

Anreicherung und Charakterisierung von *O*-Methyltransferasen aus *Arabidopsis thaliana*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Dipl.-Ing. (FH) Lisette Wirsing

geboren am 28.10.1984 in Pirna

1. Gutachter: PD Dr. Thomas Vogt
2. Gutachter: Prof. Dr. Sacha Baginsky
3. Gutachter: Prof. Dr. Birgit Piechulla

Eingereicht am: 07.02.2012

Verteidigt am: 19.06.2012

MEINER FAMILIE

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Proteomanalysen	1
1.1.1 Ausgewählte Techniken	3
1.1.2 Chemische Proteomanalysen	5
1.2 <i>O</i> -Methyltransferasen	11
1.2.1 Klassifizierung und Sequenzmotive der OMTs	12
1.2.2 Protein <i>O</i> -Methylierung	15
1.2.3 Reaktionsmechanismus der CCoAOMTs	16
1.2.4 Inhibitoren von <i>O</i> -Methyltransferasen	17
1.3 Weitere AdoMet-bindende Proteine	18
1.4 Zielstellung der Arbeit	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Pflanzenlinien sowie deren Kultivierung und Ernte	21
2.2 Bakterienstämme und deren Kultivierung	22
2.3 Verwendete Vektoren	23
2.4 Verwendete Oligonukleotide	23
2.5 Molekularbiologische Methoden	24
2.5.1 Isolierung von Nukleinsäuren	24
2.5.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
2.5.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	26
2.5.4 Klonierungstechniken	27
2.5.5 Herstellung und Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i>	28
2.5.6 Sequenzierung und Sequenzanalyse	28
2.5.7 cDNA-Erststrangsynthese	28
2.5.8 Quantitative <i>Real Time</i> PCR (qPCR)	29
2.6 Proteinbiochemische Methoden und Analytik	31
2.6.1 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial	31
2.6.2 Zellfraktionierung mit differenzieller Zentrifugation	31
2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	32
2.6.4 <i>Capture Compound Mass Spectrometry</i> (CCMS)	33
2.6.5 Anwendung der Nitrocatechol-Sonden (NC-Sonden)	34

2.6.6	SDS-PAGE	34
2.6.7	Färbung von SDS-Gelen	35
2.6.8	Immunodetektion von Proteinen	35
2.6.9	Proteinidentifizierung mit LC-MS/MS	36
2.6.10	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>	39
2.6.11	Aufreinigung des heterolog exprimierten Proteins	39
2.6.12	Enzymtest rekombinant hergestellter Proteine	39
2.6.13	Analytische HPLC-Trennung	40
2.7	Sequenzanalysen	41
2.8	Statistische Auswertung	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Anreicherung AdoMet-bindender Proteine mittels CCMS	43
3.1.1	Etablierung der CCMS-Technologie	44
3.1.2	Analyse von T-DNA-Insertionsmutanten	50
3.1.3	Einfluss verschiedener reaktiver Gruppen und Verfahren	52
3.1.4	AdoMet-bindende Proteine in anderen Organen von <i>A. thaliana</i>	56
3.1.5	Weitere AdoMet-bindende Proteine	59
3.2	CCoAOMT Anreicherung mittels Nitrocatechol-basierter Sonden	64
3.2.1	Sequenzanalysen der AtTSM1 im Vergleich zur RnCOMT	64
3.2.2	Hemmende Wirkung Nitrocatechol-basierter Inhibitoren	66
3.2.3	Kinetische Analysen zweier CCoAOMT-Inhibitoren	67
3.2.4	Kinetische Analysen der NC-Sonde	69
3.2.5	Anreicherungsstudien mittels NC-Sonde	70
3.3	Charakterisierung der AtCCoAOMT3	74
3.3.1	Proteinstruktur und Ähnlichkeitsanalysen	74
3.3.2	Heterologe Expression der AtCCoAOMT3 _{N-29}	76
3.3.3	Anreicherung der AtCCoAOMT3 mittels CCMS	78
3.3.4	<i>In vitro</i> Aktivität der rekombinanten AtCCoAOMT3 _{N-29}	81
3.3.5	Phänotypisierung einer AtCCoAOMT3 T-DNA-Insertionslinie	86
4	Diskussion	91
4.1	Proteomanalysen mit Affinitäts-basierten Sonden	91
4.1.1	Etablierung und Anwendung der <i>Capture Compounds</i>	92
4.1.2	Eigenschaften der <i>Capture Compounds</i>	93
4.1.3	Probleme bei der Detektion weiterer AdoMet-bindender Proteine mittels CCMS	97
4.1.4	Etablierung der Nitrocatechol-Sonden	100
4.1.5	Fazit und Ausblick der auf Sonden-basierten Anreicherungsverfahren	104
4.2	Charakterisierung der AtCCoAOMT3	105
4.2.1	Einordnung als CCoAOMT	106
4.2.2	<i>In vitro</i> Aktivität der AtCCoAOMT3 und <i>in silico</i> Bindungsstudien	106
4.2.3	Anreicherung mittels CCMS	110
4.2.4	Putative <i>in vivo</i> Funktionen der AtCCoAOMT3	112
4.2.5	Fazit und weiterführende Arbeiten	113

5	Zusammenfassung	115
	Literaturverzeichnis	117
	Anhang	139
1	Anreicherung AdoMet-bindender Proteine in Knospen	139
2	Klonierungsstrategie und -ablauf der erstellten Vektoren	140
3	Chromatogramme der Assays zur Substratspezifität der AtCCoAOMT3	146
4	Bindungsstudien im aktiven Zentrum der AtCAoAOMT3	148

Abkürzungsverzeichnis

Namen von Chemikalien und Molekülen, wie MgCl_2 oder Mg^{2+} , Puffer und Medien sowie Enzymbezeichnungen, die im Text näher erläutert sind, werden im Abkürzungsverzeichnis nicht aufgelistet. Für Aminosäuren wird der Ein- und Dreibuchstabencode nach IUPAC-Richtlinien und Maßeinheiten nach DIN-Norm verwendet. Aus dem Latein oder Englischen übernommene Begriffe sowie Genbezeichnungen sind in kursiver Schrift hervorgehoben.

1D	eindimensional	Bp	Basenpaare
2D	zweidimensional	c_t	engl. <i>threshold cycle</i> (Schwellenwertzyklus)
3D	dreidimensional	cAMP	engl. <i>cyclic Adenosinmonophosphate</i> (zyklisches Adenosinmonophosphat)
Å	Angström	CaOMT	engl. <i>Caffeic acid O-methyltransferase</i> (Kaffeensäure O-Methyltransferase)
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient	CC	<i>Capture Compound</i> (Eigennamen)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	CCoAOMT	engl. <i>Caffeoyl Coenzyme A O-methyltransferase</i> (Kaffeoyl-Coenzym A O-Methyltransferase)
<i>et al.</i>	lat. <i>et alia</i> (und andere)	cDNA	engl. <i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CDS	engl. <i>coding sequence</i> (kodierende Sequenz)
ABP	engl. <i>activity-based probe</i> (Aktivitäts-basierte Sonde)	CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propansulfonat
AdoHcy	<i>S</i> -Adenosyl-L-Homocystein	CID	engl. <i>collision-induced dissociation</i> (Kollisionsinduzierte Dissoziation)
AdoMet	<i>S</i> -Adenosyl-L-Methionin	Col	Columbia
AfBP	engl. <i>affinity-based probe</i> (Affinitäts-basierte Sonde)	COMT	Catechol O-methyltransferase
AK	Antikörper		
Am	<i>Ammi majus</i>		
ANOVA	engl. <i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)		
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>		
AU	engl. <i>absorption units</i> (Absorptionseinheiten)		
BAMT	AdoMet:Benzoessäure Carboxyl Methyltransferase		

d	Schichtdicke	LC	engl. <i>Liquid Chromatography</i> (Flüssigchromatographie)
Da	Dalton		
DIN	Deutsches Institut für Normung e. V.	m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
DIN	Deutsches Institut für Normung e. V.	Mc	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> (<i>M. crystallinum</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid	MES	2 (<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
DNA	engl. <i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxiribonukleinsäure)	MS	Massenspektrometrie
DNC	Dinitrocatechol	Ms	<i>Medicago sativa</i> (<i>M. sativa</i>)
DTT	Dithiothreitol	MS-Medium	Murashige & Skoog Medium
E	Extinktion	n.d.	nicht detektierbar
E_{RG}	Effizienz des Referenzgens	Na-Cholat	Natriumcholat
E_{ZG}	Effizienz des Zielgens	NASC	<i>European Arabidopsis Stock Centre</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	NC	Nitrocatechol
ESI	Elektrospray-Ionisation	NK	Negativkontrolle
gDNA	genomische DNA	Octyl	Octyl- β -D-Glucopyranosid
HPLC	engl. <i>high pressure liquid chromatography</i> (Hochdruck Flüssigchromatographie)	OD	Optische Dichte
IAA	engl. <i>indole-3-acetic acid</i> (Indol-3-Essigsäure)	OD ₂₈₀	optische Dichte bei 280 nm
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration	OMT	<i>O</i> -Methyltransferase
IL	Insertionslinie	P	Pellet
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	p	Signifikanzniveau (P-Wert)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	PA	Phenylazid
k_{cat}	katalytische Aktivität	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
k_{cat}/K_m	katalytische Effizienz	Pc	<i>Petroselinum crispum</i>
K_i	Inhibitorkonstante	PCR	Polymerasekettenreaktion
K_m	Michaelis-Menten-Konstante	PK	Positivkontrolle
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth</i> Medium	PP2A	Protein Phosphatase 2A
		PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
		Qg	Quercetagenin
		RE	Rohextrakt

Rn	<i>Rattus norvegicus</i> (<i>R. norvegicus</i>)	TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
RNA	engl. <i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)	TFA	engl. <i>trifluoroacetic acid</i> (Trifluoressigsäure)
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)	TFPA	Tetrafluorphenylazid
RT	Raumtemperatur	TMD	Transmembrandomäne
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase	UPLC	engl. <i>ultra pressure liquid chromatography</i> (Ultradruck Flüssigchromatographie)
S	Substratkonzentration	UV	ultraviolett
SAMT	AdoMet:Salizylsäure Carboxyl Methyltransferase	v	Reaktionsgeschwindigkeit
SDS	Natriumdodecylsulfat	v/v	Volumen pro Volumen
Sl	<i>Stellaria longipes</i>	w/v	Masse pro Volumen
T_R	relative Transkriptmenge	Ws	Waschfraktion
		y	Anstieg
		Ü bzw. ÜS	Überstand

Abbildungsverzeichnis

1.1	Methodenübersicht der allgemeinen Proteomanalysen	4
1.2	Chemische Proteomforschung und deren Anwendung	6
1.3	<i>On Bead</i> Verfahren der Anreicherung mittels <i>Capture Compounds</i>	9
1.4	Strukturelle Darstellung des AdoHcy-CC	10
1.5	Zellokalisierung der AtCCoAOMT3 in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums	14
1.6	S _N -2 Mechanismus der <i>O</i> -Methylierung	16
1.7	Wechselwirkung des Inhibitors BIA 3-335 mit der RnCOMT	17
2.1	Ablauf der differentiellen Zentrifugation	32
3.1	1D-Gele der CCMS verschiedener Blütenentwicklungsstadien	45
3.2	Funktionalitätsnachweis der simultanen Immunodetektion	47
3.3	Simultane Immunodetektion dreier OMTs in Blütenentwicklungsstadien	48
3.4	Relative Transkriptlevel dreier OMTs während der Blütenentwicklung	49
3.5	1D-Gel der CCMS verschiedener T-DNA-Insertionslinien	51
3.6	Gegenüberstellung der Struktur zweier reaktiver Gruppen	52
3.7	Gegenüberstellung des <i>On Bead</i> und <i>Off Bead</i> Verfahrens	53
3.8	1D-Gele der CCMS mit unterschiedlichen Sonden und Verfahren	54
3.9	1D-Gele der CCMS verschiedener Organe und Entwicklungsstadien	57
3.10	Relative Transkriptlevel dreier OMTs in verschiedenen Organen und Entwicklungsstadien	59
3.11	1D-Gele der CCMS nach differentieller Zentrifugation	61
3.12	Sequenzvergleich der AtTSM1 zur RnCOMT	65
3.13	Putative CCoAOMT-Inhibitoren	67
3.14	CCoAOMT-Inhibitoren im Vergleich zu Entacapon	68
3.15	Dixon-Diagramme der Inhibitoren 4 und 7 sowie der NC-Sonde	69
3.16	Strukturelle Darstellung der NC-Sonde	70
3.17	1D-Gele und simultane Immunodetektion der Anreicherung von CCoAOMTs	71
3.18	1D-Gele und simultane Immunodetektion der Waschfraktionen der CCoAOMT Anreicherung	73
3.19	AtCCoAOMT3 Sequenzvergleich mit sechs pflanzlichen CCoAOMTs	75
3.20	1D-Gele der Expression der rekombinanten AtCCoAOMT3 in zwei Varianten	77
3.21	1D-Gel der Aufreinigung rekombinant hergestellter AtCCoAOMT3 _{N-29}	78
3.22	1D-Gel und Immunodetektion der Anreicherung rekombinanter AtCCoAOMT3 _{N-29} durch AdoHcy-CCs	79
3.23	1D-Gel der CCMS verschiedener Wurzelproteinproben	80
3.24	Kinetische Analyse der rekombinanten AtCCoAOMT3 _{N-29} mit Quercetagetin	84

3.25	<i>In vitro</i> Enzymassays der AtCCoAOMT3 _{N-29} mit Quercetagetin	85
3.26	<i>In vitro</i> Enzymassays der AtCCoAOMT3 _{N-29} mit unterschiedlichen Kationen	86
3.27	Homozygotiebestimmung der <i>Atccoamt3</i> T-DNA-Insertionslinie	87
3.28	Analyse des Volllängentranskriptes in der <i>Atccoamt3</i> T-DNA-Insertionslinie	88
3.29	Keimungsraten der <i>Atccoamt3</i> T-DNA-Insertionslinie	89
4.1	Oberflächendarstellung der AtTSM1 mit gebundenem AdoHcy-CC	94
4.2	Wechselwirkung des NC-Inhibitors 4 mit dem Protein AtTSM1	100
4.3	Oberflächendarstellung der AtTSM1 mit gebundener NC-Sonde	103
4.4	3D-Strukturmodell der AtCCoAOMT3	107
4.5	Wechselwirkung des Quercetagetin mit dem aktiven Zentrum der AtCCoAOMT3	109
4.6	Kinetische Analyse der AtCCoAOMT3 mit Peptiden als Substrat	110
4.7	Wechselwirkung des Tetrapeptides mit dem aktiven Zentrum der AtCCoAOMT3	111
1	1D-Gele der CCMS der Knospentadien A bis C vereint	139
2	Schematische Darstellung des Klonierungsvektors pGEM [®] -T Easy	140
3	Schematische Darstellung des Expressionsvektors pQE30	141
4	Klonierungsstrategie	142
5	Schematische Darstellung des Konstruktes pGEM-T Easy: <i>At3g61990</i> CDS komplett	143
6	Schematische Darstellung des Konstruktes pGEM-T Easy: <i>At3g61990</i> CDS -87 Bp	144
7	Schematische Darstellung des Konstruktes pQE30: <i>At3g61990</i> CDS komplett	144
8	Schematische Darstellung des Konstruktes pQE30: <i>At3g61990</i> CDS -87 Bp	145
9	Chromatogramme der Enzymassays der AtCCoAOMT3 mit Flavonoiden	146
10	Chromatogramme der Enzymassays der AtCCoAOMT3 mit anderen Phenylpropa- noiden	147
11	<i>Docking</i> von Quercetagetin in das aktive Zentrum der AtCCoAOMT3	148
12	<i>Docking</i> eines Tetrapeptides in das aktive Zentrum der AtCCoAOMT3	149

Tabellenverzeichnis

1.1	Vom Gen zum Protein	2
1.2	Sondenvergleich	8
1.3	Sequenzdomänen pflanzlicher Kaffeoyl-CoA-OMTs und Kaffeesäure-OMTs	12
2.1	Verwendete Pflanzenlinien	22
2.2	Verwendete Oligonukleotide	23
2.3	Amplifikationsprofil einer PCR	26
2.4	qPCR Ansatz	29
2.5	Amplifikationsprofil einer qPCR	29
2.6	Gegenüberstellung der beiden verwendeten LC-MS/MS-Systeme	38
2.7	Zusammensetzung der <i>in vitro</i> Enzymassays	40
2.8	Parameter der analytischen HPLC-Trennung	41
3.1	Blütenentwicklungsstadien von <i>A. thaliana</i>	44
3.2	Mittels MS-Analysen identifizierte Proteine der Blütenentwicklungsstadien	46
3.3	Vergleich der Proteindetektion zweier Sonden in unterschiedlichen Verfahren	55
3.4	Detergenzien zur Solubilisierung von Membranproteinen	60
3.5	Angereicherte AdoMet-bindende Proteine nach differentieller Zentrifugation	62
3.6	Angereicherte AdoMet-bindende Proteine durch direkte MS-Messung	63
3.7	<i>In vitro</i> Aktivität rekombinanter AtCCoAOMT _{3N-29}	82

1 Einleitung

Pflanzen sind sessile Organismen, die einer Vielzahl von biotischen und abiotischen Stressfaktoren ausgesetzt sind. Sie reagieren auf verschiedenste Reize und Bedingungen in ihrer Umgebung, indem sie sich anpassen. In diesem Zusammenhang spielen Proteine und Enzyme, welche eine Vielzahl von funktionellen und strukturellen Eigenschaften besitzen, eine wichtige Rolle (Patterson & Aebersold, 2003; Heazlewood, 2011). Sie stellen eine Brücke zwischen Genotyp und Phänotyp dar, indem der molekulare Phänotyp, das Metabolom, direkt durch genkodierte Proteine und Enzyme chemisch synthetisiert und modifiziert wird (Rose *et al.*, 2004; Whitelegge *et al.*, 2011). Demzufolge sollte die Kombination von Proteomanalysen im Großdurchsatz und der biochemischen Charakterisierung einzelner Enzyme Aufschluss über biologische Prozesse geben, da so die Diversität von Proteinen in unterschiedlichen Organen, Geweben oder Zellen aufgeklärt, aber auch der Reaktionsmechanismus eines einzelnen Proteins erforscht werden kann.

1.1 Proteomanalysen

Der Begriff "Proteom", das Protein als Gegenstück zum Genom, wurde Mitte der 1990er Jahre geprägt (Wilkins *et al.*, 1995; 1996) und definiert alle zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle exprimierten Proteine, wobei deren Isoformen und Modifikationen eingeschlossen sind (Rappsilber & Mann, 2002). Die Anzahl der Proteine einer Zelle übersteigt die der kodierenden Gene bei weitem, da ein Gen viele unterschiedliche Proteinvariationen hervorbringen kann. Diese Diversität wird durch alternatives *Splicing* des Primärtranskripts, dem Auftreten von Sequenzpolymorphismen, posttranslationalen Modifikationen und anderen Proteinprozessierungen erreicht (Tabelle 1.1 sowie Domon & Aebersold (2006)). Zudem liegt das Proteom wie auch das Transkriptom einer Zelle dynamisch vor, da es als Antwort auf den Zellzustand und externe Reize ständig variiert wird. Im Gegensatz hierzu ist das Genom statisch und somit in allen Zellen eines Organismus gleich (Rappsilber & Mann, 2002; Newton *et al.*, 2004; Heazlewood & Millar, 2007). Die zugehörige Proteomanalyse ist einerseits eine systematische Studie der Gesamtheit aller Proteine und Proteinformen (Heazlewood & Millar, 2007), andererseits stellt sie aber auch detaillierte Beschreibungen der Struktur, Funktion und Kontrolle biologischer Systeme bereit, indem sie die Funktion einzelner Proteine aufklärt (Patterson & Aebersold, 2003).

Tabelle 1.1: Vom Gen zum Protein (bearbeitet; Ovaa & van Leeuwen (2008)). Darstellung der Regulation und Modifikationsvielfalt innerhalb der Biosynthese von Proteinen. Die Diversität nimmt zum Protein hin zu.

Biosyntheseebene	Regulation und Modifikation
DNA (Genom)	Kopienanzahl (Deletion, Amplifikation, Aneuploidie) Sequenz (Mutation, Umlagerung)
mRNA (Transkriptom)	Kopienanzahl (Expressionslevel) Sequenz (<i>Splicing</i> -Varianten, Transkriptionsstart und -stop)
Protein (Proteom)	Kopienanzahl (Expressionslevel) Sequenz (Prozessierung) Aktivität Komplexbildung, Interaktion mit Proteinen Posttranslationale Modifikationen Lokalisierung Dynamik Umsatz, Abbau Cofaktoren, Regulation durch kleine Moleküle

Die Proteomforschung teilt sich im Wesentlichen in vier Gebiete: die Proteinidentifizierung, die quantitative Proteomik, die Detektion posttranslationaler Modifikationen und die funktionelle Proteomik. Ziel der Proteinidentifizierung eines Gesamtproteoms ist es, alle zu einem Zeitpunkt in einer Probe enthaltenen Proteine nachzuweisen. Meist beziehen sich diese Analysen auf einzelne Organe oder Gewebe (Sheoran *et al.*, 2007; Baerenfaller *et al.*, 2008; Castellana *et al.*, 2008; Heazlewood, 2011). Die quantitative oder vergleichende Proteomik beschäftigt sich mit der Veränderung von Proteinmustern innerhalb bestimmter biologischer Prozesse (Schulze & Usadel, 2010; Bindschedler & Cramer, 2011; Takác *et al.*, 2011). Die dritte Strategie verfolgt die Erfassung posttranslationaler Modifikationen von Proteinen sowie die Analyse möglicher Isoformen (Rappsilber & Mann, 2002; Mann & Jensen, 2003). Die funktionelle Proteomik (Hirano *et al.*, 2004) betrachtet die Interaktion von Proteinen (Interaktomik; Köcher & Superti-Furga (2007); Jorrín-Novo *et al.* (2009)) sowie die Funktion und Struktur einzelner Proteine (gerichtete Proteomik; Jorrín-Novo *et al.* (2009)).

Nachdem das Genom der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) entschlüsselt war (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) und sich weitere Pflanzengenome (zum Beispiel das Reisgenom; Goff *et al.* (2002); Yu *et al.* (2002)) anschlossen, wurde es notwendig und sinnvoll auch in Pflanzen Proteomanalysen zu standardisieren. In den letzten Jahren gewann die Pflanzenproteomik zunehmend an Bedeutung, auch wenn die Human- oder Säugerproteomforschung sowie die Hefeproteomik weiter fortgeschritten sind (Jorrín-Novo *et al.*, 2009). Die Entwicklung der Pflanzenproteomik im Allgemeinen ist in diversen Übersichtsartikeln (Rossignol *et al.*, 2006; Jorrín *et al.*, 2007; Baginsky, 2009; Jorrín-Novo *et al.*, 2009; Heazlewood, 2011) zusammengefasst.

1.1.1 Ausgewählte Techniken

Zu Beginn der meisten Proteomanalysen steht die Proteinextraktion, welche einen kritischen Schritt für die späteren Aussagen der Analysen darstellt. Einen Überblick über die Anforderungen an Extraktionstechniken geben Heazlewood & Millar (2007). In Pflanzen bildet die Zellwand eine physische Barriere, die überwunden wird, indem ein meist mechanisches Aufbrechen des Pflanzenmaterials erfolgt. Des Weiteren ist in pflanzlichen Zellen der Proteinanteil relativ gering und das resultierende Proteinextrakt häufig durch Sekundärmetabolite wie Phenole sowie durch Fette und Kohlenhydrate verunreinigt. Die Reduktion der Kontaminanten wiederum kann einen Verlust an Protein verursachen. Zudem ist es nicht möglich, alle Proteine mit den selben Methoden zu extrahieren. Die Solubilisierung von Membranproteinen bedingt zum Beispiel Pufferzusätze wie Detergenzien. Die Auswahl der Extraktionsbedingungen hängt aber nicht nur von der Proben- und Proteinbeschaffenheit ab, sondern auch maßgeblich von den sich anschließenden Messmethoden, da Pufferbestandteile die Analysemethoden stören können (Isaacson *et al.*, 2006; Heazlewood & Millar, 2007; Jorrín-Novo *et al.*, 2009; Bindschedler & Cramer, 2011). Alle Methoden weisen ihre Vor- und Nachteile auf, weshalb die Wahl der Extraktionsmethode aber auch der Analysetechnik letztendlich immer von dem zu untersuchenden Material und dem Ziel des Experiments abhängt.

Die Abbildung 1.1 gibt einen generellen Überblick der Methoden zur Proteomanalyse. Die hier aufgeführten Techniken erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit und sollen lediglich einen kleinen und ausgewählten Überblick bieten, der sich am Fokus der Arbeit ausrichtet. Heazlewood & Millar (2007) sowie May *et al.* (2011) erläutern die angegebenen und andere, den Fokus dieser Arbeit nicht betreffende, Techniken im Überblick.

Die Gel-basierten Methoden ermöglichen die Färbung der Proteine im Gel, bevor diese durch Verdau mit Proteasen und Massenspektrometrie (MS) identifiziert werden. Hierbei ermöglicht die 1D-Polyacrylamidgelelektrophorese (1D-PAGE) die Auftrennung eines Proteingemisches nach dessen Molekulargewicht und ist mit den meisten Extraktionsmethoden kompatibel. Jedoch ist die schlechte Auflösung, aufgrund mehrerer Proteine vergleichbarer Masse in einer Bande, nachteilig. In der dahingehend weiterentwickelten 2D-PAGE (1. Dimension nach isoelektrischem Punkt, 2. Dimension nach Molekulargewicht; Heazlewood & Millar (2007); Jorrín-Novo *et al.* (2009); May *et al.* (2011)) können hydrophobe, basische oder sehr große Proteine allerdings unlöslich und somit nicht detektierbar sein (Santoni *et al.*, 1999; 2000). Deshalb wurde trotz besserer Auflösung und Sensitivität dieser Methode eine Entwicklung zurück zur 1D-PAGE verfolgt (Heazlewood & Millar, 2007). Gründe hierfür liegen in der nahezu uneingeschränkten Anwendbarkeit der 1D-PAGE und der verbesserten Sensitivität der MS-Analysen, welche die Detektion von mehreren hundert Proteinen in einer Bande ermöglichen. Beispielsweise konnten verschiedene membranassoziierte

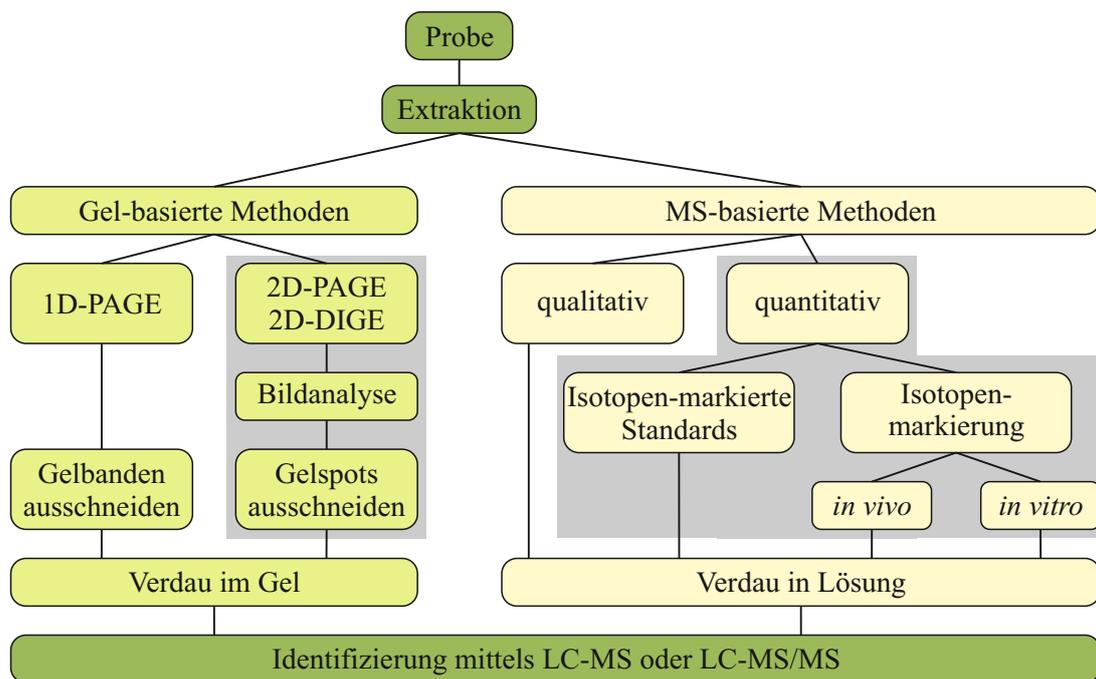


Abbildung 1.1: Methodenübersicht der allgemeinen Proteomanalysen (bearbeitet; May *et al.* (2011)). Die dargestellten Abläufe sollen einen schematischen Überblick der Techniken geben. Grau unterlegte Methoden sind im Text nicht näher beschrieben, da sie in der vorliegenden Arbeit nicht zur Anwendung kamen.

Enzymklassen (Primär- und Sekundärtransporter, Ionenkanäle und Aquaporine) identifiziert werden, indem gesamte Spuren von 1D-Gelen in Sektionen zerteilt und diese einzeln mit MS-Methoden analysiert wurden (Whiteman *et al.*, 2008; Nilsson *et al.*, 2010).

Eine andere Strategie Proteine zu detektieren ist die MS-basierte Methode, welche Massenspektrometer als Analysensysteme verwendet. Vor der Massenspektrometrie wird meist eine Flüssigchromatographie (LC) durchgeführt, welche die Peptide nach ihrer Hydrophobizität trennt. Massenspektrometer können anschließend genutzt werden, um die Massen einzelner Peptide zu bestimmen (einfache MS-Messung). Zusätzlich können im Anschluss spezifische Ionen ausgewählt und fragmentiert werden, wobei die Bestimmung der Fragmentmassen in weiteren Schritten die Sequenzierung einzelner Peptide oder die Detektion posttranslationaler Modifikationen ermöglicht. Dieser Prozess wird auch als Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) bezeichnet (Domon & Aebersold, 2006). Die Probenextraktion für direkte MS-Analyse (ohne PAGE) erfordert das Entfernen aller Detergenzien und Salze aus den Proben (Heazlewood & Millar, 2007), wobei in den letzten Jahren Extraktionsmethoden für Pflanzenmaterial entwickelt wurden, die mit der MS kompatibel sind (Isaacson *et al.*, 2006; Sheoran *et al.*, 2009). Der Vorteil einer direkten MS-Analyse eines gereinig-

ten Extraktes liegt in der Kosten- und Zeitersparnis, da die Extrakte vorher nicht mittels PAGE aufgetrennt werden müssen. Nachteilig wirkt die Dominanz hoch abundanter Proteine, die niedrig abundante Proteine maskieren können (Newton *et al.*, 2004; Heazlewood & Millar, 2007). Ein in Pflanzen weit verbreitetes Beispiel dieser Maskierung stellt die RuBisCO in grünem Blattmaterial dar (Cellar *et al.*, 2008).

Während sich die Genom- und Transkriptomanalysen auf die Möglichkeit der Amplifikation des zu untersuchenden Objekts stützen können, ist dies im Bereich der Proteomanalyse nicht möglich (Rose *et al.*, 2004). Des Weiteren sind es meist die Proteine, die in kritischen biologischen Prozessen eine Rolle spielen, die gering exprimiert und schnell wieder abgebaut werden (Newton *et al.*, 2004). Dies führt zu Einschränkungen der Messmöglichkeiten durch fehlende Sensitivität und es ist nicht möglich, das gesamte Proteom mittels einzelner Messungen zu detektieren (Ahn *et al.*, 2007). Eine Verbesserung der Proteomanalysen kann durch Vorfraktionierungen der Proben erreicht werden (Millar, 2004; Eubel *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009; Hynes *et al.*, 2009; Ferro *et al.*, 2010). Zudem bietet eine gezielte, selektive Anreicherung einzelner Proteine oder eines Subproteoms eine weitere Möglichkeit, zumindest die gewählten Zielproteine qualitativ und teilweise quantitativ zu erfassen. In diesem Zusammenhang können Techniken wie Affinitäts- (Chan *et al.*, 2004) oder Aktivitäts-basierte Anreicherungen (Heal *et al.*, 2011) genannt werden, die in der chemischen Proteomforschung zum Einsatz kommen.

1.1.2 Chemische Proteomanalysen

Die chemische Proteomforschung wird genutzt, um aktive Proteinformen zu isolieren (funktionelle Proteomik), Subproteome zu erstellen, posttranslationale Modifikationen zu detektieren oder Proteininteraktionen (Interaktionsproteomik), wie die von Medikamenten zu ihren Zielproteinen, zu testen (Ovaa & van Leeuwen, 2008; Tate, 2008; Uttamchandani *et al.*, 2009; Lenz *et al.*, 2011). Ein Beispiel der Anwendung in der funktionellen Proteomik ist der Nachweis aktiver Serinhydrolasen in Krebszelllinien (Jessani *et al.*, 2004). Weiterhin beschrieben Wissing *et al.* (2007) eine Anreicherung des Subproteoms der Kinasen und verbanden dies mit der Untersuchung von Phosphorylierungsstellen. Auf dem Gebiet der Interaktionsproteomik konnten erfolgreich die bei Parkinson angewendeten Catechol-OMT-Inhibitoren, die Nitrocatecholderivate Tolcapon und Entacapon, auf ihre Nebenwirkungen getestet werden (Fischer *et al.*, 2010b). Die zur chemischen Proteomanalyse verwendeten Methoden sind in Abbildung 1.2 gemeinsam mit den Anwendungsgebieten und verwendeten selektiven Gruppen zusammengefasst.

In der chemischen Proteomik stehen Sonden, die selektiv mit Proteinen interagieren, im Mittelpunkt und sind ein kritischer Teil dieser Technik. Der Aufbau dieser Sonden kann im Allgemeinen als selektive Gruppe, die über einen Linker mit einer Detektionseinheit verbunden ist oder in Ver-

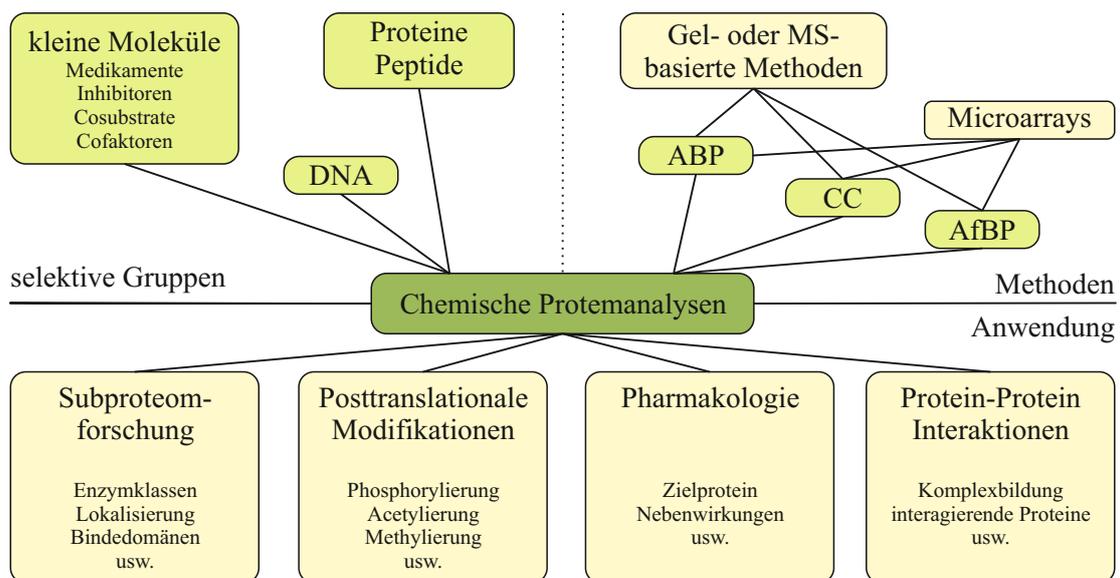


Abbildung 1.2: Chemische Proteomforschung und deren Anwendung. Oben sind die Methoden der chemischen Proteomanalysen sowie die verwendeten selektiven Gruppen der Sonden dargestellt. Diese ermöglichen gemeinsam die unten genannten Anwendungen. ABP - Aktivitäts-basierte Sonde; CC - *Capture Compound*; AfBP - Affinitäts-basierte Sonde; MS - Massenspektrometrie

bindung treten kann, vereinfacht beschrieben werden. Die selektiven Gruppen, welche die Affinität zum zu inhibierenden oder anzureichernden Protein bilden, können unterschiedlichster Form sein. Es sind Sonden mit Proteinen, Peptiden, Antikörpern, DNA-Fragmenten oder kleinen Molekülen (Inhibitoren, Medikamente, Cosubstrate usw.) bekannt und in ihrer Anwendung getestet worden (Winnacker *et al.*, 2009; Kaake *et al.*, 2010; Ivanov *et al.*, 2011; Lenz *et al.*, 2011). Proteine und Peptide wurden beispielsweise erfolgreich zur Anreicherung von Proteinkomplexen aus Säugerzellen verwendet (*Tandem Affinity Purification*; Bürckstümmer *et al.* (2006)). Wright & Cravatt (2007) publizierten ein Beispiel für die Anwendung von kleinen Molekülen, hier Inhibitoren, zur Reinigung und Analyse von aktivem Cytochrom P450 Proteinen *in vivo*. Allerdings können sich die Sonden je nach Anwendung und Ziel der Experimente im Grundaufbau unterscheiden und verschiedenen Gruppen zugeordnet werden. So unterteilen sich die Sonden in Affinitäts-basierte Sonden (AfBPs), Aktivitäts-basierte Sonden (ABPs) und *Capture Compounds* (CCs). Der Aufbau und die wichtigsten Eigenschaften der Sonden werden im nächsten Abschnitt und in Tabelle 1.2 näher beschrieben.

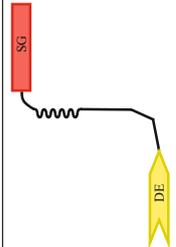
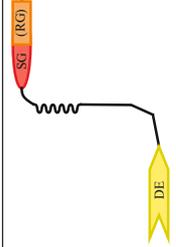
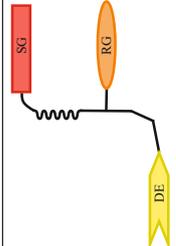
Die Grundlagen der Entwicklung Affinitäts-basierter Sonden (AfBPs) liegen in der klassischen Affinitätschromatografie. Eine selektive Gruppe, welche aufgrund spezifischer Wechselwirkungen mit dem Zielprotein interagiert, ist über einen *Linker* mit einer Detektionseinheit oder einer Festphase gekoppelt. Die Detektionseinheit wird verwendet, um die gebundenen Proteine sichtbar zu

machen (zum Beispiel Fluoreszenzfarbstoffe) oder sie in weiteren Schritten anzureichern (zum Beispiel Biotin-Streptavidin Kopplung oder Festphasenkopplung). Meist werden diese Sonden in *in vitro* Untersuchungen eingesetzt und die Anreicherung erstreckt sich über alle (auch inaktive) Proteinzustände (Rix & Superti-Furga, 2009; Lenz *et al.*, 2011).

Aktivitäts-basierte Sonden (ABPs) bestehen ebenfalls aus zwei funktionellen Gruppen, einer selektiven Einheit (gleichzeitig reaktiv) und der Detektionseinheit, welche wiederum durch einen *Linker* räumlich voneinander getrennt werden. Die selektive oder reaktive Einheit entspricht einem Molekül, welches selektiv und kovalent im aktiven Zentrum eines Enzyms bindet und es irreversibel inhibiert. Die Detektionseinheit hat die selben Eigenschaften wie in AfBPs. Mit diesen Sonden ist es möglich aktives Enzym anzureichern und zu analysieren (Evans & Cravatt, 2006; Cravatt *et al.*, 2008; Kolodziejek & van der Hoorn, 2010; Heal *et al.*, 2011; Lenz *et al.*, 2011). Zudem kommen ABPs auch bei *in vivo* Studien zum Einsatz, indem eine Markierungsmethode in zwei Schritten verwendet wird. Hierbei werden die selektiven Gruppen in den entsprechenden Organismus integriert, indem beispielsweise Blätter mit ihrem Stiel in einer die selektive Einheit enthaltenden Lösung inkubiert werden (Kaschani *et al.*, 2009b). Nach der Bindung der gesuchten Proteine wird ein Zellextrakt erzeugt und die Moleküle mit gebundenem Zielprotein über bioorthogonal verlaufende Reaktionen, vornehmlich Klickchemie (Kolb *et al.*, 2001; Kolb & Sharpless, 2003), mit der Detektionseinheit gekoppelt. Dies ermöglicht Aussagen über aktive Proteine in ihrer natürlichen Umgebung und stellt einen enormen Fortschritt der heutigen Proteomanalysen dar (Prescher & Bertozzi, 2005; Kalesh *et al.*, 2010). Ein Beispiel der Markierungsmethode in zwei Schritten ist die *in vivo* Anreicherung von aktiven Histon-Deacetylasen mit Suberoylanilid-Hydroxamsäure als selektive Gruppe der verwendeten Sonde (Salisbury & Cravatt, 2008).

Eine dritte Form von Sonden sind *Capture Compounds* (CCs), welche in der *Capture Compound Mass Spectrometry* (CCMS) eingesetzt werden. Diese trifunktionellen Sonden enthalten, wie der Name andeutet, drei getrennte funktionelle Gruppen und vereinen Eigenschaften beider zuvor beschriebenen Sonden. Wie die AfBPs umfassen sie eine frei zugängliche Detektionseinheit oder Festphasenkopplung sowie eine selektive Gruppe, die reversibel in diesem Fall mit dem aktiven Zentrum eines Proteins interagiert. Die dritte funktionelle Einheit ist eine reaktive Gruppe, die bei den ABPs bereits in der selektiven Gruppe integriert ist. In diesem Fall liegt sie jedoch räumlich getrennt von der selektiven Gruppe vor. Diese reaktive Einheit wird nach der reversiblen Bindung der affinen Proteine (zum Beispiel durch UV-Bestrahlung) aktiviert und es erfolgt die kovalente Bindung der Sonde außerhalb des aktiven Zentrums an der Proteinoberfläche (Köster *et al.*, 2007; Lenz *et al.*, 2011).

Tabelle 1.2: Sondenvergleich (bearbeitet; Lenz et al. (2011)). Gegenüberstellung von Aufbau, Struktur, Funktion und Anwendung der AFPs, ABPs und CCs sowie der Eigenschaften der Proteine nach der Anreicherung. SG - selektive Gruppe, RG - reaktive Gruppe, DE - Detektionseinheit.

Eigenschaft	Affinitäts-basierte Sonde (AFP)	Aktivitäts-basierte Sonde (ABP)	Capture Compound (CC)
allgemeine Struktur			
Aufbau	selektive Gruppe über <i>Linker</i> mit Detektionseinheit oder Matrix verbunden	selektive und reaktive Gruppe über <i>Linker</i> an Detektionseinheit gekoppelt	selektive sowie reaktive Gruppe und Detektionseinheit getrennt durch <i>Linker</i>
Anwendung	Festphase, selten in Lösung	in Lösung	Festphase, in Lösung
Interaktion mit Zielprotein und Bindungsstelle	Affinitäts-basiert, keine kovalente Bindung, Bindungsstelle nicht detektierbar	kovalente Bindung im aktiven Zentrum	Affinitäts-basiert, anschließend kovalente Bindung außerhalb des aktiven Zentrums in definierter Entfernung zur Wechselwirkungsstelle der selektiven Gruppe
Eigenschaften der Zielproteine	meist hydrophile Proteine	große Komplexe und lipophile Proteine möglich	große Komplexe und lipophile Proteine möglich
Affinität der Zielproteine	meist hoch affine Proteine	niedrig abundante und/oder affine Proteine, katalytische Aktivität erforderlich	niedrig abundante und/oder affine Proteine
Washvorgang	Optimierung zur Wechselwirkungsstärke, generell mild	stringent	stringent
Zielproteine nach Anreicherung	katalytische Funktion erhalten	keine katalytische Funktion	katalytische Funktion kann regeneriert werden

Anwendungen der *Capture Compounds*

Da in dieser Forschungsarbeit die Anreicherung bestimmter Proteinklassen mit CCs im Vordergrund stand, sollen hier einige Anwendungen in der Erstellung von Subproteomen genannt und beschrieben werden. Der Einsatz dieser Sonden konzentriert sich sowohl in der Subproteomanalyse als auch in der Pharmakologie (hier nicht diskutiert) bisweilen auf die Human- und Säugerforschung (Lenz *et al.*, 2011). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit erfolgte eine erste Anwendung im Hinblick auf pflanzliche Proteomstudien (Wirsing *et al.*, 2011). Ein Schema des Anreicherungsprinzips mittels CCs im *On Bead* Verfahren ist in Abbildung 1.3 dargestellt.

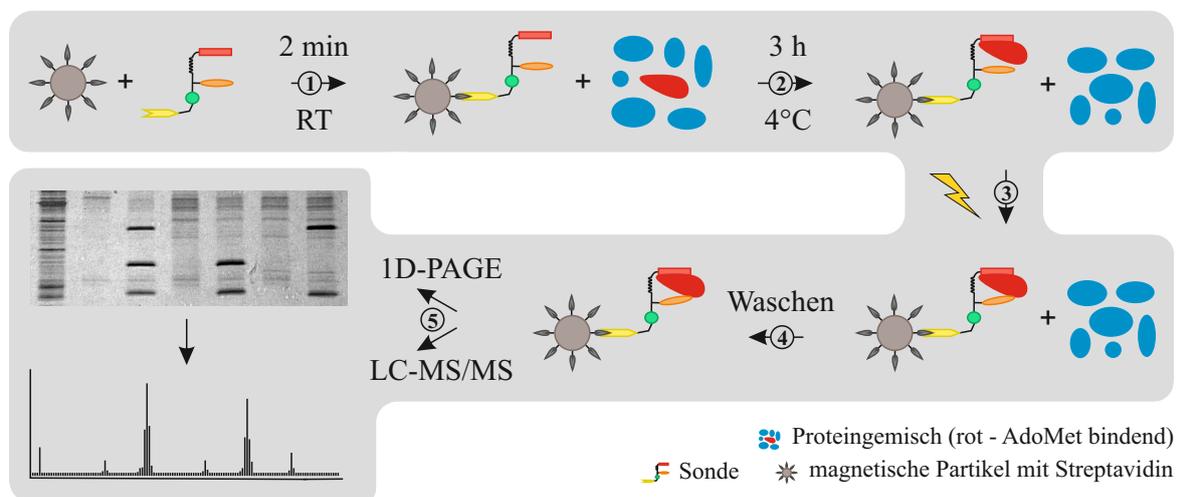


Abbildung 1.3: *On Bead* Verfahren der Anreicherung mittels *Capture Compounds*. Erst erfolgt die Kopplung der Sonde an die magnetischen Partikel (1) und die reversible Bindung der Proteine (2). Als nächstes wird die irreversible Bindung durch UV-Bestrahlung hergestellt (3) und ein stringenter Waschvorgang angeschlossen (4). Nach dem Entfernen der magnetischen Partikel können die angereicherten Proteine mittels PAGE oder direkter MS-Analyse detektiert werden (5). RT - Raumtemperatur

Im *On Bead* Verfahren werden die Sonden über Biotin (Detektionseinheit) an die mit Streptavidin überzogenen, magnetischen Partikel gebunden (1). Im nächsten Schritt erfolgt die Zugabe des Proteinextraktes (2), wobei die spezifische Interaktion der selektiven Gruppe mit dem Zielprotein stattfindet. Die reaktive Einheit wird anschließend über UV-Bestrahlung aktiviert und reagiert nun irreversibel mit dem Protein von Interesse (3). Nachdem die Proteine kovalent an die Sonde gebunden sind, können verschiedene Waschschrte (4) und anschließend die Detektion (5) mittels PAGE bzw. direkter LC-MS/MS-Messung erfolgen (caprotecTM bioanalytics GmbH, 2010).

CCs konnten zur Anreicherung einzelner Enzymklassen bereits erfolgreich verwendet werden. In Lysaten von *Escherichia coli* (*E. coli*), Säugerzellkulturen und subzellulären Fraktionen von Säugerhirnen konnten, über eine Sonde mit zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) als selektiver Gruppe, cAMP-bindende Proteine detektiert werden (Luo *et al.*, 2009). GTPasen wurden durch Luo *et al.* (2010) mit Sonden, die Guanosindiphosphat als selektive Gruppe enthalten, aus *E. coli*- und Säugerzelllysaten angereichert. Eine weitere Anwendung bestand in der Anreicherung von 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen aus Säugerzelllysaten durch Rotili *et al.* (2011b). Weiterhin wurden durch Rotili *et al.* (2011a) Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen durchgeführt. Hier wurde ein C-terminales Peptid eines durch Sauerstoffmangel induzierten Transkriptionsfaktors an eine Sonde gekoppelt, um die Komplexbildung mit anderen Proteinen nachzuweisen. Auch bestimmte Methyltransferasen aus *E. coli*-Lysat konnten bereits mittels CCMS selektiert werden (Dalhoff *et al.*, 2010). In den verwendeten Sonden wurde *S*-Adenosyl-L-Homocystein (AdoHcy) als selektive Gruppe verwendet (Abbildung 1.4). Die Anwendung der AdoHcy-CCs erfolgte im Laufe des hier vorgestellten Projektes erstmals in Pflanzen, genauer an Pflanzenmaterial aus *A. thaliana* (Wirsing *et al.*, 2011). Weitere Erfolge wurden in der Anreicherung von Kinasen bzw. der Interaktionsstudie mit Staurosporin, Dasatinib und Imatinib erzielt. Dies sind drei Kinase-Inhibitoren, welche unterschiedliche Kinasen als Zielproteine binden und sich so gegenseitig ergänzen (Fischer *et al.*, 2010a; 2011a;b). Eine der neuesten Entwicklungen ist eine Affinitätsbasierte Sonde, die mit Histon-Deacetylasen interagiert und ebenfalls in der Pharmaforschung eingesetzt werden kann. Als selektive Gruppe wurde hierbei eine dem Medikament Vorinostat ähnliche Verbindung gewählt, um für die Krebsforschung relevante Studien zu ermöglichen (Fischer *et al.*, 2011c).

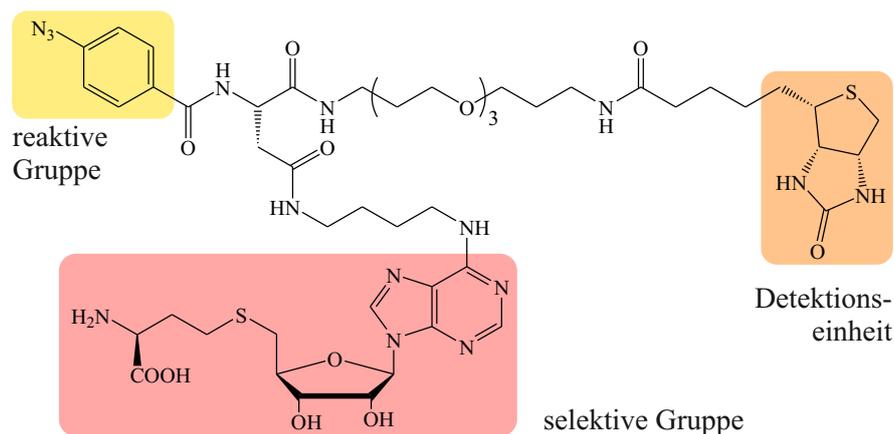


Abbildung 1.4: Strukturelle Darstellung des AdoHcy-CC. Die funktionellen Gruppen sind in verschiedenen Farben hervorgehoben.

1.2 O-Methyltransferasen

Der Stoffwechsel einer Pflanze kann in Primär- und Sekundärstoffwechsel unterteilt werden. Der Primärstoffwechsel ist essentiell für die Entwicklung, das Wachstum und die Fortpflanzung eines Organismus. Die Stoffwechselwege und gebildeten Verbindungen sind in Tieren, Pflanzen, Bakterien, Pilzen und anderen Organismen aufgrund des hohen Selektionsdrucks konserviert, wenn auch nicht identisch. Der Sekundärstoffwechsel der Pflanzen hingegen ist sehr variabel. Aufgrund ihrer sessilen Lebensweise müssen sich Pflanzen fortwährend an ihre Umgebung anpassen. Die Vielfalt der Sekundärmetabolite spielt somit eine besondere Rolle in der Interaktion der Pflanze mit ihrer Umwelt. Die entstehenden Metabolite können verschiedenste Funktionen, wie Abwehr oder Signalübertragung, erfüllen (Wink, 2003; Hartmann, 2007; Springob & Kutchan, 2009; Aharoni & Galili, 2011). Die Variabilität dieser Sekundärmetabolite ist das Ergebnis von verschiedenen Substitutionsreaktionen durch substrat- und positionsspezifische Enzyme (Lam *et al.*, 2007). Hierbei sind neben Glycosyl- und Acyltransferasen die *S*-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet) abhängigen Methyltransferasen [E.C. 2.1.1.-] hervorzuheben, welche den Transfer von Methylgruppen vom Methylgruppendonor AdoMet auf einen Methylgruppenakzeptor katalysieren. Das entsprechende methylierte Derivat und AdoHcy sind folglich Produkte dieser Reaktion. Vertreter der Methyltransferasen werden nach den Atomen eingeteilt, an welche die Methylgruppe transferiert wird. *N*-Methyltransferasen können Proteine, DNA, Phosphoethanolamine und Sekundärmetabolite an Stickstoffatomen methylieren und spielen beispielsweise eine kritische Rolle in der Transkriptionregulation. Die *C*-, Thiol- und Halogenionen-Methyltransferasen agieren, wie die Namen bereits andeuten, an den Kohlenstoffatomen, Thiolgruppen bzw. Halogenionen ihrer Substrate. Eine weitere Gruppe stellen die *O*-Methyltransferasen dar, welche in den anschließenden Abschnitten näher charakterisiert werden (Ibrahim & Muzac, 2000; Roje, 2006).

Die *O*-Methyltransferasen (OMTs) katalysieren die Methylierung der Sauerstoffatome von Hydroxygruppen an einer Vielzahl von hydroxylierten Substraten (Abbildung 1.6; Ibrahim & Muzac (2000)). Neben Hydroxygruppen sind bestimmte OMTs auch in der Lage Carboxyl-Funktionen zu methylieren (Mudgett & Clarke, 1996; Ibrahim & Muzac, 2000; Xu *et al.*, 2004; Villa *et al.*, 2006). OMTs sind sowohl in Pflanzen als auch in Säugern und Prokaryonten weit verbreitet. In tierischen Organismen sind sie meist in der Inaktivierung von Neurotransmittern oder der Entgiftung involviert (Vidgren *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1994). In Pflanzen methylieren sie vorwiegend phenolische Substanzen, wie Flavonoide, Phenylpropanoide aber auch Alkaloide (Joshi & Chiang, 1998; Ibrahim & Muzac, 2000; Humphreys & Chapple, 2002; Lam *et al.*, 2007). Die entstehenden Produkte spielen als Vorstufen des Lignins, als Antioxidantien, als pharmakologisch aktive oder antimikrobielle Substanzen (Phytoalexine) sowie in der Interaktion von Pflanzen mit ihrer Umgebung eine wichtige Rolle (Wink, 2003).

1.2.1 Klassifizierung und Sequenzmotive der OMTs

Von Joshi und Chiang wurden 1998 Sequenzvergleiche mit 56 pflanzlichen Methyltransferasen durchgeführt. Diese Studie konnte drei Motive identifizieren, die an der Bindung von AdoMet beteiligt sind. Motiv A (V/I/L)(V/L)(D/K)(V/I)GGXX(G/A) ist mit einer maximalen Fehlerrate von zwei Aminosäuren in allen Sequenzen gefunden worden. Motiv B (V/I/F)(A/P/E)X(A/P/G)DAXXXK(W/Y/F) wurde in 98% der Sequenzen detektiert, wobei Fehlerraten von drei Aminosäuren erlaubt waren. Nur 57% enthielten dieses Motiv ohne Fehler in der Aminosäuresequenz. Motiv C (A/P/G/S)(L/I/V)(A/P/G/S)XX(A/P/G/S)(K/R)(V/I)(E/I)(L/I/V) wurde in 56% der Sequenzen identifiziert, wobei in weiteren 42% die Sequenz mit maximal drei Fehlern auftrat. Basierend auf weiterführenden Sequenzvergleichen konnten die OMTs in zwei Klassen mit spezifischen Motiven (Tabelle 1.3) unterteilt werden, kationenunabhängige, sogenannte Kaffeesäure-OMTs, und kationenabhängige OMTs, die Kaffeoyl-CoA-OMTs (Joshi & Chiang, 1998). Eine weitere Klasse der OMTs in Pflanzen, die höhere Sequenzähnlichkeit zu *N*-Methyltransferasen aufweist als zu den oben genannten beiden Klassen, wird durch die sogenannten SABATH-Enzyme, welche vorwiegend Carboxygruppen methylieren, gebildet (D’Auria *et al.*, 2003; Qu *et al.*, 2010). Alle drei Klassen sollen in den nächsten Abschnitten kurz erläutert werden.

Tabelle 1.3: Sequenzdomänen pflanzlicher Kaffeoyl-CoA-OMTs und Kaffeesäure-OMTs (Joshi & Chiang, 1998). Genutzt wurde der Einbuchstabencode der Aminosäuren; X steht für variable Aminosäuren. Hoch konservierte Aminosäuren sind mittels Fettdruck hervorgehoben.

Vorkommen	Motiv	Sequenz
CCoAOMTs	Motiv D	TS (V/A)(Y/F) P (R/G) E (P/H/S) EX (M/L) KELR (E/K) XT
	Motiv E	K (N/R) T (M/I/L) E (I/V) GV (Y/F) TGYSLL (A/S/T) TA
	Motiv F	(P/E/A)(V/I/F/L) I (E/Q/K) KAG (V/L)(A/D/E/G)(H/D/S) KI (D/E/N/S) F
	Motiv G	DFX (F/L)(V/A) DADK (D/S/T)(N/S) Y
	Motiv H	DG (I/V) T (L/F) CRR (I/L/V)
CaOMTs	Motiv I	LDRXLRL
	Motiv J	IKGINFDLPHVI
	Motiv K	PGVEHVGDMF
	Motiv L	G GKERTXXEFLA

Kationenunabhängige *O*-Methyltransferasen

Die Kaffeesäure-OMTs (CaOMT) stellen die Klasse II der OMTs in Pflanzen dar. Sie bilden Homodimere, wobei die Monomere eine molare Masse von 40 kDa aufweisen und kationenunabhängig sind (Joshi & Chiang, 1998; Zubieta *et al.*, 2001; 2002). Diese Gruppe von Enzymen methyliert

Hydroxygruppen von Phenylpropanoiden, Flavonoiden (Schröder *et al.*, 2002) und hydroxylierten Benzaldehyden (Kota *et al.*, 2004). Kristallstrukturen von beispielsweise drei aus *Medicago sativa* stammenden Vertretern dieser Enzymklasse wurden bereits analysiert (Zubieta *et al.*, 2001).

In *A. thaliana* sind 14 Vertreter der CaOMTs bekannt (Raes *et al.*, 2003), wobei erst ein Vertreter, die AtOMT1, im Detail charakterisiert ist. Die AtOMT1 spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung von Syringylmonomeren für die Ligninbiosynthese und ist an der Methylierung des 5-OH-Koniferylalkohols bzw. des -aldehyds beteiligt. (Do *et al.*, 2007; Moinuddin *et al.*, 2010). Eine Funktion in der Flavonoidbiosynthese ist belegt, da Isorhamnetin in Doppelmutanten der Gene *Atomt1* und *Atccoamt1* nicht nachweisbar ist (Do *et al.*, 2007; Fellenberg *et al.*, 2012). Ergebnisse von Do *et al.* (2007) deuten darauf hin, dass die AtOMT1 und die AtCCoAOMT1 zudem eine Funktion in der Pflanzenentwicklung erfüllen könnten.

Kationenabhängige O-Methyltransferasen

Klasse I OMTs, auch als Kaffeoyl-CoA OMTs (CCoAOMT) bezeichnet, haben eine monomere molare Masse von 23 bis 27 kDa und sind kationenabhängig (Joshi & Chiang, 1998; Kopycki *et al.*, 2008). Diese Enzyme liegen in pflanzlichen Zellen als Homodimere vor (Ferrer *et al.*, 2005; Kopycki *et al.*, 2008) und werden oft mit der Methylierung von Kaffeoyl-CoA und 5-Hydroxy-Feruloyl-CoA in Verbindung gebracht (Ye *et al.*, 1994; Parvathi *et al.*, 2001). Jedoch sind auch Enzyme bekannt die andere Substrate verwenden. Diese werden als CCoAOMT-ähnliche Enzyme bezeichnet und unterscheiden sich, trotz sonst hoher sequentieller Ähnlichkeiten, von CCoAOMTs hauptsächlich in Motiv B und drei vorausgehenden sowie neun sich anschließenden Aminosäuren (Insertionschleife). Diese Sequenz ist demnach maßgeblich an der Ausbildung der Substratspezifität beteiligt (Kopycki *et al.*, 2008). Ein CCoAOMT-ähnliches Enzym aus *Pinus taeda* methyliert beispielsweise zusätzlich Kaffeesäure und 5-Hydroxy-Ferulasäure (Li *et al.*, 1997). Ibdah *et al.* (2003) zeigten, dass die McPFOMT aus *Mesembryanthemum crystallinum* zahlreiche Flavonide mit der gleichen Effizienz wie Phenylpropapone methyliert. Dabei wird die Substrat- und Positionsspezifität dieses Enzyms nicht nur durch das aktive Zentrum (enthält Insertionsschleife), sondern auch durch einen flexiblen N-Terminus bestimmt (Vogt, 2004; Kopycki *et al.*, 2008). Weiterhin können die gebundenen Kationen einen Einfluss auf die Substratspezifität haben. Beim Austausch von Mg^{2+} gegen Mn^{2+} oder Co^{2+} in Enzymassays mit einer CCoAOMT aus *Ammi majus*, AmCCoAOMT, konnten veränderte K_m -Werte und neue Substrate ermittelt werden (Lukacin *et al.*, 2004). Von den oben genannten Proteinen, McPFOMT und MsCCoAOMT aus *M. sativa*, wurden bereits Kristallstrukturen ermittelt (Ferrer *et al.*, 2005; Kopycki *et al.*, 2008). In *A. thaliana* existieren sieben Genloci, die für CCoAOMTs sowie CCoAOMT-ähnliche Enzyme kodieren können. Die Funktionen sind allerdings erst für drei Enzyme beschrieben.

Der wichtigste Vertreter in *A. thaliana* ist das Enzym AtCCoAOMT1 (*At4g34050*). Die zentrale katalytische Aktivität ist die Methylierung von Kaffeoyle-CoA zu Feruloyle-CoA. Der entstehende CoA-Ester ist Bestandteil wichtiger Biosynthesewege, unter anderem des Lignins in Stängeln (Do *et al.*, 2007), des Kumarins Scopoletin in Wurzeln (Kai *et al.*, 2008) und der Polyaminkonjugate im Tapetum junger Blütenknospen (Fellenberg *et al.*, 2009).

Die AtTSM1, kodiert vom Genlocus *At1g67990*, gehört zu den CCoAOMT-ähnlichen Enzymen und ist spezifisch in jungen Knospen exprimiert. Im Gegensatz zu AtCCoAOMT1 ist die Spezifität nicht auf Kaffeoyle-CoA begrenzt, sondern das rekombinante Enzym kann *in vitro* die Hydroxygruppe zahlreicher Phenylpropanoide, wie Hydroxyzimtsäuren oder Flavonoiden, methylieren. Eine *in vivo* Aktivität wurde mittels RNAi-Linien nachgewiesen. Hierbei wurde gezeigt, dass die AtTSM1 den letzten Schritt der Hydroxyzimtsäureamid-Biosynthese im Tapetum junger Knospen, die Methylierung von N¹,N⁵,N¹⁰-Tris-(5-Hydroxyferuloyle)-Spermidin zu N',N''-Bis-(5-Hydroxyferuloyle)-N'''-Sinapoylspermidin, katalysiert (Fellenberg *et al.*, 2008; 2009; Grienberger *et al.*, 2009).

Die *in vitro* Charakterisierung eines weiteren CCoAOMT-ähnlichen Enzyms, der AtCCoAOMT3, erfolgte gleichzeitig mit der hier angefertigten Arbeit durch Sahr *et al.* (2010). Sie entdeckten im N-Terminus dieses Proteins eine ungewöhnliche Transmembrandomäne. Darauf folgende Analysen von Protein-GFP-Fusionen ergaben eine Lokalisierung des Proteins in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (Abbildung 1.5). *In vitro* Experimente konnten die Methylierung eines N-terminalen Peptides des Aquaporins AtPIP2;1 zeigen. Diese erfolgte effizienter, wenn durch eine N-Methyltransferase, die AtSDG7, das Lys3 bereits doppelt methyliert vorlag (Sahr *et al.*, 2010). Obwohl sich die Expressionsmuster der AtCCoAOMT3, AtSDG7 und AtPIP2;1 überlappen (Sahr *et al.*, 2010) und die *in vivo* Methylierung des Aquaporins nachgewiesen wurde (Santoni *et al.*, 2006), war es bislang jedoch nicht möglich zu beweisen, dass die genannten Methyltransferasen *in vivo* für diese Methylierung verantwortlich sind.

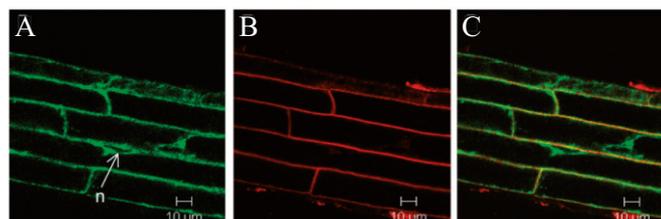


Abbildung 1.5: Zelllokalisierung der AtCCoAOMT3 in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (Sahr *et al.*, 2010). Konfokale Laser-Scan Mikroskopieaufnahmen der Fluoreszenz von epidermalen Zellen der Wurzeln (1 cm vom Apex entfernt) von transgenen Pflanzen die eine AtCCoAOMT3-GFP Fusion enthalten. A: GFP-Fusion, B: Fluoreszenz nach Behandlung mit FM4-64 (Färbung der Plasmamembran), C: Überlagerung beider Aufnahmen, n: Nukleus.

SABATH-Enzyme

SABATH-Enzyme sind nach den ersten drei bekannten Vertretern (SAMT, BAMT, Theobrominsynthase) benannt (Kato *et al.*, 1999; Ross *et al.*, 1999; Murfitt *et al.*, 2000; D’Auria *et al.*, 2003). Sie treten nativ als Dimere auf, wobei ein Monomer eine molekulare Masse von 40 bis 49 kDa aufweist. Weiterhin haben SABATH-Enzyme außerhalb der AdoMet-Bindedomäne nur geringe Sequenzähnlichkeiten zu anderen OMTs und können sowohl Sauerstoffatome als auch Stickstoffatome methylieren (D’Auria *et al.*, 2003; Qu *et al.*, 2010). Vertreter der SABATH-Enzyme aus *Clarkia breweri* und *Antirrhinum majus* methylieren Salicyl- und Benzoessäure zu Methylsalicylat und Methylbenzoat (Ross *et al.*, 1999; Murfitt *et al.*, 2000). Andere Mitglieder dieser Klasse, wie die Caffeinsynthase aus *Camellia sinensis*, methylieren die Stickstoffatome in Puringrundgerüsten (Kato *et al.*, 1999).

In *A. thaliana* ist die SABATH-Enzymklasse mit 24 Mitgliedern umfangreich vertreten (D’Auria *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2006; Qu *et al.*, 2010). Diese Enzyme methylieren unter anderem Jasmonsäure zu Methyljasmonat (Seo *et al.*, 2001), Salicylsäure zu Methylsalicylat (Chen *et al.*, 2003), Indol-3-Essigsäure (IAA) zu Methyl-IAA (Qin *et al.*, 2005), Farnesylsäure zu Methylfarnesylat (Yang *et al.*, 2006) oder Gibberilline zu deren methylierten Derivaten (Varbanova *et al.*, 2007; Xing *et al.*, 2007) und nehmen somit eine zentrale Rolle in Entwicklungsprozessen ein.

1.2.2 Protein O-Methylierung

Protein-OMTs können Carboxygruppen von Aminosäuren oder den C-Terminus eines Proteins methylieren. Die posttranslationale Methylierung von Isoprenyleinheiten an C-terminalen Cysteinresten wird durch Prenylcystein- α -carboxyl OMTs katalysiert. In *A. thaliana* konnte nachgewiesen werden, dass diese Methylierung einen negativ regulierenden Effekt auf den Abscisinsäure-Signalweg hat (Crowell & Kennedy, 2001; Chary *et al.*, 2002; Bracha-Drori *et al.*, 2008; Huizinga *et al.*, 2008). Die L-Isoaspartat (D-Aspartat) OMTs katalysieren einen Reparaturmechanismus von beschädigten Proteinen durch die Umwandlung von L-Isoaspartyl und D-Aspartyl zu L-Aspartyl, wofür auch in *A. thaliana* Enzyme beschrieben sind (Mudgett & Clarke, 1996; Mudgett *et al.*, 1997; Thapar *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2004; Villa *et al.*, 2006). Die Methylierung von C-terminalem Leucin durch OMTs ist in Pflanzen bislang nicht beschrieben, hat aber zum Beispiel eine regulierende Wirkung auf die Dimerisierung von PP2A im Gehirn von Säugern (Vafai & Stock, 2002). Protein-Glutamat-Methylierungen wurden bereits durch MS-Analysen, auch in *A. thaliana*, nachgewiesen (Hoelz *et al.*, 2006; Santoni, 2006). Bislang wurden jedoch nur in Bakterien Enzyme charakterisiert, die diese Methylierung *in vivo* katalysieren (Springer *et al.*, 1979; Clarke, 1985; Li & Stock, 2009).

1.2.3 Reaktionsmechanismus der CCoAOMTs

Pflanzliche CCoAOMTs sind mit ihrer Gesamtstruktur, der Substratbindedomäne und der Funktion eines divalenten Kations bei der Katalyse den tierischen Catechol-OMTs (COMTs) ähnlich. Das verbindet diese Enzymklassen strukturell, funktionell aber auch evolutionär miteinander (Ferrer *et al.*, 2005). Anhand bereits charakterisierter Kristallstrukturen der MsCCoAOMTs und der McPFOMT sowie der tierischen RnCOMT aus *Rattus norvegicus* konnte der Reaktionsmechanismus der Methylierung für die Enzymklasse der CCoAOMTs aufgeklärt werden (Vidgren *et al.*, 1994; Ferrer *et al.*, 2005; Kopycki *et al.*, 2008). Die Bindung der Reaktionspartner im Enzym erfolgt bei CCoAOMTs als sequentieller Mechanismus in folgender Reihenfolge: AdoMet, Kation (gewöhnlich Mg^{2+}) und letztendlich das Substrat (Lotta *et al.*, 1995; Ferrer *et al.*, 2005). Die exakte Positionierung des Substrates erfolgt durch die Interaktion der Hydroxygruppe oder -gruppen mit dem Kation. Die katalytische Reaktion in tierischen COMTs entspricht einem S_N2 Mechanismus (Abbildungen 1.6 und 1.7 im Kapitel 1.2.4). Allerdings ist die Positionierung der Substrate und Metallionen in pflanzlichen CCoAOMTs ähnlich der in Abbildung 1.7 dargestellten Bindung eines Inhibitors im aktiven Zentrum der RnCOMT. Nach der Bindung eines Substrats erfolgt ein direkter bimolekularer Transfer der Methylgruppe vom Schwefel des AdoMet zum Sauerstoff einer Hydroxygruppe des Substrats. Die entsprechende Hydroxygruppe ist durch positiv geladene Gruppen (Kation, AdoMet und Lys) umgeben, welche die Entlassung eines Protons induzieren, damit ein negativ geladenes Phenolat entsteht. Das Kation reduziert ebenfalls den pKa des Lys, welches anschließend als katalytische Base (B) fungiert und ein Proton der Hydroxygruppe aufnimmt. Die ionisierte Hydroxygruppe greift dann direkt nukleophil an der aktivierten Methylgruppe des Ado-

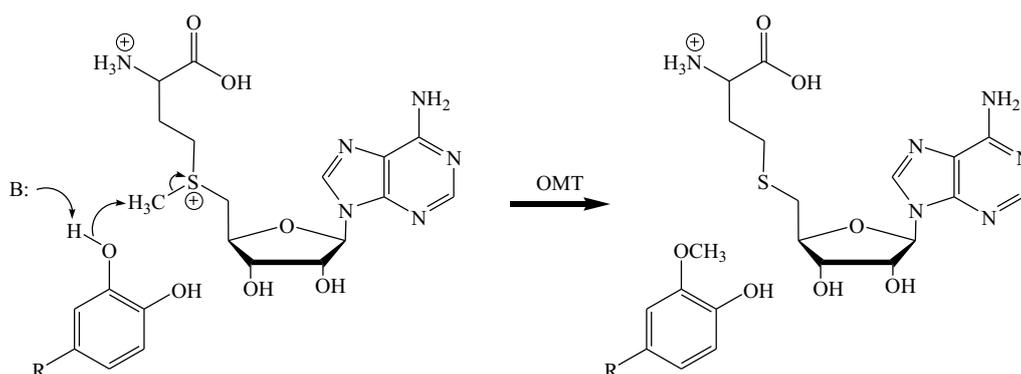


Abbildung 1.6: S_N2 Mechanismus der *O*-Methylierung. Die katalytische Reaktion des S_N2 Mechanismus (Woodard *et al.*, 1980) bei dem eine basische Aminosäure (B) die nukleophile Hydroxygruppe deprotoniert und das positiv geladene Schwefelatom protonenziehend auf die Methylgruppe wirkt, um sie elektrophil zu gestalten. Anschließend erfolgt der nukleophile Angriff auf die Methylgruppe, welche an das Sauerstoffatom bindet. Es entsteht ein neutrales und stabiles Sulfid. R - variabler Rest

Met an und die Übertragung des Methylrestes erfolgt. Der Methylether des Substrates dissoziiert anschließend als erstes aus dem aktiven Zentrum (Vidgren *et al.*, 1994; Ovaska & Yliniemelä, 1998; Bonifácio *et al.*, 2002). Entgegen dem hier erläuterten Reaktionsmechanismus schrieben Ferrer *et al.* (2005) dem konservierten Lys der MsCCoAOMT keine Funktion in der Methylgruppenübertragung zu, wonach die Reaktion ein ausschließlich Metallionen gestützter Prozess wäre.

1.2.4 Inhibitoren von O-Methyltransferasen

Mittlerweile sind im tierischen System eine Vielzahl von kompetitiven Inhibitoren für COMTs etabliert (Schultz & Nissinen, 1989; Vidgren *et al.*, 1994; Ovaska & Yliniemelä, 1998; Bonifácio *et al.*, 2002; Learmonth *et al.*, 2010; Ellermann *et al.*, 2011), da diese nicht nur den pflanzlichen CCoAOMTs sondern auch den humanoiden COMTs sequentiell sowie in Aufbau und Funktion ähneln (Salminen *et al.*, 1990; Lundström *et al.*, 1991; Bonifácio *et al.*, 2002). Die menschlichen COMTs spielen in der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen eine wichtige Rolle, da sie die verabreichten Medikamente (zum Beispiel Levodopa) durch Methylierung dem Abbau zuführen (Männistö & Kaakkola, 1999). Dieser Sachverhalt trägt wesentlich zur Suche nach effektiven Inhibitoren der COMTs bei. In Abbildung 1.7 ist beispielhaft die Bindung eines Inhibitors (BIA 3-335), des Cosubstrates (AdoMet) und des Kations (Mg^{2+}) in der RnCOMT dargestellt. Als Grundlage dieser Abbildung diente die Kristallstruktur der RnCOMT (Bonifácio *et al.*, 2002).

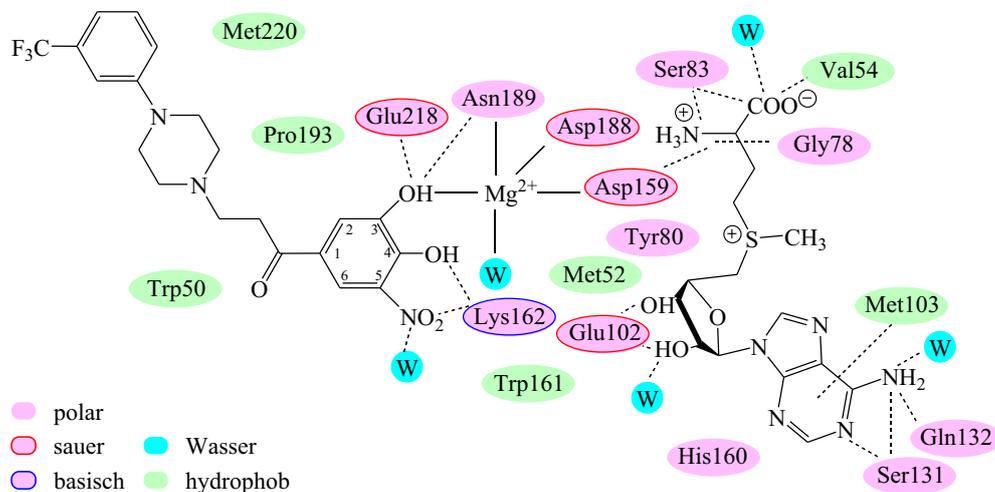


Abbildung 1.7: Wechselwirkung des Inhibitors BIA 3-335 mit der RnCOMT. Anhand der Kristallstruktur der RnCOMT mit AdoMet, Mg^{2+} und dem Nitrocatechol-Inhibitor BIA 3-335 wurde eine schematische Skizze der beteiligten Aminosäuren angefertigt (bearbeitet; Vidgren *et al.* (1994); Bonifácio *et al.* (2002)). Die gestrichelten Linien stellen Interaktionen zwischen Protein und Substrat dar. Durchgezogene Linien zeigen die Interaktionen zwischen Mg^{2+} und Enzym. Die Nummerierung der Aminosäuren entspricht dem *Alignment* in Abbildung 3.12. W - Wassermoleküle

Oft basieren COMT-Inhibitoren auf Nitrocatecholen (NC) und sind als pharmakologisch aktive Komponenten, zum Beispiel Entacapon, Bestandteile von Arzneimitteln (Müller, 2010). Diese NC-basierten Inhibitoren können im aktiven Zentrum der RnCOMT binden, werden jedoch nicht methyliert. Elektronegative Substituenten wie Nitrogruppen entziehen der ionisierten Hydroxygruppe Elektronen, verringern ihre Nukleophilie, stabilisieren den Inhibitor-Enzym-Komplex und erhöhen die nötige Aktivierungsenergie der Reaktion. Somit erfolgt kein nukleophiler Angriff an der Methylgruppe des AdoMet und keine Methylierung des Inhibitors (Vidgren *et al.*, 1994; Ovaska & Yliniemelä, 1998; Bonifácio *et al.*, 2002). Diese Inhibitoren können unter anderem genutzt werden, um OMTs aus Rohextrakten anzureichern (Fischer *et al.*, 2010b).

AdoHcy, ein Reaktionsprodukt der Methylierung durch Methyltransferasen, ist ein Inhibitor, da keine Methylgruppe zur Übertragung vorhanden ist aber das aktive Zentrum blockiert wird (Deguchi & Barchas, 1971). Die Wirkung ist nicht auf OMTs beschränkt und betrifft zahlreiche AdoMet- oder AdoHcy-bindende Proteine (Deguchi & Barchas, 1971; Borchardt, 1980). Weiterhin ist AdoHcy chemisch stabiler als das Substrat AdoMet (Dalhoff *et al.*, 2010), weshalb AdoHcy zur Anreicherung von AdoMet-bindenden Proteinen bereits erfolgreich eingesetzt wurde (Dalhoff *et al.*, 2010; Wirsing *et al.*, 2011).

Bisubstratinhibitoren haben zwei Untereinheiten, wobei die Adenineinheit in der AdoMet-Bindedomäne und die Nitrocatecholeinheit in der Substratbindedomäne bindet. Somit ist keine Methylgruppe vorhanden, die übertragen werden könnte. Zusätzlich ist die Methylierung der Hydroxygruppe nicht möglich, da eine negativ geladene Nitrogruppe benachbart ist (Masjost *et al.*, 2000; Ellermann *et al.*, 2011).

1.3 Weitere AdoMet-bindende Proteine

AdoMet ist das am zweit häufigsten verwendete Cosubstrat nach Adenosintriphosphat und in verschiedenste essentielle biologische Prozesse involviert. Die Synthese erfolgt durch das Enzym AdoMet-Synthase aus den Ausgangsstoffen Methionin und Adenosindiphosphat (Roje, 2006; Fontecave *et al.*, 2004). AdoMet kann sowohl als Donor für Methyl- und Methylengruppen, Aminogruppen, Ribosylgruppen, Aminoalkylgruppen als auch 5'-Deoxyadenosylradikale dienen (Fontecave *et al.*, 2004). Die zahlreichsten Vertreter AdoMet-bindender Enzyme sind die Methyltransferasen. Des Weiteren sind AdoMet-Decarboxylasen, Spermidin-, Spermin-, Methylen-, Nicotinamin- und ACC-Synthasen sowie Radikal-AdoMet-Enzyme bekannt (Roje, 2006; Kozbial & Mushegian, 2005; Fontecave *et al.*, 2004). Kozbial & Mushegian (2005) veröffentlichten eine *in silico* Proteinanalyse in der sie verschiedene AdoMet-Bindedomänen charakterisierten und diese für Sequenzvergleiche verwendeten. Hierbei wurden in *A. thaliana* etwa 200 AdoMet-bindende Proteine identifiziert.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Enzyme und deren Funktion über Proteinverteilungsmuster in unterschiedlichen Organen, Geweben oder Zellorganellen zu charakterisieren hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen (Jorrín-Novo *et al.*, 2009). Auf dem gegenwärtigen Stand der Technik ist es möglich Verteilungsmuster von Subproteomen und Enzymklassen, mit bestimmten Eigenschaften, zu erstellen. Diese Methoden basieren unter anderem auf der Affinität von synthetischen oder natürlichen Substanzen zu bestimmten Enzymen oder Enzymklassen (Lenz *et al.*, 2011). Die Analytik von Proteinmustern kann anschließend mit der detaillierten Analyse einzelner Proteine verfeinert werden. Von den sieben CCoAOMTs in *A. thaliana* waren zu Beginn dieser Arbeit erst zwei näher charakterisiert (Do *et al.*, 2007; Fellenberg *et al.*, 2008; 2009), während von den anderen fünf Enzymen keine Funktion bekannt war (Raes *et al.*, 2003). Die Fragen, die sich stellten, waren:

- 1) Gibt es Möglichkeiten die Enzymklassen der OMTs bzw. CCoAOMTs in Pflanzen mit Affinitätsbasierten Techniken spezifisch anzureichern?
- 2) Ist es möglich bei einzelnen, noch weitgehend unerforschten Vertretern mit proteinbiochemischen Methoden diese Aussagen zu unterlegen und funktionelle Aspekte zu klären?

Für eine Anreicherung der Proteine wurden zwei verschiedene Techniken gewählt. Zum Einen die kommerziell erhältliche CCMS der caprotecTM bioanalytics GmbH, mit der es zumindest im tierischen System bereits möglich war AdoMet-bindende Proteine anzureichern. Zum Anderen wurden von Kooperationspartnern innerhalb des Leibniz-Institutes für Pflanzenbiochemie Nitrocatechol-Sonden entwickelt, die selektiv CCoAOMTs binden sollten. Hierbei stellten die bereits charakterisierten kationenabhängigen CCoAOMTs (AtTSM1 und AtCCoAOMT1) sowie die kationenunabhängige CaOMT (AtOMT1) Marker für die Etablierung der Systeme dar. Zudem sollten weitere AdoMet-bindende Proteine bzw. CCoAOMTs detektiert und identifiziert werden.

Im Laufe der hier angefertigten Arbeit veröffentlichten Sahr *et al.* (2010), dass die AtCCoAOMT3 *in vitro* ein Glu im N-Terminus eines Aquaporins methyliert. Da dieses Enzym aufgrund seiner Sequenz bislang als Vertreter der CCoAOMTs in *A. thaliana* annotiert war und in den vorangegangenen CCMS-Analysen Hinweise auf eine Wurzelspezifität dieses Proteins aufkamen, sollte es als weitgehend unerforschte CCoAOMT charakterisiert werden. Somit stand im zweiten Teil dieser Arbeit die funktionelle Charakterisierung der AtCCoAOMT3 im Mittelpunkt, wobei rekombinant hergestelltes Enzym für *in vitro* Assays sowie eine homozygote T-DNA-Insertionslinie verwendet wurden. Ziel war es, putative *in vitro* Substrate sowie eine mögliche *in vivo* Funktion nachzuweisen.

2 Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmittel, sofern nicht anders erwähnt, wurden von Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland), Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) und Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland) bezogen. Alle im Text näher beschriebenen Lösungen, Puffer und Nährmedien wurden mit doppelt destilliertem Wasser aus einer Milli-Q-Anlage (Millipore, Schwalbach, Deutschland) hergestellt und falls notwendig bei 121°C und 2 bar für 20 min autoklaviert. Die Zugabe von Antibiotika zu den verwendeten Nährmedien erfolgte nach dem Abkühlen auf 50°C.

2.1 Pflanzenlinien sowie deren Kultivierung und Ernte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenlinien wurden ursprünglich vom *European Arabidopsis Stock Centre* (NASC, University of Nottingham, UK, www.arabidopsis.info) in Nottingham bezogen. Die Samensterilisation erfolgte mit Natriumhypochlorid. Hierzu wurden die Samen zuerst 5 min in 70% (v/v) Ethanol, dann 10 min in Natriumhypochloridlösung (70% (v/v) Natriumhypochlorid, 1% (v/v) Tween 20) und letztendlich 3 mal in sterilem, doppelt destilliertem Wasser inkubiert. Anschließend wurden die Samen auf angepasstem Murashige & Skoog Medium (MS) (2 g/L MS-Medium (Murashige & Skoog, 1962) mit Vitaminen von Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande); 10 g/L Saccharose; 0,5 g/L MES-Puffer; 5 g/L Pflanzenagar von Duchefa Biochemie; pH 5,7) im Inkubationsschrank von CLF Plant Climatics (Emersacker, Deutschland) unter Langtag Bedingungen (16 h Tag (65% Luftfeuchtigkeit und $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Lichtintensität) und 8 h Nacht (60% Luftfeuchtigkeit)) zur Keimung gebracht. Nach ein bis zwei Wochen erfolgte entweder das Belassen auf Medium zur Ernte oder das Vereinzeln der Keimlinge auf Erde (ED Koko 1+1 von Einheitserde- und Humuswerke Gebr. Patzer GmbH & Co.KG (Sinnatal-Jossa, Deutschland) vermengt mit Vermiculit). Die weitere Anzucht erfolgte im Gewächshaus bei Sonnenlicht (unterstützt durch künstliche Belichtung, 100 bis $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Lichtintensität). Zur Anwendung kamen vier unterschiedliche Linien der Modellpflanze *A. thaliana* (Tabelle 2.1).

Die auf Erde angezogenen Pflanzen wurden für die Ernte der oberirdischen Pflanzenorgane verwendet (Stängel, Blatt, Knospenstadien, Blüten und Schoten). Für die Ernte der Keimlinge (zwei

Tabelle 2.1: Verwendete Pflanzenlinien. Die Abkürzung IL entspricht Insertionslinie.

Linie (NASC-ID)	Genotyp	Literatur
Columbia-0 (N1092)	Wildtyp	(Meinke & Scholl, 2003)
GK-007F02 (N400638)	T-DNA <i>Atccoamt1</i> -Insertionslinie mit T-DNA-Insertion im Genlokus <i>At4g34050</i>	(Meinke & Scholl, 2003; Li <i>et al.</i> , 2007)
SALK_135290 (N25167)	T-DNA <i>Atomt1</i> -Insertionslinie mit T-DNA-Insertion im Genlokus <i>At5g54160</i>	(Meinke & Scholl, 2003; Alonso <i>et al.</i> , 2003)
WiscDsLoxHs087_05B (N908290)	T-DNA <i>Atccoamt3</i> -Insertionslinie mit T-DNA-Insertion im Genlokus <i>At3g61990</i>	(Meinke & Scholl, 2003; Nishal <i>et al.</i> , 2005)

Wochen nach Aussaat) und Wurzeln (drei bis vier Wochen nach Aussaat) wurden die Pflanzen auf MS-Medium belassen. Die Ernte erfolgte in jedem Fall mit Pinzetten und die Proben wurden in flüssigen Stickstoff gefroren. Zusätzlich wurden die Wurzeln vorher mit doppelt destilliertem Wasser von Agarresten befreit und kurz auf saugfähigen Papier getrocknet. Die Lagerung des Pflanzenmaterials erfolgte bei -80°C .

2.2 Bakterienstämme und deren Kultivierung

Die Anzucht der verwendeten Bakterien erfolgte auf *Lysogeny Broth* Medium (*LB Broth Low salt* oder *LB Agar Low Salt*) flüssig oder fest, welches von Duchefa Biochemie bezogen und nach Herstellerangaben vorbereitet wurde (Bertani, 2004; 1951). Je nach Bedarf wurden die entsprechenden Antibiotika (Ampicillin: 0,05 mg/mL) zugegeben. Nach der Inokulation des Mediums erfolgte die Inkubation der Bakterien über Nacht bei 37°C und 200 rpm (Flüssigkultur). Zur Klonierung wurden zwei verschiedene Bakterienstämme von *E. coli* verwendet.

E. coli XL1 Blue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB *lacI*^qZΔM15 Tn10 (*Tet*^r)]) von Agilent Technologies, Inc. (Wilmington, Delaware, USA) wurde für allgemeine Klonierungsarbeiten verwendet. Die heterologe Genexpression erfolgte im *E. coli*-Stamm M15[pREP4] (*NaI*^S, *Str*^S, *Rif*^S, *Thi*⁻, *Lac*⁻, *Ara*⁺, *Gal*⁺, *Mtl*⁻, *F*⁻, *RecA*⁺, *Uvr*⁺, *Lon*⁺) der Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland). Das zusätzlich enthaltene Plasmid, pREP4, kodiert hier für eine Kanamycinrestistenz (*Km*^r).

2.3 Verwendete Vektoren

Zur Klonierung der Plasmide für die heterologe Expression des Proteins AtCCoAOMT3 (Genlokus *At3g61990*) wurden zwei Vektoren verwendet. Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte im pGEM®-T Easy Plasmid von Promega (Madison, Wisconsin, USA). Dieser Klonierungsvektor (3016 Bp) kann aufgrund der 3'-T-Überhänge zur TA-Klonierung von PCR-Produkten verwendet werden. Des Weiteren trägt das Plasmid eine Ampicillinresistenz zur Selektion positiver Klone. Zur heterologen Genexpression wurde das Plasmid pQE-30 der Qiagen GmbH verwendet. Dieses *low copy* Expressionsplasmid (3461 Bp) enthält eine *multiple Cloningsite* zum Klonieren der zuvor restrigierten DNA Fragmente, einen His-Tag, der nach heterologer Expression N-terminal am exprimierten Protein lokalisiert ist, und eine Ampicillinresistenz zur Selektion positiver Klone. Beide Vektoren sind im Anhang in den Abbildungen 2 und 3 dargestellt.

2.4 Verwendete Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die Sequenzen, eventuell enthaltene Schnittstellen und die Orientierung der Oligonukleotide sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Verwendete Oligonukleotide. Die Orientierung ist mit (+) für vorwärts gerichtete und (-) für rückwärts gerichtete Oligonukleotide angegeben und die Schnittstellen sind in der Sequenz unterstrichen hervorgehoben.

Bezeichnung (Orientierung)	Nukleotidsequenz (5'-3')	Verwendung	Schnittstellen
Oligo(dt19) (-)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	cDNA-Erststrang-synthese	keine
qPP2A for (+)	AGACAAGGTTCACTCAATC CGTG	qPCR	keine
qPP2A rev (-)	CATTCAGGACCAAACCTCTT CAGC	qPCR	keine
q34050 for (+)	CAACGAAGACATCATCGAC	qPCR	keine
q34050 rev (-)	TGCTGTCACTTCCCTGAG	qPCR	keine
q67990 for (+)	GATGGTCGATTACCTGAC	qPCR	keine
q67990 rev (-)	CTTTCATCAACCGGAACCTC	qPCR	keine
q54160for1 (+)	GTGGGCCTATTGGGCTTTG	qPCR	keine

Tabelle 2.2: Verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung (Orientierung)	Nukleotidsequenz (5'-3')	Verwendung	Schnittstellen
q54160rev1 (-)	TATTGGGTCGTAAGACGATT TTAT	qPCR	keine
At3g61990 OE 1 (+)	AGGGATCCATGACGACGTTT TCAACGAGCTT	heterologe Genexpression	BamHI
At3g61990 OE 2 (-)	AGAAGCTTTTACCTCTTGCG GCATATGG	heterologe Genexpression	HindIII
At3g61990 OE 3 (+)	AGGGATCCATGAAATCCGGT CGGGACGTCTGC	heterologe Genexpression	BamHI
At3g61990 KO for (+)	TTCAACGAGCTTTCTTTTCC	Nachweis T-DNA-Insertion <i>At3g61990</i>	keine
At3g61990 KO rev (-)	CCTCTTGCGGCATATGGTCA TACC	Nachweis T-DNA-Insertion <i>At3g61990</i>	keine
L4(T-DNA) (-)	TGATCCATGTAGATTTCCCG GACATGAAAG	Nachweis T-DNA-Insertion <i>At3g61990</i>	keine

2.5 Molekularbiologische Methoden

Zur Herstellung eines Vektors für die heterologe Expression der AtCCoAOMt3 und zur Analyse der Transkriptdaten wurden verschiedene molekularbiologische Methoden angewandt. Zum Einsatz kamen sowohl Techniken der DNA- als auch RNA-Analyse.

2.5.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Nach der Isolierung von Nukleinsäuren wurden Konzentrationsmessungen mittels NanoDrop der peqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Für die Messungen wurde jeweils 1 μ L der entsprechenden Proben aufgetragen. Als Negativabgleich erfolgte die Messung mit jeweils 1 μ L des Puffers in dem die Nukleinsäuren gelöst wurden.

Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung von genomischer DNA wurde das DNeasy® Plant Mini Kit der Qiagen GmbH verwendet. Dazu wurden circa 100 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend in 400 µL AP1-Puffer, versetzt mit 4 µL RNase A (100 mg/mL), suspendiert. Die folgenden Schritte der Extraktion richteten sich nach dem Herstellerprotokoll "*Purification of Total DNA from Plant Tissue*" der Qiagen GmbH. Die Lagerung der gDNA erfolgte bei -20°C.

Zur Analyse der T-DNA-Insertionslinie wurde mittels Extract-N-Amp™ Plant Kits von Sigma-Aldrich gDNA extrahiert. Hierfür wurden circa 25 mm² große Blattstücke von den jeweiligen Pflanzen entfernt und nach Herstellerangaben behandelt. Die extrahierte gDNA wurde anschließend mit dem integrierten REDExtract-N-Amp™ PCR ReadyMix™ amplifiziert (Kapitel 2.5.2).

Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus einer 3 mL Suspensionsschüttelkultur des jeweiligen Bakterienklons wurde der QIAprep® Spin Miniprep Kit der Qiagen GmbH verwendet. Die Schüttelkulturen wurden über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert und anschließend bei 2200 g für 10 min zentrifugiert. Die folgenden Schritte der Isolierung erfolgten nach Herstellerangaben (Protokoll: *QIAprep Spin Miniprep Kit Using a Microcentrifuge*). Die Plasmid-DNA wurde umgehend für weitere Klonierungsschritte verwendet oder bei -20°C gelagert.

Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy® Mini Kit der Qiagen GmbH isoliert. Hierfür wurden etwa 80 mg in flüssigem Stickstoff gemörsertes Pflanzenmaterial verwendet. Die weitere Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben (Protokoll: "*Purification of Total RNA from Plant Cells and Tissues and Filamentous Fungi*"). Die RNA wurde in insgesamt 30 µL RNase freiem, doppelt destilliertem Wasser gelöst und bei -80°C gelagert.

2.5.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient der gezielten Amplifikation von DNA-Fragmenten (*Template*) mittels zweier spezifischer Oligonukleotide (*Primer*) und einer hitzebeständigen Polymerase (Mullis & Faloona, 1987). Indem mehrere Zyklen (30 bis 40) mit unterschiedlichen Schritten durchlaufen werden, ergibt sich eine Vervielfältigung des gewünschten DNA Fragments. Im ersten Schritt, der

Denaturierung, wird die DNA in ihre Einzelstränge zerlegt. Das Anlagern (*annealing*) der Oligonukleotide, die für das entsprechende DNA Fragment spezifisch sind, erfolgt im zweiten Schritt. Der letzte Schritt dient der Verlängerung (Elongation) der angelagerten *Primer*, um einen zweiten kompletten Strang des DNA-Fragmentes durch die Polymerase zu synthetisieren.

In dieser Arbeit wurden die im Kapitel 2.4 beschriebenen Primer und verschiedene Polymerasen (häufig auch als Mischung verschiedener Enzyme) verwendet. Sowohl der BioMix Red der Bioline GmbH (Luckenwalde, Deutschland), der REDEExtract-N-AmpTM PCR ReadyMixTM von Sigma-Aldrich als auch der High Fidelity PCR Enzyme Mix der Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland) kamen zum Einsatz. Die PCR-Ansätze wurden nach den entsprechenden Herstellerangaben vorbereitet und die DNA-Fragmente im Eppendorf MasterCycler[®] Gradient (Eppendorf AG) vervielfältigt. In Tabelle 2.3 ist ein Amplifikationsprofil dargestellt.

Tabelle 2.3: Amplifikationsprofil einer PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	95°C	5 min	} 30 bis 40 x
2 Denaturierung	95°C	30 sec	
3 Anlagerung	50 bis 60°C	30 sec	
4 Elongation	72°C	30 sec bis 5 min	
5	72°C	5 min	
6	4°C	variabel	

2.5.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von DNA und RNA erfolgte, sofern nicht anders angegeben, über 1,2% (w/v) Agarosegele in 1 x TBE (0,45 M Tris/HCl, pH 8,0, 0,45 M Borsäure, 10 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)). Zur Visualisierung der Nukleinsäuren wurde dem aufgeschmolzenen Gel 1 µg/µL Ethidiumbromid zugegeben. Die aufzutrennenden Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 5 x DNA Beladungspuffer von Bioline versetzt, falls nicht bereits im PCR-Ansatz Beladungspuffer enthalten war (BioMix Red und REDEExtract-N-AmpTM PCR ReadyMixTM). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 80 bis 120 V in TBE-Puffer. Anschließend wurden die Gele mit dem Geldokumentationssystem (BioDocAnalyzer, Whatmann Biometra, Göttingen, Deutschland) unter UV_{λ=320nm}-Anregung ausgewertet. Anhand eines ebenfalls aufgetragenen Größenstandards (HyperLadderTM II von Bioline) konnte die Größe der DNA-Fragmente abgeschätzt werden.

2.5.4 Klonierungstechniken

Die grundlegenden Klonierungstechniken werden in diesem Abschnitt näher erläutert. Die für diese Arbeit notwendigen Vektoren und die einzelnen Klonierungsschritte werden im Kapitel 3.3.2 und im Anhang in den Abbildung 4 bis 8 dargestellt, um die Übersichtlichkeit der Arbeit zu erhalten.

Restriktionsspaltung von DNA und Dephosphorylierung

Alle Restriktionsenzyme und Puffer wurden von der Firma Fermentas GmbH bezogen. Die Restriktionsspaltung von 0,5 - 1 µg DNA erfolgte durch jeweils 10 U der entsprechenden Restriktionsenzyme in einem 20 µL Ansatz nach Herstellerangaben. Zur Kontrolle der Restriktionsspaltung und zum Separieren einzelner Fragmente wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.5.3) durchgeführt. Bei präparativen Ansätzen wurde der Ansatz entsprechend vergrößert.

Um eine Selbstligation der restrigierten DNA-Vektoren zu vermeiden, wurde eine Phosphatasebehandlung mittels *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Fermentas GmbH) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dies führt zur Abspaltung der Phosphatreste an den 5'-Enden der DNA-Fragmente.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Um elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente zu eluieren, wurde das QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH) verwendet. Die Gelstücke wurden auf einem UV-Tisch (360 nm) mit einem Skalpell herausgeschnitten und anschließend gewogen, um die entsprechenden Volumina an Puffern zugeben zu können. Die Elution aus der Gelmatrix erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren erfolgte mittels T4 DNA Ligase der Fermentas GmbH, wobei nach Angaben des Herstellers ein 20 µL Ansatz verwendet wurde. Das Verhältnis von Vektor zu DNA-Fragment betrug 1:2. Die Reaktion wurde nach Zugabe der T4 DNA Ligase 1 h bei 22°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Ligase durch 10 min Inkubation bei 65°C. Der Ligationsansatz konnte nun umgehend zur Transformation von Bakterien verwendet werden.

2.5.5 Herstellung und Transformation elektrokompetenter *E. coli*

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen des *E. coli*-Stamms XL1 Blue bzw. M15[pREP4] wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml Suspensionsschüttelkultur inokuliert und bei 37°C und 180 bis 200 rpm (Schüttelinkubator, Certomat® BS-1, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 20 min auf Eis gekühlt und durch Zentrifugation für 15 min bei 4000 g und 4°C pelletiert. Es folgten zwei Waschschriffe der Zellen in 4°C kaltem, sterilem, doppelt destilliertem Wasser, ein weiterer in 10% (v/v) Glycerin und nach erneuter Zentrifugation (15 min, 4000 g, 4°C) die Aufnahme der Zellen in 1 ml 10% (v/v) Glycerin. Von der Zellsuspension wurden 50 µl-Aliquote angefertigt, in flüssigen Stickstoff gefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Transformation dieser Zellen erfolgte durch Elektroporation. Hierfür wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 3 µL Ligationsansatz (Kapitel 2.5.4) versetzt und in eine vorgekühlte Küvette (2 mm Spaltbreite, Eurogentec, Seraing, Belgien) überführt. Die Transformation wurde im Micropulser® der Firma BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland) mit der Einstellung Ec2 durchgeführt. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit 450 µL LB-Medium verdünnt und für 1 h bei 28°C und 200 rpm inkubiert. Zur Selektion wurden 10 bis 100 µl Transformationsansatz auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika (Ampicillin: 0,05 mg/mL) verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Identifizierung von Klonen mit dem gewünschten DNA-Fragment im Vektor erfolgte mittels PCR mit den entsprechenden *Primern* (Tabelle 2.2) und / oder Restriktionsspaltung (Kapitel 2.5.4) der isolierten Plasmid-DNA (Kapitel 2.5.1).

2.5.6 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von DNA erfolgte als externe Auftragsarbeit durch die MWG Biotech AG. Die Auswertung der Nukleotidsequenzen erfolgte mit dem Programm Geneious Pro 5.3.4 von Biomatters Ltd. (Auckland, Neuseeland).

2.5.7 cDNA-Erststrangsynthese

Die Synthese von cDNA aus 2 oder 5 µg Gesamt-RNA erfolgte mit der RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase der Fermentas GmbH nach Angaben des Herstellers. Des Weiteren wurde für die Erststrangsynthese der Oligo(dT19)-*Primer* (Tabelle 2.2) und ein Ansatzvolumen von 20 µL gewählt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

2.5.8 Quantitative *Real Time* PCR (qPCR)

Die quantitative *Real Time* PCR, auch qPCR, dient wie die herkömmliche PCR zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Allerdings kann hier am Ende eines jeden PCR-Zyklus anhand von Fluoreszenzmessungen die Konzentration der enthaltenen PCR-Produkte bestimmt werden. Die erhaltenen Daten ermöglichen Aussagen über die eingesetzten Mengen an *Template* (in diesem Fall cDNA) (Wittwer *et al.*, 1997). In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Power SYBR® R Green PCR Master Mix von Applied Biosystems (Carlsbad, Kalifornien, USA) verwendet und die Messungen mit dem Mx3000P® R QPCR-System der Firma Stratagene (La Jolla, Kalifornien, USA) durchgeführt. Die genutzten *Primer* (Tabelle 2.2) wurden mit Hilfe des Programms CloneManager von Scientific & Educational Software (Cary, North Carolina, USA) erstellt. Vor Verwendung der cDNA (Kapitel 2.5.7) als *Template* in der qPCR erfolgte eine Verdünnung auf 20 ng RNA-Äquivalent/ μL Wasser für vergleichende Transkriptdaten unterschiedlicher Gewebe. Für die Primerkalibrierung wurde eine Verdünnungsreihe der cDNA hergestellt (500; 250; 100; 50; 25; 10; 5 ng RNA-Äquivalent/ μL). Der in Tabelle 2.4 beschriebene Ansatz gilt für vergleichende Transkriptdaten. Zur Kalibrierung der Primer wurde 1 μL der entsprechenden Verdünnung eingesetzt, wodurch die Endkonzentration des *Templates* variabel ist.

Tabelle 2.4: qPCR Ansatz. Endvolumen 10 μL

Reaktionskomponente	Volumen	Endkonzentration
2 x Power SYBR Green PCR Master Mix	5 μL	1 x
Primer-Mix	4 μL	2 pmol/ μL
<i>Template</i>	1 μL	2 ng/ μL

In Tabelle 2.5 sind die einzelnen Schritte der qPCR dargestellt. Im letzten Schritt wurde eine Schmelzkurvenanalyse (1 min 95°C, 30 sec 60°C, Gradient von 60 zu 95°C mit ständiger Messung der Fluoreszenz) durchgeführt, um die Schmelzpunkte der einzelnen Produkte zu überprüfen und somit festzustellen, ob Verunreinigungen durch gDNA bestehen oder unspezifische Produkte gebildet wurden.

Tabelle 2.5: Amplifikationsprofil einer qPCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	95°C	10 min	} 45 x
2 Denaturierung	95°C	30 sec	
3 Anlagerung	54°C	30 sec	
4 Elongation	72°C	1 min	
5 Schmelzkurvenanalyse			

Eine Quantifizierung der qPCR kann nach Pfaffl (Pfaffl, 2001) mit den unten dargestellten Formeln durchgeführt werden. Hierfür wurde automatisch durch das Programm MxProTM eine Basislinie ermittelt. Diese richtet sich nach den Fluoreszenzwerten des ebenfalls im SYBR[®] Green PCR Master Mix enthaltenen Referenzfarbstoffes ROX. Anhand dieser Basislinie wird vom Programm ein Schwellenwert, der über der Basislinie und im exponentiellen Bereich der Amplifikation liegt, ermittelt. Der anschließend ermittelte c_t -Wert ist das Maß für die Quantifizierung und gibt den Zyklus einer PCR an, bei dem der Schwellenwert (definiertes Fluoreszenzniveau) über dem Hintergrundsignal (Basislinie) detektiert wird.

Um alle Ergebnisse vergleichbar zu halten wurde eine *Primer*-Kalibrierung durchgeführt. Die oben genannte Verdünnungsreihe wurde mit allen verwendeten *Primer*-Paaren (Tabelle 2.2) analysiert und die Effizienz E (Kapitel 2.5.8) der PCR nach Formel 2.1 berechnet. Der Anstieg y wurde dem Programm MxProTM entnommen.

$$E = 10^{-1/y} \quad (2.1)$$

In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine relative Quantifizierung vorgenommen. Die Normalisierung der erhaltenen Daten für die zu untersuchenden Gene (Zielgen - ZG) wurde auf Basis der Transkriptebene des nicht regulierten Gens (Referenzgen - RG) *At1g13320* (Protein Phosphatase 2A; PP2A) durchgeführt. Die ermittelten c_t -Werte (Schwellenwertzyklus) gingen in Formel 2.2 ein.

$$\Delta c_{t,ZG} = c_{t,RG} - c_{t,ZG} \quad (2.2)$$

Die relative Transkriptmenge T_R der zu untersuchenden Gene wurde nach Formel 2.3 mit der ermittelten Effizienz der Zielgene (E_{ZG}) und den erhaltenen $\Delta c_{t,ZG}$ -Werten berechnet.

$$T_R = (E_{ZG})^{\Delta c_{t,ZG}} \quad (2.3)$$

Die im Kapitel 3.1.1 und 3.1.4 erläuterten relativen Transkriptmengen wurden aus einem Mittelwert aus drei technischen Wiederholungen innerhalb drei biologischer Replikate ermittelt.

2.6 Proteinbiochemische Methoden und Analytik

Zum Erhalt der Aktivität und Struktur der Enzyme wurde beim Arbeiten mit Proteinen darauf geachtet, alle Schritte auf Eis und Zentrifugationen sowie Inkubationen bei 4°C durchzuführen. Dies gilt für alle hier beschriebenen Methoden, sofern es im Text nicht anders erwähnt wird.

2.6.1 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial

Zur Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial wurde dieses in flüssigem Stickstoff mit Pistill und Mörser zerkleinert und in 100 mg Portionen aliquotiert. Es erfolgte die Zugabe von 1 mL Extraktionspuffer (falls nicht anders angegeben: 20 mM Tris/HCl pH 7,8; 20 mM NaCl; 5% (w/v) Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP); 1 mM EDTA pH 7,8; 10 µL Protease Inhibitor Cocktail von Sigma-Aldrich pro mL Extraktionspuffer) auf 100 mg gemörsertes Pflanzenmaterial. Die Proben wurden bis zur vollständigen Suspension auf einem VortexGenie2® von Scientific Industries, Inc. (New York, USA) gemischt (3 x 20 sec) und 5 min bei 20 000 g zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Entsalzung des Überstandes mit PD-10 Desalting Columns der GE Healthcare Europe GmbH (München, Deutschland) und die Aufkonzentrierung mit Amicon® Centricon® Centrifugal Filter Devices von Millipore nach Herstellerangaben.

2.6.2 Zellfraktionierung mit differentieller Zentrifugation

Das Pflanzenmaterial wurde wie in Kapitel 2.6.1 zerkleinert und aliquotiert. Zu 1 g Pflanzenpulver wurden 10 mL Homogenisierungspuffer (50 mM TRIZMA Base; 10% (w/v) Glycerin; 500 mM Saccharose; 5% (w/v) PVPP; 10 mM Ascorbinsäure; pH 8,0; 10 µL Protease Inhibitor Cocktail pro mL Extraktionspuffer) zugegeben (Santoni, 2006). Die Proben wurden bis zur vollständigen Suspension auf einem Vortex Genie2® geschüttelt und anschließend einer differentiellen Zentrifugation unterzogen. In Abbildung 2.1 sind die einzelnen Zentrifugationsschritte mit allen Fraktionen (Pellet und Überstand) dargestellt. Die entstandenen Pellets wurden jeweils in 2 mL Extraktionspuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,8; 0,1 M NaCl; 1 mM EDTA pH 7,8; 1 mM Dithiothreitol (DTT); 10% (v/v) Glycerin; 10 µL Protease Inhibitor Cocktail pro mL Extraktionspuffer) aufgenommen. Sowohl die einzelnen Pelletfraktionen als auch der dritte Überstand (Ü3) wurden in zwei gleichmäßige Aliquots geteilt. Die so entstandenen Proben wurden mit unterschiedlichen Detergenzien versetzt (CHAPS C9426, Natriumcholat C1254 und Octyl-β-D-Glucopyranosid O8001 von Sigma Aldrich) und anschließend 1 h bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Diese Rohextrakte wurden dann mit PD-10 Desalting Columns entsalzt und mit Amicon® Centricon® Centrifugal Filter Devices konzentriert.

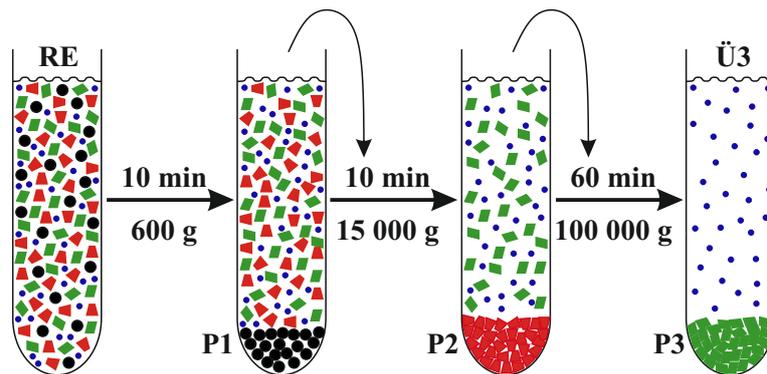


Abbildung 2.1: Ablauf der differentiellen Zentrifugation (Ozols, 1990). RE - Rohextrakt; P1 - Pellet mit intakten Zellen, Zellwänden und Zellkernen; P2 - Pellet mit Mitochondrien, Chloroplasten, Lysosomen und Peroxisomen; P3 - Pellet mit Plasmamembranen, mikrosomaler Fraktion (Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat) und anderen Membranen; Ü3 - Überstand mit löslichen, zytosolischen Proteinen.

2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Je nach vorliegender Probe wurden unterschiedliche Methoden verwendet, um Proteinkonzentrationen zu messen. Benötigte Kalibriergeraden wurden mit Bovinem Serum Albumin (BSA, *cryst. lyophil.*) der Firma SERVA Electrophoresis GmbH erstellt.

Proteinbestimmung mittels Bradfordreagenz

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteingemischen wurde eine modifizierte Bradfordreagenz (6,5% (w/v) SERVA Blue G, 5% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Phosphorsäure) verwendet (Bradford, 1976). In einem Ansatz wurden 95 μL Bradfordreagenz mit 5 μL Probe versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte in UV-Küvetten micro PLASTIBRAND[®] von BRAND GmbH + Co KG (Wertheim, Deutschland) mit dem DU[®] 800 Spectrophotometer der Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland) bei 595 nm.

Proteinbestimmung mittels OD-Messung

Für aufgereinigte Proteinlösungen wurde eine Messung der Absorption bei OD_{280} mit dem DU[®] 800 Spectrophotometer durchgeführt. Über den molaren Extinktionskoeffizienten ϵ konnte anschließend die Konzentrationen c nach Formel 2.4 berechnet werden. Die für die Berechnung notwendigen Angaben wurden mit dem Programm Geneious Pro 5.3.4 ermittelt. Die Extinktionskoeffizienten ϵ der rekombinant hergestellten Proteine AtCCoAOMT3_{N-29} und AtTSM1 be-

tragen 26150 L/(mol*cm) und 18910 L/(mol*cm). Die Schichtdicke der Küvette d war 1 cm. In dieser Formel wird die Konzentration c in der Einheit g/mol und die Extinktion E einheitenlos angegeben.

$$c = \frac{E}{\varepsilon * d} \quad (2.4)$$

Somit ergab sich für eine Absorption von 1 eine Konzentration c von 38,2 μ M bzw. 52,8 μ M. Um die Massenkonzentration ρ in mg/mL zu berechnen, wurde Formel 2.5 genutzt. Die molekulare Masse M der Proteine AtCCoAOMT3_{N-29} (29213 Da) und AtTSM1 (27749 Da) betragen 29213 g/mol bzw. 27749 g/mol.

$$\rho = \frac{m}{V} = c * M \quad (2.5)$$

Die Massenkonzentration ρ beträgt also 1,12 mg/mL für das Protein AtCCoAOMT3_{N-29} bzw. 1,47 mg/mL für die rekombinant hergestellte AtTSM1.

2.6.4 Capture Compound Mass Spectrometry (CCMS)

Um Proteine anhand ihrer Affinität zu AdoMet anreichern zu können, wurde das SAH (AdoHcy) caproKit™ der caprotec™ bioanalytics GmbH (Berlin, Deutschland) verwendet. Das CCMS-System wurde, falls nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben eingesetzt. Im Hauptteil der Arbeit wurde das *On Bead* Verfahren (Beschreibung und Abbildung 1.3 in Kapitel 1.1.2) verwendet. Bei dem Vergleich zweier reaktiver Gruppen wurden beide Verfahren, *On* und *Off Bead*, durchgeführt (Text und Abbildung 3.7 in Kapitel 3.1.3). Alle CCMS-Anreicherungen wurden mindestens zweimal durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu belegen.

Im ersten Schritt des *On Bead* Verfahrens der CCMS wurden 25 μ L mit 100 μ M *Capture Compound* Lösung mit 50 μ L gut resuspendierter Lösung der magnetischen Partikel gemischt und 2 min bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert, wobei sich die Bindung zwischen Biotin und Streptavidin ausbildete. Danach erfolgte zweimaliges Waschen der Partikel mit 200 μ L *Washing Buffer I* (50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA; 1 M Natriumchlorid; 0,1 μ M Octyl- β -D-glucopyranosid). Anschließend wurde eine Reaktionslösung aus 50 μ L doppelt destilliertem Wasser, 20 μ L 5 x *Capture Buffer* (100 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; 250 mM Kalziumacetat; 50 mM Magnesiumacetat; 50% Glycerin) und 30 μ L Lysat hergestellt. Der Negativkontrolle wurden statt 50 μ L nur 30 μ L doppelt destilliertes Wasser zugefügt und der Ansatz mit 20 μ L AdoHcy-Lösung (im Kit SAH 10 mM) aufgefüllt. Sowohl der Anreicherungsassay als auch der Ansatz der Negativkontrolle wurden auf jeweils einen Ansatz der mit der Sonde

besetzten Partikel gegeben und für 3 h bei circa 4°C im Dunkeln unter ständigem Invertieren inkubiert. Hierbei erfolgte die Interaktion der selektiven Gruppe mit den Zielproteinen. Im nächsten Schritt wurde die reaktive Gruppe mittels UV-Bestrahlung der Suspension bei 310 nm in der caproBox™ aktiviert und konnte somit irreversibel am Zielprotein binden. Weiterhin wurden sechs Waschstufen mit *Washing Buffer I* durchgeführt. Nachdem die letzte Waschlösung entfernt wurde, konnten die magnetischen Partikel entweder in 4 x Probenpuffer für die 1D-PAGE (Kapitel 2.6.6) aufgenommen oder weitere zwei Mal mit doppelt destilliertem Wasser gewaschen werden, um die Proteine, welche an die Sonde und somit an die Partikel gebunden sind, einem direkten Verdau durch Trypsin (Kapitel 2.6.9) zu unterziehen. Im *Off Bead* Verfahren entspricht der Anreicherungsansatz: 40 µL doppelt destilliertes Wasser, 20 µL 5 x *Capture Buffer*, 30 µL Lysat und 10 µL *Capture Compound* Lösung. 20 µL des Wassers wurden auch hier in der Negativkontrolle durch AdoHcy-Lösung ersetzt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation bei 4°C unter ständigem Invertieren für 10 min und die UV-Bestrahlung (310 nm) für ebenfalls 10 min. Im nächsten Schritt wurden 25 µL 5 x *Washing Buffer I* und 50 µL der resuspendierten Partikel zugegeben und wiederum eine Inkubation für 30 min unter ständigem Invertieren bei 4°C durchgeführt. Im letzten Schritt erfolgte wie im *On Bead* Verfahren das Waschen der mit Sonde und somit den Zielproteinen besetzten magnetischen Partikeln. Die Handhabung des caproMag™ erfolgte nach Angaben des Herstellers (caprotec™ bioanalytics GmbH).

2.6.5 Anwendung der Nitrocatechol-Sonden (NC-Sonden)

Die von Kooperationspartnern (Sebastian Brauch und Dr. Bernhard Westermann, Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie des Leibniz-Institutes für Pflanzenbiochemie) synthetisierten NC-Sonden zur Anreicherung von CCoAOMTs wurden im Wesentlichen in der selben Prozedur wie die CCs der CCMS eingesetzt (Kapitel 2.6.4). Die Unterschiede in der Anwendung lagen in der Verwendung anderer Bindungs- und Waschpuffer. Diese sind im Kapitel 3.2 näher erläutert. Die mit CCoAOMTs angereicherten Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

2.6.6 SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts erfolgte durch diskontinuierliche, denaturierende SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Für die Herstellung der SDS-Gele wurde 30% Acrylamid/Bis Lösung, 37,5:1 (2,6% C) von BioRad verwendet. Die Denaturierung der Proteine erfolgte durch Zugabe von 4 x Probenpuffer (62,5 mM Tris; 10% (v/v) Glycerin; 1,25% (w/v) SDS; 5% (v/v) Mercaptoethanol; 0,05% (w/v) Bromphenolblau) und Erhitzen der Proben, falls nicht anders angegeben, auf 95°C für 5 min. Die Trennung der Proteine erfolgte in

14%igen SDS-Gelen bei konstanter Stromstärke (25 mA). Der Größenstandard peqGOLD Protein-Marker V der peqLab Biotechnologie GmbH wurde zur Identifikation des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine verwendet. Im Anschluss an die Elektrophorese erfolgten zum Einen die Visualisierung der Proteine im Gel mittels Silber- oder Comassiefärbung (Kapitel 2.6.7) und zum Anderen die Immunodetektion (Kapitel 2.6.8).

2.6.7 Färbung von SDS-Gelen

Zur Silberfärbung wurden die Gele bei 100 rpm über Nacht in Fixierungslösung (40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure) inkubiert. Die weiteren Schritte der Färbung beinhalteten zweimaliges Waschen mit 30% (v/v) Ethanol, einmaliges Waschen mit destilliertem Wasser, eine Vorbehandlung für 1 min (0,2 g/L Natriumthiosulfat), kurzes Spülen der Gele mit destilliertem Wasser (3 mal 15 sec) und die Färbung für 20 min mit Silbernitratlösung (2 g/L Silbernitrat, 750 μ L/L Formaldehyd). Es folgten die Entwicklung der Gele (30 g/L Natriumcarbonat, 500 μ L/L Formaldehyd, 4 mg/L Natriumthiosulfat), das Abstoppen der Reaktion für 10 min mit 7% (v/v) Essigsäure und das zweimalige Waschen für jeweils 10 min mit destilliertem Wasser. Die Lagerung erfolgte in Konservierungslösung (25% (v/v) Ethanol, 3% (v/v) Glycerin). Diese Methode ist angelehnt an die Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987).

Zur Comassiefärbung wurden die Gele in Comassie-Lösung (0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250; 10% (v/v) Essigsäure; 40% (v/v) Methanol) bis zur Sättigung gefärbt und anschließend mit 7% (v/v) Essigsäure wieder entfärbt, bis spezifische Banden auf dem Gel zu erkennen waren. Nach der Färbung der Gele erfolgte in beiden Fällen das Fotografieren unter Weißlicht mit dem GeneGenius Bioimaging System von Syngene International Ltd. (Cambridge, UK).

2.6.8 Immunodetektion von Proteinen

Elektrophoretisch getrennte Proteine konnten nach einem Nass-Blotverfahren auf Nitrocellulose Membranen (0,2 μ m Porengröße) der Invitrogen GmbH (Darmstadt, Deutschland) übertragen werden. Dazu wurden die SDS-Gele in Transferpuffer (5% (v/v) 20 x NuPAGE® Transfer Buffer der Invitrogen GmbH, 0,1% (v/v) NuPAGE® Antioxidant der Invitrogen GmbH, 1% (v/v) Methanol) gespült und anschließend zusammen mit der in Transferpuffer äquilibrierten Membran und Schwämmen in die Blotkassette (XCell II SureLock™ Mini Cell der Invitrogen GmbH) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Der Proteintransfer erfolgte für 1 h bei konstant 30 V. Nach Abschluss der Proteinübertragung auf die Membran wurde diese kurz in TBS (100 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) gespült und anschließend für 1 h bei RT mit 5% (w/v) Trockenmilchpulver (BioRad) in TBS (pH 7,5) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die

Inkubation mit allen polyklonalen primären Antikörpern (AK-AtTSM1, AK-AtCCoAOMT1 und AK-AtOMT1 von Eurogentec Deutschland GmbH in Köln, Deutschland (Fellenberg *et al.*, 2008; 2012)), die in 5% (w/v) Trockenmilchpulver in TBS 1:1000 verdünnt wurden, erfolgte über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden anschließend durch dreimaliges Waschen (je 5 min) in TTBS (TBS; pH 7,5 mit 0,05% (v/v) Tween-20) entfernt. Nach erneutem Spülen der Membran in TBS (pH 7,5; 3 x 5 min) wurde mit dem Sekundäantikörper (*Anti-Rabbit IgG – Alkaline Phosphatase antibody produced in goat* von Sigma-Aldrich), der in 5% (w/v) Trockenmilchpulver 1:5000 verdünnt wurde, für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Sekundäantikörper ist an eine Alkalische Phosphatase zur enzymatischen kolorimetrischen Detektion gekoppelt. Nach erneutem Waschen mit TTBS (3 x 5 min) wurde die Membran 5 min in TBS (pH 9,5) inkubiert und für 5 min mit Substratpuffer (TBS; pH 9,5; 50 mM MgCl₂) äquilibriert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 0,16 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolyolphosphat (BCIP) und 0,32 mg/ml p-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) initialisiert. Nach ausreichender Farbentwicklung wurde die Reaktion durch Waschen der Membran mit destilliertem Wasser gestoppt. Die Membran wurde zur Dokumentation unter Weißlicht mit dem GeneGenius Bioimaging System von Syngene International Ltd. fotografiert.

2.6.9 Proteinidentifizierung mit LC-MS/MS

Um Proteine identifizieren zu können, wurden diese mit der Peptidase Trypsin (Promega, *Sequencing Grade Modified Trypsin*) restrigiert, um anschließend LC-MS/MS-Messungen durchzuführen. Der Trypsin-Verdau konnte sowohl im Gel als auch in Lösung durchgeführt werden. Alle erforderlichen Schritte bis zur MS-Analyse wurden, sofern nicht anders angegeben, bei RT durchgeführt.

Trypsin-Verdau im Gel

Die verwendete Methode nach Gharahdaghi *et al.* (Gharahdaghi *et al.*, 1999), Jensen *et al.* (Jensen *et al.*, 1998) und Shevchenko *et al.* (Shevchenko *et al.*, 1996) wurde modifiziert. Im ersten Schritt wurden Banden aus 1D-Gelen mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Entfärbung der Banden aus Silber gefärbten Gelen erfolgte nach dreimaligem Waschen mit doppelt destilliertem Wasser mit 1:1 gemischten 30 mM Kaliumeiscyanid mit 100 mM Natriumthiosulfat. Die Entfärbelösungen wurden mit 2 bis 4 Waschstritten mit doppelt destilliertem Wasser entfernt und die Proteine anschließend je 30 min alkyliert (10 mM DTT in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat) und reduziert (100 mM Indol-3-Essigsäure (IAA) in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat). Im nächsten Schritt wurden die Banden mit Methanol 5 min dehydriert, mit 30% (v/v) Methanol

5 min rehydriert und zwei mal mit doppelt destilliertem Wasser je 10 min gewaschen. Drei weitere Waschstufen mit 30% (v/v) Acetonitril in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat wurden angeschlossen, die Banden zerkleinert und erneut 10 min mit doppelt destilliertem Wasser gewaschen. Das Trocknen der Bandenfragmente erfolgte im Concentrator 5301 der Eppendorf AG. Anschließend wurde der Verdau mit 3 ng/ μ L Trypsin und 5% (w/v) Acetonitril in 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat angesetzt und über Nacht inkubiert. Die Trypsinlösung wurde abgenommen und die Gelfragmente mit 50% (v/v) Acetonitril / 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) in MS geeignetem Wasser 20 min inkubiert. Dieser Überstand wurde mit der Trypsinlösung vereinigt und wiederum im Concentrator 5301 getrocknet. Das Lösen der Peptide erfolgte für 5 min durch Ultraschall in 0,1% (v/v) TFA. Die Proben wurden bis zur Messung bei -20°C gelagert.

Trypsin-Verdau in Lösung

Der Trypsin-Verdau in Lösung erfolgte mit angereicherten Proben der CCMS angelehnt an die Angaben der caprotecTM bioanalytics GmbH. Die Alkylierung der Proben wurde bei 56°C für 1 h (10 mM DTT in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat) und die Reduzierung für 30 min (55 mM IAA in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat) bei RT durchgeführt. Der Verdau erfolgte mit 10 ng/ μ L Trypsin in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat über Nacht bei 37°C und 200 rpm. Anschließend wurde die Peptidlösung im Concentrator 5301 getrocknet. Die Aufnahme des Pellets erfolgte in 100 μ L 2% (v/v) TFA / 20% (v/v) Acetonitril in MS geeignetem Wasser. Im Anschluss wurden die Peptidproben mit Pierce PepCleanTM C-18 Spin Columns von Thermo Fisher Scientific GmbH (Bremen, Deutschland) nach Herstellerangaben entsalzt und nochmals im Concentrator 5301 getrocknet. Das Lösen der Peptide erfolgte für 5 min durch Ultraschall in 0,1% (v/v) TFA. Bei Proben die für die Messung durch Maria Fedorova vorbereitet wurden, musste das Peptidgemisch nochmals getrocknet werden und abschließend wurden die Peptide in 0,1% (v/v) Ameisensäure aufgenommen. Die Proben wurden bis zur Messung bei -20°C gelagert.

LC-MS/MS-Analysen zur Proteinidentifizierung

Die in dieser Arbeit enthaltenen MS-Daten wurden in Kooperation mit Kai Naumann (Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie des Leibniz-Institutes für Pflanzenbiochemie) erstellt. Eine Ausnahme bilden die Messungen der in Gel verdauten Peptide der vorfraktionierten, mittels CCMS angereicherten Proben, welche durch Maria Fedorova (Arbeitsgruppe Analytik, Biotechnologisch-Biomedizinisches Zentrum, Universität Leipzig) vermessen wurden. In beiden Fällen wurde als Laufmittel A 0,1% (v/v) Ameisensäure in Wasser und als Eluent B 0,1% (v/v) Ameisensäure in Acetonitril verwendet. In den Laufmitteln C und D ist die Ameisensäure gegen TFA ersetzt. In Tabelle 2.6 sind beide Systeme gegenübergestellt.

Tabelle 2.6: Gegenüberstellung der beiden verwendeten LC-MS/MS-Systeme.

	Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie	Universität Leipzig
LC-System	nLC (UltiMate® 3000, Dionex, Idstein, Deutschland)	nUPLC (nanoAcquity, Waters GmbH, Eschborn, Deutschland)
Vorsäule	Acclaim PepMap 100 C18-Säule (Innendurchmesser: 300 µm; Länge: 5 mm; Partikeldurchmesser: 5 µm; Porengröße 100 Å); Fluss: 30 µL/min mit 2% D in C	nanoAcquity Symmetry C18 (Innendurchmesser: 18 µm; Länge: 20 mm; Partikeldurchmesser: 5 µm); Fluss: 10 µL/min mit 3% B in A
Trennsäule	Acclaim PepMap 100 C18-Säule (Innendurchmesser: 75 µm; Länge: 150 mm; Partikeldurchmesser: 3 µm; Porengröße 100 Å); Flussrate: 240 nL/min; Gradient: 2 bis 40% B in A in 30 min; UV-Detektion: 214 nm	nanoAcquity UPLC BEH 130 Säule (C18, Innendurchmesser: 75 µm; Länge: 100 mm; Partikeldurchmesser: 1,7 µm); Flussrate: 400 nL/min; Gradient: 3 bis 30% B in A in 18 min, zu 85% B in A in 1 min
Ionisierung	Chip (Typ D) basierte Nanoelektrosprayquelle (TriVersa NanoMate, Advio, Norwick, UK); Spannung: 1,75 kV	Nanoelektrosprayquelle (PicoTip™ on-line nano ESI Elektronenquelle, New Objective, Berlin, Deutschland); Spannung: 1,5 kV
Transfer zum Detektor	Kapillartemperatur: 200 °C; Spannung: 200 V; Stickstofffluss: 4 L/min	Kapillartemperatur: 200 °C; Spannung: 120 V
MS/MS-System	HCTultra PTM Discovery System (Bruker Daltonics)	LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific GmbH)
MS-Scan	Vorläuferionenscan: 400 bis 1500 m/z im <i>Standard Enhanced Mode</i>	Vorläuferionenscan: 400 bis 2000 m/z; Auflösung 60000
MS/MS-Messung	CID-Fragmentierung (Scanbereich: 100 bis 2800 m/z im <i>Ultra Scan Mode</i> ; Isolationsbreite: 4); Nutzung der fünf Vorläuferionen mit höchster Intensität unter Ausschluss einfach geladener Ionen	CID-Fragmentierung (Isolationsbreite: 2; normalisierte Kollisionsenergie: 35%; Aktivierungszeit: 30 ms; im <i>data-dependent Acquisition Mode</i>); Nutzung der drei Vorläuferionen mit höchster Intensität

Die Rohdaten wurden mit dem Programm Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics) prozessiert und anschließend mit einem internen Mascot-Server 2.2 (Matrix Science, London, UK) gegen eine *A. thaliana* Proteindatenbank basierend auf TAIR 8.0 (Arabidopsis Biological Resource Center, 2008) (MS- und MS/MS-Toleranz von 0,5 Da) abgeglichen. Zur weiteren Evaluierung der Suchergebnisse wurde das Programm Scaffold 3.0 (Proteome Software Inc., Portland, Oregon, USA) verwendet.

2.6.10 Heterologe Genexpression in *E. coli*

Für die heterologe Expression eines Proteins in *E. coli* wurden 400 ml Suspensionskulturen mit einer 50 mL Vorkultur angeimpft und bei 37°C und 150 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 bis 0,8 inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion der Genexpression durch 0,1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG, Dioxan frei, Fermentas GmbH) und eine weitere Inkubation für 4 h bei 37°C und 150 rpm. Anschließend wurden die Zellen in Zentrifugengefäße überführt und bei 4°C und 12 000 g für 10 min pelletiert, der Überstand verworfen und die Zellen bis zur Aufreinigung bei -80°C gelagert. Die Zellpellets wurden in 40 mL Puffer A (40 mM K₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, 10% (v/v) Glycerin, pH 7,5) resuspendiert, mit Lysozym von Sigma-Aldrich (Endkonzentration 1 μ g/mL) versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss mittels Ultraschall-Homogenisator (GM-2070) der BANDELIN electronic GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland) für 6 x 30 sec bei 70% Leistung und ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4°C und 20 000 g für 10 min. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden umgehend zur Aufreinigung verwendet.

2.6.11 Aufreinigung des heterolog exprimierten Proteins

Für die Aufreinigung des Proteins über den N-terminalen His-Tag wurde eine Protino[®] Ni-NTA Column 1 mL der Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte angelehnt an die Angaben des Herstellers nach folgenden Schritten. Die Säule wurde mit 10 Säulenvolumen Wasser gewaschen und mit 5 Säulenvolumen Puffer A äquilibriert. Anschließend erfolgte das Beladen der Säule mit dem Rohextrakt. Es schlossen sich zwei weitere Waschschritte mit 5 Säulenvolumen Puffer A und 10 Säulenvolumen 10% Puffer B (40 mM K₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, 10% (v/v) Glycerin, 300 mM Imidazol) in A an. Die Elution des aufzureinigenden Proteins erfolgte mit 80% Puffer B in A. Anschließend wurde die Säule mit je 10 Säulenvolumen 100% Puffer B und MES-Puffer (30 mM MES, 0,02% (w/v) NaN₃, pH 5,8) gewaschen. Die Lagerung der Säule erfolgte in 30% Ethanol bei 4°C, die des Proteins bei -80°C als konzentrierte Lösung oder bei 4°C als 1 mL Aliquote mit einer Konzentration von 1 mg/mL. Die Konzentration wurde mittels OD-Messung erfasst (Kapitel 2.6.3).

2.6.12 Enzymtest rekombinant hergestellter Proteine

Um die *in vitro* Aktivität des rekombinant hergestellten Proteins AtCCoAOMT3_{N-29} zu testen, wurden Enzymassays durchgeführt. Der Assay setzt sich wie in der Tabelle 2.7 beschrieben zusammen. Hierbei waren das Protein in Puffer A (Kapitel 2.6.10), AdoMet und MgCl₂, in doppelt

destilliertem Wasser und die Substrate in 25% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Zum Testen der inhibierenden Wirkung der putativen Nitrocatechol-Inhibitoren und der Sonde wurde die rekombinant hergestellte AtTSM1 (stand heterolog expremiert und aufgereinigt zur Verfügung) verwendet. Die Enzymassays wurden, wie oben und in Tabelle 2.7 beschrieben, durchgeführt. Die Inhibitoren sind in 10% (v/v) Methanol gelöst und die eingesetzte Konzentration betrug 100 μM . In Negativkontrollen der inhibierenden Wirkung (normaler Enzymumsatz) wurde die Endkonzentration von 2% (v/v) Methanol durch zusätzliche Methanolzugabe eingehalten, um den inhibierenden Effekt des Lösungsmittels auszuschließen. Bei der Aufnahme kinetischer Parameter variierten die Endkonzentration der Substrate bei der Betrachtung der AtCCoAOMT3_{N-29} von 1 zu 100 μM und bei der AtTSM1 von 5 zu 30 μM . Während der Bestimmung der Inhibitor konstanten und IC₅₀-Werte wurden die gleichen Substratkonzentrationen, wie im Fall der Aufnahme der kinetischen Parameter der AtTSM1, sowie Inhibitor- bzw. Sondenkonzentrationen von 10 bis 200 μM verwendet.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung der *in vitro* Enzymassays. Die DMSO-Konzentration richtet sich nach dem Lösungsmittel der Substrate. Die Substratkonzentration richtet sich nach dem Assay und kann variieren. Beide Werte werden angegeben falls sie abweichen.

Reaktionskomponente	Endkonzentration	Bemerkung
Puffer A	16 mM K ₂ HPO ₄ , 4 mM KH ₂ PO ₄ , 6% (v/v) Glycerin	immer vorhanden
S-Adenosyl-L-Methionin	0,2 mM	immer vorhanden
MgCl ₂	0,2 mM	immer vorhanden
Protein	2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	immer vorhanden
DMSO	5% (v/v)	Konzentration variabel
Substrat	20 μM	Konzentration variabel
Inhibitor	20 μM	nur bei Inhibitoranalyse
Methanol	2% (v/v)	nur bei Inhibitoranalyse

Das verwendete Reaktionsvolumen aller Assays betrug 50 μL . Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe des Substrates. Die Assays wurden bei 37°C für vorher festgelegte Zeiten (5 bis 60 min) inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion erfolgte die Zugabe von 20 μL 10% (v/v) Trichloressigsäure in 50% (v/v) Acetonitril.

2.6.13 Analytische HPLC-Trennung

Die Messung der Assays erfolgte mit einem HPLC-System der Waters GmbH. Hierbei wurde im Waters 2695 Separation Module eine Reversed-Phase-Chromatographie über eine 5 μm Nucleosil C18-Säule (125 x 4 mm, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt. Das Injektionsvolu-

men betrug (falls nicht anders angegeben) 20 μ L, wobei als Laufmittel 0,5% (v/v) Phosphorsäure (Laufmittel A) und 100% (v/v) Acetonitril (Laufmittel B) verwendet wurden. Die Trennung der Komponenten erfolgte je nach Substrat mit unterschiedlichen Gradienten (Tabelle 2.8) und die photometrische Detektion je nach Substrat bei unterschiedlichen Wellenlängen (Tabelle 2.8) mit einem Waters 2996 Photodiode Array Detector.

Tabelle 2.8: Parameter der analytischen HPLC-Trennung. Luteolin und Chlorogensäure wurde für die Inhibitorenanalyse verwendet. Bei der Aktivitätsmessung der AtCCoAOMT3_{N-29} kamen alle Substrate zum Einsatz.

Substrat	Gradient (% B in A in Zeit)	Max Plot Wellenlängenbereich
Luteolin	30 auf 80 in 7 min	320 bis 350 nm
Caffeoyl-CoA, Chlorogen- und Kaffeesäure	5 auf 60 in 6,5 min	320 bis 350 nm
Esculetin	5 auf 55 in 7 min	320 bis 350 nm
Quercetin, Quercetagenin, Myrecitin und Gosypetin	20 auf 70 in 7 min	355 bis 375 nm

2.7 Sequenzanalysen

Um Aussagen über die Struktur, die Funktion und evolutionäre Zusammenhänge treffen zu können, wurden *in silico* Analysen von Proteinen durchgeführt. Für die Identifizierung der Struktur wurden mit dem Programm Geneious Pro 5.3.4 von Biomatters Ltd. Sequenzvergleiche (*Blosum62*, *Gap open penalty: 11*, *Gap extension penalty: 1*, *Global alignment with free and gaps*) durchgeführt. Anschließend erfolgte ein manueller Abgleich der Sequenzen nach der Veröffentlichung von Kopycki *et al.* (Kopycki *et al.*, 2008). Weiterhin wurden die durch dieses Programm angegebenen Sequenzähnlichkeiten verwendet (*identical sites*). Für alle Sequenzuntersuchungen wurden die entsprechenden Sequenzen von *Protein Data Bank* (Berman *et al.*, 2000), GenBank (Benson *et al.*, 2011) und UniProt (The UniProt Consortium, 2011; Jain *et al.*, 2009) verwendet. Die Identifikationsnummern der Proteine sind im Ergebnisteil angegeben. Zur Identifizierung der Transmembrandomäne wurden fünf frei zugängliche Programme (DAS (Cserző *et al.*, 1997), HMMTOP (Tusnády & Simon, 1998; 2001), SOSUI (Mitaku *et al.*, 2002; Mitaku & Hirokawa, 1999; Hirokawa *et al.*, 1998), TMHMM 2.0 (Sonnhammer *et al.*, 1998) und TMPred (Hofmann & Stoffel, 1993)) verwendet.

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte mit dem Programm R 2.10 durch Diana Trutschel (Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie des Leibniz-Institutes für Pflanzenbiochemie). Es wurde eine zweifaktorielle ANOVA (Varianzanalyse) durchgeführt, die zur Bestimmung der Signifikanzwerte diente.

3 Ergebnisse

Im Mittelpunkt der Arbeit stand neben Proteomstudien gesamter Enzymklassen auch die Charakterisierung einer speziellen CCoAOMT durch biochemische Analysen. Die Proteinanalysen bezogen sich dabei auf AdoMet-bindende Proteine im Allgemeinen, aber auch detaillierter auf die CCoAOMTs. Weiterhin war die Funktion des zu charakterisierenden Proteins AtCCoAOMT3 zu Beginn der Arbeit nicht bekannt. Abschließend sollte bei der Verknüpfung der erhaltenen Resultate ein Beispiel erbracht werden, wie die Aussagekraft beider Analysen vereint werden kann.

3.1 Anreicherung AdoMet-bindender Proteine mittels CCMS

Zur Anreicherung von AdoMet-bindenden Proteinen kam das kommerziell erhältliche System CCMS der caprotecTM bioanalytics GmbH zum Einsatz. In diesem Fall musste das in Bakterien und Zellkulturen etablierte Verfahren zur Anreicherung enzymatisch aktiver Proteine auf das pflanzliche System übertragen werden. Hierzu wurden die trifunktionellen AdoHcy-CCs eingesetzt, um die Proteinverteilung dreier bereits charakterisierter OMTs in Blütenentwicklungsstadien und T-DNA-Insertionslinien zu analysieren. Weiterhin erfolgte die Erweiterung der angefertigten Studien durch die Untersuchung zusätzlicher Organe. Aber nicht nur die Identifizierung dieser drei bereits bekannten OMTs sondern auch die Detektion weiterer, zum Teil nicht charakterisierter AdoMet-bindender Proteine standen im Mittelpunkt der angefertigten Arbeit.

Generell sollte zu den hier angefertigten Analysen angemerkt werden, dass während der gesamten Untersuchung AdoMet-bindender Proteine das *On Bead* Verfahren und ein AdoHcy-CC mit Phenylazid als reaktiver Gruppe zum Einsatz kamen. Zwar wurden sowohl das *On* und *Off Bead* Verfahren als auch zwei Sonden mit unterschiedlichen reaktiven Gruppen (Phenylazid und Tetrafluorphenylazid) nach Etablierung des Systems verglichen, jedoch diente dies lediglich der Einschätzung der Effizienz der Technologie, wenn bestimmte Komponenten und Methoden des Verfahrens verändert werden. Hierbei unterschieden sich die reaktiven Gruppen in der Substitution von Fluoreinheiten und die Verfahren in dem Zeitpunkt der Bindung der Sonde an die magnetischen Partikel. Diese Untersuchungen werden an gegebener Stelle dargestellt. Allerdings wurde trotz der geringfügig besseren Eignung der zweiten getesteten Sonde beschlossen, die CCs mit Phenylazid als reaktiver Gruppe (Abbildung 1.4 in Kapitel 1.1.2) zu verwenden. Gründe hierfür lagen in der

Vergleichbarkeit aller Ergebnisse und der kommerziellen Verfügbarkeit der Tetrafluorphenylazid-Sonde erst gegen Ende des praktischen Teils dieser Dissertation. Weiterhin wurde entschieden die *On Bead* Anreicherung (Abbildung 1.3 in der Einleitung) zu verwenden, da die ersten Untersuchungen mit diesem Verfahren durchgeführt wurden und dieses ein besseres Verhältnis von positiven zu falsch positiven Resultaten erbrachte.

3.1.1 Etablierung der CCMS-Technologie

Die CCMS-Technologie wurde bisher nur in tierischen Systemen und Zellkulturen eingesetzt (Lenz *et al.*, 2011), weshalb eine Übertragung der Methode auf Pflanzen notwendig war. Da bekannt ist, dass die AtCCoAOMT1 und die AtOMT1 während der Blütenentwicklung konstitutiv (Kai *et al.*, 2008; Do *et al.*, 2007; Moinuddin *et al.*, 2010) und die AtTSM1 nur in jungen Knospen aber nicht in offenen Blüten exprimiert sind (Fellenberg *et al.*, 2008), wurde für die Etablierung der CCMS die Blütenentwicklung von *A. thaliana* herangezogen. Verwendung fanden vier verschiedene Entwicklungsstadien von Knospen bis hin zu offenen Blüten. Die Einteilung der Knospenstadien erfolgte nach Smyth *et al.* (1990) und ist in Tabelle 3.1 dargestellt. Vor allem die Größe der Knospen bzw. Blüten wurde bewertet, um die Stadien voneinander unterscheiden zu können.

Tabelle 3.1: Blütenentwicklungsstadien von *A. thaliana*. Darstellung und Charakterisierung der Blütenentwicklungsstadien nach Smyth *et al.* (1990)

	Bezeichnung	Entwicklungsstadien	Größe [mm]	Morphologische Beschreibung
	Knospen A (kleine Knospen)	1 bis 8	max. 1	Entwicklung der Primordien aller Organe, später: Sepalen umschließen die Knospe und Stamen entwickeln sich
	Knospen B (mittlere Knospen)	9 bis 10	1 bis 1,5	Sepalen umschließen die Knospe, Petalen entwickeln sich
	Knospen C (große Knospen)	11 bis 12	2 bis 2,5	Sepalen umschließen die Knospe, starkes Wachstum der Petalen
	offene Blüten	13 bis 14	3	Knospe öffnet sich, Petalen sind sichtbar

Zur Verifizierung der erhaltenen Daten wurde sowohl die vorhandene Literatur als auch die Immunodetektion verwendet. Für die Immunodetektion der drei genannten Enzyme standen etablierte Antikörper zur Verfügung, die für die entsprechenden Proteine aus *A. thaliana* spezifisch waren (Fellenberg *et al.*, 2008; 2012). Weiterhin wurde ein Vergleich der erhaltenen Proteindaten

mit den relativen Transkriptmengen der korrespondierenden Gene durchgeführt. Diese Analysen sollten Korrelationen bzw. Unterschiede zwischen der Transkript- und Proteinakkumulation aufzeigen.

Anreicherung und Profilerstellung mittels CCMS

Zur Etablierung der AdoHcy-CCs erfolgte die Ernte der Knospen und Blüten von auf Erde angezogenen Pflanzen (4 bis 5 Wochen nach der Keimung). Die nach der Proteinextraktion (Kapitel 2.6.1) erhaltenen Lysate (Proteinkonzentration 7 mg/mL) wurden in der CCMS-Technologie eingesetzt (Kapitel 2.6.4), wobei eine Anreicherung an AdoMet-bindenden Proteinen stattfand. Durch 1D-PAGE (Kapitel 2.6.6) und anschließender Silberfärbung (Kapitel 2.6.7) konnten die Daten visuell ausgewertet werden. Die Proteinverteilung ist mittels Silber-gefärbten Gelen in Abbildung 3.1 dargestellt.

Auf den 1D-Gelen wurden jeweils entsalztes aber noch ungereinigtes Rohprotein (Lysat) sowie eine Negativkontrolle (NK) und angereichertes Protein (Assay) aufgetragen. Da in der Negativkontrolle eine Konkurrenzsubstanzt, hier freies AdoHcy, zugegeben wurde, konnte die Sonde nicht mit dem aktiven Zentrum der Proteine interagieren. Somit sind in der Negativkontrolle nur unspezifisch gebundene Proteine detektierbar. Im Anreicherungsassay enthalten alle Banden, die nicht in der Negativkontrolle sichtbar sind, spezifisch interagierende AdoMet- bzw. AdoHcy-bindende Proteine. In Abbildung 3.1 ist im Vergleich von Lysat zu Assay ein deutlicher Anreicherungseffekt

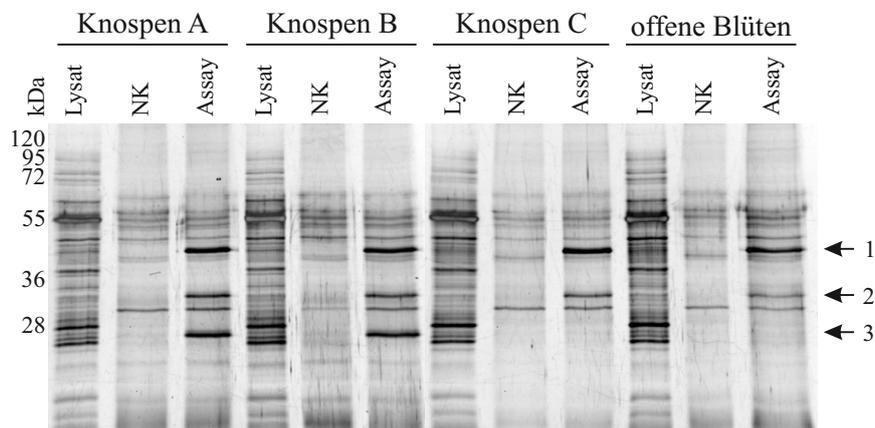


Abbildung 3.1: 1D-Gel der CCMS verschiedener Blütenentwicklungsstadien. Darstellung der Anreicherungsresultate aus Extrakten von Knospen A bis C und offenen Blüten nach Silberfärbung. Die Proteingrößen in kDa sind auf der linken Seite und die durch Pfeile hervorgehobenen, identifizierten Proteine (1 – AtOMT1 40 kDa; 2 – AtCCoAOMT1 29 kDa; 3 – AtTSM1 26 kDa) auf der rechten Seite angegeben. NK - Negativkontrolle

zu erkennen. Die Anzahl der Banden im Allgemeinen war reduziert und die Intensität der Signale AdoMet- bzw. AdoHcy-bindender Proteine nahm zu.

Zur Identifizierung von spezifisch mit der Sonde interagierenden Proteinen wurden Banden, die im Assay aber nicht in der Negativkontrolle auftraten, ausgeschnitten und einem Trypsinverdau im Gel unterzogen (Kapitel 2.6.9). Durch die anschließenden LC-MS/MS-Messungen konnten drei Proteine eindeutig durch mehrere Peptide identifiziert werden (Tabelle 3.2). Es handelt sich hierbei um die in Abbildung 3.1 mit Pfeilen und den entsprechenden Zahlen gekennzeichneten Proteine AtOMT1 (1), AtCCoAOMT1 (2) und AtTSM1 (3). Die AtOMT1 ist ein Vertreter der kationen- unabhängigen Klasse II OMTs und die AtCCoAOMT1 sowie die AtTSM1 sind Vertreter der kationenabhängigen Klasse I OMTs. Sowohl AtOMT1 als auch AtCCoAOMT1 sind in allen untersuchten Entwicklungsstadien der Blüte deutlich nachweisbar. Das Protein AtTSM1 ist spezifisch in kleinen und mittleren Knospen vertreten und konnte demnach in großen Knospen und offenen Blüten nicht nachgewiesen werden. Dies konnte sowohl durch die 1D-Gele (Abbildung 3.1) als auch durch die LC-MS/MS-Daten (Tabelle 3.2) belegt werden.

Tabelle 3.2: Mittels MS-Analysen identifizierte Proteine der Blütenentwicklungsstadien. Nach der Anreicherung durch CCMS und Verdau im Gel erfolgte die Identifizierung folgender drei OMTs.

Proteinbezeichnung (Molekulare Masse)	eindeutige Peptide	Mascot <i>Score</i>	Sequenz- deckung	Stadium
AtOMT1 (39,6 kDa)	10	320	33%	Knospen A
	16	507	47%	Knospen B
	12	383	38%	Knospen C
	8	345	37%	Blüten
AtCCoAOMT1 (29,2 kDa)	2	81	8%	Knospen A
	7	144	24%	Knospen B
	5	154	23%	Knospen C
	7	225	29%	Blüten
AtTSM1 (26,4 kDa)	6	193	24%	Knospen A
	5	206	21%	Knospen B
	keine			Knospen C
	keine			Blüten

Proteindetektion mittels Antikörper

Da die Proteinverteilung in Blütenentwicklungsstadien der Etablierung der CCMS in Pflanzen dienen sollte, war es notwendig die erhaltenen Proteindaten zu bestätigen. Eine Möglichkeit hierfür bestand in der Immunodetektion (Kapitel 2.6.8) dieser OMTs. Aufgrund von Material- und

Zeitersparnis sollte der Proteinnachweis der drei durch CCMS identifizierten OMTs mittels Antikörper simultan erfolgen. Die Spezifität der entsprechenden Antikörper war im Vorfeld bereits in zahlreichen Versuchen dokumentiert (Fellenberg *et al.*, 2008; 2012) und die Funktionalität der simultanen Immunodetektion wurde in folgend beschriebenen Analysen (Abbildung 3.2) nachgewiesen. Es wurden gleiche Mengen eines Extraktes, in diesem Fall von Knospen des Stadiums A bzw. von offenen Blüten, auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion mittels Antikörper erfolgte, indem jeweils Antikörper gegen die AtOMT1, die AtCCoAOMT1 und die AtTSM1 separat sowie letztendlich alle drei Antikörper gemeinsam verwendet wurden. Anschließend erfolgte die Interaktion mit dem für alle drei verwendeten Primärantikörper spezifischen Sekundärantikörper und abschließend die Entwicklung mittels Alkalischer Phosphatase (Kapitel 2.6.8).

Bei der Inkubation mit den einzelnen Antikörpern waren neben den spezifischen auch unspezifische Signale sichtbar (Abbildung 3.2). Diese unspezifischen Wechselwirkungen waren in gleicher Intensität auch während der simultanen Detektion aufgetreten und die spezifischen Signale waren durch dieses Verfahren nicht beeinträchtigt. Sowohl während der separaten Inkubation mit dem AtTSM1-Antikörper als auch in der simultanen Inkubation mit allen drei Antikörpern konnte die AtTSM1 (3) nur in den Knospen des Stadiums A detektiert werden. Die beiden anderen Proteine, AtOMT1 (1) und AtCCoAOMT1 (2), konnten in beiden Proben ebenfalls ohne Selektivitätsverlust nachgewiesen werden. Da sich die hier erhaltenen Resultate mit den Angaben in der Literatur decken und keine Beeinträchtigung der Detektion durch simultane Anwendung der An-

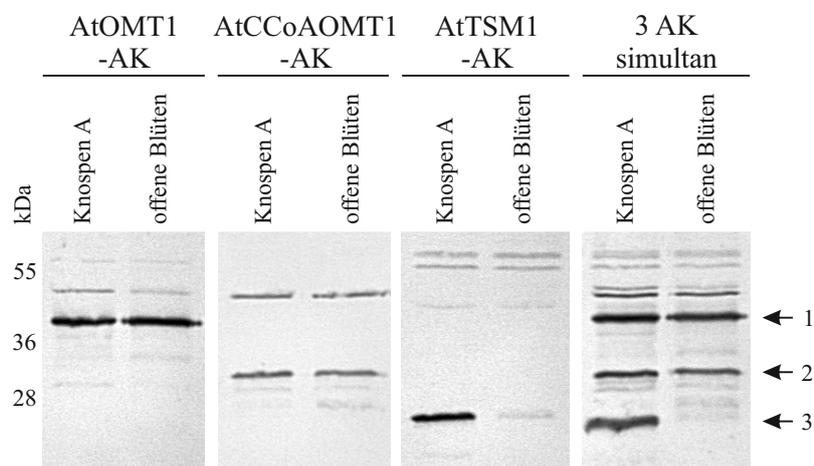


Abbildung 3.2: Funktionalitätsnachweis der simultanen Immunodetektion. Darstellung der Immunodetektion in Extrakten von Knospen A und offenen Blüten mit jeweils getrennten Antikörpern sowie der simultanen Inkubation mit allen drei Antikörpern. Die Proteingrößen in kDa sind auf der linken Seite und die durch Pfeile hervorgehobenen, detektierten Proteine (1 – AtOMT1 40 kDa; 2 – AtCCoAOMT1 29 kDa; 3 – AtTSM1 26 kDa) auf der rechten Seite angegeben. AK - Antikörper

tikörper auftrat, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die simultane Immunodetektion der gewählten OMTs möglich ist und die Analysen nicht separat angefertigt werden müssen.

Die simultane Immunodetektion wurde im Folgenden für alle verwendeten Knospenstadien und Blüten eingesetzt, um die Resultate der Anreicherung AdoMet-bindender Proteine mittels CCMS zu überprüfen. Die visuell erhaltenen Daten der Analyse sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Bei Betrachtung des *On/Off*-Effektes der OMTs (Vorkommen oder Abwesenheit der drei OMTs ohne Berücksichtigung der Quantität) in CCMS und Immunodetektion konnte eine vergleichbare Verteilung der Proteine während der Knospenentwicklung nachgewiesen werden. Die Enzyme AtOMT1 (1) und AtCCoAOMT1 (2) sind in allen Proben enthalten, während die AtTSM1 (3) auf die Knospenstadien A und B beschränkt war. Allerdings wurden Unterschiede der Signalintensitäten beobachtet. Im Fall der AtOMT1 (1), welche mittels Immunodetektion gleichbleibende Signalintensitäten ergab, wurde nach der Anreicherung mittels CCMS ein Abfall der Intensität der Bandenfärbung in Blüten beobachtet. Die ebenfalls abnehmende Signalintensität der AtCCoAOMT1 (2) während der Blütenentwicklung hingegen war mit beiden Methoden erfassbar. Die Detektion der AtTSM1 (3) mittels CCMS zeigte ein gleichbleibendes Expressionslevel des Proteins in Knospen A und B, während mittels Immunodetektion ein Abfall der Signalintensität in Knospen des Stadiums B verzeichnet werden konnte. Beide Methoden lassen jedoch nur semiquantitative Aussagen zu, da die Bindung der Antikörper bzw. Sonden von der Affinität zum Protein abhängig ist. Deshalb wurde zur Etablierung des CCMS-Systems lediglich die Verteilung als detektierbar oder nicht detektierbar (*On/Off*-Effekt) herangezogen. Die Etablierung der CCMS-Technologie in Pflanzen war somit aus qualitativer Sicht erfolgreich und die Methode konnte für weitere Analysen eingesetzt werden.

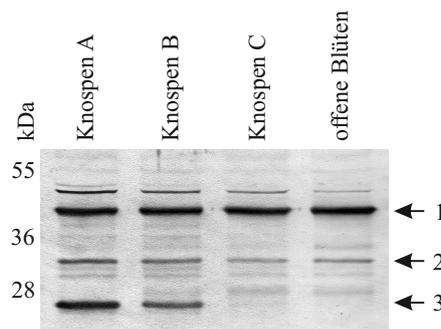


Abbildung 3.3: Simultane Immunodetektion dreier OMTs in Blütenentwicklungsstadien. Es wurden drei Antikörper die spezifisch für die jeweils detektierten Proteine waren sowie Extrakte der Knospen A bis C und offenen Blüten verwendet. Die Proteingrößen in kDa sind auf der linken Seite und die durch Pfeile hervorgehobenen, detektierten Proteine (1 – AtOMT1 40 kDa; 2 – AtCCoAOMT1 29 kDa; 3 – AtTSM1 26 kDa) auf der rechten Seite angegeben.

Transkriptanalysen

Die Analyse der relativen Transkriptlevel während der Blütenentwicklung diente der Bestimmung von Korrelationen zu den mittels CCMS und Immunodetektion erfassten Proteinen. Die beiden Diagramme in Abbildung 3.4 sollen erstens verdeutlichen, welche Unterschiede der Transkriptlevel innerhalb der einzelnen Blütenentwicklungsstadien bestehen (Abbildung 3.4 A) und zweitens ob Unterschiede der Stadien in Bezug auf jeweils ein Gen erkennbar sind (Abbildung 3.4 B). Es wird deutlich, dass Differenzen der Transkriptmengen der Gene innerhalb der jeweiligen Entwicklungsstadien zu verzeichnen waren (Abbildung 3.4 A). Besonders in den Stadien Knospen C und offene Blüten sind die Unterschiede signifikant, da kein Transkript des Gens *Attsm1* nachgewiesen werden konnte. Weiterhin kommt es innerhalb der Gene im Bezug auf die verschiedenen Blütenentwicklungsstadien zu Veränderungen in der Abundanz der korrespondierenden Transkripte (Abbildung 3.4 B). Signifikante Unterschiede ergaben sich für die Gene *Atccoaoamt1* und *Attsm1*, während die Transkription der *Atomt1* stabil war.

In den qPCR-Daten war eine Reduktion der Transkriptmenge der *Attsm1* in Knospen beim Übergang von Stadium A zu B auf 1/8 zu verzeichnen. Weiterhin konnte, während das Transkriptlevel

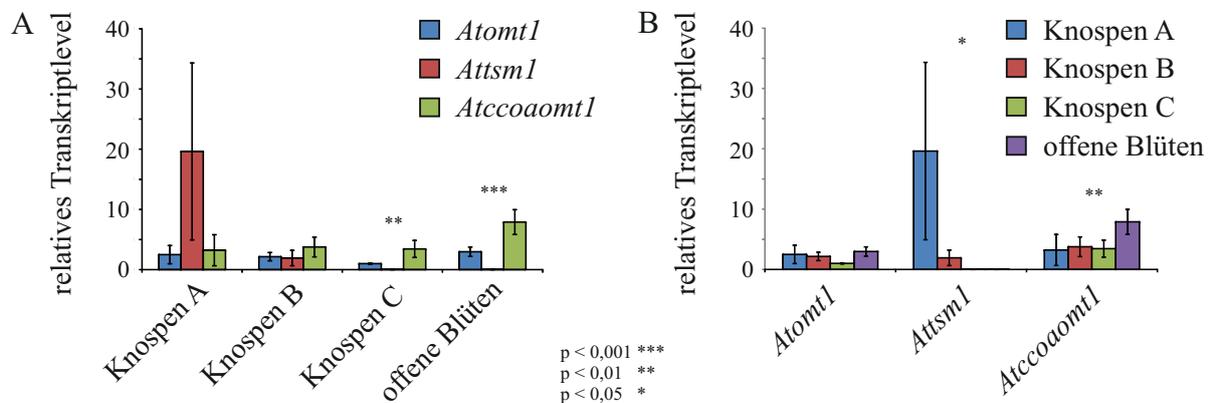


Abbildung 3.4: Relative Transkriptlevel dreier OMTs während der Blütenentwicklung. Die durch qPCR ermittelten relativen Transkriptlevel beziehen sich auf PP2A in den Entwicklungsstadien der Blüte (Knospen A bis C und offene Blüten). Dargestellt sind die Unterschiede der Transkriptlevel der Gene innerhalb der Entwicklungsstadien (A) und der Entwicklungsstadien bezogen auf die einzelnen Gene (B). Hierbei entspricht *Atomt1* dem Gen (*At5g54160*) der AtOMT1, *Attsm1* dem Gen (*At1g67990*) der AtTSM1 und *Atccoaoamt1* dem Gen (*At4g34050*) der AtCCoAOMT1. Die durch ANOVA ermittelten Signifikanzwerte p sind durch * dargestellt. Es wurden drei biologische Wiederholungen mit jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt.

der *Atccoamt1* in der Entwicklung zu offenen Blüten ansteigt, eine Reduktion des *Atomt1*-Transkriptes in Knospen C beobachtet werden. Diese drei Resultate waren mit keiner der proteinbiochemischen Methoden (CCMS und Immunodetektion) detektierbar. Im Bezug auf die offensichtlichen Unterschiede der CCMS zur Immunodetektion ist Folgendes anzumerken. Im Fall der *AtTSM1* konnte mit den qPCR-Daten die Reduktion der Signalintensität während der Immunodetektion (Stadium B) bestätigt werden. Die Entwicklung der relativen Transkriptlevel der *Atccoamt1* decken sich nicht mit den Daten der proteinbiochemischen Analysen. Hier ergab sich ein Anstieg des Transkriptlevels in der Blütenentwicklung, während auf Proteinebene ein Abfall der Signalintensität verzeichnet wurde. Zusätzlich konnte das gleichbleibende Proteinlevel der AtOMT1 nicht bestätigt werden, da das Transkriptlevel in Knospen des Stadiums C abfiel.

Abschließend muss jedoch angemerkt werden, dass es sich, wie oben bereits erwähnt, bei den Resultaten der proteinbiochemischen Analysen um semiquantitative Aussagen handelt. Somit ist es nicht möglich, die Korrelation von Transkript- und Proteinlevel exakt zu bestimmen. Dennoch können die Aussagen der proteinbiochemischen Analysen hinsichtlich des *On/Off*-Effektes aller drei OMTs bestätigt werden. Demnach ist es mittels CCMS erstmals möglich, Unterschiede der Akkumulation von Proteinen (*On/Off*-Effekt) unabhängig vom Transkriptlevel und ohne den Einsatz spezifischer Antikörper qualitativ zu bestimmen.

3.1.2 Analyse von T-DNA-Insertionsmutanten

Da die AdoHcy-basierende CCMS-Technologie die drei im letzten Kapitel genannten OMTs mit hinreichender Eindeutigkeit in *A. thaliana* nachweisen konnte, wurde die Methode verwendet, um die Abwesenheit der Proteine AtOMT1 und AtCCoAOMT1 in den entsprechenden T-DNA-Insertionslinien zu verifizieren. Zum Einsatz kamen Mutanten, welche in den entsprechenden Genen jeweils eine T-DNA-Insertion enthielten. Diese Insertion sollte zu einer Eliminierung der entsprechenden Proteine führen. In einer parallel angefertigten Dissertation konnte das Fehlen der zugehörigen Transkripte bestätigt werden (Christin Fellenberg, Abteilung Stoffwechsel- und Zellbiologie des Leibniz-Institutes für Pflanzenbiochemie, unveröffentlichte Ergebnisse). Für die Analysen der Wildtyp- (Col-1092) und T-DNA-Mutanten (T-DNA-*Atomt1*- und T-DNA-*Atccoamt1*-Insertionslinie) wurden Knospen (Stadien A und B) verwendet, in denen beide Proteine nachweislich im Wildtyp vertreten sind. Die Extraktion der Proteine, deren Anreicherung mittels CCMS sowie die Detektion erfolgte wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben. In Abbildung 3.5 sind die Ergebnisse dargestellt.

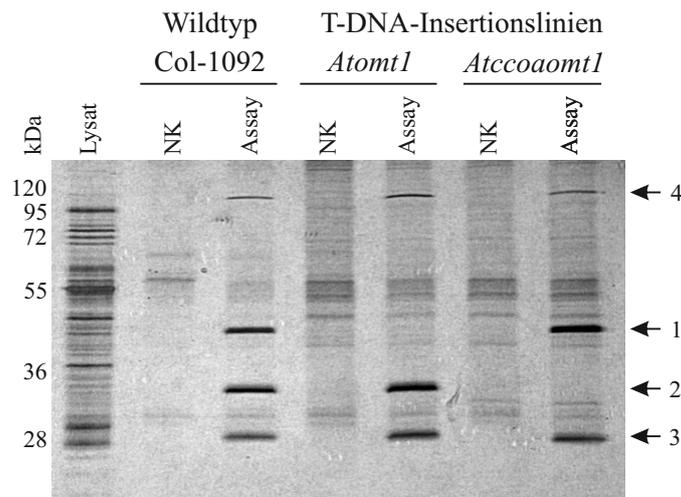


Abbildung 3.5: 1D-Gel der CCMS verschiedener T-DNA-Insertionslinien. Darstellung der Anreicherungsergebnisse aus Extrakten von Knospen (A plus B) von Wildtyp-Pflanzen und T-DNA-Insertionslinien nach Silberfärbung. Die Proteingrößen in kDa sind auf der linken Seite und die durch Pfeile hervorgehobenen, detektierten Proteine (1 – AtOMT1 40 kDa; 2 – AtCCoAOMT1 29 kDa; 3 – AtTSM1 26 kDa; 4 – AtMMT 119 kDa) auf der rechten Seite angegeben. NK - Negativkontrolle

In den Silber-gefärbten 1D-Gelen ist das Muster der bereits vorher während der Blütenentwicklung detektierten Proteine AtOMT1, AtCCoAOMT1 und AtTSM1 in den Wildtyp-Knospen (Col-1092) zu erkennen. Das Fehlen der entsprechenden Proteine in den Insertionslinien konnte nachgewiesen werden, da in den T-DNA-Mutanten die entsprechenden Banden nicht sichtbar waren. Im Fall der T-DNA-*Atomt1*-Insertionslinie fehlte Bande 1 bei 40 kDa und in der T-DNA-*Atccoaomt1*-Insertionslinie konnte Bande 2 bei 29 kDa nicht detektiert werden. Überdies waren keine zusätzlichen Banden erkennbar, die auf in der Aminosäuresequenz veränderte aber aktive Proteine hindeuten würden. Somit wurde der Nachweis erbracht, dass kein entsprechendes aktives Enzym vorhanden war und es sich bei diesen Linien auch auf Proteinebene um Deletionsmutanten handelte. Weiterhin war in allen Linien, unabhängig der genetischen Eigenschaften, eine bis zu dem Zeitpunkt noch nicht detektierte Bande bei 119 kDa (4) erkennbar. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen, die während der Etablierung des Systems (Blütenentwicklung in Kapitel 3.1.1) erzielt wurden, da das entsprechende Protein in den zugehörigen Gelen nicht sichtbar war. Auch bei weiteren Analysen der Anreicherung von AdoMet-bindenden Proteinen aus Knospenextrakten war diese Bande bei 119 kDa sichtbar (Gele siehe Abbildung 1 im Anhang). Allerdings konnten mittels LC-MS/MS-Messungen nur Hinweise auf die Identität anhand eines Peptides (Mascot Score 65) erbracht werden. Somit könnte es sich bei diesem Protein um die AtMMT (4) handeln, welche eine Thiol-Methyltransferase darstellt und Methionin (Bourgis *et al.*, 1999) sowie Selen-Methionin (Tagmount *et al.*, 2002) methylieren kann.

Die Resultate der Analysen der T-DNA-Insertionslinien wurden nicht selbst reproduziert. Allerdings fand die hinsichtlich des qualitativen Nachweises einzelner OMTs zuverlässige CCMS-Technologie bereits Anwendung in Studentenpraktika. Hierbei konnten vergleichbare Resultate bei Untersuchungen der selben T-DNA-Insertionsmutanten erbracht und somit die Reproduzierbarkeit verifiziert werden.

3.1.3 Einfluss verschiedener reaktiver Gruppen und Verfahren

Die nachfolgenden Vergleiche unterschiedlicher reaktiver Gruppen der CCs und verschiedener CCMS-Verfahren wurden durchgeführt, um zu zeigen, welche Eigenschaften der Sonden und Methoden die Anreicherung von Proteinen beeinflussen können. Hierbei handelte es sich somit nicht um eine Optimierung des Systems.

Die AdoHcy-CCs der CCMS sind in zwei verschiedenen Varianten erhältlich, welche sich in den reaktiven Gruppen unterscheiden. Zum Einen wurde ein Phenylazid und zum Anderen ein Tetrafluorphenylazid verwendet. Phenylazide und deren Derivate sind die bekanntesten photoreaktiven Substanzen und zeichnen sich vor allem durch eine hohe Reaktionseffizienz und -geschwindigkeit sowie der Stabilität während der Lagerung und der einfachen Herstellung aus (Liu & Yan, 2010). Die strukturellen Unterschiede dieser reaktiven Gruppen sind in Abbildung 3.6 dargestellt. Die im Tetrafluorphenylazid eingeführten Fluorsubstitutionen verbessern die Eigenschaften der durch UV-Bestrahlung ausgelösten Reaktion und der anschließenden Bindung (Poe *et al.*, 1992). Demzufolge könnten erhebliche Unterschiede in der irreversiblen Bindung der Zielproteine auftreten, die anhand dieser Studien charakterisiert werden sollen.

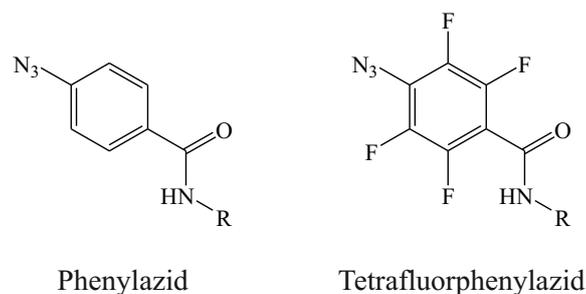


Abbildung 3.6: Gegenüberstellung der Struktur zweier reaktiver Gruppen. Die Darstellung beinhaltet sowohl die Azide als reaktive Gruppen als auch die Kopplung über eine Peptidbindung zum Rest der Sonde (R).

Mit beiden Sonden wurden zusätzlich sowohl das *Off* als auch das *On Bead* Verfahren durchgeführt und mögliche Differenzen in der Detektion erfasst. Die Unterschiede der beiden Verfahren lagen im Bindungszeitpunkt der Sonde an die magnetischen Partikel (Abbildung 3.7). Im Fall des *On Bead*

Verfahrens sind die Sonden bereits an die Partikel gebunden, wenn das Extrakt zugegeben wird. Bei dem *Off Bead* Verfahren wird die reine Sonde zum Rohextrakt gegeben und die Bindung über Biotin und Streptavidin an die magnetischen Partikel erfolgt nach der irreversiblen Interaktion der Proteine mit der Sonde. In beiden Verfahren könnten sich somit Unterschiede in der Detektion ergeben, da verschiedene Parameter eine Rolle spielen.

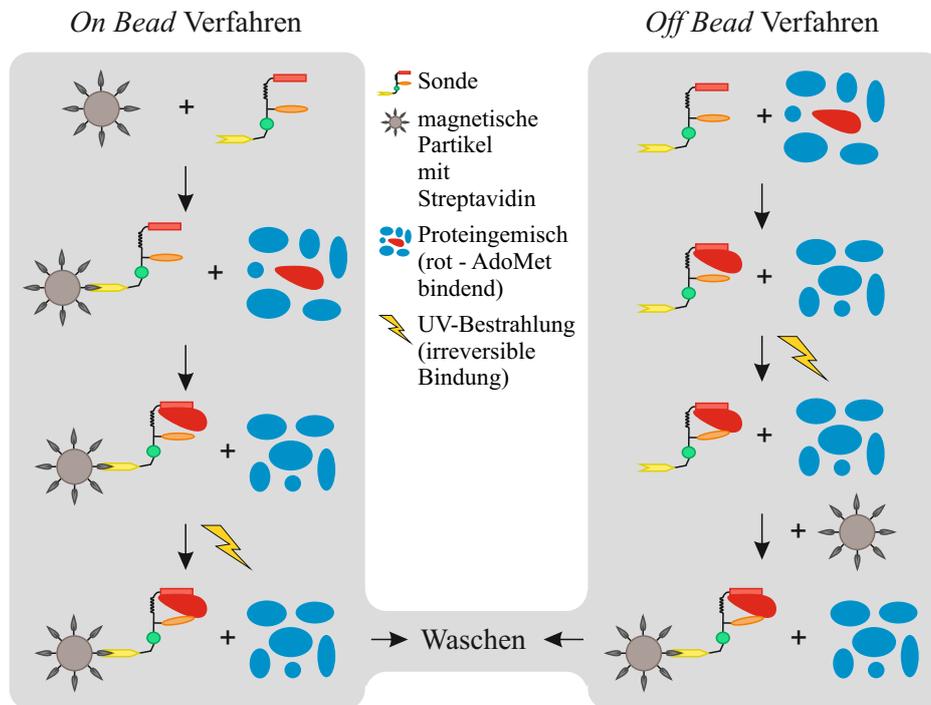


Abbildung 3.7: Gegenüberstellung des *On Bead* und *Off Bead* Verfahrens. Der Unterschied beider Verfahren liegt im Bindungszeitpunkt der magnetischen Partikel. Die weiteren Schritte können in Abbildung 1.3 nachvollzogen werden.

Qualitative Auswertung mittels 1D-PAGE

Die 1D-Gele, welche hierfür erstellt wurden, sind in Abbildung 3.8 vergleichend dargestellt. Die Durchführung dieser Analysen beschränkte sich auf offene Blüten, da hier nur Unterschiede zwischen der Anreicherungs-effizienz zweier reaktiver Gruppen und dem *On* und *Off Bead* Verfahren getestet werden sollten und die einzelnen Entwicklungsstadien nicht von Interesse waren. Aus diesem Grund ist kein Signal der AtTSM1 zu beobachten.

Beim Vergleich der verwendeten Methoden und Sonden konnte festgestellt werden, dass mit der Sonde, welche Phenylazid als reaktive Gruppe besitzt, das *On Bead* Verfahren bessere Ergebnisse erzielte als das *Off Bead* Verfahren. Hier waren deutliche Unterschiede zwischen Assay und Nega-

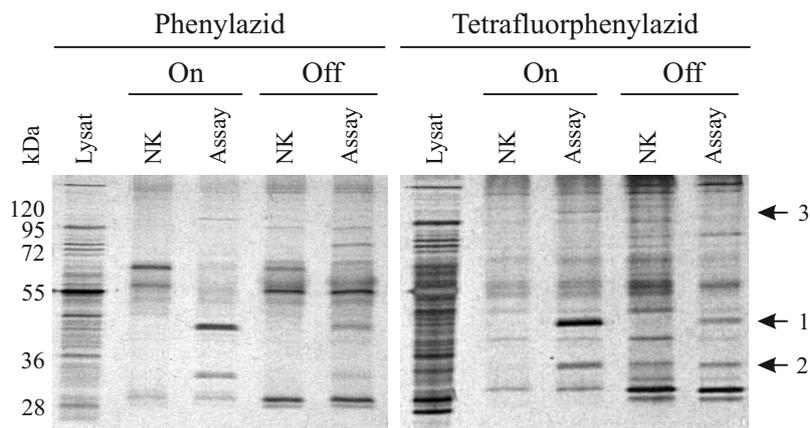


Abbildung 3.8: 1D-Gele der CCMS mit unterschiedlichen Sonden und Verfahren. Die verwendeten Sonden sind nach den reaktiven Gruppen in Phenylazid- und Tetrafluorphenylazid-Sonden eingeteilt. Die verwendeten Verfahren waren *On* und *Off Bead*, gekennzeichnet durch *On* und *Off*. Die Proteingrößen in kDa sind auf der linken Seite und die durch Pfeile hervorgehobenen, erfassten Proteine (1 – AtOMT1 40 kDa; 2 – AtCCoAOMT1 29 kDa; 3 – AtMMT 119 kDa) auf der rechten Seite angegeben. NK - Negativkontrolle

tivkontrolle sichtbar. Während des *Off Bead* Verfahrens schienen die AdoMet-bindenden Proteine weniger effizient zu interagieren. Die Banden, welche die AtOMT1 (1) und AtCCoAOMT1 (2) repräsentieren, sind deutlich schwächer, während die Bande der AtMMT (3) nicht erkennbar ist. Mit dem *On Bead* Verfahren konnten alle drei zuvor bereits erfassten Proteine mit höherer Intensität der Bandenfärbung nachgewiesen werden.

Im Fall der Sonde mit Tetrafluorphenylazid als reaktiver Gruppe, ergaben sich vergleichbare Resultate. Auch hier schien das *On Bead* Verfahren effizienter zu sein als das *Off Bead* Verfahren. Während die AtMMT (3) mittels *Off Bead* Verfahren nicht nachgewiesen werden konnte, war dies im *On Bead* Verfahren möglich. Des Weiteren wurde eine höhere Bandenintensität der AtOMT1 (1) im *On Bead* Verfahren festgestellt. Die Bandenintensität der AtCCoAOMT1 (2) war relativ gleichbleibend. Ein weiterer zu beobachtender Effekt war die erhöhte Intensität und Anzahl der falsch positiven Banden in der Negativkontrolle beim *Off Bead* Verfahren, vor allem bei Verwendung der Sonde mit Tetrafluorphenylazid als reaktiver Gruppe aber auch mit der Phenylazid-Sonde.

Qualitative Auswertung mittels LC-MS/MS-Messung

Zur Verifizierung der visuell erhaltenen Daten durch PAGE und Silberfärbung wurden LC-MS/MS-Messungen durchgeführt. Die Resultate sind in Tabelle 3.3 aufgeführt. Hierbei wurde Bezug auf die drei in diesen Messungen detektierten AdoMet-bindenden Enzyme genommen. Alle unspezifisch interagierenden Proteine wurden nicht aufgelistet, gehen aber in die Berechnung der Ver-

hältnisse von AdoMet-bindenden zu unspezifisch interagierenden Proteinen ein. Bei den AdoMet-bindenden Proteinen handelte es sich um die AtOMT1, AtCCoAOMT1 und eine putative Thiol-Methyltransferase. Die LC-MS/MS-Messungen wurden nur einmalig durchgeführt und keiner Optimierung unterzogen, da die Messkapazität des Massenspektrometers nicht ausreichte. Es wurden äquivalente Mengen analysiert, damit die erhaltenen Daten vergleichbar sind.

Tabelle 3.3: Vergleich der Proteindetektion zweier Sonden in unterschiedlichen Verfahren. Die unterschiedlichen Sonden sind nach den reaktiven Gruppen die verwendet wurden, Phenylazid (PA) und Tetrafluorphenylazid (TFPA), bezeichnet. Die beiden eingesetzten Verfahren sind *On* und *Off Bead*, abgekürzt durch On und Off.

Proteinbezeichnung	PA On	PA Off	TFPA On	TFPA Off
AtOMT1 (<i>At5g54160</i>)	4	3	4	3
AtCCoAOMT1 (<i>At3g34050</i>)	2	1	1	1
putative Thiol-Methyltransferase (<i>At2g43910</i>)	-	-	-	1
AdoMet bindend / gesamt (Protein)	2 / 11	2 / 20	2 / 6	3 / 17
AdoMet bindend (Protein)	18,2%	10,0%	33,3%	17,6%
AdoMet bindend / gesamt (Peptid)	6 / 15	4 / 22	5 / 9	5 / 19
AdoMet bindend (Peptid)	40,0%	18,2%	55,6%	26,3%

Es ist zu erkennen, dass mit beiden Sonden bei der Verwendung des *On Bead* Verfahrens im Fall der AtOMT1 mehr Peptide angereichert wurden. Das konnte ebenfalls für die AtCCoAOMT1 bei Verwendung der Phenylazid-Sonde und dem *On Bead* Verfahren gezeigt werden. Jedoch ist ebenfalls auffällig, dass mit der Tetrafluorphenylazid-Sonde und dem *Off Bead* Verfahren ein weiteres, mit der anderen Sonde nicht anzureicherndes Protein, messbar war. Hierbei handelt es sich um eine putative Thiol-Methyltransferase. Da die Messungen nicht optimiert und keine größeren Mengen injiziert wurden, konnte keine eindeutige Identifizierung dieses Proteins mit mindestens zwei Peptiden erfolgen. Weiterhin war auffällig, dass obwohl eine Bande bei 119 kDA in den Gelen der *On Bead* Verfahren im Fall beider Sonden sichtbar ist, die AtMMT durch direkte LC-MS/MS-Messung in keiner Probe nachweisbar war.

Ein verbessertes Verhältnis von AdoMet-bindenden zu nicht spezifisch interagierenden Proteinen, sowohl auf Protein- als auch auf Peptidebene, ist im *On Bead* Verfahren eindeutig nachweisbar. Es wurden 18,2% (PA) bzw. 33,3% (TFPA) AdoMet-bindende Proteine erfasst, während im *Off Bead* Verfahren nur 10,0% (PA) bzw. 17,6% (TFPA) detektiert wurden. Ähnliche Verhältnisse konnten bei Betrachtung der Peptiddaten verzeichnet werden. Der Anteil AdoMet-bindender im Vergleich zu unspezifisch interagierenden Proteinen konnte durch Verwendung der Tetrafluorphenylazid-Sonde weiter erhöht werden (Tabelle 3.3). Da bei der Betrachtung der Verhältnisse allerdings nur die Anzahl der erfassten Proteine bzw. Peptide zugrunde gelegt und die Konzentrationen der Peptide nicht einbezogen wurde, können nur semiquantitative Aussagen getroffen werden.

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Sonden mit Tetrafluorphenylazid als reaktiver Gruppe kombiniert mit dem *On Bead* Verfahren effizienter ist, da, abgesehen von dem mit dem *Off Bead* Verfahren zusätzlich detektierten Protein, ein besseres Verhältnis von positiv zu falsch positiv erfassten Proteinen erreicht wurde. Da die Tetrafluorphenylazid-basierte Sonde allerdings erst gegen Ende des praktischen Teils der hier angefertigten Dissertation erhältlich war, wurden alle Analysen mit der Phenylazid-Sonde und dem bereits optimierten *On Bead* Verfahren durchgeführt, um die Ergebnisse vergleichbar zu halten.

3.1.4 AdoMet-bindende Proteine in anderen Organen von *A. thaliana*

Da es möglich war, ein Profil der drei hoch abundanten OMTs, AtOMT1, AtCCoAOMT1 und AtTSM1 während der Blütenentwicklung zu erstellen, sollte die Bestimmung des Proteinmusters auf weitere Organe und Entwicklungsstadien von *A. thaliana* erweitert werden. Hierfür wurden Keimlinge, Wurzeln, Stängel, Blätter und Schoten verwendet. Zusätzlich sollte, sofern möglich, die Detektion weiterer AdoMet-bindender Proteine erfolgen.

Anreicherung und Profilerstellung mittels CCMS

Für diese Experimente erfolgte die Ernte der Stängel, Blätter und Schoten vier bis fünf Wochen nach Vereinzeln der Keimlinge auf Erde. Die Keimlinge selbst wurden zwei Wochen und die Wurzeln drei bis vier Wochen nach Keimung auf MS-Medium geerntet (Kapitel 2.1). Die Extraktion der Proteine sowie deren Anreicherung und Detektion erfolgte auch hier mit den gleichen Methoden wie zur Analyse der Proben der Blütenentwicklung (Kapitel 3.1.1). Die Proteinkonzentration aller Lysate, mit Ausnahme des Stängelsextraktes, entsprach etwa 7 mg/mL. Die Extrakte aus Stängeln wiesen eine Konzentration von etwa 3 mg/mL auf.

In Abbildung 3.9 sind die Anreicherungsanalysen der Extrakte aus Keimlingen, Wurzeln, Stängeln, Blättern und Schoten dargestellt. Hierbei ist, wie in Kapitel 3.1.1, das Lysat, die Negativkontrolle (NK) und der Anreicherungsassay (Assays) abgebildet. Die Identifizierung der einzelnen Proteine erfolgte ebenfalls mittels Verdau im Gel und LC-MS/MS-Messung. Detaillierter betrachtet wird deutlich, dass in den Assays, im Vergleich zur Negativkontrolle, visuell drei spezifisch mit der Sonde interagierende Proteine erkennbar sind. Die beiden OMTs, AtOMT1 und AtCCoAOMT1, waren mit einer Ausnahme, der AtOMT1 in Blättern, in allen hier verwendeten Organen von *A. thaliana* sichtbar. Das Signal der AtOMT1 im Blatt war durch hoch abundante Proteine, welche auch in der Negativkontrolle auftraten (Abbildung 3.9 in Blättern), überlagert. LC-MS/MS-Messungen wiesen nach, dass es sich hierbei um die Primärstoffwechselproteine RuBisCO-Aktivase (*At2g39730*; Zhang *et al.* (2001)), eine Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase B Untereinheit (*At1g42970*;

Kwon *et al.* (1994)) und ein putatives RNA-Bindungsprotein (*At1g09340*; Beligni & Mayfield (2008)) handelt. Während diese Enzyme mit mehreren Peptiden identifiziert wurden, konnte lediglich ein Peptid (Mascot *Score* = 27,8) der AtOMT1 nachgewiesen werden. Zusätzlich war die Signalintensität des Proteins AtCCoAOMT1 (2) in Blättern geringer. Deshalb war die Detektion der AtCCoAOMT1 hier ebenfalls nur mit einem Peptid möglich. Überdies ergaben sich Indizien für ein spezifisch in Wurzeln vorkommendes Protein. Durch MS-Analyse der die AtCCoAOMT1 enthaltenden Bande, konnte ein Peptid des Proteins AtCCoAOMT3 (4) mit einem Mascot *Score* von 28 detektiert werden. Zudem konnte das in Knospen bereits erfasste Protein AtMMT (3) in einer spezifischen Bande bei 119 kDa nachgewiesen werden. Somit ist es ebenfalls konstitutiv in allen hier untersuchten Organen vertreten. Die Identifizierung mittels LC-MS/MS-Messungen der ausgeschnittenen Bande aus den Anreicherungen von Stängel- und Schotenextrakten ergab vier bzw. fünf Peptide mit Mascot *Scores* von 105 und 4% Sequenzdeckung bzw. 101 und 5% Sequenzdeckung. Somit konnte die AtMMT eindeutig identifiziert werden. Weiterhin war, wie bereits in weit entwickelten Knospen und offenen Blüten, in keiner der Proben eine Anreicherung der AtTSM1 zu beobachten. Ein Anstieg der Signalintensität im Allgemeinen war in den Stängelproben zu verzeichnen, obwohl weniger Protein (etwa 3 mg/ml bei gleich bleibendem Volumen) eingesetzt wurde als in der Anreicherung von Proteinen aus den anderen Organen. Zusammenfassend konnten vier Proteine in den analysierten Organen von *A. thaliana* erfasst werden, wobei sich in den Blattproben Probleme durch höher abundante Proteine des Primärstoffwechsels ergaben.

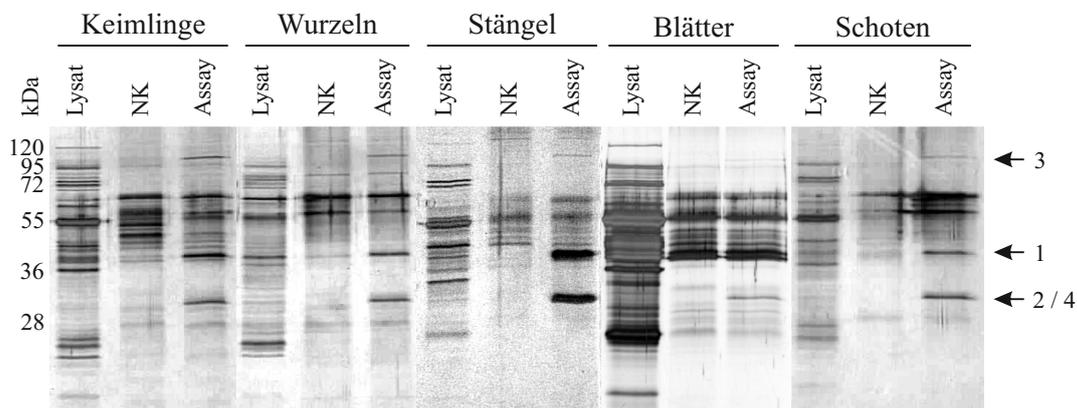


Abbildung 3.9: 1D-Gele der CCMS verschiedener Organe und Entwicklungsstadien. Darstellung der Anreicherungsergebnisse aus Extrakten von Keimlingen, Wurzeln, Stängeln, Blättern und Schoten nach Silberfärbung. Die Proteingrößen in kDa sind auf der linken Seite und die durch Pfeile hervorgehobenen, erfassten Proteine (1 – AtOMT1 40 kDa; 2 – AtCCoAOMT1 29 kDa; 3 – AtMMT 119 kDa; 4 – AtCCoAOMT3 32 kDa) auf der rechten Seite angegeben. NK - Negativkontrolle

Transkriptanalysen

Um die durch die CCMS erhaltenen Resultate im Hinblick auf die Transkriptmengen einordnen zu können, wurden auch hier qPCR-Daten der Gene *Atomt1*, *Atccoamt1* und *Atccoamt3* (Abbildung 3.10) erstellt. Auf die Analyse des Transkriptlevels der *Atmmt* wurde verzichtet, da es sich hierbei um eine Thiol-Methyltransferase handelt, welche nicht im Fokus dieser Arbeit stand. Mit den qPCR-Daten der *Attsm1* konnte die spezifische Expression des Proteins in jungen Knospen bestätigt werden, da kein Transkript in den hier verwendeten Proben messbar war (nicht abgebildet). Die beiden Diagramme sollen wiederum verdeutlichen, welche Unterschiede der Transkriptlevel innerhalb der einzelnen Blütenentwicklungsstadien bestehen (Abbildung 3.10 A) und ob Unterschiede der Stadien in Bezug auf jeweils ein Gen erkennbar sind (Abbildung 3.10 B).

Die AtCCoAOMT3, die nach Angaben des Programms Genevestigator vor allem in Wurzeln, Embryonen und alternden Blättern transkribiert wird (Genevestigator; Hruz *et al.* (2008)), wurde einbezogen, da es sich um ein funktionell bis dahin noch nicht charakterisiertes CCoAOMT-ähnliches Protein aus *A. thaliana* handelt. Bei der Analyse der qPCR-Daten fiel auf, dass das zugehörige Gen unter den hier untersuchten Organen lediglich in Wurzeln transkribiert wird. Dies bestätigt die Daten von Genevestigator, da keine seneszenten Blätter oder Embryonen verwendet wurden. Die Transkriptmengen der AtCCoAOMT3 sind in fast allen Fällen geringer als die Transkriptmengen der anderen analysierten OMTs. Dies ist kongruent zu den geringen Wiederfindungsraten des Enzyms mittels CCMS. Die beiden anderen untersuchten Gene, *Atomt1* und *Atccoamt1*, konnten in jeder verwendeten Probe detektiert werden und sind somit in allen untersuchten Organen exprimiert. Zudem war das Transkriptlevel beider Gene in Stängeln, übereinstimmend mit der Beteiligung der resultierenden Proteine in der Ligninbiosynthese (Do *et al.*, 2007; Moinuddin *et al.*, 2010), erhöht. Diese Steigung der Transkriptmenge spiegelte sich auch im Proteinlevel wieder (Abbildung 3.9). In Blättern allerdings wurde festgestellt, dass die AtOMT1 ein, im Vergleich zu den anderen Organen und Genen, niedrigeres Transkriptlevel aufwies. Nur die Transkriptmenge der *Atccoamt3* in Wurzeln war ähnlich gering. Da beide Proteine mit nur einem Peptid in den entsprechenden Proben detektiert werden konnten, deutet das auf Probleme bei der Detektion niedrig abundanter Proteine mittels CCMS hin. Allerdings war auch das Protein AtCCoAOMT1 nur mit einem Peptid in Blättern nachweisbar, aber dennoch ergaben sich für dieses Gen höhere Transkriptlevel.

Zusammenfassend konnte eine Korrelation der Transkript- und Proteinmengen im Bezug auf den *On/Off*-Effekt festgestellt werden. Lediglich eine einzige Abweichung der Transkript- vom Proteinlevel konnte beobachtet werden (AtCCoAOMT1 in Blättern), jedoch soll aufgrund der fehlenden Quantifizierbarkeit der CCMS nicht näher darauf eingegangen werden. Weiterhin deuten die erhaltenen Ergebnisse auf die Schwierigkeiten der CCMS hin, gering abundante Proteine anzureichern.

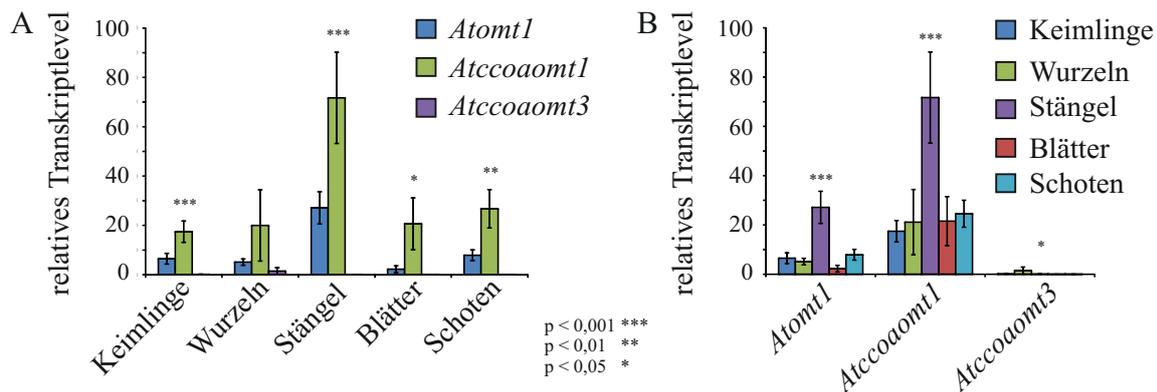


Abbildung 3.10: Relative Transkriptlevel dreier OMTs in verschiedenen Organen und Entwicklungsstadien. Die durch qPCR ermittelten relativen Transkriptlevel beziehen sich auf PP2A in Keimlingen, Wurzeln, Stängeln, Blättern und Schoten. Dargestellt sind die Unterschiede der Transkriptmengen der Gene innerhalb der Entwicklungsstadien (A) und der Entwicklungsstadien bezogen auf die einzelnen Gene (B). Hierbei entspricht *Atomt1* dem Gen (*At5g54160*) der AtOMT1, *Atccoaoamt1* dem Gen (*At4g34050*) der AtCCoAOMT1 und *Atccoaoamt3* dem Gen (*At3g61990*) der AtCCoAOMT3. Die durch ANOVA ermittelten Signifikanzwerte (p) sind durch * dargestellt. Es wurden drei biologische Wiederholungen mit jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt.

Die AtCCoAOMT3 konnte in Wurzeln nur mit einem Peptid erfasst werden. Dies deckt sich mit der Detektion nur eines Peptides der AtOMT1 in Blättern, welche hier, wie die AtCCoAOMT3 in Wurzeln, nur geringe Transkriptmengen aufwies.

3.1.5 Weitere AdoMet-bindende Proteine

Während der Etablierung des Systems und dessen Anwendung in verschiedenen Organen und T-DNA-Insertionslinien von *A. thaliana* konnten lediglich fünf AdoMet-bindende Proteine detektiert werden. Davon wurden vier Enzyme eindeutig über mehrere Peptide identifiziert. Da in *A. thaliana* theoretisch aber circa 200 AdoMet-bindende Enzyme (Kozbial & Mushegian, 2005) existieren, sollte der Einsatz differentieller Zentrifugation zur Vorfraktionierung, Detergenzien zur Solubilisierung sowie direkte LC-MS/MS-Messung die Sensitivität der Methode steigern und somit dem Nachweis weiterer AdoMet- bzw. AdoHcy-bindender Proteine dienen. Außerdem war eine eindeutige Identifizierung der AtCCoAOMT3 angestrebt.

Vorfraktionierung und Solubilisierung durch Detergenzien

In diesem Experiment, durchgeführt von Sophie Nahrstedt (Abteilung Stoffwechsel- und Zellbiologie des Leibniz-Institutes für Pflanzenbiochemie, Bachelorarbeit) wurden Wurzelproben verwendet,

da auch die AtCCoAOMT3 eindeutig nachgewiesen werden sollte. Von diesem Protein konnte in den vorangegangenen Analysen nur ein Peptid ermittelt werden. Da es sich hierbei aber um eine wurzelspezifische und membrangebundene CCoAOMT handelt und dies für keine andere bislang charakterisierte CCoAOMT aus *A. thaliana* bekannt ist, war dieses von besonderem Interesse. Damit Membranproteine oder membranassoziierte Proteine, wie die AtCCoAOMT3, und andere schwer lösliche Proteine identifiziert werden können, wurde eine Vorfraktionierung der Rohextrakte durchgeführt und verschiedene Detergenzien eingesetzt. Die Vorfraktionierung des Zellextraktes erfolgte durch differentielle Zentrifugation (Kapitel 2.6.2). Dies ermöglicht die Isolierung von Proteinen, welche auf bestimmte Organellen beschränkt sind. Die verschiedenen Fraktionen beinhalteten intakte Zellen und Zellwände (P1, verworfen); Mitochondrien, Chloroplasten, Lysosomen und Peroxisomen (P2); Plasmamembran, mikrosomale Fraktion (Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat) und andere Membranen (P3) sowie lösliche, zytosolische Proteine (Ü3) (Ozols, 1990). Da die Solubilisierung der Membranproteine abhängig vom Verhältnis Detergenz zu Protein ist und die Konzentration von membrangebundenen Proteinen eines Rohextraktes nicht bekannt war, wurden drei in Tabelle 3.4 genannte Detergenzien mit jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Diese wurden so gewählt, dass eine Konzentration nahe der kritischen mizellären Konzentration lag und die zweite doppelt so hoch war. Die Solubilisierung der Membranproteine erfolgte während der Inkubation bei 4°C und mehrmaligem Schütteln.

Tabelle 3.4: Detergenzien zur Solubilisierung von Membranproteinen. Die eingesetzten Konzentrationen richten sich nach der entsprechenden kritischen mizellären Konzentration.

Detergenz	Eigenschaft	Konzentration im Extrakt
CHAPS	zwitterionisch	0,4% und 0,8%
Natriumcholat	ionisch	0,5% und 1,0%
Octyl- β -D-Glucopyranosid	nicht ionisch	0,7% und 1,4%

Nach der Solubilisierung erfolgte die Anreicherung AdoMet-bindender Proteine der Fraktionen P2, P3 und Ü3 mittels CCMS und die visuelle Auswertung mittels Silber-gefärbten 1D-Gelen (Abbildung 3.11). Auch in diesem Experiment wurden Banden ermittelt und ausgeschnitten, die spezifisch angereicherte Proteine enthielten und nicht in der Negativkontrolle beobachtet werden konnten. Weiterhin wurden speziell Banden in der Größenregion zwischen 30 und 34 kDa extrahiert, da die AtCCoAOMT3 eine molare Masse eines Monomers von etwa 32 kDa besitzt. Anschließend erfolgte der Verdau durch Trypsin und die LC-MS/MS-Analyse, wobei zu beachten ist, dass aufgrund der fehlenden Messkapazität am IPB die Proben an der Universität Leipzig durch Maria Federova vermessen wurden. Hierbei wurden die Proben der Octyl- β -D-Glukopyranosid Fraktionen nach dem Verdau direkt vermessen und nicht in einem zusätzlichen Aufarbeitungsschritt eingengt und in anderem Puffer erneut gelöst. Allerdings war dies bei den CHAPS und Natriumcholat Fraktionen der Fall, da diese ursprünglich für die Messung am IPB vorbereitet waren (Kapitel 2.6.9).

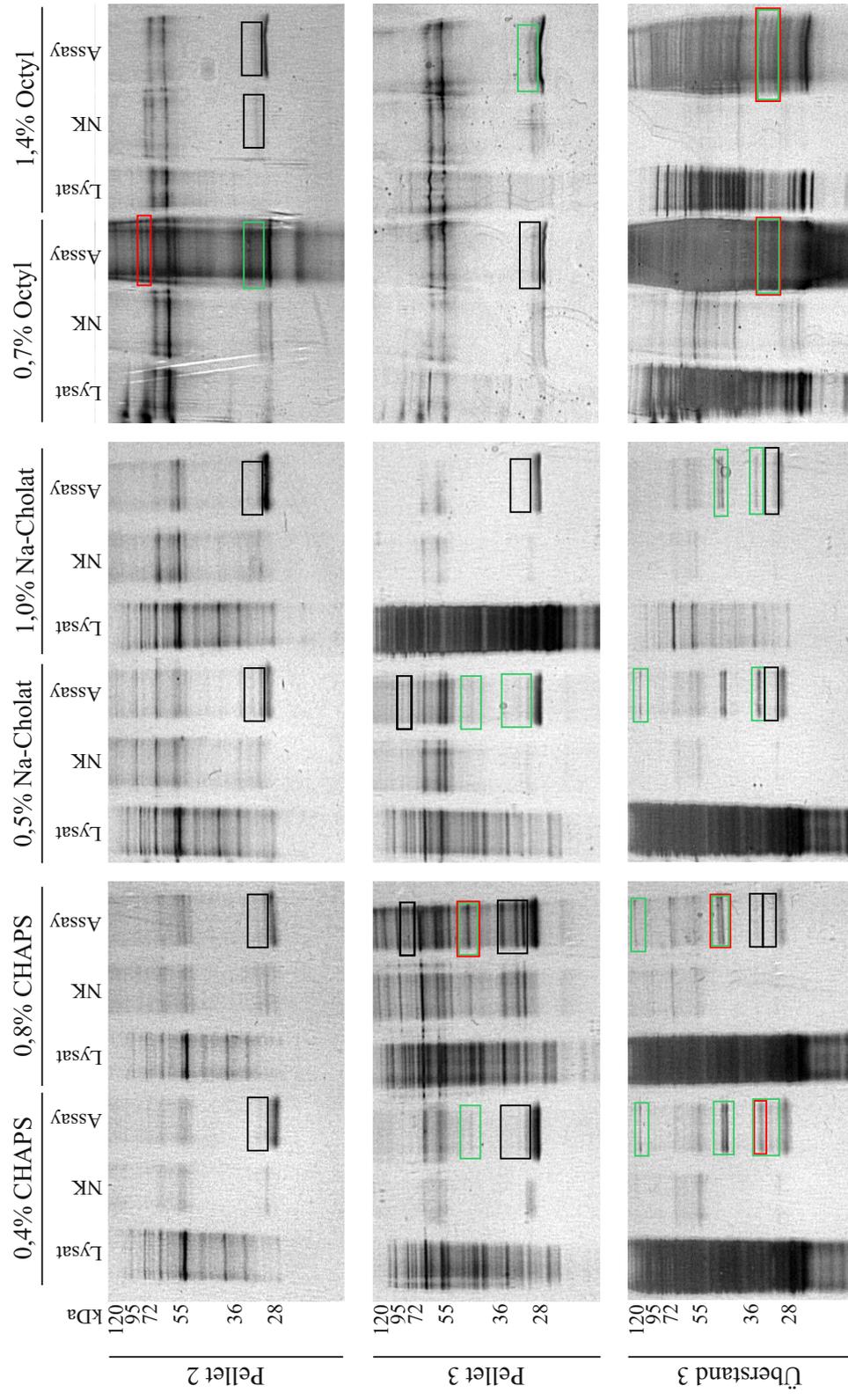


Abbildung 3.11: 1D-Gele der CCMS nach differentieller Zentrifugation. Darstellung der Anreicherungsresultate aus vorfraktionierten, mit Detergenzien versehenen Wurzelextrakten nach Silberfärbung. Die Proteingrößen in kDa sind auf der linken Seite angegeben. Die roten Rahmen zeigen die ausgeschnittenen Banden, in denen AdoMet-bindende Proteine identifiziert wurden. Schwarze Rahmen verdeutlichen die Banden mit unspezifisch interagierenden Proteinen, und grün hebt die Banden mit den Methyltransferasen AtOMT1, AtCCoAOMT1 und AtMMT sowie anderen AdoMet-bindenden Proteinen hervor. NK - Negativkontrolle; Na-Cholat - Natriumcholat; Octyl - Octyl- β -D-Glucopyranosid

In Abbildung 3.11 werden die Banden, welche die neu identifizierten AdoMet-bindenden Proteine enthielten, durch einen roten Rahmen hervorgehoben. Schwarze Rahmen markieren die Banden mit nur unspezifisch interagierenden Proteinen, während grün die Banden mit den Methyltransferasen AtOMT1, AtCCoAOMT1 und AtMMT sowie anderen AdoMet-bindenden Proteinen verdeutlicht.

In Tabelle 3.5 sind alle identifizierten Proteine und die Proben, in welchen diese enthalten waren, aufgelistet. Die drei bereits eindeutig in Gelen von Wurzelextrakten detektierten Proteine (AtOMT1, AtCCoAOMT1 und AtMMT) sind nicht nochmals angegeben. Es wird deutlich, dass acht weitere AdoMet bindende Proteine nachgewiesen werden konnten. Der Hauptteil dieser Proteine war in den Fraktionen der Extrakte mit Octyl- β -D-Glukopyranosid vertreten. Gründe hierfür liegen zum Einen an der hohen Menge an Protein, welches an der Sonde gebunden war (siehe Abbildung 3.11: bei gleichbleibendem aufgetragenem Volumen in allen Anreicherungsassays). Zum Anderen wird nochmals darauf hingewiesen, dass diese Proben nach dem Verdau direkt vermessen wurden und somit geringere Verluste an Peptiden auftraten. Die gesuchte Membran-assoziierte AtCCoAOMT3 konnte allerdings mit keiner Methode nachgewiesen werden. Ursachen hierfür könnten in den geringen Mengen des Proteins und der fehlenden Solubilisierung liegen.

Tabelle 3.5: Angereicherte AdoMet-bindende Proteine nach differentieller Zentrifugation.

Nach Anreicherung durch CCMS erfolgte die Identifizierung durch MS-Messungen. TMD - Transmembrandomäne; SAM - *S*-Adenosylmethionin-Synthetase; SMT - Sterol-Methyltransferase; MAT - Methionin-Adenosyltransferase

Proteinbezeichnung	Genlokus	Molekulare Masse	TMD eindeutige Peptide	Mascot Protein Score	Sequenzdeckung	Probenbeschreibung
SAM-1	<i>At1g02500</i>	43 kDa	nein 4	467	31%	Octyl Ü3
SMT2	<i>At1g20330</i>	40 kDa	ja 2	98	6%	CHAPS P3
dehydration-responsive family protein	<i>At1g26850</i>	70 kDa	ja 4	171	9%	Octyl P2
MAT3	<i>At2g36880</i>	42 kDa	nein 14	637	47%	Octyl Ü3
thiol methyltransferase	<i>At2g43910</i>	25 kDa	nein 2	77	11%	Octyl Ü3
MAT4	<i>At3g17390</i>	43 kDa	nein 8	666	48%	Octyl Ü3
dehydration responsive protein related	<i>At3g23300</i>	69 kDa	ja 3	80	5%	Octyl P2
SAM-2	<i>At4g01850</i>	43 kDa	nein 2	630	38%	Octyl Ü3
similar to unknown protein	<i>At5g14600</i>	35 kDa	nein 2	57	5%	CHAPS Ü3

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse an, dass mittels Vorfraktionierung und der Anwendung von Detergenzien die Ausbeute an AdoMet-bindenden Proteinen erhöht werden kann. Weiterhin konnte der positive Einfluss dieser Extraktion auf die Identifizierung von membranassoziierten AdoMet-bindenden Proteinen nachgewiesen werden. In den Fraktionen P2 und P3, in welchen auch die Membranen der unterschiedlichen Zellbestandteile sedimentieren, konnten AdoMet-bindende Proteine nachgewiesen werden, welche Membrandomänen enthielten (Arabidopsis Biological Resource Center, 2010). Im Überstand Ü3 hingegen (lösliche, zytosolische Proteine) wurden nur nicht-membranständige Proteine identifiziert. Es konnte jedoch kein erneuter Nachweis der AtCCoAOMT3 erbracht werden.

MS-basierte Detektion

Direkte LC-MS/MS-Messungen, unmittelbar nach der Anreicherung über AdoHcy-CCs, ohne Separierung auf 1D-Gelen, könnte ebenfalls die Anzahl der detektierbaren AdoMet-bindenden Proteine erhöhen. Diese Analysen wurden mit Proben von Knospen (Stadien A bis C zusammengefasst) durchgeführt. Vier weitere AdoMet-bindende Proteine konnten über jeweils ein Peptid detektiert werden (Tabelle 3.6). Jedoch war es nicht möglich, mit Hilfe direkter MS-Analysen weitere AdoMet- oder AdoHcy-bindende Proteine eindeutig zu identifizieren. Allerdings wurden die hier angegebenen MS-Messungen infolge eingeschränkter Messzeit nur einmalig durchgeführt und es fand keine Optimierung des Trypsinverdaus oder der LC-MS/MS-Messung selbst statt. Es ist denkbar, dass weitere Replikate sowie die Optimierung der Methode zu umfangreicheren Ergebnissen führen können. Dies wäre Gegenstand zukünftiger Arbeiten.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass es durchaus möglich ist, weitere AdoMet- oder AdoHcy-bindende Proteine mittels CCMS zu detektieren, indem Vorfraktionierungen, Detergenzien oder direkte MS-Analysen angewendet werden. Jedoch konnten nicht alle circa 200 putativen AdoMet-bindenden Proteine (Kozbial & Mushegian, 2005) identifiziert werden.

Tabelle 3.6: Angereicherte AdoMet-bindende Proteine durch direkte MS-Messung. Es konnte jeweils nur ein Peptid detektiert werden.

Proteinbezeichnung	Genlokus	Molekulare Masse	Mascot Score	Sequenzdeckung
Nicotianaminsynthase (put.)	<i>At1g56430</i>	36 kDa	21	6%
unbekannte Methyltransferase	<i>At2g31740</i>	85 kDa	58	2%
N-Methyltransferase 2 (put.)	<i>At1g48600</i>	54 kDa	75	3%
N-Methyltransferase 1	<i>At3g18000</i>	56 kDa	87	3%

3.2 CCoAOMT Anreicherung mittels Nitrocatechol-basierter Sonden

Die Differenzierung der CCoAOMTs von anderen AdoMet-bindenden Proteinen bereits während der Anreicherung sollte durch CCoAOMT-spezifische Sonden erfolgen. Da für diesen Zweck aber noch kein etabliertes System zur Verfügung stand, wurden Literaturrecherchen und Sequenzanalysen durchgeführt, um ähnliche Enzymklassen zu finden, für die reversible Inhibitoren bekannt sind. Auf dieser Grundlage wurden anschließend putative Inhibitoren der CCoAOMTs von Kooperationspartnern (S. Brauch und Dr. B Westermann) synthetisiert und auf ihre hemmende Wirkung getestet. Bei effizienter Hemmung kamen sie als selektive Einheiten Nitrocatechol-basierter Sonden (NC-Sonden) zum Einsatz. Die zum Ende der Arbeit erste entwickelte NC-Sonde konnte abschließend auf ihre Anreicherungs-effizienz und Selektivität gegenüber pflanzlicher CCoAOMTs getestet werden.

Generell ist anzumerken, dass es während der Analysen mit den NC-Inhibitoren und -Sonden zu Problemen mit der Löslichkeit und Reinheit der Verbindungen kam. Diese erschwerten die Anwendung der Sonden-basierten Anreicherung und die damit verbundenen Analysen.

3.2.1 Sequenzanalysen der AtTSM1 im Vergleich zur RnCOMT

Tierische COMTs besitzen eine circa 80%ige Sequenzidentität zu den menschlichen Vertretern dieser Enzymklasse (Bonifácio *et al.*, 2002; Lundström *et al.*, 1991; Salminen *et al.*, 1990). Aus diesem Grund werden Inhibitoren, die bei neurodegenerativen Erkrankungen des Menschen zum Einsatz kommen, zuvor im tierischen System getestet (Nissinen, 2010). Außerdem belegen Vergleiche der Proteinstruktur der bereits kristallisierten CCoAOMTs, McPFOMT und MsCCoAOMT, mit der Struktur der RnCOMT, dass trotz geringer Sequenzidentität von etwa 20% die aktiven Zentren sowie die Tertiärstruktur der Proteine hoch konserviert sind (Kopycki *et al.*, 2008; Ferrer *et al.*, 2005). Somit besteht die Möglichkeit, bereits etablierte Inhibitoren zur Entwicklung der CCoAOMT-spezifischen Sonden zu verwenden. Um dies auch für die in *A. thaliana* exprimierten CCoAOMTs zu bestätigen, wurde exemplarisch ein Sequenzvergleich der AtTSM1 und der RnCOMT durchgeführt (Abbildung 3.12).

Die Sequenzen der AtCCoAOMT3 und der RnCOMT haben eine Identität von 18,9% (Geneious Pro 5.3.4). Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Homologien bzw. Sequenzidentitäten vorwiegend in den für die Bindung des Substrates, des Cosubstrates und des Metallions verantwortlichen Aminosäuren auftreten. Für die RnCOMT wurde die Struktur mittels Kristallografie aufgeklärt und der Bindungsmechanismus beschrieben (Bonifácio *et al.*, 2002; Vidgren *et al.*, 1994). Aufgrund

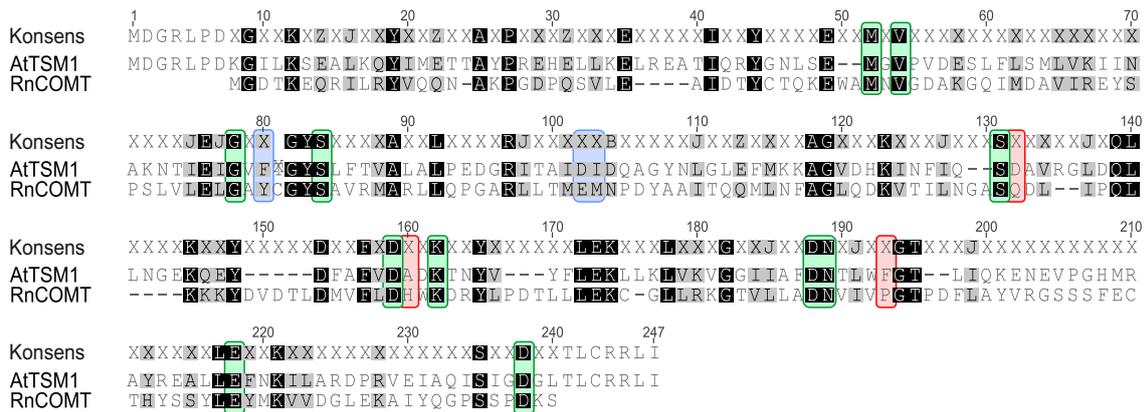


Abbildung 3.12: Sequenzvergleich der AtTSM1 zur RnCOMT. Die identischen Aminosäuren sind schwarz und die Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften grau unterlegt. Farblich hinterlegte Aminosäuren sind bei der Bindung des Substrates, Cosubstrates oder des Cofaktors essentiell (Vidgren *et al.*, 1994; Bonifácio *et al.*, 2002), wobei grün identische Aminosäuren hervorhebt, blau Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften und rot Unterschiede zwischen den Sequenzen. RnCOMT (AAH81850.1) und AtTSM1 (NP_564917.1)

dieser Angaben wurden die hier essentiellen Aminosäuren in Abbildung 3.12 hervorgehoben und mit den entsprechenden Aminosäuren der AtTSM1 verglichen. Insgesamt wurden hierbei 17 Aminosäuren betrachtet. Dabei fiel auf, dass 11 von diesen Aminosäuren identisch (grün umrahmt, schwarz unterlegt) zwischen der RnCOMT und der AtTSM1 vorlagen. Weitere drei Aminosäuren wiesen ähnliche Eigenschaften auf (blau umrahmt, grau unterlegt) und nur drei Aminosäuren unterschieden sich völlig (rot umrahmt). Hierbei sind das His160 durch Ala, das Gln132 durch Asp und das Pro193 durch Phe ersetzt. Die katalytisch aktiven Aminosäuren wie Lys162 und Asn189, Asp188 und Asp159 liegen hoch konserviert vor.

Eine Gruppe der bereits im tierischen System hinreichend charakterisierten Inhibitoren, sind Nitrocatechol-Derivate, wie Entacapon (Lotta *et al.*, 1995; Nissinen *et al.*, 1992) und andere Verbindungen (Bonifácio *et al.*, 2002; Vidgren *et al.*, 1994). Da die oben durchgeführten Sequenzanalysen eine Vielzahl an Analogien beider Enzymklassen herausstellen, liegt die Vermutung nahe, dass Nitrocatechol-Derivate auch mit dem aktiven Zentrum der pflanzlichen CCoAOMTs aus *A. thaliana* reagieren und somit als selektive Gruppe bei spezifischen Sonden angewendet werden können. Allerdings sind auch Unterschiede in der Substratbindetasche aufgefallen. Somit können die Inhibitoren des tierischen Systems nicht einfach übernommen werden, sondern es müssen Vortests durchgeführt werden, die die Interaktion der putativen Inhibitoren mit den CCoAOMTs aus *A. thaliana* belegen. Weiterhin weisen die Klasse II (CaOMTs) und Klasse III (SABATH-Enzyme) OMTs erhebliche Unterschiede zu CCoAOMTs auf. Beispielsweise besitzen sie ein höheres Molekulargewicht und sind kationenunabhängig (Joshi & Chiang, 1998). Somit sollte nicht nur die

Differenzierung zwischen OMTs und anderen AdoMet-bindenden Proteinen möglich sein, sondern auch die spezifische Unterscheidung zwischen CCoAOMTs und weiteren OMTs.

3.2.2 Hemmende Wirkung Nitrocatechol-basierter Inhibitoren

Zur Analyse der Hemmung putativer Inhibitoren wurden von den für die Synthese verantwortlichen Kooperationspartnern verschiedene Nitrocatechol-Derivate synthetisiert, die anschließend in Enzymassays mit dem rekombinant hergestellten Enzym AtTMS1 getestet wurden. Hierfür wurde das Substrat Chlorogensäure verwendet, welches von diesem Protein mit der höchsten katalytischen Effizienz umgesetzt wurde (Fellenberg *et al.*, 2008). Bei Betrachtung der Hemmung durch verschiedene Nitrocatechol-Derivate, können Aussagen über die Wirkung unterschiedlich substituierter Reste getroffen werden. Die verwendete Nummerierung der C-Atome der putativen Inhibitoren kann anhand von Substanz **1** ((E)-2-(4'-Hydroxy-3'-Methoxy-5'-Nitrobenzyliden)Bernsteinsäure) in Abbildung 3.13 nachvollzogen werden. Die Substanzen unterscheiden sich in den Substituenten am C3'-Atom und der partiell veresterten Bernsteinsäure.

In den Inhibitoren ist die negativ geladene Nitrogruppe in direkter Nachbarschaft zu den Hydroxygruppen des Catecholrings laut Literatur ausschlaggebend für die Inhibierung (Bonifácio *et al.*, 2002; Vidgren *et al.*, 1994). Deshalb wurde 3,5-Dinitrocatechol (3,5-DNC) als Leitstruktur verwendet. Abbildung 3.13 zeigt die Inhibitoren und ihre jeweilige hemmende Wirkung der AtTSM1, angegeben als prozentuale Reduktion der Methylierung der Chlorogensäure. Hierbei wurden die kritischen Substituenten rot hervorgehoben und die die Inhibierung nicht beeinflussenden grün. Die Leitstruktur 3,5-DNC wies eine inhibierende Wirkung von 22% auf. Die Substanzen **1** und **2** enthalten jeweils eine Methylgruppe am C3'-Atom des Catechols und zeigten keine inhibierende Wirkung. Die Demethylierung des Catechols (Substanz **3**) war somit essentiell für die hemmende Wirkung, hier 10%. Die Veresterung der Säuregruppen der Bernsteinsäure hatte keinen Einfluss, solange eine Methylgruppe am Catecholring enthalten war (Vergleich Substanz **1** und **2**). Lag das Molekül demethyliert vor, konnte eine Veresterung an der C1-Säuregruppe die hemmende Wirkung steigern (Strukturen **3** mit 10% im Vergleich zu **4**, **5** und **6** mit durchschnittlich 33% inhibierender Wirkung). Die Veränderung der Funktionalität der C4-Säuregruppe hatte nur minimalen Einfluss auf die Inhibierung (Substanzen **4**, **5** und **6**). Abschließend wurde entschieden, Substanz **4** in weiteren Untersuchungen zu verwenden, da hier die höchste inhibierende Wirkung (etwa 35%) der AtTMS1 auftrat.

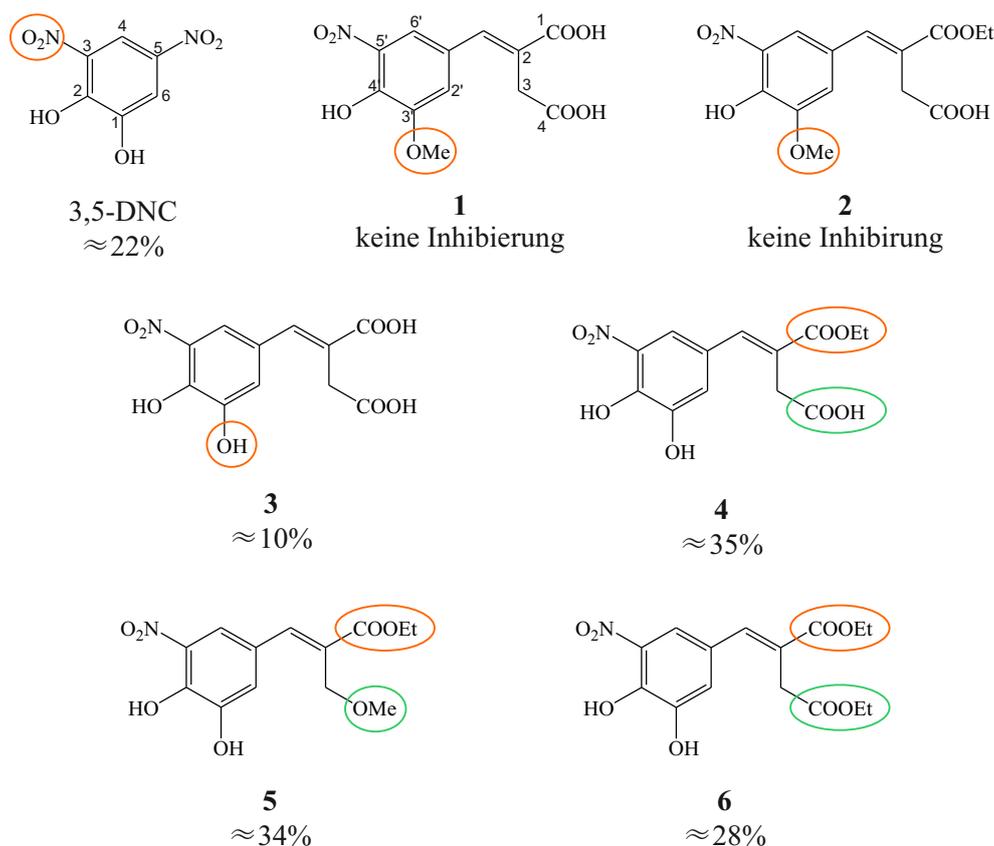


Abbildung 3.13: Putative CCoAOMT-Inhibitoren. Darstellung der chemischen Struktur der putativen CCoAOMT-Inhibitoren. Unter der entsprechenden Nummer des Inhibitors ist die inhibierende Wirkung in % angegeben. Die roten Kreise markieren die für die Inhibierung entscheidenden Substitutionen, während grüne Kreise nicht relevante hervorheben.

3.2.3 Kinetische Analysen zweier CCoAOMT-Inhibitoren

In Abbildung 3.14 sind die chemischen Strukturen der CCoAOMT-Inhibitoren **4** und **7**, einem weiteren synthetisierten Inhibitor, im Vergleich zu Entacapon dargestellt. Der Inhibitor **7** wurde aufgrund der großen Unterschiede zu den Substanzen **1** bis **6** in Kapitel 3.2.2 nicht einbezogen. Es erfolgten weitere kinetische Studien der Inhibitoren **4** und **7**, da Substanz **4** die höchste inhibierende Wirkung (35%) aufwies und Substanz **7** dem Entacapon, einem der bekannten COMT-Inhibitoren (Nissinen *et al.*, 1992; Lotta *et al.*, 1995), strukturell ähnelt (Abbildung 3.14). Beide Substanzen enthalten die entscheidende Nitrogruppe am Catechol, wobei die an der C1-Säuregruppe veresterte Bernsteinsäure der Substanz **4** in Substanz **7** durch Ethylacrylat ersetzt wurde. Entacapon enthält, wie Substanz **7**, ebenfalls eine Cyanogruppe und zudem ist das Ethylacrylat durch das Diethylamid der Acrylsäure substituiert.

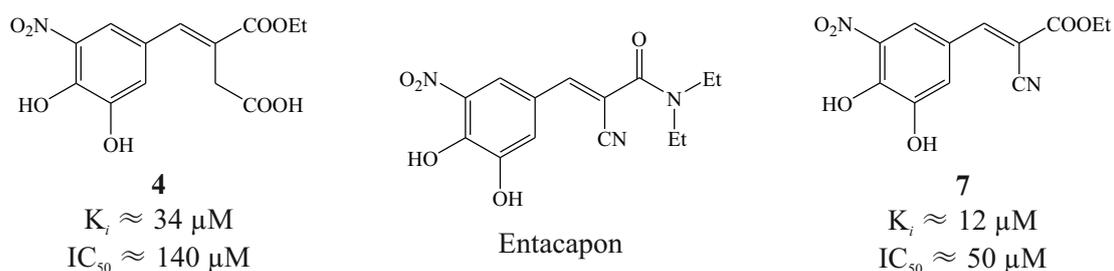


Abbildung 3.14: CCoAOMT-Inhibitoren im Vergleich zu Entacapon. Darstellung der chemischen Struktur der CCoAOMT-Inhibitoren **4** und **7** und des COMT-Inhibitors Entacapon (Nissinen *et al.*, 1992; Lotta *et al.*, 1995). Für die Substanzen **4** und **7** wurden die kinetischen Daten K_i und IC_{50} ermittelt. Das verwendete Substrat war Luteolin und wurde zur Berechnung des IC_{50} -Wertes auf $100 \mu\text{M}$ gesetzt. Der Umsatz erfolgte mit dem rekombinant hergestellten Protein AtTSM1 ($K_m = 31,4 \mu\text{M}$ und $k_{cat} = 0,29 \text{ min}^{-1}$).

Die kinetischen Analysen der Inhibitoren **4** und **7** wurden ebenfalls mit dem Protein AtTSM1 aber dem Substrat Luteolin durchgeführt ($K_m = 31,4 \mu\text{M}$ und $k_{cat} = 0,29 \text{ min}^{-1}$). Luteolin wurde gewählt, da diese Substanz von allen drei bisher charakterisierten OMTs, AtOMT1, AtCCoAOMT1 und AtTSM1 umgesetzt wird. Aus den in Abbildung 3.15 dargestellten Dixon-Diagrammen konnte die Hemmung als kompetitiv (y-Wert des Schnittpunktes der Ausgleichsgeraden ist negativ) eingeordnet werden. Weiterhin erfolgte die Ermittlung der K_i -Werte aus diesen Diagrammen. Der Schnittpunkt zweier Ausgleichsgeraden wurde berechnet und beim y-Wert das Vorzeichen umgekehrt, um den K_i -Wert der betreffenden Geraden zu erhalten. In diesem Muster wurde jede Gerade mit jeder einer anderen Substratkonzentration zugehörigen Ausgleichsgeraden einbezogen und der Mittelwert entspricht dem letztendlichen K_i -Wert des entsprechenden Inhibitors. Die Substratkonzentration des Luteolin wurde bei der Berechnung der IC_{50} -Werte mit Formel 3.1 auf $100 \mu\text{M}$ gesetzt. Die Angaben der berechneten Werte beziehen sich auf $100 \mu\text{M}$ Luteolin.

$$\text{IC}_{50} = (1 + [S]/K_m)\Delta K_i \quad (3.1)$$

Bei einem niedrigeren IC_{50} -Wert sind geringere Konzentrationen an Inhibitor notwendig, um eine 50%ige Inhibierung bei einer bestimmten Substratkonzentration zu erreichen. Die Datenaufnahme erfolgte in drei Replikaten, welche anschließend zu Mittelwerten zusammengefasst wurden.

Die kinetischen Daten (Inhibitorkonstante K_i und IC_{50} -Wert) der Inhibitoren in Abbildung 3.14 verdeutlichen, dass die Entacapon-ähnliche Substanz **7** (IC_{50} etwa $50 \mu\text{M}$) als Inhibitor besser geeignet wäre. Allerdings ist die freie Säuregruppe am C4-Atom vorteilhaft für die Synthese der kompletten Sonde (Abbildung 3.16; S. Brauch, persönliche Mitteilung). Aus diesem Grund wurde Substanz **4** ($\text{IC}_{50} \approx 140 \mu\text{M}$) für die Synthese der ersten NC-Sonde verwendet.

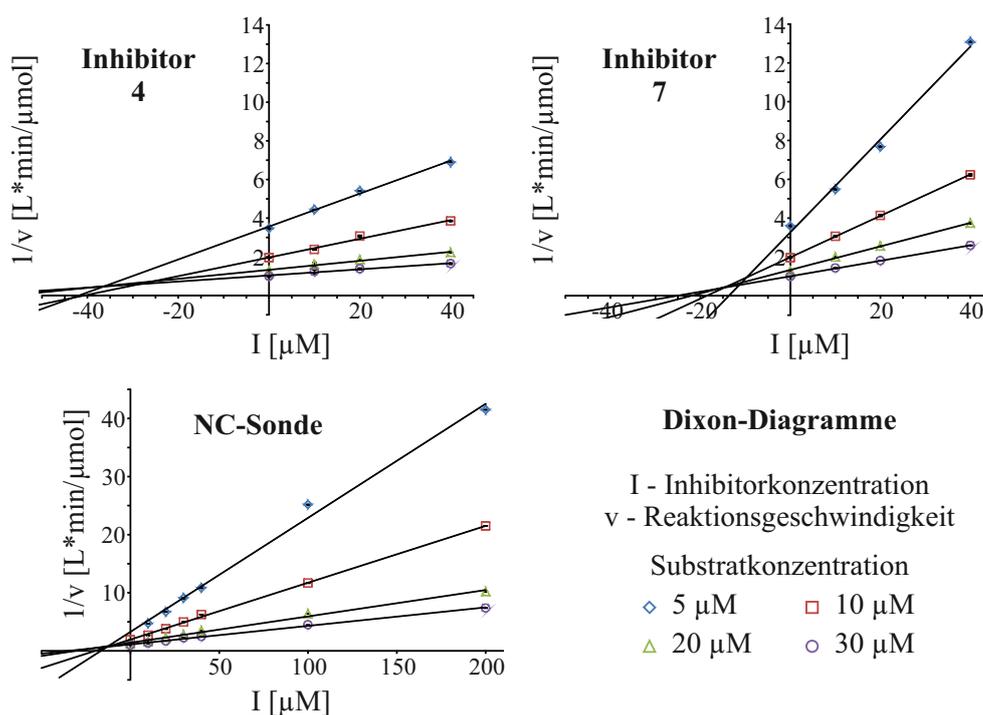


Abbildung 3.15: Dixon-Diagramme der Inhibitoren **4** und **7** sowie der NC-Sonde. Da die Y-Werte der Schnittpunkte der Geraden für alle getesteten Substanzen negativ sind, werden die Inhibitoren **4** und **7** und auch die NC-Sonde als kompetitive Inhibitoren eingeordnet.

3.2.4 Kinetische Analysen der NC-Sonde

Die letztendlich durch die Kooperationspartner synthetisierte NC-Sonde enthielt somit Inhibitor **4** als selektive Gruppe, Biotin als Detektionseinheit, Phenylazid als reaktive Gruppe und PEG-Linker zur räumlichen Trennung von Biotin und selektiver sowie reaktiver Einheit (Abbildung 3.16). Die kinetischen Analysen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die der Inhibitoren **4** und **7** durchgeführt. Hierbei ergaben sich die Parameter $IC_{50} \approx 60 \mu\text{M}$ und $K_i \approx 13 \mu\text{M}$ (Abbildung 3.16). Demzufolge zeigen die ermittelten Inhibitor-konstanten, dass sich die hemmenden Wirkungen der NC-Sonde und des Inhibitors **7** kaum unterscheiden und somit die Inhibierung der NC-Sonde effizienter ist als die der Substanz **4**, welche als selektive Gruppe dieser Sonde dient (Abbildung 3.16). Dies verdeutlicht, dass die Substitution der Säuregruppe am C4-Atom ebenfalls einen Effekt auf die hemmende Wirkung hat, allerdings sollte der Substituent relativ groß sein. Kleinere Substituenten hatten, wie in Abbildung 3.13 dargestellt, keinen Einfluss auf die Inhibierung.

Zusammenfassend wird in den kinetischen Analysen deutlich, dass Substanzen basierend auf Nitrocatechol-Inhibitoren des tierischen Systems auch Inhibitoren und somit Interaktionspartner

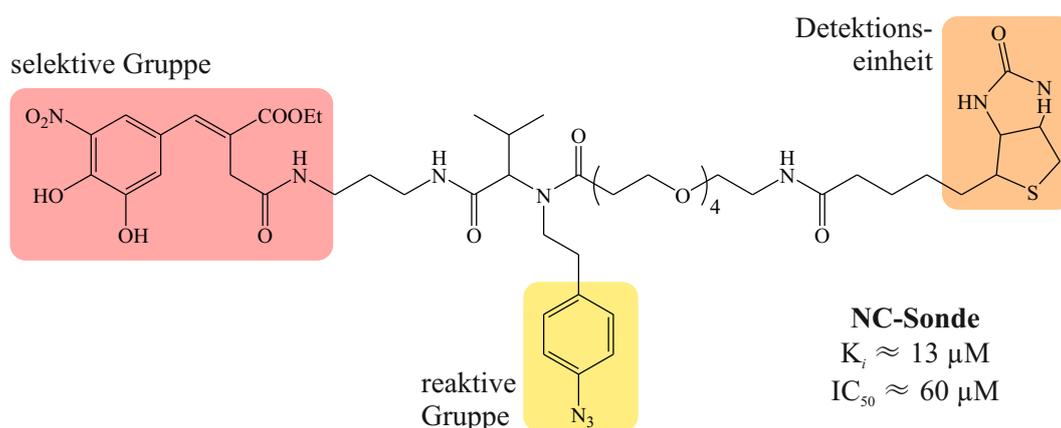


Abbildung 3.16: Strukturelle Darstellung der NC-Sonde. Darstellung der chemischen Struktur der vollständigen NC-Sonde, welche zur Anreicherung von CCoAOMTs verwendet wurde. Die funktionellen Gruppen sind farblich hervorgehoben.

für CCoAOMTs aus *A. thaliana* darstellen können. Weiterhin ergab sich, dass die Kopplung der Inhibitoren als selektive Einheit an den Rest der Sonde die IC_{50} -Eigenschaften sogar verbessert. Abschließend könnte trotz relativ hoher IC_{50} -Werte, verglichen mit der hemmenden Wirkung von Entacapon auf tierische COMTs mit IC_{50} -Werten zwischen 10 und 160 nM (Nissinen *et al.*, 1992), diese NC-Sonde zur Anreicherung von CCoAOMTs eingesetzt werden.

3.2.5 Anreicherungsstudien mittels NC-Sonde

Nachdem die Interaktion der NC-Sonde mit einer CCoAOMT aus *A. thaliana* nachgewiesen werden konnte, stellte sich nun die Frage: Ist die synthetisch hergestellte NC-Sonde geeignet, CCoAOMTs anzureichern und zwischen diesen und anderen, kationenunabhängigen OMTs zu unterscheiden? Die nachfolgenden Analysen wurden, wie im Beispiel der AdoHcy-CCs (Kapitel 3.1), mittels SDS-PAGE und Immunodetektion durchgeführt. In der Negativkontrolle erfolgte die Zugabe von 3,5-DNC, um das aktive Zentrum der Zielproteine zu blockieren. Somit konnte die Sonde mit dem Zielprotein nicht interagieren und es sollte keine Anreicherung im Assay erfolgen.

Eine Anreicherung durch Sonden, welche über Biotin an magnetische Partikel gekoppelt sind (*On Bead* Verfahren), ist nicht nur von der Sonde selbst, sondern auch von den gewählten Bindungs- (Bindungspuffer oder *Capture Buffer*) und den Waschbedingungen (Waschpuffer oder *Washing Buffer I*) abhängig. Der im Fall der NC-Sonde gewählte Bindungspuffer enthielt, abweichend von der Methode mit den AdoHcy-CCs, zusätzlich 5 mM AdoMet. Eine Begründung hierfür liegt in experimentellen Befunden (Lotta *et al.*, 1995; Ferrer *et al.*, 2005) die zeigten, dass AdoMet als erstes vor dem Kation, hier Mg^{2+} und letztendlich dem Substrat bzw. dem Inhibitor der

CCoAOMTs gebunden wird. Mg^{2+} ist auch in dem Bindungspuffer der AdoHcy-CCs enthalten und musste nicht zusätzlich zugegeben werden. Der gewählte Waschpuffer enthielt, wie in der Anwendung der AdoHcy-CCs, 250 mM Tris-HCL (pH 7,5) und $0,5 \mu\text{M}$ Octyl- β -D-Glukopyranosid. Um die Stringenz des Puffers zu beeinflussen, wurden unterschiedliche Konzentrationen an NaCl eingesetzt: 5 mM (stringent wie bei AdoHcy-CCs) und 0,75 mM (tolerant). EDTA (5 mM) wurde genutzt, um Mg^{2+} im Waschpuffer zu eliminieren (ursprünglich: 5 mM $MgCl_2$). Die Ergebnisse der Optimierungsstudien von rekombinant hergestelltem Protein (AtTSM1 und AtOMT1) sowie Knospenextrakten sind in den Abbildungen 3.17 und 3.18 dargestellt.

In Abbildung 3.17 sind die 1D-Gele und eine entsprechende Immunodetektion zur Anreicherung von CCoAOMTs mit der synthetisierten NC-Sonde abgebildet. Für die Tests mit rekombinantem Protein wurden jeweils $1 \mu\text{g}$ der AtOMT1 und AtTSM1 vermisch und in der Anreicherung eingesetzt. Es wurde deutlich, dass die rekombinant hergestellten OMTs an die NC-Sonde binden. Da aber auch in den Negativkontrollen Banden in den entsprechenden Größen (1D-Gel und Immunodetektion) sichtbar waren, konnte diese Interaktion unspezifisch sein oder die Bindung des 3,5-DNC war nicht effizient genug, um die Bindung der Sonde komplett zu verhindern. Die rekombinant hergestellte AtOMT1 (1) zeigt ein verändertes Verhalten im Vergleich der Negativkontrolle

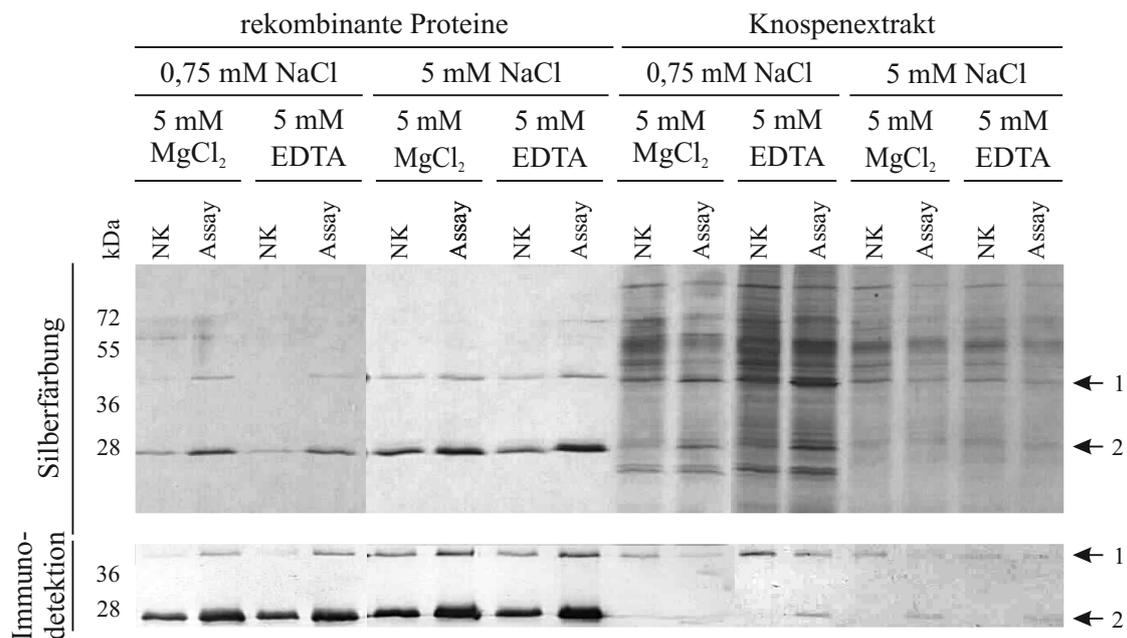


Abbildung 3.17: 1D-Gele und simultane Immunodetektion der Anreicherung von CCoAOMTs. Die gezeigte Anreicherung wurde mit der NC-Sonde durchgeführt. Die verschiedenen Gelspuren entsprechen dem angereicherten Protein (Assay) und der Negativkontrolle (NK) der darüber angegebenen Waschbedingungen. Auf der linken Seite ist der Größenstandard und auf der rechten sind die Proteine mittels Pfeil und Zahl dargestellt (1 – AtOMT1 40 kDa; 2 – AtTSM1 29 kDa).

zum Anreicherungsassay bei toleranten Waschbedingungen (0,75 mM NaCl). Hier waren keine Signale (Silberfärbung) bzw. nur schwache Signale (Immunodetektion) in den Negativkontrollen sichtbar. Im Fall der rekombinant hergestellten AtTSM1 (2) konnten sowohl im Assay als auch in der Negativkontrolle Signale detektiert werden. Hierbei war das Signal in der Negativkontrolle lediglich schwächer, aber noch immer intensiver als das der AtOMT1 in den Negativkontrollen. Das bedeutet, dass bei rekombinanten Proteinen kaum zwischen den Zielproteinen der CCoAOMTs und anderen Klasse II CaOMTs unterschieden werden kann.

In Assays, die mit Knospenrohextrakten durchgeführt wurden (Abbildung 3.17), ergab sich ein anderes Bild. Hier wurde deutlich, dass eine spezifische Anreicherung der CCoAOMTs mit der NC-Sonde erfolgreich war, da ein deutlicher Unterschied zwischen Assay und Negativkontrolle, im Fall der AtTSM1 (2), festgestellt werden konnte. Im Gegensatz dazu war die AtOMT1 (1) sowohl in der Negativkontrolle als auch im Anreicherungsassay detektierbar. Unterschiede der Anreicherungseigenschaften zwischen kationenabhängigen CCoAOMTs (Klasse I) und kationenu-nabhängigen CaOMTs (Klasse II) wurden sowohl im 1D-Gel als auch durch Immunodetektion deutlich (Abbildung 3.17). Die NC-Sonde interagiert somit beim Einsatz von Knospenextrakten spezifisch mit den Zielproteinen, den kationenabhängigen CCoAOMTs, während bei Klasse II OMTs keine oder nur unspezifische Signale erhalten wurden. Die Waschbedingungen (Stringenz bzw. Mg^{2+} -Anwesenheit) hatten kaum Einfluss auf die Resultate der Anreicherungen aus Proteinrohextrakten. Da diese Versuche, aufgrund der schlechten Löslichkeit der Sonde, jedoch nur einmalig durchgeführt werden konnten, ist die Reproduzierbarkeit in zukünftigen Analysen zu prüfen.

Um diese Daten zu verifizieren, wurden der Überstand des ursprünglichen Assays nach Bindung der Sonde, sowie die erste Waschfraktion der Anreicherungsansätze mittels SDS-PAGE und Immunodetektion analysiert. Die Abbildung 3.18 zeigt, dass im Überstand des Assays (ÜS), im Fall der rekombinanten Proteine, lediglich die AtOMT1 (1) sichtbar war. Die höhere Affinität der NC-Sonde zur AtTSM1 (2) wurde damit belegt. Dieses Enzym wurde erst beim Waschen (Ws1) teilweise wieder von der Sonde gelöst.

Die Analysen mit Knospenextrakten ergaben andere Resultate. Hier waren sowohl die AtOMT1 (1) als auch die AtTSM1 (2) bereits im Überstand und in der ersten Waschfraktion detektierbar. Lediglich im Überstand der Tests unter toleranten Waschbedingungen und enthaltenem Mg^{2+} konnte eine schwächere Bande der AtTSM1 nachgewiesen werden. Da die gewählten Waschbedingungen jedoch keinen Einfluss auf die im Überstand enthaltenen Proteine haben sollten, hätten sich bei allen vier dargestellten Assays die Resultate im Bezug auf die Überstände (ÜS) gleichen müssen. Jedoch konnte dies in der Analyse der anderen Anreicherungen nicht bestätigt werden. Somit konnte eine effektivere Bindung eines der beiden Enzyme im Fall der untersuchten Rohextrakte nicht nachgewiesen werden. Bei der Analyse der Waschbedingungen konnten ebenfalls keine

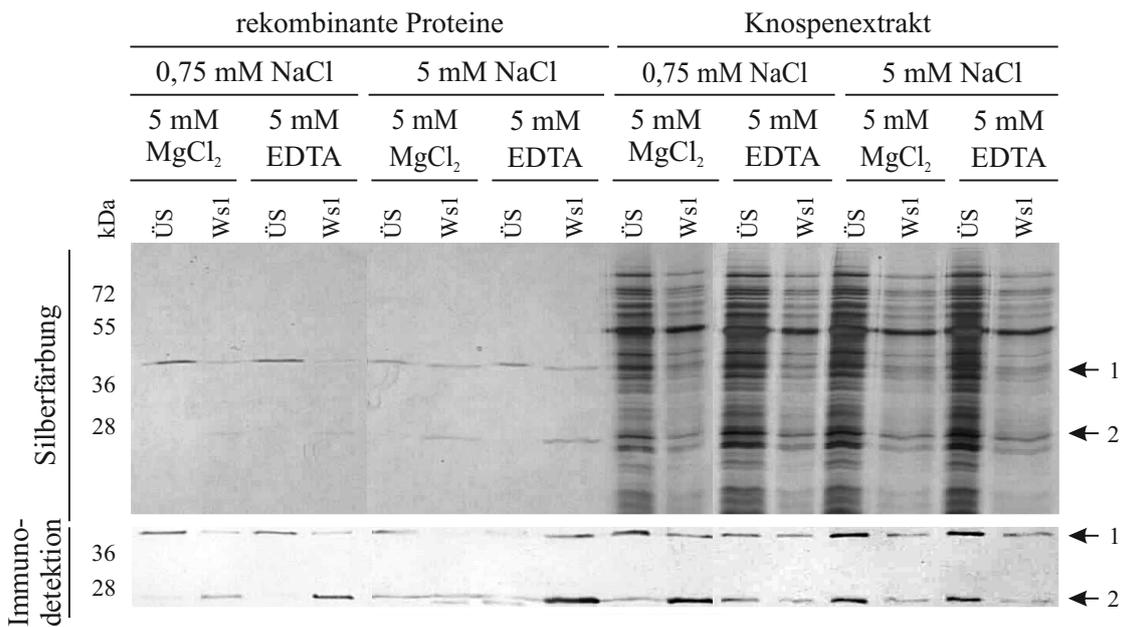


Abbildung 3.18: 1D-Gele und simultane Immunodetektion der Waschfraktionen der CCoAOMT Anreicherung. Die dargestellten Fraktionen wurden während der Anreicherung mittels NC-Sonde gesammelt. Die verschiedenen Gelspuren entsprechen dem vom Assay abgenommenem Überstand (ÜS) und der ersten Waschfraktion (Ws1) der darüber angegebenen Waschbedingungen. Auf der linken Seite ist der Größenstandard und auf der rechten die Proteine mittels Pfeilen und Zahlen dargestellt (1 – AtOMT1 40 kDa; 2 – AtTSM1 29 kDa).

Unterschiede zwischen der An- und Abwesenheit von Mg²⁺ oder unterschiedlicher Stringenz des Waschens festgestellt werden.

Zusammenfassend ist verdeutlicht worden, dass die Nitrocatechol-basierten Sonden Ansätze zur spezifischen Anreicherung der CCoAOMTs bieten. Eine Tendenz zur Differenzierung zwischen Klasse I und Klasse II OMTs ist gegeben, da leicht veränderte Spezifitäten beobachtet wurden. Allerdings konnte die Spezifität gegenüber SABATH-Enzymen und anderen AdoMet-bindenden Proteinen noch nicht hinreichend geklärt werden.

3.3 Charakterisierung der AtCCoAOMT3

Die vorangegangenen CCMS-Analysen ergaben Hinweise auf ein spezifisches Vorkommen der AtCCoAOMT3 in Wurzeln (siehe Kapitel 3.1.4). Da dieses Enzym bis zu diesem Zeitpunkt nicht charakterisiert war und die Gewebespezifität neue Erkenntnisse zur CCoAOMT-Genfamilie aus *A. thaliana* erwarten ließ, rückte dieses Enzym in diesem Teil der Arbeit in den Mittelpunkt des Interesses. Sequenzanalysen dienten zur Aufklärung der Interaktion der AtCCoAOMT3 mit dessen Substraten. Weiterhin wurde rekombinantes Protein in Bakterien exprimiert, welches anschließend für Studien der *in vitro* Aktivität sowie der Interaktion mit Sonden diente. Abschließend wurde eine entsprechende T-DNA-Insertionslinie untersucht, die Aussagen über eine putative *in vivo* Funktion ermöglichen sollte.

3.3.1 Proteinstruktur und Ähnlichkeitsanalysen

Vorab standen Analysen der Aminosäuresequenz und der Bindedomänen im Mittelpunkt. Die hierzu angefertigten Sequenzvergleiche des Proteins AtCCoAOMT3 mit sechs anderen bereits charakterisierten CCoAOMTs aus Pflanzen zeigen miteinander vergleichbar hohe Sequenzidentitäten der für die katalytische Aktivität wichtigen Domänen (Abbildung 3.19).

Da die Einteilung der AtCCoAOMT3 aufgrund von Sequenzvergleichen in die Klasse I der kationenabhängigen OMTs und weiterhin in die Gruppe der CCoAOMT-ähnlichen Enzyme bereits durch Raes *et al.* (2003) durchgeführt wurde, soll nicht im Detail auf die Identifizierung der acht im Kapitel 1.2.1 beschriebenen Motive eingegangen werden. Zusammengefasst konnten alle Motive, die von Joshi & Chiang (1998) für diese Enzymklasse als charakteristisch gelten, identifiziert werden. Eine Ausnahme bildete Motiv B (Abbildung 3.19 im Vergleich zu Kapitel 1.2.1). Da dieses Motiv allerdings in der Insertionsschleife (Abbildung 3.19) liegt und als Unterscheidungsmerkmal der CCoAOMTs zu den CCoAOMT-ähnlichen Enzymen gilt (Kopycki *et al.*, 2008), ist dies eine Bestätigung der Einteilung des Proteins nach Raes *et al.* (2003) als CCoAOMT-ähnliches Enzym.

Die zur Bindung der Cosubstrate und des Substrates essentiellen Aminosäuren der MsCCoAOMT wurden durch Ferrer *et al.* (2005) beschrieben und sind mit C (Cosubstrat, hier: AdoMet), M (Metallion, hier: Mg²⁺) und S (Substrat) in Abbildung 3.19 markiert. Diese bindungsrelevanten Aminosäuren sind in der Enzymklasse der CCoAOMTs hoch konserviert, was in der Konsenssequenz sichtbar wird. Bei dem Vergleich der AtCCoAOMT3 mit der Konsenssequenz (und somit der MsCCoAOMT) fiel auf, dass lediglich minimale Abweichungen von den identifizierten Aminosäuren nach Ferrer *et al.* (2005) auftraten. Zwei Aminosäuren, die in der Metallionenbindung eine Rolle spielen, sind in der Sequenz der AtCCoAOMT3 verändert. Es handelt sich hierbei um

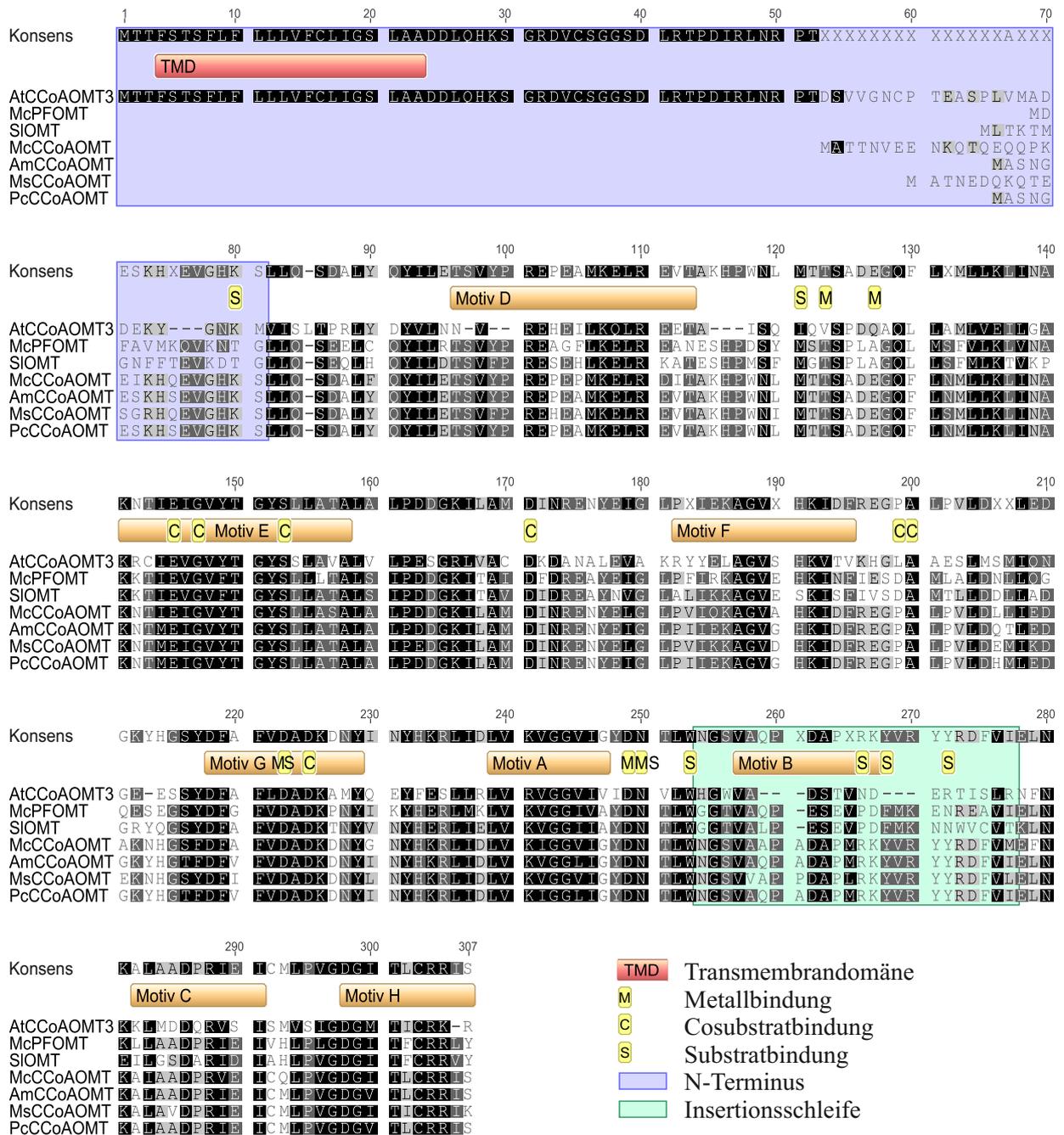


Abbildung 3.19: AtCCoAOMT3 Sequenzvergleich mit sechs pflanzlichen CCoAOMTs (bearbeitet, Kopycki *et al.* (2008)). McPFOMT (3C3Y), SIOMT (Q43161.1), McCCoAOMT (O65162.1), AmCCoAOMT (AAT40111.1), MsCCoAOMT (Q40313.1), PcCCoAOMT (CAA83943.1), RnCOMT (AAH81850.1). Die Bindungsstellen sind nach Ferrer *et al.* (2005) und die Motive nach Joshi & Chiang (1998) eingezeichnet.

die Aminosäuren Thr123 und Glu127, welche neben drei weiteren Aminosäuren zur Stabilisierung der Position des Cofaktors dienen. Diese entsprechen in der AtCCoAOMT3 Val und Gln. Von den mit dem Substrat interagierenden Aminosäuren sind hauptsächlich Aminosäuren der Insertionsschleife (Met121, Arg266, Tyr268 und Tyr272) in der AtCCoAOMT3 substituiert (Met zu Ile und Arg zu Asn) oder fehlen (beide Tyr). Die drei zuletzt genannten sind auch in den Sequenzen der McPFOMT aus *M. crystallinum* und SIOMT aus *Stellaria longipes* (hier durch Pro, Phe und Asn) ausgetauscht. Insgesamt weisen alle CCoAOMTs eine Sequenzähnlichkeit von 51 bis 58% auf, wobei die höchsten Ähnlichkeiten der AtCCoAOMT3 zu den Enzymen SIOMT (57,8%) und McPFOMT (56,0%) erfasst werden konnten (verwendetes Programm: Geneious Pro 5.3.4). Diese beiden Enzyme entsprechen CCoAOMT-ähnlichen Enzymen, welche andere Substratspezifitäten aufweisen als die CCoAOMTs (Kopycki *et al.*, 2008).

Es kann somit zusammengefasst werden, dass die für die Katalyse wichtigen Aminosäuren auch in der AtCCoAOMT3 konserviert vorliegen. Die meisten Diskrepanzen wurden bei den substratbindenden Aminosäuren beobachtet, diese sind aber auf die Funktion als CCoAOMT-ähnliches Enzym zurückzuführen.

Ein weiterer auffallender Unterschied zu den anderen CCoAOMTs und CCoAOMT-ähnlichen Enzymen war der ungewöhnlich lange N-Terminus der AtCCoAOMT3. Dieser N-terminale Bereich umfasst etwa 50 bis 70 Aminosäuren, die in allen anderen verwendeten Sequenzen nicht auftraten. Lediglich eine funktionell noch nicht charakterisierte Methyltransferase aus *A. thaliana*, welche vom benachbarten Genlocus *At3g62000* kodiert wird, zeigt ebenfalls einen verlängerten N-Terminus (nicht abgebildet). Die Proteinsequenzen beider OMTs weisen zudem eine Sequenzähnlichkeit von 74,7% auf (Geneious Pro 5.3.4). Der Genlocus *At3g62000* wird jedoch noch geringer exprimiert als der der AtCCoAOMT3 (C. Fellenberg, unveröffentlichte Ergebnisse). Um Aufschluss über die Funktion des ungewöhnlichen N-terminalen Bereiches zu erhalten, wurden die ersten 100 Aminosäuren der Sequenz mit verschiedenen frei zugänglichen Programmen auf spezifische Signaturen überprüft (Programme siehe Kapitel 2.7). Mit mehreren Programmen konnte eine Transmembrandomäne identifiziert werden. Das Programm DAS legte diese von Aminosäure 6 bis 23 fest, SOSUI von Aminosäure 2 bis 24, TMPred von Aminosäure 3 bis 23, HMMTOP von Aminosäure 6 bis 23 und TMHMM 2.0 von Aminosäure 4 bis 23 (in Abbildung 3.19 rot dargestellt). Weitere Signaturen anderer Domänen wurden im N-Terminus nicht identifiziert.

3.3.2 Heterologe Expression der AtCCoAOMT3_{N-29}

Um das Enzym *in vitro* funktionell näher zu charakterisieren, war es notwendig die AtCCoAOMT3 rekombinant in *E. coli* herzustellen. Es wurden zwei unterschiedliche Leserahmen der kodierenden Sequenz des Gens verwendet. Die Amplifikation erfolgte mit den Oligonukleotiden At3g61990 OE 1

und At3g61990 OE 2 für Konstrukt I sowie At3g61990 OE 3 und At3g61990 OE 2 für Konstrukt II (siehe Tabelle 2.2). Die resultierenden Fragmente enthielten die komplette kodierende Sequenz (I) bzw. die kodierende Sequenz ohne die ersten 87 Bp (II), wodurch die Transmembrandomäne (Kapitel 3.3.1) entfiel. Die jeweiligen Fragmente wurden in den Vektor pGEM[®]-T ligiert (pGEM[®]-T:At3g61990 CDS komplett (I) und pGEM[®]-T:At3g61990 CDS -87 Bp (II) in Abbildung 2 im Anhang) und in *E. coli* XL1 Blue transformiert. Nach der Kontrolle der Sequenz wurden mit Hilfe dieser Fragmente die Vektoren pQE30:At3g61990 CDS komplett (I) und pQE30:At3g61990 CDS -87 Bp (II) erstellt (Abbildung 3 im Anhang) und die entsprechenden Proteine in *E. coli* M15[pREP4] heterolog exprimiert. Die Klonierungsstrategie sowie die erhaltenen Vektoren sind zusätzlich in den Abbildungen 4 bis 8 im Anhang dargestellt.

Um Aussagen über die Effizienz der Proteinexpression treffen zu können, wurde eine Testexpression durchgeführt. In Abbildung 3.20 sind die Proteinrohextrakte der verschiedenen Konstrukte, nach der Extraktion und ohne Aufreinigung (Kapitel 2.6.10), aus einer 3 mL Kultur dargestellt. Es wird deutlich, dass das rekombinante Protein der AtCCoAOMT3, welches den kompletten Leserahmen umfasst (I), weder löslich ist noch im Zellpellet vorliegt. Die heterologe Expression des um 29 Aminosäuren (Transmembrandomäne) N-terminal verkürzten Proteins (II), welches alle in CCoAOMTs konservierten Domänen besitzt, war erfolgreich. Im Folgenden beschriebene Experimente wurden ausschließlich mit diesem Protein durchgeführt, welches als AtCCoAOMT3_{N-29} bezeichnet wurde.

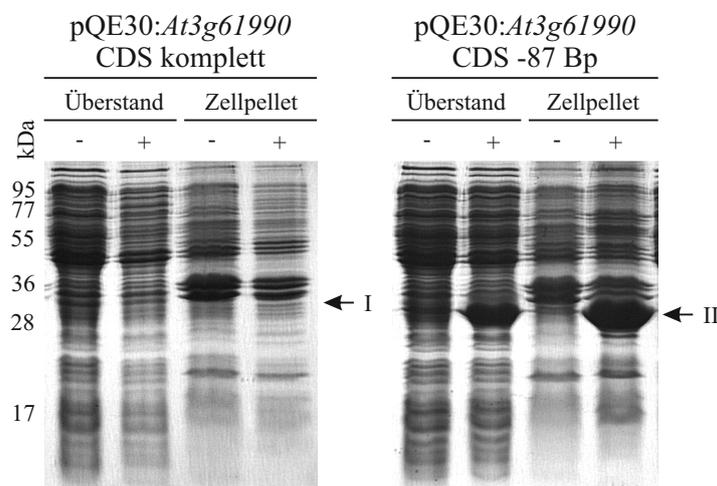


Abbildung 3.20: 1D-Gele der Expression der rekombinanten AtCCoAOMT3 in zwei Varianten. Dargestellt sind die Konstrukte und deren Effizienz in der Expression. Die unterschiedlichen Konstrukte sind durch die römischen Zahlen I (kompletter Leserahmen) und II (N-terminal um 29 Aminosäuren verkürzt; AtCCoAOMT3_{N-29}) sowie Pfeilen hervorgehoben. Die Induktion der Expression durch IPTG ist durch ein + angegeben, während die Negativkontrolle mit einem - gekennzeichnet ist.

Das erhaltene Protein war unter den gegebenen Bedingungen zwar nicht komplett löslich (Bande in der Pelletprobe), der Anteil des in der löslichen Fraktion enthaltenen Proteins genügte aber, um eine Reinigung und anschließende funktionelle Analysen durchzuführen.

Die Reinigung der heterolog exprimierten AtCCoAOMT3_{N-29} erfolgte, wie in Kapitel 2.6.10 und 2.6.11 beschrieben, mit Hilfe eines N-terminalen His-Tags (vom Vektor pQE30) über eine Nickel-NTA Säule. In Abbildung 3.21 können die Resultate der unterschiedlichen Elutionsfraktionen nachvollzogen werden. Es wird deutlich, dass ein Protein mit einer molekularen Masse von etwa 29 kDa exprimiert wurde. In den gereinigten Fraktionen (E 1 bis 7) ist fast ausschließlich rekombinante AtCCoAOMT3_{N-29} (1) und dessen Dimer (2) erkennbar. Die Fraktionen E2 bis E6 wurden anschließend vereint und die Proteinkonzentration mittels OD-Messung bestimmt. Die Ausbeute an rekombinantem Protein betrug circa 54 mg/L_{Kulturflüssigkeit} mit einer Endkonzentration des aufgereinigten Proteins von etwa 7 mg/mL.

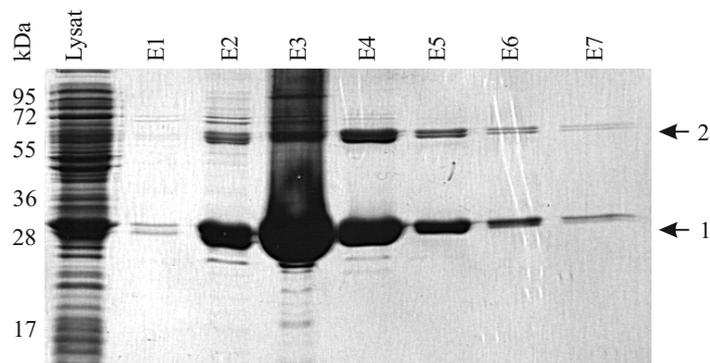


Abbildung 3.21: 1D-Gel der Aufreinigung rekombinant hergestellter AtCCoAOMT3_{N-29}. Die Proteingrößen in kDa sind links und das durch einen Pfeil hervorgehobene Protein sowie dessen Dimer (1 – rekombinante AtCCoAOMT3_{N-29} 31 kDa; 2 – Dimer der rekombinanten AtCCoAOMT3_{N-29}) rechts angegeben. E- Elutionsfraktionen (1 bis 7)

3.3.3 Anreicherung der AtCCoAOMT3 mittels CCMS

Die zu Beginn der Arbeit angefertigten Proteomstudien ergaben Indizien auf das hier zu charakterisierende Protein AtCCoAOMT3. Deshalb sollte durch die Anreicherung der rekombinant hergestellten AtCCoAOMT3_{N-29} ein Beleg der Interaktion dieses Proteins mit den AdoHcy-CCs erfolgen. Die Experimente zur Anreicherung der AdoMet-bindenden Proteine aus Wurzeln mittels AdoHcy-CCs sollten zudem intensiviert werden, um eventuell doch noch die native AtCCoAOMT3 über LC-MS/MS-Messungen eindeutig zu identifizieren.

Anreicherung des rekombinanten Proteins

Die Bindungsversuche der rekombinanten AtCCoAOMT3_{N-29} an AdoHcy-CCs wurden unter Verwendung des Systems von caprotecTM bioanalytics von S. Nahrstedt durchgeführt. Die AdoHcy-CCs sollten in der Lage sein, das rekombinante Protein zu binden, womit weitere Hinweise für die Bindung des Cosubstrates, AdoMet, erbracht wären. Außerdem würde dieses Experiment bestätigen, ob grundlegend eine Anreicherung des nativen Proteins mittels CCMS möglich ist. Wie schon in den Experimenten aus Kapitel 3.1.1 wurde bei der Anreicherung mittels AdoHcy-CC eine Negativkontrolle mitgeführt. In Abbildung 3.22 sind 1D-PAGE und Immunodetektion der Anreicherung dargestellt. Um die AtCCoAOMT3 im Immunoblot detektieren zu können, wurden verschiedene zur Verfügung stehende Antikörper getestet. Der Antikörper gegen AtTSM1 ist in der Lage rekombinante AtCCoAOMT3_{N-29} mit hinreichender Sensitivität nachzuweisen. Da beide Proteine jedoch streng organspezifisch exprimiert sind (Transkriptdaten in Kapiteln 3.1.1 und 3.1.4), ist eine parallele Detektion bei Anwendung in Rohextrakten auszuschließen. In Abbildung 3.22 wird deutlich, dass die rekombinante AtCCoAOMT3_{N-29} sowohl ohne Anreicherung (1 µg des rekombinanten Proteins AtCCoAOMT3_{N-29} aufgetragen) als auch nach Bindung an die Sonde nachweisbar ist. Jedoch erscheint das im Anreicherungsassay enthaltene Protein etwas größer als das im Lysat. Dies kann durch die Bindung des Proteins an AdoHcy-CC (molekulare Masse: 1,14 kDa) erklärt werden. Somit konnte die effiziente Anreicherung des rekombinanten Proteins AtCCoAOMT3_{N-29} nachgewiesen werden.

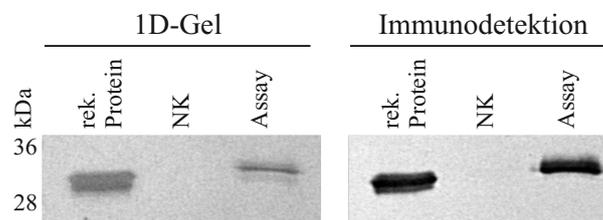


Abbildung 3.22: 1D-Gel und Immunodetektion der Anreicherung rekombinanter AtCCoAOMT3_{N-29} durch AdoHcy-CCs. Die Proteingrößen in kDa sind auf der linken Seite angegeben. Zur Immunodetektion wurde der AtTSM1-Antikörper eingesetzt. NK - Negativkontrolle; rek. Protein - rekombinantes Protein

Anreicherung des nativen Proteins

Mit dem heterolog exprimierten Protein AtCCoAOMT3_{N-29} konnte nachgewiesen werden, dass eine Interaktion zwischen AtCCoAOMT3 und dem AdoHcy-CC grundsätzlich stattfinden kann. Basierend auf diesem Ergebnis schlossen sich Experimente zur Anreicherung des nativen Proteins an. Da es bei der Anwendung von Wurzelrohextrakten (Kapitel 3.1.4) und vorfraktionierten

Extrakten, versetzt mit Detergenzien (Kapitel 3.1.5), nicht zur eindeutigen Identifizierung dieses Proteins kam, wurden die Untersuchungen unter Berücksichtigung der N-terminalen Membrandomäne erweitert. Hierfür wurden Wurzeln (Kapiteln 2.1 und 2.6.4) geerntet und verschiedene Extraktionspuffer (mit und ohne Detergenzien) genutzt. In einem Fall wurde das nach der Extraktion löslicher Proteine (Kapitel 2.6.1) entstandene Pellet in Extraktionspuffer mit 0,3% CHAPS, jedoch ohne PVPP-Zusatz, aufgenommen und der Ansatz 1 h bei 4°C unter Schütteln inkubiert, um die Proteine möglichst gleichmäßig mit dem Detergenz zu benetzen. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (5 min bei 20 000 g), um größere und unlösliche Bestandteile abzutrennen. Beide Extrakte wurden entsalzt, konzentriert und für die CCMS verwendet (Abbildung 3.23 A). Im anderen Fall bestand die Extraktion darin, dem ursprünglich verwendeten Extraktionspuffer 0,3% CHAPS zuzusetzen ohne die bereits ohne Detergenz löslichen Proteine vorher abzutrennen. Die nach der Anreicherung dieser Proben angefertigten 1D-Gele sind in Abbildung 3.23 B dargestellt.

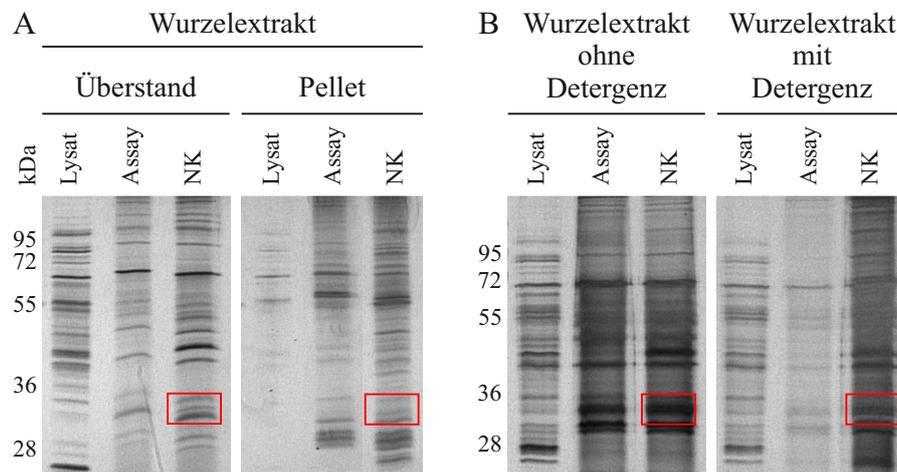


Abbildung 3.23: 1D-Gel der CCMS verschiedener Wurzelproteinproben. A: Gegenüberstellung des Extraktionsüberstandes und des Pellets, welches nochmals mit Detergenz (CHAPS) behandelt wurde. B: Gegenüberstellung von Wurzelextrakten die zum Einen ohne CHAPS-Zusatz (links) und zum Anderen mit CHAPS-Zusatz (rechts) extrahiert wurden. Die Proteingrößen in kDa sind jeweils auf der linken Seite angegeben. Die roten Rahmen geben die für die MS-Analysen ausgeschnittenen Banden an.

In den in Abbildung 3.23 A dargestellten Wurzelextrakten, welche entweder zytosolische (Überstand, 1,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) oder auch membrangebundene (Pellet, 0,11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) Proteine enthielten, sind deutliche Unterschiede im Proteinmuster erkennbar. Demzufolge war es möglich unter anderen Bedingungen ausfallende Proteine mittels CHAPS zu lösen. Die unterschiedlichen Konzentrationen der Extrakte wurden beim Einsatz in der CCMS berücksichtigt. In den in Abbildung 3.23 B gezeigten Gelen sind kaum Unterschiede zwischen den Lysaten nachweisbar und die Konzentrationen (ohne Detergenz 1,77 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, mit Detergenz 1,48 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) waren vergleichbar. Es ist möglich,

dass die durch CHAPS solubilisierten Proteine durch die auch ohne Detergenz löslichen Proteine maskiert werden. Schlussfolgernd führte der Einsatz von CHAPS zur Solubilisierung von ansonsten unlöslichen Proteinen, was in der ersten Variante (Abbildung 3.23 A) deutlich erkennbar war.

Es schlossen sich LC-MS/MS-Analysen der Peptide aus den Banden der Assays in Höhe von etwa 32 kDa an (molekulare Masse des nativen Monomers der AtCCoAOMT3; rot markiert in Abbildung 3.23). Keine dieser Banden enthielt das gesuchte Protein AtCCoAOMT3. Eine Reproduktion oder gar Optimierung der Ergebnisse der CCMS aus Kapitel 3.1.4 war demnach nicht möglich. Bei der Anwendung des mit der rekombinanten AtCCoAOMT3_{N-29} interagierenden Antikörpers zur Immunodetektion des nativen Proteins konnte ebenfalls kein Signal detektiert werden (nicht abgebildet). Da das Fehlen dieses Signals allerdings nicht nur im Anreicherungsassay sondern auch im Lysat auftrat, kann keine Aussage zur Interaktion mit der Sonde getroffen werden.

3.3.4 *In vitro* Aktivität der rekombinanten AtCCoAOMT3_{N-29}

Das am N-Terminus um 29 Aminosäuren verkürzte, rekombinant hergestellte Protein AtCCoAOMT3_{N-29} wurde eingesetzt, um die *in vitro* Substratspezifität zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden Substrate verwendet, die bereits für die Methylierung durch CCoAOMTs in Frage kamen und ausführlich beschrieben sind (Fellenberg *et al.*, 2008; Ibdah *et al.*, 2003). Weiterhin wurde die Positionsspezifität und der Einfluss verschiedener Cofaktoren (Metallionen) analysiert.

Substratspezifität

CCoAOMTs und CCoAOMT-ähnliche Enzyme sind im Allgemeinen dafür bekannt Phenylpropanoide und deren CoA-Ester zu methylieren (Ibdah *et al.*, 2003; Parvathi *et al.*, 2001; Li *et al.*, 1997; Ye *et al.*, 1994). Aus diesem Grund wurden verschiedene Verbindungen dieser Substanzklasse (Tabelle 3.7) gewählt, um Analysen der *in vitro* Enzymaktivität durchzuführen. Die Durchführung der Assays erfolgte wie in Kapitel 2.6.12 beschrieben. Bei der Betrachtung der Aktivitäten der rekombinanten AtCCoAOMT3_{N-29} mit unterschiedlichen Substraten stellte sich heraus, dass das Flavonol Quercetagetin (Tabelle 3.7) das am effektivsten umgesetzte (446 pkat/mg_{Protein}) *in vitro* Substrat dieses Enzyms unter den hier getesteten war. Bei dieser Reaktion wurde ein einziges Produkt gebildet. Dies deutet auf eine hohe Positionsspezifität hin. Der Umsatz mit Quercetagetin wurde als 100% angenommen und die Aktivitäten mit den anderen Substraten als relative Aktivität im Vergleich zu Quercetagetin in Prozent angegeben (Tabelle 3.7). Wie das in *A. thaliana* als Glycosid vorkommende Quercetin (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2008) enthält Quercetagetin mit zwei vicinalen Hydroxygruppen in den Positionen 3' und 4' am B-Ring, aber drei benach-

barten Hydroxygruppen in den Positionen 5, 6 und 7 des A-Rings. Wichtig erscheint die freie Hydroxygruppe am C6-Atom, da stark abfallende Aktivität zu verzeichnen war, sobald die Substrate diese, wie beim Luteolin oder Quercetin, nicht enthielten. Demnach fördern drei vicinale Hydroxygruppen die Methylierungsaktivität. Die Hydroxygruppe in Position 3 hatte kaum Effekt auf die Aktivität (vergleiche Luteolin und Quercetin). Die weiteren getesteten Phenylpropanoide (Caffeoyl-CoA, Kaffeesäure, Esculetin und Chlorogensäure) ergaben ebenfalls nur mäßige Methylierungsraten.

Tabelle 3.7: *In vitro* Aktivität rekombinanter AtCCoAOMT3_{N-29}. Die relative Aktivität in Prozent ist bezogen auf die höchste Aktivität mit Quercetagenin.

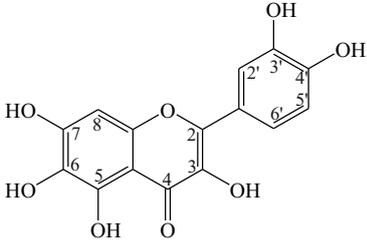
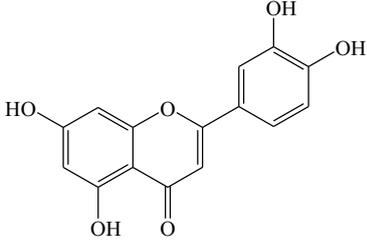
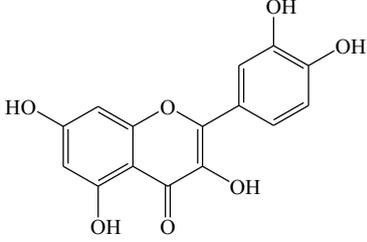
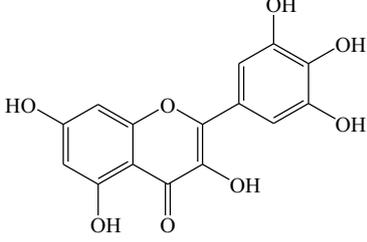
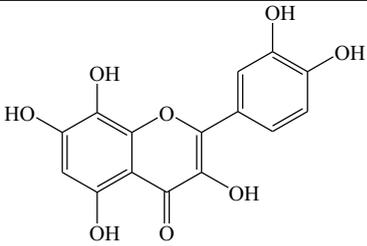
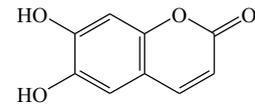
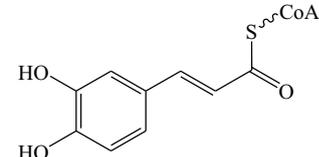
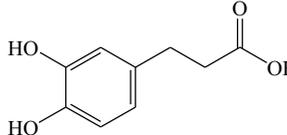
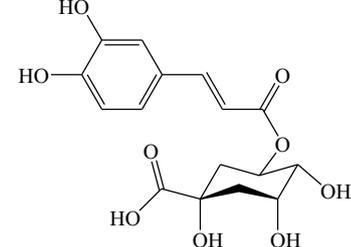
Substrat	chemische Struktur	relative Aktivität [%]
Quercetagenin		100,0% ±0,01%
Luteolin		3,14% ±0,24%
Quercetin		<1% ±0,05%
Myricetin		n.d.

Tabelle 3.7: *In vitro* Aktivität rekombinanter AtCCoAOMT3_{N-29}.

Substrat	chemische Struktur	relative Aktivität [%]
Gossypetin		n.d.
Esculetin		1,62% ±0,07%
Caffeoyl-CoA		<1% ±0,09%
Kaffeesäure		<1% ±0,03%
Chlorogensäure		<1% ±0,02%

Insgesamt war es möglich für sieben der neun putativen Substrate eine spezifische Enzymaktivität zu bestimmen. Im Fall der hoch hydroxylierten Substrate Myricetin und Gossypetin konnten keine Aussagen über die Aktivität getroffen werden, da sowohl die Substrate selbst als auch mögliche Produkte zum Großteil in den Assays oxidiert werden (Dr. Thomas Vogt, Abteilung Stoffwechsel- und Zellbiologie des Leibniz-Institutes für Pflanzenbiochemie, persönliche Mitteilung) und nicht nachweisbar waren. Dies kann anhand der Abbildung 10 im Anhang nachvollzogen werden.

Für das mit der höchsten spezifischen Enzymaktivität umgesetzte Substrat Quercetagenin wurden anschließend die kinetischen Parameter k_{cat} und K_m bestimmt. Diese leiteten sich aus dem Hanes-Diagramm in Abbildung 3.24 ab. Die Analysen wurden in drei Replikaten durchgeführt, wobei die

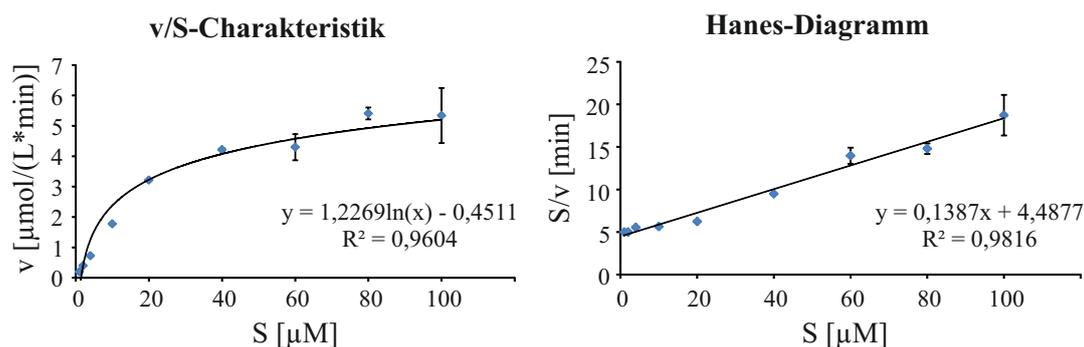


Abbildung 3.24: Kinetische Analyse der rekombinanten AtCCoAOMT3_{N-29} mit Quercetagen. Dargestellt sind eine v/S-Charakteristik und ein Hanes-Diagramm, in denen die Standardabweichungen der Messwerte sowie die Formeln der Ausgleichsgeraden und deren Bestimmtheitsmaß angegeben sind. Die berechneten kinetischen Parameter betragen $k_{cat} = 1,76 \text{ min}^{-1}$ und $K_m = 32,4 \text{ µM}$. S - Substratkonzentration; v - Reaktionsgeschwindigkeit

Standardabweichungen der Messwerte und das Bestimmtheitsmaß der Ausgleichsgeraden in den Diagrammen dargestellt sind. Die ermittelten kinetischen Parameter betragen $k_{cat} = 1,76 \text{ min}^{-1}$ und $K_m = 32,4 \text{ µM}$, womit eine Effizienz der Methylierung des Quercetagens mit k_{cat}/K_m von $900 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ erreicht wurde.

Positionsspezifität

Im Rahmen dieser Arbeit sollte weiterhin untersucht werden, an welcher der Hydroxygruppen des Quercetagens die Methylierung stattfindet. Hierfür wurden, parallel zu den angefertigten Assays, die Retentionszeiten und Spektren verschiedener Standards mittels HPLC bestimmt. Diese Standards entsprechen Quercetagen-Derivaten, die an verschiedenen Positionen des A- und des B-Rings methyliert waren. Abbildung 3.25 zeigt die überlagerten Chromatogramme, die Strukturformeln der einzelnen Substanzen sowie die Spektren des Produktes und des Standards 6-O-Methyl-Quercetagen. Abbildung 3.25 A belegt, dass das Produkt der Enzymassays (dunkelblau), mit Quercetagen und dem Protein AtCCoAOMT3_{N-29}, zur gleichen Zeit wie die Substanz 6-O-Methyl-Quercetagen (6-OMe-Qg, rot) eluierte. Weiterhin ist das erhaltene Spektrum dieser Substanz (Abbildung 3.25 B) identisch mit dem des methylierten Produktes (Abbildung 3.25 C). In beiden Fällen sind Maxima bei 258,7 nm bzw. 371,8 nm zu erkennen. Aufgrund der gleichen Retentionszeit und der identischen Spektren kann geschlossen werden, dass Quercetagen durch das Protein AtCCoAOMT3_{N-29} am C-6 des A-Rings methyliert wird, da die Standardsubstanz 6-O-Methyl-Quercetagen ebenfalls am C6-Atom methyliert vorliegt.

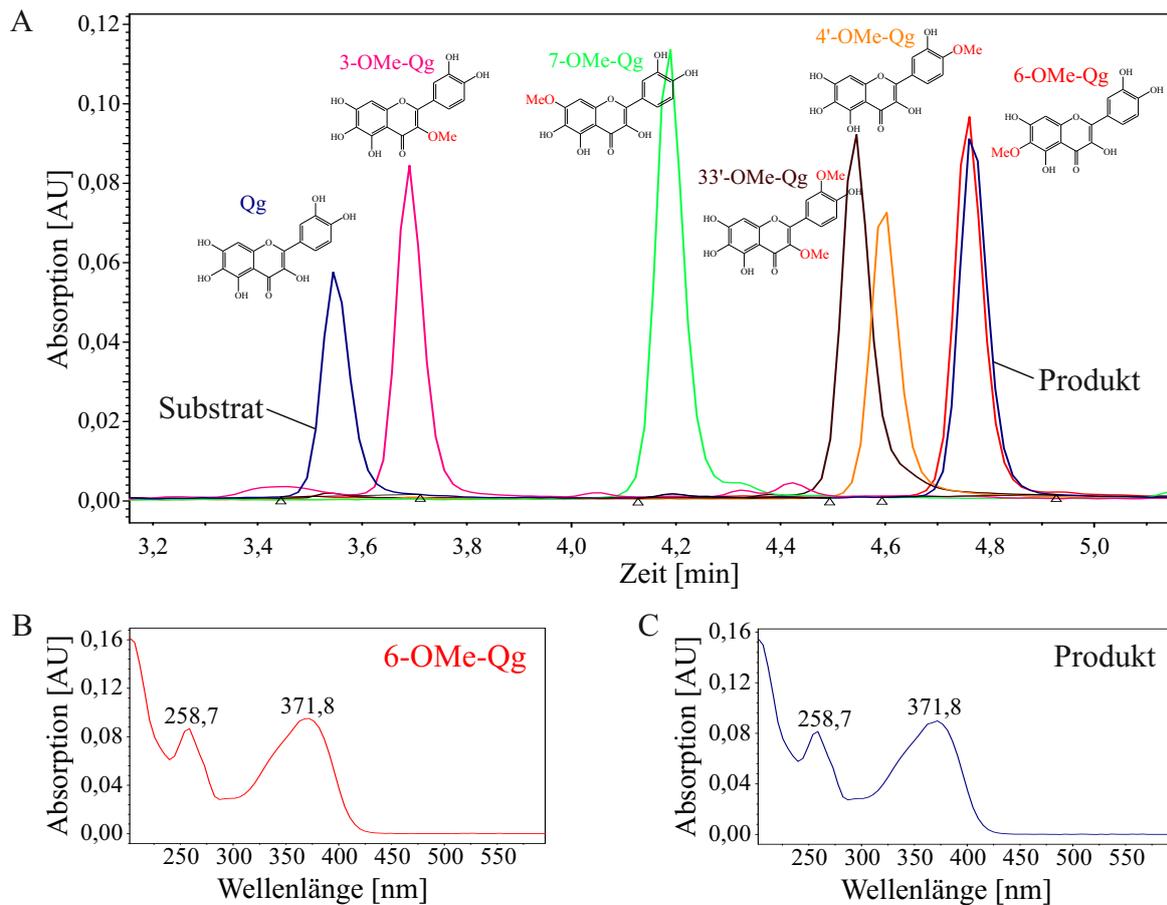


Abbildung 3.25: *In vitro* Enzymtests von AtCCoAOMT3_{N-29} mit Quercetagen (Qg). Überlagerte Chromatogramme der Enzymassays mit Standards von methylierten Quercetagen-Derivaten (A). Spektren des Standards 6-O-Methyl-Quercetagen (B) im Vergleich mit dem gebildeten Produkt des *in vitro* Enzymassays (C). AU - Absorptionseinheiten

Ionenabhängigkeit

Weitere *in vitro* Studien der Aktivität dieses Enzyms bezogen sich auf die Abhängigkeit von bivalenten Kationen. Diese Analysen wurden mit dem für CCoAOMTs bekannten Cofaktor Mg²⁺, EDTA und Ca²⁺ sowie vier weiteren Kationen durchgeführt. Durch Zugabe von EDTA können kleinste Mengen an verbliebenen freien Kationen effektiv aus dem Assay eliminiert werden und es stellte sich heraus, dass in Abwesenheit von freien Kationen keine Methylierung des Quercetagens stattfand (Abbildung 3.26, rotes Chromatogramm).

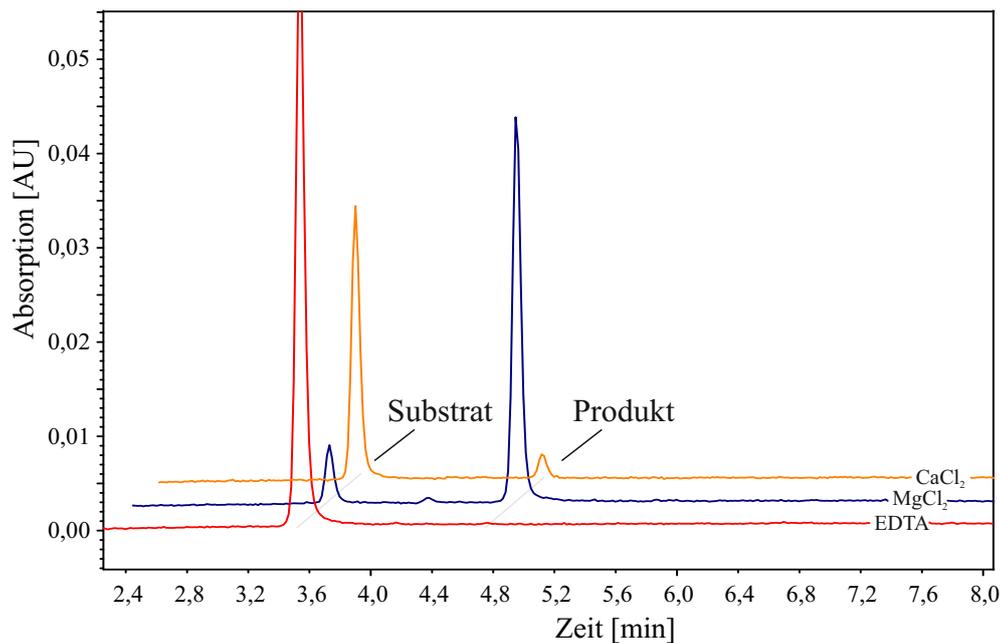


Abbildung 3.26: *In vitro* Enzymassays der AtCCoAOMT3_{N-29} mit unterschiedlichen Kationen. Darstellung der an der z-Achse ausgerichteten Chromatogramme der Enzymassays in Anwesenheit unterschiedlicher Ionen als Cofaktoren. Diese sind durch die zu den Assays gegebenen Salze auf der Basislinie angezeigt.

Wurde CaCl_2 statt MgCl_2 eingesetzt, konnte eine spezifische Enzymaktivität von $25,2 \text{ pkat/mg}_{\text{Protein}}$ bestimmt werden. Jedoch ist diese spezifische Enzymaktivität im Vergleich zur Verwendung von MgCl_2 ($446 \text{ pkat/mg}_{\text{Protein}}$) stark reduziert. Andere bivalente Kationen (Co^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+}) ergaben keine quantifizierbaren Resultate. Zwar konnte das Produkt 6-OMe-Qg in den Enzymassays aller Cofaktoren außer Cu^{2+} nachgewiesen werden, aber ein nicht näher untersuchter Abbau des Substrates Quercetagetin und der eventuell entstandenen Produkte machte die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität auch hier unmöglich (nicht abgebildet).

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass die Assays der AtCCoAOMT3_{N-29} mit Mg^{2+} als Cofaktor und Quercetagetin als Substrat die höchste spezifische Aktivität erreichte.

3.3.5 Phänotypisierung einer AtCCoAOMT3 T-DNA-Insertionslinie

Im *European Arabidopsis Stock Center* in Nottingham war eine T-DNA-Insertionslinie des entsprechenden Gens *At3g61990* unter der Bezeichnung *WiscDsLoxHs087 05B* erhältlich (Kapitel 2.1). Diese Linie wurde genutzt, um die noch unbekannt *in vivo* Funktion dieses Gens bzw. des kodierten Enzyms in Pflanzen näher zu analysieren. Laut Angaben auf *signal.salk.edu* (Alonso

et al. (2003)) sollte die Insertion in Exon fünf des Gens lokalisiert sein und die Pflanzen somit kein aktives Protein produzieren. Die verwendeten Pflanzen dieser Linie wurden auf Homozygotie der Insertion getestet und ein Phänotyp der Keimung unter abiotischen Stressbedingungen beobachtet.

In den folgenden Experimenten ist die homozygote T-DNA-Insertionslinie jeweils mit den Zahlen 46 oder 49 gekennzeichnet. Es handelt sich hier nicht um unterschiedliche Linien. Die Nummerierung bezieht sich lediglich auf die Pflanzen von denen die verwendeten Samen bzw. Proben stammen. Dies bedeutet, dass alle Pflanzen, bis auf den Wildtyp (Col-1092), den gleichen genetischen Hintergrund aufweisen, aber die verwendeten Samen von unterschiedlichen Pflanzen (46 und 49) der selben Linie geerntet wurden.

Nachweis der Homozygotie der T-DNA-Insertion

Die Keimlinge der T-DNA-Insertionslinie wurden auf Erde vereinzelt. Mittels T-DNA- und genspezifischer Oligonukleotide erfolgte mit extrahierter gDNA eine Kontrolle auf Homozygotie der enthaltenen T-DNA-Insertion. Dabei wird ausgenutzt, dass das Wildtyp-Gen durch die verwendete Polymerase nicht amplifiziert wird bzw. ein größeres Produkt entsteht, wenn eine T-DNA-Insertion enthalten ist und die Oligonukleotide am 3'- und 5'-Ende des Gens binden (genspezifische *Primer*). Im Gegensatz dazu kann mit *Primern*, die am Beginn des Gens und am Anfang der T-DNA-Insertion binden, bei enthaltener T-DNA-Insertion ein spezifisches Fragment von etwa 1200 Bp im Anschluss an die Gelelektrophorese detektiert werden. Die erhaltenen Resultate der PCR sind beispielhaft in Abbildung 3.27 dargestellt. Es war also darauf zu achten, dass in den Mutanten die T-DNA-Insertion (ein T-DNA- und ein genspezifischer *Primer*), aber kein Wildtyp-Gen (genspezifische *Primer*) nachweisbar ist (Primer siehe Tabelle 2.2). Beim Nachweis beider PCR-Produkte, konnte auf Heterozygotie geschlossen werden.

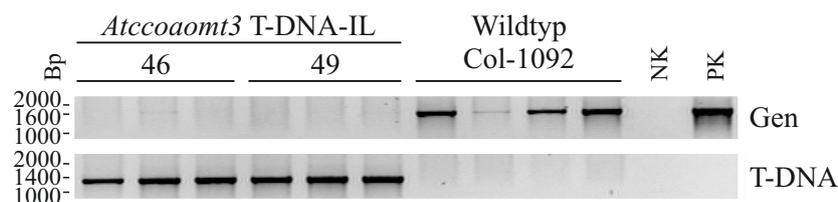


Abbildung 3.27: Homozygotiebestimmung der *Atccoamt3* T-DNA-Insertionslinie. Die Negativkontrolle (NK) enthielt als *Template* Wasser und die Positivkontrolle (PK) gDNA von *A. thaliana* Blättern, in welchen der Nachweis des Gens bereits erbracht wurde (nicht dargestellt). IL - Insertionslinie

Deutlich wird, dass jeweils drei Proben der Pflanzen 46 und 49 deren Homozygotie hinsichtlich der T-DNA-Insertion belegen. Lediglich in der PCR-Reaktion mit einem genspezifischen und einem T-

DNA-spezifischen *Primer* ist die zu erwartende Bande bei etwa 1200 Bp zu erkennen. Die PCR mit zwei genspezifischen *Primern* ergab infolge der T-DNA-Insertion keine Signale. In den Spuren der homozygoten Wildtyp Pflanzen waren nur bei PCR-Analysen mit zwei genspezifischen *Primern* Signale zu erkennen. Die Positivkontrolle wurde mit bereits auf dieses Gen getesteter gDNA von Wildtyp Pflanzen (nicht gezeigt) durchgeführt und ergab, genau wie bei den anderen Wildtyp Pflanzen, nur Signale bei Nutzung der genspezifischen *Primer*. In der Negativkontrolle, in der die DNA durch Wasser ersetzt wurde, sind keine Signale erkennbar. Für die anschließenden Analysen wurden ausschließlich Samen der homozygoten Pflanzen 46 und 49 verwendet.

Prüfen des Vollängentranskriptes

Um nachzuweisen, dass die homozygoten Linien kein Vollängentranskript des Gens *At3g61990* enthielten, wurde mittels PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden (*At3g61990* OE 1 und *At3g61990* OE 2), die exakt am 3'- und 5'-Ende der kodierenden Sequenz binden, extrahierte RNA bzw. hergestellte cDNA amplifiziert. Die visuelle Auswertung der PCR erfolgte über Agarosegelelektrophorese (Abbildung 3.28). In Wildtyp-Pflanzen (Wt) war ein deutliches Signal in der korrekten Höhe (873 Bp) sichtbar. In Pflanzen der T-DNA-Insertionslinie (46 und 49) konnte keine solche Bande nachgewiesen werden. Dies bestätigt, dass in den verwendeten Mutanten kein Vollängentranskript des Gens *At3g61990* vorlag und dass es sich hier auf Transkriptebene um einen *Knockout* des ursprünglich in *A. thaliana* exprimierten Proteins handelt.

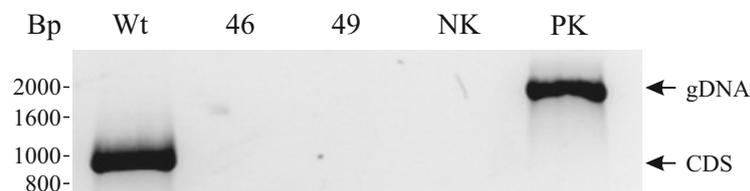


Abbildung 3.28: Analyse des Vollängentranskriptes in der *Atccoamt3* T-DNA-Insertionslinie. Die T-DNA-Insertionslinie ist mit den Nummern 46 bzw. 49 angegeben. Die Negativkontrolle (NK) enthielt Wasser und die Positivkontrolle (PK) gDNA von *A. thaliana* Blättern, in welchen der Nachweis des Gens bereits erbracht wurde (nicht dargestellt). Wildtyp (Wt); Vollängentranskript (kodierende Sequenz - CDS) - 873 Bp; gDNA - 1942 Bp

Bestimmung der Keimungsraten unter abiotischen Stressbedingungen

Da eine homozygote T-DNA-Insertionslinie der *AtCCoAOMT3* zur Verfügung stand, in der kein Vollängentranskript nachweisbar war, konnten Analysen zur Bestimmung eines möglichen Phänotyps folgen. Durch vorangegangene Experimente war bekannt, dass das Transkript der

AtCCoAOMT3 spezifisch in Wurzeln und Embryonen sowie alternden Blättern vorkommt (bezogen auf die in Kapitel 3.1.4 analysierten Organe und Genevestigator (Hruz *et al.*, 2008)). Weiterhin war durch frei zugängliche Transkriptdaten unter verschiedenen Stressbedingungen bekannt, dass sich das Transkriptlevel dieses Gens erhöht, sobald Saccharose in erhöhter Konzentration vorliegt (Genevestigator; Hruz *et al.* (2008)). Diese Fakten legen eine Untersuchung der Funktion des Proteins in der Wasser- und Nährstoffzufuhr nahe. Zu diesem Zweck wurden Keimungsuntersuchungen mit Pflanzen der Wildtyp und T-DNA-Insertionslinie auf verschiedenen Nährmedien unter Variation der Salz- und Saccharosekonzentrationen durchgeführt.

Die Analysen erfolgten mit den geernteten Samen der homozygoten Pflanzen 46 und 49 der T-DNA-Insertionslinie. Das für die Keimungsanalysen verwendete Medium entsprach dem in Kapitel 2.1 beschriebenen MS-Medium unter Zugabe verschiedener Konzentrationen an Saccharose und Salzen. Die entsprechenden Keimungsraten sind in Abbildung 3.29 dargestellt. Bei der Auswahl der unterschiedlich hohen Salzkonzentration von Na₂SO₄, KCl und NaCl wurde die Ionenstärke berücksichtigt. Diese beträgt für Na₂SO₄ drei und für KCl und NaCl jeweils zwei. Um in den hohen Salzkonzentrationen die gleiche Ionenstärke beizubehalten, wurden entsprechend 2/3 des Na₂SO₄ im Vergleich zu den anderen Salzen zugesetzt.

Durch diese Untersuchungen konnten erste Indizien für einen Effekt auf die Keimungsraten bei fehlender AtCCoAOMT3 festgestellt werden. In Abbildung 3.29 wird ersichtlich, dass um 50 mM erhöhte Salzkonzentrationen nur mit Na₂SO₄ signifikant reduzierte Keimungsraten der T-DNA-Insertionslinie gegenüber dem Wildtyp ergaben. Jedoch muss auch hier die Ionenstärke einbe-

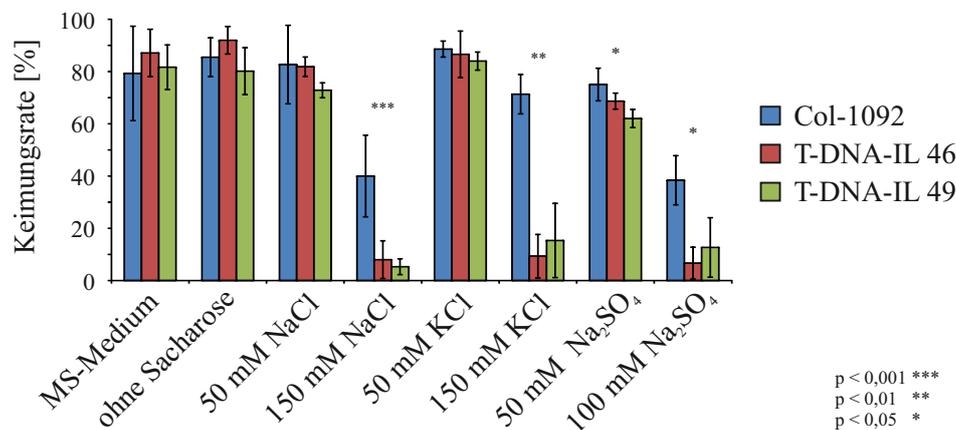


Abbildung 3.29: Keimungsraten der *Atccoamt3* T-DNA-Insertionslinie. Das MS-Medium wurde verändert, indem keine Saccharose, 50 mM oder 150 mM NaCl, 50 mM oder 150 mM KCl sowie 50 mM oder 100 mM Na₂SO₄ zugesetzt wurden. Die durch ANOVA ermittelten Signifikanzwerte sind als * angegeben und beziehen sich auf die Unterschiede der Keimungsraten der verwendeten Pflanzenlinien auf den jeweiligen Medien. Es wurden drei biologische Replikate durchgeführt. IL- Insertionslinie

zogen werden. Diese ist bei Na_2SO_4 höher und hat somit bei gleicher Konzentration an Ionen einen stärkeren Effekt auf die Keimung. Im Fall der hohen Salzkonzentrationen konnten signifikante Unterschiede für alle Salze festgestellt werden (150 mM NaCl, 150 mM KCl und 100 mM Na_2SO_4). Somit zeigt die *Atccoamt3* T-DNA-Insertionslinie im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber steigenden Salzkonzentrationen. Weiterhin kann eine Anfälligkeit gegenüber Saccharosemangel ausgeschlossen werden, da es während der Analysen keinen signifikanten Unterschied der Keimungsraten bei Samen gab, die auf MS-Medium oder auf MS-Medium ohne Saccharose gekeimt sind. Demzufolge kann festgehalten werden, dass dieses Enzym vermutlich eine Funktion in der Wasser- und / oder Nährstoffzufuhr hat und so ein erstes Indiz für die *in vivo* Funktion der AtCCoAOMT3 detektiert werden konnte.

Inwieweit ein Zusammenhang zu der beobachteten Substratspezifität der AtCCoAOMT3_{N-29} besteht, ist noch unklar. Allerdings konnte von Sahr *et al.* (2010) kürzlich gezeigt werden, dass dieses Protein *in vitro* keine aromatischen Verbindungen sondern ein N-terminales Peptid eines Aquaporins, welches im Wasser- und Nährstoffhaushalt der Pflanze funktionell ist, methyliert. Auf diese unerwartete Diskrepanz wird in der Diskussion näher eingegangen.

4 Diskussion

Ziel dieser Dissertation war die Etablierung von Affinitäts-basierten Anreicherungsverfahren im pflanzlichen System. Hierbei standen die AdoMet-bindenden Proteine und speziell die CCoAOMTs aus *A. thaliana* im Mittelpunkt der Studien. Allerdings wurden nicht nur die Anreicherung der Proteine fokussiert, es war ebenfalls von Interesse die Funktion einzelner Enzyme über biochemische Methoden aufzuklären und die Resultate den Proteomanalysen gesamter Enzymfamilien ergänzend zur Seite zu stellen.

4.1 Proteomanalysen mit Affinitäts-basierten Sonden

Die Anreicherung spezifischer Enzymklassen über Affinitäts- und Aktivitäts-basierte Technologien hat im letzten Jahrzehnt deutliche Fortschritte erfahren. Auf dem Gebiet der Aktivitäts-basierten Methoden haben hauptsächlich die Anstrengungen der Arbeitsgruppen um Cravatt (Tier- und Humanforschung) sowie van der Hoorn (Pflanzenforschung mit Fokus auf Primärstoffwechsel) zu deutlichen Entwicklungen geführt (van der Hoorn *et al.*, 2004; Gu *et al.*, 2010; Simon & Cravatt, 2010). Bei Anreicherungen mit Aktivitäts-basierten Sonden (ABPs) muss jedoch der exakte Reaktionsmechanismus der Zielproteine bekannt (Chan *et al.*, 2004) und die Interaktion mit dem aktiven Zentrum irreversibel sein (Chattopadhyaya *et al.*, 2005). Affinitäts-basierte Sonden (AfBPS) interagieren reversibel mit ihren Zielproteinen und sind somit nicht auf genaue Kenntnisse des Katalysemechanismus angewiesen (Rix & Superti-Furga, 2009). Eine Weiterentwicklung der AfBPs enthält zusätzlich eine getrennte reaktive Einheit, die irreversibel außerhalb des aktiven Zentrums am Zielprotein bindet (Chan *et al.*, 2004; Saghatelian *et al.*, 2004; Chattopadhyaya *et al.*, 2005; Köster *et al.*, 2007). Diese trifunktionellen Sonden wurden durch Köster *et al.* (2007) als *Capture Compounds* (CCs) bezeichnet und stellen eine Sonderklasse der zur Anreicherung von Enzymfamilien verwendeten Sonden dar. Bisher sind keine Studien bekannt, in denen Enzyme des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels, die oft nur in Spuren im pflanzlichen Gewebe vorkommen, durch CCs spezifisch angereichert und analysiert wurden. Demnach betrat diese Arbeit Neuland, indem am Beispiel der OMTs trifunktionelle Sonden in Pflanzen etabliert wurden. Ziel war ein besseres Verständnis der gewebe- und entwicklungspezifischen Verteilung sowie der Funktion dieser Enzyme zu erhalten.

4.1.1 Etablierung und Anwendung der *Capture Compounds*

Da die verwendeten AdoHcy-CCs in Verbindung mit MS-Analysen (CCMS; Köster *et al.* (2007)) in dieser Form bislang nur in tierischen und eukaryontischen Systemen sowie Zellkulturen eingesetzt wurden (Lenz *et al.*, 2011), musste die Anwendung im pflanzlichen System etabliert und anschließend erweitert werden. Untersucht wurde dafür die spezifische Verteilung dreier zytosolischer OMTs (AtOMT1, AtCCoAOMT1 und AtTSM1) in Knospen und Blüten während der Blütenentwicklung und in anderen Organen, wie Keimlingen, Wurzeln, Stängeln, Blättern und Schoten von *A. thaliana*. Alle drei OMTs sind in der Literatur bereits ausführlich beschrieben und boten aufgrund der zur Verfügung stehenden T-DNA-Insertionslinien und spezifischen Antikörper ideale Untersuchungsobjekte, um die Anreicherung von AdoMet-bindenden Proteinen mit den speziell entwickelten trifunktionellen Sonden zu belegen.

Für die kodierenden Gene der Proteine AtOMT1 sowie AtCCoAOMT1 ist beschrieben, dass sie in allen Organen von *A. thaliana* exprimiert werden (Do *et al.*, 2007; Kai *et al.*, 2008; Fellenberg *et al.*, 2009). Dieser Sachverhalt spiegelt sich auch in den Funktionen dieser Enzyme wieder, da die Enzyme Funktionen in der gesamten Pflanze verteilt übernehmen. Die AtOMT1 ist in der Lignin- und Flavonoidbiosynthese sowie in der Pflanzenentwicklung von Bedeutung (Do *et al.*, 2007; Moimuddin *et al.*, 2010; Fellenberg *et al.*, 2012). Die AtCCoAOMT1 konnte sowohl dem Phenylpropanstoffwechsel als auch der Spermidinkonjugat-, Scopoletin- und Ligninbiosynthese zugeordnet werden (Do *et al.*, 2007; Fellenberg *et al.*, 2009; Kai *et al.*, 2008). Die AtTSM1 hingegen wird nur im Tapetum exprimiert und übernimmt eine Funktion in der auf dieses Gewebe beschränkten Polyaminkonjugatbiosynthese (Fellenberg *et al.*, 2008).

Übereinstimmend mit der Literatur konnten in der vorliegenden Arbeit mittels CCMS sowohl die AtOMT1 als auch die AtCCoAOMT1 in verschiedenen Organen (Keimlinge, Wurzeln, Stängel, Blätter und Schoten) sowie allen Blütenentwicklungsstadien nachgewiesen werden. Zudem wurde die AtTSM1 nur in den kleinen und mittleren geschlossenen Knospen detektiert (Kapitel 3.1.1 und 3.1.4). Diese Daten konnten durch die Immunodetektion aller drei Proteine während der Blütenentwicklung, ebenfalls auf qualitativer Ebene, bestätigt werden (Wirsing *et al.*, 2011). Demnach konnte die CCMS in Verbindung mit AdoHcy-CCs in Pflanzen etabliert werden und weitere Anwendungen konnten folgen.

Mit Einsatz der CCMS in Analysen zweier T-DNA-Insertionslinien, der OMTs AtOMT1 und AtCCoAOMT1, konnte der *Knockout* dieser Enzyme direkt auf Proteinebene relativ einfach nachgewiesen werden (Wirsing *et al.*, 2011). Wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, waren in den homozygoten Linien die entsprechenden Enzyme weder in der korrekten Größe noch als sequenziell verändertes Protein nachweisbar. Nakaune *et al.* (2005) publizierten eine ähnliche Anwendung der Sonden-basierten Anreicherung. Hier erfolgte der Nachweis der Deletion von vaskulären Prozes-

sierungsproteinen in T-DNA-Insertionslinien von *A. thaliana* zwar mittels Antikörper, allerdings wurden anschließend auf Sonden basierende Aktivitätstests im Vergleich von Wildtyp zu T-DNA-Insertionslinie durchgeführt. Damit konnte im Wildtyp die Bindung einer spezifischen Sonde an eines der Proteine und somit eine Kaspase-1 ähnliche Aktivität des Enzyms nachgewiesen werden, während in der T-DNA-Insertionslinie keine Interaktion stattfand. Demzufolge konnte der *Knock-out* auf der Aktivitätsebene mittels Sonden-basierter Anreicherung nachgewiesen werden. Die in der vorliegenden Dissertation sowie die durch Nakaune *et al.* (2005) erzielten Resultate verdeutlichen den *Screening*-Charakter dieser Methode. Diese kann nicht nur bei der Untersuchung von Mutanten sondern auch bei Analysen definierter Zielproteine, nach zum Beispiel biotischen und abiotischen Stresssituationen, eingesetzt werden. In diesem Zusammenhang soll auf einen Übersichtsartikel zu Studien über Pflanze-Pathogen-Interaktionen mittels Aktivitäts-basierter Sonden von Richau & van der Hoorn (2010) verwiesen werden. Beispielsweise erfolgte ein Vergleich der Aktivität von Serin-Hydrolasen zwischen nicht behandelten und mit *Botrytis cinerea* infizierten *A. thaliana* Pflanzen durch Kaschani *et al.* (2009a).

Nachweise der Proteinverteilung über herkömmliche immunologische Methoden, die vergleichbare Resultate erzielen würden, benötigen die aufwendige Herstellung sensitiver und spezifischer Antikörper. Diese waren im Fall der hier untersuchten OMTs bereits etabliert und konnten zur Verifizierung der Daten genutzt werden. Die Herstellung solcher Antikörper kann allerdings bei vielen anderen Enzymen, wie pflanzlichen Glykosyltransferasen schwierig oder unmöglich sein (Dr. T. Vogt, persönliche Mitteilung). Vor allem in solchen Fällen würde sich eine Entwicklung und Anwendung spezifischer Sonden rentieren. In Pflanzen wurden jedoch bisher nur Sonden verwendet, die spezifisch für Proteine des Primärstoffwechsels sind, wie zum Beispiel das Proteasom, Serin-Hydrolasen, Methylesterasen, Lipasen und Acyltransferasen (Kolodziejek & van der Hoorn, 2010). Im tierischen und prokaryontischen System sind weit mehr Sonden bekannt (Kapitel 1.1.2; Heal *et al.* (2011) und Cravatt *et al.* (2008)), die in Zukunft ebenfalls für die Anwendung in Pflanzen verwendet werden könnten.

Die Etablierung sowie die ersten Anwendungen der CCMS waren somit in Bezug auf lösliche, pflanzliche Proteine des Sekundärstoffwechsels erfolgreich und diese Technik kann als vielversprechende Methode zur Subproteomanalyse weiter verwendet werden.

4.1.2 Eigenschaften der *Capture Compounds*

Es ist wichtig den Bindungscharakter der Sonde zu ihrem Zielprotein zu charakterisieren, da sich je nach Interaktion und Bindung unterschiedliche Aussagen für die angereicherten Proteine ergeben können. Hierfür wurden *in silico* Bindungsstudien der Sonden an einem 3D-Modell der AtTSM1 durchgeführt (Robert Klein, Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie des Leibniz-

Institutes für Pflanzenbiochemie, unveröffentlichte Ergebnisse). Da die Lage des AdoHcy bereits bekannt war (Kopycki *et al.*, 2008; Ferrer *et al.*, 2005), musste lediglich der Rest der Sonde manuell modelliert werden. Als Resultat ergab sich (Abbildung 4.1), dass sowohl die reaktive Gruppe (schwarzer Pfeil) als auch die Detektionseinheit (blauer Pfeil) außerhalb des aktiven Zentrums liegen. Lediglich die dafür vorgesehene selektive Gruppe interagiert mit der Cosubstratbindedomäne im aktiven Zentrum. Somit ist die Einordnung der Sonde als CC (Köster *et al.*, 2007) bestätigt und es wurde gezeigt, dass auch nach der Bindung des Proteins die Detektionseinheit laut Modell frei zugänglich sein sollte.

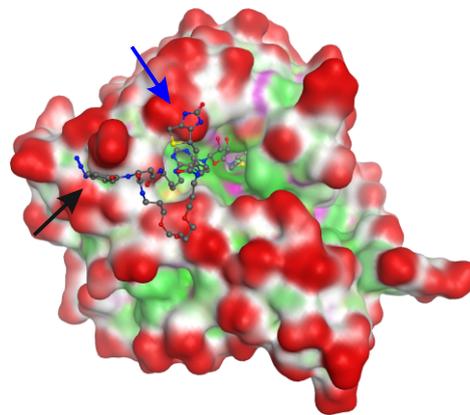


Abbildung 4.1: Oberflächendarstellung der AtTSM1 mit gebundenem AdoHcy-CC (R. Klein, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Moleküloberfläche ist rosa für polare, grün für hydrophobe und rot für Lösungsmittel exponierte Regionen eingefärbt. Die Sonde ist als Strich- und Kugelmodell dargestellt. Der schwarze Pfeil deutet auf die reaktive Gruppe (Phenylazid) und der blaue Pfeil auf die Detektionseinheit (Biotin).

Die CCs sind laut Literatur nicht auf die Aktivität des Zielproteins angewiesen (Dülsner, 2009; Köster *et al.*, 2007), da sie nicht von der kovalenten Bindung im aktiven Zentrum in Übereinstimmung mit der katalytischen Aktivität des Proteins abhängig sind (Köster *et al.*, 2007; Hagenstein *et al.*, 2003). Die Affinität der hier verwendeten selektiven Einheit (AdoHcy; Deguchi & Barchas (1971); Borchardt (1980); Chiang (1998)) basiert, wie bei ABPs, auf der Interaktion im aktiven Zentrum, aber nicht in Form einer kovalenten Bindung. Die irreversible Bindung erfolgt erst anschließend durch die reaktive Gruppe außerhalb des aktiven Zentrums. Jedoch stellt sich die Frage, ob das Zielprotein nicht dennoch aktiv oder zumindest korrekt gefaltet vorliegen muss, um eine Interaktion von Sonde und Protein zu erhalten. In diesem Fall könnten, wie mit APBs, Aussagen über aktive Proteinformen getroffen werden, während AfBPs alle Proteinzustände anreichern und Aussagen über die Abundanz der Proteine zulassen (Adam *et al.*, 2002). Um diesen Sachverhalt ausführlich und in letzter Konsequenz zu analysieren, bedarf es allerdings weiterer Studien der Interaktion von Sonde und Zielprotein.

Da es sich bei der CCMS und auch der Immunodetektion um semiquantitative Methoden handelt (Lenz *et al.*, 2011; Köster *et al.*, 2007), die in dieser Arbeit auf visueller Auswertung der Bandenintensität beruhen, können letztendlich nur Aussagen über das Vorhandensein oder das Fehlen der Proteine getroffen werden (*On/Off*-Effekt). Dieser Sachverhalt kann am besten mit den Daten der AtTSM1 belegt werden. Hier war es mit zwei semiquantitativen Methoden (CCMS und Immunodetektion) nicht möglich, das relative Proteinlevel übereinstimmend zu beschreiben. Die Bandenfärbung war mit beiden Verfahren (in Knospen des Stadiums B) im Vergleich zu anderen Stadien von unterschiedlicher Intensität (CCMS: gleichbleibend bzw. Immunodetektion: abnehmend von Stadium A zu B; siehe Kapitel 3.1.1). Zum Zweck der Quantifizierung wäre es notwendig, weitere Methoden anzuwenden. Lehmann *et al.* (2008) beschrieben beispielsweise den *mass western*, bei dem interne Standards zur Quantifizierung verwendet werden. Weiterhin ist die Methode der Isotopenmarkierung weit verbreitet (Zhang & Neubert, 2006), aber auch bioinformatische Ansätze der Quantifizierung, wie *spectral counting* (Lundgren *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011) oder Quantifizierung über extrahierte Ionenchromatogramme (XIC; Valot *et al.* (2011)) sind bekannt. Allerdings ermöglichen auch diese Methoden in Verbindung mit der CCMS nur semiquantitative Aussagen, da die Affinität der Zielproteine zum AdoHcy-CC Einfluss auf die Quantifizierung hat. Es ist beschrieben, dass die Affinität beim Waschen der magnetischen Partikel mit gebundener Sonde keine Rolle spielt, da das Protein durch die reaktive Einheit irreversibel an die Sonde gebunden wird (Lenz *et al.*, 2011). Jedoch hat dies dennoch Einfluss auf die vorausgehende Interaktion von selektiver Einheit und Protein. Eine höhere Affinität bedeutet, dass eine effektivere Anreicherung möglich ist. Hierzu muss das Gleichgewicht der Enzymreaktionen betrachtet werden. Proteine, bei welchen das Gleichgewicht auf der Seite des Enzym-Inhibitor-Komplexes liegt, interagieren effektiver mit der Sonde, wodurch eine höhere Anreicherungs-effizienz erreicht wird. Deshalb ist dieser Sachverhalt bei der Quantifizierung der CCMS-Analysen ausschlaggebend und verschiedene Proteine können nicht miteinander verglichen werden (Lenz *et al.*, 2011; Köster *et al.*, 2007). Aber auch bei der Verwendung von ABPs kann keine absolute Quantifizierung der angereicherten Proteine vorgenommen werden. Hier spielt die Affinität der Proteine zur Sonde ebenso eine Rolle (Kolodziejek & van der Hoorn, 2010). Lediglich die Gegenüberstellung des gleichen Proteins in verschiedenen Proben ist mit diesen Anreicherungstechniken möglich. Deshalb werden diese Verfahren in Verbindung mit quantitativen MS-Analysen in der vergleichenden Proteomanalyse angewandt. Zum Beispiel wurde durch van der Hoorn *et al.* (2004) die Aktivität verschiedener Serin-Hydrolasen in unterschiedlichen Organen von *A. thaliana* verglichen.

Weiterhin ist bekannt, dass das Transkriptlevel nicht zwangsläufig dem Proteinlevel entspricht (Hack, 2004; Kleffmann *et al.*, 2004; Ovaa & van Leeuwen, 2008; Domon & Aebersold, 2006). Aus diesem Grund wurden in den Kapiteln 3.1.1 und 3.1.4 die mittels CCMS erhaltenen Daten der OMTs mit den Transkriptleveln der jeweiligen Gene verglichen. Anhand der erzielten Resultate

wurde die Korrelation zwischen Transkript- und Proteinlevel in Bezug auf den *On/Off*-Effekt untersucht. Hierbei wurden die quantitativen Unterschiede vernachlässigt, da die Quantifizierung der CCMS in dieser Arbeit nicht möglich war. Abschließend konnten keine Unterschiede des *On/Off*-Effektes zwischen Transkript- und Proteinlevel der vier analysierten OMTs beobachtet werden. Somit wurde geschlussfolgert, dass keine drastische Regulation des Proteinlevels bzw. der Enzymaktivität auf Proteinebene stattfindet. Eine Spezifikation dieser Aussagen kann allerdings erst erfolgen, wenn eindeutig geklärt ist, ob die AdoHcy-CCs nur katalytisch aktive bzw. zumindest korrekt gefaltete Proteine oder alle denkbaren Proteinvarianten anreichern (siehe oben). Es kann demnach nicht ausgeschlossen werden, dass mit der Anreicherung durch AdoHcy-CCs Aussagen über die Enzymaktivität getroffen werden können. Beim Vergleich der Daten mit der durch Barenfaller *et al.* (2008) durchgeführten Proteomstudie fällt auf, dass diese eine allgemeine Regulation der Proteinabundanz in *A. thaliana* auf Transkriptebeleg belegt, was mit den in dieser Arbeit erhaltenen Resultaten der OMTs übereinstimmt. Mit der Annahme einer Anreicherung von aktivem Protein mittels CCMS könnte zusätzlich geschlussfolgert werden, dass es zu keiner *On/Off*-Regulation der Aktivität der hier untersuchten OMTs kommt.

Zur weiteren Charakterisierung der Eigenschaften der AdoHcy-CCs erfolgte die Gegenüberstellung der Bindungseffizienz zweier reaktiver Gruppen sowie zwei verschiedener Verfahren. Es ergab sich, dass Tetrafluorphenylazid als reaktive Gruppe besser für die Anbindung der Sonde an AdoMet-bindende Proteine geeignet ist als Phenylazid, da eine höhere Anreicherungseffizienz nachweisbar war (Kapitel 3.1.3). Eine Studie der Herstellerfirma konnte teilweise vergleichbare Resultate aufzeigen (caprotecTM bioanalytics GmbH, 2011). Auch hier erzielte die irreversible Kopplung mittels Tetrafluorphenylazid in Verbindung mit dem *Off Bead* Verfahren eine höhere Anreicherungseffizienz. Dass die UV-induzierte Bindung durch Azide effizienter ist, wenn diese mit Fluor substituiert sind (Poe *et al.*, 1992), konnte somit auch mit den hier verwendeten Sonden bestätigt werden. Im Fall der untersuchten Verfahren waren die Ergebnisse beider Studien weniger übereinstimmend. Das von der Herstellerfirma favorisierte und zeitsparende *Off Bead* Verfahren führte in den Studien der vorliegenden Arbeit zwar zum Nachweis eines zusätzlichen Proteins, allerdings war das Verhältnis von positiv zu falsch positiv detektierten Proteinen bzw. Peptiden schlechter (Kapitel 3.1.3). Gründe für die unterschiedliche Effizienz der beiden verwendeten Verfahren könnten beispielsweise darin liegen, dass die im *On Bead* Verfahren bereits bei der Selektion und irreversiblen Bindung vorhandenen magnetischen Partikel störend auf die Interaktion wirken. Im *Off Bead* Verfahren könnte es zu zusätzlichen Interaktionen zwischen Streptavidin und natürlich biotinylierten Proteinen kommen, da das Streptavidin hier noch nicht am Biotin der Sonde gebunden ist. Die hier erfolgten Analysen wurden jedoch nur einmalig durchgeführt und sollten demnach lediglich als Hinweise auf die eventuell bessere Eignung des *On Bead* Verfahrens in Pflanzen angesehen und zukünftig verifiziert werden.

4.1.3 Probleme bei der Detektion weiterer AdoMet-bindender Proteine mittels CCMS

Ein kritischer Punkt, unter dem die CCMS betrachtet werden muss, ist die unzureichende Erfassung und Identifizierung AdoMet-bindender Proteine. Hiervon sind durch eine *in silico*-Analyse AdoMet-bindender Motive von (Kozbial & Mushegian, 2005) etwa 200 Proteine in *A. thaliana* beschrieben. Insgesamt konnten mittels CCMS jedoch nur 16 AdoMet-bindende Proteine eindeutig identifiziert werden. Dies entspricht 8% der in *A. thaliana* bekannten Proteine diesen Typs. Auf fünf weitere gab es Hinweise, jedoch war die eindeutige Identifizierung über mindestens zwei Peptide nicht möglich. Doch worin liegen die Gründe für die fehlende Detektion der anderen Proteine?

In den 1D-Gel Analysen der CCMS wurden, ohne Vorfraktionierung oder Detergenzieneinsatz vor der Anreicherung, fünf AdoMet-bindende Proteine detektiert. Da in dieser Arbeit lediglich visuell auffällig unterscheidbare Banden ausgeschnitten wurden, könnten gering exprimierte Proteine übersehen worden sein. Eine Analyse der gesamten Gelspur des Anreicherungsassays mittels LC-MS/MS-Messungen könnte die Resultate auf Basis der 1D-Gele verbessern. Die Auswertung ergab neben den drei zur Etablierung herangezogenen OMTs zwei weitere AdoMet-bindende Proteine. Im Fall der AtMMT fiel auf, dass das Protein in den Gelen der CCMS-Etablierung (Blütenentwicklung) nicht sichtbar war, obwohl es in Knospen und offenen Blüten vorhanden ist (Kapitel 3.1.1). Gründe für den fehlenden Nachweis können in der anfänglich fehlenden Routine und / oder der schwierigen Handhabung des CaproMagsTM zur Isolierung der magnetischen Partikel liegen.

Hervorzuheben ist, dass durch die 1D-PAGE-basierte Methode Indizien für die wurzelspezifische und membrangebundene AtCCoAOMT3 erfasst wurden (Kapitel 3.1.4). Allerdings war nur ein Peptid nachweisbar und somit eine eindeutige Identifizierung nicht möglich. Zudem konnte auch die AtOMT1 in Blättern nur mit einem Peptid identifiziert werden. Bei der Gegenüberstellung der Transkriptlevel beider zu den Enzymen korrespondierenden Gene zeigten sich vergleichbar geringe Transkriptmengen (Kapitel 3.1.4). Die ineffektive Anreicherung könnte somit auf die geringe Abundanz zurückgeführt werden. Allerdings konnten die AtCCoAOMT3 in Wurzeln und die AtOMT1 in Blättern in den Studien von Baerenfaller *et al.* (2008) mittels 1D-PAGE ohne vorherige Anreicherung spezieller Proteine eindeutig über mehrere Peptide identifiziert werden. Hierbei spielte es keine Rolle, ob die entsprechenden Extrakte mit einem Detergenz behandelt wurden oder nicht. Demnach sollte dieses Protein auch in den hier angefertigten CCMS-Analysen mit angeschlossener 1D-PAGE und MS-Analysen nachweisbar sein. Zusammenfassend zeigen sich hier erste Defizite des Systems, da niedrig abundante, eventuell membrangebundene Proteine nicht ohne größeren Aufwand angereichert werden konnten.

Die Identifizierung der Proteine mittels MS-Analysen bringt vor allem einen Nachteil mit sich. Je komplexer die zu messende Probe ist, um so mehr können abundante Proteine die geringer konzentrierten Proteine maskieren (Heazlewood & Millar, 2007; Newton *et al.*, 2004). Zudem besteht die Möglichkeit, dass diese überlagernden Proteine unspezifisch angereichert werden und somit die AdoMet-bindenden Zielproteine nicht detektierbar sind. Ein Beispiel des Maskierungseffektes in grünen Pflanzenteilen ist die RuBisCO. In Kapitel 3.1.4 war die Detektion der AtOMT1 in Blättern nur mit einem Peptid möglich. Dies kann wie zuvor beschrieben an der im Vergleich zu den anderen Organen niedrigen Abundanz liegen. Zudem war in den Blattproben nach Anreicherung jedoch eine intensive, unspezifische Bande (auch in der Negativkontrolle) auf Höhe der AtOMT1 sichtbar (Abbildung 3.9). Diese Bande enthielt eine RuBisCO-Aktivase und andere im Primärstoffwechsel funktionelle Proteine, welche die Signale der AtOMT1 überlagerten. Dieses Problem ist allgemein bekannt und verschiedene Techniken der Abreicherung dieser Proteine sind etabliert (Cellar *et al.*, 2008; am Beispiel der RuBisCO). Der Maskierungseffekt kann natürlich nicht nur in ausgeschnittenen Banden sondern noch ausgeprägter bei der direkten MS-Analyse auftreten. Somit wurden durch direkte MS-Messungen des Anreicherungsassays nach der CCMS lediglich vier weitere AdoMet-bindende Proteine detektiert. Eine eindeutige Identifizierung war allerdings nicht möglich, da ohne Optimierung und Reproduktion der Analysen jeweils nur ein Peptid nachgewiesen wurde. Weiterhin können bei der Verwendung von Pflanzenmaterial über den Maskierungseffekt hinaus eine Vielzahl anderer Substanzen vertreten sein (Sekundärmetabolite, Öle und Kohlenhydrate), die sowohl die Extraktion als auch die Anreicherung und Detektion behindern könnten (Isaacson *et al.*, 2006; Heazlewood & Millar, 2007; Jorrín-Novo *et al.*, 2009; Bindschedler & Cramer, 2011).

Vorfraktionierungen der Zellbestandteile und Einsatz von Detergenzien sind häufig verwendete Ansätze, niedrig abundante sowie schwer lösliche Proteine, wie membrangebundene Enzyme, zu extrahieren und zu solubilisieren (Ozols, 1990; Luche *et al.*, 2003; Lin & Guidotti, 2009). Dies ist auch denkbar für gering konzentrierte, membranständige AdoMet-bindende Proteine und stellte sich als vielversprechende Möglichkeit dar, weitere Zielproteine zu identifizieren. Diese Methode gekoppelt mit der CCMS konnte neun zusätzliche AdoMet-bindende Proteine (Kapitel 3.1.5) eindeutig nachweisen. Bei der Anwendung direkter LC-MS/MS-Messung oder der Analyse der gesamten Gelspur der 1D-PAGE könnten diese Daten vervollständigt werden. Da diese Untersuchungen aus Zeit- und Materialgründen allerdings nicht wiederholt wurden, war dieser Nachweis nicht möglich. Zur Vorfraktionierung können nachfolgend aber auch andere Methoden wie Zell- oder Zellorganellenisolierung eingesetzt werden (Millar, 2004; Chen *et al.*, 2006; Eubel *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009; Hynek *et al.*, 2009; Ferro *et al.*, 2010). Dennoch bedeutet Vorfraktionierung größeren Arbeitsaufwand und mehr zur Verfügung stehendes Probenmaterial. Sie steht somit

dem eigentlichem Anwendungsgebiet der CCMS, die schnelle und einfache Anreicherung mit geringen Probeneinsatz, konträr gegenüber.

Mit Vorfraktionierung und Detergenzieneinsatz konnte aber nicht nur eine erhöhte Menge an Identifizierungen sondern auch eine höhere Anzahl an membranengebundenen Proteinen verzeichnet werden. Drei der hier erfassten Proteine waren membranständig (Kapitel 3.1.5), wohingegen mit herkömmlichen Extraktionsmethoden lediglich ein Membranprotein detektiert wurde (ein Peptid der AtCCoAOMT3 aus Wurzeln beschrieben in Kapitel 3.1.4). Da jedoch eine Vielzahl an membranengebundenen Proteinen aus *A. thaliana* bekannt sind (Arabidopsis Biological Resource Center, 2010), die unter Umständen auch AdoMet binden können (Chary *et al.*, 2002), ist selbst nach dem Einsatz von Detergenzien die Ausbeute an membranassoziierten Proteinen gering. Es ist allerdings nicht möglich, jedes Membranprotein unter den gleichen Bedingungen zu extrahieren (Hjelmeland, 1990; Lin & Guidotti, 2009). Für die meisten sind individuelle Extraktionsmethoden zu verwenden, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht ausführlich getestet werden konnten. Es können beispielsweise auch andere hier nicht getestete Detergenzien eingesetzt werden. Baerenfaller *et al.* (2008) nutzten SDS zur Solubilisierung für Proteine die unter herkömmlichen Extraktionsbedingungen unlöslich sind. In der hier vorliegenden Arbeit konnten keine Aussagen über die Effizienz der verwendeten Detergenzien getroffen werden, da durch die stark variierende Aufarbeitung der unterschiedlichen Fraktionen mit den verschiedenen Detergenzien für die LC-MS/MS-Messung keine eindeutigen Schlussfolgerungen gezogen werden können.

Eine zusätzliche Erklärung kann durch die Verteilung und die Expression der Proteine gegeben werden. Es ist hinreichend bekannt, dass Proteine eine organ-, gewebe- und entwicklungspezifische Verteilung aufzeigen und teilweise nur unter bestimmten Stressbedingungen exprimiert werden. Demnach kann ein solches Protein nicht erfasst werden, wenn die Proben nicht von dem entsprechenden Organ, Gewebe oder Entwicklungsstadium stammen oder die Pflanzen unter anderen Bedingungen angezogen wurden. Ein Beispiel hierfür stellt die AtTSM1 dar. Dieses Protein ist nur im Tapetum der Knospen exprimiert (Fellenberg *et al.*, 2008) und demnach nur nachweisbar, wenn junge Knospen als Probe verwendet werden.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass durch den Aufbau der Sonde sterische Hinderungen der Interaktion entstehen. Scholten *et al.* (2006) und Shiyama *et al.* (2004) zeigten beispielsweise das ein Einfluss der Länge und Eigenschaften des *Linkers* auf die Interaktion von Zielprotein und Sonde besteht. Weiterhin ist nicht jedes aktive Zentrum dieser Proteine exakt gleich aufgebaut (Kozbial & Mushegian, 2005) und lässt die Interaktionen der selektiven Einheit oder auch die irreversible Bindung durch die reaktive Gruppe zu. Zudem wurde AdoHcy als selektive Einheit verwendet. Obwohl AdoHcy ein chemisches Analogon zu AdoMet ist, kann es vorkommen, dass es nicht mit dem aktiven Zentrum bestimmter AdoMet-bindender Enzyme interagieren kann und sich deshalb keine spezifische Wechselwirkung vom Protein zur Sonde ausbildet. Dies könnte weiterhin dazu

führen, dass das Protein anschließend nicht irreversibel gebunden und somit nicht angereichert wird. Zudem kann die bereits diskutierte Affinität der selektiven Einheit Einfluss auf die Nachweisbarkeit bestimmter Proteine haben. Wenn niedrig abundante Proteine zusätzlich eine geringe Affinität zur Sonde zeigen, könnte es unmöglich sein diese effektiv anzureichern.

4.1.4 Etablierung der Nitrocatechol-Sonden

Da während der Anwendung der CCMS Defizite bei der Detektion eines derart großen Subproteoms (etwa 200 AdoMet-bindende Proteine; (Kozbial & Mushegian, 2005)) auftraten, sollte durch die Entwicklung neuer Sonden die Analyse eines Teils der AdoMet-bindenden Proteine, nämlich den CCoAOMTs, ermöglicht werden. Hierfür wurden durch Kooperationspartner Sonden synthetisiert, welche auf Inhibitoren basieren, die in der Substratbindedomäne mit den Zielproteinen interagieren. Dabei war die Grundlage eine Nitrocatecholeinheit (wie zum Beispiel in Entacapon; Nissinen *et al.* (1992)), welche für die Inhibition tierischer COMTs bereits bekannt war (Vidgren *et al.*, 1994; Bonifácio *et al.*, 2002). Dies war aufgrund von Fachliteraturrecherchen, einem Sequenzvergleich einer tierischen COMT mit einer CCoAOMT aus *A. thaliana* sowie *in silico* Bindungsstudien eines Inhibitors auf die ausgewählten Zielproteine übertragbar.

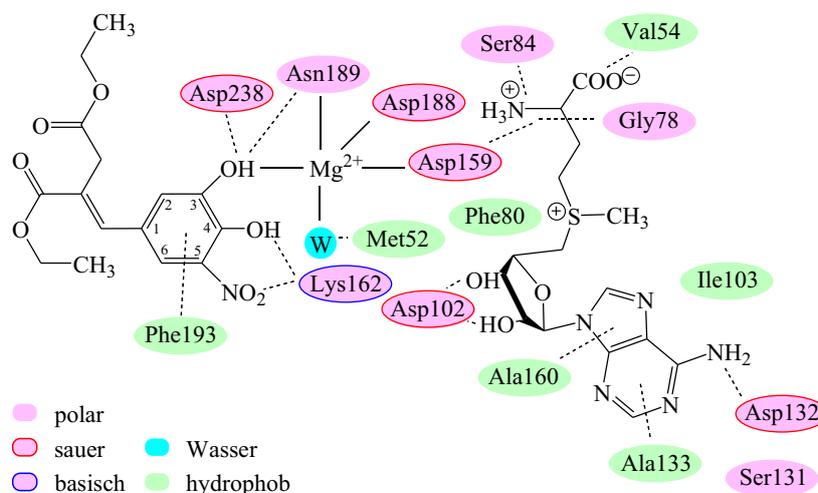


Abbildung 4.2: Wechselwirkung des NC-Inhibitors 4 mit dem Protein AtTSM1. Die Darstellung bezieht sich auf die während der Bindung relevanten Aminosäuren, welche unterschiedliche Eigenschaften (durch Färbung angezeigt) aufweisen. Gestrichelte Linien zeigen elektrostatische Wechselwirkungen, Van-der-Waals Wechselwirkungen bzw. Wasserstoffbrückenbindungen an. Die Nummerierung der Aminosäuren entspricht dem *Alignment* in Abbildung 3.12. W - Wassermolekül

Im Folgenden sollen die in der Sequenz detektierten Unterschiede der zwei Enzyme AtTSM1 und RnCOMT (Kapitel 3.2.1) hinsichtlich des Bindungsmodus eines Inhibitors im aktiven Zentrum

(Abbildung 4.2) diskutiert werden. Es wird deutlich, dass der Bindungsmechanismus der AtTSM1 (Abbildung 4.2; R. Klein, unveröffentlichte Ergebnisse) im Vergleich zur RnCOMT (Abbildung 1.7 in Kapitel 1.2.4 sowie Bonifácio *et al.* (2002) und Vidgren *et al.* (1994)) ähnlich verläuft. Die konservierten Aminosäuren sowie Aminosäuren mit vergleichbaren Eigenschaften an einer Position erfüllen entsprechende Funktionen. Beispielsweise sind hier drei das Metallion stabilisierende Aminosäuren (Asp159, Asp188 und Asp189) zu nennen. Für die in Kapitel 3.2 als unterschiedlich beschriebenen Aminosäuren mit Aufgaben in der Substratbindung, Gln132, His160 und Pro193 der RnCOMT, konnten ebenfalls vergleichbare Funktionen definiert werden. Ein weiterer in den *Alignments* nicht auffallender Unterschied liegt bei der Aminosäure Glu218 der RnCOMT. Diese interagiert mit der Hydroxygruppe am C3-Atom des Catecholorings (Bonifácio *et al.*, 2002; Vidgren *et al.*, 1994). An der gleichen Position ist in der AtTSM1 ebenfalls ein Glu vorhanden, doch die Interaktion mit der C3-Hydroxygruppe übernimmt das Asp238. Hier liegt somit kein Austausch der Aminosäuren, sondern eine Verschiebung von Sekundärstrukturelementen vor. Zusammenfassend wird deutlich, dass sich die Bindungs- und Katalysemechanismen dieser Proteine trotz der geringen Sequenzhomologie ähneln. Dies war eine weitere Bestätigung der Ähnlichkeit zwischen CCoAOMTs aus *A. thaliana* und tierischen COMTs (Ferrer *et al.*, 2005). Ein Unterschied ist allerdings deutlich erkennbar. Von Ferrer *et al.* (2005) wurde eine metallionengestützte Methylgruppenübertragung der CCoAOMTs beschrieben, während Bonifácio *et al.* (2002) und Vidgren *et al.* (1994) als katalytische Base in COMTs ein Lys identifizierten. In dem in dieser Arbeit erstellten Sequenzvergleich (Kapitel 3.2.1) konnte ebenfalls ein Lys identifiziert werden (Position 162), welches in der Methylgruppenübertragung funktionell sein könnte. Dieser Sachverhalt wurde durch die von R. Klein angefertigten *in silico* Studien unterstützt, indem das entsprechende Lys in geringer Distanz zu einer Hydroxylgruppe und der Nitrogruppe des Inhibitors lokalisiert werden konnte. Abschließend können diesbezüglich jedoch keine definitiven Aussagen getroffen werden. Hierfür wäre es notwendig, das entsprechende Lys der AtTSM1 zu mutieren, um anschließend *in vitro* die Aktivität zu überprüfen.

Aufgrund der zuvor erläuterten Parallelen beider Systeme konnten von Kooperationspartnern (S. Brauch und Dr. B. Westermann) Sonden synthetisiert werden, die anschließend auf ihre inhibierende Wirkung getestet wurden. Obwohl Probleme mit der Wasserlöslichkeit und Reinheit auftraten sollen die Daten unter Vorbehalt dennoch verdeutlichen, dass die Substanzen (die NC-Sonde eingeschlossen) in unterschiedlicher Effizienz CCoAOMTs inhibieren. Während der *in vitro* Analyse der hemmenden Wirkung putativer Inhibitoren wurde der Einfluss der Nitrogruppe nicht erneut bestätigt und als gegeben angenommen (Schultz & Nissinen, 1989; Vidgren *et al.*, 1994; Ovaska & Yliniemelä, 1998; Bonifácio *et al.*, 2002; Learmonth *et al.*, 2010). Weiterhin scheint die Demethylierung des Catecholorings notwendig und die Veresterung größerer Substituenten der Säuregruppen der Bernsteinsäure vorteilhaft zu sein. Es ist zu bemerken, dass keiner der hier

verwendeten Inhibitoren den IC_{50} -Wert von Entacapon, einem der bekanntesten Nitrocatechol-Inhibitoren der tierischen COMTs, erreichte. Dieser lag zwischen 10 und 160 nM bei der Inhibierung der löslichen RnCOMT aus Darm und Leber (Nissinen *et al.*, 1992) und ist somit etwa 100 mal niedriger als die der inhibierenden Substanz **7**, der hier angefertigten Analysen. Hierfür gibt es zwei mögliche Ursachen. Zum Einen könnten NC-Inhibitoren allgemein eine weniger hemmende Wirkung auf CCoAOMTs als auf COMTs besitzen. Zum Anderen sind die Strukturen der synthetisierten Inhibitoren nicht identisch dem Entacapon, was zu einer weniger hemmenden Wirkung auf die AtTSM1 im Gegensatz zu Entacapon auf die RnCOMT führen kann. Der inhibierende Effekt des Entacapon auf die AtTSM1 konnte nicht bestimmt werden, da diese Substanz nicht zur Verfügung stand. Die NC-Sonde zeigte letztendlich eine nahezu gleiche Inhibierungseffizienz wie die des effektivsten getesteten Inhibitors der AtTSM1 (Substanz **7**). Somit sollte es dieser Sonde möglich sein, mit den CCoAOMTs von *A. thaliana* spezifisch zu interagieren.

Im nächsten Schritt der Entwicklung CCoAOMT-spezifischer Sonden wurde die mit dem aktiven Zentrum dieser Proteine interagierende NC-Sonde für erste Anreicherungsuntersuchungen von rekombinanten Proteinen aber auch Proteinrohextrakten verwendet (Abbildungen 3.17 und 3.18). Deutlich wurde, dass diese Sonde spezifisch kationenabhängige CCoAOMTs aber nicht kationunabhängige CaOMTs der Klasse II anreichert, wenn Proteinrohextrakte verwendet wurden. Mit rekombinant hergestelltem Protein konnte dies allerdings nicht bestätigt werden, da auch in der Negativkontrolle die Bande der CCoAOMT AtTSM1 sichtbar war. Mögliche Ursachen hierfür könnten in der Sättigung der Sonde liegen, da in diesen Assays höhere Proteinkonzentrationen, als die natürlich vorkommenden, eingesetzt wurden. Weiterhin ist es denkbar, dass der für die Negativkontrolle verwendete Inhibitor 3,5-DNC eine geringere Affinität zu den Zielproteinen aufweist als die NC-Sonde. Hierdurch wäre die effiziente Blockade des aktiven Zentrums der CCoAOMTs gegen die NC-Sonde nicht gegeben und es sollte in Betracht gezogen werden, andere Kompetitoren in der Negativkontrolle einzusetzen. Weiterhin konnten auch durch Beobachtungen während der CCMS-Analysen Hinweise für die Verbesserung der Anreicherung mit NC-Sonden erfasst werden. Bei dem Vergleich des *On* und *Off Bead* Verfahrens mit AdoHcy-Sonden war aufgefallen, dass Unterschiede in der Anreicherungs-effizienz entstanden (Kapitel 3.1.3). Somit könnte die Anwendung des *Off Bead* Verfahrens bei NC-Sonden eventuell Verbesserungen in der Anreicherung erzielen. Zudem konnten sowohl in den Überständen als auch in den Waschfraktionen der Anreicherungsassays mit rekombinantem Protein aber auch Proteinrohextrakten Signale beider OMTs, AtOMT1 und AtTSM1, detektiert werden. Dies könnte durch Probleme bei der irreversiblen Bindung hervorgerufen werden. Wie bereits im Fall der AdoHcy-CCs beschrieben kann die Konstruktion der Sonden erheblichen Einfluss auf die Wechselwirkungen mit ihren Zielproteinen haben (Shiyama *et al.*, 2004; Scholten *et al.*, 2006). Beispielsweise zeigte sich dies beim Vergleich der reaktiven Gruppen der AdoHcy-CCs (Kapitel 3.1.3). Dies verdeutlicht, dass eine Verbesserung durch die Verwendung anderer reaktiver Einheiten erzielt werden könnte.

Durch die Unterscheidung der CCoAOMTs zu anderen Klassen der OMTs während der Anreicherung könnte es in Zukunft möglich sein, bei einer Überlappung der Funktionen einzelner Proteine schnell und einfach nachzuweisen, welches der Proteine in welchem Gewebe die zu klärende Aufgabe übernimmt. Ein Beispiel hierfür ist die überlappende Funktion der AtOMT1 und der AtCCoAOMT1, welche vor Kurzem, noch ohne die Anwendung einer solchen Sonde, mittels Antikörper zugeordnet werden konnte (Fellenberg *et al.*, 2012). Jedoch könnte, auch in Bezug auf andere spezifische Sonden, dies ein Anwendungsgebiet dieser Anreicherungstechnik darstellen.

Letzendlich ist im Fall der NC-Sonden die Einordnung in die drei Gruppen der in der chemischen Proteomik verwendeten Sonden ebenso wichtig wie bei den AdoHcy-CCs. Hierfür wurde das von R. Klein erstellte 3D-Modell (Abbildung 4.3) erneut herangezogen und es konnten Parallelen der NC-Sonden zu den AdoHcy-CCs aufgezeigt werden. Es wird deutlich, dass einerseits die reaktive Gruppe (schwarzer Pfeil) nicht mit dem aktiven Zentrum des Proteins interagiert und andererseits die Detektionseinheit Biotin (blauer Pfeil) an der Proteinoberfläche liegt und somit an das Streptavidin der magnetischen Partikel binden kann. Demnach ist auch die NC-Sonde als trifunktionelle CC einzuordnen (Lenz *et al.*, 2011; Köster *et al.*, 2007).

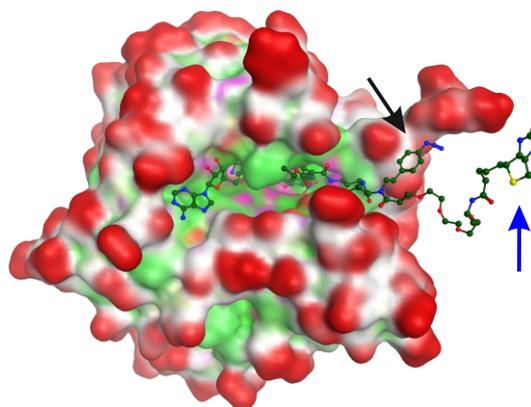


Abbildung 4.3: Oberflächendarstellung der AtTSM1 mit gebundener NC-Sonde (R. Klein, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Moleküloberfläche ist rosa für polare, grün für hydrophobe und rot für Lösungsmittel exponierte Regionen eingefärbt. Die Sonde ist als Strich- und Kugelmodell dargestellt. Der schwarze Pfeil deutet auf die reaktive Gruppe (Phenylazid) und der blaue Pfeil auf die Detektionseinheit (Biotin).

Zusammenfassend konnten Hinweise für die spezifische Anreicherung der CCoAOMTs durch eine NC-Sonde gezeigt werden. Jedoch sollten die Probleme mit der Löslichkeit und Reinheit durch Optimierung der Sonde und des Systems beseitigt werden.

4.1.5 Fazit und Ausblick der auf Sonden-basierten Anreicherungsverfahren

Abschließend kann die zu Beginn der Arbeit gestellte Frage, ob OMTs spezifisch angereichert und Profile der Verteilung in einzelnen Organen erstellt werden können, nur teilweise beantwortet werden. Es war möglich mittels CCMS drei hoch abundante OMTs anzureichern, nachzuweisen und ihre Verteilung in unterschiedlichen Organen und Entwicklungsstadien von *A. thaliana* zu beschreiben. Weiterhin war die Detektion von insgesamt 21 der etwa 200 bekannten AdoMet-bindenden Proteine (Kozbial & Mushegian, 2005), mit teilweise nur einem Peptid, in unterschiedlichen Organen realisierbar. In einer Studie von Baerenfaller *et al.* (2008) hingegen konnten sämtliche der mittels CCMS angereicherten Proteine mit mehr als einem Peptid identifiziert werden, indem lediglich 1D-PAGE und anschließende MS-Messung, ohne Anreicherung durch Sonden, angewandt wurde. Dies zeigt die Grenzen des CCMS-Systems in der Anreicherung niedrig abundanter und / oder membrangebundener Proteine auf und es ist fragwürdig, ob diese Methode eine effiziente Detektion solcher Proteine zulässt. Es besteht die Möglichkeit, dass durch Optimierung der Anreicherung, Vorfraktionierung und verbesserter Detektion weitere durch Baerenfaller *et al.* (2008) nicht detektierte Proteine identifiziert werden können. Allerdings war es durch begrenzte Messkapazitäten am Massenspektrometer nicht möglich diese Studien in erforderlichem Maße durchzuführen. Außerdem verliert die Methode durch die Ergänzung von Vorfraktionierungsschritten ihren eigentlichen Vorteil, der schnellen und einfachen Anwendung mit geringen Probenmengen.

Da die CCMS somit kaum zum Nachweis noch nicht beschriebener Enzyme verwendbar ist, könnte sie dennoch in anderen Anwendungsgebieten eingesetzt werden. Nachdem das SONDENSYSTEM für spezielle Proteine optimiert ist, ermöglicht es die Analyse des Verteilungsmusters bestimmter Enzyme in Pflanzen, die verschiedenen biotischen oder abiotischen Parametern ausgesetzt waren oder putative Proteinmutationen enthalten (Richau & van der Hoorn, 2010; Wirsing *et al.*, 2011). Weitere Anwendungsgebiete könnten im Vergleich von Protein- zu Transkriptleveln liegen, wenn die Methode in naher Zukunft durch Einsatz von internen Standards bzw. Markierungen quantifizierbar wird. Hierbei können entweder Aussagen über die Regulation der Enzymaktivität oder des Proteinlevels getroffen werden. Dazu muss jedoch die Interaktion der Proteine mit den Sonden näher charakterisiert werden. Zum Beispiel könnten Mutationen in der AdoMet-Bindedomäne Aufschluss geben, ob nur korrekt gefaltetes und im Prinzip aktives Protein gebunden werden kann. Eine andere Anwendung besteht im *Screening* nach Interaktionspartnern der selektiven Gruppen. Dies ist in der medizinischen Forschung weit verbreitet und es können beispielsweise Schlussfolgerungen über Nebenwirkungen von Medikamenten getroffen werden (Fischer *et al.*, 2010b).

Weiterhin sollte es mit der durch Kooperationspartner (S. Bruch und Dr. B. Westermann) synthetisierten NC-Sonde in Zukunft möglich sein, zwischen CCoAOMTs und anderen OMTs zu unterscheiden und spezifische Profile für CCoAOMTs zu erstellen. Diese Anreicherungsverfahren

befindet sich in ihren Anfängen und dennoch konnte eine Tendenz zur Selektivität gegenüber CCoAOMTs gezeigt werden. Aber es sind noch eine Vielzahl an Optimierungen der Sonde und auch der Methode durchzuführen. Vor allem sollte auf die Löslichkeit und Reinheit der Substanzen Wert gelegt werden, da diese bislang exakte Analysen erschwerten. In absehbarer Zeit könnten, zum Beispiel durch die Wahl eines anderen *Linkers*, die Löslichkeitsprobleme behoben werden. Zur Weiterentwicklung des Sondendesigns besteht beispielsweise die Möglichkeit, andere reaktive Gruppen zur UV-induzierten Bindung, wie Tetrafluorphenylazid (Poe *et al.*, 1992) oder Benzophenon (Dormán & Prestwich, 1994), einzusetzen. Einige der hier angesprochenen Probleme der NC-Sonde werden bereits durch S. Brauch bearbeitet, allerdings existiert gegenwärtig keine fertig gestellte Sonde, die getestet werden kann. Im Bezug auf die Methode sollte vor allem die Etablierung einer effizienten Negativkontrolle in Zukunft im Mittelpunkt stehen. Hierbei könnte der Inhibitor **7** verwendet werden, welcher bessere inhibierende Eigenschaften zeigte als 3,5-DNC. Da sich die NC-Sonden und AdoHcy-CCs strukturell, abgesehen von der selektiven Gruppe, ähneln, könnten die Eigenschaften aber auch die Nachteile der CCMS auf die NC-Sonden übertragbar sein. Somit ist es denkbar, dass die gleichen Einschränkungen in der Anwendung entstehen.

Prinzipiell war es möglich eine Anreicherungsverfahren (AdoHcy-CC) in Pflanzen zu etablieren und mit einer NC-Sonde erste Untersuchungen, die Hinweise auf Optimierungen boten, durchzuführen. Obwohl einige Probleme während der Anwendung und Etablierung der Systeme auftraten sind dies vielversprechende Methoden, die in Zukunft weiter verwendet und optimiert werden sollten. Gründe hierfür liegen im großen Interesse, das Proteom von Organismen aufzuklären. Weiterhin sind auch andere Anwendungsgebiete, wie pharmakologische Studien zu Nebenwirkungen von Medikamenten, bekannt, die diese Methode als hilfreich bestätigten (Fischer *et al.*, 2010b).

4.2 Charakterisierung der AtCCoAOMT3

Durch die in Kapitel 3.1 beschriebenen Proteomanalysen konnte die wurzelspezifische Verteilung, bezogen auf die hier untersuchten Organe, eines CCoAOMT-ähnlichen Enzyms gezeigt werden. Hierbei handelte es sich um die AtCCoAOMT3, von welcher zu Beginn der Arbeiten keine Funktion bekannt war. Aus diesen Gründen stand die Charakterisierung dieses Proteins im zweiten Teil der Arbeit im Mittelpunkt. Weiterhin wurde gleichzeitig mit den hier durchgeführten Studien eine *in vitro* Aktivität der AtCCoAOMT3 als Glutamat-Methyltransferase beschrieben (Sahr *et al.*, 2010), welche sich von den sonst bekannten Funktionen dieser Proteine deutlich unterscheidet.

4.2.1 Einordnung als CCoAOMT

Die Einordnung der AtCCoAOMT3 nach Raes *et al.* (2003) erfolgte in die Klasse I der kationenabhängigen OMTs und weiterhin in die Gruppe der CCoAOMT-ähnlichen Enzyme. Jedoch wurde durch Sahr *et al.* (2010) eine untypische *in vitro* Funktion, die Methylierung der Carboxylgruppe der Aminosäure Glu, nachgewiesen. Deshalb sollte die Einteilung nochmals bestätigt werden, indem Sequenzvergleiche mit sechs anderen pflanzlichen CCoAOMTs durchgeführt und die Sequenzmotive nach Joshi & Chiang (1998) nachgewiesen wurden (Kapitel 3.3.1). Es war möglich, alle Motive der CCoAOMTs bis auf Motiv B zuzuordnen. Da dieses Motiv allerdings in der Insertionsschleife (Abbildung 3.19) liegt und als Unterscheidungsmerkmal der CCoAOMTs zu den CCoAOMT-ähnlichen Proteinen gilt (Kopycki *et al.*, 2008), war dies eine Bestätigung der Einteilung des Proteins nach Raes *et al.* (2003) als CCoAOMT-ähnliches Enzym. Eine detaillierte Auswertung des Einflusses des hier divergenten Motivs auf die Funktionalität des Enzyms folgt im nächsten Abschnitt (Kapitel 4.2.2). Des Weiteren lagen alle Sequenzübereinstimmungen mit den CCoAOMTs über 50%, wobei die höchste zu den Proteinen SLOMT (57,8%) und McPFOMT (56,0%) verzeichnet wurden, welche ebenfalls den CCoAOMT-ähnlichen Enzymen angehören.

Zusätzlich konnte die Einteilung der AtCCoAOMT3 als CCoAOMT durch den Beweis der Ionenabhängigkeit bestätigt werden, da nur die pflanzlichen CCoAOMTs kationenabhängig sind (Kopycki *et al.*, 2008; Joshi & Chiang, 1998). Wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben, sinkt die Effizienz der Methylierung sobald Mg^{2+} durch andere Kationen ersetzt wird. Zusätzlich war keine enzymatische Aktivität bei Fehlen des Kations nachweisbar. Eine entsprechende Ionenabhängigkeit wurde durch Sahr *et al.* (2010) nicht explizit nachgewiesen, allerdings war auch in deren Enzymassays $MgCl_2$ als Ionenquelle vorhanden.

4.2.2 *In vitro* Aktivität der AtCCoAOMT3 und *in silico* Bindungsstudien

CCoAOMTs sind im Allgemeinen dafür bekannt Phenylpropanoide, deren CoA-Ester aber auch Flavonoide zu methylieren (Ye *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1997; Parvathi *et al.*, 2001; Ibdah *et al.*, 2003). Deshalb wurden während dieser Analyse erste Enzymtests vorgenommen, die Aussagen über die *in vitro* Aktivität mit den aus der Literatur bekannten Substraten ermöglichen sollten. Hierfür kam das rekombinant hergestellte Enzym AtCCoAOMT3_{N-29} zum Einsatz. Dieses lag am N-Terminus um 29 Aminosäuren verkürzt vor, da hier eine Transmembrandomäne enthalten war, die sich negativ auf die Expression des Proteins durch Bakterien auszuwirken schien (Kapitel 3.3.2). Zur Bestätigung der *in vitro* erhaltenen Resultate wurde von Dominic Brauch (Abteilung Stoffwechsel- und Zellbiologie des Leibniz-Institutes für Pflanzenbiochemie, Projektarbeit) auf Basis der McP-

FOMT ein 3D-Modell der AtCCoAOMT3 erstellt (Abbildung 4.4). Somit war es möglich *in silico* Studien zur Substratbindung durchzuführen (D. Brauch).

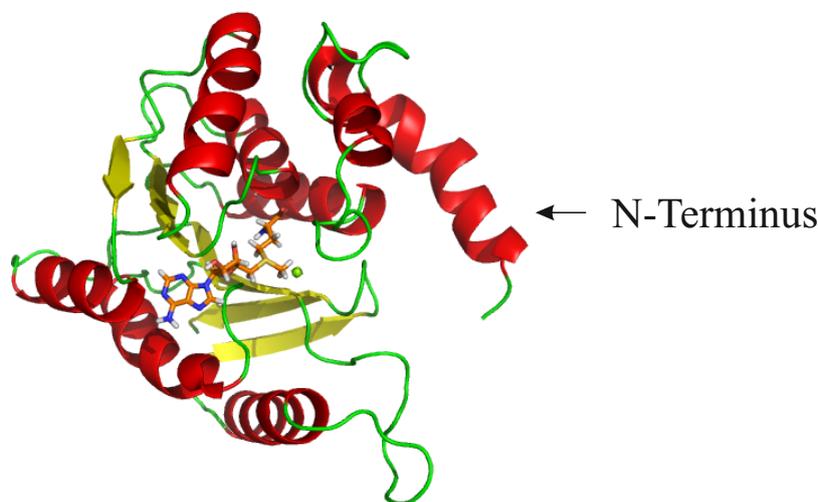


Abbildung 4.4: 3D-Strukturmodell der AtCCoAOMT3 (D. Brauch, Projektarbeit). Das gesamte Protein wird vereinfacht mit Pfeilen für β -Faltblätter und Spiralen für α -Helices dargestellt. Im aktiven Zentrum sind das Cosubstrat AdoMet (orangefarbenes Kohlenstoffgerüst) und Mg^{2+} (grüne Kugel) gebunden. Der N-Terminus ist variabel und wird hier nur beispielhaft abgebildet.

Bei dem *Screening* verschiedener Substrate ergab sich, dass Quercetagenin das *in vitro* am effektivsten umgesetzte Substrat der AtCCoAOMT3_{N-29} ist (spezifische Enzymaktivität von 446 pkat/mg_{Protein}). Die kinetischen Parameter wurden mit $k_{cat} = 1,76 \text{ min}^{-1}$ und $K_m = 32,4 \text{ }\mu\text{M}$ ermittelt. Die daraus berechnete katalytische Effizienz k_{cat}/K_m betrug circa $900 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Im Vergleich mit der durch Kopycki *et al.* (2008) ermittelten katalytischen Effizienz der McPFOMT ist die der AtCCoAOMT3 somit geringer. Dies war allerdings zu erwarten, da Quercetagenin nicht endogen in *A. thaliana* vorkommt und es sich hier um ein *in vitro* Substrat handelt, welches als *in vivo* Substrat nahezu ausgeschlossen werden kann. Allerdings konnten bei Experimenten mit anderen Phenylpropanoiden und Flavonoiden nur geringere spezifische Enzymaktivitäten erfasst werden. Die gemessenen Umsätze lagen zwischen 0 und 4% der Aktivität der AtCCoAOMT3_{N-29} mit dem Substrat Quercetagenin. Mit zwei Ausnahmen können also alle in Kapitel 3.3.4 vorgeschlagenen Substrate ausgeschlossen werden (Luteolin, Quercetin, Esculetin, Caffeoyl-CoA, Kaffeesäure, Chlorogensäure). Obwohl für andere pflanzliche CCoAOMTs beschrieben ist, dass sie ein weites Substratspektrum haben (Ibdah *et al.*, 2003; Fellenberg *et al.*, 2008), scheint es sich hier um ein sehr spezifisches Enzym zu handeln.

Zudem wurde in der Publikation von Kopycki *et al.* (2008) und auch schon früher durch Vogt (2004) beschrieben, dass der N-Terminus dieses Proteins die Substratspezifität beeinflusst. Liegt

der N-Terminus des rekombinanten Proteins verkürzt vor (um bis zu 13 Aminosäuren), verlagert sich die Substratspezifität von Flavonoiden zu Phenylpropanoiden (Vogt, 2004; Kopycki *et al.*, 2008). In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, dass außer der Transmembrandomäne weitere drei Aminosäuren des N-Terminus entfernt wurden, welche für die gezeigte Substratspezifität des rekombinant hergestellten Proteins AtCCoAOMT3_{N-29} verantwortlich sein könnten. Weiterhin spielt die Insertionsschleife mit Motiv B (Abbildung 3.19; Joshi & Chiang (1998); Kopycki *et al.* (2008)), welche in der AtCCoAOMT3 zur MsCCoAOMT stark variiert, eine Rolle in der Substratspezifität. In der McPFOMT bestehen ebenfalls Unterschiede zur MsCCoAOMT und beim Austausch der entsprechenden Region gegen die Aminosäuresequenz der MsCCoAOMT konnte eine Verlagerung der Substratspezifität von Flavonoiden zu Caffeoyl-CoA beobachtet werden (Kopycki *et al.*, 2008). Somit könnte auch im Fall der AtCCoAOMT3 diese Sequenz für die Substratspezifität zu Flavonoiden (speziell Quercetagenin) verantwortlich sein.

Der Bindungsmechanismus von Quercetagenin und den benötigten Cofaktoren in das aktive Zentrum der AtCCoAOMT3 (Abbildung 4.5) ist weitgehend äquivalent zu dem durch Ferrer *et al.* (2005) beschriebenen Mechanismus. Wie bereits im *Alignment* dieses Proteins mit sechs anderen pflanzlichen CCoAOMTs gezeigt wurde (Kapitel 3.3.1), sind die meisten zur Bindung notwendigen Aminosäuren hoch konserviert. Lediglich die Aminosäuren Gln anstelle von Thr127 und Val anstelle von Glu123 liegen in größerer Entfernung zum Metallion und haben keinen Einfluss auf dieses (Abbildung 4.5). Jedoch ist zum Beispiel für die RnCOMT beschrieben, dass drei Aminosäuren (Asn und zwei Asp), welche auch in der AtCCoAOMT3 enthalten sind und hier mit dem Metallion interagieren (Abbildung 4.5), zur Stabilisierung der Position des Kations ausreichen (Bonifácio *et al.*, 2002; Vidgren *et al.*, 1994). Durch die Kristallisierungsstudien von Vidgren *et al.* (1994) und Bonifácio *et al.* (2002) ist weiterhin bekannt, dass im tierischen Organismus ein Lys an der Methylgruppenübertragung durch COMTs beteiligt ist. Ferrer *et al.* (2005) publizierten eine Metallionen-basierte Methylgruppenübertragung, da in der Kristallstruktur der MsCCoAOMT kein als katalytische Base fungierendes Lys (im *Alignment* in Abbildung 3.19 an Position 226) in Reichweite der Hydroxygruppen gefunden wurde. Im Fall der AtCCoAOMT3 konnte bislang nicht eindeutig nachgewiesen werden, welcher Katalysemechanismus erfolgt. Es gab allerdings Hinweise, dass auch hier das Lys funktionell sein könnte, da eine Interaktion von Lys226 mit einer Hydroxygruppe des Quercetagenins detektiert werden konnte (Abbildung 4.5). Zum konkreten Beweis einer der beiden Katalysemechanismen sollten jedoch weitere Experimente durchgeführt werden.

In den hier angefertigten *in vitro* Enzymtests der AtCCoAOMT3_{N-29} wurde neben der Substratspezifität auch eine Positionsspezifität für das C6-Atom des Quercetagenins nachgewiesen. Jedoch ist auch hier die Kürzung des N-Terminus der rekombinanten AtCCoAOMT3_{N-29} zu beachten. Dies könnte eine Verschiebung der Positionsspezifität, wie im Fall der McPFOMT von der Methylierung am C5-Atom hin zum C6-Atom des Quercetagenins (Vogt, 2004), nach sich ziehen. Die

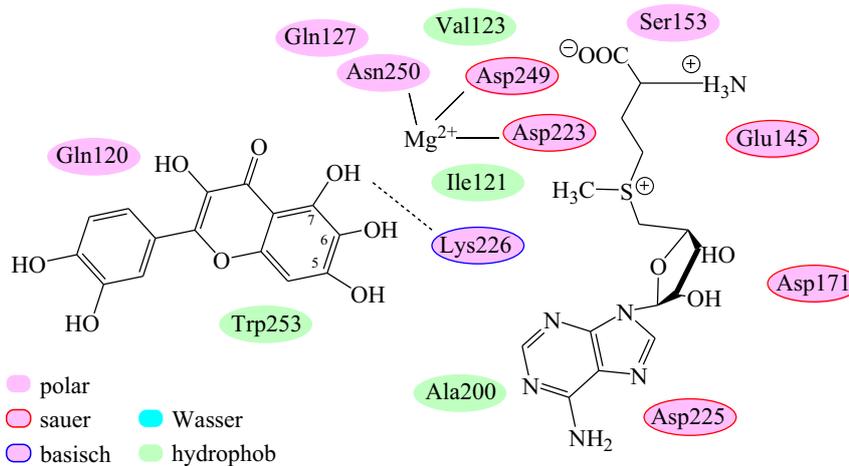


Abbildung 4.5: Wechselwirkung des Quercetagetin mit dem aktiven Zentrum der AtCCoAOMT3 (bearbeitet; D. Brauch, Projektarbeit). Die Darstellung bezieht sich auf die während der Bindung des Substrats und der Cosubstrate relevanten Aminosäuren, welche unterschiedliche Eigenschaften (durch Färbung angezeigt) aufweisen. Die durch eine gestrichelte Linie eingezeichnete Wechselwirkung ist eine Wasserstoffbrückenbindung. Die Nummerierung der Aminosäuren entspricht dem *Alignment* in Abbildung 3.19.

durch Enzymassays beobachtete Positionsspezifität konnte beim Vergleich mit den *in silico* Studien (Abbildung 4.5; Brauch (2011)) nicht eindeutig belegt werden. Das Lys226 interagiert mit der Hydroxygruppe am C7-Atom des Quercetagetins (Abbildung 4.5 und Abbildung 11 im Anhang). Doch ist nicht bekannt, ob die Interaktion für die Katalyse von Bedeutung ist. Weiterhin konnte nicht eindeutig geklärt werden, welche Hydroxygruppe näher an der Methylgruppe des AdoMet lokalisiert ist (Abbildung 4.5 und Abbildung 11 im Anhang). Dies wiederum wäre ebenfalls ein Hinweis für die Positionsspezifität gewesen. Für diese Bindungsstudie wurde allerdings aus Zeitgründen keine Energieeffizienzuntersuchung durchgeführt, womit die Aussagekraft dieser Analyse hinsichtlich der exakten Positionierung eingeschränkt ist (S. Brauch, persönliche Mitteilung) und die erhaltenen Daten der *in vitro* Analysen als aussagekräftiger einzustufen sind.

Sahr *et al.* (2010) beschrieben, dass die AtCCoAOMT3 *in vitro* ein N-terminales Peptid des Proteins AtPIP2;1 methyliert. AtPIP2;1 seinerseits ist ein Aquaporin, welches den Wassertransport in die Pflanze ermöglicht (Verdoucq *et al.*, 2008). Die Methylierung dieses Enzyms findet am Glu6 des Proteins bzw. des genutzten Peptides statt. Gesteigert wurde die Methylierungsrate, wenn das Lys3 zweifach methyliert vorlag (siehe Abbildung 4.6). Diese Reaktion wird durch die N-Methyltransferase AtSDG7 durchgeführt und wurde ebenfalls von Sahr *et al.* (2010) *in vitro* nachgewiesen. Interessanterweise verloren die von Sahr *et al.* (2010) verwendeten rekombinant exprimierten Proteine ihre Aktivität, sobald das am N-Terminus fusionierte Maltosebindungsprotein abgespalten wurde. Das Maltosebindungsprotein könnte somit für eine Konformationsänderung

verantwortlich sein, die es der AtCCoAOMT3 ermöglicht, die N-terminalen Peptide des AtPIP2;1 zu methylieren.

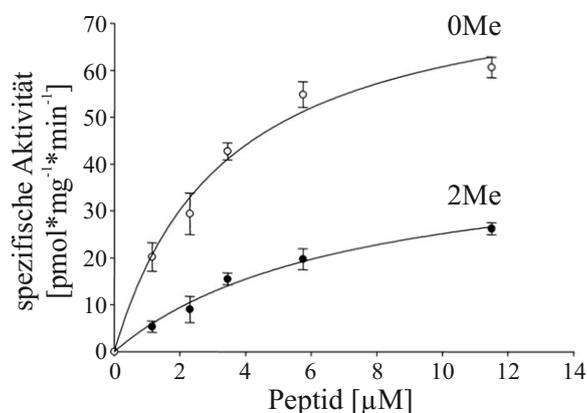


Abbildung 4.6: Kinetische Analyse der AtCCoAOMT3 mit Peptiden als Substrat (Sahr *et al.*, 2010). Die Konzentration der Substrate (nicht methyliertes Peptid (0Me) und am Lys3 doppelt methyliertes Peptid (2Me)) wurde bei konstant bleibender AdoMet-Konzentration variiert. Es ergaben sich die kinetischen Parameter $v_{max}(0Me) = 43 \pm 5 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $K_m(0Me) = 7,2 \pm 1,5 \text{ } \mu\text{M}$, $v_{max}(2Me) = 81 \pm 6 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und $K_m(2Me) = 3,4 \pm 0,7 \text{ } \mu\text{M}$.

Aber ist die Bindung des durch Sahr *et al.* (2010) identifizierten *in vitro* Substrates im aktiven Zentrum der AtCCoAOMT3 sterisch überhaupt möglich? Um dies zu klären, wurden von D. Brauch (Projektarbeit) weitere *in silico* Studien mit dem N-terminalen Tetrapeptid (Asp-Val-Glu-Ala) von AtPIP2;1 und den zugehörigen Cofaktoren durchgeführt (Abbildungen 4.7 und 12 im Anhang). Hier ergab sich für die Bindung des AdoMet und des Mg^{2+} der gleiche Mechanismus wie in der vorhergehenden Studie mit Quercetagenin. Die Unterschiede betrafen vorrangig den äußeren Teil der Substratbindetasche. Hierbei sind die Aminosäuren Arg110, Aminosäure 74 (in AtCCoAOMT3 Tyr), Gly297 und Asp298 bei der Stabilisierung des Tetrapeptides am äußeren Rand involviert. Die beiden Aminosäuren Arg110 und Asp298 gehen jeweils mit dem Asp bzw. dem Ala des Tetrapeptides eine Wasserstoffbrückenbindung ein. Für das von Sahr *et al.* (2010) beschriebene Peptid als Substrat konnte durch D. Brauch somit ein möglicher Bindungsmechanismus identifiziert werden. Aber auch hier muss auf die fehlende Energieeffizienzanalyse hingewiesen werden.

4.2.3 Anreicherung mittels CCMS

AdoHcy ist ein reversibler Inhibitor AdoMet-bindender Proteine (Borchardt, 1980; Deguchi & Barchas, 1971) und es sollte möglich sein zumindest korrekt gefaltetes bzw. aktives Protein dieser Art anzureichern (siehe auch Kapitel 4.1.2). Im Fall der AtCCoAOMT3 wurde dies mit der Anreicherung des aktiven, rekombinant hergestellten Proteins AtCCoAOMT3_{N-29} bestätigt

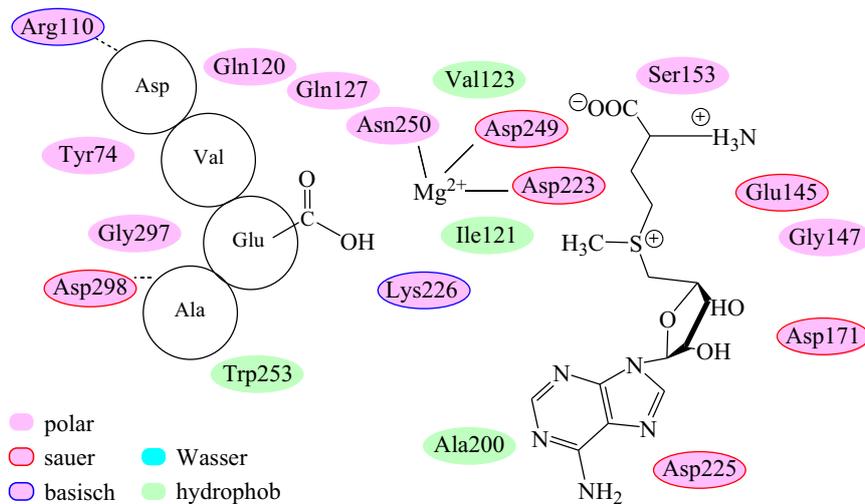


Abbildung 4.7: Wechselwirkung des Tetrapeptides mit dem aktiven Zentrum der AtCCoAOMT3 (bearbeitet nach Brauch (2011)). Die Darstellung bezieht sich auf die während der Bindung des Substrat und der Cosubstrate relevanten Aminosäuren, welche unterschiedliche Eigenschaften (durch Färbung angezeigt) aufweisen. Die durch gestrichelte Linien eingezeichneten Wechselwirkungen entsprechen Wasserstoffbrückenbindungen. Die Abbildung des Peptides (Asp-Val-Glu-Ala) ist stark vereinfacht durch die Nennung der relevanten Aminosäuren. Nur die Carboxylgruppe des Glu wurde hervorgehoben, da diese die zu methylierende Position angibt. Die Nummerierung der Aminosäuren entspricht dem *Alignment* in Abbildung 3.19.

(Kapitel 3.3.3). Aber warum ist es mit dieser Technik nicht möglich die native AtCCoAOMT3 reproduzierbar anzureichern?

Da ein Großteil der relevanten Probleme der Detektion membrangebundener, niedrig abundanter AdoMet-bindender Proteine bereits in Kapitel 4.1.3 eingehend diskutiert wurde, soll hier nur eine kurze Zusammenfassung in Bezug auf die AtCCoAOMT3 gegeben werden. In den Proteomstudien von Baerenfaller *et al.* (2008) wurden Extraktionen sowohl ohne als auch mit Detergenzien (SDS) durchgeführt. Die AtCCoAOMT3 war in beiden Fällen detektierbar. Somit wurde der Einfluss der ungenügenden Löslichkeit des Proteins während der Extraktion widerlegt, da in diesen Studien Extraktionspuffer verwendet wurden die in ihren Eigenschaften den hier eingesetzten gleichen. Allerdings können anhand der Analysen durch Baerenfaller *et al.* (2008) keine Aussagen über die Aktivität bzw. die korrekte Faltung getroffen werden. In den hier angefertigten Analysen mit Affinitäts-basierten Anreicherungstechniken war es nicht möglich, dass native Protein der AtCCoAOMT3 reproduzierbar nachzuweisen und somit liegt es im Rahmen der Möglichkeiten, dass dieses Protein in den hier untersuchten Proben inkorrekt gefaltet bzw. inaktiv vorlag. Allerdings ist dies nur eine Hypothese, da noch nicht eindeutig geklärt ist, ob die hier verwendete Technik nur aktives Enzym anreichert (diskutiert in Kapitel 4.1.2).

4.2.4 Putative *in vivo* Funktionen der AtCCoAOMT3

Zur weiteren Charakterisierung der AtCCoAOMT3 und deren *in vivo* Funktion wurde die Phänotypisierung einer T-DNA-Insertionslinie vorgenommen. Es war bekannt, dass das Transkript der AtCCoAOMT3 spezifisch in Wurzeln und Embryonen sowie seneszenten Blättern vorkommt (bezogen auf die in Kapitel 3.1.4 analysierten Organe und Genevestigator-Daten (Hruz *et al.*, 2008)). Weiterhin war durch frei zugängliche Transkriptdaten unter verschiedenen Stressbedingungen erfasst, dass sich das Transkriptlevel dieses Gens erhöht, sobald eine erhöhte Saccharosekonzentration vorliegt (Genevestigator-Daten Hruz *et al.* (2008)). Diese Fakten legten eine Untersuchung der Funktion des Proteins in der Wasser- und Nährstoffzufuhr nahe. Hierzu wurden homozygote Pflanzen einer T-DNA-Insertionslinie auf verschiedenen Medien zur Keimung gebracht. Es stellte sich heraus, dass die Saccharosekonzentration keinen Einfluss auf die Keimung ausübt. Allerdings wirkten erhöhte Salzgehalte des Mediums hemmend auf die Keimung der Samen. Im Vergleich der T-DNA-Insertionsmutante zum Wildtyp war die Hemmung durch erhöhte Salzkonzentrationen signifikant größer (Kapitel 3.3.5). Das bedeutet die T-DNA-Insertionslinie wird unter diesen Umständen effektiver gehemmt.

Dieser Phänotyp könnte in der fehlenden Methylierung des AtPIP2;1 begründet sein (Sahr *et al.*, 2010), da AtPIP2;1 der Enzymfamilie der Aquaporine angehört und in der Nährstoff- und Wasserversorgung der Pflanze eine Rolle spielt (Verdoucq *et al.*, 2008). Zudem ist die *in vivo* Methylierung dieses Proteins am Glu6 nachgewiesen (Santoni *et al.*, 2006). Es könnte somit ein indirekter Zusammenhang zwischen der Inaktivierung dieser CCoAOMT und der niedrigeren Salztoleranz der Mutanten bestehen. Da keine Methylierung des AtPIP2;1 am Glu6 des N-Terminus stattfindet, ist es möglich, dass dieses Protein inaktiv, inkorrekt gefaltet oder falsch lokalisiert vorliegt. Sorieul *et al.* (2011) wiesen nach, dass Glu6 als Bestandteil des Motivs Asp4-Val5-Glu6 mitverantwortlich für den Transport des AtPIP2;1 vom Endoplasmatischen Retikulum in die Plasmamembran ist. Somit könnte angenommen werden, dass die fehlende Methylierung eine fehlerhafte Lokalisierung initiiert. Weiterhin wurde durch Sahr *et al.* (2010) festgestellt, dass die *in vitro* Methylierung am Glu6 des AtPIP2;1-Peptides zunimmt sobald das Lys3 ebenfalls methyliert vorliegt, was durch die AtSDG7 katalysiert wird. Die Expressionsmuster der AtSDG7 und AtCCoAOMT3 überlappen zwar jeweils mit dem des AtPIP2;1, aber die AtCCoAOMT3 und die AtSDG7 sind in unterschiedlichen Geweben exprimiert, weshalb sich deren katalysierte Methylierungen gegenseitig nicht beeinflussen können. Somit weichen die *in vitro* und *in vivo* Resultate voneinander ab und es ist denkbar, dass die AtCCoAOMT3 *in vivo* eine völlig andere Funktion ausübt. Zudem war es bislang nur möglich OMTs aus Prokaryonten zu charakterisieren, die die Funktion der Glutamatmethylierung katalysieren (Li & Stock, 2009; Clarke, 1985; Springer *et al.*, 1979). In Pflanzen und Säugern konnte bislang keine solche OMT nachgewiesen werden.

Eine andere Erklärung dieser niedrigen Salztoleranz der T-DNA-Insertionslinie könnte eine Funktion der AtCCoAOMT3 in der Suberinbiosynthese in Wurzeln sein. Sowohl der Phänotyp der Mutanten als auch die spezifische Expression in Wurzeln unterstreichen diese Hypothese. Durch Gou *et al.* (2009) sowie Molina *et al.* (2009) wurde ein an der Suberinbiosynthese beteiligtes Enzym, die AtHHT bzw. ASFT, charakterisiert. Es handelt sich hierbei um eine Acyltransferase, welche *in vitro* die Substrate Feruloyl-CoA bzw. *p*-Kumaroyl-CoA bevorzugt (Gou *et al.*, 2009). Durch Deletionsmutanten konnte ein Einfluss auf die Zusammensetzung des aromatischen Anteils des Suberins nachgewiesen werden, da eine Reduktion des Suberinferulats zu verzeichnen war (Gou *et al.*, 2009; Molina *et al.*, 2009). Die Deletionsmutanten dieses Gens zeigten weiterhin einen mit der T-DNA-Insertionslinie der AtCCoAOMT3 vergleichbaren Phänotyp während der Keimung auf Medium mit erhöhten Salzgehalten (Kapitel 3.3.5; Gou *et al.* (2009)). Die durchgeführten *in vitro* Enzymassays der AtCCoAOMT3 sprechen allerdings gegen eine Funktion in exakt diesem Syntheseweg, da Caffeoyl-CoA bzw. Kaffeesäure durch die AtCCoAOMT3 kaum methyliert wurden (Kapitel 3.3.4) und direkten Vorgängern des Ferulats entsprechen.

Schlussfolgernd sind hier zwei mögliche *in vivo* Funktionen der AtCCoAOMT3 genannt. Zu beiden Hypothesen gibt es Resultate, die die jeweilige Funktion belegen. Aber es wurden auch Widersprüche erfasst. Somit kann diesbezüglich keine abschließende Bewertung erfolgen und weitere Experimente sind notwendig, um die Charakterisierung zu vervollständigen.

4.2.5 Fazit und weiterführende Arbeiten

Zusammenfassend konnte die Einordnung der AtCCoAOMT3 nach Raes *et al.* (2003) belegt, zwei *in vitro* Substrate (Quercetagein und AtPIP2;1 durch Sahr *et al.* (2010)) über Funktionalitätsnachweise und Bindungsstudien sowie ein Phänotyp (Keimungsinhibierung der T-DNA-Insertionslinie unter Salzstress) bestimmt werden. Weiterhin wurden zwei Hypothesen (Suberinbiosynthese oder Aquaporinmethylierung) der *in vivo* Funktion abgeleitet. Allerdings war es nicht möglich, das native Protein der AtCCoAOMT3 anzureichern. Dies könnte andeuten, dass es sich unter den mittels CCMS untersuchten Bedingungen um ein inaktives Protein handelt. Zudem ermöglichten Vergleiche der *in vitro* erhaltenen Resultate mit *in silico* Bindungsstudien von D. Brauch (Projektarbeit) erweiterte Aussagen zur Substrat- und Positionsspezifität, womit sich Ansätze für Experimente im Bezug auf die Klärung des Katalysemechanismus ergaben. Da in den bislang durchgeführten Studien des Proteins AtCCoAOMT3 größtenteils widersprüchliche Aussagen getroffen wurden, sind weitere Experimente zur endgültigen Charakterisierung dieses Enzyms durchzuführen. Vor allem die *in vivo* Funktion sollte dabei im Mittelpunkt stehen.

Ein wichtiger Aspekt anschließender Arbeiten sollte der Nachweis des nativen und aktiven Enzyms sein. Hierzu könnten zum Beispiel weiterentwickelte NC-Sonden verwendet werden, die eine gezielte

Anreicherung der CCoAOMTs ermöglichen sollten. In diesem Zusammenhang sollten auch andere Organe (gereifte Samen oder alternde Blätter) bzw. Entwicklungsstadien der Organe (jüngere Wurzeln) sowie unter Stressbedingungen (erhöhter Salzgehalt) angezogene Pflanzen eingesetzt werden. Denn es ist möglich, dass vor allem Stressbedingungen zur Expressionsinduktion bzw. Aktivierung des nativen Proteins beitragen könnten. In diesen Studien sollte zudem das Transkriptlevel der *Atccoamt3* beobachtet werden, da auch Veränderungen der Expression Aufschluss über eventuelle Parameter der Induktion ergeben können.

Der Phänotyp der gehemmten Keimung bei hohen Salzkonzentration könnte vielleicht nicht dem Gesamtbild entsprechen. Aus diesem Grund sollten weitere Experimente durchgeführt werden, die andere phänotypische Merkmale aufzeigen können. Beispielsweise wäre es möglich die Pflanzen anderen Stresssituationen auszusetzen oder die unter Salzstress erhaltenen Daten zu ergänzen, indem die weitere Entwicklung der Pflanzen nach der Keimung betrachtet wird. Weiterhin muss nachgewiesen werden, dass die integrierte T-DNA im Gen *Atccoamt3* tatsächlich für den beschriebenen Phänotyp verantwortlich ist. Hierzu sollten Rückkreuzungen erfolgen, um das Gen wieder in seiner ursprünglichen Form in die Pflanze zu integrieren. Anschließend muss hierbei der gleiche Phänotyp wie beim Wildtyp nachweisbar sein.

Da bislang kein *in vitro* Substrat identifiziert wurde, welches auch für eine *in vivo* Funktion in Frage kommt, könnten weitere Substanzen getestet werden. Dabei sollten polyhydroxylierte Substrate aufgrund der effizienten Methylierung von Quercetagetin einbezogen werden. Hierbei könnten auch Variationen im N-Terminus, des Motivs B (mit den anschließenden neun Aminosäuren) oder dem möglicherweise als katalytische Base dienenden Lys der AtCCoAOMT3 vorgenommen werden. Dies könnte weitere Aufschlüsse über die Substrat- und Positionsspezifität sowie den Katalysemechanismus geben. In Publikationen von Gou *et al.* (2009) und Molina *et al.* (2009) wurde Tetrazoliumchlorid (*tetrazolium red*) eingesetzt, welches Aufschluss über die Suberinzusammensetzung und -eigenschaften in der T-DNA-Insertionsmutante der AtCCoAOMT3 geben könnten. Metabolitenprofile könnten dies vervollständigen, indem eine veränderte Zusammensetzung des aromatischen Anteils des Suberins gezeigt würde. Allerdings sollten auch hier nicht genannte, völlig andere *in vivo* Funktionen berücksichtigt werden.

Weiterhin sollte nachgewiesen werden, ob es sich bei der Methylierung des Aquaporins AtPIP2;1 um eine *in vivo* Funktion handelt. Für den Fall, dass eine Bestätigung der durch Sahr *et al.* (2010) identifizierten *in vitro* Funktion mit dem hier hergestellten rekombinanten Protein AtCCoAOMT3_{N-29} möglich ist, wäre die Methylierung des AtPIP2;1 auch *in vivo* plausibel. Denn die Glutamatmethylierung wäre dann mit zwei unterschiedlich exprimierten, rekombinanten Proteinen der AtCCoAOMT3 belegt und es könnte ausgeschlossen werden, dass das Maltosebindungsprotein oder der verkürzte N-Terminus einen Einfluss auf die Aktivität haben. Dieser Sachverhalt ließe dieses CCoAOMT-ähnliche Enzym in ganz neuem Licht erscheinen.

5 Zusammenfassung

Durch die zunehmende Bedeutung der Proteomik, ist es mit dem heutigen Stand der Technik möglich, Verteilungsmuster von Enzymklassen und Subproteomen zu erstellen. Gegenwärtig zur Verfügung stehende Methoden nutzen dabei oft die Affinität speziell angefertigter Sonden zu deren Zielproteinen, um diese einer Anreicherung unterziehen zu können. Anschließend können identifizierte Proteine biochemischen Studien unterzogen werden, um deren Funktion im Detail zu klären. Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen hierbei pflanzliche *O*-Methyltransferasen, wobei das spezielle Interesse der Verteilung und Funktion der Caffeoyl-CoA *O*-Methyltransferasen galt. Während zwei dieser in *Arabidopsis thaliana* vertretenen Enzyme hinreichend charakterisiert sind, war die Funktion für weitere fünf Vertreter zu Beginn der Arbeit noch weitgehend unbekannt.

Die hier vorgestellte Arbeit widmete sich zwei Fragestellungen:

- 1) Gibt es Möglichkeiten, die genannten Enzymklassen in Pflanzen mit Affinitäts-basierten Techniken spezifisch anzureichern?
- 2) Ist es möglich, bei einzelnen, noch weitgehend unerforschten Vertretern mit proteinbiochemischen Methoden diese Aussagen zu unterlegen und funktionelle Aspekte zu klären?

Zur Beantwortung der ersten Fragestellung kamen zwei Technologien zum Einsatz. Zum Einen ermöglichte ein kommerziell erhältliches System, die *Capture Compound Mass Spectrometry* (CCMS), die erfolgreiche Anreicherung dreier *O*-Methyltransferasen aus Proteinrohextrakten verschiedener Organe von *Arabidopsis thaliana* und die Detektion anderer mit *S*-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet) bzw. *S*-Adenosyl-L-Homocystein (AdoHcy) interagierenden Proteine. Allerdings war es nicht möglich die Gesamtheit dieser Proteine zu erfassen. Im Fall der drei relativ abundanten *O*-Methyltransferasen AtOMT1, AtCCoAOMT1 und AtTSM1 konnten Übereinstimmungen der organ- und entwicklungspezifischen Verteilungen mit den in der Literatur beschriebenen Funktionen bestimmt werden. Beispielsweise war das Protein AtTSM1 mittels CCMS spezifisch in jungen Knospen, übereinstimmend mit den Transkriptdaten und der Funktion des Enzyms in der Hydroxymethylsäureamid-Biosynthese im Tapetum von *Arabidopsis thaliana*, nachweisbar. Zum Anderen konnten Nitrocatechol-Sonden (NC-Sonden) entwickelt und getestet werden. Diese basieren auf Inhibitoren der tierischen Catechol *O*-Methyltransferasen, welche den Caffeoyl-CoA *O*-Methyltransferasen ähneln. Die Entwicklung der NC-Sonden ist noch in ihren Anfängen. Aller-

dings konnte bereits eine tendenzielle Differenzierung zwischen kationenabhängigen Caffeoyl-CoA *O*-Methyltransferasen und kationenunabhängigen *O*-Methyltransferasen gezeigt werden. Aufgrund der erhaltenen Resultate war es weiterhin möglich, Defizite der Sonden und ihrer bisherigen Anwendung aufzudecken und Ansatzpunkte für Weiterentwicklungen zu schaffen.

Inwieweit Sonden bei der Anreicherung pflanzlicher Subproteome eine Rolle spielen können, hängt weitgehend von drei Faktoren ab: der Abundanz und Löslichkeit der anzureichernden Proteine, der Affinität der Sonden zu den Zielproteinen sowie den chemischen und physikalischen Parametern der Sonden. Eine Anwendung für andere Enzymklassen, wie beispielsweise den Zucker- oder Acyltransferasen, wäre mit geeigneten selektiven Einheiten ebenfalls möglich.

Neben dem Nachweis bereits bekannter Proteine wird auch die Detektion und nachfolgende Charakterisierung von Proteinen noch unbekannter Funktion innerhalb einer Gen- oder Proteinfamilie erleichtert. Ein Vertreter der Caffeoyl-CoA *O*-Methyltransferasen aus *Arabidopsis thaliana*, die AtCCoAOMT3, war mittels CCMS nur in Wurzeln erfassbar, was durch Transkriptdaten bestätigt werden konnte. Diese Organspezifität sollte durch biochemische Analysen ergänzt werden, wobei ein *in vitro* Substrat (das Flavonol Quercetagetin) und der Phänotyp einer T-DNA-Insertionsmutante (erhöhte Keimungsinhibierung unter Salzstress) identifiziert werden konnte. Durch Sahr *et al.* (2010) wurde gleichzeitig bekannt, dass dieses Enzym *in vitro* die Methylierung eines N-terminalen Peptides eines Aquaporins katalysiert. Diese Resultate ließen Mutmaßungen über eine Funktion in der Wasser- und Nährstoffzufuhr der Pflanze zu, welche durch die gezeigte Wurzelspezifität unterstützt wurde. Jedoch deuten Widersprüche in den Resultaten beider Arbeiten an, dass die Methylierung der *in vitro* Substrate *in vivo* fraglich ist. Deshalb sollten auch andere Möglichkeiten der Funktion der AtCCoAOMT3 im Wasser- und Nährstoffhaushalt der Pflanze in Betracht gezogen werden. Interessanterweise konnten die erhaltenen Hinweise der wurzelspezifischen Expression mittels CCMS nicht reproduziert werden. Hier stößt diese Methode an ihre Grenzen. Da es sich bei den angewendeten *Capture Compounds* wahrscheinlich um Sonden handelt, die aktives bzw. korrekt gefaltetes Protein anreichern, könnte eine Begründung die Inaktivität der AtCCoAOMT3 unter den hier gewählten Bedingungen sein. Andererseits ist es auch denkbar, dass eine geringe Abundanz des Proteins und die Bindung an eine Membran problematisch waren.

Abschließend war es anhand dieser Anreicherungstechniken möglich, spezielle Verteilungsmuster von Proteinen zu zeigen und diese mit biochemischen Analysen zu ergänzen. Letztendlich sollte es in Zukunft mit Hilfe vermehrter interdisziplinärer Zusammenarbeit sowie innovativer Technologien möglich sein das Proteom vollständig zu charakterisieren und somit die Brücke vom Genom zum Metabolom zu schlagen.

Literaturverzeichnis

- Adam, Gregory C.; Sorensen, Erik J. & Cravatt, Benjamin F. (2002). Chemical Strategies for Functional Proteomics. *Mol Cell Proteomics*, **1**(10), 781–790.
- Aharoni, Asaph & Galili, Gad (2011). Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. *Curr Opin Biotechnol*, **22**(2), 239–244.
- Ahn, Natalie G.; Shabb, John B.; Old, William M. & Resing, Katheryn A. (2007). Achieving In-Depth Proteomics Profiling by Mass Spectrometry. *ACS Chem Biol*, **2**(1), 39–52.
- Alonso, José M.; Stepanova, Anna N.; Leisse, Thomas J.; Kim, Christopher J.; Chen, Huaming; Shinn, Paul; Stevenson, Denise K.; Zimmerman, Justin; Barajas, Pascual; Cheuk, Rosa; Gadrinab, Carmelita & Heller, Collen *et al.* (2003). Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**(5633), 653–657 (<http://signal.salk.edu/>).
- Arabidopsis Biological Resource Center (12. April 2008). The Arabidopsis Information Resource (TAIR). online Stand: 02.02.2012. ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/Sequences/blast_datasets/TAIR8_blastsets/TAIR8_pep_20080412.
- Arabidopsis Biological Resource Center (18. November 2010). The Arabidopsis Information Resource (TAIR). online Stand: 02.02.2012. ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/Proteins/Properties/Membrane_Proteins.tai10.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**, 796–815.
- Baerenfaller, Katja; Grossmann, Jonas; Grobei, Monica A.; Hull, Roger; Hirsch-Hoffmann, Matthias; Yalovsky, Shaul; Zimmermann, Philip; Grossniklaus, Ueli; Gruissem, Wilhelm & Baginsky, Sacha (2008). Genome-Scale Proteomics Reveals *Arabidopsis thaliana* Gene Models and Proteome Dynamics. *Science*, **320**(5878), 938–941.
- Baginsky, Sacha (2009). Plant proteomics: Concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. *Mass Spectrom Rev*, **28**(1), 93–120.
- Beligni, María V. & Mayfield, Stephen P. (2008). *Arabidopsis thaliana* mutants reveal a role for

- CSP41a and CSP41b, two ribosome-associated endonucleases, in chloroplast ribosomal RNA metabolism. *Plant Mol Biol*, **67**, 389–401.
- Benson, Dennis A.; Karsch-Mizrachi, Ilene; Lipman, David J.; Ostell, James & Sayers, Eric W. (2011). GenBank. *Nucleic Acids Res*, **39**(Datenbankausgabe), D32–D37.
- Berman, Helen M.; Westbrook, John; Feng, Zukang; Gilliland, Gary; Bhat, T. N.; Weissig, Helge; Shindyalov, Ilya N. & Bourne, Philip E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, **28**(1), 235–242 (www.pdb.org).
- Bertani, Giuseppe (1951). Studies on Lysogenesis - The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **62**(3), 293–300.
- Bertani, Giuseppe (2004). Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems. *J Bacteriol*, **186**(3), 595–600.
- Bindschedler, Laurence V. & Cramer, Rainer (2011). Quantitative plant proteomics. *Proteomics*, **11**(4), 756–775.
- Blum, Helmut; Beier, Hildburg & Gross, Hans J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93–99.
- Bonifácio, Maria J.; Archer, Margarida; Rodrigues, Maria L.; Matias, Pedro M.; Learmonth, David A.; Carrondo, Maria Arménia & Soares-da Silva, Patrício (2002). Kinetics and Crystal Structure of Catechol-*O*-Methyltransferase Complex with Co-Substrate and a Novel Inhibitor with Potential Therapeutic Application. *Mol Pharmacol*, **62**(4), 795–805.
- Borchardt, Ronald T. (1980). *S*-Adenosyl-L-methionine-Dependent Macromolecule Methyltransferases: Potential Targets for the Design of Chemotherapeutic Agents. *J Med Chem*, **23**(4), 347–357.
- Bourgis, Fabienne; Roje, Sanja; Nuccio, Michael L.; Fisher, Donald B.; Tarczynski, Mitchell C.; Li, Changjiang; Herschbach, Cornelia; Rennenberg, Heinz; Pimenta, Maria Joao; Shen, Tun-Li; Gage, Douglas A. & Hanson, Andrew D. (1999). *S*-Methylmethionine Plays a Major Role in Phloem Sulfur Transport and Is Synthesized by a Novel Type of Methyltransferase. *Plant Cell*, **11**(8), 1485–1498.
- Bracha-Drori, Keren; Shichrur, Keren; Lubetzky, Tsofnat Cohen & Yalovsky, Shaul (2008). Functional Analysis of Arabidopsis Postprenylation CaaX Processing Enzymes and Their Function in Subcellular Protein Targeting. *Plant Physiol*, **148**(1), 119–131.
- Bradford, Marion M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem*, **72**, 248–254.

- Brauch, Dominic (2011). *Partielle Charakterisierung des löslichen Teils einer Methyltransferase codiert durch das Arabidopsis-Gen At3g61990*. Protokoll zum Forschungsgruppenpraktikum, Martin Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Bürckstümmer, Tilmann; Bennett, Keiryn L; Preradovic, Adrijana; Schütze, Gregor; Hantschel, Oliver; Superti-Furga, Giulio & Bauch, Angela (2006). An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nat Methods*, **3**(12), 1013–1019.
- caprotecTM bioanalytics GmbH (2010). “OnBead” Protocol for Capturing via caproBeadsTM. online Stand: 02.02.2012. http://www.caprotec.com/fileadmin/dateien/pdf/cpt_SAH_caproKit_Guideline_OnBead.pdf.
- caprotecTM bioanalytics GmbH (2011). SAH caproKitTM. online Stand: 02.02.2012. http://www.caprotec.com/fileadmin/dateien/pdf/SAH_Specification_Sheet.pdf.
- Castellana, Natalie E.; Payne, Samuel H.; Shen, Zhouxin; Stanke, Mario; Bafna, Vineet & Briggs, Steven P. (2008). Discovery and revision of *Arabidopsis* genes by proteogenomics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**(52), 21034–21038.
- Cellar, Nicholas A.; Kuppannan, Krishnamoorthy; Langhorst, Marsha L.; Ni, Weiting; Xu, Ping & Young, Scott A. (2008). Cross species applicability of abundant protein depletion columns for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **861**(1), 29–39.
- Chan, Elaine W. S.; Chattopadhyaya, Souvik; Panicker, Resmi C.; Huang, Xuan & Yao, Shao Q. (2004). Developing Photoactive Affinity Probes for Proteomic Profiling: Hydroxamate-based Probes for Metalloproteases. *J Am Chem Soc*, **126**(44), 14435–14446.
- Chary, S. Narasimha; Bultema, Rebecca L.; Packard, Clay E. & Crowell, Dring N. (2002). Prenyl-cysteine α -carboxyl methyltransferase expression and function in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **32**(5), 735–747.
- Chattopadhyaya, Souvik; Chan, Elaine W.S. & Yao, Shao Q. (2005). An affinity-based probe for the proteomic profiling of aspartic proteases. *Tetrahedron Lett*, **46**(23), 4053–4056.
- Chen, Emily I.; Hewel, Johannes; Felding-Habermann, Brunhilde & Yates, John R. (2006). Large Scale Protein Profiling by Combination of Protein Fractionation and Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT). *Mol Cell Proteomics*, **5**(1), 53–56.
- Chen, Feng; D’Auria, John C.; Tholl, Dorothea; Ross, Jeannine R.; Gershenzon, Jonathan; Noel, Joseph P. & Pichersky, Eran (2003). An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. *Plant J*, **36**(5), 577–588.

- Chiang, Peter K. (1998). Biological Effects of Inhibitors of *S*-Adenosylhomocysteine Hydrolase. *Pharmacol Ther*, **77**(2), 115–134.
- Clarke, Steven (1985). Protein Carboxyl Methyltransferases: Two Distinct Classes of Enzymes. *Annu Rev Biochem*, **54**(1), 479–506.
- Cravatt, Benjamin F.; Wright, Aaron T. & Kozarich, John W. (2008). Activity-Based Protein Profiling: From Enzyme Chemistry to Proteomic Chemistry. *Annu Rev Biochem*, **77**(1), 383–414.
- Crowell, Dring N. & Kennedy, Matthew (2001). Identification and functional expression in yeast of a prenylcysteine α -carboxyl methyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, **45**, 469–476.
- Cserző, Miklos; Wallin, Erik; Simon, Istvan; von Heijne, Gunnar & Elofsson, Arne (1997). Prediction of transmembrane α -helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng*, **10**(6), 673–676.
- Dalhoff, Christian; Hüben, Michael; Lenz, Thomas; Poot, Peter; Nordhoff, Eckhard; Köster, Hubert & Weinhold, Elmar (2010). Synthesis of *S*-Adenosyl-L-homocysteine Capture Compounds for Selective Photoinduced Isolation of Methyltransferases. *ChemBioChem*, **11**(2), 256–265.
- D’Auria, John C.; Chen, Feng & Pichersky, Eran (2003). The SABATH family of MTs in *Arabidopsis thaliana* and other plant species. In Romeo John T. (Ed.): *Integrative Phytochemistry: from Ethnobotany to Molecular Ecology* Band **37** aus *Recent Advances in Phytochemistry* Kapitel 11, (S. 253 – 283). Elsevier, Amstaerdam.
- Deguchi, Takeo & Barchas, Jack (1971). Inhibition of Transmethylations of Biogenic Amines by *S*-Adenosylhomocysteine. *J Biol Chem*, **246**(10), 3175–3181.
- Dülsner, Erik (2009). CCMS technology enables improved proteomic analysis through functional isolation of sub-proteomes. *Nat Methods*, **5**(12).
- Do, Cao-Trung; Pollet, Brigitte; Thévenin, Johanne; Sibout, Richard; Denoue, Dominique; Barrière, Yves; Lapierre, Catherine & Jouanin, Lise (2007). Both caffeoyl Coenzyme A 3-*O*-methyltransferase 1 and caffeic acid *O*-methyltransferase 1 are involved in redundant functions for lignin, flavonoids and sinapoyl malate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Planta*, **226**, 1117–1129.
- Domon, Bruno & Aebersold, Ruedi H. (2006). Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science*, **312**(5771), 212–217.
- Dormán, György & Prestwich, Glenn D. (1994). Benzophenone Photophores in Biochemistry. *Biochemistry*, **33**(19), 5661–5673.

- Ellermann, Manuel; Paulini, Ralph; Jakob-Roetne, Roland; Lerner, Christian; Borroni, Edilio; Roth, Doris; Ehler, Andreas; Schweizer, W. Bernd; Schlatter, Daniel; Rudolph, Markus G. & Diederich, Francois (2011). Molecular Recognition at the Active Site of Catechol-*O*-methyltransferase (COMT): Adenine Replacements in Bisubstrate Inhibitors. *Chemistry*, **17**(23), 6369–6381.
- Eubel, Holger; Meyer, Etienne H.; Taylor, Nicolas L.; Bussell, John D.; O'Toole, Nicholas; Heazlewood, Joshua L.; Castleden, Ian; Small, Ian D.; Smith, Steven M. & Millar, A. Harvey (2008). Novel Proteins, Putative Membrane Transporters, and an Integrated Metabolic Network Are Revealed by Quantitative Proteomic Analysis of Arabidopsis Cell Culture Peroxisomes. *Plant Physiol*, **148**(4), 1809–1829.
- Evans, Michael J. & Cravatt, Benjamin F. (2006). Mechanism-Based Profiling of Enzyme Families. *Chem Rev*, **106**(8), 3279–3301.
- Fellenberg, Christin; Böttcher, Christoph & Vogt, Thomas (2009). Phenylpropanoid polyamine conjugate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* flower buds. *Phytochemistry*, **70**(11-12), 1392–1400.
- Fellenberg, Christin; Milkowski, Carsten; Hause, Bettina; Lange, Peter-Robert; Böttcher, Christoph; Schmidt, Jürgen & Vogt, Thomas (2008). Tapetum-specific location of a cation-dependent *O*-methyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **56**(1), 132–145.
- Fellenberg, Christin; van Ohlen, Maike; Handrick, Vinzenz & Vogt, Thomas (2012). The role of CCoAOMT1 and COMT1 in *Arabidopsis* anthers. *Planta*, **Im Druck** (10.1007/s00425-011-1586-6).
- Ferrer, Jean-Luc; Zubieta, Chloe; Dixon, Richard A. & Noel, Joseph P. (2005). Crystal Structures of Alfalfa Caffeoyle Coenzyme A 3-*O*-Methyltransferase. *Plant Physiol*, **137**(3), 1009–1017.
- Ferro, Myriam; Brugière, Sabine; Salvi, Daniel; Seigneurin-Berny, Daphné; Court, Magali; Moyet, Lucas; Ramus, Claire; Miras, Stéphane; Mellal, Mourad; Le Gall, Sophie; Kieffer-Jaquinod, Sylvie; Bruley, Christophe; Garin, Jérôme; Joyard, Jacques; Masselon, Christophe & Rolland, Norbert (2010). AT_CHLORO, a Comprehensive Chloroplast Proteome Database with Subplastidial Localization and Curated Information on Envelope Proteins. *Mol Cell Proteomics*, **9**(6), 1063–1084.
- Fischer, Jenny J.; Dalhoff, Christian; Schrey, Anna K.; Graebner neé Baessler, Olivia Y.; Michaelis, Simon; Andrich, Kathrin; Glinski, Mirko; Kroll, Friedrich; Sefkow, Michael; Dreger, Mathias & Koester, Hubert (2011a). Dasatinib, imatinib and staurosporine capture compounds - Comple-

- mentary tools for the profiling of kinases by Capture Compound Mass Spectrometry (CCMS). *J Proteomics*, **75**(1), 160–168.
- Fischer, Jenny J.; Graebner neé Baessler, Olivia Y.; Dalhoff, Christian; Michaelis, Simon; Schrey, Anna K.; Ungewiss, Jan; Andrich, Kathrin; Jeske, Danny; Kroll, Friedrich; Glinski, Mirko; Sefkow, Michael; Dreger, Mathias & Koester, Hubert (2010a). Comprehensive Identification of Staurosporine-Binding Kinases in the Hepatocyte Cell Line HepG2 using Capture Compound Mass Spectrometry (CCMS). *J Proteome Res*, **9**(2), 806–817.
- Fischer, Jenny J.; Graebner neé Baessler, Olivia Y.; Dreger, Mathias; Glinski, Mirko; Baumgart, Sabine & Koester, Hubert (2011b). Improvement of Capture Compound Mass Spectrometry Technology (CCMS) for the Profiling of Human Kinases by Combination with 2D LC-MS/MS. *J Biomed Biotechnol*, **2011**(ID 850589), 5 Seiten.
- Fischer, Jenny J.; Michaelis, Simon; Schrey, Anna K.; Diehl, Anne; Graebner neé Baessler, Olivia Y.; Ungewiss, Jan; Horzowski, Sabine; Glinski, Mirko; Kroll, Friedrich; Dreger, Mathias & Koester, Hubert (2011c). SAHA Capture Compound - A novel tool for the profiling of histone deacetylases and the identification of additional vorinostat binders. *Proteomics*, **11**(20), 4096–4104.
- Fischer, Jenny J.; Michaelis, Simon; Schrey, Anna K.; Graebner neé Baessler, Olivia Y.; Glinski, Mirko; Dreger, Mathias; Kroll, Friedrich & Koester, Hubert (2010b). Capture Compound Mass Spectrometry Sheds Light on the Molecular Mechanisms of Liver Toxicity of Two Parkinson Drugs. *Toxicol Sci*, **113**(1), 243–253.
- Fontecave, Marc; Atta, Mohamed & Mulliez, Etienne (2004). *S*-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem Sci*, **29**(5), 243–249.
- Gharahdaghi, Farzin; Weinberg, Catherine R.; Meagher, Denise A.; Imai, Brian S. & Mische, Sheenah M. (1999). Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis*, **20**(3), 601–605.
- Goff, Stephen A.; Ricke, Darrell; Lan, Tien-Hung; Presting, Gernot; Wang, Ronglin; Dunn, Molly; Glazebrook, Jane; Sessions, Allen; Oeller, Paul; Varma, Hemant; Hadley, David & Hutchison, Don *et al.* (2002). A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science*, **296**(5565), 92–100.
- Gou, Jin-Ying; Yu, Xiao-Hong & Liu, Chang-Jun (2009). A hydroxycinnamoyltransferase responsible for synthesizing suberin aromatics in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**(44), 18855–18860.

- Grienenberger, Etienne; Besseau, Sébastien; Geoffroy, Pierrette; Debayle, Delphine; Heintz, Dimitri; Lapierre, Catherine; Pollet, Brigitte; Heitz, Thierry & Legrand, Michel (2009). A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of Arabidopsis anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. *Plant J*, **58**(2), 246–259.
- Gu, Christian; Kolodziejek, Izabella; Misas-Villamil, Johana; Shindo, Takayuki; Colby, Tom; Verdoes, Martijn; Richau, Kerstin H.; Schmidt, Jürgen; Overkleeft, Hermen S. & Van Der Hoorn, Renier A. L. (2010). Proteasome activity profiling: a simple, robust and versatile method revealing subunit-selective inhibitors and cytoplasmic, defense-induced proteasome activities. *Plant J*, **62**(1), 160–170.
- Hack, Catherine J. (2004). Integrated transcriptome and proteome data: The challenges ahead. *Brief Funct Genomic Proteomic*, **3**(3), 212–219.
- Hagenstein, Miriam C.; Mussgnug, Jan H.; Lotte, Kirsten; Plessow, Regina; Brockhinke, Andreas; Kruse, Olaf & Sewald, Norbert (2003). Affinity-Based Tagging of Protein Families with Reversible Inhibitors: A Concept for Functional Proteomics. *Angew Chem Int Ed Engl*, **42**(45), 5635–5638.
- Hartmann, Thomas (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, **68**(22-24), 2831–2846.
- Heal, William P.; Dang, T. H. Tam & Tate, Edward W. (2011). Activity-based probes: discovering new biology and new drug targets. *Chem Soc Rev*, **40**(1), 246–257.
- Heazlewood, Joshua L. (2011). The Green proteome: challenges in plant proteomics. *Front Plant Sci*, **2**, 1–3.
- Heazlewood, Joshua L. & Millar, A. Harvey (2007). Plant Proteomics: Challenges and Resources. In Finnie Christine (Ed.): *Annual Plant Reviews* Band **28** aus *Plant Proteomics* Kapitel 1, (S. 1–31). Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
- Hirano, Hisashi; Islam, Nazrul & Kawasaki, Hiroshi (2004). Technical aspects of functional proteomics in plants. *Phytochemistry*, **65**(11), 1487–1498.
- Hirokawa, Tatakisugu; Boon-Chieng, Seah & Mitaku, Shigeki (1998). SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics*, **14**(4), 378–379.
- Hjelmeland, Leonard M. (1990). Solubilization of native membrane proteins. In Deutscher Murray (Ed.): *Guide to Protein Purification* Band **182** aus *Methods in Enzymology* Kapitel 19, (S. 253–264). Academic Press Inc., New York.
- Hoelz, Derek J.; Arnold, Randy J.; Dobrolecki, Lacey E.; Abdel-Aziz, Waleed; Loehrer, Andrew P.;

- Novotny, Milos V.; Schnaper, Lauren; Hickey, Robert J. & Malkas, Linda H. (2006). The discovery of labile methyl esters on proliferating cell nuclear antigen by MS/MS. *Proteomics*, **6**(17), 4808–4816.
- Hofmann, Kay & Stoffel, W. (1993). TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyle*, **374**, 166 (nur Abstract).
- Hruz, Tomas; Laule, Oliver; Szabo, Gabor; Wessendrop, Frans; Bleuler, Stefan; Oertle, Lukas; Widmayer, Peter; Gruissem, Wilhelm & Phillip, Zimmermann (2008). Genevestigator V3: A Reference Expression Database for the Meta-Analysis of Transcriptomes. *Adv Bioinformatics*, **2008**(ID 420747), 5 Seiten.
- Huang, Shaobai; Taylor, Nicolas L.; Narsai, Reena; Eubel, Holger; Whelan, James & Millar, A. Harvey (2009). Experimental Analysis of the Rice Mitochondrial Proteome, Its Biogenesis, and Heterogeneity. *Plant Physiol*, **149**(2), 719–734.
- Huizinga, David H.; Omosogbon, Olutope; Omery, Bilal & Crowell, Dring N. (2008). Isoprenylcysteine Methylation and Demethylation Regulate Abscisic Acid Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **20**(10), 2714–2728.
- Humphreys, John M. & Chapple, Clint (2002). Rewriting the lignin roadmap. *Curr Opin Plant Biol*, **5**(3), 224–229.
- Hynek, Radovan; Svensson, Birte; Jensen, Ole N.; Barkholt, Vibeke & Finnie, Christine (2009). The plasma membrane proteome of germinating barley embryos. *Proteomics*, **9**(14), 3787–3794.
- Ibdah, Mwafaq; Zhang, Xing-Hai; Schmidt, Jürgen & Vogt, Thomas (2003). A Novel Mg²⁺-dependent O-Methyltransferase in the Phenylpropanoid Metabolism of *Mesembryanthemum crystallinum*. *J Biol Chem*, **278**(45), 43961–43972.
- Ibrahim, Ragai K. & Muzac, Ingrid (2000). The methyltransferase gene superfamily: A tree with multiple branches. In Romeo John T., Ibrahim Ragal, Varin Luc, & De Luca Vincenzo (Eds.): *Evolution of Metabolic Pathways* Band **34** aus *Recent Advances in Phytochemistry* Kapitel 11, (S. 349–384). Pergamon, New York.
- Isaacson, Tal; Damasceno, Cynthia M. B.; Saravanan, Ramu S.; He, Yonghua; Catalá, Carmen; Saladié, Montserrat & Rose, Jocelyn K. C. (2006). Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nat Protoc*, **1**(2), 769–774.
- Ivanov, A.; Zgoda, V. & Archakov, A. (2011). Technologies of protein interactomics: A review. *Russ. J. Bioorganic Chem.*, **37**, 4–16.
- Jain, Eric; Bairoch, Amos; Duvaud, Severine; Phan, Isabelle; Redaschi, Nicole; Suzek, Baris; Mar-

- tin, Maria; McGarvey, Peter & Gasteiger, Elisabeth (2009). Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. *BMC Bioinformatics*, **10**, 136.
- Jensen, Ole N.; Wilm, Matthias; Shevchenko, Andrej & Mann, Matthias (1998). Sample Preparation Methods for Mass Spectrometric Peptide Mapping Directly from 2-DE Gels. In Link Andrew J. (Ed.): *2-D Proteome Analysis Protocols* Band**112** aus *Methods in Molecular Biology* Kapitel 52, (S. 513–530). Humana Press Inc., New York.
- Jessani, Nadim; Humphrey, Mark; McDonald, W. Hayes; Niessen, Sherry; Masuda, Kim; Gangadharan, Beena; Yates, John R.; Mueller, Barbara M. & Cravatt, Benjamin F. (2004). Carcinoma and stromal enzyme activity profiles associated with breast tumor growth *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(38), 13756–13761.
- Jorrín, Jesús V.; Maldonado, Ana M. & Castillejo, Mari A. (2007). Plant proteome analysis: A 2006 update. *Proteomics*, **7**(16), 2947–2962.
- Jorrín-Novo, Jesús V.; Maldonado, Ana M.; Echevarría-Zomeño, Sira; Valledor, Luis; Castillejo, Mari A.; Curto, Miguel; Valero, José; Sghaier, Besma; Donoso, Gabriel & Redonda, Inmaculada (2009). Plant proteomics update (2007-2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. *J Proteomics*, **72**(3), 285–314 (Plant Proteomics).
- Joshi, Chandrashekhar P. & Chiang, Vincent L. (1998). Conserved sequence motifs in plant *S*-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases. *Plant Mol Biol*, **37**, 663–674.
- Kaake, Robyn M.; Wang, Xiaorong & Huang, Lan (2010). Profiling of Protein Interaction Networks of Protein Complexes Using Affinity Purification and Quantitative Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, **9**(8), 1650–1665.
- Kai, Kosuke; Mizutani, Masaharu; Kawamura, Naohiro; Yamamoto, Ryotaro; Tamai, Michiko; Yamaguchi, Hikaru; Sakata, Kanzo & Shimizu, Bun-ichi (2008). Scopoletin is biosynthesized via *ortho*-hydroxylation of feruloyl CoA by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **55**(6), 989–999.
- Kalesh, Karunakaran A.; Shi, Haibin; Ge, Jingyan & Yao, Shao Q. (2010). The use of click chemistry in the emerging field of catalomics. *Org Biomol Chem*, **8**(8), 1749–1762.
- Kaschani, Farnusch; Gu, Christian; Niessen, Sherry; Hoover, Heather; Cravatt, Benjamin F. & van der Hoorn, Renier A. L. (2009a). Diversity of Serine Hydrolase Activities of Unchallenged and *Botrytis*-infected *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Proteomics*, **8**(5), 1082–1093.
- Kaschani, Farnusch; Verhelst, Steven H. L.; Van Swieten, Paul F.; Verdoes, Martijn; Wong,

- Chung-Sing; Wang, Zheming; Kaiser, Markus; Overkleeft, Herman S.; Bogyo, Matthew & Van Der Hoorn, Renier A. L. (2009b). Minitags for small molecules: detecting targets of reactive small molecules in living plant tissues using 'click chemistry'. *Plant J*, **57**(2), 373–385.
- Kato, Misako; Mizuno, Kouichi; Fujimura, Tatsuhito; Iwama, Masanori; Irie, Masachika; Crozier, Alan & Ashihara, Hiroshi (1999). Purification and Characterization of Caffeine Synthase from Tea Leaves. *Plant Physiol*, **120**(2), 579–586.
- Köcher, Thomas & Superti-Furga, Giulio (2007). Mass spectrometry-based functional proteomics: from molecular machines to protein networks. *Nat Methods*, **4**(10), 807–815.
- Kleffmann, Torsten; Russenberger, Doris; von Zychlinski, Anne; Christopher, Wayne; Sjölander, Kimmen; Gruissem, Wilhelm & Baginsky, Sacha (2004). The *Arabidopsis thaliana* Chloroplast Proteome Reveals Pathway Abundance and Novel Protein Functions. *Curr Biol*, **14**(5), 354–362.
- Kolb, Hartmuth C.; Finn, M. G. & Sharpless, K. Barry (2001). Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed Engl*, **40**(11), 2004–2021.
- Kolb, Hartmuth C. & Sharpless, K. Barry (2003). The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov Today*, **8**(24), 1128–1137.
- Kolodziejek, Izabella & van der Hoorn, Renier A. L. (2010). Mining the active proteome in plant science and biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, **21**(2), 225–233.
- Kopycki, Jakub G.; Rauh, Daniel; Chumanevich, Alexander A.; Neumann, Piotr; Vogt, Thomas & Stubbs, Milton T. (2008). Biochemical and Structural Analysis of Substrate Promiscuity in Plant Mg²⁺-Dependent O-Methyltransferases. *J Mol Biol*, **378**(1), 154–164.
- Kota, Parvathi; Guo, Dianjing; Zubieta, Chloe; Noel, Joe & Dixon, Richard A. (2004). O-Methylation of benzaldehyde derivatives by "lignin specific" caffeic acid 3-O-methyltransferase. *Phytochemistry*, **65**(7), 837–846.
- Kozbial, Piotr & Mushegian, Arcady (2005). Natural history of S-adenosylmethionine-binding proteins. *BMC Struct Biol*, **5**(1), 19.
- Köster, Hubert; Little, Daniel P.; Luan, Peng; Muller, Rolf; Siddiqi, Suhaib M.; Marappan, Subramanian & Yip, Ping (2007). Capture Compound Mass Spectrometry: A Technology for the Investigation of Small Molecule Protein Interactions. *Assay Drug Dev Technol*, **5**(3), 381–390.
- Kwon, Hawk-Bin; Park, Soo-Chu; Peng, Hsiao-Ping; Goodman, Howard M.; Dewdney, Julia & Shih, Ming-Che (1994). Identification of a Light-Responsive Region of the Nuclear Gene Encoding the B Subunit of Chloroplast Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, **105**(1), 357–367.

- Laemmli, Ulrich K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, **227**(5259), 680–685.
- Lam, Kevin C.; Ibrahim, Ragai K.; Behdad, Bahareh & Dayanandan, Selvadurai (2007). Structure, function, and evolution of plant *O*-methyltransferases. *Genome*, **50**(11), 1001–1013.
- Learmonth, DA; Kiss, LE & Soares-da Silva, P. (2010). The chemistry of catechol-*O*-methyltransferase inhibitors. In Nissinen Erkki (Ed.): *Basic Aspects of Catechol-O-Methyltransferase and the clinical applications of its inhibitors* Band **95** aus *International Review of Neurobiology* (S. 119–162). Academic Press Inc., New York.
- Lee, Seungmook; Kwon, Min-Seok; Lee, Hyoung-Joo; Paik, Young-Ki; Tang, Haixu; Lee, Jae & Park, Taesung (2011). Enhanced peptide quantification using spectral count clustering and cluster abundance. *BMC Bioinformatics*, **12**, 423.
- Lehmann, Ute; Wienkoop, Stefanie; Tschöep, Hendrik & Weckwerth, Wolfram (2008). If the antibody fails - a mass Western approach. *Plant J*, **55**(6), 1039–1046.
- Lenz, Thomas; Fischer, Jenny J. & Dreger, Mathias (2011). Probing small molecule-protein interactions: A new perspective for functional proteomics. *J Proteomics*, **75**(1), 100–115.
- Li, Laigeng; Popko, Jacqueline L.; Zhang, Xing-Hai; Osakabe, Keishi; Tsai, Chung-Jui; Joshi, Chandrashekar P. & Chiang, Vincent L. (1997). A novel multifunctional *O*-methyltransferase implicated in a dual methylation pathway associated with lignin biosynthesis in loblolly pine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(10), 5461–5466.
- Li, Yong; Rosso, Mario G.; Viehöver, Prisca & Weisshaar, Bernd (2007). GABI-Kat SimpleSearch: an *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database with detailed information for confirmed insertions. *Nucleic Acids Res*, **35**(Datenbankausgabe), D874–D878.
- Li, Zhu & Stock, Jeffrey B. (2009). Protein carboxyl methylation and the biochemistry of memory. *Biol Chem*, **390**(11), 1087–1096.
- Lin, Sue-Hwa & Guidotti, Guido (2009). Purification of membrane proteins. In Burgess Richard R. & Deutscher Murray P. (Eds.): *Guide to Protein Purification* Band **463** aus *Methods in Enzymology* Kapitel 35, (S. 619–629). Academic Press Inc., New York.
- Liu, Li-Hong & Yan, Mingdi (2010). Perfluorophenyl Azides: New Applications in Surface Functionalization and Nanomaterial Synthesis. *Acc Chem Res*, **43**(11), 1434–1443.
- Lotta, Timo; Vidgren, Jukka; Tilgmann, Carola; Ulmanen, Ismo; Melen, Krister; Julkunen, Ilkka & Taskinen, Jyrki (1995). Kinetics of Human Soluble and Membrane-Bound Catechol *O*-

- Methyltransferase: A Revised Mechanism and Description of the Thermolabile Variant of the Enzyme. *Biochemistry*, **34**(13), 4202–4210.
- Luche, Sylvie; Santoni, Véronique & Rabilloud, Thierry (2003). Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, **3**(3), 249–253.
- Lukacin, Richard; Matern, Ulrich; Specker, Silvia & Vogt, Thomas (2004). Cations modulate the substrate specificity of bifunctional class I *O*-methyltransferase from *Ammi majus*. *FEBS Lett*, **577**(3), 367–370.
- Lundgren, Deborah H; Hwang, Sun-Il; Wu, Linfeng & Han, David K (2010). Role of spectral counting in quantitative proteomics. *Expert Rev Proteomics*, **7**(1), 39–53.
- Lundström, K.; Salminen, M.; Jalanko, A.; Savolainen, R. & I., Ulmanen (1991). Cloning and characterization of human placental catechol-*O*-methyltransferase cDNA. *DNA Cell Biol*, **10**(3), 181–189.
- Luo, Yan; Blex, Christian; Baessler, Olivia; Glinski, Mirko; Dreger, Mathias; Sefkow, Michael & Köster, Hubert (2009). The cAMP Capture Compound Mass Spectrometry as a Novel Tool for Targeting cAMP-binding Proteins. *Mol Cell Proteomics*, **8**(12), 2843–2856.
- Luo, Yan; Fischer, Jenny J.; Graebner (né Baessler), Olivia Y.; Schrey, Anna K.; Ungewiss, Jan; Glinski, Mirko; Sefkow, Michael; Dreger, Mathias & Köster, Hubert (2010). GDP-Capture Compound - A novel tool for the profiling of GTPases in pro- and eukaryotes by capture compound mass spectrometry (CCMS). *J Proteomics*, **73**(4), 815–819.
- Mann, Matthias & Jensen, Ole N. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol*, **21**(3), 255–261.
- Masjost, Birgit; Ballmer, Patrick; Borroni, Edilio; Zürcher, Gerhard; Winkler, Fritz K.; Jakob-Roetne, Roland & Diederich, Francois (2000). Structure-Based Design, Synthesis, and in vitro Evaluation of Bisubstrate Inhibitors for Catechol *O*-Methyltransferase (COMT). *Chemistry*, **6**(6), 971–982.
- May, Caroline; Brosseron, Frederic; Chartowski, Piotr; Schumbrutzki, Cornelia; Schoenebeck, Bodo & Marcus, Katrin (2011). Instruments and Methods in Proteomics. In Hamacher Michael, Eisenacher Martin, Stephan Christian, & Walker John M. (Eds.): *Data Mining in Proteomics* Band **696** aus *Methods in Molecular Biology* Kapitel 1, (S. 3–26). Humana Press Inc., New York.
- Meinke, David & Scholl, Randy (2003). The Preservation of Plant Genetic Resources. Experiences with Arabidopsis. *Plant Physiol*, **133**(3), 1046–1050 (<http://arabidopsis.info/>).

- Millar, A. Harvey (2004). Location, location, location: surveying the intracellular real estate through proteomics in plants. *Funct Plant Biol*, **31**, 563–582.
- Mitaku, Shigeki & Hirokawa, Takatsugu (1999). Physicochemical factors for discriminating between soluble and membrane proteins: hydrophobicity of helical segments and protein length. *Protein Eng*, **12**(11), 953–957.
- Mitaku, Shigeki; Hirokawa, Takatsugu & Tsuji, Toshiyuki (2002). Amphiphilicity index of polar amino acids as an aid in the characterization of amino acid preference at membrane-water interfaces. *Bioinformatics*, **18**(4), 608–616.
- Müller, Thomas (2010). Entacapone. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, **6**(8), 983–993.
- Männistö, Pekka T. & Kaakkola, Seppo (1999). Catechol-*O*-methyltransferase (COMT): Biochemistry, Molecular Biology, Pharmacology, and Clinical Efficacy of the New Selective COMT Inhibitors. *Pharmacol Rev*, **51**(4), 593–628.
- Moinuddin, Syed G. A.; Jourdes, Michaël; Laskar, Dhrubojyoti D.; Ki, Chanyoung; Cardenas, Claudia L.; Kim, Kye-Won; Zhang, Dianzhong; B., Davin Laurence & Lewis, Norman G. (2010). Insights into lignin primary structure and deconstruction from *Arabidopsis thaliana* COMT (caffeic acid *O*-methyl transferase) mutant *Atomt1*. *Org Biomol Chem*, **8**(17), 3928–3946.
- Molina, Isabel; Li-Beisson, Yonghua; Beisson, Fred; Ohlrogge, John B. & Pollard, Mike (2009). Identification of an Arabidopsis Feruloyl-Coenzyme A Transferase Required for Suberin Synthesis. *Plant Physiol*, **151**(3), 1317–1328.
- Mudgett, Mary B. & Clarke, Steven (1996). A distinctly regulated protein repair L-Isoaspartylmethyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, **30**, 723–737.
- Mudgett, Mary B.; Lowenson, Jonathan D. & Clarke, Steven (1997). Protein Repair L-Isoaspartyl Methyltransferase in Plants (Phylogenetic Distribution and the Accumulation of Substrate Proteins in Aged Barley Seeds). *Plant Physiol*, **115**(4), 1481–1489.
- Mullis, Kary B. & Faloona, Fred A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In Wu Ray (Ed.): *Recombinant DNA Part F* Band **155** aus *Methods in Enzymology* Kapitel 21, (S. 335–350). Academic Press Inc., New York.
- Murashige, Toshio & Skoog, Folke (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*, **15**(3), 473–497.
- Murfitt, Lisa M.; Kolosova, Natalia; J., Mann Craig & Dudareva, Natalia (2000). Purification and Characterization of S-Adenosyl-methionine:Benzoic Acid Carboxyl Methyltransferase, the

- Enzyme Responsible for Biosynthesis of the Volatile Ester Methyl Benzoate in Flowers of *Antirrhinum majus*. *Arch Biochem Biophys*, **382**(1), 145–151.
- Nakaune, Satoru; Yamada, Kenji; Kondo, Maki; Kato, Tomohiko; Tabata, Satoshi; Nishimura, Mikio & Hara-Nishimura, Ikuko (2005). A Vacuolar Processing Enzyme, δ VPE, Is Involved in Seed Coat Formation at the Early Stage of Seed Development. *Plant Cell*, **17**(3), 876–887.
- Newton, Russell P.; Brenton, A. Gareth; Smith, Chris J. & Dudley, Edward (2004). Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. *Phytochemistry*, **65**(11), 1449–1485.
- Nilsson, Robert; Bernfur, Katja; Gustavsson, Niklas; Bygdell, Joakim; Wingsle, Gunnar & Larsson, Christer (2010). Proteomics of Plasma Membranes from Poplar Trees Reveals Tissue Distribution of Transporters, Receptors, and Proteins in Cell Wall Formation. *Mol Cell Proteomics*, **9**(2), 368–387.
- Nishal, Bindu; Tantikanjana, Titima & Sundaresan, Venkatesan (2005). An Inducible Targeted Tagging System for Localized Saturation Mutagenesis in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **137**(1), 3–12.
- Nissinen, Erkki (2010). *Basic Aspects of Catechol-O-Methyltransferase and the clinical applications of its inhibitors* Band **95** aus *International Review of Neurobiology*. Academic Press Inc., New York.
- Nissinen, Erkki; Linden, Inge-Britt; Schultz, Eija & Pohto, Pentti (1992). Biochemical and pharmacological properties of a peripherally acting catechol-O-methyltransferase inhibitor entacapone. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **346**, 262–266.
- Ovaa, Huib & van Leeuwen, Fred (2008). Chemical Biology Approaches to Probe the Proteome. *ChemBioChem*, **9**(18), 2913–2919.
- Ovaska, Martti & Yliniemelä, Ari (1998). A semiempirical study on inhibition of catechol O-methyltransferase by substituted catechols. *J Comput Aided Mol Des*, **12**, 301–307.
- Ozols, Juris (1990). Preparation of Membrane Fractions. In Deutscher Murray (Ed.): *Guide to Protein Purification* Band **182** aus *Methods in Enzymology* Kapitel 17, (S. 225–235). Academic Press Inc., New York.
- Parvathi, Kota; Chen, Fang; Guo, Dianjing; Blount, Jack W. & Dixon, Richard A. (2001). Substrate preferences of O-methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-O-methylation of monolignols. *Plant J*, **25**(2), 193–202.

- Patterson, Scott D. & Aebersold, Ruedi H. (2003). Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet*, **33**, 311–323.
- Pfaffl, Michael W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **29**(9), e45.
- Poe, Russell; Schnapp, Karlyn; Young, Mary J. T.; Grayzar, Jennifer & Platz, Matthew S. (1992). Chemistry and kinetics of singlet pentafluorophenylnitrene. *J Am Chem Soc*, **114**(13), 5054–5067.
- Prescher, Jennifer A & Bertozzi, Carolyn R (2005). Chemistry in living systems. *Nat Chem Biol*, **1**(1), 13–21.
- Qin, Genji; Gu, Hongya; Zhao, Yunde; Ma, Zhiqiang; Shi, Guanglu; Yang, Yue; Pichersky, Eran; Chen, Haodong; Liu, Meihua; Chen, Zhangliang & Qu, Li-Jia (2005). An Indole-3-Acetic Acid Carboxyl Methyltransferase Regulates *Arabidopsis* Leaf Development. *Plant Cell*, **17**(10), 2693–2704.
- Qu, LiJia; Li, Shuang & Xing, ShuFan (2010). Methylation of phytohormones by the SABATH methyltransferases. *Chinese Science Bulletin*, **55**, 2211–2218.
- Raes, Jeroen; Rohde, Antje; Christensen, Jørgen Holst; Van de Peer, Yves & Boerjan, Wout (2003). Genome-Wide Characterization of the Lignification Toolbox in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **133**(3), 1051–1071.
- Rappsilber, Juri & Mann, Matthias (2002). What does it mean to identify a protein in proteomics? *Trends Biochem Sci*, **27**(2), 74–78.
- Richau, Kerstin H. & van der Hoorn, Renier A. L. (2010). Studies on Plant-Pathogen Interactions Using Activity-based Proteomics. *Curr Proteomics*, **7**(4), 328–336.
- Rix, Uwe & Superti-Furga, Giulio (2009). Target profiling of small molecules by chemical proteomics. *Nat Chem Biol*, **5**(9), 616–624.
- Roje, Sanja (2006). *S*-Adenosyl-L-methionine: Beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry*, **67**(15), 1686–1698.
- Rose, Jocelyn K.C.; Bashir, Sajid; Giovannoni, James J.; Jahn, Molly M. & Saravanan, Ramu S. (2004). Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant J*, **39**(5), 715–733.
- Ross, Jeannine R.; Nam, Kyoung H.; D’Auria, John C. & Pichersky, Eran (1999). *S*-Adenosyl-L-Methionine:Salicylic Acid Carboxyl Methyltransferase, an Enzyme Involved in Floral Scent

- Production and Plant Defense, Represents a New Class of Plant Methyltransferases. *Arch Biochem Biophys*, **367**(1), 9–16.
- Rossignol, Michel; Peltier, Jean-Benoît; Mock, Hans-Peter; Matros, Andrea; Maldonado, Ana M. & Jorrín, Jesús V. (2006). Plant proteome analysis: A 2004 - 2006 update. *Proteomics*, **6**(20), 5529–5548.
- Rotili, Dante; Altun, Mikael; Hamed, Refaat B.; Loenarz, Christoph; Thalhammer, Armin; Hopkinson, Richard J.; Tian, Ya-Min; Ratcliff, Peter J.; Mai, Antonello; Kessler, Benedikt M. & Schofield, Christopher J. (2011a). Photoactivable peptides for identifying enzyme-substrate and protein-protein interactions. *Chem Commun (Camb)*, **47**(5), 1488–1490.
- Rotili, Dante; Altun, Mikael; Kawamura, Akane; Wolf, Alexander; Fischer, Roman; Leung, Ivanhoe K. H.; Mackeen, Mukram M.; Tian, Ya-Min; Ratcliffe, Peter J.; Mai, Antonello; Kessler, Benedikt M. & Schofield, Christopher J (2011b). A Photoreactive Small-Molecule Probe for 2-Oxoglutarate Oxygenases. *Chem Biol*, **18**(5), 642–654.
- Saghatelian, Alan; Jessani, Nadim; Joseph, Arul; Humphrey, Mark & Cravatt, Benjamin F. (2004). Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(27), 10000–10005.
- Sahr, Tobias; Adam, Thibaud; Fizames, Cécile; Maurel, Christophe & Santoni, Véronique (2010). *O*-carboxyl- and *N*-methyltransferases active on plant aquaporins. *Plant Cell Physiol*, **51**(12), 2092–2104.
- Salisbury, Cleo M. & Cravatt, Benjamin F. (2008). Optimization of Activity-Based Probes for Proteomic Profiling of Histone Deacetylase Complexes. *J Am Chem Soc*, **130**(7), 2184–2194.
- Salminen, Marjo; Lundström, Kenneth; Tilgmann, Carola; Savolainen, Raija; Kalkkinen, Nisse & Ulmanen, Ismo (1990). Molecular cloning and characterization of rat liver catechol-*O*-methyltransferase. *Gene*, **93**(2), 241–247.
- Santoni, Véronique (2006). Plant Plasma Membrane Protein Extraction and Solubilization for Proteomic Analysis. In Hervé Thiellement Catherine Damerval Valérie Méchin, Michel Zivy (Ed.): *Plant Proteomics* Band**355** aus *Methods in Molecular Biology* Kapitel 11, (S. 93–109). Humana Press Inc., New York.
- Santoni, Véronique; Kieffer, Sylvie; Desclaux, Dominique; Masson, Florence & Rabilloud, Thierry (2000). Membrane proteomics: Use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. *Electrophoresis*, **21**(16), 3329–3344.
- Santoni, Véronique; Rabilloud, Thierry; Dumas, Patrick; Rouquié, David; Mansion, Monique;

- Kieffer, Sylvie; Garin, Jérôme & Rossignol, Michel (1999). Towards the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gels. *Electrophoresis*, **20**(4-5), 705–711.
- Santoni, Véronique; Verdoucq, Lionel; Sommerer, Nicolas; Vinh, Joëlle; Pflieger, Delphine & Mauriel, Christophe (2006). Methylation of aquaporins in plant plasma membrane. *Biochem J*, **400**(1), 189–197.
- Scholten, Arjen; Poh, Mee Kian; van Veen, Toon A. B.; van Breukelen, Bas; Vos, Marc A. & Heck, Albert J. R. (2006). Analysis of the cGMP/cAMP Interactome Using a Chemical Proteomics Approach in Mammalian Heart Tissue Validates Sphingosine Kinase Type 1-interacting Protein as a Genuine and Highly Abundant AKAP. *J Proteome Res*, **5**(6), 1435–1447.
- Schröder, Gudrun; Wehinger, Elke & Schröder, Joachim (2002). Predicting the substrates of cloned plant *O*-methyltransferases. *Phytochemistry*, **59**(1), 1–8.
- Schultz, Eija & Nissinen, Erkki (1989). Inhibition of rat liver and duodenum soluble catechol-*O*-methyltransferase by a tight-binding inhibitor OR-462. *Biochem Pharmacol*, **38**(22), 3953–3956.
- Schulze, Waltraud X. & Usadel, Björn (2010). Quantitation in Mass-Spectrometry-Based Proteomics. *Annu Rev Plant Biol*, **61**, 491–516.
- Seo, Hak S.; Song, Jong T.; Cheong, Jong-Joo; Lee, Yong-Hwan; Lee, Yin-Won; Hwang, Ingyu; Lee, Jong S. & Choi, Yang D. (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(8), 4788–4793.
- Sheoran, Inder S.; Ross, Andrew R. S.; Olson, Douglas J. H. & Sawhney, Vipen K. (2007). Proteomic analysis of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pollen. *J Exp Bot*, **58**(13), 3525–3535.
- Sheoran, Inder S.; Ross, Andrew R. S.; Olson, Douglas J. H. & Sawhney, Vipen K. (2009). Compatibility of plant protein extraction methods with mass spectrometry for proteome analysis. *Plant Sci*, **176**(1), 99–104.
- Shevchenko, Andrej; Wilm, Matthias; Vorm, Ole & Mann, Matthias (1996). Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Anal Chem*, **68**(5), 850–858.
- Shiyama, Takaaki; Furuya, Minoru; Yamazaki, Akira; Terada, Tomohiro & Tanaka, Akito (2004). Design and synthesis of novel hydrophilic spacers for the reduction of nonspecific binding proteins on affinity resins. *Bioorg Med Chem*, **12**(11), 2831–2841.
- Simon, Gabriel M. & Cravatt, Benjamin F. (2010). Activity-based Proteomics of Enzyme Superfamilies: Serine Hydrolases as a Case Study. *J Biol Chem*, **285**(15), 11051–11055.
- Smyth, David R.; Bowman, John L. & Meyerowitz, Elliot M. (1990). Early Flower Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **2**, 755–767.

- Sonnhammer, Erik L. L.; von Heijne, Gunnar & Krogh, Anders (1998). A Hidden Markov Model for Predicting Transmembrane Helices in Protein Sequences. *Proceedings of the 6th International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, **6**, 175–182.
- Sorieul, Mathias; Santoni, Véronique; Maurel, Christophe & Luu, Doan-Trung (2011). Mechanisms and Effects of Retention of Over-Expressed Aquaporin AtPIP2;1 in the Endoplasmic Reticulum. *Traffic*, **12**(4), 473–482.
- Springer, Martin S.; Goy, Michael F. & Adler, Julius (1979). Protein methylation in behavioural control mechanisms and in signal transduction. *Nature*, **280**(5720), 279–284.
- Springob, Karin & Kutchan, Toni M. (2009). Introduction to the different classes of natural products. : Kapitel 1, (S. 3–50). Springer New York.
- Tagmount, Abderrahmane; Berken, Antje & Terry, Norman (2002). An Essential Role of *S*-Adenosyl-L-Methionine:L-Methionine *S*-Methyltransferase in Selenium Volatilization by Plants. Methylation of Selenomethionine to Selenium-Methyl-L-Selenium- Methionine, the Precursor of Volatile Selenium. *Plant Physiol*, **130**(2), 847–856.
- Takác, Tomás; Pechan, Tibor & Samaj, Jozef (2011). Differential proteomics of plant development. *J Proteomics*, **74**(5), 577–588.
- Tate, Edward W. (2008). Recent advances in chemical proteomics: exploring the post-translational proteome. *J Chem Biol*, **1**, 17–26.
- Thapar, Nitika; Kim, An-Keun & Clarke, Steven (2001). Distinct Patterns of Expression But Similar Biochemical Properties of Protein L-Isoaspartyl Methyltransferase in Higher Plants. *Plant Physiol*, **125**(2), 1023–1035.
- The UniProt Consortium (2011). Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource. *Nucleic Acids Res*, **39**(Datenbankausgabe), D214–D219.
- Tusnády, Gábor E. & Simon, István (1998). Principles Governing Amino Acid Composition of Integral Membrane Proteins: Application to Topology Prediction. *J Mol Biol*, **283**(2), 489–506.
- Tusnády, Gábor E. & Simon, István (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*, **17**(9), 849–850.
- Uttamchandani, Mahesh; Lu, Candy H. S. & Yao, Shao Q. (2009). Next Generation Chemical Proteomic Tools for Rapid Enzyme Profiling. *Acc Chem Res*, **42**(8), 1183–1192.
- Vafai, Scott B. & Stock, Jeffrey B. (2002). Protein phosphatase 2A methylation: a link between elevated plasma homocysteine and Alzheimer's Disease. *FEBS Lett*, **518**(1-3), 1–4.

- Valot, Benît; Langella, Olivier; Nano, Edlira & Zivy, Michel (2011). MassChroQ: A versatile tool for mass spectrometry quantification. *Proteomics*, **11**(17), 3572–3577.
- van der Hoorn, Renier A. L.; Leeuwenburgh, Michiel A.; Bogyo, Matthew; Joosten, Matthieu H. A. J. & Peck, Scott C. (2004). Activity Profiling of Papain-Like Cysteine Proteases in Plants. *Plant Physiol*, **135**(3), 1170–1178.
- Varbanova, Marina; Yamaguchi, Shinjiro; Yang, Yue; McKelvey, Katherine; Hanada, Atsushi; Borochov, Roy; Yu, Fei; Jikumaru, Yusuke; Ross, Jeannine; Cortes, Diego; Ma, Choong Je; Noel, Joseph P.; Mander, Lew; Shulaev, Vladimir; Kamiya, Yuji; Rodermel, Steve; Weiss, David & Pichersky, Eran (2007). Methylation of Gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell*, **19**(1), 32–45.
- Verdoucq, Lionel; Grondin, Alexandre & Maurel, Christophe (2008). Structure-function analysis of plant aquaporin *AtPIP2;1* gating by divalent cations and protons. *Biochem J*, **415**(3), 409–416.
- Vidgren, Jukka; Svensson, L. Anders & Liljas, Anders (1994). Crystal structure of catechol *O*-methyltransferase. *Nature*, **368**(6469), 354–358.
- Villa, Sarah T.; Xu, Qilong; Downie, A. Bruce & Clarke, Steven G. (2006). *Arabidopsis* protein repair L-isoaspartyl methyltransferases: predominant activities at lethal temperatures. *Physiol Plant*, **128**(4), 581–592.
- Vogt, Thomas (2004). Regiospecificity and kinetic properties of a plant natural product *O*-methyltransferase are determined by its N-terminal domain. *FEBS Lett*, **561**(1-3), 159–162.
- Whitelegge, Julian P.; Komatsu, Setsuko & Jorrin-Novo, Jesus (2011). Diverse facets of plant proteomics. *Phytochemistry*, **72**(10), 961–962.
- Whiteman, Sally-Anne; Nühse, Thomas S.; Ashford, David A.; Sanders, Dale & Maathuis, Frans J. M. (2008). A proteomic and phosphoproteomic analysis of *Oryza sativa* plasma membrane and vacuolar membrane. *Plant J*, **56**(1), 146–156.
- Wilkins, Marc R.; Pasquali, Christian; Appel, Ron D.; Ou, Keli; Golaz, Oliver; Sanchez, Jean-Charles; Yan, Jun X.; Gooley, Andrew A.; Hughes, Graham; Humphery-Smith, Ian; Williams, Keith L. & Hochstrasser, Denis F. (1996). From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. *Nat Biotechnol*, **14**(1), 61–65.
- Wilkins, Marc R.; Sanchez, Jean-Charles; Gooley, Andrew A.; Appel, Ron D.; Humphery-Smith, Ian; Hochstrasser, Denis F. & Williams, Keith L. (1995). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*, **13**, 19–50.

- Wink, Michael (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, **64**(1), 3–19.
- Winnacker, Malte; Breeger, Sascha; Strasser, Ralf & Carell, Thomas (2009). Novel Diazirine-Containing DNA Photoaffinity Probes for the Investigation of DNA-Protein-Interactions. *ChemBioChem*, **10**(1), 109–118.
- Wirsing, Lisette; Naumann, Kai & Vogt, Thomas (2011). Arabidopsis methyltransferase fingerprints by affinity-based protein profiling. *Anal Biochem*, **408**(2), 220–225.
- Wissing, Josef; Jansch, Lothar; Nimtz, Manfred; Dieterich, Guido; Hornberger, Renate; Kéri, Gyögy; Wehland, Jürgen & Daub, Henrik (2007). Proteomics Analysis of Protein Kinases by Target Class-selective Prefractionation and Tandem Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, **6**(3), 537–547.
- Wittwer, C. T.; Herrmann, Mg; Moss, Aa & Rasmussen, Rp (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, **22**(1), 130–131, 134–138.
- Woodard, Ronald W.; Tsai, Ming-Daw; Floss, Heinz G.; Crooks, Peter A. & Coward, James K. (1980). Stereochemical course of the transmethylation catalyzed by catechol *O*-methyltransferase. *J Biol Chem*, **255**(19), 9124–9127.
- Wright, Aaron T. & Cravatt, Benjamin F. (2007). Chemical Proteomic Probes for Profiling Cytochrome P450 Activities and Drug Interactions In Vivo. *Chem Biol*, **14**(9), 1043–1051.
- Xing, Shufan; Qin, Genji; Shi, Yan; Ma, Zhiqiang; Chen, Zhangliang; Gu, Hongya & Qu, Li-Jia (2007). *GAMT2* Encodes a Methyltransferase of Gibberellic Acid That is Involved in Seed Maturation and Germination in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol*, **49**(3), 368–381.
- Xu, Qilong; Belcastro, Marisa P.; Villa, Sarah T.; Dinkins, Randy D.; Clarke, Steven G. & Downie, A. Bruce (2004). A Second Protein L-Isoaspartyl Methyltransferase Gene in Arabidopsis Produces Two Transcripts Whose Products Are Sequestered in the Nucleus. *Plant Physiol*, **136**(1), 2652–2664.
- Yang, Yue; Yuan, Joshua S.; Ross, Jeannine; Noel, Joseph P.; Pichersky, Eran & Chen, Feng (2006). An *Arabidopsis thaliana* methyltransferase capable of methylating farnesoic acid. *Arch Biochem Biophys*, **448**(1-2), 123–132.
- Ye, Zheng-Hua; Kneusel, Richard E.; Matern, Ulrich & Varner, Joseph E. (1994). An Alternative Methylation Pathway in Lignin Biosynthesis in *Zinnia*. *Plant Cell*, **6**(10), 1427–1439.
- Yonekura-Sakakibara, Keiko; Tohge, Takayuki; Matsuda, Fumio; Nakabayashi, Ryo; Takayama, Hiromitsu; Niida, Rie; Watanabe-Takahashi, Akiko; Inoue, Eri & Saito, Kazuki (2008). Com-

- prehensive Flavonol Profiling and Transcriptome Coexpression Analysis Leading to Decoding Gene-Metabolite Correlations in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **20**(8), 2160–2176.
- Yu, Jun; Hu, Songnian; Wang, Jun; Wong, Gane Ka-Shu; Li, Songgang; Liu, Bin; Deng, Yajun; Dai, Li; Zhou, Yan; Zhang, Xiuqing; Cao, Mengliang & Liu, Jing *et al.* (2002). A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*, **296**(5565), 79–92.
- Zhang, Guoan & Neubert, Thomas A. (2006). Automated Comparative Proteomics Based on Multiplex Tandem Mass Spectrometry and Stable Isotope Labeling. *Mol Cell Proteomics*, **5**(2), 401–411.
- Zhang, Ning; Schürmann, Peter & Portis, Archie (2001). Characterization of the regulatory function of the 46-kDa isoform of Rubisco activase from *Arabidopsis*. *Photosynth Res*, **68**, 29–37.
- Zhu, Bao T.; Ezell, Edward L. & Liehr, Joachim G. (1994). Catechol-*O*-methyltransferase-catalyzed rapid *O*-methylation of mutagenic flavonoids. *J Biol Chem*, **269**(1), 292–299.
- Zubieta, Chloe; He, Xian-Zhi; Dixon, Richard A. & Noel, Joseph P. (2001). Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant *O*-methyltransferases. *Nat Struct Mol Biol*, **8**(3), 271–279.
- Zubieta, Chloe; Kota, Parvathi; Ferrer, Jean-Luc; Dixon, Richard A. & Noel, Joseph P. (2002). Structural Basis for the Modulation of Lignin Monomer Methylation by Caffeic Acid/5-Hydroxyferulic Acid 3/5-*O*-Methyltransferase. *Plant Cell*, **14**(6), 1265–1277.

Anhang

1 Anreicherung AdoMet-bindender Proteine in Knospen

In folgender Abbildung ist ein 1D-Gel nach der Anreicherung AdoMet-bindender Proteine aus Knospenrohextrakten dargestellt. In diesem Fall konnte, im Gegensatz zu den Anreicherungen die zur Etablierung des Systems dienten, die AtMMT detektiert werden. Das Protein wird durch den Pfeil, welcher mit der Nummer vier beschriftet ist, gekennzeichnet.

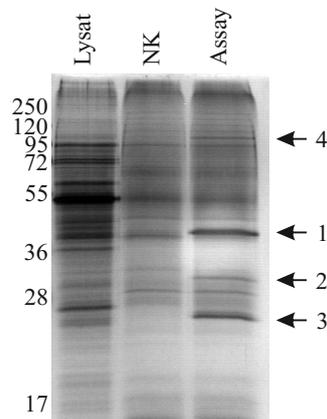


Abbildung 1: 1D-Gele der CCMS der Knospenstadien A bis C vereint. Darstellung der Anreicherungsresultate aus einem Extrakt von Knospen A bis C vereint. Die Proteingrößen in kDa sind auf der linken Seite und die durch Pfeile hervorgehobenen, detektierten Proteine (1 – AtOMT1 40 kDa; 2 – AtCCoAOMT1 29 kDa; 3 – AtTSM1 26 kDa; 4 - AtMMT 119 kDa) auf der rechten Seite angegeben.

2 Klonierungsstrategie und -ablauf der erstellten Vektoren

In den folgenden zwei Abbildungen 2 und 3 sind die Vektorkarten der beiden Plasmide pGEM[®]-T Easy und pQE-30 dargestellt. Diese kommerziell erhältlichen Vektoren (Kapitel 2.3) wurden für die Klonierung eines Expressionsvektors, welcher die gesamte oder Teile der kodierenden Sequenz der AtCCoAOMT3 enthält, verwendet.

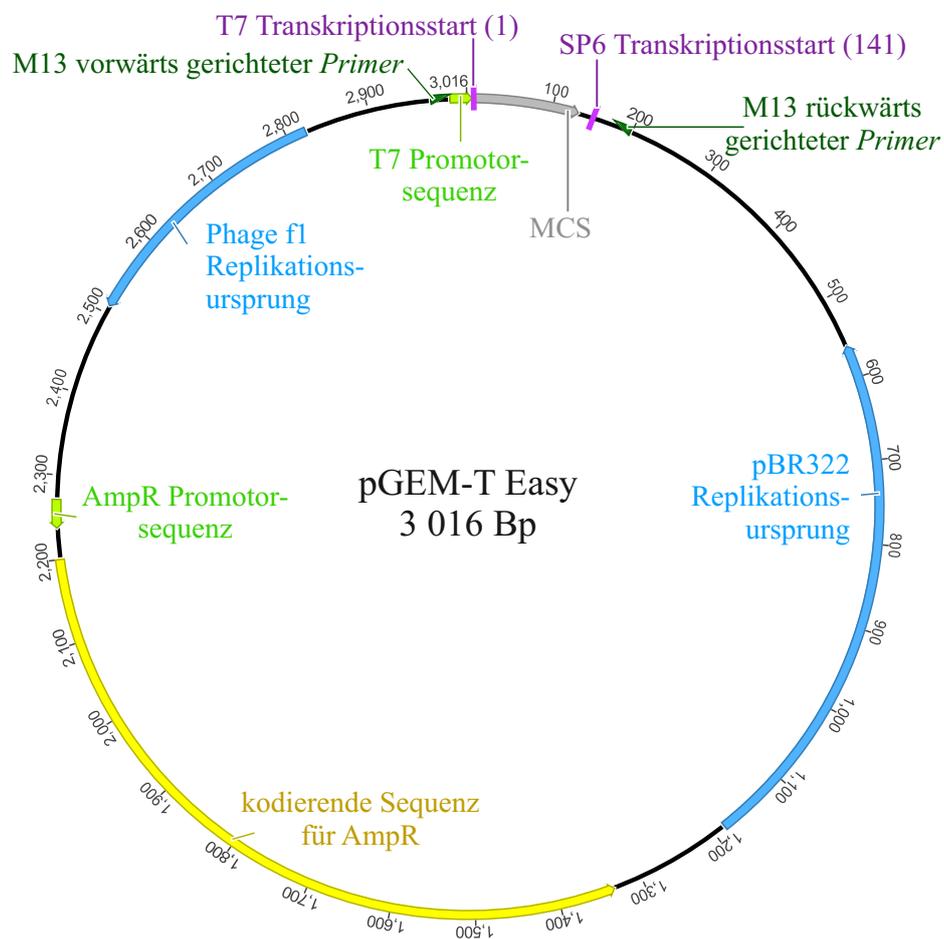


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Klonierungsvektors pGEM[®]-T Easy (Promega). Darstellung des original Vektors ohne Insertion. Die Insertion erfolgte über TA-Klonierung in die *multiple cloning site* (MCS). Die PCR-Fragmente werden über ihre Adenin-Überhänge am 5'- bzw. 3'-Ende in den Vektor integriert.

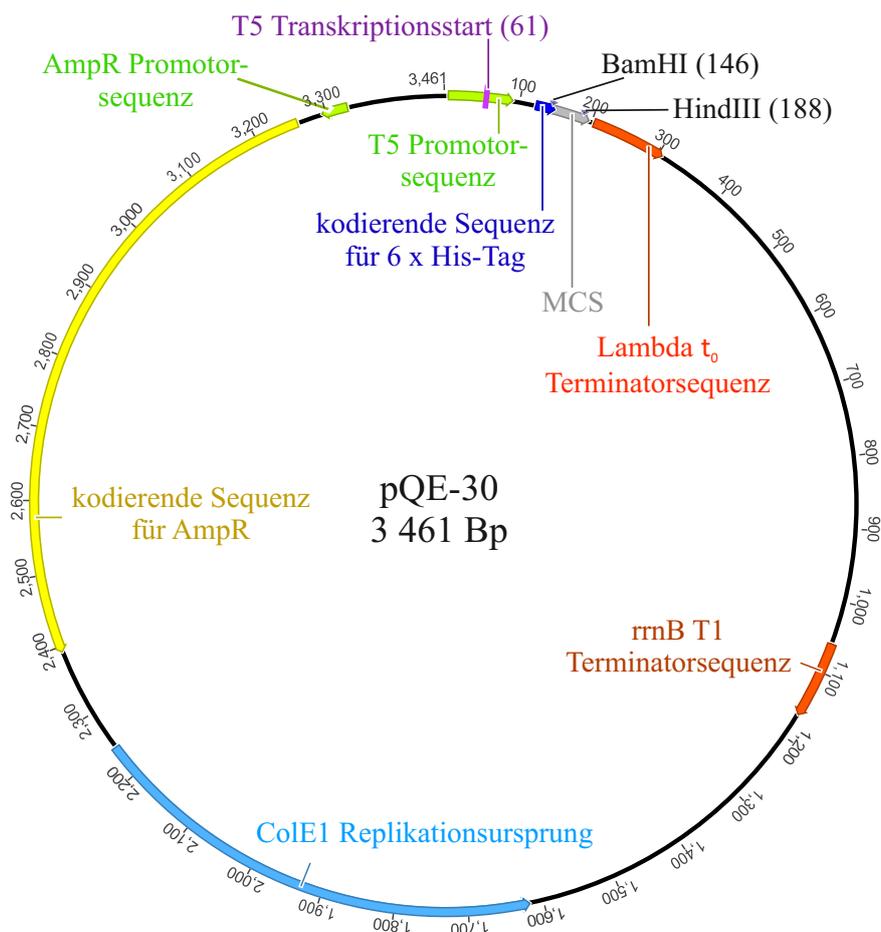


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pQE30 (Qiagen GmbH). Darstellung des original Vektors ohne Insertion. Die Insertion erfolgte zwischen den Schnittstellen BamHI und HindIII.

Die Klonierungsstrategie kann in Abbildung 4 nachvollzogen werden. Die zu integrierenden DNA-Fragmente wurden mittels PCR aus cDNA amplifiziert und aus dem resultierenden Agarosegelen eluiert. Zuerst wurden die Fragmente I (CDS komplett) und II (CDS -87 Bp) in pGEM[®]-T Easy ligiert, um eine Sequenzierung zur Kontrolle der Basenabfolge durchzuführen. Da in pGEM[®]-T Easy sowie pQE30 jeweils ein Ampicillinresistenzgen (AmpR) kodiert ist, wurde nach der Restriktion der erstellten Konstrukte eine Agarosegelelektrophorese und wiederum die Elution des gewünschten Fragmentes angeschlossen. Somit wurde eine Religation der Fragmente mit pGEM-T-Easy verhindert und die jeweiligen DNA-Fragmente konnten ebenfalls mit HindIII und BamHI geschnittenem sowie mit Phosphatase behandeltem pQE30-Plasmid gerichtet ligiert werden. Die letztendlich erstellten Expressionsvektoren wurden in *E. coli* transformiert und eine Testexpression durchgeführt (Kapitel 3.3.2).

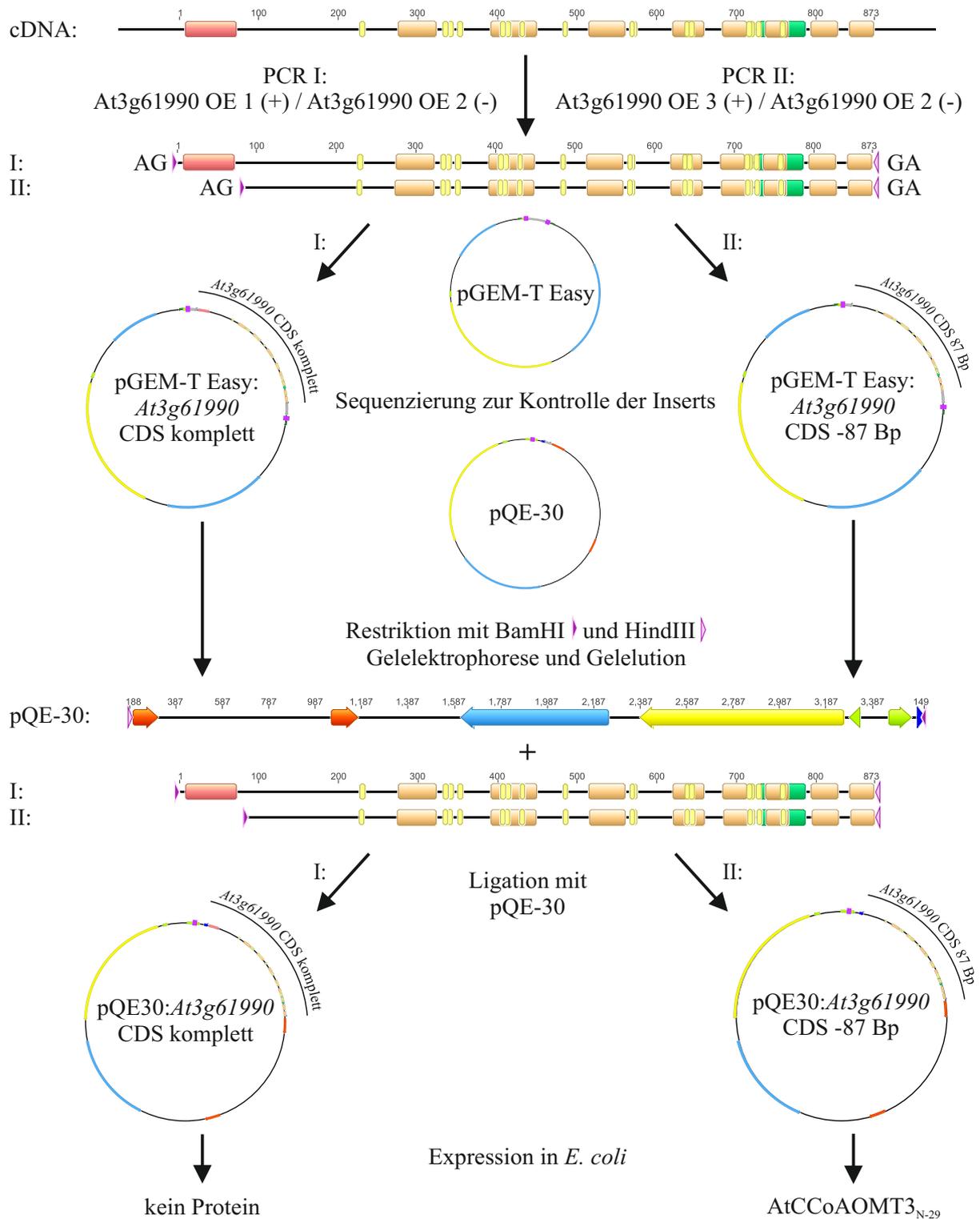


Abbildung 4: Klonierungsstrategie. Ablauf der Klonierung zweier Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Abschnitten der kodierenden Sequenz (CDS) vom Gen *At3g61990*, welches für das Protein AtCCoAOMT3 kodiert.

Die während der Klonierung erhaltenen Vektoren sind in den Abbildungen 5 bis 8 dargestellt. Das integrierte Fragment wurde jeweilig hervorgehoben, indem eine Linie mit Beschriftung des Fragments außerhalb des Vektors abgebildet ist. Die Darstellungen enthalten die folgenden Abkürzungen:

T7 TS	T7 Terminatorsequenz
Sp6 TS	Sp6 Terminatorsequenz
T5 TS	T5 Terminatorsequenz
Lambda t_0 TS	Lambda t_0 Terminatorsequenz
rrn BT1 TS	rrn BT1 Terminatorsequenz
T7 PS	T7 Promotorsequenz
T5 PS	T5 Promotorsequenz
AmpR PS	AmpR Promotorsequenz
AmpR	kodierende Sequenz für AmpR
MCS	<i>multiple cloning site</i>
His-Tag	kodierende Sequenz für 6 x His-Tag
M13 (+)	M13 vorwärts gerichteter <i>Primer</i>
M13 (-)	M13 rückwärts gerichteter <i>Primer</i>
Phage f1 RU	Phage f1 Replikationsursprung
pBR322 RU	pBR322 Replikationsursprung
ColE1 RU	ColE1 Replikationsursprung

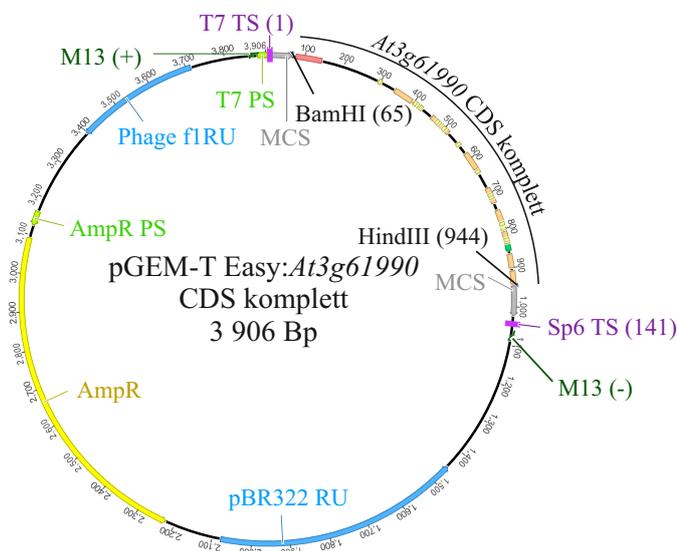


Abbildung 5: Vektorkarte pGEM-T Easy:At3g61990 CDS komplett.

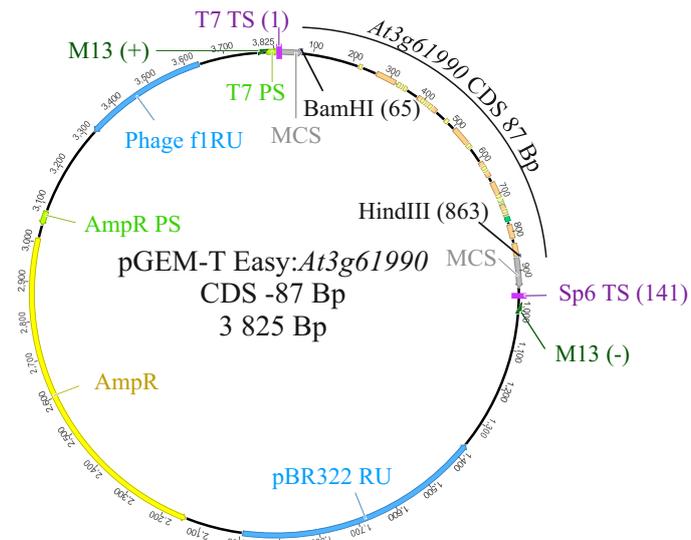


Abbildung 6: Vektorkarte pGEM-T Easy:At3g61990 CDS -87 Bp.

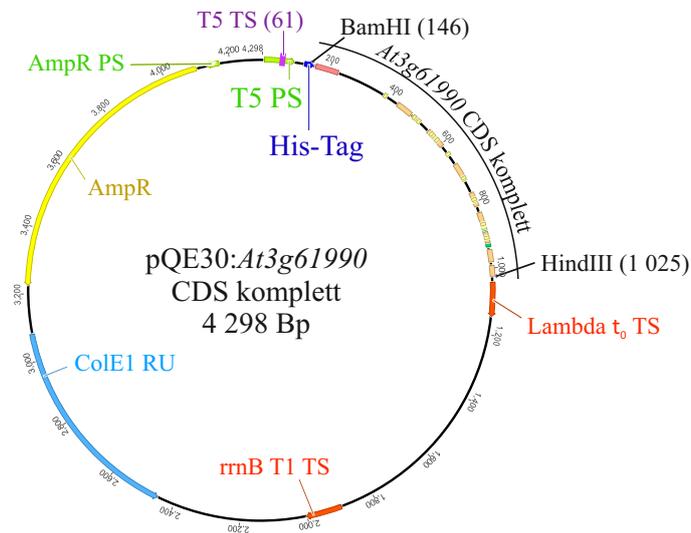


Abbildung 7: Vektorkarte pQE30:At3g61990 CDS komplett.

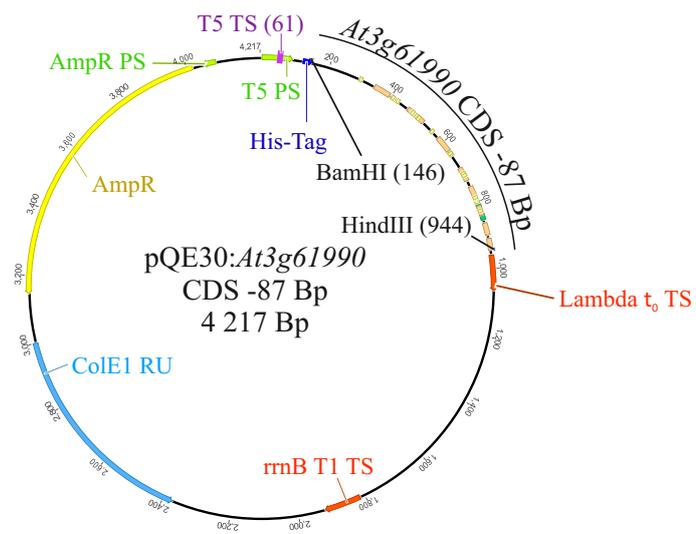


Abbildung 8: Vektorkarte pQE30:At3g61990 CDS -87 Bp.

3 Chromatogramme der Assays zur Substratspezifität der AtCCoAOMT3

In Abbildung 9 und 10 sind Beispiele der aufgenommenen Chromatogramme der *in vitro* Enzymassays mit der AtCCoAOMT3_{N-29} dargestellt. Es werden alle in Kapitel 3.3.4 erwähnten Substrate aufgeführt. In den meisten Fällen konnten Produkte detektiert werden. Lediglich die Enzymassays der Substrate Myricetin und Gossypetin wurden nicht ausgewertet, da hier keine Produkte detektiert wurden und die Substrate ebenfalls nur in Spuren nachweisbar waren.

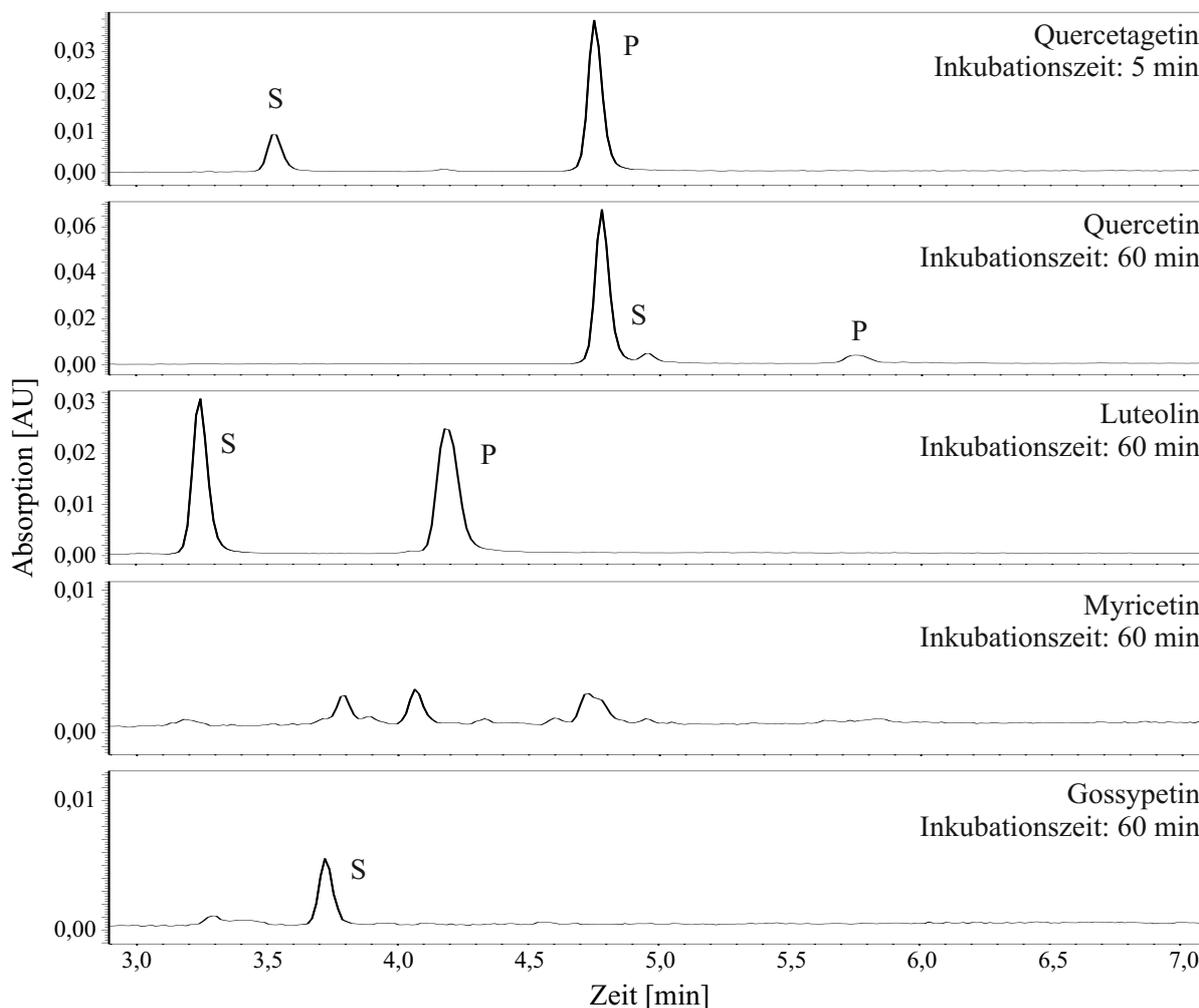


Abbildung 9: Chromatogramme der Enzymassays der AtCCoAOMT3 mit Flavonoiden. Darstellung der HPLC-Chromatogramme nach Durchführung der Enzymassays (Kapitel 2.6.12 und 2.6.13) mit unterschiedlichen Flavonoiden als putative Substrate. Die Endkonzentration der Substrate im Assay betrug 100 μ M. S - Substrat; P - Produkt

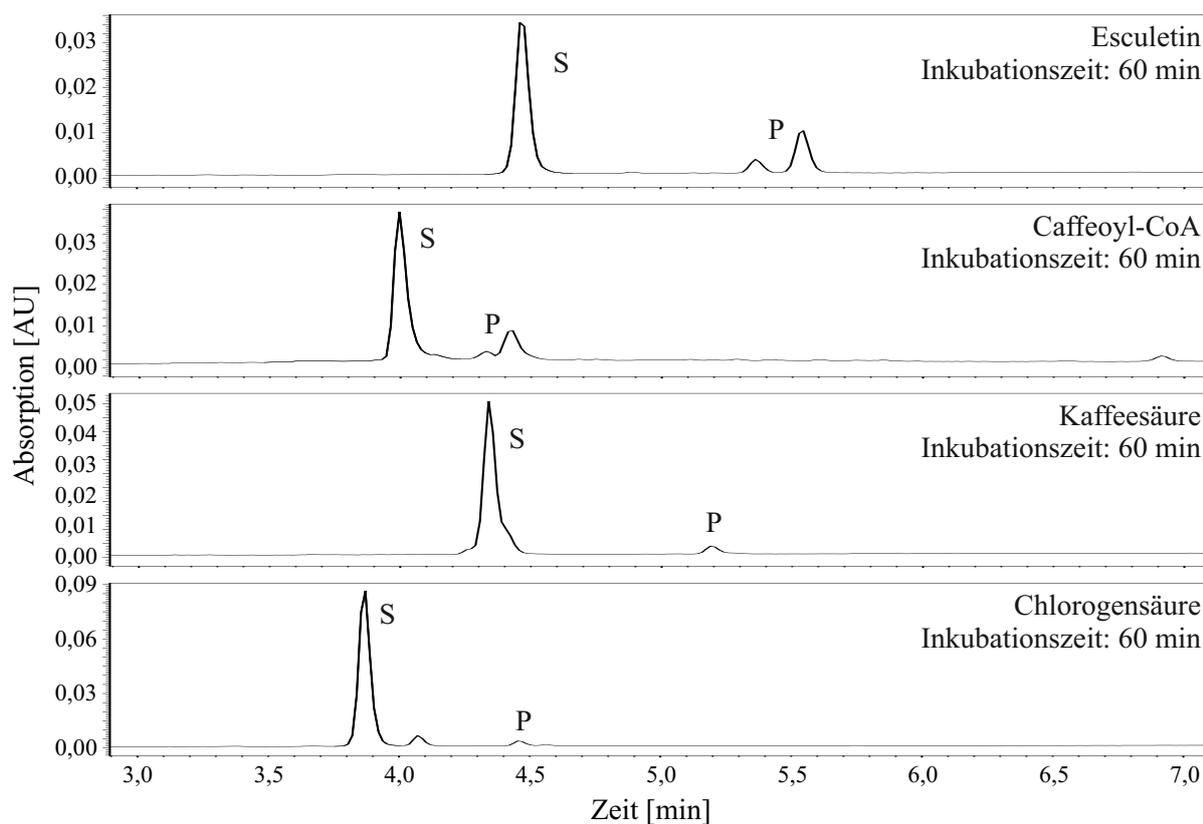


Abbildung 10: Chromatogramme der Enzymassays der AtCCoAOMT3 mit anderen Phenylpropanoiden. Darstellung der HPLC-Chromatogramme nach Durchführung der Enzymassays (Kapitel 2.6.12 und 2.6.13) mit weiteren Phenylpropanoiden als putative Substrate. Die Endkonzentration der Substrate im Assay betrug 100 μ M. S - Substrat; P - Produkt

4 Bindungsstudien im aktiven Zentrum der AtCAoAOMT3

In den folgenden zwei Abbildungen (11 und 12) sind die zu Grunde gelegten 3D-Modelle der Abbildungen 4.5 und 4.7 dargestellt. Die Modellierung der putativen Substrate in das aktive Zentrum der AtCCoAOMT3 wurde von D. Brauch vorgenommen. Es wurde in beiden Fällen keine Energieeffizienzanalyse durchgeführt.

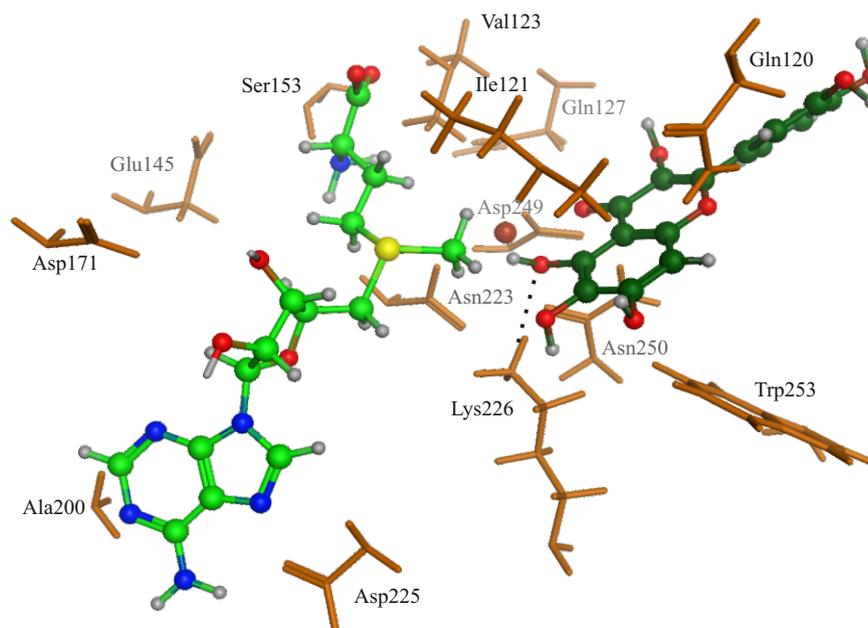


Abbildung 11: Docking von Quercetagetin in das aktive Zentrum der AtCCoAOMT3. Das Substrat Quercetagetin ist in dunkelgrün (Kohlenstoffgerüst) dargestellt. AdoMet wird mittels hellgrünem Kohlenstoffgerüst hervorgehoben und das Mg²⁺ ist als rote Kugel abgebildet. Die Kohlenstoffgerüste der Aminosäuren sind in orange abgebildet, wobei auf die Darstellung des Peptidrückgrates verzichtet wurde. Die Nummerierung der Aminosäuren ist angelehnt am *Alignement* in Abbildung 3.19 in Kapitel 3.3.1. Stickstoffatome sind blau, Sauerstoffatome rot, Schwefelatome gelb und Wasserstoff grau dargestellt.

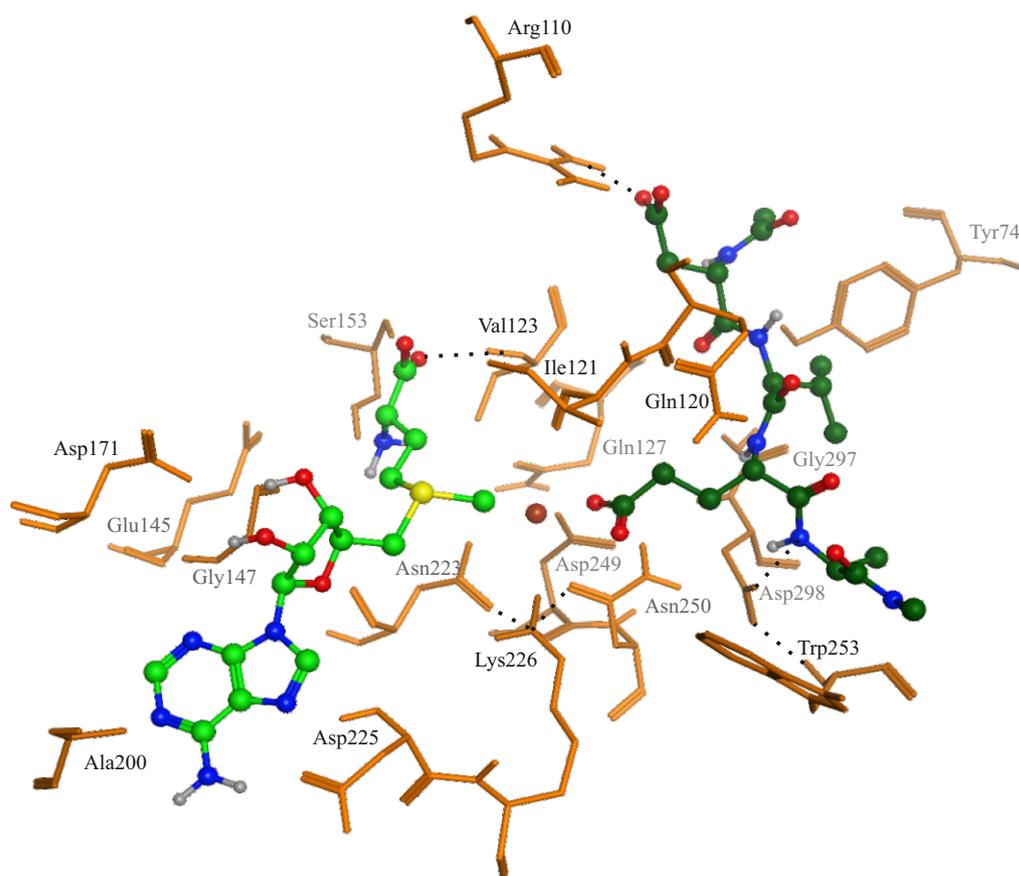


Abbildung 12: Docking eines Tetrapeptides in das aktive Zentrum der AtCCoAOMT3. Das Tetrapeptid ist in dunkelgrün (Kohlenstoffgerüst) dargestellt. AdoMet wird mittels hellgrünem Kohlenstoffgerüst hervorgehoben und das Mg^{2+} ist als rote Kugel abgebildet. Die Kohlenstoffgerüste der Aminosäuren sind in orange abgebildet, wobei auch das Peptidrückgrat dargestellt wurde. Die Nummerierung der Aminosäuren ist angelehnt am *Alignement* in Abbildung 3.19 in Kapitel 3.3.1. Stickstoffatome sind blau, Sauerstoffatome rot, Schwefelatome gelb und Wasserstoff grau dargestellt.

Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Dieter Strack für das Ermöglichen dieser Arbeit durch die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, aber auch Prof. Dr. Alain Tissier, der mir die Fertigstellung der Arbeit in seiner Abteilung möglich machte. Weiterhin danke ich beiden für die stetige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

PD Dr. Thomas Vogt danke ich vor allem für die Bereitstellung des interessanten Themas, die professionelle Betreuung, die Unterstützung und die interessanten Diskussionen.

Weiterer Dank gilt Dr. Kai Naumann für die Übernahme der mentoriellen Betreuung, für die Bereitstellung des Themas und die Durchführung der MS-Analysen. Wobei hier auch Dr. Maria Fedorova von der Universität Leipzig genannt werden soll, die ebenfalls MS-Messungen im Rahmen dieser Dissertation vornahm.

Den Kooperationspartner Dr. Bernhard Westermann und Sebastian Brauch der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie des IPBs möchte ich für die Bereitstellung der Inhibitoren und der Sonde sowie immer während der Diskussionsbereitschaft danken. Aber auch Robert Klein, der selben Abteilung angehörig, möchte ich für die Unterstützung bei der Bearbeitung der durch ihn erstellten *in silico* 3D-Proteinmodelle danken.

Weiterhin gilt großer Dank den Mitarbeitern des Leibniz-Instituts für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale) für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Hierbei sind besonders die Abteilung Stoffwechsel- und Zellbiologie (früher: Sekundärstoffwechsel) und die Arbeitsgruppe Proteinbiochemie und Metabolite Profiling zu nennen. Vor allem Christin Fellenberg will ich für die fortwährende Unterstützung im Labor danken. Kerstin Manke unterstützte mich vor allem in der Durchführung von Experimenten, weshalb auch ihr gedankt werden soll. Zudem sollen an dieser Stelle meine Praktikanten, HiWis und so weiter nicht vergessen werden. Vielen Dank an Jörg, Vinzenz, Sophie und Dominic.

Diana Trutschel danke ich für die statistische Auswertung der qPCR-Daten und der Keimungsassays.

Ganz besonderer Dank gilt den “Knöggelchens“ und allen die adoptiert wurden (ihr wisst schon wen ich meine). Die gemeinsamen Mittagspausen und schönen Feiern am Abend halfen auch die

stressigsten Zeiten der Dissertation durchzustehen und es war möglich abzuschalten sowie neue Ideen zu fassen.

Weiterhin möchte ich all denen danken die mich vor allem in der letzten Phase meiner Doktorarbeit durch unentwegtes Korrekturlesen und intensive Diskussion unterstützt haben.

Sehr großer Dank gilt auch meiner Familie und den Freunden außerhalb des Institutes. Ihr habt mich in allen Lebenslagen unterstützt und immer ein offenes Ohr für meine Probleme gehabt.

Abschließend möchte ich meinem Freund Christian Hildebrandt für die entgegengebrachte Liebe und Unterstützung, seinem Verständnis sowie die Einarbeitung in Latex danken!

Lebenslauf

Name	Lisette Wirsing
Akademischer Grad	Dipl.-Ing. (FH)
Geschlecht	weiblich
Geburtsdatum	28.10.1984
Geburtsort	Pirna
Anschrift	Breitenfelder Straße 14 06112 Halle (Saale)
Nationalität	deutsch

Werdegang

seit 02/2012	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in der Arbeitsgruppe „Proteinbiochemie und Metabolite Profiling“ unter Dr. Thomas Vogt
04/2008 – 01/2012	Promotion am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in der Arbeitsgruppe „Proteinbiochemie und Metabolite Profiling“ unter Dr. Thomas Vogt
04/2007 – 03/2008	Diplomarbeit am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in der Arbeitsgruppe „Molekulare Kommunikation in Pflanze-Pathogen-Interaktionen“ unter Dr. Wolfgang Knogge
10/2005 – 02/2006	Praktikum zum Thema der Arabidopsis-Phytophthora-Interaktion in der School of Biological Sciences and Biotechnology an der Murdoch University in Perth, Westaustralien
08/2004 – 10/2004	Praktikum im Bereich der Trink- und Abwasseruntersuchung im Umweltlabor Rhön Rennsteig GmbH
10/2003 – 03/2008	Studium der Molekularen Biotechnologie an der Hochschule Anhalt (FH) Köthen (Dipl.-Ing. (FH): 1,5)
09/1995 – 07/2003	Abitur (Note: 2,2) am Werratal-Gymnasium Schwallungen

Halle (Saale) den, 07. Februar 2012

Lisette Wirsing

Publikationsliste

Teile der vorliegenden Dissertation sind in folgende Publikationen in Fachzeitschriften und Tagungsbeiträge eingegangen.

Publikationen in Fachzeitschriften

Wirsing, Lisette; Naumann, Kai & Vogt, Thomas (2011). Arabidopsis methyltransferase finger- prints by affinity-based protein profiling. *Anal Biochem*, 408(2), 220–225.

Tagungsbeiträge

Vorträge:

Wirsing, Lisette: Capture compound mass spectrometry (CCMS) - a novel tool for analyzing *O*-methyltransferases in plants. 5th Plant Science Student Conference, 23. - 26.06.2009, Halle (Saale), Deutschland

Poster:

Wirsing, Lisette; Brauch, Sebastian; Klein, Robert; Naumann, Kai; Westermann, Bernhard; Vogt, Thomas: Activity-based Protein Profiling of *O*-methyltransferases in *Arabidopsis thaliana* – Modeling, Synthesis and Application. 6th Plant Science Student Conference, 15. - 18.06.2010, Gatersleben, Deutschland

Wirsing, Lisette; Naumann, Kai; Vogt, Thomas: Affinity-based Protein Profiling enables Arabidopsis Methyltransferase Fingerprints. ProteomLux 2010, 18.10 - 20.10.2010, Luxemburg, Luxemburg

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), den 07. Februar 2012

Lisette Wirsing