

Dissertation

vorgelegt der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Fakultät
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Deutschland

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

von Mgr. Iwona Stephan
geb. in Golub-Dobrzyn, Polen

Mündliche Prüfung:.....

**Identifizierung und Charakterisierung
von N-terminalen Acetyltransferasen
in *Arabidopsis thaliana***

Gutachter: Prof. Dr. Rüdiger Hell

Prof. Dr. Thomas Rausch

Inhaltsverzeichnis:

Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
Zusammenfassung	XII
Summary	XIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Modifikationen des N-Terminus von Proteinen	1
1.1.1 Methionin-Abspaltung	2
1.1.2 N ^α -terminale Acetylierung von Proteinen	4
1.1.2.1 Die Bedeutung der N-terminalen Acetylierung	5
1.1.3 Die Struktur der Nat-Komplexe	6
1.1.3.1 NatA-Komplex	8
1.1.3.2 NatB-Komplex	10
1.1.3.3 NatC-Komplex	11
1.1.3.4 NatD-Komplex	12
1.1.3.5 NatE-Komplex	12
1.2 Ziel der Arbeit.....	13
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Ausstattung und Materialien	15
2.1.1 Geräte	15
2.1.2 Verbrauchsmaterial	17
2.1.3 Chemikalien	18
2.1.4 Kits	20
2.1.5 Enzyme.....	21
2.1.6 Primer	21
2.1.7 Software	21
2.2 Biologisches Material	22
2.2.1 Bakterienstämme	22
2.2.2 Hefestämme.....	22
2.2.3 Pflanzenmaterial	22
2.3 Methoden der Pflanzenarbeit	23
2.3.1 Pflanzenanzucht	23

2.3.1.1	Anzucht auf Erde.....	23
2.3.1.2	Pflanzenanzucht auf AT-Medium.....	24
2.3.2	Selektion von Arabidopsis-Keimlingen.....	24
2.3.3	Extraktion genomischer DNA (gDNA) aus Arabidopsis Gewebe.....	25
2.3.4	RNA-Isolation.....	25
2.3.5	Isolierung löslicher Proteine aus Arabidopsis-Gewebe.....	26
2.3.6	Chlorophyllextraktion aus Arabidopsis-Gewebe und Bestimmung der Chlorophyllkonzentration.....	26
2.3.7	Transformation von Pflanzen.....	27
2.3.7.1	Stabile Transformation von Arabidopsis.....	27
2.3.7.2	Transiente Transformation von Tabak.....	27
2.3.8	Pollen Vitalitätstest.....	27
2.3.9	Präparation von Arabidopsis-Embryonen.....	28
2.4	Molekularbiologische Methoden.....	28
2.4.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	28
2.4.2	Quantitative RT-PCR.....	29
2.4.3	PEG-Aufreinigung der PCR-Produkte.....	30
2.4.4	DNA-Gelelektrophorese.....	30
2.4.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	30
2.4.6	DNA-Restriktion.....	30
2.4.7	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	31
2.4.8	Konzentrationsbestimmung von RNA.....	31
2.4.9	cDNA-Synthese.....	31
2.4.10	Klonierung.....	31
2.4.10.1	Gateway-Klonierung.....	31
2.4.10.2	Klonierung mittels Endonukleasen und Ligation.....	32
2.4.10.3	Verwendete Vektoren.....	33
2.4.11	Sequenzierung.....	33
2.5	Bakteriologische Methoden.....	34
2.5.1	Bakterienanzucht.....	34
2.5.2	Proteinextraktion aus <i>Escherichia coli</i>	34
2.5.3	Herstellung kompetenter Zellen.....	35
2.5.4	Transformation von Bakterien.....	35
2.5.5	Plasmidpräparation mittels Affinitätsmatrix.....	36

2.6	Biochemische Methoden.....	36
2.6.1	Aufreinigung von rekombinanten Proteinen unter nativen Bedingungen	36
2.6.1.1	Aufreinigung von AtNAA50p.....	36
2.6.1.2	Aufreinigung von AtNAA10p.....	36
2.6.2	Aufreinigung von rekombinanten Proteinen unter denaturierenden Bedingungen.....	37
2.6.3	Aufreinigung potenzieller Interaktionspartner von AtNAA10p unter nativen Bedingungen.....	38
2.6.4	Größenausschluss-Chromatographie.....	39
2.6.5	Aufkonzentrierung von Proteinen	39
2.6.6	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	39
2.6.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
2.6.8	Isoelektrische Fokussierung von Proteinen.....	40
2.6.9	Visualisierung der aufgetrennten Proteine	41
2.6.10	Immunologische Detektion von Proteinen.....	42
2.6.10.1	Herstellung und Aufreinigung eines spezifischen Antikörpers gegen AtNAA10p	42
2.6.10.2	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembrane (<i>Western Blot</i>)	43
2.6.10.3	Immunologischer Nachweis der Proteine.....	43
2.6.11	Massenspektrometrische Analyse	44
2.6.12	<i>In vitro</i> N ^α -Acetyltransferase-Aktivitätstest.....	44
2.7	<i>Confocal laser scanning microscopy</i> (CLSM)	45
2.8	Statistische Methoden	46
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Identifizierung der katalytischen Untereinheit des NatA-Komplexes	47
3.1.1	Biochemische Charakterisierung von AtNAA10p.....	48
3.1.1.1	Charakterisierung der Proteinstruktur von AtNAA10p	48
3.1.1.2	Überexpression und Aufreinigung des rekombinanten AtNAA10p	51
3.1.1.3	Identifizierung potentieller Interaktionspartner von AtNAA10p.....	53
3.1.2	<i>In vitro</i> N ^α -Acetyltransferase-Aktivitätstest von MBP-His:NAA10p.....	55
3.1.3	Subzelluläre Lokalisierung von AtNAA10p in <i>Nicotiana spec.</i>	56
3.1.4	<i>In vivo</i> Charakterisierung der <i>naa10-1</i> T-DNA-Insertionslinie	57
3.1.4.1	Molekulare Charakterisierung der <i>naa10-1</i> T-DNA-Insertionslinie.....	58
3.1.4.2	Charakterisierung der Embryogenese heterozygoter <i>naa10-1</i> -Pflanzen.	59

3.1.5	Komplementierung heterozygoter <i>naa10-1</i> -Pflanzen durch Überexpression von endogenem NAA10p.....	60
3.1.6	Komplementierung heterozygoter <i>naa10-1</i> -Pflanzen durch Überexpression des <i>S. cerevisiae</i> Naa10-Orthologs	62
3.2	Identifizierung der Anker-Untereinheit des NatA-Komplexes.....	65
3.2.1	Biochemische Charakterisierung von AtNAA15p	66
3.2.1.1	Charakterisierung der Proteinstruktur von AtNAA15p	66
3.2.1.2	Überexpression und Aufreinigung des rekombinanten AtNAA15p	72
3.2.2	Subzelluläre Lokalisierung von AtNAA15p in <i>Nicotiana spec.</i>	73
3.2.3	<i>In vivo</i> Charakterisierung der <i>naa15-1</i> und <i>naa15-2</i> T-DNA-Insertionslinien	74
3.2.3.1	Molekulare Charakterisierung der <i>naa15-1</i> und <i>naa15-2</i> T-DNA-Insertionslinien	75
3.2.3.2	Charakterisierung der Embryogenese heterozygoter <i>naa15-1</i> - und <i>naa15-2</i> -Pflanzen.....	77
3.2.4	Identifizierung und Charakterisierung der AtNAA15 <i>knock down</i> Linien (amiNAA15).....	78
3.2.4.1	Quantitative Transkriptionsanalyse der amiNAA15-Pflanzen.....	81
3.3	Identifizierung der katalytischen Untereinheit des NatB-Komplexes	83
3.3.1	Biochemische Charakterisierung von AtNAA20p	84
3.3.1.1	Charakterisierung der Proteinstruktur von AtNAA20p	84
3.3.1.2	Überexpression und Aufreinigung des rekombinanten AtNAA20p	86
3.3.2	Subzelluläre Lokalisierung von AtNAA20p	87
3.3.2.1	Subzelluläre Lokalisierung von AtNAA20p in <i>Nicotiana spec.</i>	88
3.3.2.2	Subzelluläre Lokalisierung von AtNAA20p in <i>A. thaliana</i>	88
3.3.3	<i>In vivo</i> Charakterisierung der <i>naa20-1</i> und <i>naa20-2</i> T-DNA-Insertionslinien	90
3.3.3.1	Molekulare Charakterisierung der <i>naa20-1</i> und <i>naa20-2</i> T-DNA-Insertionslinien	91
3.3.3.2	Wachstum homozygoter <i>naa20-1</i> - und <i>naa20-2</i> -Pflanzen	92
3.3.3.3	Chlorophyllbestimmung von homozygoten <i>naa20-1</i> - und <i>naa20-2</i> -Pflanzen.....	94
3.3.3.4	Semiquantitative Transkriptionsanalyse homozygoter <i>naa20-1</i> - und <i>naa20-2</i> -Pflanzen	95
3.3.4	Komplementierung homozygoter <i>naa20-1</i> -Pflanzen durch Überexpression von endogenem NAA20p.....	97
3.3.5	Identifizierung der AtNAA20-Substrate	99

3.3.5.1	Identifizierung modifizierter Proteine in homozygoten <i>naa20-1</i> -Pflanzen	99
3.3.5.2	Identifizierung acetylierter Proteine in homozygoten <i>naa20-1</i> -Pflanzen	101
3.3.6	Komplementierung homozygoter <i>naa20-1</i> -Pflanzen durch Überexpression des <i>S. cerevisiae</i> Naa20-Orthologs	103
3.4	Identifizierung der katalytischen Untereinheit des NatE-Komplexes.....	106
3.4.1	Biochemische Charakterisierung von AtNAA50p	107
3.4.1.1	Charakterisierung der Proteinstruktur von AtNAA50p	107
3.4.1.2	Überexpression und Aufreinigung des rekombinanten AtNAA50p	109
3.4.1.3	Verifizierung der Tertiärstruktur von AtNAA50p	111
3.4.2	<i>In vitro</i> N ^α -Acetyltransferase-Aktivitätstest von His:NAA50p	112
3.4.3	Subzelluläre Lokalisierung von AtNAA50p in <i>Nicotiana spec.</i>	114
3.4.4	<i>In vivo</i> Charakterisierung der <i>naa50-1</i> und <i>naa50-2</i> T-DNA-Insertionslinien	115
3.4.4.1	Molekulare Charakterisierung der <i>naa50-1</i> und <i>naa50-2</i> T-DNA-Insertionslinien	115
3.4.4.2	Semiquantitative Transkriptionsanalyse homozygoter <i>naa50-1</i> - und <i>naa50-2</i> -Pflanzen	117
3.4.4.3	Wachstum homozygoter <i>naa50-1</i> - und <i>naa50-2</i> -Pflanzen	119
3.4.5	Komplementierung heterozygoter <i>naa50-2</i> -Pflanzen durch Überexpression von endogenem NAA50p.....	120
3.4.6	Komplementierung heterozygoter <i>naa50-2</i> -Pflanzen durch Überexpression des <i>H. sapiens</i> Naa50-Orthologs.....	123
3.4.6.1	Pollenvitalität von HsNaa50p exprimierenden homozygoten <i>naa50-2</i> -Pflanzen.....	125
4	Diskussion	127
4.1	Charakterisierung des NatA-Komplexes in Arabidopsis	127
4.2	Charakterisierung des NatE-Komplexes in Arabidopsis	131
4.3	Charakterisierung des NatB-Komplexes in Arabidopsis	134
5	Literaturverzeichnis	138
6	Anhang	149
6.1	Proteinsequenzen	149
6.2	Identifizierung der orthologen AtNAA10, AtNAA15, AtNAA20, AtNAA50 Proteine	152
6.3	Primersequenzen	154
6.3.1	Genotypisierungsprimer	154

6.3.2	Primer für die RT-PCR-Analyse	156
6.3.3	Klonierungsprimer	157
6.3.4	Sequenzierungsprimer	159
6.4	Karten hergestellter Konstrukte	159
6.5	Subzelluläre Lokalisierung von AtNAA20 und AtNAA50 in <i>N. tabacum</i>	164
6.6	Komplementierung des <i>naa10</i> -Phänotyps	165
6.7	Trockengewicht.....	165
6.8	Lokalisierungsvorhersage der putativen NatB-Substrate.....	168
Publikationen		169
Erklärung		170
Danksagung		171

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 3.1	Die evolutionäre Verwandtschaft des AtNAA10p zu niederen und höheren Eukaryoten sowie Cyanobakterien	47
Abbildung 3.2	Proteinsequenzvergleich zwischen orthologen NAA10-Proteinen	50
Abbildung 3.3	Aufreinigung von AtNAA10p unter nativen Bedingungen.....	52
Abbildung 3.4	Aufreinigung von AtNAA10p unter denaturierenden Bedingungen....	53
Abbildung 3.5	Aufreinigung von AtNAA10p mittels <i>Tandem Affinity Purification</i> System.....	54
Abbildung 3.6	N ^α -Acetyltransferaseaktivität des Arabidopsis MBP-His:NAA10p.....	55
Abbildung 3.7	Lokalisierung des AtNAA10:EYFP-Fusionsproteins in <i>Nicotiana spec.</i>	57
Abbildung 3.8	Struktur des <i>AtNAA10</i> -Gens (<i>At5g13780</i>) mit einer T-DNA-Insertion	58
Abbildung 3.9	Genotypisierung der <i>naa10-1</i> T-DNA-Insertionslinie.....	59
Abbildung 3.10	Embryogenese heterozygoter <i>naa10-1</i> -Pflanzen	60
Abbildung 3.11	Komplementierung des <i>naa10-1</i> -Phänotyps mit AtNAA10p.....	61
Abbildung 3.12	Semiquantitative RT-PCR-Analyse von ScNaa10p exprimierenden heterozygoten <i>naa10-1</i> -Pflanzen	63
Abbildung 3.13	Komplementierung heterozygoter <i>naa10-1</i> -Pflanzen mit dem orthologen Naa10p aus Hefe.....	64
Abbildung 3.14	Die evolutionäre Verwandtschaft des AtNAA15p zu niederen und höheren Eukaryoten	65
Abbildung 3.15	Proteinsequenzvergleich zwischen orthologen NAA15-Proteinen	71
Abbildung 3.16	Induktionskontrolle des His:NAA15-Fusionsproteins	73
Abbildung 3.17	Lokalisierung des AtNAA15:EYFP-Fusionsproteins in <i>Nicotiana spec.</i>	74
Abbildung 3.18	Struktur des <i>AtNAA15</i> -Gens (<i>At1g80410.1</i>) mit zwei unabhängigen T-DNA-Insertionen	75
Abbildung 3.19	Zygotiebestimmung von <i>naa15-1</i> - und <i>naa15-2</i> -Mutanten	77
Abbildung 3.20	Embryogenese heterozygoter <i>naa15-1</i> - und <i>naa15-2</i> -Pflanzen	78
Abbildung 3.21	Phänotyp der amiNAA15-Pflanzen	80
Abbildung 3.22	Quantitative RT-PCR-Analyse der amiNAA15-Pflanzen	82
Abbildung 3.23	Die evolutionäre Verwandtschaft des AtNAA20p zu niederen und höheren Eukaryoten sowie Cyanobakterien	83
Abbildung 3.24	Proteinsequenzvergleich zwischen orthologen NAA20-Proteinen	86
Abbildung 3.25	Induktionskontrolle des His:NAA20-Fusionsproteins	87
Abbildung 3.26	Lokalisierung des AtNAA20:EYFP-Fusionsproteins in <i>N. benthamiana</i>	88

Abbildung 3.27 Lokalisierung des AtNAA20-EYFP-Fusionsproteins in Arabidopsis-Keimlingen.....	89
Abbildung 3.28 Struktur des <i>AtNAA20</i> -Gens (<i>At1g03150</i>) mit zwei unabhängigen T-DNA-Insertionen	90
Abbildung 3.29 Genotypisierung der <i>naa20-1</i> und <i>naa20-2</i> T-DNA-Insertionslinien ..	92
Abbildung 3.30 Wachstumsphänotyp homozygoter <i>naa20-1</i> - und <i>naa20-2</i> -Pflanzen ...	93
Abbildung 3.31 Chlorophyllgehalt homozygoter <i>naa20-1</i> - und <i>naa20-2</i> -Pflanzen.....	95
Abbildung 3.32 Semiquantitative RT-PCR-Analyse homozygoter <i>naa20-1</i> - und <i>naa20-2</i> -Pflanzen	96
Abbildung 3.33 Komplementierung des <i>naa20</i> -Phänotyps mit AtNAA20p.....	98
Abbildung 3.34 2-D Gel Analyse eines Gesamtproteinextrakts aus homozygoten <i>naa20-1</i> -Pflanzen	100
Abbildung 3.35 Potentielle Substrate der orthologen AtNAA20-Acetyltransferase	103
Abbildung 3.36 Wachstumsphänotyp von ScNaa20p exprimierenden homozygoten <i>naa20-1</i> -Pflanzen.....	105
Abbildung 3.37 Die evolutionäre Verwandtschaft des AtNAA50p zu niederen und höheren Eukaryoten sowie Cyanobakterien	106
Abbildung 3.38 Proteinsequenzvergleich zwischen orthologen NAA50-Proteinen	109
Abbildung 3.39 Aufreinigung von AtNAA50p mittels <i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>	110
Abbildung 3.40 Größenausschluss-Chromatographie von His:NAA50p.....	112
Abbildung 3.41 N ^α -Acetyltransferaseaktivität des Arabidopsis His:NAA50p.....	113
Abbildung 3.42 Lokalisierung des AtNAA50:EYFP-Fusionsproteins in <i>N. benthamiana</i>	114
Abbildung 3.43 Struktur des <i>AtNAA50</i> -Gens (<i>At5g11340</i>) mit zwei unabhängigen T-DNA-Insertionen	115
Abbildung 3.44 Zygotiebestimmung von <i>naa50-1</i> - und <i>naa50-2</i> -Mutanten	117
Abbildung 3.45 Semiquantitative RT-PCR-Analyse homozygoter <i>naa50-1</i> - und <i>naa50-2</i> -Pflanzen	118
Abbildung 3.46 Wachstumsphänotyp homozygoter <i>naa50-1</i> - und <i>naa50-2</i> -Pflanzen	120
Abbildung 3.47 Komplementierung des <i>naa50</i> -Phänotyps mit AtNAA50p.....	122
Abbildung 3.48 Komplementierung heterozygoter <i>naa50-2</i> -Pflanzen mit dem orthologen Naa50p aus Menschen.....	124
Abbildung 3.49 Lebensfähigkeit der Pollen von HsNaa50p exprimierenden <i>naa50-2</i> -Mutanten	126

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 2.1 N-terminale Acetyltransferasen in Hefe und Menschen (Polevoda and Sherman, 2003b; Arnesen et al., 2009b; Starheim et al., 2009a)

Tabelle 2.1 T-DNA-Insertionslinien

Tabelle 2.2 Wachstumsbedingungen in Klimakammern und Percival

Tabelle 2.3 Herstellung von microNAA15 PCR-Produkt

Abkürzungsverzeichnis:

AcCoA	Acetyl-Koenzym A
amiRNA	artificial micro RNA
Amp.	Ampicilin
BASTA	L-Phosphinothricin
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CaMV 35S	<i>The cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CLSM	<i>Confocal laser scanning microscopy</i>
COFRADIC	<i>COmbined FRActional DIagonal Chromatography</i>
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp Columbia-0
DIC	<i>Differential interference contrast</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleotide
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
EYFP	<i>Enhanced yellow fluorescent protein</i>
Gcn5	<i>General Control Nonderepressible protein5</i>
gDNA	genomischer DNA
GNAT	Gcn5-ähnliche N-Acetyltransferasen
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazi-N'-ethansulfonsäure
IEP	Isoelektrischer Punkt
IgG	Immunoglobulin
IMAC	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
Kan.	Kanamycin
KAT	Lysin-Acetyltransferasen
kDa	Kilodalton
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight</i>
MAP	Methioninaminopeptidasen

MBP	Maltose-Binde-Peptid
Min.	Minute
N ^α	α-Amino-Gruppe N-terminaler Aminosäuren
N ^ε	ε-Amino-Gruppe von internen Lysinresten
Nat	N-terminale Acetyltransferasen
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NME	Methionin-Abspaltung
NTA	N-terminale Acetylierung
N-Terminus	Amino-Terminus
p	Protein
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDF	Peptiddeformylasen
Pfl.	Pflanze
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese
Spec.	Spectinomycin
TAP	<i>Tandem Affinity Purification</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
T-DNA	Transferierte DNA
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl) propane-1,3-diol
TPR	<i>tetratricopeptide repeat</i>
ÜN	Über Nacht
(w/v)	Gewichtsprozent

Zusammenfassung

Die N^α-terminale Acetylierung (NTA) gehört zu den häufigsten Proteinmodifikationen in Eukaryoten. Die Funktion der NTA ist vielfältig und vom jeweiligen Protein abhängig. Bisher wurde belegt, dass die N-terminale Modifikation die Funktion und Stabilität eines Proteins sowie Protein-Protein Interaktion beeinflussen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob in der Modellpflanze *A. thaliana* Proteine N-terminal acetyliert werden. Ein Homologievergleich mit den aus Hefe bekannten Nat-Komplexen (NatA, NatB und NatE) identifizierte folgende Kandidatenproteine: AtNAA10p (At5g13780) und AtNAA15p (At1g80410.1) für den NatA-, AtNAA20p (At1g03150) für den NatB- und AtNAA50p (At5g11340) für den NatE-Komplex.

Die enzymatische Charakterisierung der rekombinant exprimierten Enzyme AtNAA10 und AtNAA50, bestätigte die auf Proteinsequenz basierte Vorhersage der enzymatischen Aktivität.

Die transiente Expression von AtNAA10p, AtNAA15p und AtNAA50p in Fusion mit fluoreszierenden Marker-Proteinen in Tabakzellen zeigte die erwartete Lokalisierung im Cytosol und Zellkern. Überraschenderweise wurde das Fusionsprotein AtNAA20:EYFP neben dem Cytosol auch in Mitochondrien in Arabidopsis detektiert, was auf den funktionellen Unterschied zwischen AtNAA20p und den orthologen Proteinen in Hefe und Menschen hindeutet, die im Cytosol vorkommen. Das HsNaa20p wird auch im Zellkern exprimiert.

Die Identifikation einer T-DNA-Insertionslinie (*naa20-1*) für *AtNAA20* ermöglichte die Bestätigung der katalytischen Funktion von AtNAA20p *in vivo*. Die hier gezeigten Ergebnisse deuten ein vergleichbares Substratspektrums des NatB-Komplexes aus Hefe, Menschen und höheren Pflanzen an. Homozygote Pflanzen beider identifizierten T-DNA-Insertionslinien für *AtNAA20* waren deutlich im Wachstum gehemmt, durchliefen aber eine normale Entwicklung, die mit der Produktion von vitalem Saatgut endete. Im Gegensatz hierzu führte der *knock out* der NAA50p nach erfolgreicher Keimung zu einer anormalen Entwicklung während des vegetativen Wachstums. Die homozygoten Pflanzen sind auch nicht fertil. Ein Verlust der NAA10 oder NAA15 Funktion führt zu einem Abort der Embryogenese im globulärem Stadium, das sich durch die erstmalige Differenzierung von Organen auszeichnet.

Es konnte somit gezeigt werden, dass NTA von Proteinen durch die Nat-Komplexe A, B und E nicht nur in Hefe und Menschen sondern auch in Pflanzen konserviert ist, wobei sich funktionelle Alleinstellungsmerkmale der NTA *in planta* andeuten. Des Weiteren konnte belegt werden, dass die N-terminale Acetylierung von Proteinen essentiell für die Entwicklung von höheren Pflanzen ist.

Summary

The N-terminal acetylation (NTA) is one of the most common modifications of eukaryotic proteins. The function of the NTA is manifold and dependent on the respective protein. It was already indicated that the N-terminal acetylation may affect biological function and stability of a protein or protein-protein interaction.

The present study investigated whether some proteins will be acetylated in the model plant *Arabidopsis thaliana*. The search for orthologous proteins of Nat complexes in *Arabidopsis*, which were known in yeast and human, revealed the following candidates: AtNAA10p (At5g13780) and AtNAA15p (At1g80410.1) for the NatA, AtNAA20p (At1g03150) for the NatB and AtNAA50p (At5g11340) for the NatE complex.

Based on the protein sequence, the N^α-acetyltransferase activity for the NAA10 and NAA50 proteins was predicted. The Expression of the N^α-acetyltransferase activity was confirmed using acetylation assay with recombinant proteins, respectively.

In order to identify subcellular localisation of the AtNAA10, AtNAA15 and AtNAA50 proteins a fluorescent protein fusion was used. The transient expression in tobacco cells revealed the expected cytosolic and nucleus localisation. Surprisingly, the fusion protein AtNAA20:EYFP was detected in the cytosol as well as in the mitochondria in *Arabidopsis*. This suggests the functional differences between AtNAA20p and the orthologous proteins from yeast and human, which were localised in the cytosol. The HsNaa20p was expressed in the nucleus too.

The Identification of a T-DNA insertion line (*naa20-1*) for *AtNAA20* allowed the confirmation of the catalytic function of AtNAA20p *in vivo*. The present results showed a comparable substrate spectrum of the NatB complexes in yeast, human and higher plants. Homozygous plants of both T-DNA insertion lines for *AtNAA20* showed retarded growth, but developed normally and produced seeds. Except for effective Germination showed the *knock out* of the NAA50p in contrast abnormal development during vegetative phase. Homozygous plants are also not fertile. A loss of the NAA10 or NAA15 function induced abort of embryogenesis in the globular stage; a stage characterized by the first-time differentiation of organs.

We were able to demonstrate that the NTA of proteins of Nat complexes A, B and E is conserved not only in yeast and human but also in higher plants. However, these present results suggest some unique functional differences of NTA *in planta*. Furthermore, this study indicated that NTA is essential for development of higher plants.

1. Einleitung

1.1 Modifikationen des N-Terminus von Proteinen

Am N-terminalen Ende von Proteinen treten zahlreichen Modifikationen auf, die während der Proteinsynthese, wie N^α-terminale Acetylierung und Methionin-Abspaltung, oder nach der Translation wie beispielsweise Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung oder N^ε-Acetylierung, stattfinden. Die Abspaltung des initialen Methionins sowie die Acetylierung N-terminaler Aminosäurereste kommen in Eukaryoten mengenmäßig am häufigsten vor (Bradshaw et al., 1998; Polevoda et al., 1999; Polevoda and Sherman, 2000; Arnesen et al., 2009b). Die Acetylierung ist eine enzymatisch katalysierte Reaktion, bei der die Acetyl-Gruppe von Acetyl-Coenzym A (AcCoA) durch verschiedene Acetyltransferasen auf die ε-Amino-Gruppe von internen Lysinresten oder auf die α-Amino-Gruppe N-terminaler Aminosäuren übertragen wird (Driessen et al., 1985; Polevoda and Sherman, 2002, 2003a; Marmorstein, 2004).

Die N^ε-Acetylierung wird durch Lysin-Acetyltransferasen (KATs) katalysiert und findet post-translational statt. Histone, Transkriptions- und nukleare Importfaktoren sowie α-Tubulin wurden als Substrate der N^ε-Acetylierung identifiziert (MacRae, 1997; Struhl, 1998; Bannister et al., 2000; Marmorstein, 2004). Die Acetylierung von internen Lysinresten ist reversibel (Grant, 2001) und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression, dem Zellzyklus, DNA-Replikation, Rekombination, Reparatur und Apoptose (Kouzarides, 1999; Marmorstein, 2004).

Die NTA findet in Eukaryoten meistens co-translational statt, sobald das naszierende Peptid eine Länge von 25 bis 50 Aminosäureresten besitzt (Strous et al., 1973; Strous et al., 1974; Driessen et al., 1985). Die Reaktion wird durch N-terminale Acetyltransferasen (Nat) katalysiert, welche in direktem Kontakt zum Ribosom stehen (Yoshida and Lin, 1972; Pestana and Pitot, 1974, 1975). Es wird vermutet, dass die N-terminale Modifikation ein irreversibler Vorgang ist (Driessen et al., 1985; Pesaresi et al., 2003). In *S. cerevisiae* und *H. sapiens* sind fünf Nat-Komplexe, NatA, NatB, NatC, NatD und NatE, (Tabelle 1.1) bekannt, welche zahlreiche Substratspezifitäten besitzen. Die NatB (Kapitel 1.1.3.2), NatC (Kapitel 1.1.3.3) und NatE Acetyltransferasen (Kapitel 1.1.3.5) acetylieren unmittelbar das N-terminale Methionin. NatA (Kapitel 1.1.3.1) und NatD (Kapitel 1.1.3.4) acetylieren den ersten

Aminosäurerest nach der Methionin-Abspaltung (Kapitel 1.1.1). An wenigen Beispielen konnte gezeigt werden, dass auch post-translationale N^α-Acetylierung möglich ist. So kann die NTA, nach einer proteolytischen Aktivität, am neu entstandenen N-Terminus z. B. bei Peptidhormonen stattfinden (Dockray, 1987; Dores et al., 1990). Die post-translationale Modifikation wird jedoch durch Enzyme katalysiert, die über andere Spezifitäten als co-translational agierende Acetyltransferasen verfügen. Interessanterweise wurde ebenfalls gezeigt, dass die N-terminale Acetyltransferase Naa10 aus Menschen unabhängig vom NatA-Komplex den N-Terminus von Aktin post-translationally acetylieren kann (Van Damme et al., 2011).

1.1.1 Methionin-Abspaltung

Proteine von Prokaryoten, Mitochondrien und Chloroplasten tragen als initiiierende Aminosäure ein N-Formyl-Methionin während cytosolische Proteine eukaryotischer Zellen mit Methionin beginnen (Halbreich and Rabinowitz, 1971; Meinnel et al., 1993; Takeuchi et al., 1998). Die Methionin-Abspaltung (NME) wird durch Peptiddeformylasen (PDF) und Methioninaminopeptidasen (MAP) vermittelt. PDF-Aktivität ist zunächst notwendig um die Formyl-Gruppe zu entfernen (Solbiati et al., 1999; Giglione et al., 2000a; Giglione et al., 2000b; Giglione and Meinnel, 2001). Anschließend wird das N-terminale Methionin bei ca. 60 % aller Proteine durch MAP abgespalten (Meinnel et al., 1993; Bradshaw et al., 1998; Giglione et al., 2000a; Giglione and Meinnel, 2001; Giglione et al., 2004), sofern sich an der zweiten Position eine kleine und ungeladene Aminosäure wie Ala, Cys, Gly, Pro, Ser, Thr oder Val befindet (Sherman et al., 1985; Ben-Bassat et al., 1987; Hirel et al., 1989; Moerschell et al., 1990; Li and Chang, 1995). Die Methionin-Abspaltung erfolgt in Eukaryoten co-translational (Pine, 1969; Arfin and Bradshaw, 1988) sobald das naszierende Peptid eine Länge von 15 bis 30 Aminosäureresten besitzt (Jackson and Hunter, 1970; Yoshida et al., 1970; Driessen et al., 1985; Kendall et al., 1990; Polevoda and Sherman, 2003a). Die MAP-Aktivität kann vollständig oder teilweise inhibiert werden, wenn an dritter Stelle ein Prolin vorliegt (Moerschell et al., 1990). Der NME-Prozess erfolgt in Eukaryoten mit Hilfe von zwei Methioninaminopeptidasen, während Prokaryoten lediglich eine MAP besitzen (Kendall and Bradshaw, 1992; Giglione et al., 2000b; Chen et al., 2002; Giglione et al., 2004). MAP1 ist in Mitochondrien, Chloroplasten sowie im Cytosol lokalisiert (Giglione et al., 2000b; Serero et al., 2003;

Ross et al., 2005), wohingegen MAP2 nur im Cytosol vorkommt (Giglione et al., 2004; Ross et al., 2005). Die Methionin-Abspaltung ist essentiell in allen bislang untersuchten Organismen (Meinzel et al., 1993; Giglione et al., 2000a; Lowther and Matthews, 2000; Giglione et al., 2004). MAP2 in Tieren ist ein bifunktionales Protein, welches über *protection of eIF2 α phosphorylation*- (Ray et al., 1992) und NME-Aktivität (Ray et al., 1992; Liu et al., 1998) verfügt. Der *knock down* von MAP2 in Tieren führt zur Phosphorylierung des eIF2 α -Translations-Initiationsfaktors und letztendlich zur Apoptose (Datta, 2000). In *Drosophila melanogaster* beeinträchtigt die Inaktivierung des MAP2-Gens das Wachstum und veranlasst Embryoletalität (Cutforth and Gaul, 1999). Das MAP2-Protein in Pflanzen und Pilzen weist dagegen keine *protection of eIF2 α phosphorylation*-Aktivität auf (Giglione et al., 2000b; Ross et al., 2005), darum ist der *knock out* von MAP2 in *Saccharomyces cerevisiae* lebensfähig, jedoch führt die Inaktivierung des MAP1 zum verlangsamten Wachstum (Li and Chang, 1995). Viele anti-karzinogene Medikamente wie beispielsweise Fumagillin adressieren MAP als Ziel (Sin et al., 1997; Lowther et al., 1999; Ross et al., 2005). NME ist möglicherweise ebenfalls mit dem *N-end rule* Prozess verknüpft und beeinflusst dadurch die Halbwertszeit der Proteine (Arfin and Bradshaw, 1988; Meinzel et al., 2006). In höheren Pflanzen verhindert die Inaktivierung der plastidären MAPs, MAP1B (At3g25740), MAP1C (At1g13270) und MAP1D (At4g37040), die Entwicklung zum funktionsfähigen Chloroplasten, was auf die Instabilität der essentiellen in Chloroplasten kodierten Proteine zurückzuführen ist (Giglione and Meinzel, 2001; Serero et al., 2001; Giglione et al., 2003). In Arabidopsis wurden drei MAPs, MAP1A (At2g45240), MAP2A (At2g44180) und MAP2B (At3g59990), im Cytosol identifiziert. Der *knock down* von MAP1A, MAP2s und der *knock out* von MAP1 weisen einen Phänotyp vergleichbar zum Wildtyp auf. Dies weist auf deren funktionelle Austauschbarkeit hin, wobei nur wesentliche Menge der MAP2s die MAP1A-Aktivität kompensieren kann. Die MAP1A spielt eine wichtige Rolle bei der Wurzelentwicklung und bei der Transition zwischen der vegetativen und generativen Phase. Die vollständige Inaktivierung der cytosolischen NME-Aktivität verhindert die Pflanzenentwicklung nach der Keimung (Ross et al., 2005). Die Methionin-Abspaltung ermöglicht ebenfalls weitere N-terminalen Modifikationen wie beispielsweise Myristoylierung oder N-terminalen Acetylierung (Driessen et al., 1985; Kendall et al., 1990; Krishna and Wold, 1993).

1.1.2 N^α-terminale Acetylierung von Proteinen

Das erste N^α-terminal acetylierte Polypeptid wurde 1958 im Tabakmosaikvirus identifiziert (Narita, 1958). Seitdem dient zur Charakterisierung der N-terminalen Acetylierung (NTA) primär der Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* sowie menschliche Zellkulturen. Mittels *COmbined FRActional DIagonal Chromatography* (COFRADIC) wurde verifiziert, dass in *S. cerevisiae* ca. 57 %, in *Homo sapiens* etwa 84 % cytosolischer Proteine N-terminal acetyliert sind (Arnesen et al., 2009b). Die N^α-terminal acetylierten Proteine haben kein gemeinsames Sequenzmotiv, was die Vorhersage der N^α-Acetylierung schwer macht. Die Studien an Hefe und menschlichen Proteinen zeigen jedoch, dass die Effizienz der N-terminale Acetylierung für viele Proteine durch die Identität der ersten zwei Aminosäuren bestimmt wird (Arnesen et al., 2009b). Alanin und Serin gehören mit 67 % zu den am häufigsten acetylierten Aminosäuren (Driessen et al., 1985), zusammen mit Glyzin, Threonin und Methionin repräsentieren sie 95 % des acetylierten N-Terminus. Trotzdem garantiert keine dieser Aminosäuren eine N-terminale Acetylierung (Driessen et al., 1985; Persson et al., 1985; Flinta et al., 1986; Kendall et al., 1990; Bradshaw et al., 1998). Die NTA kann dennoch mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit vorausgesagt werden, wenn die ersten Aminosäuren Met-Glu-, Met-Asp- oder Met-Asn- sind (Polevoda and Sherman, 2003a; Arnesen et al., 2009b). Die Acetylierung kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. So wurde vor allem der Aminosäure Prolin eine inhibitorische Wirkung nachgewiesen. Saure Aminosäuren wie Asparaginsäure oder Glutaminsäure können dagegen die Acetylierung fördern (Polevoda and Sherman, 2003a). Auch die AcCoA-Verfügbarkeit kann die Rate der N^α-Acetylierung beeinflussen. So wird beispielweise das Melanozyt stimulierende Peptidhormon (α -MSH) nur Gewebespezifisch acetyliert (Grand et al., 1981). Ebenso kann der Enzymmangel zu einer unvollständigen Acetylierung führen, was in Hefe bei der Alkohol-Dehydrogenase gezeigt wurde (Jornvall et al., 1980).

Im Gegensatz zur eukaryotischen Zelle ist die N-terminale Acetylierung von Proteinen im prokaryotischen System selten. Basierend an 873 identifizierten N-terminalen Peptiden in *Halobacterium salinarum* und *Natronomonas pharaonis*, beträgt der Anteil der acetylierten Proteine in Archaeae etwa 15 %. Die NTA von Proteinen findet lediglich an Serin und Alanin statt (Falb et al., 2006). Die acetylierten Proteine in *Sulfolobus solfataricus* weisen am N-Terminus zusätzlich zu Serin und Alanin ebenfalls

Threonin und Methionin-Glutaminsäure auf. Die aktive Acetyltransferase von *S. solfataricus* zeigt eine hohe Ähnlichkeit mit Acetyltransferasen der Eukaryoten (Mackay et al., 2007). Die NTA in *Escherichia coli* ist sehr selten und findet post-translational statt. Es konnten lediglich vier N-terminal acetylierte Proteine, die ribosomalen Proteine S18, S5 und L12 sowie Elongationsfaktor EF-Tu, identifiziert werden (Cumberlidge and Isono, 1979; Arai et al., 1980; Isono and Isono, 1980; Isono and Isono, 1981; Polevoda and Sherman, 2003a; Miao et al., 2007). In *E. coli* wurden drei N-terminale Acetyltransferasen identifiziert, RimI, RimJ und RimL, welche jeweils Ala-Arg-, Ala-His- und Ser-Ile- acetylieren (Yoshikawa et al., 1987; Tanaka et al., 1989). RimL kann neben Ser-Ile- auch N-terminale Alaninreste acetylieren (Miao et al., 2007). Die prokaryotischen Acetyltransferasen besitzen sehr wahrscheinlich keine zusätzlichen Untereinheiten, sind jedoch als Homodimere aktiv (Vetting et al., 2005a; Miao et al., 2007).

1.1.2.1 Die Bedeutung der N-terminalen Acetylierung

Die Funktion der N^α-Acetylierung von Proteinen ist vielfältig und kann für ein spezifisches Substrat bislang nicht vorhergesagt werden. Es wurde jedoch an Einzelbeispielen gezeigt, dass die NTA die enzymatische Funktion und Stabilität eines Proteins sowie Protein-Protein Interaktionen beeinflussen kann. So wird beispielsweise die erhöhte Stabilität der murinen Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase (Johnson et al., 1988) sowie die vermehrte Dissoziation des menschlichen fötalen Hämoglobins (HbF₁) im Vergleich zum normalen HbF (Manning and Manning, 2001) auf deren N^α-Acetylierung zurückgeführt. Der Verlust der N^α-Acetylierung reduziert die Hitze-Stabilität des S5 Proteins von *E. coli* (Cumberlidge and Isono, 1979) und der NADH-spezifischen Glutamatdehydrogenase von *Neurospora crassa* (Siddig et al., 1980). Die N^α-Acetylierung von Tropomyosin ist entscheidend für die funktionale Bindung und Stabilität von Aktinfilamenten (Singer and Shaw, 2003). Ebenso ist diese Modifikation von Bedeutung für die hemmende Wirkung des Phosphatidylethanolamin-Bindeproteins (Tfs1p), welches als Regulator vom Proteinkinase A-System dient (Caesar and Blomberg, 2004). In den 80er Jahren wurde postuliert, dass die NTA den Abbau durch Aminopeptidasen hemmt und die betreffenden Proteine dadurch vor Degradation schützt (Jornvall, 1975; Barra et al., 1978). Demgegenüber zeigt andere Studie in *S. cerevisiae*, dass N-terminal acetylierte Aminosäuren wie Met, Ala, Val, Ser, Thr und

Cys als Degradations-Signal für die Doa10 Ubiquitin-Ligase (^{15}N -degrons) erkannt werden. Es wird vermutet, dass dieses Degradation-Signal als Qualitätskontrolle und Regulation der Stöchiometrie von Proteinen dient (Hwang et al., 2010). Im Falle der Alkohol-Dehydrogenase (Jornvall et al., 1980; Hoog et al., 1987) und des Chaperonin Hsp10 (Ryan et al., 1995) hat die N^{α} -Acetylierung keine Auswirkung auf die Stabilität und Funktion der jeweiligen Proteine. Die post-translationale N^{α} -Acetylierung hat ebenfalls eine wichtige biologische Bedeutung. Sie erhöht die Pigmenterzeugung des MSH-Hormons (Ramachandran and Choh Hao, 1967) und reduziert die Opiat-Aktivität des β -Endorphins (Smyth et al., 1979).

1.1.3 Die Struktur der Nat-Komplexe

Die Struktur der Nat-Komplexe wurde zunächst in Hefe untersucht und dient als Vergleich für andere eukaryotischen Organismen wie beispielweise *H. sapiens* und *Arabidopsis thaliana*. *S. cerevisiae* verfügt über fünf N-terminale Acetyltransferasen (Nats), NatA-NatE, welche ein großes Spektrum an N-terminalen Sequenzen acetylieren (Tabelle 1.1). Die bedeutendsten N-terminale Acetyltransferasen setzen sich aus einer katalytischen und einer (NatA, NatB) oder zwei Anker-Untereinheiten (NatC) zusammen (Mullen et al., 1989; Park and Szostak, 1992; Tercero and Wickner, 1992; Polevoda et al., 1999; Polevoda and Sherman, 2001; Polevoda et al., 2003; Singer and Shaw, 2003). Die katalytischen Untereinheiten der Nat-Komplexe gehören zu der GNAT-Superfamilie (Gcn5-ähnlichen N-Acetyltransferasen), welche vier konservierte Motive, A, B, C und D, enthält. Die A und B Motive sind am stärksten konserviert und an der AcCoA-Bindung beteiligt. Die zwei andere Motive, C und D, kommen ebenso in vielen Mitglieder der GNAT-Superfamilie vor (Neuwald and Landsman, 1997; Vetting et al., 2005b). Die katalytischen Untereinheiten, Naa10p, Naa20p und Naa30p, genauso wie die Anker-Untereinheiten, Naa15p, Naa25p, Naa35p, weisen untereinander Sequenzähnlichkeit auf. Im Gegensatz dazu gibt es keine Sequenzähnlichkeit zwischen katalytischen und Anker-Untereinheiten (Polevoda and Sherman, 2003b). Die Anker-Untereinheiten, Naa15p, Naa25p, Naa35p, besitzen sechs bis sieben gezielt verteilte *tetratricopeptide repeat* Motive (TPR). TPR sind 34 Aminosäuren-lange degenerierte Wiederholungen, welche z.B. Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen (Polevoda and Sherman, 2003b).

	NatA	NatB	NatC	NatD	NatE
<u>S. cerevisiae</u>					
Katalytische Untereinheit	Naa10p Naa11p*	Naa20p	Naa30p	Naa40p	Naa50p
Anker-Untereinheit	Naa15p Naa16p*	Naa25p	Naa35p Naa38p		Naa15p
Substrate	Ser- Ala- Gly- Thr- Val-* Cys-×	Met-Glu- Met-Asp- Met-Asn-	Met-Ile- Met-Leu- Met-Trp- Met-Phe-	Ser-Gly-etc-	?
Anzahl der Substrate	~2000	~1000	~250	2?	?
<u>H. sapiens</u>					
Die Struktur der Komplexe	Konserviert	Konserviert	Konserviert	Unbekannt	Konserviert
Substrate	Konserviert	Konserviert	Konserviert	Unbekannt	Met-Leu- Met-Ala- Met-Met-

Tabelle 2.1 N-terminale Acetyltransferasen in Hefe und Menschen (Polevoda and Sherman, 2003b; Arnesen et al., 2009b; Starheim et al., 2009a)

Struktur und Substratspezifität der N-terminalen Acetyltransferasen von *S. cerevisiae* und *H. sapiens*. (p) Protein, (*) Naa11p und Naa16p wurden nur in Menschen identifiziert. (×) Die Acetylierung von Cys- am N-Terminus wurde nur in Hefe und die des Val- nur in Menschen gefunden.

Der NatA-Komplex in Hefe setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, der katalytischen (Naa10p) und der Anker-Untereinheit (Naa15p) (Tabelle 1.1), welche den Proteinkomplex am Ribosom verankert (Gautschi et al., 2003). Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass die katalytische Untereinheit des NatA-Komplexes selbst am Ribosom bindet (Polevoda et al., 2008). Des Weiteren spielen möglicherweise auch

zwei andere Proteine, Rpl25p und Rpl35p, eine Rolle bei der Verankerung des NatA-Komplexes am Ribosom (Polevoda et al., 2008). Der NatA-Komplex interagiert zusätzlich mit Naa50p (Gautschi et al., 2003), welche jedoch keinen Einfluss auf die NatA-Aktivität ausübt (Mullen et al., 1989; Park and Szostak, 1992) (Kapitel 1.1.3.5).

Der NatB-Komplex in Hefe besteht genauso wie der NatA-Komplex aus einer katalytischen (Naa20p) (Polevoda et al., 1999) und einer Anker-Untereinheit (Naa25p) (Tabelle 1.1) (Singer et al., 2000; Polevoda et al., 2003) und bindet ebenfalls durch die Anker-Untereinheit am Ribosom. Dennoch liegt der größte Teil der katalytischen Untereinheit frei im Cytosol vor (Polevoda et al., 2008).

Im Gegensatz zu den NatA und NatB Komplexen bilden drei Untereinheiten den NatC-Komplex in Hefe, eine katalytische (Naa30p) und zwei Anker-Untereinheiten (Naa35p und Naa38p) (Tabelle 1.1) (Rigaut et al., 1999; Uetz et al., 2000). Der NatC-Komplex wird durch Naa35p am Ribosom verankert, es ist jedoch ähnlich wie beim NatA-Komplex nicht ausgeschlossen, dass die katalytische Untereinheit selbst am Ribosom bindet (Polevoda et al., 2008). In Hefe werden zur Acetylierung von NatA (Mullen et al., 1989), NatB (Polevoda et al., 2003) und NatC Substraten (Polevoda and Sherman, 2001) alle Untereinheiten des jeweiligen Komplexes benötigt.

NatD in Hefe besteht aus der katalytischen Untereinheit Naa40p. Ob der NatD-Komplex zudem eine Anker-Untereinheit besitzt ist nicht bekannt (Polevoda et al., 2009). Das menschliche Ortholog wurde bisher nicht charakterisiert (Song et al., 2003).

Der NatE-Komplex in Hefe und Menschen besteht aus einer katalytischen, Naa50p, und einer Anker-Untereinheit, Naa15p, welche zugleich die Anker-Untereinheit des NatA-Komplexes darstellt (Kapitel 1.1.3.5) (Gautschi et al., 2003; Arnesen et al., 2006b).

1.1.3.1 NatA-Komplex

Die Struktur und Funktion des NatA-Komplexes ist in Hefe und im Menschen konserviert (Kapitel 1.1.3) (Arnesen et al., 2005b; Arnesen et al., 2009b). In Menschen bindet die katalytische Untereinheit Naa10p und die Anker-Untereinheit Naa15p am Ribosom, signifikante Mengen beider Proteine wurden jedoch auch frei im Cytosol gefunden (Arnesen et al., 2005b). Die Struktur des NatA-Komplexes in Menschen ist durch die Duplikate des Naa10- (Naa11p mit 81 % Identität) und Naa15-Proteins

(Naa16p mit 71 % Identität) vielfältiger als in Hefe. Die zwei putativen Komplexe HsNaa11p-HsNaa15p und HsNaa11p-HsNaa16p wurden jedoch im Gegensatz zum HsNaa10p-HsNaa16p bis jetzt nicht nachgewiesen (Arnesen et al., 2006c; Arnesen et al., 2009a). In Hefe und im Menschen gehört NatA zu den bedeutendsten und am besten untersuchten Nat-Komplexen (Park and Szostak, 1992; Arnesen et al., 2005b). Der NatA-Komplex acetyliert das breiteste Spektrum an N-terminalen Sequenzen (Tabelle 1.1), über 2000 Proteine in Hefe und etwa 8400 menschliche Proteine (Polevoda and Sherman, 2003a; Arnesen et al., 2009b). Nach der Methionin-Abspaltung wird der zweite Aminosäurerest des N-Terminus, Ser-, Ala-, Gly-, Thr-, Val-, Cys-, durch NatA acetyliert (Tabelle 1.1) (Polevoda et al., 1999; Polevoda and Sherman, 2003a; Arnesen et al., 2009b). In Hefe sind 90 % der Proteine mit Ser- und 50 % der Proteine mit Ala- am N-Terminus acetyliert (Driessen et al., 1985; Polevoda and Sherman, 2000, 2003a). Die mittels *COmbined FRActional DIagonal Chromatography* (COFRADIC) identifizierten NatA-Substrate in Hefe liegen zum Teil acetyliert vor, wobei die meisten Proteine in Menschen vollständig oder nahezu vollständig acetyliert sind (Arnesen et al., 2009b). Interessanterweise wurde auch nachgewiesen, dass die katalytische Untereinheit des NatA-Komplexes (Naa10p) in Menschen zusätzlich zur N^α- (Arnesen et al., 2005b) ebenfalls über eine N^ε-Acetyltransferaseaktivität verfügt (Jeong et al., 2002; Seo et al., 2010).

Beide Hefe-Deletionsmutanten *naa10* und *naa15* weisen zusätzlich zu dem Verlust der NatA-Aktivität mehrere Phänotypen wie beispielsweise verlangsamtes Wachstum, Temperatursensibilität, Fehler in der Sporulation sowie beim Eintritt in das G₀-Stadium auf (Whiteway and Szostak, 1985; Whiteway et al., 1987; Mullen et al., 1989; Park and Szostak, 1992; Polevoda et al., 1999). Die Rolle des NatA-Komplexes ist auch in Menschen von sehr großer Bedeutung, so korreliert die Expression von HsNaa10p und HsNaa15p mit aggressiver Tumorentwicklung (Fluge et al., 2002; Line et al., 2002; Midorikawa et al., 2002; Arnesen et al., 2005b; Arnesen et al., 2005a; Ren et al., 2008; Yu et al., 2009). Außerdem spielt der NatA-Komplex eine wichtige Rolle bei der Zellzyklus-Regulation und während des Zellwachstums (Fisher et al., 2005; Arnesen et al., 2006a; Arnesen et al., 2009a). Dementsprechend resultiert *knock down* von *HsNAA10* oder *HsNAA15* in HeLa-Zellen in Apoptose. Der NatA-Komplex ist somit ein mögliches Ziel für die therapeutische Bekämpfung von Tumoren (Arnesen et al., 2005b;

Arnesen et al., 2006a; Arnesen et al., 2008; Seo et al., 2010). Der *knock out* von *HsNAA10*, das auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, führt bei Jungen zwischen dem sechsten und 16. Lebensmonat, zu Herzrhythmusstörungen und Hypotonie und somit zum Tod (Rope et al., 2011).

1.1.3.2 NatB-Komplex

Zu den identifizierten NatB-Substraten in Hefe gehören unter anderem Aktin (Polevoda et al., 1999) und Tropomyosin (Singer and Shaw, 2003), die ribosomalen Proteine S21 und S28 (Arnold et al., 1999), die kleine Untereinheit der ribonucleotide reductase Rn4p (Polevoda et al., 1999) sowie 20S und 19S Proteine (Kimura et al., 2000). Die NatB-Acetyltransferase acetyliert das N-terminale Methionin, wenn diesem ein Glutamat-, Asparaginsäure- oder Asparaginrest folgt (Tabelle 1.1). Die Acetylierung der NatB-Substrate kann als einzige verlässlich vorhergesagt werden, weil die oben genannten Motive in Hefe stets vollständig und in Menschen nahezu vollständig acetyliert vorliegen (Polevoda and Sherman, 2003a; Arnesen et al., 2009b). Der NatB-Komplex ist ebenso wie der NatA-Komplex in Hefe und Menschen in Hinsicht auf die Homologie der Untereinheiten und die Spezifität der acetylierten Substrate konserviert (Kapitel 1.1.3) (Starheim et al., 2008; Arnesen et al., 2009b). Beide Untereinheiten des NatB-Komplexes in Menschen wurden im Cytosol sowohl frei als auch am Ribosom verankert gefunden (Starheim et al., 2008).

Die Hefe-Deletionsmutanten *naa20* und *naa25* weisen den stärksten Phänotyp im Vergleich zu anderen Mutanten der Nat-Komplexe auf. Beide Mutanten zeigen ähnliche Phänotypen wie langsames Wachstum, Temperatur- und Osmosesensibilität, Fehler in der Erbgut von Mitochondrien und Vakuolen, zufällige Polarität der Knospung, Anfälligkeit gegenüber mutagener Substanzen (Polevoda et al., 2003). Die meisten der oben genannten Phänotypen sind auf die fehlende Acetylierung von Aktin und Tropomyosin und somit auf nicht funktionsfähigen Aktinfilamente zurückzuführen (Singer et al., 2000; Polevoda et al., 2003; Singer and Shaw, 2003). Der *knock down* von *HsNAA20* und *HsNAA25* inhibiert Zellwachstum sowie Proliferation und beeinträchtigt den Verlauf des Zellzyklus, wobei beide *knock down* Untereinheiten des NatB-Komplexes in Menschen Unterschiede in den Phänotypen zeigen. Der *knock down* von *HsNAA20* stoppt die G_0/G_1 -Sadium und erhöht die Menge des p21-Inhibitors.

Der *knock down* von *HsNAA25* führt zur Apoptose und zur Abnahme der in G₀/G₁-Stadium befindlichen Zellen sowie zur Reduktion der p21-Menge (Deng et al., 1995; Starheim et al., 2008; Ametzazurra et al., 2009).

1.1.3.3 NatC-Komplex

Der NatC-Komplex ist bislang der einzige weitgehend in Pflanzen charakterisiert. Im Arabidopsis Proteom konnten orthologe Proteine zu den ScNaa30p, ScNaa35p und ScNaa38p gefunden werden. Es konnte mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System ausschließlich die Interaktion zwischen AtNAA30p (At2g38130) und AtNAA35p (At2g11000) nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Hefe und Menschen benötigt die katalytische Untereinheit (AtNAA30p) in Arabidopsis keine weiteren Untereinheiten für die N^o-Acetyltransferaseaktivität. AtNAA30p kann die Funktion der katalytischen Untereinheit (ScNaa30p) und sogar des gesamten NatC-Komplexes in Hefe ersetzen (Pesaresi et al., 2003). Die Struktur und Funktion des NatC-Komplexes ist in Hefe und Menschen konserviert (Kapitel 1.1.3). Alle Untereinheiten des NatC-Komplexes in Menschen, Naa30p, Naa35p und Naa38p, wurden genauso wie bei den NatA und NatB Komplexen sowohl am Ribosom als auch frei im Cytosol nachgewiesen (Starheim et al., 2009b). Die NatC-Acetyltransferase acetyliert N-terminale Methioninreste auf welche Isoleucin, Leucin, Tryptophan oder Phenylalanin folgen (Tabelle 1.1) (Tercero et al., 1993; Plevoda et al., 1999; Kimura et al., 2000; Plevoda and Sherman, 2003a; Arnesen et al., 2009b).

Die homozygoten *naa30-1*-Pflanzen in Arabidopsis weisen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen eine Wachstumsbeeinträchtigung und eine leichte Aufhellung der Blätter auf. Die Beeinträchtigung der Synthese wichtiger PSII-Proteine, D1 und CP47, in den homozygoten *naa30-1*-Pflanzen, ist mit der Reduktion der Thylakoid Multiproteinkomplexe verbunden (Pesaresi et al., 2003). Der Verlust der NatC-Aktivität in Hefe führt bei allen Deletionsmutanten, *naa30*, *naa35* und *naa38*, zu dem gleichen Phänotyp: Verlangsamtem Wachstum auf einer nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle. Die Hefemutanten sind zudem unfähig zur Ausbreitung des L-A Virus, was auf die fehlende N-terminale Acetylierung des viralen Gag-Proteins zurückzuführen ist (Toh-e und Sahashi, 1985, Lee und Wickner, 1992, Tercero und Wickner, 1992, Tercero et al., 1993, Plevoda und Sherman, 2001). Der *knock down* der

NatC-Untereinheiten in Menschen weist einen schwerwiegenderen Phänotyp im Vergleich zu den Hefe-Deletionsmutanten auf. Alle *knock down* Linien *HsNAA30*, *HsNAA35* und *HsNAA38* zeigen denselben Phänotyp in HeLa Zellen, nämlich die Abnahme der Zell-Proliferation sowie eine erhöhte Rate an Apoptose (Starheim et al., 2009).

1.1.3.4 NatD-Komplex

Zusätzlich zu den drei umfangreich charakterisierten NatA, NatB und NatC Komplexen gibt es noch zwei N-terminale Acetyltransferasen: NatD und NatE. NatD wurde bislang nur in Hefe größtenteils charakterisiert. ScNaa40p wurde im Cytosol, verankert am Ribosom gefunden. In Hefe benötigt Naa40p mehr spezifische Aminosäuren als andere N-terminale Acetyltransferasen (30-50) um Proteine zu acetylieren (Polevoda et al., 2009). Bisher sind zwei NatD-Substrate bekannt: die Histone H4 und H2A mit jeweils Ser-Gly-Gly-Lys-Gly- und Ser-Gly-Arg-Gly-Lys- am N-Terminus (Song et al., 2003; Polevoda et al., 2009). Die Deletion von Naa40p zeigt in Hefe keinen Phänotyp auf gewöhnlichen Medien (Song et al., 2003). Laut einer anderen Studie zeigen *Scnaa40*-Deletionsmutanten jedoch Phänotypen wie beispielsweise Sensitivität gegen 3-Aminotriazol, Benomyl, Salz oder Tiabendazol (Polevoda et al., 2009).

1.1.3.5 NatE-Komplex

Die Struktur des NatE-Komplexes ist in Hefe und in Menschen konserviert (Kapitel 1.1.3). Die Substratspezifität (Tabelle 1.1) der Naa50-Acetyltransferase ist bislang jedoch nur in Menschen bekannt. Naa50p acetyliert das N-terminale Methionin, wenn der darauffolgende Aminosäurerest Leucin sowie Alanin oder Methionin ist (Van Damme et al., 2011; Evjenth et al., 2009b). Mittels *in vitro* Aktivitätstest und massenspektrometrischer Analyse wurde gezeigt, dass die HsNaa50-Acetyltransferase zusätzlich zu der N^α- ebenfalls eine N^ε-Acetyltransferaseaktivität besitzt. Als KAT-Acetyltransferase autoacetyliert HsNaa50p drei interne Lysinreste (34, 37 und 140) und *in vitro* Histon 4. Es wurde gezeigt, dass die Autoacetylierung des HsNaa50p die N^α-Acetyltransferaseaktivität erhöht und die N^ε-Acetyltransferaseaktivität gegen Histon 4 reduziert. Möglicherweise wird durch die Autoacetylierung des HsNaa50p die Enzymspezifität erhöht (Evjenth et al., 2009b).

Die Deletion des Naa50p in Hefe zeigt keinen Phänotyp (Polevoda et al., 2008) gegenüber der Verringerung von HsNaa50p in HeLa-Zellen, welche Fehler in der Chromatid Kohesion hervorruft (Williams et al., 2003; Hou et al., 2007). Die orthologe Naa50-Acetyltransferase in *Drosophila melanogaster* weist eine essentielle Rolle nicht nur in der Chromatid Kohesion sondern auch in der Segregation von Chromosomen auf (Williams et al., 2003; Pimenta-Marques et al., 2008).

1.2 Ziel der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die orthologen Untereinheiten des NatA- (Naa10p und Naa15p), NatB- (Naa20p) und NatE- (Naa15p und Naa50p) Komplexes in *Arabidopsis thaliana* identifiziert und mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden.

- I. Durch die Überexpression und Aufreinigung von rekombinanten AtNAA10p, AtNAA15p, AtNAA20p und AtNAA50p sollte die Tertiärstruktur der Proteine überprüft und spezifische Antikörper hergestellt werden.
- II. Die subzelluläre Lokalisierung der Nat-Komplexe sollte durch Fusion der jeweiligen Untereinheiten mit einem fluoreszierenden Markerprotein überprüft werden.
- III. Die enzymatische Funktion und Substratspezifität der Nat-Komplexe sollte *in vitro*, durch Entwicklung eines N^α-Acetyltransferase-Aktivitätstest für rekombinante Nats aus Pflanzen, und *in vivo*, durch 2-D Gel-Elektrophorese und massenspektrometrische Analyse von Proteinextrakten aus *knock out* Mutanten, überprüft werden.
- IV. Die Bedeutung der N^α-Acetylierung *in planta* sollte durch T-DNA-Insertionslinien für die Untereinheiten des NatA-, NatB- und NatE-Komplexes analysiert werden.
- V. Die Funktion der N^α-terminale Acetylierung von Proteinen in dem unizellulären Eukaryonten Hefe und den höheren Eukaryonten, Mensch und Pflanzen sollte durch Komplementierung der pflanzlichen *knock out* Mutanten für die Untereinheiten der Nat-Komplexe mit den endogenen Nat-Untereinheiten und den orthologen Proteinen aus *S. cerevisiae* oder *H. sapiens* adressiert werden.

- VI. Die Identifizierung der potentiellen Interaktionspartner der jeweiligen Proteine sollte *in vivo* mittels *Tanden affinity purification system* vorbereitet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Ausstattung und Materialien

2.1.1 Geräte

Anionenaustauschanlage:	GE Healthcare, München
Kollektor Frac 900	
Pumpe P 900	
Säule HiLoad 16/10 Fractogel	
UV Detektor UV 900	
Autoklav Sanoklav	Sanoklav, Bad Überkingen-Hausen
Autoklav Varioklav H + P Labortechnik AG	Oberschleißheim
Digitalkamera Canon Powershot A620	Canon, Krefeld
DNA-Gelapparaturen	Peqlab, Erlangen
Elektronische Dosierhilfe Edos 5222	Eppendorf, Hamburg
Elektrophorese- und Blot-Systeme:	
Mini-Protean 3 Elektrophoresesystem	Bio-Rad, München
PerfectBlue Doppelgelsystem Twin ExW S	Peqlab, Erlangen
Protean II xi Cell	Bio-Rad, München
Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München
Protean IEF Cell	Bio-Rad, München
Elektroporator EasyJect Optima	Bio-Rad, München
Gel-Dokumentation Gel Jet Imager 2000	Intas, Göttingen
Gelfiltrationsanlage:	GE Healthcare, München
Kollektor FRAC-100	
Kontroller LCC-500 Plus	
MotorValve MV-7	

Pumpe P-500	
Säule HiLoad 16/60 Superdex 200, Prepgrade	
Heizblock Thermostat HBT-2 132	HLC, Bovenden
Horizontalschüttler: The Belly Dancer	Stovall, Greensboro, NC USA
Inkubationsschüttler Innova 4300	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Inkubationsschüttler Multitron	Infors, Bottmingen
Klimakammer	Waiss, Gießen
Klimaschrank Percival	CFL Plant Climatics, Emersacker
Kühlblock Thermostat KBT-2 133	HLC, Bovenden
PCR-Gerät Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
PCR-Gerät Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
PCR-Gerät LightCycler 480 Real-Time PCR	Roche, Deutschland
Peristaltikpumpe PA-SF	IKA Labortechnik, Staufen
Photometer UvikonXL	Secoman, Kandsberg
PlateReader Fluostar Omega	BMG Labtechnologies, Offenburg
Reinstwassersystem PURELAB Classic	ELGA LabWater, Celle
Scintiscouter Beckman LS6000SC	Beckman, München
Sonikatorspitze UW 70	Bandelin Electronic, Berlin
Spannungsgeber PowerPac 300 und 1.000	BioRad, München
Spectral photometer LKB Ultraspec III	Pharmacia, Freiburg
Sterilbank Lamin Air 2448 und HB 2472	Heraeus Instruments, Osterode
Ultraschallsonikator Sonoplus GM 7	Bandelin Electronic, Berlin
Vortex-Genie 2	Scientific Instruments, Ringoes USA

Zentrifugen:

Beckman J2-21 mit JA-20 Rotor	Beckman, München
Biofuge pico	Heraeus Instruments, Osterode
Megafuge 1.0 R mit BS 4402/A Rotor	Heraeus Instruments, Osterode
Mikrozentrifuge 5415C und 5417R	Eppendorf, Hamburg
Sorvall RC5C mit GSA Rotor	DuPont, Bad Homburg

Weitere Geräte entsprachen der üblichen Laborausstattung.

2.1.2 Verbrauchsmaterial

96-Loch Platten, U und F-bottom	Greiner, Frickenhausen
DNA-Größenstandard 2-log	New England Biolabs, Beverly, USA
HiTrap Chelating HP Säulen	GE Healthcare, München
IgG-Beads Sepharose 6 Fast Flow	GE Healthcare, München
Membran Entsalzungsfilter	Millipore, Eschborn
MF-Milipore VSWP Membran	Milipore, Schwalbach
Mikroskope Gläser	Marienfeld, Laude-Königshofen
Mira cloth	Calbiochem, La Jolla, CA (USA)
NAP5 Säulen	Amersham Bioscience, Braunschweig
Nickel ²⁺ -Beads	Qiagen, Hilden
Nitrocellulose Transfer Membran Protan	Schleicher & Schuell, Dassel
PD-10 Säulen Sephadex G-25 M	Amersham Bioscience, Braunschweig
Protein-Größenstandard Mark12	Invitrogen, Karlsruhe
Protein-Größenstandard Prestained	New England Biolabs, Beverly, USA

ReadyStrip IPG Streifen	Bio-Rad, Munich
Rotilabo Spritzenfilter (0,45 µM)	Roth, Karlsruhe
Sterile Einwegspritzen	BD Plastipak, Madrid (Spanien)
SP Sepharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Torfkultursubstrat	Ökohum, Herbertingen
Vivaspin2 Säulen	Sartorius, Göttingen

2.1.3 Chemikalien

[³ H]Acetyl-CoA	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
Agar	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose	Serva, Heidelberg
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	SERVA Feinchemica, Heidelberg
Bacto Hefeextrakt	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Bacto Trypton	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Borsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bromphenolblau	SERVA Feinbiochemica, Heidelberg
Coomassie Brilliantblau G250	SERVA Feinbiochemica, Heidelberg
Dikaliumhydrogenphosphat	GRÜSSING GmbH, Filsum
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Steinheim

DNA-Ladepuffer	New England Biolabs, Beverly, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol p. a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Etyhlendiamintetraessigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
EGTA	SERVA Feinbiochemica, Heidelberg
α -D-Glukose	Merck, Darmstadt
Glutathion reduziert	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Gentamycin	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Hepes	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hygromycin	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Imidazol	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Riedel-de Haën AG, Seelze
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt
NatriumNa-Azid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdodecylsulfate	Fluka Biochemika, Seelze
Natriumhypochlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Nickelchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Propanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Phytigel	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rifampicillin	Duchefa, Haarlem, Niederlande
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti-Quant Bradford-Reagenz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure	VWR International GmbH, Darmstadt
Silwet L-77	OSi, Specialities, Danbury (USA)
Spectinomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween	Serva, Heidelberg
Ultima Gold	PerkinElmer, USA
2.1.4 Kits	
2-Quant-Kit	Amersham, San Francisco
High Molecular Weight Calibration Kit	Amersham Bioscience, Braunschweig
PlusOne Silver Staining Kit	GE Healthcare, München
NucleoSpin Extrct II Kit	Macherey- Nagel
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey- Nagel
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden

PCR Clean Up Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNase- free DNase Kit	Qiagen, Hilden

2.1.5 Enzyme

Gateway BP clonase II enzyme mix	Invitrogen, Karlsruhe
Gateway LR clonase II enzyme mix	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Beverly, (USA)
Taq-DNA Polymerase (5 U/μl)	New England Biolabs, Beverly, (USA)
Phusion high fidelity DNA polymerase	Finnzymes, Espoo (Finnland)
Precision Protease	GE Healthcare, München (Andrea Schott)
Restriktionsendonucleasen:	New England Biolabs, Beverly, (USA)

*Apal, BamHI, ClaI, EcoRI, EcoRV, HindIII,
KpnI, NcoI, NdeI, NsiI, PstI, PvuI, PvuII,
SacI, Sall, SpeI*

2.1.6 Primer

Primer (Anhang 6.3) wurden mittels Vektor NTI 9 erstellt und bei MWG synthetisiert (Ebersberg, Germany). Die lyophilisierten Primer wurden in 10mM Tris pH 7 auf 20 pmol/μl resuspendiert.

2.1.7 Software

Fluostar Optima 1.30	BMG Labtechnologies, Offenburg
Gel-Pro Express MediaCybernetics	Silver Spring, (USA)
Intas GDS Application 1.51	Intas, Göttingen

LightCycler 480 release 1.5.0	Roche, Deutschland
Microsoft Office 2007	Microsoft
Millenium32 Waters	Milford MA, (USA)
Photoshop CS 8.0.1	Adobe Systems GmbH, München
Sigma Plot 8.01	SPSS Inc., München
Sigma Plot Enzyme Kinetic Module	SPSS Inc., München
Unicorn 4.12	GE Healthcare, München
Vector NTI 9	Invitrogen, Karlsruhe
Zeiss LSM Image Software	Zeiss, Jena

2.2 Biologisches Material

2.2.1 Bakterienstämme

Agrobacterium tumefaciens **AGL-1**: (C58, RecA) mit pTiBo542DT-DNA Ti-Plasmid

Agrobacterium tumefaciens **C58c1**: T-DNA⁻ *vir*⁺ *rif*^r. Mit Helfer-Plasmid [*gen*^r]

Escherichia coli **DH5α** (Invitrogen): *supE44*, *lacU169* (80 *lacZ* M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*

Escherichia coli **DB3.1** (Invitrogen): *F*⁻, *gyrA462* *endA*- *delta* (*sr1-recA*) *mcrB* *mrr* *hsdS20* (*rB*⁻, *mB*⁻) *supE44* *ara14* *galK2* *lacY1* *proA2* *rpsL20* (*Smr*) *xyl5* *lambda*- *leu* *mtl1*

Escherichia coli **HMS 174** (Novagen, 1999): *F*⁻ *recA* *hsdR* (*r*_{K12}-*m*_{K12}⁺) *rif*^r

Escherichia coli **XL1-Blue** (Stratagene): *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*⁻ (*F*['], *proAB*⁺, *lacI*_q, *lacZ*₋ M15:Tn10 (*tetr*))

2.2.2 Hefestämme

Saccharomyces cerevisiae **BY4741**: MATa *his3Δ1* *leu2Δ0* *met15Δ0* *ura3Δ0*

2.2.3 Pflanzenmaterial

Es wurde mit *Arabidopsis thaliana* (L.), Ökotyp Columbia-0, gearbeitet. *Arabidopsis spec.* sind Mitglieder der *Bassicaceae*, Ordnung: *Capparales*, Klasse: *Dictyledoneae*,

Unterabteilung: *Angiospermae*. Des Weiteren wurden T-DNA-Insertionslinien verwendet (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1 T-DNA-Insertionslinien

T-DNA-Insertionslinie	Locus	Bezeichnung in der hier vorliegende Arbeit
Wisc DsLOX289_292G3	At5g13780	<i>naa10-1</i> (N850295; <i>ard1-1</i>)
SAIL_812_B10	At1g80410.1	<i>naa15-1</i> (N836292; <i>nat-1-1</i>)
Wisc DsLOX 481- 484J20	At1g80410.1	<i>naa15-2</i> (N858020; <i>nat1-2</i>)
SALK_027687	At1g03150	<i>naa20-1</i> (N527687; <i>nat3-1</i>)
SAIL_323_B05	At1g03150	<i>naa20-2</i> (N814943; <i>nat3-2</i>)
SAIL_1210_AO2	At5g11340	<i>naa50-1</i> (N844130; <i>nat5-1</i> oder <i>ard2-1</i>)
SAIL_1186_AO3	At5g11340	<i>naa50-2</i> (N843868; <i>nat5-2</i> oder <i>ard2-2</i>)

Für diese Arbeit wurden zugleich *Nicotiana benthamiana* und *Nicotiana tabacum* cv. *SNN* verwendet. *Nicotiana spec.* gehören zur Familie der *Solanaceae*, Ordnung *Scrophulariales*, Klasse: *Dictyledoneae*, Unterabteilung: *Angiospermae*.

2.3 Methoden der Pflanzenarbeit

2.3.1 Pflanzenanzucht

2.3.1.1 Anzucht auf Erde

Für die Pflanzenanzucht wurde Torfkultursubstrat (Ökohum, Herberlingen) mit Beimischung von ca. 20 % (v/v) Perlit verwendet. Vegetatives Wachstum der Pflanzen wurde in der Klimakammer unter Kurztagbedingungen (Tabelle 2.2) nach zwei Tagen Stratifizierung bei 4°C im Dunkeln ermöglicht. Nach zwei Wochen wurden die Keimlinge in Töpfe vereinzelt. Zur Induktion der Blüten wurden die Pflanzen nach acht Wochen in der Klimakammer unter Langtagbedingungen (Tabelle 2.2) weiter kultiviert.

Tabelle 2.2 Wachstumsbedingungen in Klimakammern und Percival

Parameter	Kurztag	Langtag
Photoperiode	8,5 Stunden	14 Stunden
Temperatur; Tag	22°C	22°C
Temperatur; Nacht	18°C	18°C
Relative Luftfeuchte; Tag	30 %	30 %
Relative Luftfeuchte; Nacht	70 %	70 %
Photonendichte	120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$	120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$

2.3.1.2 Pflanzenanzucht auf AT-Medium

Die Samen wurden zunächst für 10-15 Min. in 1 ml 2 % Tween inkubiert und anschließend 1 Min. mit 1 ml 80 % Ethanol behandelt. Dann erfolgte eine 5-8-minütige Inkubation in 1 ml 6 % Hypochlorid. Die Samen wurden dreimal mit 1 ml ddH₂O gewaschen. Die noch feuchten Samen wurden auf ein steriles Filterpapier gegeben und dort getrocknet. Anschließend wurden die sterilen Samen auf AT-Medium (5 mM KNO₃, 2,5 mM KH₂PO₄ pH 5,6, 2 mM MgSO₄, 2 mM Ca(NO₃)₂, 0,05 mM Fe-EDTA, 0,8 % Mikroagar, Mikronutrientmix 1:1000; pH 5,8) pH 5,8 ausgebracht und für ca. zwei Wochen im Percival unter Kurztagbedingungen (Tabelle 2.2) kultiviert. Anschließend wurden die Keimlinge auf Erde umgesetzt.

2.3.2 Selektion von Arabidopsis-Keimlingen

Die Selektion mit 200 mg/l L-Phosphinothricin (BASTA) erfolgte auf Erde (Kapitel 2.3.1.1), nachdem die Keimlinge ca. drei Wochen alt wurden.

Die Selektion mit Antibiotika erfolgte auf AT-Medium (Kapitel 2.3.1.2) mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hygromycin (bei 4 °C gelagert) oder 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin. Gentamycin ist ausschließlich mit Microagar verwendbar, da es in Verbindung mit Phytigel ausfällt.

2.3.3 Extraktion genomischer DNA (gDNA) aus Arabidopsis Gewebe

Zur Genotypisierung von *A. thaliana* wurde DNA aus ein bis zwei Blättern nach (Edwards et al., 1991) extrahiert. Die Blätter wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäßen geerntet und dann mittels Kunststoffpistill mechanisch zerkleinert. Dem zerkleinerten Blattmaterial wurden 300 µl Edwards-Puffer (200 mM Tris/HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS) zugegeben und der Ansatz wurde für 10–15 Sekunden gründlich gevortext. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur (RT) und 14000 rpm. Vom Überstand wurden 200 µl abgenommen, in ein sauberes 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die enthaltene DNA mit 200 µl 100 % Isopropanol gefällt. Nach 2-minütiger Fällung bei RT erfolgte die Abtrennung der DNA mittels 10-minütiger Zentrifugation bei RT und 14000 rpm. Der Überstand wurde abdekantiert und das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte das vollständige Abnehmen des Überstandes und das Trocknen des Pellets für etwa 30 Min. bei RT. Zum Abschluss wurde das Pellet in 25 µl T₁₀E₁ Puffer pH 8,0 bei 65 °C für 10 Min. oder bei RT über Nacht resuspendiert.

2.3.4 RNA-Isolation

Für die RNA Extraktion wurde RNeasy Plant Mini Kit und RNase-free DNase Kit von Qiagen verwendet. Zwischen 120 und 150 mg eingefrorenes Blattmaterial wurden unter Stickstoffkühlung gemörsert und mit 500 µl zuvor vorbereiteten RLT (je 500 µl RLT Puffer 5 µl β-Mercaptoethanol) Puffer versetzt, gevortext und 1,5 Min. bei 50 °C inkubiert. Die Zellreste wurden bei 14000 rpm für 10 Min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und mit 250 µl 100 % Ethanol versetzt und durch Pipettieren gemischt. Das gesamte Volumen wurde auf eine RNeasy-Säule gegeben und für 1 Min. bei 8000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die Matrix mit 350 µl RW1 Puffer 1 Min. bei 8000 rpm gewaschen und die DNA mit zuvor vorbereiteten RDD Puffer (je 70 µl RDD Puffer 10 µl DNase) mit DNase 15 Min. bei RT verdaut. Die Säule wurde nochmal mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen. Der Waschschrift wurde zweimal mit 500 µl RPE Puffer (1 Min. bei 8000 rpm dann 1 Min. bei 10000 rpm) wiederholt. Anschließend wurde die Membran durch Zentrifugation für 1 Min. bei 10000 rpm getrocknet und die Säule in RNase freie 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die Elution der RNA erfolgte in zwei Schritten mit 30 µl bzw. 20 µl RNase

freiem ddH₂O sowie einer Inkubationszeit von 3 Min. bzw. 1 Min. und anschließende Zentrifugation bei 13000 rpm für 1 Min. Das Eluat wurde in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.5 Isolierung löslicher Proteine aus Arabidopsis-Gewebe

Für die Extraktion wurden ca. 200 mg Blattmaterial geerntet in ein 2 ml Eppendorfgefäße überführt und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Nach dem Aufschluss des eingefrorenen Blattmaterials unter Stickstoffkühlung wurde das Pulver mit 500 µl Extraktionspuffer (50 mM Hepes/KOH pH 7,4, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 % Glycerin, 10 mM DTT, 0,5 mM PMSF) versetzt und 15 Min. auf Eis gevortext. Die Membranrückstände wurden durch 10 Min. Zentrifugation bei 4 °C und 16400 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde quantitativ in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Zentrifugation wurde wiederholt bis der Überstand klar war. Der Überstand wurde auf eine zuvor mit 5 Säulenvolumina Resuspensionspuffer äquilibrierte NAP-5 Säule aufgetragen. Die Proteine wurden mit 1 ml Resuspensionspuffer (50 mM Hepes/KOH pH 7,5, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,5 mM PMSF) eluiert. Der Proteinrohextrakt wurde mit 1/5 Volumen 5-fachen SDS-Laderpuffer versetzt und 10 Min. bei 95 °C denaturiert und bei -20 °C gelagert. Nach Elution des Proteinextraktes wurde die NAP-5 Säule mit 3 Säulenvolumina 0,25 M NaOH und 5 Säulenvolumina 10 mM Tris pH 7,5 gewaschen. Abschließend wurde die Säule mit 5 Säulenvolumina 0,02 % Na-Azid gewaschen und bei 4 °C gelagert.

2.3.6 Chlorophyllextraktion aus Arabidosis-Gewebe und Bestimmung der Chlorophyllkonzentration

Für die Extraktion von Chlorophyll wurden ca. 200 mg Blattmaterial geerntet und im flüssigen Stickstoff eingefroren und mittels Potterhomogenisator RZR 2041 (Heidolph) zerrieben. Das Pulver wurde mit 1 ml 80 % Aceton versetzt und gemixt. Danach wurde die Probe 2-3 Minuten bei 4 °C und 16400 rpm abzentrifugiert und der Überstand in neues Eppendorfgefäß überführt. Das Pellet wurde mi 500 µl 80 % Aceton versetzt und die Zentrifugation wiederholt. Die Absorption der vereinigten Überstände wurde im Spektrophotometer Uvikon 931 gegen Aceton bei 663 nm (Chlorophyll a) und bei 645 nm (Chlorophyll b) bestimmt. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte nach (Arnon, 1949).

2.3.7 Transformation von Pflanzen

2.3.7.1 Stabile Transformation von Arabidopsis

Für die Transformation von Arabidopsis wurde nach (Clough and Bent, 1998) *Floral Dip* angewendet. Hierzu wurden 300 ml LB-Medium mit einer 20 ml Startkultur von Agrobakterien angeimpft und über Nacht bei 28 °C und 250 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden 10 Min. bei 4 °C, 3500 rpm abzentrifugiert und in Transformationslösung (50 g/L Saccharose, 200 µl/L Silwet L-77) zu einer $OD_{600nm}=0,8-1$ resuspendiert. Geschlossene Arabidopsis Blüten wurden in die Lösung eingetaucht und unter feuchter, dunkler Atmosphäre über Nacht bei RT gelagert. Der Vorgang wurde nach eine Woche wiederholt. Positive Transformanten wurden auf AT-Medium mit entsprechendem Antibiotikum unter Kurztagbedingungen selektiert. Resistente Keimlinge wurden auf Erde transferiert und unter Standardbedingungen kultiviert (Kapitel 2.3.1.1). Das Transgen wurde ferner durch PCR nachgewiesen.

2.3.7.2 Transiente Transformation von Tabak

Fluoreszenzmarkierte Proteine mit EYFP wurden durch Agrobakterieninfiltration (Wroblewski et al., 2005) in Epidermiszellen von *N. benthamiana* transient exprimiert. Dazu wurden 20 ml LB-Medium mit Agrobakterien einer Einzelkolonie oder von einem Glycerinstock angeimpft und für 48 h bei 28 °C und 250 rpm angezogen. Die Bakterien wurden 10 Min. bei 4 °C, 6000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet mit sterilem, kaltem ddH₂O auf ca. 20 ml aufgefüllt und wieder 10 Min. bei 4 °C, 6000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in sterilem, kaltem ddH₂O zu einer $OD_{600nm}=0,3$ resuspendiert. Die Agrobakterien-Lösung wurde mit einer sterilen 1 ml Spritze (Plastipak Becton & Dickinson, Madrid, Spanien) in die Epidermiszellen gesunder Tabakblättern infiltriert. Die Expression wurde zwischen zwei und drei Tagen nach Infiltration unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert (Kapitel 2.7).

2.3.8 Pollen Vitalitätstest

Um die Lebensfähigkeit von Pollen zu überprüfen wurden Blüten von ca. zwölf Wochen alten Arabidopsis Pflanzen analysiert. Alle Pflanzen wurden die ersten acht Wochen unter Kurztagbedingungen und anschließend unter Langtagbedingungen kultiviert (Tabelle 2.2). Dazu wurden die Petalen der Blüten entfernt und die so

präparierte Blüte auf Objektträger gelegt. Nach dem die Blüten mit Alexander Färbelösung (10 ml Ethanol, 1 ml Malachit Grün, 5 ml Fuchsin, 0,5 ml Orange G, 5 g Phenol, 5 g Chloralhydrat, 2 ml Eisessig, 25 ml Glycerol, 50 ml ddH₂O) bedeckt wurden, wurde der Objektträger kurz über eine Flamme erhitzt, bis die Lösung unter dem Deckglas zu köcheln beginnt. Die Färbung der Pollen wurde unter dem Mikroskop analysiert (40 x Vergrößerung (Leica)). Die lebensfähigen Pollen wurden rot und nicht lebensfähige grün gefärbt.

2.3.9 Präparation von Arabidopsis-Embryonen

Um die Letalität der *naa10-1*, *naa15-1* und *naa15-2* Mutanten zu bestätigen wurden Embryonen aus zwölf Wochen alten Arabidopsis Pflanzen analysiert. Dazu wurden Schoten auf einen Objektträger gelegt und mit Hilfe von Pinzetten beidseitig die Fruchtblätter entfernt. Zum Entfärben von der präparierten Embryonen wurden ca. 200 µl Hoyer Lösung (7,5 g Gummiarabikum, 100g Chloralhydrat, 5ml Glycerin, 60ml Wasser; vor Gebrauch durch über Nacht zum auflösen rühren lassen) gegeben. Die vorbereiteten Präparate wurden mit Deckgläsern bedeckt und über Nacht bei RT inkubiert. Die entfärbten *A. thaliana* Embryonen wurden mit dem Leica DM/RB Mikroskop mittels *differential interference contrast* Mikroskopie analysiert.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion nach (Mullis et al., 1986) wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten benutzt. Für die Selektion und Charakterisierung von T-DNA-Insertionslinien und semiquantitative RT-PCR wurde *Taq*-Polymerase (NEB) verwendet. Standard PCR Reaktionen wurden in 25 µl Reaktionsansätzen mit 1 ng DNA, 20 pmol Primer (Kapitel 2.1.6; Anhang 6.3), 500 µM dNTPs und einem auf die *Taq*-Polymerase optimierten Puffer. Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

Schritt	Temperatur	Zeit
<i>Hold</i>	94°C	∞
Initiale Denaturierung	94°C	3 Min.
Denaturierung	94°C	30 Sec.
Hybridisierung	x °C	30 Sec.
Verlängerung	72°C	30-75 Sec.
Finale Verlängerung	72°C	10 Min.
<i>Hold</i>	4°C	∞

Für die Amplifikation von DNA, die anschließend für Klonierungen eingesetzt wurde, wurde *Pfu*-Polymerase (Finnzymes) mit *Proofreading* Funktion verwendet. Eine Standardreaktion wurde in 50 µl mit 1 ng DNA, 20 pmol Primer (Kapitel 2.1.6; Anhang 6.3), 10 mM dNTPs und einem auf die *Pfu*-Polymerase optimierten Puffer durchgeführt. Folgendes PCR- Programm wurde verwendet:

Schritt	Temperatur	Zeit
<i>Hold</i>	98°C	∞
Initiale Denaturierung	98°C	90 Sec.
Denaturierung	98°C	10 Sec.
Hybridisierung	x °C	20 Sec.
Verlängerung	72°C	60-90 Sec.
Finale Verlängerung	72°C	10 Min.
<i>Hold</i>	4°C	∞

2.4.2 Quantitative RT-PCR

Die synthetisierte cDNA wurde erstmal 1:10 und dann in dem nächsten Schritt 1:5 verdünnt. Um die Effizienz der Primer zu testen wurde die cDNA von Vektor-Kontrollen erstmal 1:10 und dann in weiteren sechs Schritten jeweils 1:2 verdünnt. Eine RT-PCR Reaktion wurde in 13 µl mit 2 µl cDNA, jeweils 0,2 µl Primer (10 pmol/µl), 8 µl Master Mix (5 µl Express SYBR Green Super Mix von Invitrogen) und 2,6 µl Rnase

freies ddH₂O durchgeführt. Die PCR erfolgte im LightCycler 480 Real-Time PCR System von Roche. Für die Auswertung vom Transkript Level wurde LightCycler 480 software release 1.5.0 von Roche verwendet.

2.4.3 PEG-Aufreinigung der PCR-Produkte

25 µl PCR-Produkt wurde zu 75 µl T₁₀E₁ Puffer (10 mM Tris/HCl, 1mM EDTA) pH 8 und 50 µl PEG MgCl₂ (Invitrogen) gegeben, gut gevortext und für 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Dann erfolgte das Abnehmen des Überstandes und das Resuspendieren des Pellets in 10 µl T₁₀E₁ Puffer.

2.4.4 DNA-Gelelektrophorese

PCR-Produkte sowie Restriktionsfragmente wurden mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese nach Größe aufgetrennt. Je nach gewünschter Trennleistung wurden 0,8 bis 1,5 % Agarose in 1xTBE Puffer (90 mM Tris/HCl, 90 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA) pH 8,0 mit 0,7 µg/ml Ethidiumbromid eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 120 V in 1xTBE-Puffer durchgeführt. Zur Größenabschätzung der Fragmente wurde der DNA-Marker 2-log Ladder von NEB verwendet.

2.4.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolation von DNA-Fragmenten wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAEXII Extraktion Kit von QIAGEN nach Protokoll aufgereinigt.

2.4.6 DNA-Restriktion

Restriktionsendonukleasen und passende Puffer wurden von NEB bezogen. Die Reaktionsbedingungen wurden den Herstellerprotokollen entnommen. Zur Überprüfung von Klonen wurde der Verdau in 20 µl Volumen mit 2-4 µl Plasmidpräparation, 2 µl 10x Puffer und jeweils 1 µl Enzym durchgeführt.

2.4.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte durch Intensitätsvergleich der Banden. Die Mengenabschätzung erfolgte anhand des DNA-Markers 2-log Ladder von NEB.

2.4.8 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt durch Messung der Optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Für die Konzentrationsmessung wurde die RNA 1:200 verdünnt. RNA Konzentration $[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{gemessene OD} \times 40 \mu\text{g/ml}$ (Faktor) \times Verdünnungsfaktor \times Umrechnungsfaktor auf 1 μl .

2.4.9 cDNA-Synthese

Jeweils 1 μg RNA und OligoT-Primer wurden mit RNase freiem ddH₂O auf 10 μl aufgefüllt und 10 Min. bei 65 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde der Ansatz mit 2 μl 10 mM dNTPs, 0,5 μl RNasin (Promega) 10 μl 5-fachen M-MLV Puffer (Promega) 1 μl M-MLV Reverse Transkriptase (Promega) und 26,5 μl ddH₂O versetzt. Die cDNA Synthese erfolgte mittels Reverse Transkription. Folgendes Programm wurde verwendet: 10 Min. bei 30°C, 60 Min. bei 42°C, 15 Min. bei 60°C, *hold* bei 4°C.

2.4.10 Klonierung

2.4.10.1 Gateway-Klonierung

Das Gateway-System von Invitrogen (Karlsruhe) nutzt Rekombinationssequenzen des Bakteriophagen λ , um gewünschte DNA Fragmente durch homologe Rekombination in Zielvektoren einzufügen. Dem Herstellerprotokoll entsprechend wurden Primer mit den Rekombinationssequenzen konstruiert (Anhang 6.3.3) und damit gewünschte Sequenzen durch PCR amplifiziert. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit einem PEG-System (Kapitel 2.4.3) oder Extraktion Kit von QIAGEN (Kapitel 2.4.5). Die Gateway-Klonierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. pDonr201 wurde als *Entry-Vektor* benutzt.

2.4.10.2 Klonierung mittels Endonukleasen und Ligation

Für die Herstellung des pBIN AR amiNAA15-Konstruktes wurden Endonukleasen und Ligation verwendet. Das microNAA15 PCR-Produkt wurde mit den unspezifischen (A, B) und spezifischen (1160-1163) Primern von Open Biosystems in vier PCR Schritten (a-d) amplifiziert (Tabelle 2.3). Das microNAA15 PCR-Produkt wurde anschließend in der *Mlu*NI pCap Vektor kloniert wurde. Als nächstes wurde das pCAP/amiNAA15-Konstrukt und der Ziel Vektor pBIN AR mit *Kpn*I und *Bam*HI Endonukleasen bei 37 °C für 3 Stunden inkubiert. Die entsprechenden DNA Fragmente wurden mittels Gelextraktion aufgereinigt (Kapitel 2.4.5). Die Ligation der DNA Fragmente wurde mit T4-Ligase in 20 µl Ansätzen durchgeführt. Für die Ligation wurden Vector: Insert-Verhältnisse 2:4, 2:7, 4:11 benutzt. Die übrigen Reaktionsbedingungen wurden dem Herstellerprotokoll entnommen. Die Ligation wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Anschließend wurde die gesamte Reaktion auf 0,025 µm MF-Millipore VSWP Membran (Millipore, Schwalbach) dialysiert und jeweils 5 µl in kompetente *E. coli* Zellen transformiert und dann auf selektivem Medium selektiert. Das Konstrukt wurde durch analytische Restriktion und Sequenzierung (Kapitel 2.4.11) überprüft.

Tabelle 2.3 Herstellung von microNAA15 PCR-Produkt

	<i>forward oligo</i>	<i>reverse oligo</i>	<i>template</i>
(a)	A	1163	pRS300
(b)	1162	1161	pRS300
(c)	1160	B	pRS300
(d)	A	B	(a)+(b)+(c)

2.4.10.3 Verwendete Vektoren

Plasmidname	Verwendung und relevante Eigenschaften	Bakterien Selektionsmarker	Pflanzen Selektionsmarker
pCAP (Roche Applied Science, Mannheim)	zur Klonierung von DNA Fragmenten mit stumpfen Enden	Amp.	-
pBIN AR (Höfgen and Willmitzer, 1990)	Klonierung mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen und Ligasen; Überexpression von Proteinen in Pflanzen (CaMV 35S Promotor)	Kan.	Kan.
pETG10a (Novagen, Darmstadt)	Zielvektor zur Gateway-Klonierung; Überexpression von Proteinen in <i>E. coli</i> mit N-terminalem Polyhistidintag	Amp.	-
pDONR201 (Invitrogen, Karlsruhe)	Eingangsvektor zur Gateway-Klonierung	Kan.	-
pB2GW7 (Invitrogen, Karlsruhe)	Zielvektor zur Gateway-Klonierung; Komplementierung von <i>naa20-1</i> -Mutanten (CaMV 35S Promotor)	Spec.	BASTA
pK2GW7 (Invitrogen, Karlsruhe)	Zielvektor zur Gateway-Klonierung; Komplementierung von <i>naa10-1</i> - und <i>naa50-2</i> -Mutanten (CaMV 35S Promotor)	Spec.	Kan.
pB7YWG2 (Invitrogen, Karlsruhe)	Zielvektor zur Gateway-Klonierung; Endogene und heterologe Lokalisierung von Proteinen in Pflanzen mit C-terminalen EYFP-Tag; Komplementierung von <i>naa20-1</i> -Mutanten (CaMV 35S Promotor)	Spec.	BASTA
pK7YWG2 (Invitrogen, Karlsruhe)	Zielvektor zur Gateway-Klonierung; Endogene und heterologe Lokalisierung von Proteinen in Pflanzen mit C-terminalen EYFP-tag (CaMV 35S Promotor)	Spec.	Kan.

2.4.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde durch SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Die Proben wurden nach den Angaben des Anbieters vorbereitet und eingeschickt. Die Sequenzen wurden mit Vector NTI 9 (Invitrogen, Karlsruhe) ausgewertet.

2.5 Bakteriologische Methoden

2.5.1 Bakterienanzucht

Die Anzucht von *Escherichia coli* in LB-Flüssigmedium (1 % NaCl, 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, pH 7,0) erfolgte für 16 h bei 37°C und 220 U/min. Für *A. tumefaciens* betrug die Inkubationszeit 24 h bei 28°C und 250 U/min. Kulturen auf LB-Festmedien wurden für *E. coli* ca. 20 Stunden und für *A. tumefaciens* ca. 48 Stunden jeweils bei 37 °C bzw. 28 °C inkubiert. Zur Herstellung von Stammkulturen wurden 800 µl Übernachtskultur mit 200 µl 80 % autoklaviertem Glycerin gemischt und im flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Überexpression von AtNAA50p wurden 300 ml LB-Medium mit 10 ml der Übernachtskultur, für AtNAA10p 2 Liter mit 50 ml der Übernachtskultur und dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und bei 37°C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 inkubiert. Die Induktion der Synthese erfolgte durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM. Für die Expression von AtNAA10p wurde zusätzlich 0,5 g/L Glukose zugegeben. Die AtNAA50-Kultur wurde nach 4 Stunden bei 37°C für 15 min bei 4 °C und 10.000 rpm abzentrifugiert (GSA Rotor, Sorvall). Die AtNAA10-Kultur wurde über Nacht bei 18°C und 70 rpm bzw. bei 110 rpm inkubiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen und das Sediment in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.5.2 Proteinextraktion aus *Escherichia coli*

Die Bakterienpellets aus *E.coli* HMS 174 (Kapitel 2.2.1) wurden für die Proteinaufreinigung durch *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC), in 5 ml NAT-B Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 20 mM Imidazol) mit 0,5 mM PMSF resuspendiert. Die Zellen wurden durch Sonifizierung für 7 Min. bei 40 % Aktivität auf Eis aufgeschlossen (Ultraschallsonikator Sonoplus GM70, Badelin Elektronik). Anschließend wurden die Zellen für 10 Min. bei 4 °C und 17000 rpm zentrifugiert (SS-34 Rotor, J2-21) um Zellbestandteile aus der Lösung zu entfernen. Der Überstand wurde durch einen Filter mit Porengröße 0,45 µm filtriert. Der Überstand wurde für die Aufreinigung unter nativen (Kapitel 2.6.1) und das Pellet für die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen (Kapitel 2.6.2) verwendet.

2.5.3 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen wurde 200 ml LB-Medium mit 1/25 Volumen unter Selektionsdruck über Nacht angezogener Bakterien angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,8 bei 37 °C mit 220 U/min geschüttelt. Nach Abkühlen der Kultur für 15 Minuten auf Eis wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 4000×g und 4 °C sedimentiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 4 °C nacheinander in 1 Volumen und 1/2 Volumen sterilem Aqua bidest, sowie 1/50 Volumen 10 % (v/v) Glycerin gewaschen. Abschließend wurden die Bakterien in 1/400 des Anzuchtolumens 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in 40 µl Aliquots im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die elektrokompenten Zellen bei -80 °C gelagert.

Zur Herstellung chemokompenter Bakterien wurden 250 ml LB-Medium mit einer 10 ml Übernachtskultur inokuliert und bis zu einer OD_{600nm} von 0,8-1 wachsen gelassen. Die Kultur wurde auf Eis für 15 Min. abgekühlt und bei 2500 rpm und 4 °C für 15 Min. abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 12,5 ml sterilem TSB-Medium (10% PEG 3.400, 5% DMSO, 10% Glycerin, 10mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$ in LB-Medium) resuspendiert, zu 100 µl aliquotiert und im flüssigen Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C eingelagert.

2.5.4 Transformation von Bakterien

Für die Elektroporation wurde ein Aliquot kompetenter Zellen (Kapitel 2.5.3) auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden DNA vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte durch einen Spannungsimpuls von 2500 V und 15 µF. Direkt nach der Transformation wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium pH 7,0 (1 % NaCl (w/v), 1 % Trypton (w/v), 0,5 % Hefeextrakt (w/v)) aufgenommen. Für die chemische Transformation wurde ein Aliquot (Kapitel 2.5.3) auf Eis aufgetauchter Zellen mit 5 µl DNA gemischt und 5 Min. auf Eis stehen lassen, danach 50 Sec. bei 42°C erhitzt und 5 Min. auf Eis stehen lassen.

Je nach Bakterienstamm und verwendetem Selektionsmarker wurden die Bakterien 1 bis 3 h bei 28 °C oder 37 °C und 220 U/Min. inkubiert, bevor sie in Aliquots auf Selektionsmedium ausplattiert wurden.

2.5.5 Plasmidpräparation mittels Affinitätsmatrix

Aus 2-4 ml Übernachtskultur (Kapitel 2.5.1) wurde mit Hilfe des QIAprep Miniprep Kit (QIAGEN) oder NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel), nach der Angaben des Herstellers, Plasmid DNA gewonnen.

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen unter nativen Bedingungen

Die Aufreinigung der Polyhistidin-markierten Proteine erfolgte durch *Immobilized Metal Affinity Chromatography*. Die HiTrap Chelating HP Säule, die an eine Peristaltikpumpe angeschlossen wurde, wurde mit 5 ml 10 mM EDTA gewaschen und dann mit 5 ml 50 mM NiCl beladen und mit 5 ml NAT-B Puffer äquilibriert. Das Proteinrohextrakt (Kapitel 2.5.2) zirkulierte zwischen 30 Min. und 1 Stunde bei einer Flussrate von 1 ml/Min. über die Säule. Die einzelnen Proben wurden in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Die Proteinkonzentration in den Fraktionen wurde mittels Bradford-Assay bestimmt. Zur Reinheitsbestimmung wurde diskontinuierliche SDS-PAGE (Kapitel 2.6.7) gefolgt von Coomassie (Kapitel 2.6.9) oder Silberfärbung (Kapitel 2.6.9) durchgeführt. Die Nickel-Ionen wurden mit 5 ml 10 mM EDTA von der Säule entfernt. Anschließend wurde die Säule mit 2 ml 0,25 M NaOH und bis zu Erreichen von pH 7,0 mit ddH₂O gewaschen und dann bei 4 °C in 0,02 % Na-Azid gelagert.

2.6.1.1 Aufreinigung von AtNAA50p

Die unspezifisch an die Säule gebundenen Proteine wurden mit 10 ml NAT-W Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 80 mM Imidazol) von der Säule gewaschen. Die spezifische Elution des Proteins erfolgte mittels 8 ml NAT-E Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 400 mM Imidazol).

2.6.1.2 Aufreinigung von AtNAA10p

Zunächst erfolgte das Waschen der HiTrap Chelating HP Säule für 10 bis 15 Min. mit Waschpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 50 bis 80 mM Imidazol), dann die Elution der Proteine mit 8 bis 10 ml Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 400 mM Imidazol).

2.6.2 **Aufreinigung von rekombinanten Proteinen unter denaturierenden Bedingungen**

Die Proteinaufreinigung unter denaturierenden Bedingungen erfolgt über die Wechselwirkung zwischen dem His-Tag des rekombinanten Proteins und an eine Agarosematrix gebundener Nickel-Ionen. Für die Aufreinigung von rekombinanten AtNAA10p wurden 500 bis 700 µl Ni-NTA-Agarose in Ethanol (Quiagen) in ein 15 ml-Röhrchen überführt und nach dem Absetzen der Agarosematrix wurde der Überstand abgenommen. Anschließend wurde die Ni-NTA-Agarose in 5 ml Puffer B (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris/HCl, 8 M Harnstoff) pH 8,0 äquilibriert und in eine befüllbare Kunsstoffsäule überführt. Nach dem Abtropfen des Puffers aus der Säule, war sie einsatzfähig. Das Pellet (Kapitel 2.5.2) wurde mittels Ultra-TurraxT25 (Janke und Kunkel, IKA-Labortechnik) in 10 ml Puffer B resuspendiert und bei 18000 rpm für 15 Min. zentrifugiert. Danach erfolgte die Überführung des Überstandes in ein neues Falcon und die Zentrifugation wurde wiederholt. Der Überstand wurde durch einen 0,45 µm-Filter filtriert und für die Aufreinigung verwendet. Der gesamte Proteinrohextrakt wurde dreimal auf die Säule gegeben. Danach erfolgte das dreimalige Waschen der Säule mit je 1 ml Puffer C (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris/HCl, 8 M Harnstoff) pH 6,6 und die Elution mittels pH-Gradienten: 3x500 µl Puffer D (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris/HCl, 8 M Harnstoff) pH 5, 9, 2x500 µl Puffer X (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris/HCl, 8 M Harnstoff) pH 5,2 und 4 x 500 µl Puffer E (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris/HCl, 8 M Harnstoff) pH 4,5. Die Proteinkonzentration allen Fraktionen wurde mittels Bradford-Assay (Kapitel 2.6.6) bestimmt. Im Falle des Vorkommens eines unspezifischen Proteins in den Elutionsfraktionen erfolgte die Vereinigung der Elutionsfraktionen, die Einstellung des pH-Werts auf pH 8,0 und das erneute Aufgeben des Extraktes auf die Ni-NTA-Agarose-Säule. Zum Entfernen der unspezifisch gebundenen Proteine wurde die Säule mit Puffer C gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution mit Puffer D, X und E. Nach der Aufreinigung erfolgte das Waschen der Säule mit 5 Säulenvolumina ddH₂O und deren Lagerung in 0,02 % Na-Azid bei 4 °C.

2.6.3 **Aufreinigung potenzieller Interaktionspartner von AtNAA10p unter nativen Bedingungen**

Die Proteinaufreinigung erfolgte mittels *Tandem Affinity Purification* (TAP). Mit Hilfe von dem System werden Proteinkomplexe in zwei Schritten aufgereinigt. In dem ersten Schritt erfolgte die Aufreinigung durch IgG-Beads, für den zweiten Aufreinigungsschritt wurden Ni²⁺-Beads angewendet.

Zwischen 15 bis 25 g auf Gentamycin selektierten Pflanzen, wurden unter Stickstoffkühlung gemörsert. Das gemörserte Blattmaterial wurde in eiskalten TAP Extraktionspuffer (50mM Tris-HCl pH7,5, 150mM NaCl, 10% Glycerin, 0,1 % Nonidet P-40, kurz vor der Extraktion 1mM PMSF), für 10 Min. eingerührt und durch Papierfilter filtriert (10 g Blattmaterial ca. 25 ml Extraktionspuffer). Das Filtrat wurde für 20 Min. bei 13000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit IgG-Beads versetzt (auf ca. 10 ml Extrakt 1 ml IgG-beads) und für 3 Stunden bei 4 °C unter leichtem Drehen inkubiert und anschließend für 3 Min. bei 300×g bei 4 °C zentrifugiert. IgG-Beads wurden viermal mit 10 ml TAP-Waschpuffer (50mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mMNaCl, 10% Glycerin, 0,1 % Nonidet P-40) gewaschen. Nach jedem Waschschrift folgte eine 3-minutige Zentrifugation bei 300×g bei 4 °C. Anschließend wurden die IgG-beads erneut mit 5 ml TAP-Waschpuffer und 100 Units 3C Protease (Prescission protease) versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert und danach 3 Min. bei 300×g bei 4 °C zentrifugiert. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde mittels Bradford-Assay bestimmt. Die IgG-Beads wurden erneut mit 1,5 ml TAP-Waschpuffer gewaschen und 3 Min. bei 300×g bei 4 °C zentrifugiert. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde mittels Bradford-Assay bestimmt. Im zweiten Aufreinigungsschritt wurde das gesamte Elutionsvolumen des ersten Aufreinigungsschrittes (ca. 6 ml) mit zuvor in TAP-Waschpuffer äquilibrierten Ni-Beads (ca. 600 µl) für 1 Stunde bei 4 °C unter leichtem Drehen inkubiert. Die Ni-Beads wurden dreimal mit 10 ml TAP-Waschpuffer gewaschen. Abschließend wurden die Proteine mit NAT-E Puffer in 500 µl-Fractionen eluiert. Die Proteinkonzentration von allen Fraktionen wurde mittels Bradford-Assay bestimmt. Der Proben wurden mit einem entsprechenden Volumen 5- fachen Laemmli-Puffer (0,1 % Tris pH7,0, 5 % SDS, 3,63 M β-Mercaptoethanol, 20 % (v/v) Glycerin, 0,01 % Bromphenolblau) versetzt und 10 Min. bei 95 °C denaturiert und bei - 20 °C gelagert.

2.6.4 Größenausschluss-Chromatographie

Zur Feststellung des Grades der Oligomerisierung der Proteine und zum Trennen von verschiedenen Proteinen aus einem Proteingemisch wurde eine Größenausschluss-Chromatographie durchgeführt. Für die Auftrennung der Proteine wurde HiLoad 16/60 Superdex 200 Prepgrade Säule (GE Healthcare) verwendet, die vor dem Auftragen der Proteine mit 120 ml Äquilibrierungspuffer bzw. NAT-B gespült wurde. Die Flussrate während der Chromatographie lag bei 1 ml/Min. Es wurden 1-2,5 mg Protein pro Lauf verwendet. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Absorptionsmessung bei 280 nm. Das Molekulargewicht der Proteine wurde anhand einer Kalibrierungskurve bestimmt, die mit dem High Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit von GE Healthcare erstellt wurde. Die Säule wurde mit 4 Säulenvolumina 0,25 M NaOH und anschließend mit 5 Säulenvolumina NAT-B Puffer gewaschen. Die Säule wurde in Ethanol gelagert.

2.6.5 Aufkonzentrierung von Proteinen

Die Aufkonzentrierung von einer Proteinlösung über Vivaspin 2 Säulen (5 MWCO/PES) wurde gemäß Angaben des Herstellers durchgeführt

Die Aufkonzentrierung von Proteinen erfolgte ebenfalls durch Zugabe vom Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration 75 %. Ammoniumsulfat wurde unter ständigem Rühren auf Eis zur Probe gegeben. Die ausgefällten Proteine wurden anschließend durch eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 16400 rpm und 4 °C pelletiert und in dem gewünschten Volumen des entsprechenden Puffers aufgenommen.

Für die massenspektrometrische Analyse, welche mit Zusammenarbeit mit Fabian Hosp durchgeführt wurde (Kapitel 2.6.11), wurden Proteine durch eine Natriumacetatfällung aufkonzentriert. Zu 300 µl Proteinextrakt wurden 70 µl 2,5 M Natriumacetat pH 5,0 und 1,63 ml 100 % Ethanol zugegeben. Die Probe wurde kurz gemixt und über Nacht bei RT inkubiert. Nach 30-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm wurde das Pellet luftgetrocknet und in dem gewünschten Volumen des entsprechenden Puffers aufgenommen.

2.6.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Konzentration der löslichen Proteine nach Bradford (1976) zu bestimmen wurden je 10 µl Probelösung in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte pipettiert und mit

250 µl des 1:5 verdünnten Roti-Quant Bradford-Reagenz versetzt. Nach 5 Min. Inkubation bei RT erfolgte die Extinktionsmessung bei 595 nm am Platereader Fluostar Optima. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand einer Eichgerade hergestellt mit 0,1 µg/µl, 0,2 µg/µl und 0,4 µg/µl BSA (Rinderserumalbumin).

Die Konzentrationsbestimmung für die Isoelektrische Fokussierung (Kapitel 2.6.8) wurde mittels 2-D Quant Kit (Amersham) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.6.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer molekularen Masse wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (1970) angewendet. Der Acrylamidgehalt des Sammelgels (0,08 M Tris pH 6,8, 0,065 % (w/v) SDS, 0,026 % crosslinker) lag bei 4 % und die des Trenngels (0,37 M Tris pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,026 % crosslinker) bei 12,5 %. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen 5xLaemmli-Puffer (0,1 M Tris pH 7,0, 5 % (w/v) SDS, 3,63 M β-Mercaptoethanol, 20 % Glycerin, 0,01 % Bromphenolblau) versetzt und für 10 Minuten bei 98 °C denaturiert. Als Größenstandard dienten die Proteinmarker Mark12 von Invitrogen oder ColorPlus Prestained von NEB. Die Elektrophorese fand im SDS-PAGE Laufpuffer (250 mM Tris pH 8,3, 1,92 mM Glycin, 1 % (w/v) SDS) statt. Die Proteine, wurden im Sammelgel 30 Min. bei 80 V konzentriert, dann wurde die Spannung auf 120 V erhöht um die Proteine im Trenngel aufzutrennen. Die Elektrophorese wurde bei Austreten des Bromphenolblaus aus dem Gel beendet.

2.6.8 Isoelektrische Fokussierung von Proteinen

Um Proteine in der ersten Dimension entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt (IEP) zu separieren wurde 2-dimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewendet. Dazu wurde ein Proteinextrakt aus Arabidopsis Blattmaterial hergestellt. Für die Extraktion wurden ca. 550 mg Blattmaterial geerntet und im flüssigen Stickstoff eingefroren und dann mittels Potterhomogenisator RZR 2041 (Heidolph) zerkleinert. Das Pulver wurde mit 5 ml TCA-Aceton Lösung (10 % (w/v) TCA, 0,07 % β-Mercaptoethanol in Aceton) versetzt. Die Suspension wurde auf 2 ml Eppendorfgefäße verteilt, 30 Sekunden im flüssigen Stickstoff abgekühlt, 80 Min. bei -20 °C inkubiert und danach 15 Min. bei 4 °C, 16400 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde

verworfen und das Pellet mit 1,5 ml Waschlösung (0,07 % 2-Mercaptoethanol in Aceton) durch Vortexen oder 5 Min. Ultraschallbad auf Eis resuspendiert. Die Probe wurde erneut 30 Sec. im flüssigen Stickstoff abgekühlt, 30 Min. bei -20 °C inkubiert und 10 Min. bei 4 °C und 16400 rpm abzentrifugiert. Der Waschvorgang wurde nochmal wiederholt und die Probe über Nacht bei -20 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe 10 Min. bei 4 °C und 16400 rpm abzentrifugiert. Der Waschvorgang wurde erneut wiederholt und die Probe 15 Min. bei 4 °C und 16400 rpm abzentrifugiert und zum Abschluss bei RT getrocknet. Das luftgetrocknete Pellet wurde in 175 µl RL-Lösung (8 M Harnstoff, 2 % CHAPS, 0,005 % Bromphenolblau) durch Vortexen oder 5 Min. Ultraschallbad auf Eis resuspendiert und anschließend 20 Min. bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Proteinkonzentration des Extraktes wurde mit Hilfe des 2-D Quant Kit bestimmt (Kapitel 2.6.6). Unmittelbar vor Gebrauch wurde die Probe mit 20 mM DTT und 0,5 % IPG-Puffer versetzt und für 20 Min. bei RT zentrifugiert. Die Rehydratisierung eines 7 cm IPG Streifen (pH 3-6 und 5-8) wurde bei 50 V über Nacht (Minimum 16 Stunden) in Biorad Protean IEF Kammer durchgeführt. Die isoelektrische Fokussierung wurde durch folgendes Programm erreicht: 40 Min. bei 250 V, 40 Min. bei 500 V, gradueller Anstieg auf 5000 V für 60 Min., 35.000 Voltstunden bei 5000 V, Absenken auf 1500 V. Die Streifen wurden bei -20 °C gelagert und am nächsten Tag im SDS Equilibrierung-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30 % Glycerin, 2 % SDS, 0,005 % Bromphenolblau) equilibriert. Das Auftrennen der Proteine in der 2. Dimension gemäß dem Molekulargewicht wurde wie unter Kapitel 2.6.7 beschrieben durchgeführt.

2.6.9 Visualisierung der aufgetrennten Proteine

Die Färbung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kapitel 2.6.7) aufgetrennter Proteine erfolgte mit Coomassie-Färbelösung (50 % (v/v) Methanol, 1 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue) für 30 Min. unter leichtem Schwenken. Anschließend wurde es mehrmals mit Entfärbelösung (20 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure oder ddH₂O gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

Geringkonzentrierte Proteine wurden mit Hilfe der Silberfärbung detektiert. Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten bei RT auf dem Schüttler. Inkubation des

PAA-Gels für 30 Min. in Fixierungslösung (300 ml Ethanol, 50 ml Essigsäure, 650 ml ddH₂O, gefolgt von drei Waschgängen jeweils für 10 Min. in 18Ω-H₂O. Sensibilisierung für 1 Min. in Sensibilisierungslösung (10% Thiosulfat), gefolgt von zwei Waschgängen jeweils für 1 Min. in 18Ω-H₂O. Anschließend wurde das PAA-Gel für 30 Min. in Silbernitratlösung (10 % (w/v) Na-Thiosulfat) für 30 Min. geschüttelt und überschüssige Lösung anschließend durch einen 5 bis 10-sekündigen Waschschrift mit 18Ω-H₂O entfernt. Die Entwicklung erfolgte in Entwicklungslösung (100 ml 30 % Kaliumcarbonat, 250 ml 37 % Formaldehyd, 125 µl 10 % Na-Thiosulfat, 525 ml ddH₂O) für 5-10 Min. Die Reaktion wurde durch eine 30-60-minütige Inkubation in Abstopplösung (10 ml Essigsäure, 990 ml ddH₂O) beendet. Zum Abschluss erfolgte das mehrmalige Waschen des Gels in H₂O.

Die Silberfärbung wurde ebenso mittels PlusOne Silver Staining Kit (GE Healthcare) gemäß Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.6.10 Immunologische Detektion von Proteinen

2.6.10.1 Herstellung und Aufreinigung eines spezifischen Antikörpers gegen AtNAA10p

Das gewünschte Antigen wurde mittels Metallaffinitätschromatographie aufgereinigt (Kapitel 2.6.2). Die Fraktion mit der höchsten Proteinkonzentration wurde sterilfiltriert und für die Immunisierung des Kaninchens benutzt. Für die erste Immunisierung wurden 300 µl des aufgereinigten Antigens mit 300 µl Freund's *complete Adjuvanz* (Sigma-Aldrich, Steinheim) und für jede weitere Immunisierung mit 300 µl Freund's *incomplete Adjuvanz* (Sigma-Aldrich, Steinheim) versetzt. Das erhaltene Blut (Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung; IBF) wurde nach 24 Stunden bei 4 °C für 20 Min bei 4 °C und 10000xg zentrifugiert. Falls notwendig, wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt. Das Serum wurde mit 0,2 % Na-Azid versetzt bei 4 °C sowie -20 °C gelagert.

Zur Aufreinigung des primären Antikörpers wurden ca. 0,5 mg des aufgereinigten Antigens mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kapitel 2.6.7) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Kapitel 2.6.10.2). Nach Lokalisieren des Antigens auf der Membran mittels Ponceau Lösung (0,1 % (w/v)

Ponceau S 5 % (v/v) Essigsäure) wurde ein Streifen der Membran mit dem Antigen in ein Röhrchen mit ca. 30 ml Blutserum überführt und für 3 Stunden unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran in ein 15 ml-Röhrchen überführt und die Elution der am Antigen gebundenen Antikörper erfolgte mit 2 ml Glycinpuffer (pH 2,4). Dazu wurde die Membran für 10 bis 15 Sekunden im Glycinpuffer geschwenkt und anschließend mit 100 mM Tris-Puffer pH 7,5 neutralisiert. Der aufgereinigte Antikörper wurde mit 0,02 % Na-Azid versetzt und bei 4 °C gelagert.

2.6.10.2 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembrane (*Western Blot*)

Die mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kapitel 2.6.7) aufgetrennten Proteine wurden für 16 h in Transferpuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM Glycin, 0,4 % SDS, 20 % Methanol) bei 45 mA und 4 ° C in einer Mini-ProteanTM-II-Zelle von BIORAD elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran nach (Towbin et al., 1979) übertragen. Der Blot bestand vom Minus- zum Pluspol aus einem Schwamm, 2 Lagen Whatmanpapier, dem Gel, der Nitrocellulosemembran, 2 Lagen Whatmanpapier und einem weiteren Schwamm.

2.6.10.3 Immunologischer Nachweis der Proteine

Durch eine reversible Färbung mit Ponceau-Lösung für 15 Minuten und die anschließende Entfärbung mit ddH₂O konnte der Proteintransfer überprüft und die Proteine des Größenstandards (Mark12, Invitrogen) auf der Nitrocellulosemembran gekennzeichnet werden. Anschließend wurde die Membran in einer Blocklösung zur Absättigung unspezifischer Bindungsplätze inkubiert. Die Membran wurde kurz in 1xTBS gewaschen und für 90 Min. in einer 1:1000 bis 1:12000-Verdünnung des Primärantiköpers inkubiert. Zur Entfernung des nicht gebundenen Primärantiköpers erfolgten drei 10-minütige Waschschrte mit 1xTBS. Die Nitrocellulosemembran wurde dann für 90 Min. in einer 1:10000-Verdünnung des Anti-Kaninchen/Alkalische-Phosphatase-(AP)-Konjugats (Promega) inkubiert, anschließend dreimal für 10 Min. in 1xTBS gewaschen und für 2 Min. in AP-Puffer (100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) äquilibriert. Die Proteine konnten nun durch die alkalische Phosphatase, welche am sekundären Antikörper konjugiert war, detektiert werden. Dazu wurden 115 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und 330 mg/ml Nitroblau-

Tetrazoliumchlorid (NBT) in AP-Puffer auf der Membran bei RT und in Dunkelheit für wenige Minuten inkubiert. Sobald Proteinbanden deutlich sichtbar waren, wurde die Reaktion mit 1 % (v/v) Essigsäure gestoppt.

2.6.11 Massenspektrometrische Analyse

Die Identifizierung durch 2-dimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kapitel 2.6.8) aufgetrennte Proteine und die Identifizierung der extrahierten Proteine aus Arabidopsis Blattmaterial (Kapitel 2.3.5) wurde jeweils mit Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Ruppert (ZMBH, Heidelberg) und Fabian Hosp (Dept. Intracellular Signaling and Mass Spectrometry, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin) mittels massenspektrometrischer Analyse durchgeführt. Die Trypsin verdauten Peptide wurden in der Abteilung von T. Ruppert mit Hilfe von *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF-MS) an einem Massenspektrometer Bruker Ultraflex analysiert. Die Proteine wurden mit Hilfe der NCBI Datenbank und Mascot 2.1 (Matrix Science) identifiziert. Peptide eines Proteinextraktes wurden mittels *Nanoflow Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry* (nanoLC-MS/MS) mit einem Agilent Technologies 1200 nanoflow System oder einem Eksigent nanoLC-1Dplus System analysiert. Die MS/MS Daten wurden mit der *Arabidopsis thaliana* IPI Protein Datenbank Version 3.60 verglichen. Peptide und Proteine wurden mittels Mascot (Matrix Science, London) und einer hergestellten Datenbank identifiziert.

2.6.12 *In vitro* N^α-Acetyltransferase-Aktivitätstest

Um die N^α-Acetyltransferaseaktivität von AtNAA50p zu bestätigen, wurde ein *in vitro* N^α-Acetyltransferase Test (100 µl Reaktionsvolumen) mit dem rekombinanten NAA50p (Kapitel 2.6.1.1) durchgeführt. Das Protein (ca. 4,2 bis 4,8 µg) wurden mit 10 µl 2 mM Peptid (custom-made peptides von T. Arnesen (Department of Molecular Biology, University of Bergen, Norway)), 1 µl [acetyl-3H]-Acetyl-Coenzyme A (37 MBq/ml, 8,14 GBq/mmol; Hartmann Analytic GmbH), 4 µl 5 % BSA und Acetylierungspuffer (500 mM Tris/HCl pH7,5, 10 mM DTT, 8 mM EDTA) versetzt. Die Sequenz von den Peptiden betrug 1-24 Aminosäuren, von der die ersten sieben am N-Terminus unikal für die N-Acetylierung und die nächsten 17 identisch mit denen von ACTH waren. Der Mix wurde auf 100 µl mit Acetylierung-Puffer (500 mMTris/HCl pH 7,5, 10 mM DTT, 8

mM EDTA) aufgefüllt. Die Probe wurde anschließend zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und dann 4 Min. bei RT und 1500×g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 100 µl SP Sepharose (50 % Suspension in 0,5 M Essigsäure) für 5 Min. inkubiert und danach erneut 4 Min. bei RT und 1500×g zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet dreimal mit 0,5 M Essigsäure und einmal mit 100 % Methanol gewaschen. Die Aktivität wurde im Sziutillationszähler anhand der gebundenen Menge von [acetyl-3H]-AcCoA, jeweils nach 15, 30, 60 und 120 Min. nachgemessen. Es wurden zwei Varianten von Kontrollen verwendet. Das AtNaa10p wurde einmal 10 Min. bei 95 °C inkubiert um die enzymatische Aktivität zu zerstören. Bei der zweiten Kontrolle wurde das Protein durch den NAT-E Puffer ersetzt.

Der N^α-Acetyltransferase-Aktivitätstest mit AtNAA10p wurde in Zusammenarbeit mit T. Arnesen (Department of Molecular Biology, University of Bergen, Norway) durchgeführt. Das Konstrukt pET32a_AtNAA10 (Linster, 2010) wurde der Gruppe von T. Arnesen zur Verfügung gestellt. Das AtNAA10p wurde schlussendlich in den pETM41-Vektor (G. Stier, EMBL) kloniert und das hergestellte Konstrukt pETM41_AtNAA10 für die Aufreinigung mittels HisTrap Säule und anschließende Größenausschluss-Chromatographie verwendet. Das rekombinante MBP-His:AtNAA10-Fusionsprotein wurde erfolgreich aufgereinigt und für den *in vitro* N^α-Acetyltransferase-Aktivitätstest benutzt. Der Aktivitätstest basiert auf dem bereits beschriebenen Versuch (Evjenth et al., 2009a).

2.7 Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

Lokalisationsstudien mit fluoreszenzmarkierten Proteinen wurden mittels *confocal laser scanning microscopy* (LSM 510 META, Zeiss, Oberkochen) bestimmt. Die endogene Lokalisierung wurde in sieben bis 14 Tagen stabil transformierten (Kapitel 2.3.7.1) Arabidopsis-Keimlingen durchgeführt. Um die Mitochondrien zu färben wurden die Keimlinge 45 Minuten in 500 nM MitoTracker-Lösung Orange CM-H₂TMRos (M7511) von Invitrogen (1:20,000 Verdünnung von 1 mM Stammlösung) inkubiert. Für die heterologe Lokalisierung wurden *N. benthamiana* oder *N. tabacum* verwendet (Kapitel 2.3.7.2). Die Fluoreszenz von EYFP wurde mit 514 nm Wellenlänge angeregt und nach einem Bandpassfilter 520-620 nm detektiert. Autofluoreszenz von Chloroplasten wurde ebenfalls mit 488 nm angeregt und zwischen 560 und 615 nm aufgefangen. Die Bilder

wurden durch die Zeiss LSM 510 Software analysiert. Zur weiteren Bearbeitung wurden die Bilder in voller Auflösung als Tiff-Datei in Adobe Photoshop CS exportiert.

2.8 Statistische Methoden

Bei statistischen Analysen wurden die konstante Varianz und die Normal-Verteilung der Meßpunkte als Voraussetzung für die Anwendung der statistischen Methode mit SigmaStat 3.0 überprüft. Wenn die Stichprobe Normal-verteilt war, wurde der t-Test für den Vergleich zwischen 2 Mittelwerten aus unabhängigen Stichproben verwendet. Im anderen Fall wurde der Mann-Whitney-Test angewendet. Die Signifikanz wurde mit Hilfe von Sternen dargestellt: $P \leq 0.05 > 0.01^*$; $P \leq 0.01 > 0.001^{**}$; $P \leq 0.001^{***}$.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung der katalytischen Untereinheit des NatA-Komplexes

Die Sequenz der katalytischen Untereinheit des *S. cerevisiae* NatA-Komplexes, Naa10p (Yhr013cp) (Proteinsequenz: Anhang 6.1), wurde für eine Orthologiesuche im Arabidopsis Proteom mittels BLAST Algorithmus (TAIR BLASTP2.2.8, www.arabidopsis.org) genutzt. Es konnte das Protein At5g13780 identifiziert werden, das eine deutlich höhere Homologie als andere Proteine aufwies (Anhang 6.2). Orthologe zu dem AtNAA10p wurden in Organismen des Pflanzen-, Pilz- und Tierreiches sowie in Bakterien gefunden: *Oryza sativa* (86 % Identität zu Arabidopsis), *Glycine max* (81 %), *Chlamydomonas reinhardtii* (75 %), *Physcomitrella patens* (87 %), *Homo sapiens* (67 %), *Drosophila melanogaster* (68 %), *Ceanorhabditis elegans* (67 %), *Schizosaccharomyces pombe* (61 %), *Saccharomyces cerevisiae* (44 %), *Synechocystis sp.* PCC6803 (40 %) (Abbildung 3.1).

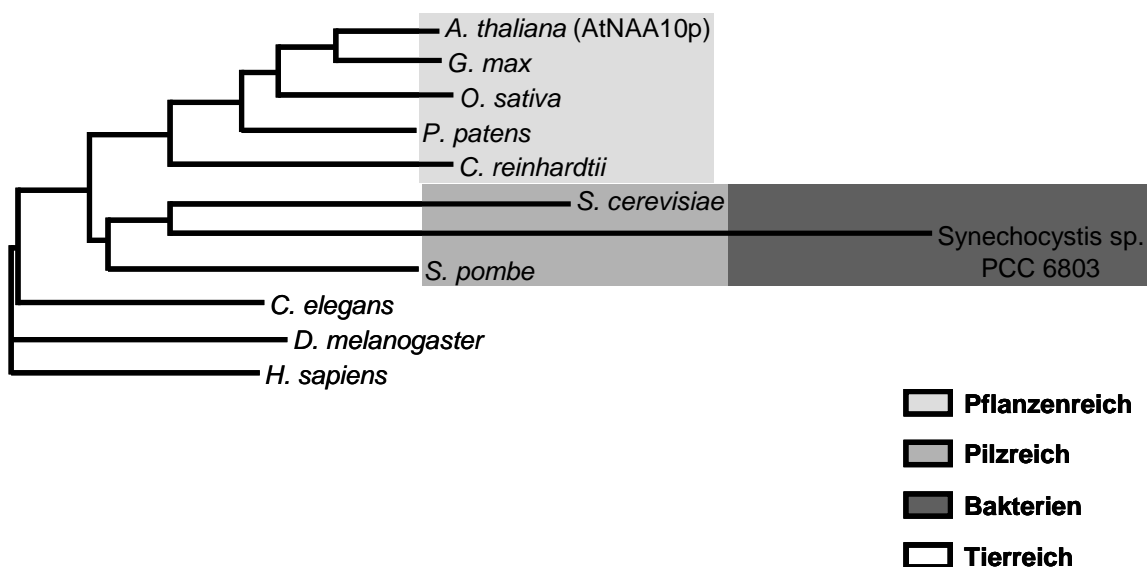


Abbildung 3.1 Die evolutionäre Verwandtschaft des AtNAA10p zu niederen und höheren Eukaryoten sowie Cyanobakterien

Die Abbildung zeigt die evolutionäre Abstammung der orthologen NAA10p aus dem Pflanzen-, Tier- und Pilzreich sowie Bakterien. Die Proteine wurden mittels BLAST Algorithmus (TAIR BLASTP2.2.8, www.arabidopsis.org) verglichen. Die pflanzlichen Orthologe, *G. max* (11g16210), *O. sativa* (Os04g0635800; NP_001054011.1), *P. patens* (XP_001781748.1) und *C. reinhardtii* (XP_001696115.1), zeigen die höchste Identität mit dem AtNAA10p. Sie bilden ebenso wie die Pilze *S. pombe* (NP_594309.1) und *S. cerevisiae* (Yhr013cp) zusammen mit den Cyanobakterien *Synechocystis sp.* PCC6803 (NP_441109.1) jeweils einen Ast des Stammbaumes. Die Organismen aus dem Tierreich, *C. elegans* (NP_501392.1), *D. melanogaster* (NP_648378.1) und *H. sapiens* (NP_003482.1), bilden ebenfalls einen Ast des Stammbaumes.

3.1.1 Biochemische Charakterisierung von AtNAA10p

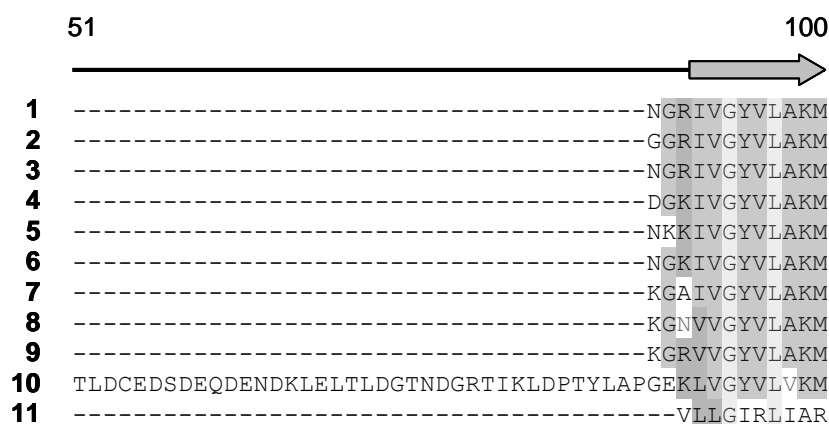
Die biochemische Charakterisierung des AtNAA10p wurde durch Analyse der konservierten Domänen und Überexpression des rekombinanten Proteins in *E.coli* durchgeführt.

3.1.1.1 Charakterisierung der Proteinstruktur von AtNAA10p

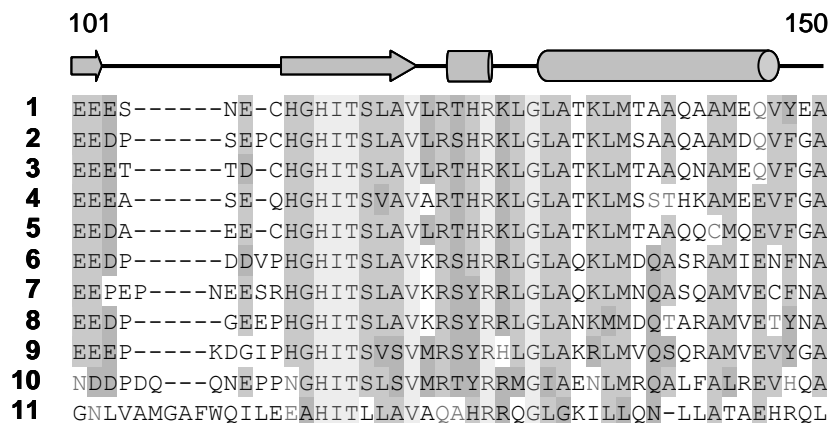
AtNAA10p enthält vier konservierte Motive, A, B, C und D, welche für die GNAT-Superfamilie charakteristisch sind (Abbildung 3.2; Kapitel 3.1.3) (Neuwald and Landsman, 1997; Dyda et al., 2000). Das Arabidopsis NAA10p hat eine Länge von 192 Aminosäuren und zeigt eine hohe Sequenzidentität mit Proteinen aus dem Pflanzen-, Pilz- und Tierreich sowie Bakterien (Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2). Der Aminosäurenvergleich der putativen als auch bereits bekannten NAA10-Acetyltransferasen verschiedener Eukaryoten und Prokaryoten zeigt eine deutliche Konservierung des N-Terminus im Gegensatz zum vergleichsweise schwach konservierten C-Terminus. Interessanterweise zeigt die ScNaa10p einen Einschub im Sequenzbereich von 51-100 Aminosäuren im Vergleich zu den anderen analysierten Naa10-Proteinsequenzen verschiedener Eukaryoten (Abbildung 3.2; 10). Die Sekundärstruktur des AtNAA10p wurde mit dem Programm PSIPRED (www.bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred) vorhergesagt. Das AtNAA10p scheint aus jeweils sechs α -Helices und sechs β -Schleifen zu bestehen.



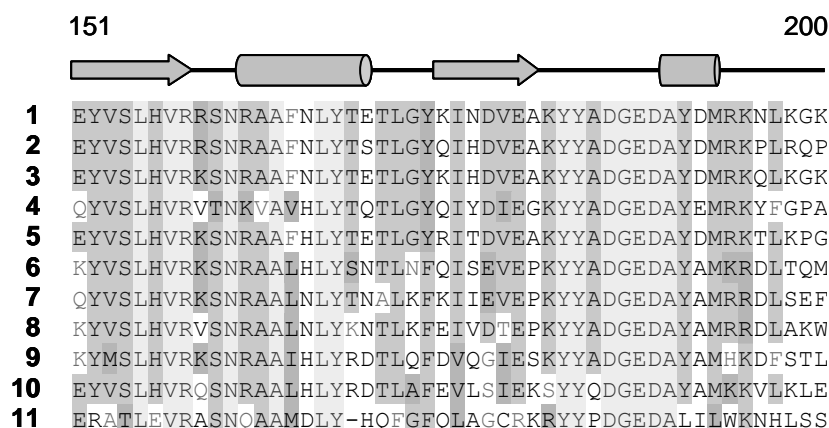
Motiv C



Motiv D



Motiv A



Motiv B

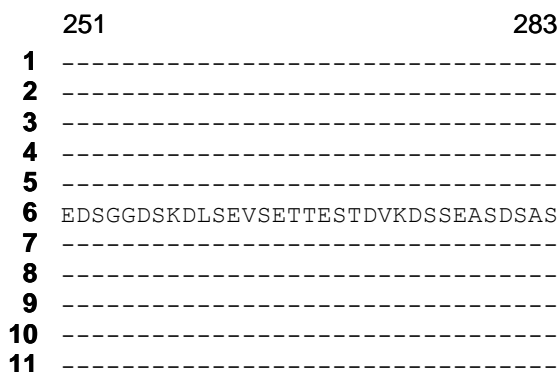
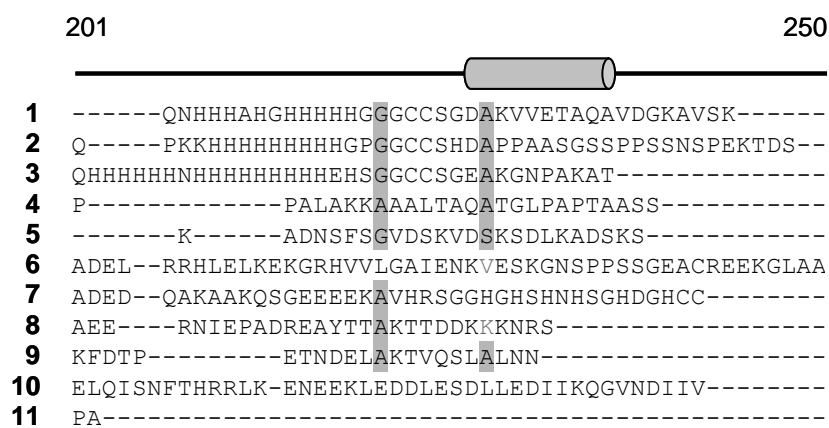


Abbildung 3.2 Proteinsequenzvergleich zwischen orthologen NAA10-Proteinen

Die Abbildung zeigt den Proteinsequenzvergleich zwischen *A. thaliana* (At5g13780) und *O. sativa* (Os04g0635800; NP_001054011.1), *G. max* (11g16210), *C. reinhardtii* (XP_001696115.1), *P. patens* (XP_001781748.1), *H. sapiens* (NP_003482.1), *D. melanogaster* (NP_648378.1), *C. elegans* (NP_501392.1), *S. pombe* (NP_594309.1), *S. cerevisiae* (Yhr013cp), *Synechocystis sp.* PCC6803 (NP_441109.1). Der Aminosäuresequenzvergleich wurde mit dem Programm Vector NTI 9 (AlignX) durchgeführt und die konservierten Aminosäuren wurden grau hinterlegt. Die Sekundärstruktur wurde mittels PSIPRED vorausgesagt und oberhalb der Proteinsequenz dargestellt: β -Schleifen wurden als Pfeile und α -Helices als Zylinder markiert. Die konservierten Motive, A, B, C und D, der GNAT-Superfamilie (Neuwald and Landsman, 1997) wurden unterhalb der Proteinsequenz gezeigt.

3.1.1.2 Überexpression und Aufreinigung des rekombinanten AtNAA10p

Das AtNAA10p wurde mittels C-terminalem Histidin-Tag (His) für die Antikörperherstellung aufgereinigt. Dazu wurde der kodierende Bereich der cDNA für das AtNAA10p (Proteinsequenz: Anhang 6.1) vom Klon U15240 (www.arabidopsis.org) mit den Primern 750 und 1002 (Anhang 6.3.3) amplifiziert und schlussendlich mittels Gateway-Klonierung (Kapitel 2.4.10.1) in den Expressionsvektor pETG10a kloniert (Expressionskonstrukt: Anhang 6.4A). Das Protein wurde in *E.coli* HMS 174 exprimiert und mittels IMAC aus dem Proteinextrakt aufgereinigt (Kapitel 2.6.1.2). Nach einer Aufreinigung aus 250 ml Kulturvolumen unter Standardbedingungen konnte kein Protein mit dem vorausgesagtem Molekulargewicht von 23,8 kDa inklusive His-Fusion-Tag aufgereinigt werden (Daten nicht gezeigt). Zur Optimierung der Expression des rekombinanten AtNAA10p wurde sowohl die Dauer der IPTG-abhängigen Induktion, die Inkubationstemperatur als auch die Schüttelstärke bei der die Bakterienkulturen angezogen wurden, variiert. Es wurden zwei unabhängige Koaufräufingungen aus jeweils 900 ml HMS 174/pETG10a_ AtNAA10 sowie HMS 174/pETG10a_ AtNAA15 nach einer 18-stündigen Inkubation bei 18 °C und 180 rpm durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnten zwei Proteine eluiert werden. Ein Protein mit dem vorausgesagten Molekulargewicht des His:NAA10p mit einer Konzentration von ca. 0,4 µg/µl und eins mit einem Molekulargewicht von etwa 60 kDa mit einer Konzentration von ca. 3,8 µg/µl (Abbildung 3.3A). Letzteres konnte durch LC-MS/MS als GroEL identifiziert werden (Linster, 2010). Die Gesamtproteinmenge lag bei ca. 13,74 mg. Um die Proteinausbeute von AtNAA10p zu verbessern wurde das Kulturvolumen der Bakterien HMS 174/pETG10a_ AtNAA10 auf 2 Liter erhöht und die Schüttelstärke auf 110 bis 70 rpm gesenkt. Zusätzlich wurde dem LB-Medium 0,5 g/L α -D-Glukose zugefügt. Letztendlich konnte His:NAA10p, infolge einer Aufreinigung aus 2 L Kulturvolumen sowie 15-stündiger Inkubation bei 18 °C und 110 rpm, zwar nicht rein aber in verhältnismäßig hoher Konzentration von ca. 0,6 µg/µl aufgereinigt werden. Die Gesamtproteinmenge lag bei ca. 4,14 mg (Abbildung 3.3B).

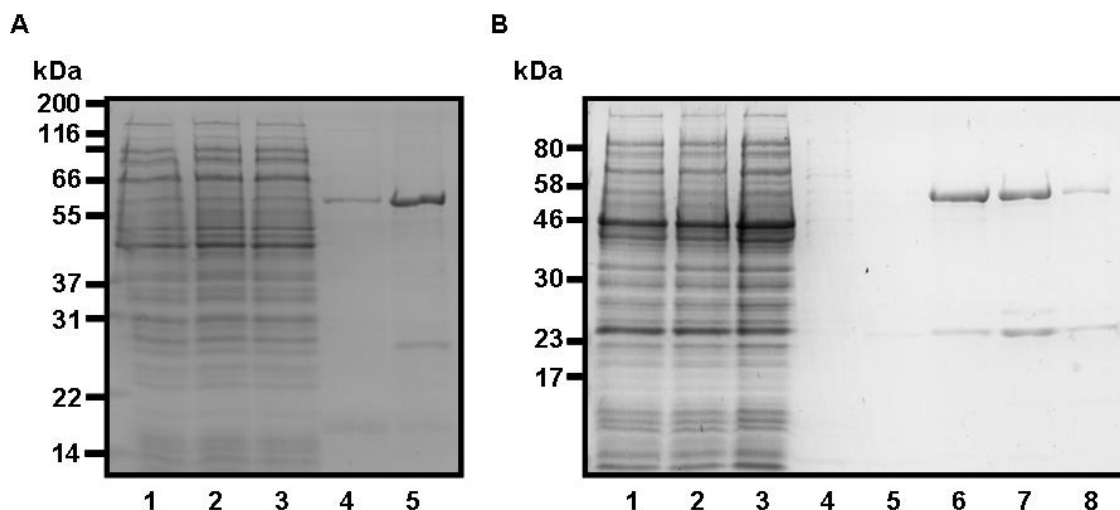


Abbildung 3.3 Aufreinigung von AtNAA10p unter nativen Bedingungen

(A, B) Die Proteinfractionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung visualisiert. (A) Die Abbildung zeigt eine Aufreinigung aus 900 ml Kulturvolumen sowie einer 18-stündigen Inkubation bei 18 °C und 180 rpm. (1) Rohextrakt [7,5 µg], (2) Durchfluss [7,5 µg], (3-4) das 12-malige Waschen erfolgte mit 80 mM Imidazol. Die Abbildung zeigt die Wachfraktionen 1 [7,5 µg] und 12 [1µg]. Die Proteine wurden mit 12 ml 400 mM Imidazol von der Säule eluiert. (5) Die Abbildung zeigt die zweite Elutionsfraktion [4µg]. (B) Die Aufreinigung aus 2 L Kulturvolumen sowie einer 15-stündigen Inkubation bei 18 °C und 110 rpm. (1) Rohextrakt, (2) Durchfluss, (3-5) das 15-malige Waschen erfolgte mit 50 mM Imidazol. Die Abbildung zeigt Wachfraktionen 1, 8 und 15. (6-8) Die Proteine wurden mit 8 ml 400 mM Imidazol von der Säule eluiert. Die Abbildung zeigt die ersten drei Elutionsfraktionen. Es wurden jeweils 5 µg jeder Fraktion aufgetragen.

Die Aufreinigung unter nativen Bedingungen ergab keine reine NAA10-Fraktion und deshalb wurde eine Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (Kapitel 2.6.2). Die Reinheit des Proteins wurde durch Auftrennung mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.6.7) und anschließender Visualisierung mittels Coomassie (Kapitel 2.6.9) überprüft. Die Elutionsfraktionen zeigten weiterhin andere Proteine, deren Anteil jedoch im Vergleich zu NAA10p gering war (Abbildung 3.4C; 4-6). Um reines NAA10p zu gewinnen wurden Elutionsfraktionen, welche mit Puffer E eluiert wurden vereinigt und erneut aufgereinigt (Abbildung 3.4D). Das His:NAA10p konnte unter denaturierenden Bedingungen im Gegensatz zu nativen Bedingungen rein mit einer Konzentration von ca. 0,8 µg/µl aufgereinigt und deswegen für die Antikörperherstellung verwendet werden. Die Gesamtproteinmenge betrug ca. 13,43 mg.

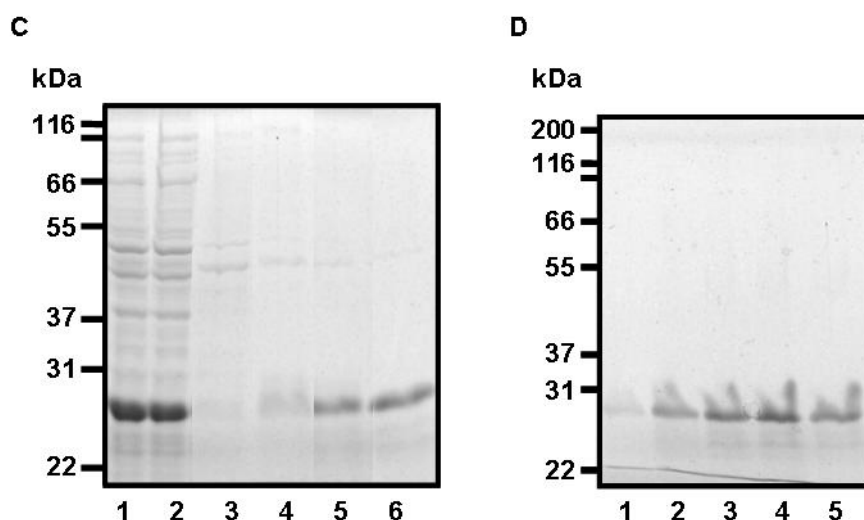


Abbildung 3.4 Aufreinigung von AtNAA10p unter denaturierenden Bedingungen

(A, B) Die Proteinfractionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung visualisiert. (A) (1) Rohextrakt [15 µg], (2) Durchfluss [15 µg], (3) die letzte Waschfraktion [2µg], (4-6) Elutionsfraktionen: (4) die Proteine wurden mit Puffer D, (5) mit Puffer X, (6) mit Puffer E eluiert. (B) Die folgende Aufreinigung erfolgte analog zu A. (1-5) Elutionsfraktionen: (1-2) Proteine wurden mit Puffer X, (3-5) mit Puffer E eluiert. Es wurden zwischen 1 und 5 µg von den Elutionsfraktionen aufgetragen.

3.1.1.3 Identifizierung potentieller Interaktionspartner von AtNAA10p

Die NAA10-Orthologe in Hefe und Menschen bilden mit einer Anker-Untereinheit den NatA-Komplex. Interessanterweise unterscheidet sich zum Teil die Struktur des NatA-Komplexes zwischen den niedrigen und höheren Eukaryoten (Park and Szostak, 1992; Arnesen et al., 2005b; Arnesen et al., 2009a). Um zu überprüfen, ob AtNAA10p ebenfalls mit anderen Proteinen einen Komplex bildet wurde das *Tandem Affinity Purification* (TAP) System genutzt. Das TAP-System ermöglicht die Isolation der Proteinkomplexe unter nativen Bedingungen und deren Aufreinigung in zwei Schritten (Rubio et al., 2005). Die *AtNAA10* kodierende cDNA (Proteinsequenz: Anhang 6.1) wurde vom Klon U15240 (www.arabidopsis.org) mit den Primern 750 und 751 (Anhang 6.3.3) mittels PCR amplifiziert und letztendlich mittels Gateway-Klonierung (Kapitel 2.4.10.1) in den Expressionsvektor pYL436 kloniert. Das dadurch generierte NAA10-Fusionsprotein trägt einen C-terminalen 9×Myc, 6×His, 3C Protease und 2×IgG Tag. Das pYL436_AtNAA10-Konstrukt (Anhang 6.4A) wurde stabil in Columbia Wildtyp Pflanzen (Col-0) transformiert (Kapitel 2.3.7.1). Die Expression des NAA10-Fusionsproteins erfolgte unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors. In der T1-

Generation wurden Col-0/pYL436_AtNAA10-Pflanzen mittels Selektion auf AT-Medium mit Gentamycin (Kapitel 2.3.2) und anschließender *Western Blot*-Analyse (Kapitel 2.6.10.2) identifiziert. Die Proteine wurden aus acht bis zehn Wochen alten Transformanten extrahiert (Kapitel 2.6.3) und mittels TAP (Kapitel 2.6.3) aufgereinigt. Die SDS-PAGE (Kapitel 2.6.7) und die darauf folgende *Western Blot*-Analyse zeigte eine Expressionsbande bei ca. 66 kDa statt beim voraussagten Molekulargewicht des AtNAA10:Myc-His-3CProt.-IgG von 56 kDa (Abbildung 3.5; 1). Nach dem ersten Aufreinigungsschritt mit Hilfe von IgG-Beads sollten Proteine eluiert werden, welche bei ca. 42 kDa detektierbar wären. Nach dem zweiten Aufreinigungsschritt mit Hilfe von Ni²⁺-Beads konnten Proteine bei ca. 50 kDa statt des vorausgesagten Molekulargewichts von 41 kDa detektiert werden (Abbildung 3.5A; 7-11). Es ist auffallend, dass Proteine in jeder Fraktion höher laufen als erwartet, was eventuell auf die C-terminale Fusion zurückzuführen ist. Möglicherweise wurde das Protein nicht vollständig linearisiert. Die maximale Konzentration der Proteine in den Elutionsfraktionen betrug 0,06 µg/µl (Abbildung 3.5A; 7). Die Proteinmenge nach dem ersten Aufreinigungsschritt lag bei 345,5 µg.

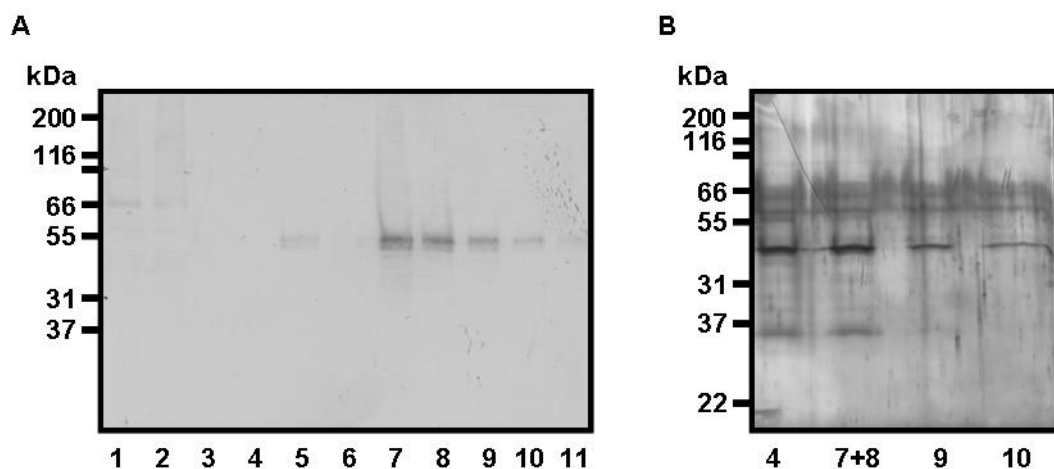


Abbildung 3.5 Aufreinigung von AtNAA10p mittels *Tandem Affinity Purification System*

(A, B) Die Proteinfraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. (A) Anschließend folgte der immunologische Nachweis der Proteine mit Hilfe des α -myc-Antikörpers. (B) Die Visualisierung der Proteine erfolgte mittels Silber-Färbung. (1) Rohextrakt, (2) ungebundene Proteine nach der Inkubation mit IgG-Beads, (3) die letzte Waschfraktion der IgG-Beads, (4) die Elutionsfraktion von IgG-Beads, (5) ungebundene Proteine nach der Inkubation mit Ni²⁺-Beads, (6) der letzte Waschschrift der Ni²⁺-Beads, (7-11) die Elutionsfraktionen von Ni²⁺-Beads.

Um die Interaktionspartner des NAA10p zu identifizieren wurden Proteine aus den Elutionsfraktionen, nach dem zweiten Aufreinigungsschritt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe der Silber-Färbung (Kapitel 2.6.9) visualisiert (Abbildung 3.5B). Die Identifizierung der neun aufgetrennten Proteine mittels massenspektrometrischer Analyse (Kapitel 2.6.11) war leider erfolglos.

3.1.2 *In vitro* N^α-Acetyltransferase-Aktivitätstest von MBP-His:NAA10p

Ob das AtNAA10p über eine N^α-Acetyltransferaseaktivität verfügt, wurde mittels N^α-Acetyltransferase-Aktivitätstest bestimmt, der in Zusammenarbeit mit T. Arnesen (Department of Molecular Biology, University of Bergen, Norway) durchgeführt wurde, wie im Kapitel 2.6.12 beschrieben. Das MBP-His:NAA10p acetyliert *in vitro* Serin (Abbildung 3.6A), was mit der vorhergesagten Substratspezifität des NatA-Komplexes in Hefe und Menschen übereinstimmt (Polevoda et al., 1999; Polevoda and Sherman, 2003a; Arnesen et al., 2009b).

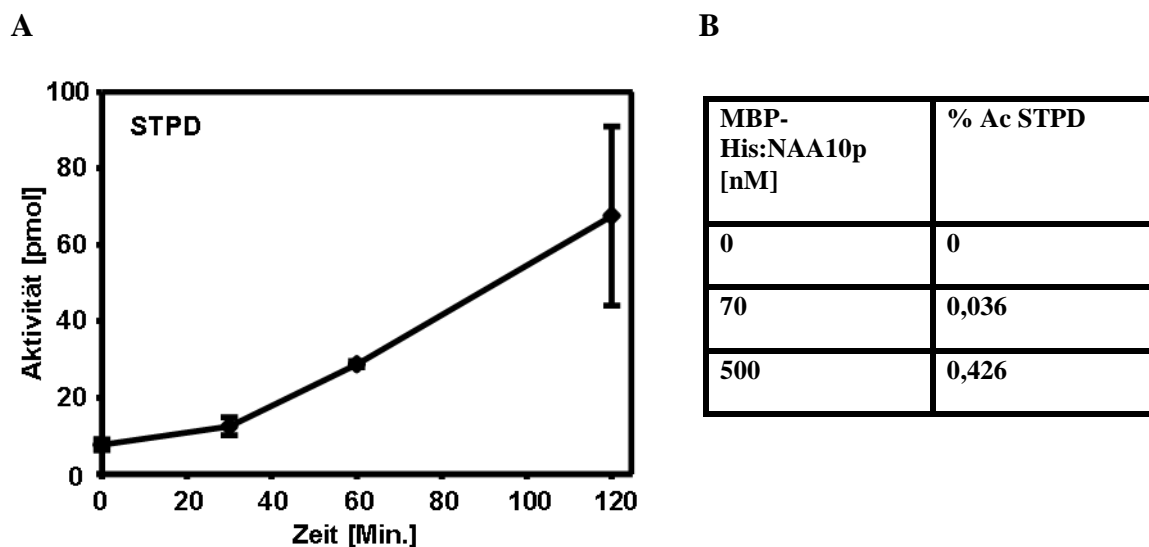


Abbildung 3.6 N^α-Acetyltransferaseaktivität des Arabidopsis MBP-His:NAA10p

(A) Die Aktivität des MBP-His:NAA10p wurde im Scintillationszähler anhand der gebundenen Menge von [acetyl-3H]-AcCoA, jeweils nach 0, 30, 60 und 120 Minuten nachgemessen. Arabidopsis MBP-His:NAA10p acetyliert *in vitro* N-terminales Serin. Die SPTP-RRR und MELL-RRR Peptide wurden als Negativkontrolle verwendet. In B wurde die N^α-Acetyltransferaseaktivität des MBP-His:NAA10p abhängig von dessen Konzentration verifiziert.

Die SPTP-RRR und MELL-RRR Peptide wurden als Negativkontrollen verwendet und zeigten dementsprechend keine N^α-Acetyltransferaseaktivität. Das SPTP-RRR Peptid besitzt an der zweiten Stelle Prolin, das die N-terminale Acetylierung hemmt (Polevoda

and Sherman, 2003a). Das MELL-RRR ist zwar in Menschen acetyliert aber durch den NatB-Komplex (Starheim et al., 2008). Man konnte ebenfalls den Zusammenhang zwischen der Enzymkonzentration und acetylierten Peptiden nachweisen (Abbildung 3.6B).

3.1.3 Subzelluläre Lokalisierung von AtNAA10p in *Nicotiana spec.*

Die orthologen Naa10-Proteine in Hefe und Menschen gehören zu den am besten charakterisierten N-terminalen Acetyltransferasen. Das ScNaa10p ist im Cytosol (Polevoda et. al., 2008) und das HsNaa10p im Cytosol und Zellkern (Arnesen et al., 2005b) lokalisiert. Die Lokalisierungsbestimmung von AtNAA10p wurde in *Nicotiana tabacum* und *Nicotiana benthamiana* durchgeführt. Die *AtNAA10* kodierende cDNA wurde mit den Primern 750 und 751 (Anhang 6.3.3) mittels PCR amplifiziert (Kapitel 3.1.1.3). Das mittels Gateway-Klonierung (Kapitel 2.4.10.1) hergestellte pK7YWG2_AtNAA10-Konstrukt mit einem C-terminalen EYFP-Fusionsprotein (Anhang 6.4A) wurde für die Lokalisierungsstudie verwendet. Das pK7YWG2_AtNAA10-Konstrukt wurde durch Agrobakterieninfiltration in die Epidermiszellen von *Nicotiana tabacum* und *Nicotiana benthamiana* transformiert (Kapitel 2.3.7.2). Die transiente Expression des AtNAA10:EYFP erfolgte unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors. Die heterologe Lokalisierung mit fluoreszenzmarkiertem NAA10p wurde mittels *confocal laser scanning microscopy* (CLSM) durchgeführt (Kapitel 2.7). Das Protein wird im Cytosol und Zellkern sowohl in *N. tabacum* als auch in *N. benthamiana* exprimiert (Abbildung 3.7). Bei der Lokalisierungsbestimmung des NAA10p in *N. benthamiana* traten gelb fluoreszierende Punkte auf, die eine mitochondriale Lokalisierung andeuten (Abbildung 3.7D). Aus diesem Grund ist es notwendig die Lokalisierung des AtNAA10:EYFP-Fusionsproteins in *A. thaliana* zu überprüfen.

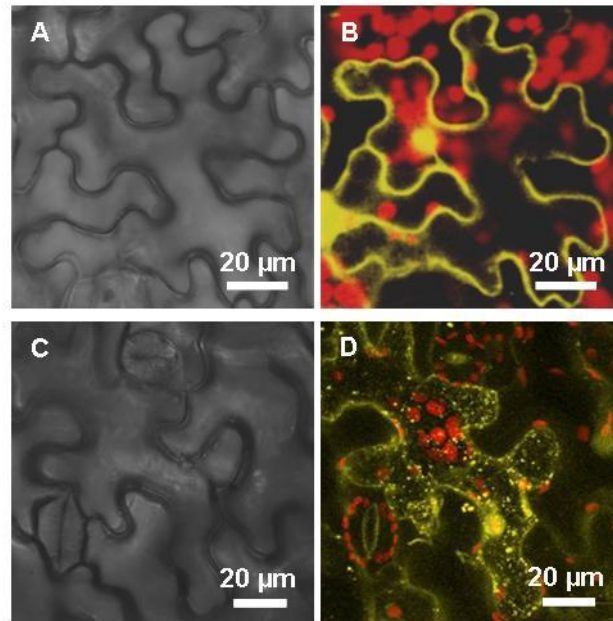


Abbildung 3.7 Lokalisierung des AtNAA10:EYFP-Fusionsproteins in *Nicotiana spec.*

Die Abbildungen zeigen eine *in vivo* Lokalisationsstudie von AtNAA10:EYFP im Blatt von *N. tabacum* (A, B) sowie *N. benthamiana* (C, D). Die transiente Expression von AtNAA10:EYFP wurde mittels CLSM drei Tage nach Agrobakterieninfiltration analysiert. (A, C) Durchlichtbilder, (B, D) die Detektion der EYFP-Fluoreszenz wurde gelb, die Autofluoreszenz von Plastiden rot dargestellt. Das AtNAA10:EYFP wird in beiden *Nicotiana spec.* im Cytosol sowie im Zellkern exprimiert. Die gelb fluoreszierenden unspezifischen Aggregate in D deuten eine mitochondriale Lokalisierung an.

3.1.4 *In vivo* Charakterisierung der *naa10-1* T-DNA-Insertionslinie

Hefe *naa10*-Mutanten sind lebensfähig, zeigen jedoch verschiedene Phänotypen beispielsweise verlangsamtes Wachstum, Temperatursensibilität, Fehler in der Sporulation sowie beim Eintritt in das G₀-Stadium (Whiteway and Szostak, 1985; Whiteway et al., 1987; Mullen et al., 1989; Park and Szostak, 1992; Polevoda et al., 1999). Die Bedeutung der N-terminalen Acetylierung durch den NatA-Komplex, bzw. durch die AtNAA10-Acetyltransferase in Arabidopsis wurde *in vivo* unter Verwendung der T-DNA-Insertionslinie *naa10-1* (Tabelle 2.1) analysiert. Die T-DNA-Insertionslinie entstammt der Wisconsin- (Wisc DsLOX289_292G3) Sammlung und enthält eine T-DNA-Insertion in dem *single copy* Gen *At5g13780*. Die Insertionsstelle der T-DNA-Linie wurde durch Sequenzierung des *naa10-1* PCR-Produkts mittels *left border* Primer verifiziert. Die Insertionsstelle der *naa10-1* Linie wurde im ersten Intron, 680 bp unterhalb des Start-Kodons lokalisiert (Abbildung 3.8).

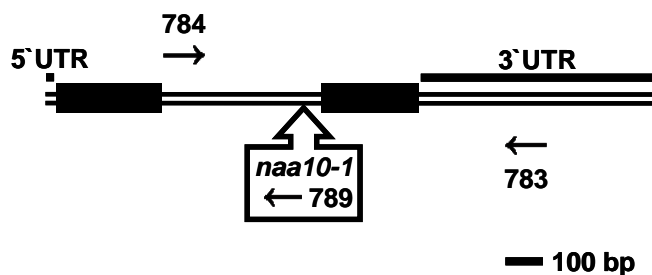


Abbildung 3.8 Struktur des *AtNAA10*-Gens (*At5g13780*) mit einer T-DNA-Insertion

Exons wurden als schwarze Boxen und Primer als schwarze Pfeile markiert. Die Insertionsstelle wurde als Flächenpfeil dargestellt.

3.1.4.1 Molekulare Charakterisierung der *naa10-1* T-DNA-Insertionslinie

Die Pflanzen der *naa10-1* T-DNA-Insertionslinie wurden mittels PCR mit zwei Kombinationen von Primern (Abbildung 3.8; Anhang 6.3.1) genotypisiert. Für den Nachweis der T-DNA-Insertion wurden ein genspezifischer Primer (784) und ein Primer (789), der an die linke Flanke der T-DNA-Insertion bindet, verwendet (Abbildung 3.9A). Zur Bestätigung des Wildtyp-Allels wurden genspezifische Primer (784 und 783) verwendet (Abbildung 3.9B). Die durchgeführte PCR-Analyse von 39 potentiellen *naa10-1*-Mutanten wies 36 heterozygote- und zwei Wildtyp-Pflanzen, jedoch keine homozygoten Pflanzen auf (Abbildung 3.9). Aus diesem Grund wurde die Keimungsrate der heterozygoten *naa10-1*-Pflanzen bestimmt. Die Samen der heterozygoten *naa10-1*-Pflanze wurden sterilisiert (Kapitel 2.3.1.2) und auf AT-Medium ohne Selektionsmarker ausgesät (Kapitel 2.3.1.2). Von den 91 ausgesäten Samen keimten 23 (25,3 %) nicht, was zusammen mit dem Ergebnis der PCR sehr stark eine lethale Auswirkung der T-DNA-Insertion im *NAA10*-Gen andeutet.

Um die Anzahl der Insertionen im *At5g13780*-Gen zu überprüfen wurde das Segregationsmuster der heterozygoten *naa10-1*-Pflanzen analysiert. Es wurden, in vier Versuchen, 173 heterozygote *naa10-1*-Pflanzen mit BASTA selektiert (Kapitel 2.3.2), 66 (38,2 %) der selektierten Pflanzen starben ab. Die Wildtyp-Pflanzen wurden als Negativkontrolle verwendet. Die Keimungsrate von 75 % und das Segregationsmuster mit einem annähernden Verhältnis von 2:1 von resistenten zu nicht-resistenten Pflanzen entspricht einem rezessiven Erbgang nach Mendel.

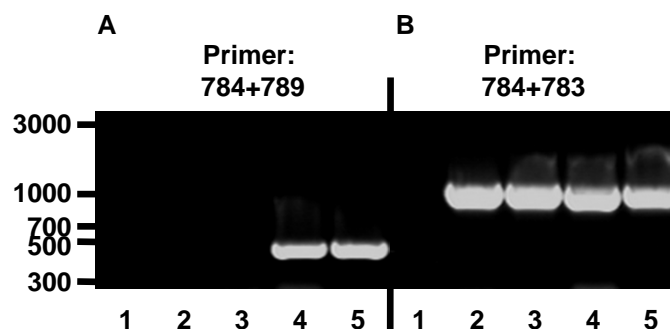


Abbildung 3.9 Genotypisierung der *naa10-1* T-DNA-Insertionslinie

Die Genotypisierung der *naa10-1*-Mutanten wurde mittels PCR mit zwei Kombinationen von Primern durchgeführt. (A) Die T-DNA-Insertion im *AtNAA10*-Gen wurde mit einem genspezifischem Primer (784) und einem *left border* Primer (789) verifiziert. (B) Das Wildtyp-Allel wurde mit genspezifischen Primern (784 und 783) nachgewiesen. (1) Negativkontrolle mit H₂O, (2, 3) genomischer DNA von zwei unabhängigen Wildtyp-Pflanzen, (4, 5) genomischer DNA von zwei unabhängigen *naa10-1*-Pflanzen. Das Wildtyp-Allel konnte mit den genspezifischen Primern amplifiziert werden, was auf heterozygote *naa10-1*-Pflanzen hinweist.

3.1.4.2 Charakterisierung der Embryogenese heterozygoter *naa10-1*-Pflanzen

Um zu überprüfen, ob die Embryogenese der *naa10-1*-Pflanzen durch die T-DNA-Insertion im *AtNAA10*-Gen beeinträchtigt wurde, wurden Embryonen aus Schoten zwölf Wochen alten heterozygoten *naa10-1*-Pflanzen präpariert (Kapitel 2.3.9). Die *naa10-1*-Pflanzen wurden die ersten acht Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen und anschließend unter Langtagbedingungen (Tabelle 2.2) kultiviert. Die weitere Analyse der Embryonen erfolgte mittels *differential interference contrast* (DIC) Mikroskopie (Kapitel 2.3.9). Von 687 analysierten Samenanlagen der heterozygoten *naa10-1*-Pflanzen, die von drei unabhängigen Experimenten stammten, verblieben 131 Embryonen (19,1 %) in dem globulären Stadium der Embryogenese. Bei den anderen 556 (80,9 %) Embryonen fand eine normale Entwicklung statt (Abbildung 3.10). Die mikroskopische Analyse der Embryogenese von heterozygoten *naa10-1*-Pflanzen zusammen mit der molekularen Charakterisierung der *naa10-1*-Pflanzen (Kapitel 3.1.4.1) beweist, dass der *knock out* von *AtNAA10* embryolethal ist.

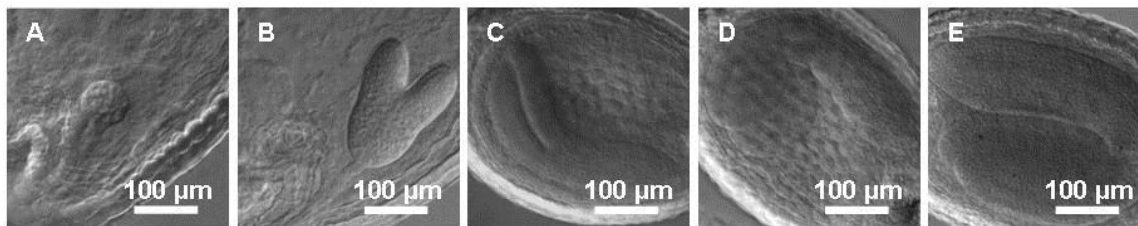


Abbildung 3.10 Embryogenese heterozygoter *naa10-1*-Pflanzen

Die Bilder zeigen verschiedene Stadien der Embryogenese von zwölf Wochen alten heterozygoten *naa10-1*-Pflanzen. Die Analyse der Embryonen erfolgte mittels DIC Mikroskopie. 19,1 % Embryonen arretierten in dem globulären Stadium der Embryogenese (A), während 80,9 % Embryonen sich normal entwickelten (B-E); (B) das Herzstadium, (C) das Torpedo Stadium, (D) frühes *upturned-u* Stadium, (E) spätes *upturned-u* Stadium.

3.1.5 Komplementierung heterozygoter *naa10-1*-Pflanzen durch Überexpression von endogenem NAA10p

Die Charakterisierung der Embryogenese der heterozygoten *naa10-1*-Pflanzen weist darauf hin, dass der *knock out* von *AtNAA10* embryolethal ist (Kapitel 3.1.4.2). Aus diesem Grund konnten mittels PCR keine homozygoten *naa10-1*-Pflanzen gefunden werden (Kapitel 3.1.4.1). Aufgrund dessen wurden die BASTA resistenten heterozygoten *naa10-1*-Pflanzen (Kapitel 3.1.4) mit dem Kanamycin resistenten pK2GW7_*AtNAA10*-Konstrukt (Anhang 6.4A), das die Expression von *AtNAA10p* unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors vermittelt, stabil transformiert (Kapitel 2.3.7.1). Dazu wurde die *AtNAA10* kodierende cDNA mit den Primern 750 und 1002 (Anhang 6.3.3) amplifiziert (Kapitel 3.1.1.2) und schließlich mittels Gateway-Klonierung (Kapitel 2.4.10.1) in den Expressionsvektor pK2GW7 kloniert. In der T1-Generation wurden zwei homozygote *naa10-1/pK2GW7_AtNAA10*-Pflanzen mittels Selektionsanalyse auf AT-Medium mit Kanamycin (Kapitel 2.3.2) und anschließender PCR (Kapitel 3.1.4.1) identifiziert. In der T2-Generation wurden Pflanzen der zwei unabhängigen *naa10-1/pK2GW7_AtNAA10*-Linien charakterisiert. Die Transformanten beider Linien wuchsen vergleichbar zu Wildtyp-Pflanzen (Col-0), welche als Kontrolle verwendet wurden. Alle analysierten Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen angezogen (Tabelle 2.2). Der Phänotyp von *naa10-1*-Mutanten wurde grundsätzlich komplementiert (Abbildung 3.11A, Bilder von Linie 4 nicht gezeigt). Die wenigen Ausnahmen der Linie 21 zeigten teilweise chlorotischen

Phänotyp der Blattadern im Vergleich zu Col-0-Pflanzen (Anhang 6.6). Von den komplementierten Pflanzen beider Linien wurde zusätzlich Frisch- und Trockengewicht im Vergleich zu Col-0-Pflanzen bestimmt. Die Entwicklung und die Wachstumsrate aller komplementierten Pflanzen waren vergleichbar mit der der Col-0-Pflanzen

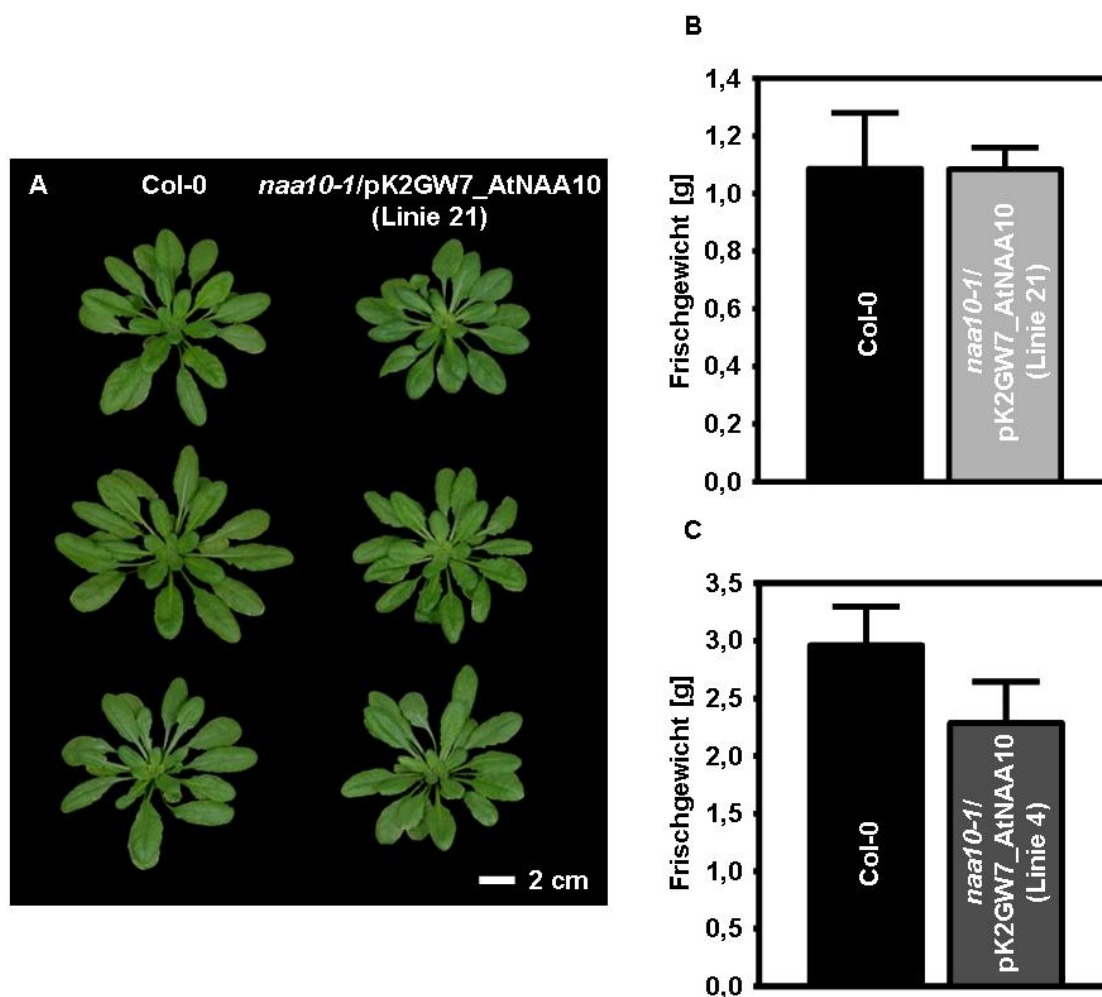


Abbildung 3.11 Komplementierung des *naa10-1*-Phänotyps mit AtNAA10p

Die Bilder zeigen acht Wochen alte, unter Kurztagbedingungen angezogene, repräsentative Wildtyp-Pflanzen (Col-0) und *naa10-1/pK2GW7_AtNAA10*-Pflanzen der Linie 21 (A) und deren Frischgewicht (n=8) (B). Bilder von den neun Wochen alten Col-0-Pflanzen im Vergleich zu *naa10-1/pK2GW7_AtNAA10*-Pflanzen der Linie 4 wurden nicht gezeigt. Die Pflanzen beider transformierten Linien entwickelten sich jedoch vergleichbar zu Col-0-Pflanzen. In C wurde das Frischgewicht von neun Wochen alten Col-0-Pflanzen (n=6) und *naa10-1/pK2GW7_AtNAA10*-Pflanzen der Linie 4 (n=3) dargestellt.

3.1.6 Komplementierung heterozygoter *naa10-1*-Pflanzen durch Überexpression des *S. cerevisiae* Naa10-Orthologs

Heterozygote *naa10-1*-Pflanzen wurden mit einem Konstrukt stabil transformiert (Kapitel 2.3.7.1), welches die konstitutive Expression des Naa10p aus dem unizellulären niederen Eukaryoten *S. cerevisiae* erlaubt. In den folgenden Generationen sollte überprüft werden, ob homozygote *naa10-1*-Pflanzen durch die Expression des ScNaa10p die Embryogenese abschließen können. Dazu wurde der kodierende Bereich des *Naa10*-Gens (*Yhr013cp*) von *S. cerevisiae* genomischer DNA mit den Primern 752 und 1111 (Anhang 6.3.3) vervielfältigt und letztendlich mittels Gateway-Klonierung (Kapitel 2.4.10.1) in den Expressionsvektor pK2GW7 kloniert (Expressionskonstrukt: Anhang 6.4A). In der T1-Generation konnten, nach einer Selektionsanalyse auf AT-Medium mit Kanamycin (Kapitel 2.3.2) und anschließender PCR-Analyse, sechs heterozygote *naa10-1/pK2GW7_ScNaa10*-Pflanzen gefunden werden. Alle analysierten Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen angezogen (Tabelle 2.2). Um das *ScNAA10*-Transkript in den transformierten heterozygoten *naa10-1*-Pflanzen nachzuweisen wurde eine semiquantitative Transkriptionsanalyse durchgeführt (Kapitel 2.4.1). Von drei acht Wochen alten heterozygoten *naa10-1/pK2GW7_ScNaa10*-Pflanzen wurde die RNA extrahiert (Kapitel 2.3.4) und die cDNA synthetisiert (Kapitel 2.4.9). Anschließend wurde *ScNAA10* mit den genspezifischen Primern 1522 und 1523 (Anhang 6.3.2) amplifiziert. Bei allen analysierten *naa10-1/pK2GW7_ScNaa10*-Pflanzen wurde das *ScNAA10*-Transkript nachgewiesen. Als Negativkontrolle wurden Wildtyp-Pflanzen (Col-0) verwendet (Abbildung 3.12A). Das konstitutiv exprimierte Transkript des Aktins wurde mit Aktinspezifischen Primern 364 und 436 (Anhang 6.3.2) amplifiziert und zur Quantifizierung der *ScNAA10*-Transkriptmenge genutzt (Abbildung 3.12B).

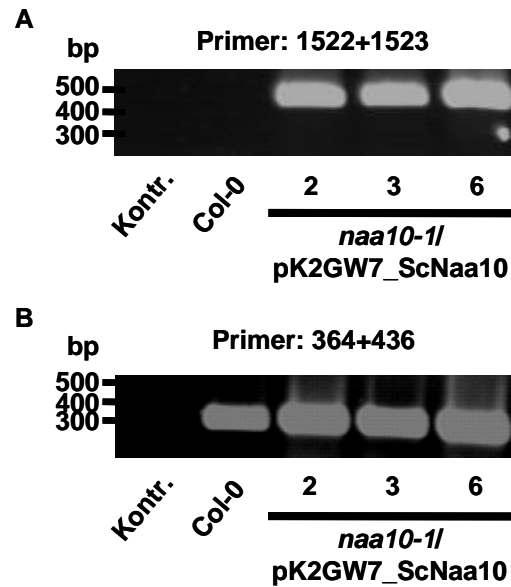


Abbildung 3.12 Semiquantitative RT-PCR-Analyse von ScNaa10p exprimierenden heterozygoten *naa10-1*-Pflanzen

Die Transkription des *ScNaa10* (*Yhr013cp*) (A) und Aktingens (*At5g09810*) (B) wurde in Blättern von drei unabhängigen *naa10-1/pK2GW7_ScNaa10*-Pflanzen, 2, 3 und 6, durch semiquantitative RT-PCR untersucht. Die Wildtyp-Pflanzen (Col-0) wurden als Negativkontrolle verwendet. Alle analysierten Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen angezogen. Das *ScNAA10*-Transkript wurde mit den Primern 1522 und 1523 (A) und das konstitutiv exprimierte Transkript des Aktingens mit den Primern 364 und 436 (B) amplifiziert. Das *ScNAA10*-Transkript konnte in den transformierten heterozygoten *naa10-1*-Pflanzen nachgewiesen werden.

In der T2-Generation wurden insgesamt 118 Nachkommen der drei *naa10-1/pK2GW7_ScNaa10*-Pflanzen mittels PCR analysiert. Es konnten keine homozygoten *naa10-1/pK2GW7_ScNaa10*-Pflanzen identifiziert werden. Aus diesem Grund wurde die Embryogenese der *naa10-1/pK2GW7_ScNaa10*-Pflanzen mittels *differential interference contrast* (DIC) Mikroskopie (Kapitel 2.3.9) untersucht. Es wurden Embryonen aus Schoten zwölf Wochen alten heterozygoten *naa10-1/pK2GW7_ScNaa10*-Pflanzen präpariert (Kapitel 2.3.9). Als Kontrolle wurden Embryonen der heterozygoten *naa10-1*-Pflanzen genutzt (Kapitel 3.1.4.2). Die Pflanzen wurden die ersten acht Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen und anschließend unter Langtagbedingungen kultiviert (Tabelle 2.2). Von 311 analysierten Samenanlagen der heterozygoten *naa10-1*-Pflanzen arretierten 67 Embryonen (21,5 %) im globulären Stadium der Embryogenese, während 244 Embryonen (78,5 %) sich normal entwickelten (Abbildung 3.13A). Die Embryogenese der *naa10-1/pK2GW7_ScNaa10*-Pflanzen von drei unabhängigen Linien verlief vergleichbar wie bei der heterozygoten

naa10-1-Kontrolle. Es wurden jeweils 144, 299 und 277 Samenanlagen analysiert. 30 (21,4 %) Embryonen der zweiten (Abbildung 3.13B), 68 (22,7 %) der dritten (Abbildung 3.13C) und 56 (20,2 %) Embryonen der sechsten (Abbildung 3.13D) transformierten Linie verblieben im globulären Stadium der Embryogenese. Bei den anderen 114 (78,6 %), 231 (77,3 %) und 221 (79,8 %) untersuchten Embryonen fand eine normale Embryogenese statt (Abbildung 3.13B, C, D). Der Phänotyp der homozygoten *naa10-1*-Pflanzen konnte durch die Expression von ScNaa10p nicht komplementiert werden, was auf mögliche funktionelle Unterschiede der Naa10-Acetyltransferasen in niederen und höheren Eukaryoten hinweist.

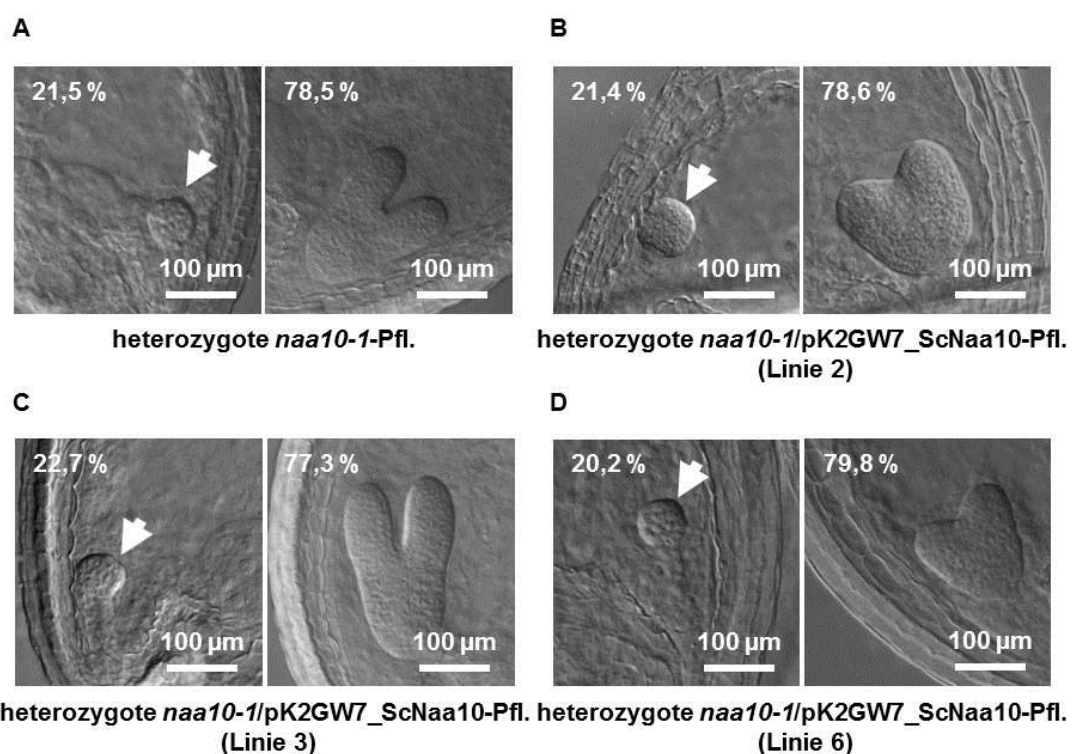


Abbildung 3.13 Komplementierung heterozygoter *naa10-1*-Pflanzen mit dem orthologen Naa10p aus Hefe

Die Bilder zeigen verschiedene Stadien der Embryogenese von zwölf Wochen alten heterozygoten *naa10-1*- (A) und *naa10-1/pK2GW7_ScNaa10*-Pflanzen dreier unabhängigen Linien (B-D). Die Analyse der Embryonen erfolgte mittels DIC Mikroskopie. Die Embryogenese der transformierten heterozygoten *naa10-1*-Pflanzen verlief vergleichbar mit den heterozygoten *naa10-1*-Pflanzen, die als Kontrolle verwendet wurden. Über 20 % der analysierten Embryonen arretierten im globulären Stadium der Embryogenese, welches mit dem weißen Pfeil markiert wurde. Die anderen Embryonen entwickelten sich normal, was als Herzstadium gezeigt wurde.

3.2 Identifizierung der Anker-Untereinheit des NatA-Komplexes

Als Referenz für eine Orthologiesuche nach der Anker-Untereinheit des NatA-Komplexes im Arabidopsis Proteom wurde die Sequenz des *Saccharomyces cerevisiae* Proteins Naa15 (Ydl040cp) (Proteinsequenz: Anhang 6.1) benutzt. Mit dem BLAST Algorithmus (TAIR BLASTP2.2.8, www.arabidopsis.org) konnten zwei Proteine, At1g80410.1 und At1g80410.2, identifiziert werden, die eine deutlich höhere Homologie als andere Proteine aufwiesen (Anhang 6.2). Orthologe zu dem AtNAA15p konnten genauso wie bei der katalytischen Untereinheit des NatA-Komplexes (Kapitel 3.1) in Eukaryoten unterschiedlicher Entwicklungsstufen identifiziert werden. AtNAA15-Orthologe wurden in *Oryza sativa* (66 % Identität zu Arabidopsis), *Glycine max* (72 %), *Chlamydomonas reinhardtii* (63 %), *Physcomitrella patens* (55 %), *Homo sapiens* (41 %), *Drosophila melanogaster* (39 %), *Ceanorhabditis elegans* (35 %), *Schizosaccharomyces pombe* (33 %) sowie *Saccharomyces cerevisiae* (30 %) bestimmt (Abbildung 3.14).

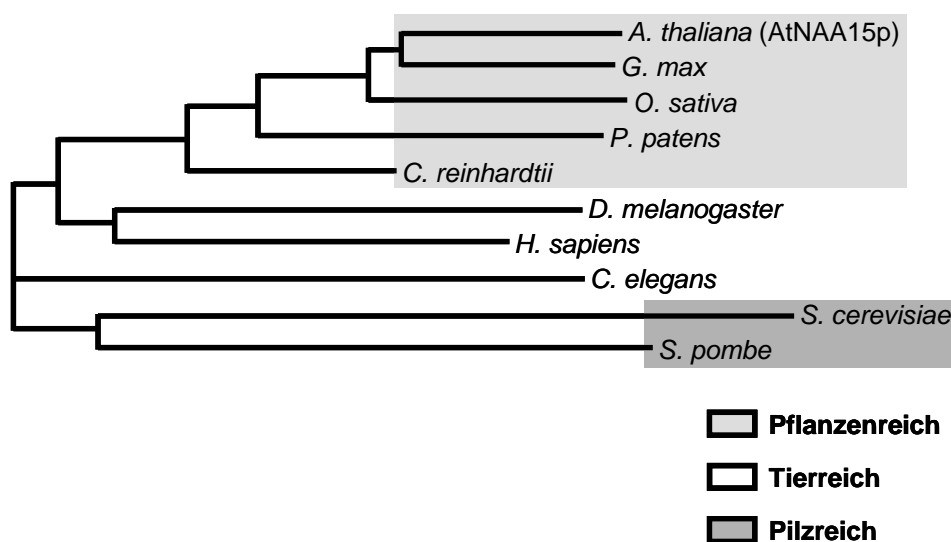


Abbildung 3.14 Die evolutionäre Verwandtschaft des AtNAA15p zu niederen und höheren Eukaryoten

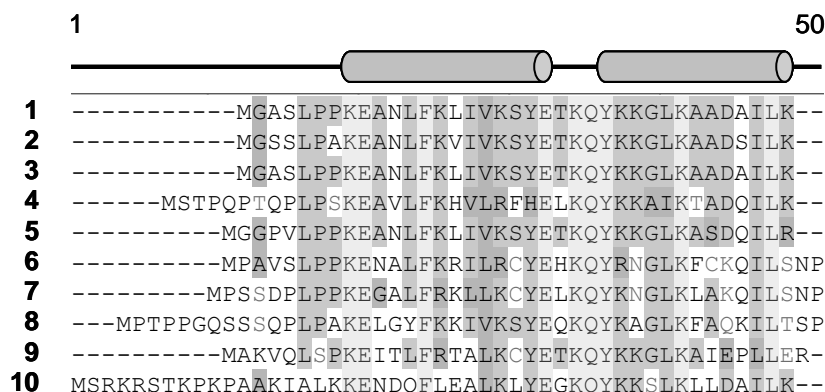
Die Abbildung zeigt die evolutionären Beziehungen der orthologen NAA15p aus dem Pflanzen-, Tier- und Pilzreich. Die Proteine wurden mit dem BLAST Algorithmus (TAIR BLASTP2.2.8, www.arabidopsis.org) verglichen. Die pflanzlichen Orthologe, *G. max* (07g03850), *O. sativa* (Os01g0617500; NP_001043582.1), *P. patens* (XP_001764313.1) und *C. reinhardtii* (XP_001698064.1), zeigen deutlich höhere Identität mit dem AtNAA15-Protein als die Orthologe des Tier- (*D. melanogaster* (NP_573384.1), *H. sapiens* (NP_476516.1) und *C. elegans* (NP_497180.3)) und des Pilzreiches (*S. cerevisiae* (Ydl040cp) und (*S. pombe* (NP_588160.1))). Die pflanzlichen Orthologe sowie die Orthologe aus dem Tier- und Pilzreich bilden jeweils einen Ast des Stammbaumes.

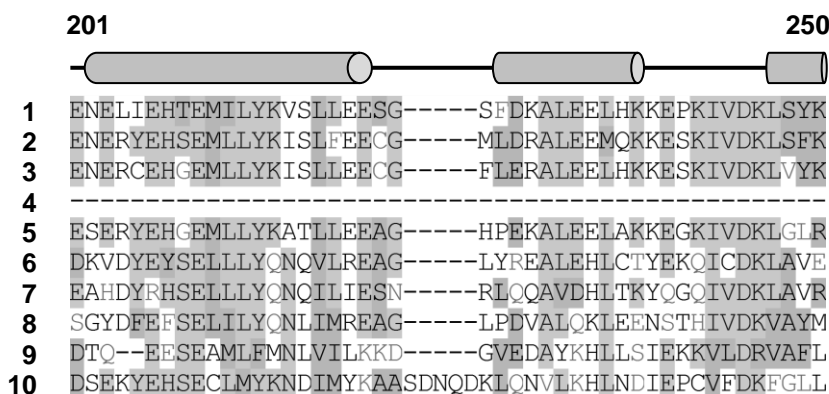
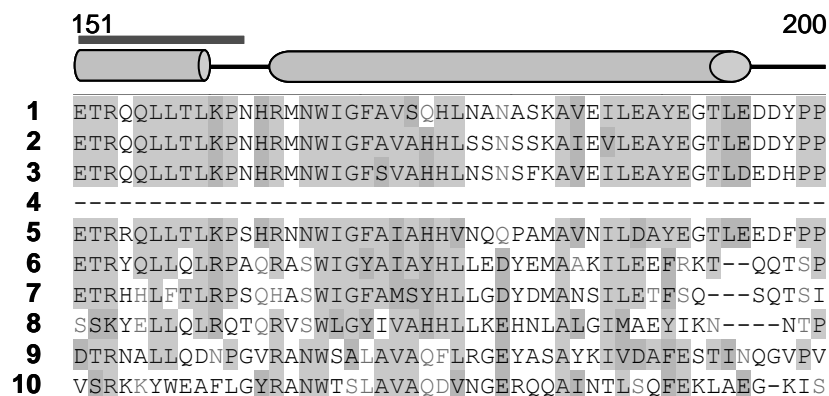
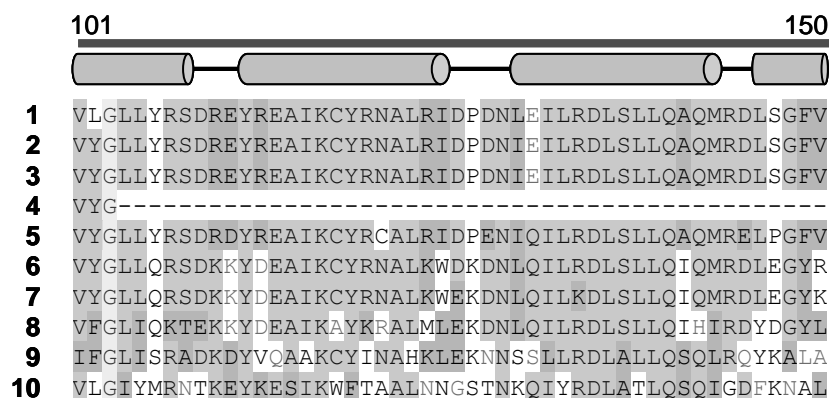
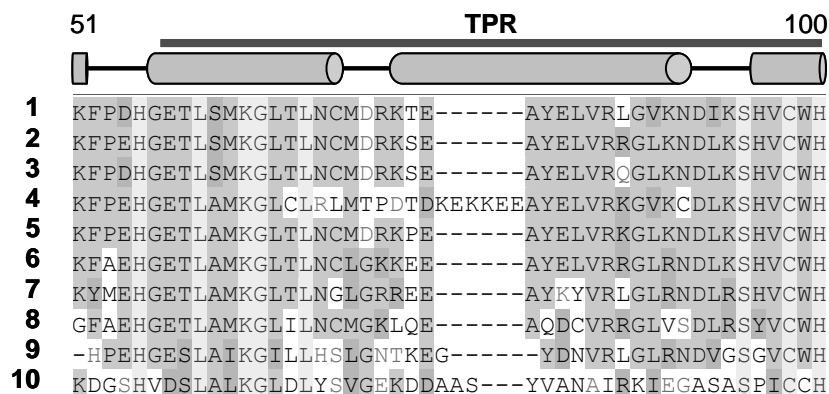
3.2.1 Biochemische Charakterisierung von AtNAA15p

Die biochemische Charakterisierung der Anker-Untereinheit des NatA-Komplexes wurde durch Analyse der konservierten Domänen und Überexpression des rekombinanten AtNAA15p in *E.coli* durchgeführt.

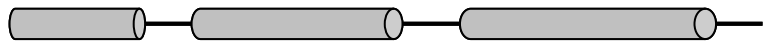
3.2.1.1 Charakterisierung der Proteinstruktur von AtNAA15p

Das Arabidopsis NAA15p hat eine Länge von 897 Aminosäuren und zeigt ähnlich wie die katalytische Untereinheit des NatA-Komplexes, AtNAA10p (Kapitel 3.1), eine hohe Sequenzidentität mit den orthologen Proteinen niederer und höherer Eukaryoten (Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15). AtNAA15p enthält ähnlich wie die orthologen Proteine in Hefe (Gendron et al., 2000; Choi et al., 2001; Fluge et al., 2002) und Menschen (Arnesen et al., 2005b) TPR-Motive, welche unter anderem die Protein-Protein-Interaktion ermöglichen (Abbildung 3.15). Durch den Aminosäuresequenzvergleich innerhalb der putativen als auch bereits bekannten NAA15-Acetyltransferasen verschiedener Eukaryoten konnte man eine deutliche Konservierung des N-Terminus im Gegensatz zu dem schwach konservierten C-Terminus erkennen. ScNaa15p (Abbildung 3.15; 10) zeigt genauso wie das ScNaa10p (Abbildung 3.2; 10) einen Einschub in der Sequenz, im Bereich von 548-576 Aminosäuren, im Vergleich zu den anderen analysierten Eukaryoten. Interessanterweise zeigt der zweite Pilz, *S. pombe* (Abbildung 3.15; 9) eine verkürzte Aminosäuresequenz im Vergleich zu den anderen Eukaryoten mit Ausnahme der Grünalge *C. reinhardtii* (Abbildung 3.15; 4), deren Proteinlänge 95 Aminosäuren beträgt. Die Sekundärstruktur des AtNAA15p wurde mit dem Programm PSIPRED (www.bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred) vorausgesagt. Das AtNAA15p scheint ausschließlich aus 44 α -Helices zu bestehen.






251 300



```

1 EQEVSLLSKVGRLEEANKLYRVLLSMNPDNYRYHEGLQKCLGLYSESGQY
2 EQMACILLKLGRFEEAEKTYRSLLFMNPDNYKYFIAVQKCLGLYSENGQY
3 EQEVSLLVKLGHLDGEALYRALLSMNPDNYRYEGLQKCVGLYLEDGQY
4 -----
5 EHRASLYLQTNRLSEAEETIRKLLVVPDNYHYEGLQKCLGLISDGKAY
6 ETKGELLQLCRLEDAADVYRGLQERNPENWAYYKGLEKALKPAN-----
7 ETMGDLYIKLQQQEKAVPIFESLIRRNPENVLYEQQYIAARQVTD-----
8 ETRANLLMDLEQPKQAEVWRALIERNPDNSLEYDDMLEKCMGIKDS-----
9 ETRAHEYELYLSKMEEAKSTIYLLDRNPDNHQYYNLRQAYGYEDASG--
10 ERKATIYMKLGQLKDAIVYRTLIKRNPDNFKYYKLLLEVSLGIQG-----
    
```


301 350



```

1 SSDQIEKLNALYQSLSEQYTRSSAVKRIPLDFLQD-ENFKAEAVAKYIKPL
2 STDDVDRLCELYSSLKEEYGWSSAVKRIPLDFLEG-EKFQEAADNYVRPL
3 SPDQIDRLDSLYKTLVQQYKWSSAVKRIPLDFLQD-GQFREAADSYIRPL
4 -----
5 TSEQVEKLVKLYDDLREKYPRSAAKRIPLDFLEE-DAFKAAVSLYVRPF
6 ----MLERLKIYEEAWTKYPRGLVPRRLPLNFLSG-EKFKECLDKFLRMN
7 ----SSAVVSIYRVFQEQYPRALCPRRLPLNIANG-DEFRRVTDEYLRRG
8 ----PKAQLAMLDGLAEKFKRAAAPRLALYLVEG-EELRRRLHEWMIPI
9 KVLDSAEWLNLYSQLAKRYPKSECPTRLPLEKLEG-DEFLTHVDLYLRKK
10 ---DNKCLKKALYGLKLEQFYPRCEPPKFIPLTFLQDKEELSKKILREYVLPQ
    
```

351 400



```

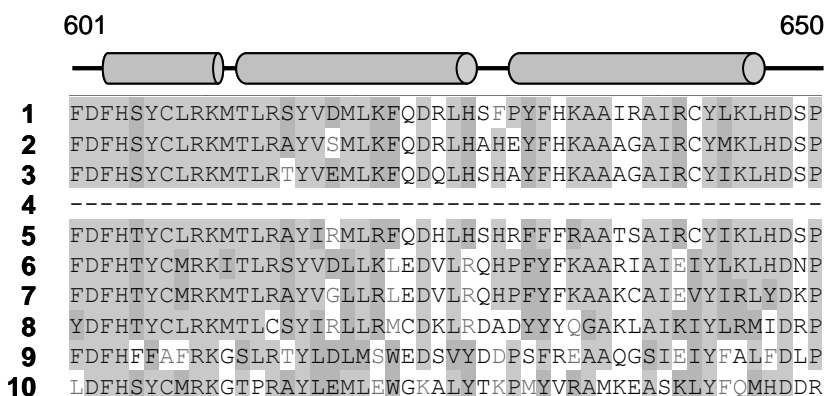
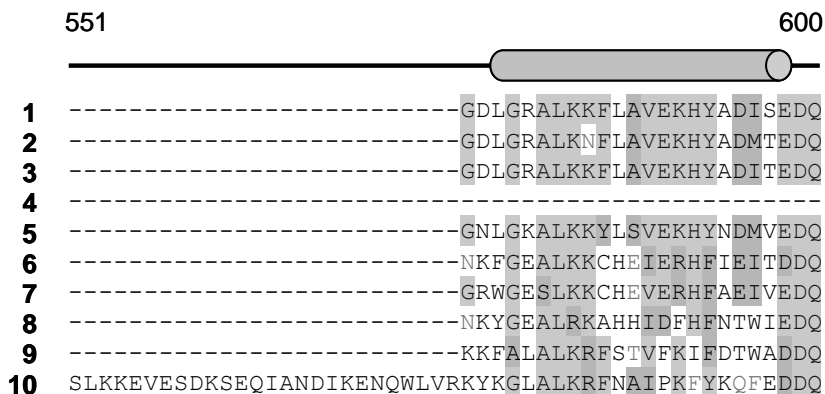
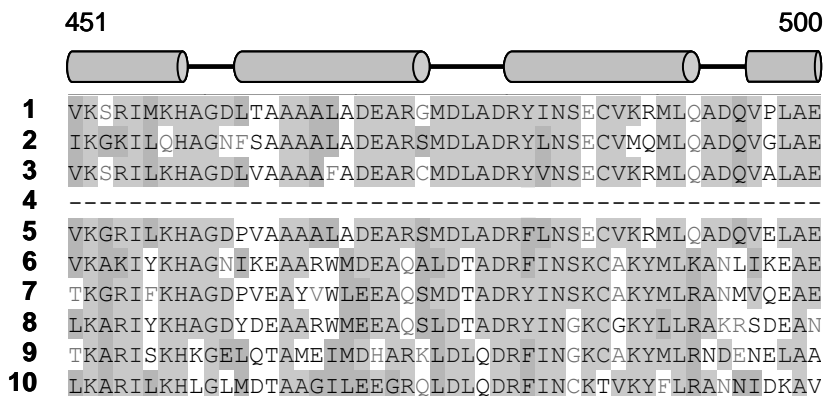
1 LTKGVPSLFSDDLSSLYDHPK--PDILEQLVEMKHSIGTTGSEFPGSQV
2 LTKGVPSLFSDLSPLYEQPGK--ANILEELFLKLEERSIRTSQCFPGSSHT
3 LTKGVPSLFSDDLSSLYNHFGK--ADILEQLILELEHSIRMSGHYPGRTDK
4 -----
5 LKKGVPSLFTDLRPLYSNPRK--VEIMEEVFLEVSQSIQSTKTFSGSSDI
6 FSKGCPPVFNTLRSLYKDEK--VAIIIEELVVGYESLKSCLFNPNDDG
7 LRKGIPPLFVNVRTLHQIPER--AAVIEELALQYFENLTRSGHFSREDAD
8 LRKGAPSLFASLVPLYKYPQK--QAVIESLITEYVKKMDDEGYGNVSLDG
9 LKRGIPSVFVDVKSLYKDTKK--CKVVEDLVSKYASSLSTTNKFSEDDDN
10 LERGVPATFNSNVKPLYQRRKSKVSPLEKIVLDYLSGLDPT-----
    
```

401 450




```

1 E-----PPSTLLWTLFFLAQHYYDRRGQYDVALCKIDEAIAHTPTVIDLYS
2 E-----PPSTLLWTLFLISQHYDRRGQYDIALDKIDEAISHPTPTVIDLYS
3 E-----PPSTLMWTLFLLAQHYDRRGQYEIALSKIDEAIEHTPTVIDLYS
4 -----
5 E-----APSTYLWTLYLLAQHFDKRRQYKHAHSYINLAIEHTPTVIDLYL
6 K---EPPPTLLWVQYLAQHYDKIGQPSIALEYINTAIESTPTLIELFL
7 AGIPVEPASALVWTAFLAQHYDYMRTDRALEYINVAIDHTPTLIELLI
8 KDQECEPPTALWLYVLASHHFDRCGMTQLALNYIERAIQHTPTVVENYM
9 S---QIEIPTLLWTYFLAQHFDHVGELEKAEKYVDLAIDHTPTLVELFM
10 -----QDPIPF IWTNYYSQHF LFLKDFPKAQEYIDAALDHTPTLVEFYI
    
```




651 700



```

1 ---KSTAGEDEMSK LAPAQKKIK-KQKAEARAKKEAESKS---EESTA
2 S-KSSTEENDEMSK LPPAQRKKLRQKQKAEARAKREAEKQE--DETTS
3 P-KSTAEEEDNMSK LPSQKMKRQKQKAEARAKKEAEKN---EESSA
4 -----
5 PKAAAEQHEAAVAGLPATERKKMRQKLRKAEAKAKKEAEKAKEEEIAAAA
6 LTDENKEHEADTANMSDKELKKLRNKQRRRAQKKAQIEEEKKNAEKEKQQR
7 LKSETTIEEIDIENLPPSELKKLRSKQRKAKKKAELSAQAAQAQVKREQ
8 -DDMNEHSALIKEGMDTQEIKKMKKKLKKQKELQEEEEKKKK---DKEQK
9 -FAKYSPKLPDFEKLSSGEINEEE--EKKIYKKLKKDLSKRLERAEKLKE
10 LKRKSDSLDENSD EIQNNGQNSSS---Q--KKKAKKEAAMNKRKETEAK
    
```


701 750



```

1 SGASKSGKR----NVKPVDPDPHGQKLIQVEEPMAEASKYLRLQKHSPN
2 SHTSKSGK---QNARVLDLDPHGKLVQIENPLAEGTKYLKLLQNNSSD
3 SGVSKSGKR----HVKPVDPDPNGEKLLQVEDPLSEATKYLKLQKNSPD
4 -----
5 AAASKGGKGTQ-TSRPVDTPDGDKLMNVEDPLSEALKYLRLQEHSD
6 NQKKK---DDDDEEIGGPKEELIPEKLAKVETPLEEAIKFLTPLKNLVKN
7 HQSKQQANQETDPDAPQLDELVAEKLERTDDPLDKAIEFLKPLQQLAKE
8 EEGLQRG-----P---QIDAEALLKTEDPLGEAAKFNHITFTGTQ
9 ADKSRAKSEDG--MPVKYDEDELGENLVATSEPLKEAQKCLEKLLPYGDK
10 SVAAYPS-----DQDNDVFGKLIETSTPMEDFATEFYNNYSMQVR
    
```

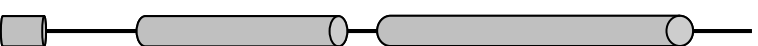
751 800



```

1 SLE-THLLSFEVNM RKQKFLLA FQAVKQLLKLGAENP--DSHRSLVKFFL
2 SLE-THTLSFELNMRKQKILLAFQAVKQLIKLDENSP--DSHRCLIRFFH
3 SLE-THLLSFELYTRKQKILLALQAVKQLRLDAEHP--DSHRCLIKFFH
4 -----
5 ALE-THLLAFEVYFR TNKKLLALQAVKKQLALDPNSP--DVHLCILRIFE
6 KIE-THLFAFEIYFRKEKFLMLQSVKRAFAIDSSHP--WLHECMIRLFN
7 RIE-THLLAFELYRKNKLLMLQCIRRARAVDASHP--VIHSCIIRFVK
8 KVT-GYALCAEVYRRKGKVL LALKCLNEGEDREPTHP--LLHVQKVKFLA
9 NPS-AYILAAQLYTRLNKFDT ASKYLEQAKVILGQND--PTVISTEKFYN
10 EDERDYILD FEFNYRIGKLALCFASLNKFAKRFGTTSGLFGSMATVLLHA
    
```

801 850



```

1 MTESISAPTTEAEKLRWRVLEAERPSISQLQNKSLMEANKEFLGRHEDS
2 KINNLPSPGTDSEKLIWNVLEAERPDLRQLHGKSLVEVNRSFLEKHSAS
3 KVGSMNAPVTDSEKLIWSVLEAERPTISQLHEKSLFEANNSFLEKHKDS
4 -----
5 SLDKLPSPDTHAEKTIHDVIALER GSKLKEGKSLLDANRDFLDAHSDS
6 TAVCESKD--LSDTVRTVLKQEMNRLFGATNPK----NFNETFLKRNSDS
7 SLTSAAKEQPFNEHVQQVLEKATKELIGSKTPQ----QLNDEFIAKHNAS
8 YWPKCELSGLVKETADEL MKCVYG-----AERD-AAELNEKFKIEHQHD
9 SIKTQSN-----
10 TRNDTPFDPIKVKVTKSLEKEYSENFPLNEISNNSFDWLNFYQEKFGKN
    
```

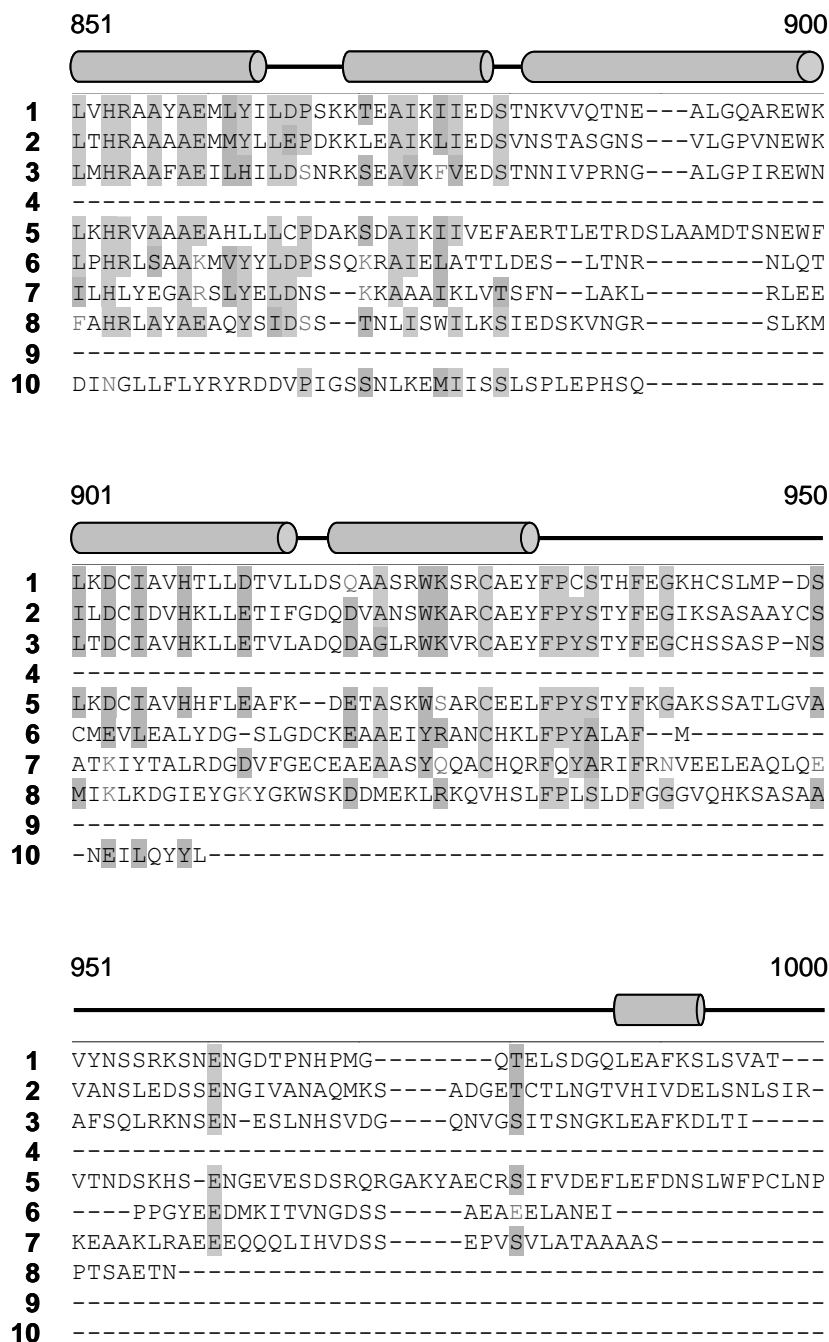


Abbildung 3.15 Proteinsequenzvergleich zwischen orthologen NAA15-Proteinen

Die Abbildung zeigt den Proteinsequenzvergleich zwischen *A. thaliana* (At1g80410.1), *O. sativa* (Os01g0617500; NP_001043582.1), *G. max* (07g03850), *C. reinhardtii* (XP_001698064.1), *P. patens* (XP_001764313.1), *H. sapiens* (NP_476516.1), *D. melanogaster* (NP_573384.1), *C. elegans* (NP_497180.3), *S. pombe* (NP_588160.1) und *S. cerevisiae* (Ydl040cp). Der Aminosäuresequenzvergleich wurde mit dem Programm Vector NTI 9 (AlignX) durchgeführt und die konservierten Aminosäuren wurden als graue Felder markiert. Die Voraussage der Sekundärstruktur des AtNAA15p erfolgte mittels PSIPRED und wurde oberhalb der Proteinsequenz dargestellt. Die Sekundärstruktur besteht aus 44 α -Helices. Die TPR-Motive (NCBI) des AtNAA15p wurden oberhalb der Sekundärstruktur markiert.

3.2.1.2 Überexpression und Aufreinigung des rekombinanten AtNAA15p

Die *AtNAA15* kodierende cDNA (Proteinsequenz: Anhang 6.1) wurde vom Klon U11066 (www.arabidopsis.org) mit den Primern 764 und 921 (Anhang 6.3.3) amplifiziert und letztendlich mittels Gateway-Klonierung in den Expressionsvektor pETG10a mit einem N-terminalen 6×His-Fusion-Tag (Expressionskonstrukt: Anhang 6.4B) kloniert. Das Protein wurde in *E.coli* HMS 174 exprimiert und mittels IMAC aus Proteinextrakten aufgereinigt. Es wurden zwei Aufreinigungen unter Standardbedingungen durchgeführt: eine aus 500 und die zweite aus 600 ml Kulturvolumen plus 0,5 g/L α -D-Glukose. Die Auftrennung mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.6.7) und die anschließende Visualisierung mit Coomassie-Färbung (Kapitel 2.6.9) zeigten im Rohextrakt, Waschfraktionen sowie Elutionsfraktionen kein Protein mit dem vorausgesagten Molekulargewicht von 104,2 kDa inklusive His-Fusion-Tag (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden jeweils aus 900 ml HMS 174/pETG10a_AtNAA15 sowie HMS 174/pETG10a_AtNAA10 zwei Koaufräinigungen mit beiden Untereinheiten des NatA-Komplexes durchgeführt. Nach einer 18-stündigen Inkubation bei 18 °C und 180 rpm sowie unter Standardbedingungen konnte das NAA15p nicht aufgereinigt werden (Kapitel 3.1.1.2: Abbildung 3.3A). Die Induktionskontrolle der Gesamtproteinen zeigte dagegen eine Expressionsbande bei ca. 105 kDa, was dem His:NAA15p entspricht und darauf hindeutet, dass das Protein sich in den unlöslichen Fraktionen befindet (Abbildung 3.16).

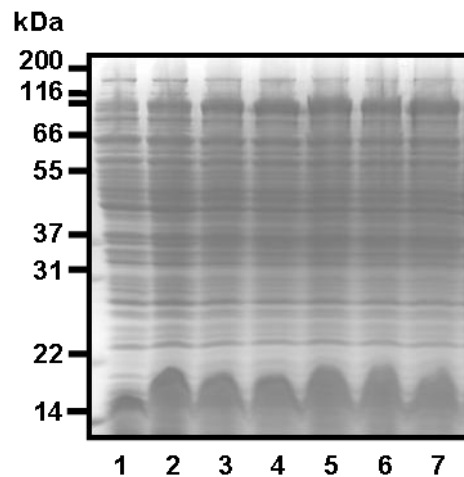


Abbildung 3.16 Induktionskontrolle des His:NAA15-Fusionsproteins

Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE (12,5 %) aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung visualisiert. Die Induktionskontrolle wurde bei 37 °C bei 220 rpm durchgeführt. Die erste Spur zeigt die exprimierten Proteine vor der Induktion mit IPTG. Die zweite Spur zeigt die exprimierten Proteine 30 Minuten, die dritte eine, die vierte zwei, die fünfte drei, die sechste vier und die siebte Spur fünf Stunden nach der Induktion. Schon nach 30 Minuten konnte man die Expressionsbande des His:NAA15-Proteins mit dem vorausgesagten Molekulargewicht von 104,2 kDa erkennen.

3.2.2 Subzelluläre Lokalisierung von AtNAA15p in *Nicotiana spec.*

Die Anker-Untereinheit des NatA-Komplexes in Hefe und Menschen gehört genauso wie die katalytische Untereinheit des Komplexes zu dem umfangreich charakterisierten Arabidopsis Ortholog. Das ScNaa15p (Polevoda et. al., 2008) ist ebenso wie das HsNaa15p (Arnesen et al., 2005b) im Cytosol lokalisiert. HsNaa15p wird auch schwach im Zellkern exprimiert (Arnesen et al., 2005b). Die Lokalisierungsbestimmung des Fluoreszenzmarkierten AtNAA15p wurde mittels *confocal laser scanning microscopy* (CLSM) (Kapitel 2.7) in *Nicotiana tabacum* und *Nicotiana benthamiana* durchgeführt. Dazu wurde die *AtNAA15* kodierende cDNA (Kapitel 3.2.1.2) mit den Primern 764 und 765 (Anhang 6.3.3) amplifiziert und schließlich mittels Gateway-Klonierung (Kapitel 2.4.10.1) in den Expressionsvektor pK7YWG2, mit einem C-terminalen EYFP-Tag (Expressionskonstrukt: Anhang 6.4B) kloniert. Das pK7YWG2_AtNAA15 wurde durch Agrobakterieninfiltration in Epidermiszellen von *Nicotiana spec.* transformiert (Kapitel 2.3.7.2). Die Expression des AtNAA15:EYFP erfolgte unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors. Das Protein wird sowohl in *N. tabacum* als auch in *N. benthamiana* im Cytosol und Zellkern exprimiert (Abbildung 3.17). Die Expression des NAA15:EYFP im Zellkern von *N. benthamiana* war jedoch sehr schwach. (Abbildung 3.17D).

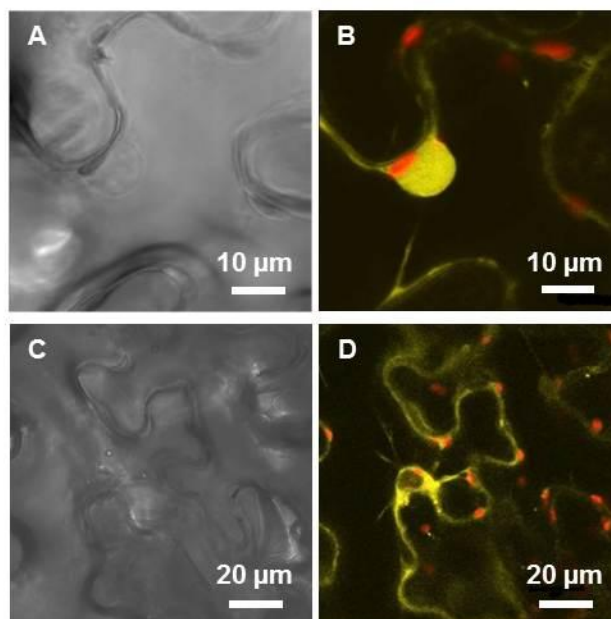


Abbildung 3.17 Lokalisierung des AtNAA15:EYFP-Fusionsproteins in *Nicotiana spec.*

Die Abbildungen zeigen eine *in vivo* Lokalisationsstudie von AtNAA15:EYFP im Blatt von *N. tabacum* (A, B) sowie *N. benthamiana* (C, D). Die transiente Expression von AtNAA15:EYFP wurde mittels CLSM drei Tage nach Agrobakterieninfiltration analysiert. (A, C) Durchlichtbilder, (B, D) die Detektion der EYFP-Fluoreszenz wurde gelb, die Autofluoreszenz von Plastiden rot dargestellt. Das AtNAA15:EYFP wird in beiden *Nicotiana spec.* im Cytosol und im Zellkern exprimiert.

3.2.3 *In vivo* Charakterisierung der *naa15-1* und *naa15-2* T-DNA-Insertionslinien

Trotz des Fehlens der Anker- Untereinheit (ScNaa15p) des NatA-Komplexes in Hefe waren die entsprechenden Mutanten lebensfähig, zeigten jedoch ähnliche Phänotypen wie die Deletionsmutanten der katalytischen Untereinheit (ScNaa10p) (Kapitel 3.1.4). Die Bedeutung der N-terminalen Acetylierung durch den NatA-Komplex *in planta* sollte mittels T-DNA-Insertionslinien analysiert werden. Nach Durchsichtung der verfügbaren Datenbank der T-DNA-Insertionslinien (www.arabidopsis.org) konnten zwei unabhängige T-DNA-Insertionslinien *naa15-1* und *naa15-2* identifiziert werden (Tabelle 2.1), die eine T-DNA-Insertion im *At1g80410.1* Gen enthalten. Die T-DNA-Insertionslinie *naa15-1* entstammt der SAIL- (SAIL_812_B10) und die *naa15-2* T-DNA-Insertionslinie der Wisconsin- (Wisc DsLOX 481- 484J20) Sammlung. Die Insertionsstellen der T-DNA-Linien wurden durch Sequenzierung des *naa15-1* und *naa15-2* PCR-Produkts mittels *left border* Primer verifiziert. Die Insertionsstelle der

naa15-1-Linie wurde am Ende des 16. Exons, 4580 bp unterhalb vom Start-Kodon lokalisiert, während die *naa15-2*-Linie die T-DNA-Insertion im sechsten Intron, 2299 bp unterhalb vom Start-Kodon aufweist (Abbildung 3.18).

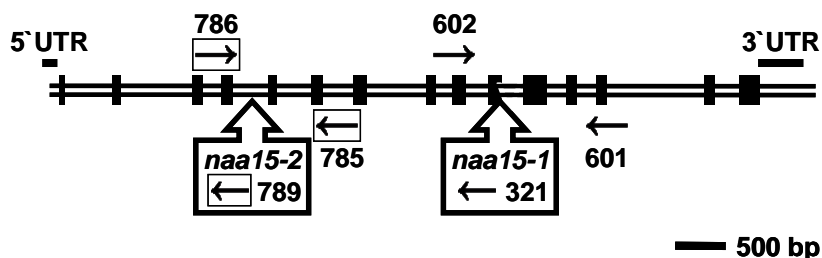


Abbildung 3.18 Struktur des *AtNAA15*-Gens (*At1g80410.1*) mit zwei unabhängigen T-DNA-Insertionen

Exons (1, 2, 5-9, 14-19, 25, 26) wurden als schwarze Boxen dargestellt. Primer zur Charakterisierung der *naa15-1* und *naa15-2* T-DNA-Insertionslinien wurden jeweils als schwarze Pfeile und schwarze Pfeile in Boxen markiert. Die Insertionsstellen der T-DNA wurden als Flächenpfeile dargestellt.

3.2.3.1 Molekulare Charakterisierung der *naa15-1* und *naa15-2* T-DNA-Insertionslinien

Für die Genotypisierung beider T-DNA-Insertionslinien wurden zwei Kombinationen von Primern (Abbildung 3.18; Anhang 6.3.1) generiert. Die Verifizierung der *naa15-1*-T-DNA-Insertion erfolgte mit einem genspezifischen Primer (602) und einem Primer, der an die linke Flanke der T-DNA-Insertion bindet (321) (Abbildung 3.19A). Für den Nachweis des Wildtyp-Allels wurden genspezifische Primer (602 und 601) verwendet (Abbildung 3.19B). Die *naa15-2* T-DNA-Insertion wurde ebenfalls mit einem genspezifischen Primer (786) und mit einem Primer, der an die linke Flanke der T-DNA-Insertion bindet (789) verifiziert (Abbildung 3.19C). Der Nachweis des Wildtyp Allels erfolgte mit genspezifischen Primern (786 und 785) (Abbildung 3.19D). Die Genotypisierung der 60 potenziellen *naa15-1*-Mutanten wies ausschließlich heterozygote- (55) sowie Wildtyp-Pflanzen (5) auf (Abbildung 3.19A, B). Von 24 potenziellen *naa15-2*-Mutanten wurden mittels PCR ebenfalls nur heterozygote- (5) und Wildtyp-Pflanzen (19) verifiziert (Abbildung 3.19C, D). Es wurden somit wie bei den *naa10-1*-Mutanten (Kapitel 3.1.4.1) keine homozygoten Pflanzen gefunden. Aufgrund dessen wurde die Keimungsrate der heterozygoten *naa15-1*- und *naa15-2*-Pflanzen bestimmt. Die Samen beider T-DNA-Insertionslinien wurden sterilisiert (Kapitel 2.3.1.2) und auf AT-Medium ohne Selektionsmarker ausgesät (Kapitel 2.3.1.2). Von

den 101 ausgesäten Samen der heterozygoten *naa15-1*-Pflanzen keimten 23 (23 %) nicht, von 100 der heterozygoten *naa15-2*-Pflanzen 32 (32 %), was zusammen mit dem Ergebnis der PCR-Analyse die Letalität der homozygoten *naa15-1*- und *naa15-2*-Pflanzen andeutet.

Um die Anzahl der Insertionen im *Atlg80410.1*-Gen zu überprüfen wurde das Segregationsmuster analysiert. Pflanzen beider T-DNA-Insertionslinien sowie Wildtyp-Pflanzen als Negativkontrolle wurden mit BASTA selektiert (Kapitel 2.3.2). In sieben Versuchen wurden 438 heterozygote *naa15-1*-Pflanzen analysiert, wovon 166 (38,1 %) Pflanzen abstarben. Die Keimungsrate mit annähernd 75 % und das Segregationsmuster mit einem Verhältnis von 2:1 von resistenten zu nicht-resistenten Pflanzen stimmen mit den Erwartungen für einen rezessiven Erbgang nach Mendel überein. Von 94 selektierten heterozygoten *naa15-2*-Pflanzen starben lediglich drei Pflanzen (3,2 %) ab, was mehrere Insertionen im Genom der *naa15-2*-Mutanten nahe legt. Zusätzlich zu Keimungs- und Segregationsexperimenten wurden die Schoten zwölf Wochen alter heterozygoten *naa15-1*-Pflanzen mit Hilfe eines Binokulars analysiert. Von 65 analysierten Samenanlagen waren 18 (27,7 %) nicht vollständig ausgebildet. In Col-0-Schoten wurden keine Samenanlagen beobachtet, die einen ähnlichen Phänotyp aufwiesen (Abbildung 3.19E). Die Analyse der Schoten weist ebenfalls auf eine lethale Auswirkung der T-DNA-Insertion im *NAA15*-Gen hin.

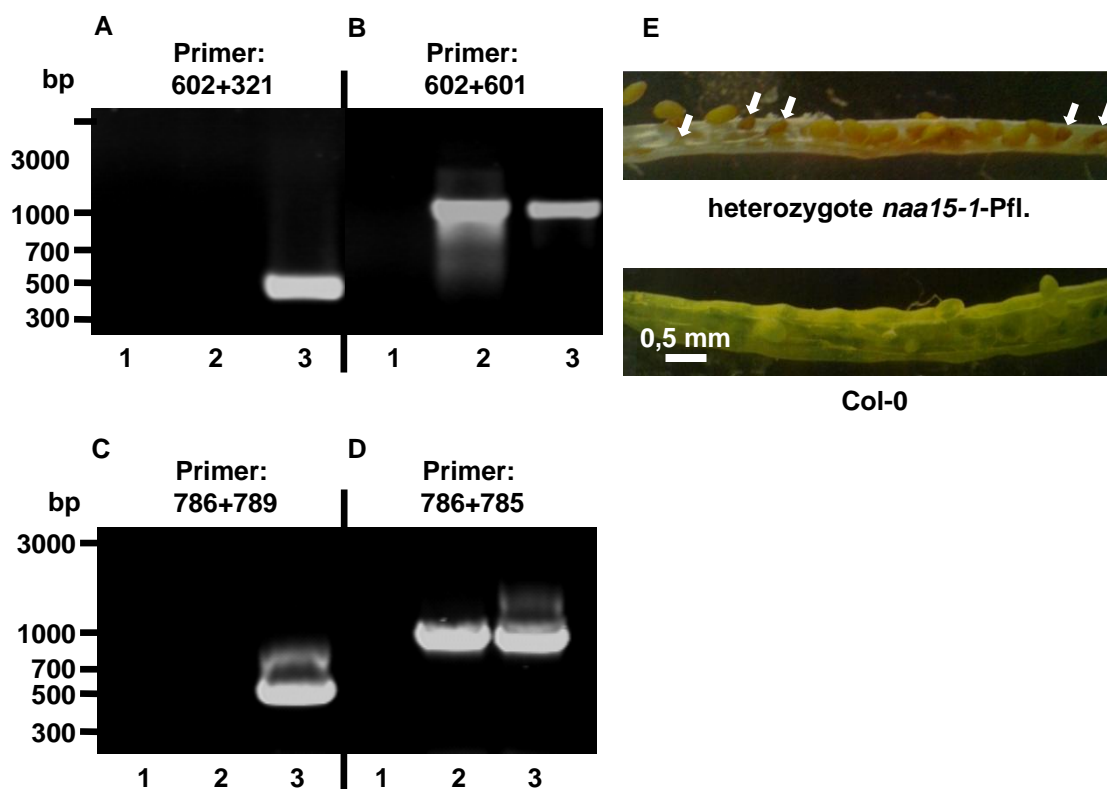


Abbildung 3.19 Zygotebestimmung von *naa15-1*- und *naa15-2*-Mutanten

(A-D) Die Genotypisierung der *naa15-1*- und *naa15-2*-Mutanten wurde mittels PCR mit zwei Kombinationen von Primern durchgeführt. Die Verifizierung der *naa15-1* T-DNA-Insertion im *AtNAA15*-Gen erfolgte mit einem genspezifischen Primer (602) und einem *left border* Primer (321) (A) und des Wildtyp-Allels mit genspezifischen Primern (602 und 601) (B). (1) Negativkontrolle mit H₂O, (2) genomischer DNA einer Wildtyp-Pflanze, (3) genomischer DNA einer *naa15-1*-Pflanze. Die *naa15-2* T-DNA-Insertion wurde mit genspezifischem Primer (786) und *left border* Primer (789) (C) und das Wildtyp-Allel mit genspezifischen Primern (786 und 785) (D) nachgewiesen. (1) Negativkontrolle mit H₂O, (2) genomischer DNA einer Wildtyp-Pflanze, (3) genomischer DNA einer *naa15-2*-Pflanze. Das Wildtyp-Allel konnte jeweils mit den genspezifischen Primern amplifiziert werden, was auf heterozygote *naa15-1*- und *naa15-2*-Pflanzen hinweist. (E) Die Bilder zeigen eine offene Schote einer Col-0- und einer heterozygoten *naa15-1*-Pflanze. Mit weißen Pfeilen wurden kleine, dunklere Samenanlagen der heterozygoten *naa15-1*-Pflanze markiert.

3.2.3.2 Charakterisierung der Embryogenese heterozygoter *naa15-1*- und *naa15-2*-Pflanzen

Um zu überprüfen, ob die Embryogenese der *naa15-1*- und *naa15-2*-Pflanzen ähnlich wie bei den *naa10-1*-Pflanzen (Kapitel 3.1.4.2) durch die T-DNA-Insertion beeinträchtigt wurde, wurden Embryonen aus Schoten zwölf Wochen alter heterozygoten *naa15-1*- und *naa15-2*-Pflanzen präpariert (Kapitel 2.3.9). Die Pflanzen wurden die ersten acht Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen und anschließend

unter Langtagbedingungen kultiviert (Tabelle 2.2). Die weitere Analyse der Embryonen erfolgte mittels *differential interference contrast* (DIC) Mikroskopie (Kapitel 2.3.9). Von 236 analysierten Samenanlagen der heterozygoten *naa15-1*-Pflanzen entwickelten sich 57 Embryonen (24,2 %) nur zum globulären Stadium. Bei den anderen 179 (75,8 %) Embryonen fand eine normale Embryogenese statt (Abbildung 3.20A). In 60 Samenanlagen der heterozygoten *naa15-2*-Pflanzen verblieben 13 (21,7 %) Embryonen in dem globulären Stadium. Die übrigen 47 Embryonen (78,3 %) entwickelten sich normal (Abbildung 3.20B). Die mikroskopische Analyse der Embryogenese von heterozygoten *naa15-1*- und *naa15-2*-Pflanzen beweist, dass der *knock out* von *AtNAA15* genauso wie der *knock out* von *AtNAA10* (Kapitel 3.1.4.2) embryolethal ist.

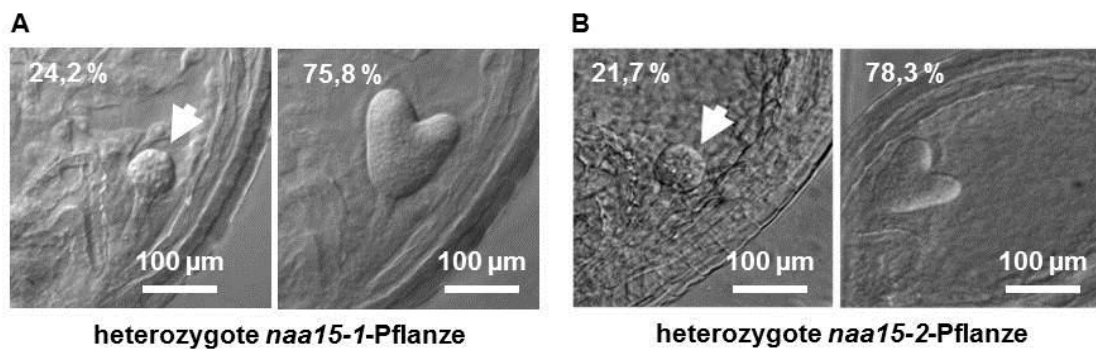


Abbildung 3.20 Embryogenese heterozygoter *naa15-1*- und *naa15-2*-Pflanzen

Die Bilder zeigen verschiedene Stadien der Embryogenese von heterozygoten *naa15-1*- (A) und *naa15-2*-Pflanzen (B). Die Analyse der Embryonen erfolgte mittels DIC Mikroskopie. Über 20 % der analysierten Embryonen beider T-DNA Insertionslinien arretierten im globulären Stadium der Embryogenese, was mit dem weißen Pfeil markiert wurde. Die anderen Embryonen entwickelten sich normal, was als Herzstadium gezeigt wurde.

3.2.4 Identifizierung und Charakterisierung der *AtNAA15 knock down* Linien (*amiNAA15*)

Artificial microRNA Konstrukte (*amiRNA*) sind RNAi Konstrukte mit ausgetauschter Targetsequenz, welche von endogenen microRNAs abgeleitet wurde (Schwab et al., 2006). Aufgrund der Tatsache, dass die T-DNA-Insertion im *NAA15*-Gen lethal ist (Kapitel 3.2.3.2) wurden *amiNAA15*-Linien hergestellt. Dazu wurde das *microNAA15* PCR-Produkt mittels zwei unspezifischen (A und B) sowie vier spezifischen Primern (1160, 1161, 1162 und 1163) (Anhang 6.3.3) in vier PCR Schritten amplifiziert und letztendlich in den Kanamycin-resistenten pBIN AR-Vektor kloniert (Kapitel 2.4.10.2).

Die Wildtyp-Pflanzen wurden mit dem *artificial micro* RNA-Konstrukt pBIN AR amiNAA15 (Anhang 6.4B), welches die Expression unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors vermittelt, stabil transformiert (Kapitel 2.3.7.1). Als Kontrolle wurden Wildtyp-Pflanzen (Col-0) verwendet, welche lediglich mit dem pBIN AR-Vektor stabil transformiert wurden. Nach einer Selektionsanalyse auf AT-Medium mit Kanamycin (Kapitel 2.3.2) und anschließender PCR-Analyse konnten 28 unabhängige Col-0/pBIN AR amiNAA15 in der T1 Generation identifiziert werden. Die analysierten Pflanzen wurden die ersten acht Wochen unter Kurztagbedingungen angezogen und anschließend unter Langtagbedingungen kultiviert (Tabelle 2.2). Alle identifizierten amiNAA15-Pflanzen waren lebensfähig zeigten jedoch während der Entwicklung ein unterschiedlich beeinträchtigtes Wachstum und eine teilweise veränderte Struktur der Blätter (Abbildung 3.21A, B). Dennoch waren alle amiNAA15-Pflanzen fähig im generativen Stadium Samen zu bilden (Abbildung 3.21B).

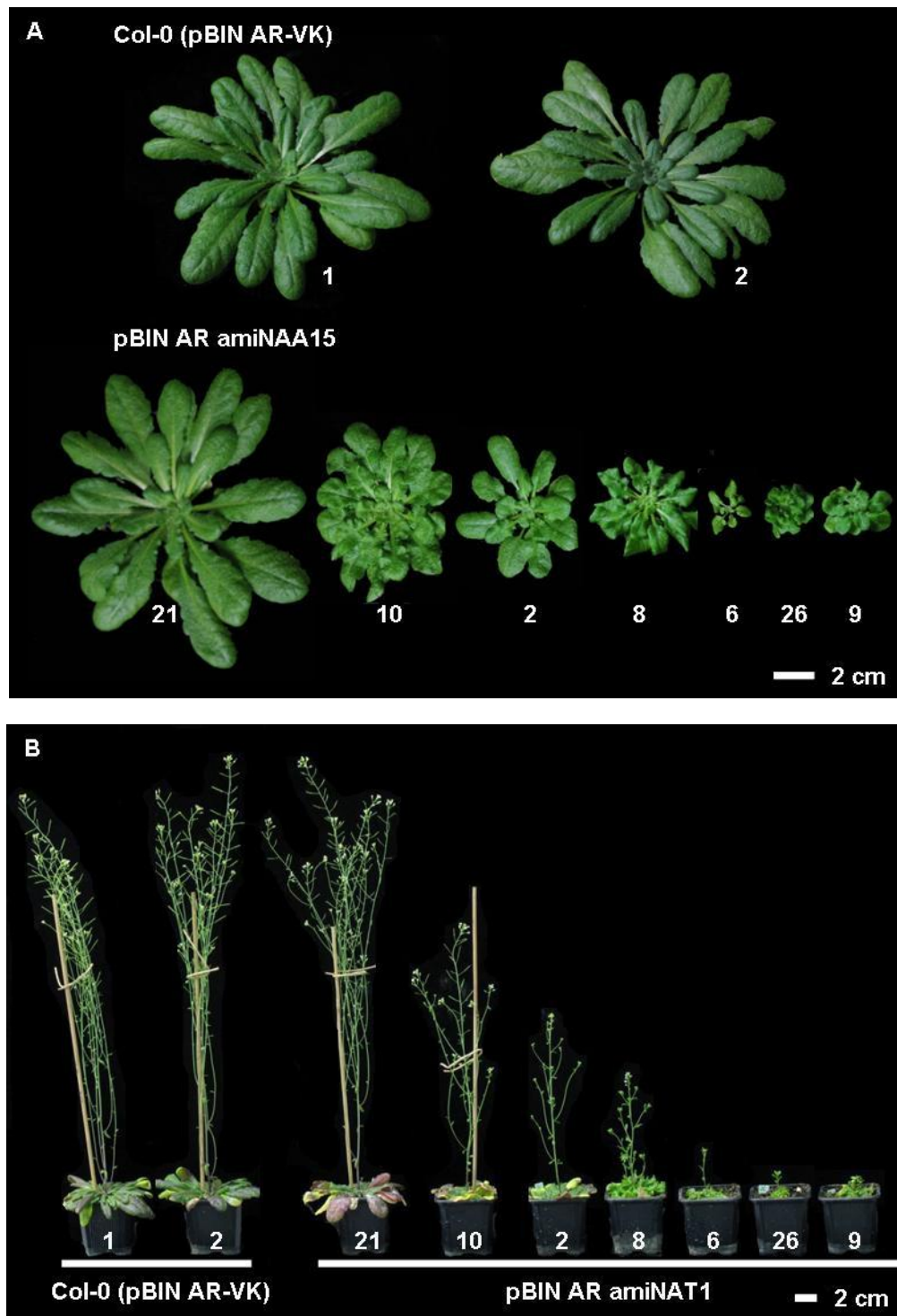


Abbildung 3.21 Phänotyp der amiNAA15-Pflanzen

Die Bilder zeigen acht Wochen alte, unter Kurztagbedingungen angezogene, repräsentative amiNAA15- und gleichaltrige Wildtyp-Pflanzen (Col-0) (A), welche anschließend unter Langtagbedingungen kultiviert wurden (B). Die Wachstumsdifferenzen der amiNAA15-Pflanzen sind nicht nur in der vegetativen (A) sondern auch in der generativen Phase erkennbar (B). (B) Die Sproßlänge der 13 Wochen alten ami NAA15-Pflanzen war entweder vergleichbar oder kürzer im Vergleich zu Col-0-Pflanzen. Trotz der Wachstumsunterschiede bildeten alle amiNAA15-Pflanzen Samen.

3.2.4.1 Quantitative Transkriptionsanalyse der amiNAA15-Pflanzen

Die mRNA Menge von *NAA15* in Col-0-Pflanzen, die mit dem pBIN AR amiNAA15-Konstrukt transformiert wurden, wurde durch eine quantitative *real-time PCR* bestimmt (Kapitel 2.4.2). Von allen 28 amiNAA15-Pflanzen wurde RNA extrahiert (Kapitel 2.3.4) und cDNA synthetisiert (Kapitel 2.4.9). *AtNAA15* wurde anschließend mit den genspezifischen Primern 1604 und 1605 (Anhang 6.3.2) amplifiziert. Das konstitutiv exprimierte Transkript des Aktins wurde mit den Aktinspezifischen Primern 364 und 436 (Anhang 6.3.2) amplifiziert und zur Quantifizierung der *AtNAA15*-Transkriptmenge genutzt. Bei 23 amiNAA15-Pflanzen war eine Reduktion der relativen *NAA15*-Transkriptmenge im Vergleich zu Col-0-Pflanzen erkennbar (Abbildung 3.22), bei Pflanzen 7 und 27 schwach (Abbildung 3.22C). Bei drei Pflanzen: 14, 25 und 29 war die Expression von *NAA15* im Vergleich zu Col-0-Pflanzen hochreguliert (Abbildung 3.22C). Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen Wachstumsphänotyp (Abbildung 3.21) und *NAA15*-Transkriptmenge (Abbildung 3.22) festgestellt werden.

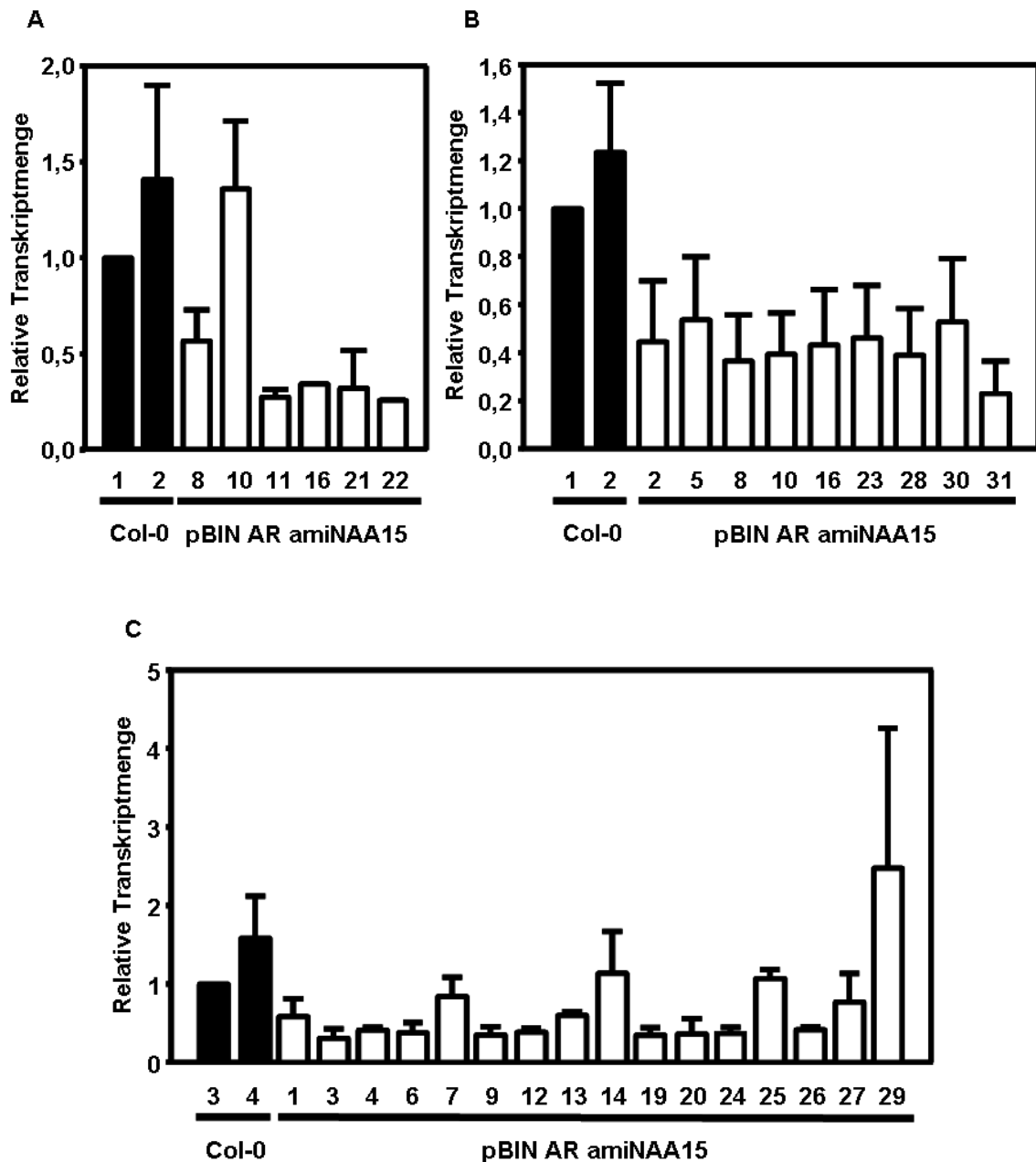


Abbildung 3.22 Quantitative RT-PCR-Analyse der amiNAA15-Pflanzen

Die Abbildungen zeigen die Transkriptmenge der acht (A, B) und zehn (C) Wochen alten, unter Kurztagbedingungen angezogenen amiNAA15- im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen (Col-0). Die Transkriptmenge wurde mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Die Kontrollen wurden schwarz, Pflanzen der amiNAA15-Linien weiß dargestellt. Die *AtNAA15*-Transkriptmenge der jeweils drei technischen Replikate wurde anhand der Expression von Aktin normalisiert. Die relative Transkriptmenge der ersten und dritten Col-0/pBIN AR Vektorkontrolle wurde als 1,0 definiert. Die Nummern der jeweiligen Kontrollen und amiNAA15-Linien beziehen sich auf die entsprechenden Pflanzen in Abbildung 3.21.

3.3 Identifizierung der katalytischen Untereinheit des NatB-Komplexes

Orthologe zu dem AtNAA20p wurden ebenso wie die Untereinheiten des NatA-Komplexes (Kapitel 3.1 und Kapitel 3.2) in Organismen des Pflanzen-, Pilz- und Tierreiches gefunden: *O. sativa* (82 % Identität zu Arabidopsis), *Glycine max* (93 %), *Chlamydomonas reinhardtii* (45 %), *Physcomitrella patens* (69 %), *Homo sapiens* (58 %), *Drosophila melanogaster* (61 %), *Ceanorhabditis elegans* (51 %), *Schizosaccharomyces pombe* (52 %), *Saccharomyces cerevisiae* (40 %) sowie *Synechocystis sp.* PCC6803 (33 %) (Abbildung 3.23). Für die Orthologiesuche im Arabidopsis Proteom wurde die Sequenz des *Saccharomyces cerevisiae* Proteins Naa20 (Ypr131cp) (Proteinsequenz: Anhang 6.1) als Referenz genutzt. Es konnte mit dem BLAST Algorithmus (TAIR BLASTP2.2.8, www.arabidopsis.org) ein Protein, At1g03150, identifiziert werden, das eine deutlich höhere Homologie als andere Proteine aufwies (Anhang 6.2).

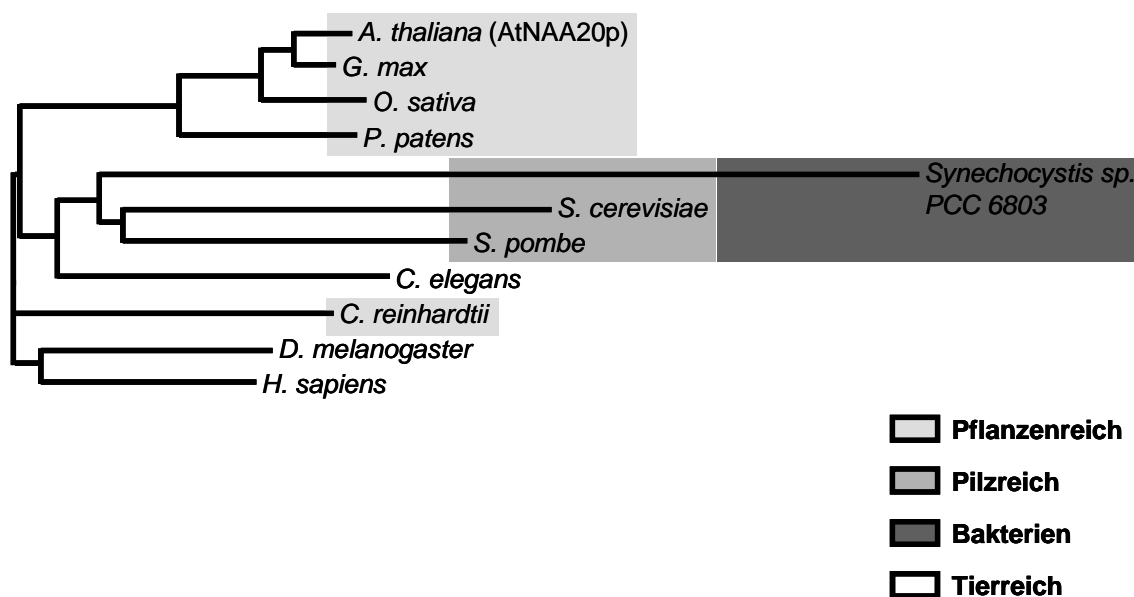


Abbildung 3.23 Die evolutionäre Verwandtschaft des AtNAA20p zu niederen und höheren Eukaryoten sowie Cyanobakterien

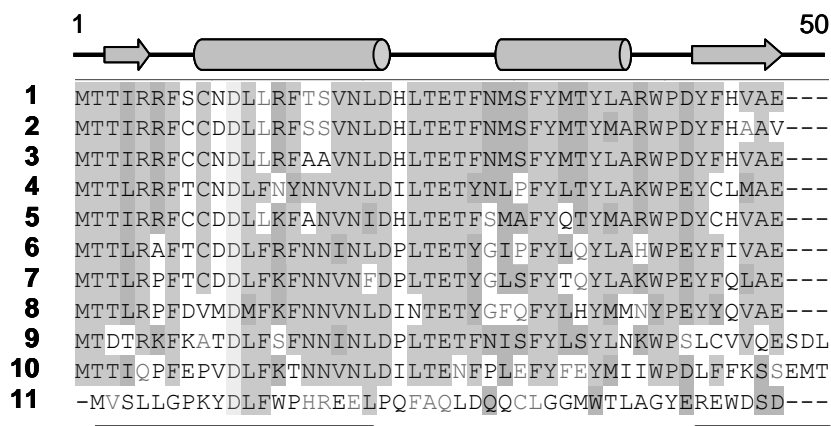
Die Abbildung zeigt die evolutionären Beziehungen des orthologen NAA20p aus dem Pflanzen-, Tier- und Pilzreich sowie Bakterien. Die Proteine wurden mit dem BLAST Algorithmus (TAIR BLASTP2.2.8, www.arabidopsis.org) verglichen. Die pflanzlichen Orthologe, *G. max* (03g31120), *O. sativa* (Os03g0699400; NP_001050988.1), *P. patens* (XP_001781047.1), zeigen deutlich höhere Identität mit dem AtNAA20p gegenüber des Pilz- (*S. cerevisiae* (Ypr131cp) und *S. pombe* (NP_587922.1)) und Tierreiches (*C. elegans* (NP_505053.1), *D. melanogaster* (NP_608331.1), *H. sapiens* (NP_057184)). Interessanterweise zeigt *C. reinhardtii* (XP_001694221.1) deutlich niedrigere Identität im Vergleich zu den anderen pflanzlichen Orthologen und bildet mit ihnen keinen gemeinsamen Ast des Stammbaumes. *Synechocystis sp.* PCC6803 (NP_441109.1) besitzt die niedrigste Identität mit dem orthologen AtNAA20p.

3.3.1 Biochemische Charakterisierung von AtNAA20p

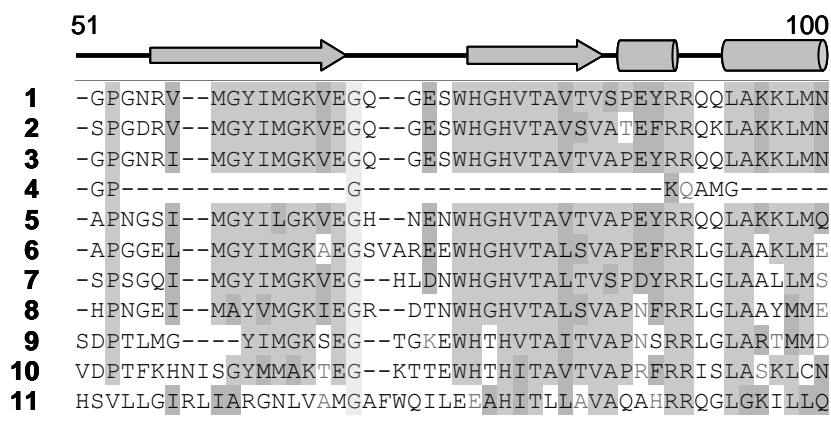
Die biochemische Charakterisierung des AtNAA20p wurde durch Analyse der konservierten Domänen und Überexpression des rekombinanten AtNAA20p in *E.coli* durchgeführt.

3.3.1.1 Charakterisierung der Proteinstruktur von AtNAA20p

Die katalytische Untereinheit des NatB-Komplexes, AtNAA20p, sowie die katalytische Untereinheit des NatA-Komplexes, AtNAA10p, (Kapitel 3.1) besitzen vier charakteristische für die GNAT-Superfamilie Motive (Abbildung 3.24; Kapitel 3.1.3) (Neuwald and Landsman, 1997; Dyda et al., 2000). Das Arabidopsis NAA20p hat eine Länge von 174 Aminosäuren und zeigt eine hohe Sequenzidentität mit Proteinen aus dem Pflanzen-, Pilz- und Tierreich sowie Bakterien (Abbildung 3.23 und Abbildung 3.24). Mit Ausnahme von der Grünalge *C. reinhardtii* (Abbildung 3.24; 4) weist der Aminosäuresequenzvergleich der putativen als auch bereits bekannten NAA20-Acetyltransferasen verschiedener Eukaryoten und Prokaryoten eine deutliche Konservierung des N-Terminus auf. Interessanterweise ist ebenfalls der C-Terminus der orthologen NAA20-Proteine hoch konserviert. Die Sekundärstruktur des AtNAA20p wurde mit dem Programm PSIPRED (www.bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred) vorausgesagt. Laut der Vorhersage besteht das AtNAA20p aus jeweils sechs α -Helices und β -Schleifen.

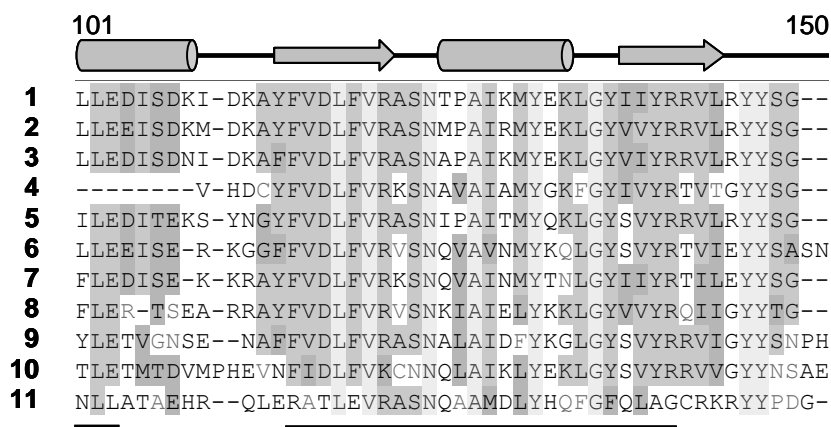


Motiv C



Motiv D

Motiv A



Motiv B

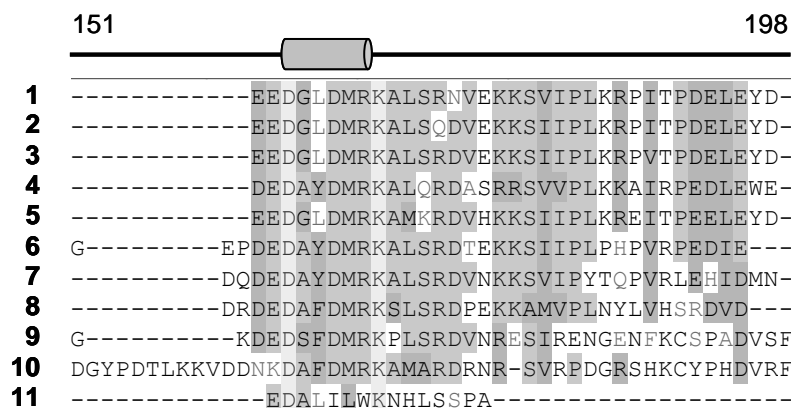


Abbildung 3.24 Proteinsequenzvergleich zwischen orthologen NAA20-Proteinen

Die Abbildung zeigt den Proteinsequenzvergleich zwischen *A. thaliana* (At1g03150AV821903), *O. sativa* (Os03g0699400; NP_001050988.1), *G. max* (03g31120), *C. reinhardtii* (XP_001694221.1), *P. patens* (XP_001781047.1), *H. sapiens* (NP_057184), *D. melanogaster* (NP_608331.1), *C. elegans* (NP_505053.1), *S. pombe* (NP_587922.1), *S. cerevisiae* (Ypr131cp) und *Synechocystis sp.* PCC6803 (NP_441109.1). Der Aminosäuresequenzvergleich wurde mit dem Programm Vector NTI 9 (AlignX) durchgeführt und die konservierten Aminosäuren wurden als graue Felder markiert. Die Sekundärstruktur wurde mittels PSIPRED vorausgesagt und oberhalb der Proteinsequenz dargestellt: β -Schleifen wurden als Pfeile und α -Helixen als Tuben markiert. Die konservierten Motive, A, B, C und D, der GNAT-Superfamilie (Neuwald and Landsman, 1997) wurden unterhalb der Proteinsequenz gezeigt.

3.3.1.2 Überexpression und Aufreinigung des rekombinanten AtNAA20p

Das rekombinante AtNAA20p wurde auf Basis eines His-Tags mittels *Immobilized Metal Affinity Chromatography* aufgereinigt. Dazu wurde der kodierende Bereich der cDNA für das mature Protein (At1g03150AV821903-Proteinsequenz: Anhang 6.1) vom Klon U15648 (www.arabidopsis.org) mit den Primern: 768 und 1003 (Anhang 6.3.3) amplifiziert und letztendlich mittels Gateway-Klonierung (Kapitel 2.4.10.1) in den Expressionsvektor pETG10a kloniert. Anschließend wurden die *E. coli* HMS 174 Zellen mit dem pETG10a_AtNAA20-Konstrukt (Anhang 6.4C) transformiert. Die Expression wurde durch das Herabsenken der Induktionstemperatur und verlängerte Inkubationsdauer optimiert. Es wurden zwei Aufreinigungen unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt: eine aus 250 ml Kulturvolumen unter Standardbedingungen und die zweite aus 600 ml Kulturvolumen nach einer 12-stündigen Inkubation bei 28 °C und 220 rpm. Die SDS-PAGE-Analyse (Kapitel 2.6.7) und anschließende Visualisierung der aufgetrennten Proteine mittels Coomassie (Kapitel 2.6.9) zeigte weder eine Expressionsbande, mit dem vorausgesagtem Molekulargewicht von 22,5 kDa inklusive His-Fusion-Tag, im Rohextrakt noch eine in den Waschfraktionen oder

Elutionsfraktionen (Daten nicht gezeigt). Die Induktionskontrolle der Gesamtproteine zeigte dagegen eine schwache Expressionsbande bei ca. 23 kDa, was dem His:NAA20p entspricht und darauf hindeutet, dass das His:NAA20p sich teilweise in den unlöslichen Fraktionen befindet (Abbildung 3.25). Es wäre notwendig die Aufreinigung von NAA20p durch andere Bedingungen und möglicherweise andere Fusionen zu optimieren.

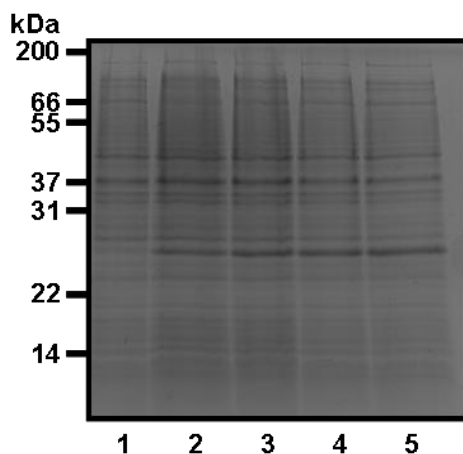


Abbildung 3.25 Induktionskontrolle des His:NAA20-Fusionsproteins

Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE (15 %) aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung visualisiert. Die Induktionskontrolle wurde bei 37 °C bei 220 rpm durchgeführt. Die erste Spur zeigt die exprimierten Proteine vor der Induktion mit IPTG. Die zweite Spur eine Stunde, die dritte zwei, die vierte drei und die fünfte vier Stunden nach der Induktion. Schon nach einer Stunde konnte man bereits die Expressionsbande des His:NAA20p mit dem vorausgesagten Molekulargewicht von 22,5 kDa erkennen.

3.3.2 Subzelluläre Lokalisierung von AtNAA20p

Beide orthologe Naa20-Proteine aus Hefe und Menschen sind im Cytosol lokalisiert (Polevoda et al., 2008; Starheim et al., 2008). Das HsNaa20p wird ebenfalls im Zellkern exprimiert (Starheim et al., 2008). Um zu überprüfen in welchen subzellulären Kompartimenten das AtNAA20p exprimiert wird, wurde die Lokalisierung von AtNAA20p in *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana* sowie in Arabidopsis-Keimlingen durchgeführt. Dazu wurde die *AtNAA20* kodierende cDNA (Kapitel 3.3.1.2) mit den Primern 768 und 769 (Anhang 6.3.3) amplifiziert und letztendlich mittels Gateway-Klonierung (Kapitel 2.4.10.1) in einen Expressionsvektor pB7YWG2 mit einem C-terminalem EYFP-Fusionsprotein, welches die Expression des AtNAA20p unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors vermittelt, kloniert. Die Lokalisierung des

fluoreszenzmarkierten AtNAA20p wurde mittels *confocal laser scanning microscopy* (CLSM) durchgeführt (Kapitel 2.7).

3.3.2.1 Subzelluläre Lokalisierung von AtNAA20p in *Nicotiana spec.*

Fluoreszenzmarkiertes AtNAA20p wurde nach Agrobakterieninfiltration (Kapitel 2.3.7.2) in Epidermiszellen von *N. tabacum* und *N. benthamiana* transient exprimiert. In zwei Versuchen wurde AtNAA20:EYFP im Cytosol und Zellkern des *N. tabacum* (Anhang 6.5B) und *N. benthamiana* (Abbildung 3.26) exprimiert, jedoch der dritte Versuch deutete zusätzlich die mitochondriale Lokalisierung des AtNAA20p an (Abbildung 3.26D). Die Mitochondrien-Färbung mittels MitoTracker-Lösung (Kapitel 2.7) war jedoch erfolglos.

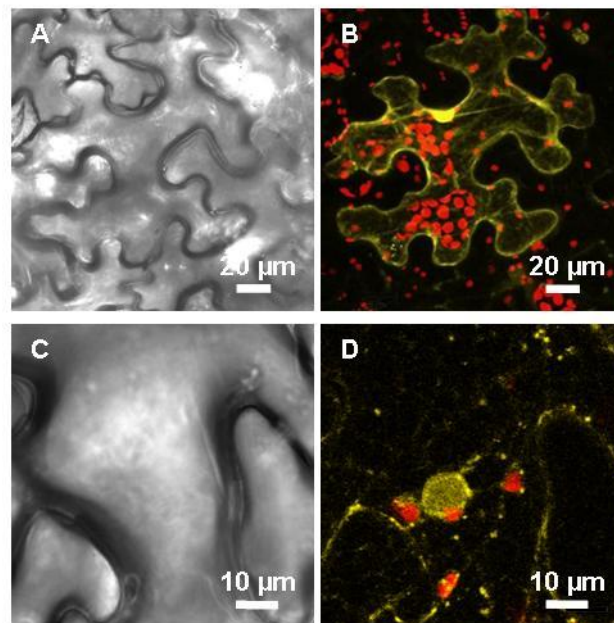


Abbildung 3.26 Lokalisierung des AtNAA20:EYFP-Fusionsproteins in *N. benthamiana*

Die Abbildungen zeigen eine *in vivo* Lokalisationsstudie von AtNAA20:EYFP im Blatt von *N. benthamiana*. Die transiente Expression von AtNAA20:EYFP wurde mittels CLSM drei Tage nach Agrobakterieninfiltration analysiert. (A, C) Durchlichtbilder, (B, D) die Detektion der EYFP-Fluoreszenz wurde gelb, die Autofluoreszenz von Plastiden rot dargestellt. Das AtNAA20:EYFP wird im Cytosol und im Zellkern exprimiert. (D) Die gelb fluoreszierenden unspezifischen Aggregate deuten eine mitochondriale Lokalisierung an.

3.3.2.2 Subzelluläre Lokalisierung von AtNAA20p in *A. thaliana*

Die subzelluläre Lokalisierung des AtNAA20:EYFP im heterologen System deutete neben der cytosolischen ebenfalls eine mitochondriale Expression an (Kapitel 3.3.2.1).

Um auszuschließen, dass die Lokalisierung des AtNAA20p aufgrund der heterologen Expression in *N. benthamiana* begründet ist, wurde dasselbe Protein stabil in *A. thaliana* homozygote *naa20-1*-Pflanzen transformiert (Kapitel 2.3.7.1). Die Lokalisationsbestimmung von NAA20:EYFP fand im Blatt, Hypokotyl und der Wurzel statt. Das AtNAA20p wird im Cytosol sowie in Mitochondrien im Blatt und Hypokotyl exprimiert (Abbildung 3.27A, B, E, F). Um die mitochondriale Lokalisierung des AtNAA20p zu bestätigen wurden Arabidopsis-Keimlinge in MitoTracker-Lösung inkubiert (Kapitel 2.7). Die Kolo-kalisierung von EYFP-Fluoreszenz und MitoTracker zeigte eine eindeutige mitochondriale Lokalisierung von AtNAA20:EYFP im Blatt, Hypokotyl und in Wurzeln (Abbildung 3.27B-D, F-H, I-K).

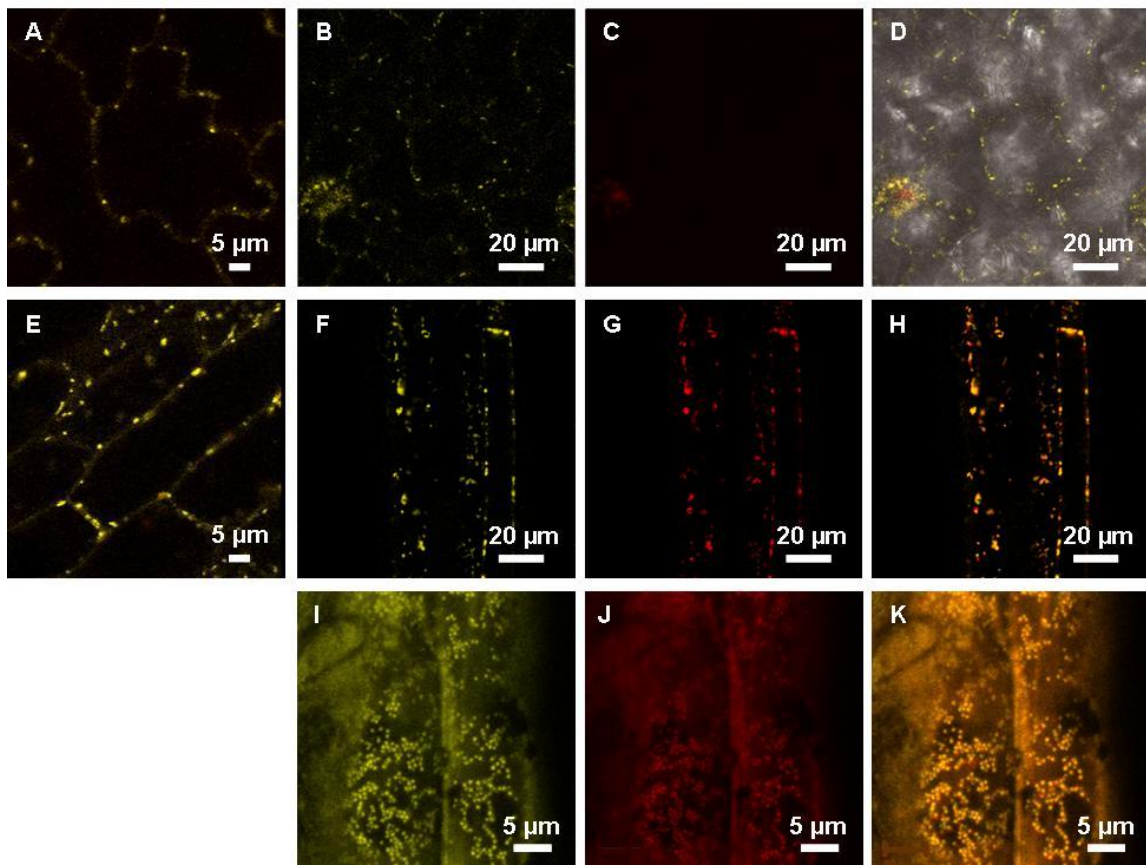


Abbildung 3.27 Lokalisierung des AtNAA20-EYFP-Fusionsproteins in Arabidopsis-Keimlingen

Die Abbildungen zeigen eine *in vivo* Lokalisationsstudie von AtNAA20:EYFP in verschiedenen Geweben von *A. thaliana*: im Blatt (A-D), Hypokotyl (E-H) und in der Wurzel (I-K). Die Lokalisierung wurde mittels CLSM durchgeführt. Die Detektion der EYFP-Fluoreszenz wurde gelb (A, B, E, F, I), MitoTracker-Färbung rot (C, G, J) und die Überlagerung von EYFP und MitoTracker orange dargestellt (D, H, K). Das AtNAA20:EYFP ist im Cytosol sowie in Mitochondrien im Blatt (A-D) und Hypokotyl (E-H) lokalisiert. Die Bilder zeigen die mitochondriale Lokalisierung des AtNAA20-Proteins ebenfalls in den Wurzelzellen (I-K).

3.3.3 *In vivo* Charakterisierung der *naa20-1* und *naa20-2* T-DNA-Insertionslinien

Die Bedeutung der N-terminalen Acetylierung durch den NatB-Komplex, bzw. NAA20p in Arabidopsis wurde *in vivo* mittels zwei T-DNA-Insertionslinien *naa20-1* und *naa20-2* (Tabelle 2.1) analysiert. Beide enthalten eine T-DNA-Insertion im *At1g03150*-Gen. Die bereits charakterisierten Hefe *naa20*-Mutanten waren lebensfähig, zeigten jedoch einige Phänotypen wie langsames Wachstum, Temperatur- und Osmosesensibilität, Fehler in der Erbgut der Mitochondrien, zufällige Polarität der Knospung (Polevoda et al., 2003), welche auf die nicht funktionsfähigen Aktinfilamente zurückzuführen sind (Singer et al., 2000; Polevoda et al., 2003; Singer and Shaw, 2003).

Die T-DNA-Insertionslinie *naa20-1* entstammt der SALK- (SALK_027687) und die *naa20-2* T-DNA-Insertionslinie der SAIL- (SAIL_323_B05) Sammlung. Die Insertionsstelle der *naa20-1* T-DNA-Linie wurde durch Sequenzierung des *naa20-1* PCR-Produkts verifiziert, welches in den pGEMTeasy-Vektor kloniert wurde. Die Insertionsstelle der *naa20-2* T-DNA-Linie wurde durch Sequenzierung des *naa20-2* PCR-Produkts mittels *left border* Primer bestimmt. Die Insertionsstelle der *naa20-1* T-DNA-Insertionslinie wurde im dritten Intron, 1813 bp unterhalb vom Start-Kodon und die der *naa20-2* im putativen Promotor, 72 bp vor dem Start-Kodon lokalisiert (Abbildung 3.28).

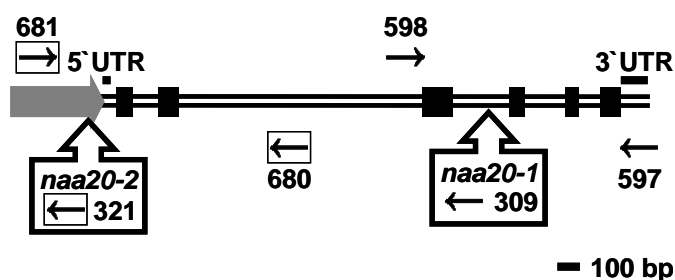


Abbildung 3.28 Struktur des *AtNAA20*-Gens (*At1g03150*) mit zwei unabhängigen T-DNA-Insertionen

Der putative Promotor ist als grauer Pfeil und die Exons als schwarze Boxen dargestellt. Primer zur Charakterisierung der *naa20-1* und *naa20-2* T-DNA-Insertionslinien wurden jeweils als schwarze Pfeile und schwarze Pfeile in Boxen markiert. Die Insertionsstellen der T-DNA wurden als Flächenpfeile dargestellt.

3.3.3.1 Molekulare Charakterisierung der *naa20-1* und *naa20-2* T-DNA-Insertionslinien

Die Verifizierung der T-DNA-Insertion und des Wildtyp-Allels in Pflanzen der *naa20-1* und *naa20-2* T-DNA-Insertionslinien wurde mittels PCR mit zwei Kombinationen von Primern (Abbildung 3.28; Anhang 6.3.1) durchgeführt. Der Nachweis der *naa20-1* T-DNA-Insertion erfolgte mit einem genspezifischen Primer (598) und mit einem Primer, der an die linke Flanke der T-DNA-Insertion bindet (309) (Abbildung 3.29A). Für den Nachweis des Wildtyp-Allels wurden genspezifische Primer (598 und 597) verwendet (Abbildung 3.29B). Die PCR-Analyse von 66 potentiellen *naa20-1*-Mutanten wies heterozygote- (43), Wildtyp- (19) und homozygote-Pflanzen (4) auf. Die *naa20-2* T-DNA-Insertion wurde ebenfalls mit einem genspezifischen Primer (681) und einem Primer, der an die linke Flanke der T-DNA-Insertion bindet (321) verifiziert (Abbildung 3.29C). Der Nachweis des Wildtyp-Allels erfolgte mit genspezifischen Primern (681 und 680) (Abbildung 3.29D). Ausgehend von 35 potentiellen *naa20-2*-Mutanten wurden eine homozygote- und 34 heterozygote-Pflanzen identifiziert.

Um die Anzahl der Insertionen im *At1g03150*-Gen zu überprüfen wurde das Segregationsmuster analysiert. Es wurden heterozygote-Pflanzen beider T-DNA-Insertionslinien mit dem entsprechenden Selektionsmarker (Kapitel 3.3.3) selektiert. Wildtyp-Pflanzen wurden als Negativkontrolle verwendet. In zwei Versuchen wurden 233 heterozygote *naa20-1*-Pflanzen mit Kanamycin selektiert (Kapitel 2.3.2), wovon 69 Pflanzen abstarben. Von 136 heterozygoten *naa20-2*-Pflanzen, die in zwei Versuchen mit BASTA selektieren wurden (Kapitel 2.3.2), starben 42 Pflanzen ab. Dies entspricht einer Resistenzverteilung von 70,4 % resistenten zu 29,6 % nicht-resistenten Pflanzen der *naa20-1* T-DNA-Insertionslinie und 69 % resistenten zu 31 % nicht-resistenten Pflanzen der *naa20-2* T-DNA-Insertionslinie. Die statistische Analyse, mit einem annähernden Verhältnis von 3:1 von resistenten zu nicht-resistenten Pflanzen, deutet eine einfache Insertion im Genom der *naa20-1*- und *naa20-2*-Mutanten an.

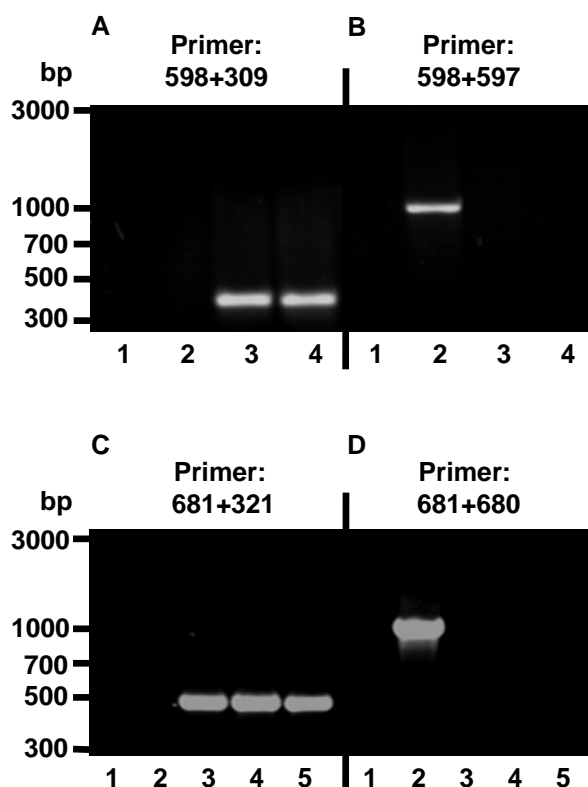


Abbildung 3.29 Genotypisierung der *naa20-1* und *naa20-2* T-DNA-Insertionslinien

(A-D) Die Genotypisierung der *naa20-1*- und *naa20-2*-Mutanten wurde mittels PCR mit zwei Kombinationen von Primern durchgeführt. Die Verifizierung der *naa20-1* T-DNA-Insertion im *AtNAA20*-Gen erfolgte mit einem genspezifischen Primer (598) und einem *left border* Primer (309) (A). Die des Wildtyp-Allels mit genspezifischen Primern (598 und 597) (B). (1) Negativkontrolle mit H₂O, (2) genomischer DNA einer Wildtyp-Pflanze, (3, 4) genomischer DNA von zwei unabhängigen *naa20-1*-Pflanzen. Die *naa20-2* T-DNA-Insertion wurde mit einem genspezifischem Primer (681) und einem *left border* Primer (321) (C) und das Wildtyp-Allel mit genspezifischen Primern (681 und 680) (D) nachgewiesen. (1) Negativkontrolle mit H₂O, (2) genomischer DNA einer Wildtyp-Pflanze, (3-5) genomischer DNA von drei unabhängigen *naa20-2*-Pflanzen. Das Wildtyp-Allel konnte mit beiden Kombinationen der genspezifischen Primern nicht amplifiziert werden, was auf homozygote Pflanzen hinweist.

3.3.3.2 Wachstum homozygoter *naa20-1*- und *naa20-2*-Pflanzen

Es wurden acht und 13 Wochen alte homozygote *naa20-1*- und *naa20-2*-Pflanzen im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Pflanzen (Col-0) analysiert. Alle Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen angezogen und nach acht Wochen weiter unter Langtagbedingungen kultiviert (Tabelle 2.2). Acht Wochen alte homozygote Pflanzen beider T-DNA-Insertionslinien wiesen ein beeinträchtigt Wachstum, leichte Aufhellungen der Blätter (Abbildung 3.30A) und eine signifikante Veränderung des Frisch- und Trockengewichts auf. Das Wachstum acht Wochen alter homozygoten

naa20-1- war um ca. 51 % und das der homozygoten *naa20-2*-Pflanzen um ca. 45 % im Vergleich zu Col-0-Pflanzen reduziert (Abbildung 3.30B; Trockengewicht: Anhang 6.7B).

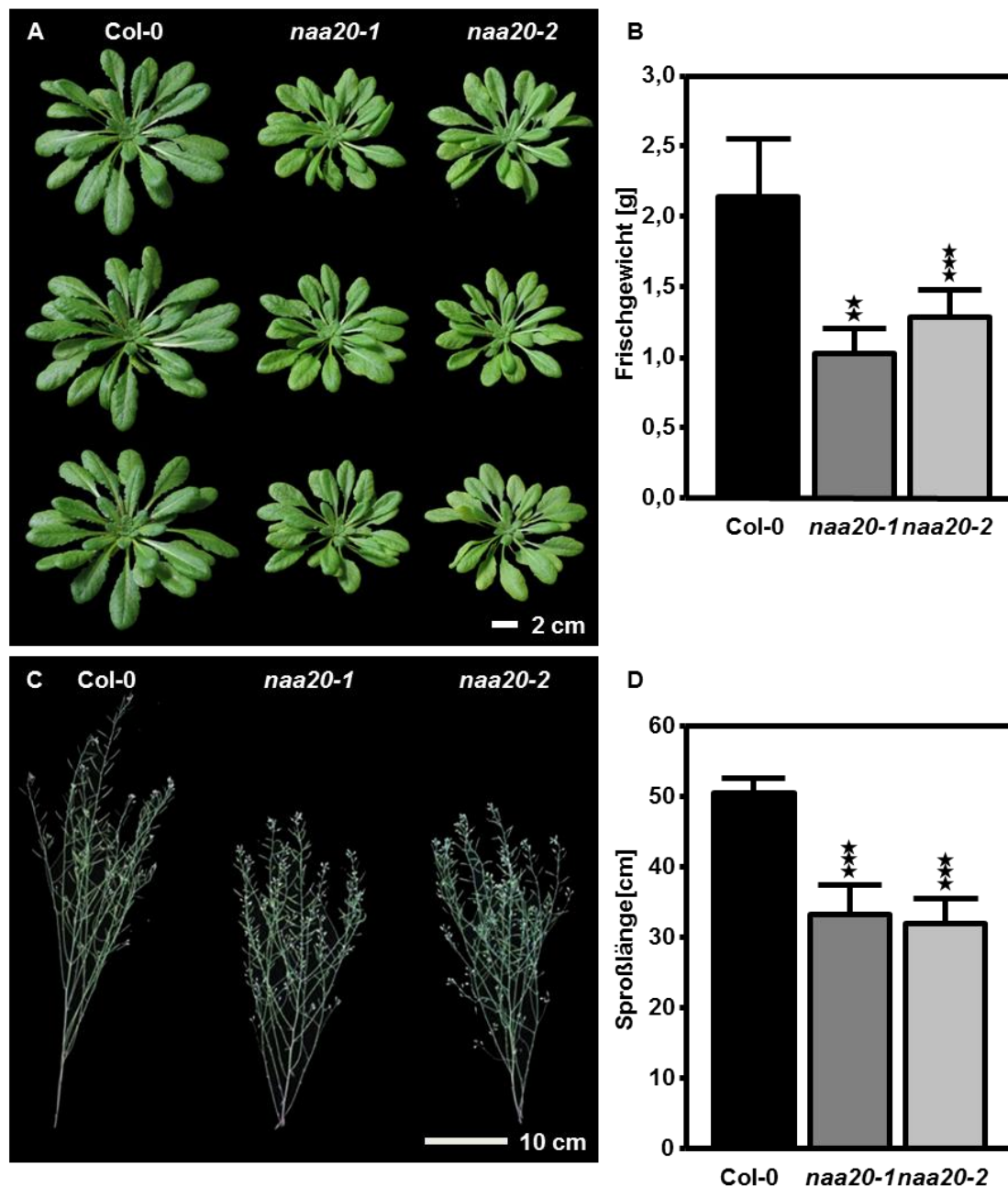


Abbildung 3.30 Wachstumsphänotyp homozygoter *naa20-1*- und *naa20-2*-Pflanzen

Die Bilder zeigen das Wachstum von acht (A) und 13 Wochen (C) alten, repräsentativen Wildtyp- (Col-0), homozygoten *naa20-1*- und *naa20-2*-Pflanzen, welche die ersten acht Wochen unter Kurztagbedingungen und anschließend unter Langtagbedingungen kultiviert wurden. In B ist das Frischgewicht acht Wochen alter Pflanzen dargestellt (n=6). Die Sproßlänge von 13 Wochen alten Col-0-, homozygoten *naa20-1*- und *naa20-2*-Pflanzen wurde in D gezeigt (n=5). $P \leq 0.05 > 0.01^*$; $p \leq 0.01 > 0.001^{**}$; $p \leq 0.001^{***}$.

Die Wachstumsunterschiede zwischen homozygoten *naa20-1*- und *naa20-2*- zu Col-0-Pflanzen waren nach Beendigung des Wachstums und am Ende der Vegetationsphase weiterhin sichtbar (Abbildung 3.30C). Die Sproßlänge von 13 Wochen alten homozygoten *naa20-1*- und *naa20-2*-Pflanzen war signifikant um ca. 35 % kleiner als jene von vergleichbaren Col-0-Pflanzen (Abbildung 3.30D).

3.3.3.3 Chlorophyllbestimmung von homozygoten *naa20-1*- und *naa20-2*-Pflanzen

Die homozygoten *naa20-1*- und *naa20-2*-Pflanzen zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen (Col-0) eine Aufhellung der Blätter (Abbildung 3.30A). Aus diesem Grund wurde der Chlorophyllgehalt (Kapitel 2.3.6) von acht und zehn Wochen alten, unter Kurztagbedingungen (Tabelle 2.2) angezogenen, homozygoten *naa20-1*-, *naa20-2*- sowie Col-0-Pflanzen bestimmt. Alle Pflanzen beider T-DNA-Insertionslinien wiesen eine Reduktion im Gesamtchlorophyllgehalt auf (Abbildung 3.31A, B). Die Reduktion des Gesamtchlorophylls in acht (Abbildung 3.31A) und zehn (Abbildung 3.31B) Wochen alten Blättern der homozygoten *naa20-1*-Pflanzen war auf die Reduktion von Chlorophyll b zurückzuführen. Die Konzentration von Chlorophyll a war vergleichbar mit der in Col-0-Pflanzen. Ebenso wie in Pflanzen der *naa20-1*-Linie, wiesen die Blätter homozygoter *naa20-2*-Pflanzen im Alter von acht Wochen eine signifikante Reduktion des Gesamtchlorophylls auf (Abbildung 3.31A), welche sich auf die Reduktion des Chlorophyll b-Gehaltes zurückführen lässt. Im Alter von zehn Wochen ist der Gesamtchlorophyllgehalt homozygoter *naa20-2*-Pflanzen im Vergleich zu Col-0 weiterhin signifikant reduziert, hier ist die Reduktion jedoch auf eine niedrigere Abundanz von Chlorophyll a und b zurückzuführen (Abbildung 3.31B).

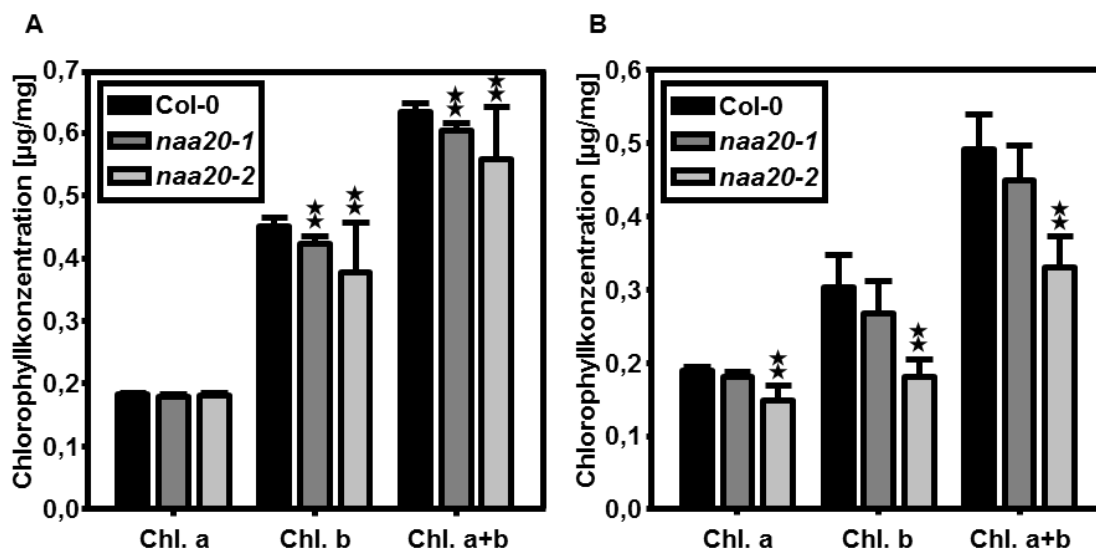


Abbildung 3.31 Chlorophyllgehalt homozygoter *naa20-1*- und *naa20-2*-Pflanzen

Auf den Abbildungen ist der Chlorophyllgehalt von acht (A) und zehn (B) Wochen alten, unter Kurztagbedingungen angezogenen, Wildtyp- (Col-0), homozygoten *naa20-1*- und *naa20-2*-Pflanzen dargestellt. Für jede Linie wurden jeweils 6 acht und 4 zehn Wochen alte Pflanzen analysiert. (A, B) Pflanzen beider T-DNA-Insertionslinien zeigen eine Reduktion im Gesamtchlorophyllgehalt. $P \leq 0,05 > 0,01^*$; $p \leq 0,01 > 0,001^{**}$; $p \leq 0,001^{***}$.

3.3.3.4 Semiquantitative Transkriptionsanalyse homozygoter *naa20-1*- und *naa20-2*-Pflanzen

Die homozygoten Pflanzen der *naa20-1* und *naa20-2* T-DNA-Insertionslinien waren zwar lebensfähig wiesen aber ein beeinträchtigt Wachstum auf (Abbildung 3.30). Um zu überprüfen, ob dieser Phänotyp auf die fehlende NAA20-Aktivität zurückzuführen ist, wurde eine semiquantitative Transkriptionsanalyse (Kapitel 2.4.1) durchgeführt. Dazu wurde die RNA aus jeweils zwei unabhängigen, acht Wochen alten Wildtyp- (Col-0), homozygoten *naa20-1*- und *naa20-2*-Pflanzen extrahiert (Kapitel 2.3.4) und die cDNA synthetisiert (Kapitel 2.4.9). Alle analysierten Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen angezogen (Tabelle 2.2). Anschließend wurde *AtNAA20* mit zwei Kombinationen genspezifischer Primer amplifiziert (Abbildung 3.32A, B; Anhang 6.3.2). Die erste Kombination genspezifischer Primer 972 und 999 wurde so ausgewählt, dass die Insertionsstelle der *naa20-1*-Mutanten zwischen den Primern und der *naa20-2*-Mutanten vor den ausgewählten Primern lokalisiert war. Das *NAA20*-Transkript in homozygoten *naa20-1*- und *naa20-2*-Pflanzen konnte im Gegensatz zu Col-0-Pflanzen, die als Positivkontrolle verwendet wurden, nicht amplifiziert werden

(Abbildung 3.32A). Die zweite Kombination genspezifischer Primer 1252 und 1253 bindet vor der Insertionsstelle im Falle von *naa20-1*- und erneut hinter der Insertionsstelle der *naa20-2*-Mutanten. Die *NAA20*-Transkriptmenge in homozygoten *naa20-1*-Pflanzen war vergleichbar mit einer der Col-0 Pflanzen (Abbildung 3.32B) im Gegensatz zu der Transkriptmenge, die mit der ersten Kombination genspezifischer Primer amplifiziert wurde (Abbildung 3.32A). Aufgrund der Intensität und der Größe deuten die Transkriptionsprodukte im Falle von homozygoten *naa20-2*-Pflanzen vielmehr auf eine Kontamination hin (Abbildung 3.32B).

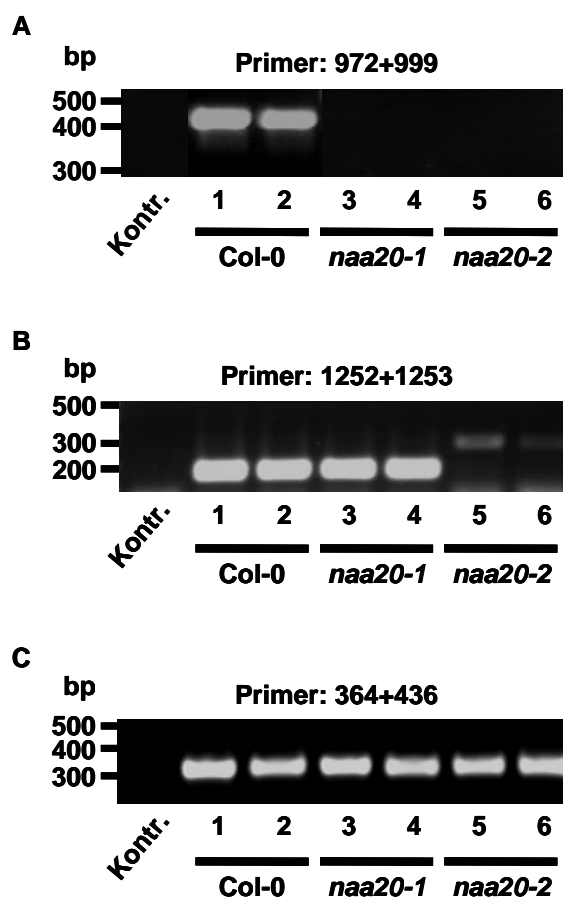


Abbildung 3.32 Semiquantitative RT-PCR-Analyse homozygoter *naa20-1*- und *naa20-2*-Pflanzen

Die Transkription des *AtNAA20* (*At1g03150*) (A, B) und Aktinens (*At5g09810*) (C) wurde in Blättern von jeweils zwei unabhängigen homozygoten *naa20-1*- und *naa20-2*- sowie Wildtyp-Pflanzen (Col-0) als Positivkontrolle durch semiquantitative RT-PCR untersucht. Alle analysierten Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen angezogen. Das *AtNAA20*-Transkript wurde mit zwei Kombinationen genspezifischer Primer 972 und 999 (A), sowie 1252 und 1253 (B) amplifiziert. Das konstitutiv exprimierte Transkript des Aktinens wurde mit den Primern 364 und 436 (C) analysiert. Das Volllänge *NAA20*-Transkript (A) konnte weder in homozygoten *naa20-1*- noch in *naa20-2*-Pflanzen nachgewiesen werden.

Diese zwei Versuche mit unterschiedlich ausgewählten Primer lassen darauf schließen, dass ein Teil des *NAA20*-Transkript in homozygoten *naa20-1*-Pflanzen gebildet wird. Es wird aber nicht das Volllänge-Transkript in den homozygoten *naa20-1*-Pflanzen gebildet. Das konstitutiv exprimierte Transkript des Aktins wurde mit den Aktinspezifischen Primern 364 und 436 (Anhang 6.3.2) amplifiziert und zur Quantifizierung der *AtNAA20*-Transkriptmenge genutzt (Abbildung 3.32C).

3.3.4 Komplementierung homozygoter *naa20-1*-Pflanzen durch Überexpression von endogenem NAA20p

Da die homozygoten *naa20-1*-Pflanzen lebensfähig waren aber ein beeinträchtigtes Wachstum zeigten, wurden sie mit dem BASTA resistenten pB7YWG2_*AtNAA20*-Konstrukt (Anhang 6.4C), welches ebenfalls für die Lokalisierungsbestimmung des *AtNAA20*:EYFP-Protein (Kapitel 3.3.2) benutzt wurde, stabil transformiert (Kapitel 2.3.7.1). Die Herstellung des pB7YWG2_*AtNAA20*-Konstrukts erfolgte wie im Kapitel 3.3.2 beschrieben. Die *naa20-1*/pB7YWG2_*AtNAA20*-Pflanzen wurden in der T1-Generation mittels BASTA-Selektion (Kapitel 2.3.2) und PCR-Analyse identifiziert. In der T3-Generation wurde der Wachstumsphänotyp von *naa20-1*/pB7YWG2_*AtNAA20*-Pflanzen dreier unabhängigen Linien im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen (Col-0) charakterisiert. Alle Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen angezogen (Tabelle 2.2). *naa20-1*/pB7YWG2_*AtNAA20*-Pflanzen der drei analysierten Linien wiesen keine Wachstumsunterschiede im Vergleich zu Col-0-Pflanzen auf, welche als Kontrolle verwendet wurden. Der Phänotyp von acht und neun Wochen alten homozygoten *naa20-1*-Pflanzen wurde vollständig komplementiert (Abbildung 3.33A, Bilder von Linie 1 und 3 nicht gezeigt). Die komplementierten *naa20-1*-Pflanzen der drei unabhängigen Linien zeigten auch keine Differenzen des Frisch- und Trockengewichts im Vergleich zu Col-0-Pflanzen, während homozygote *naa20-1*-Pflanzen erneut signifikante Gewichtsunterschiede aufwiesen (Abbildung 3.33B, C, Trockengewicht: Anhang 6.7C).

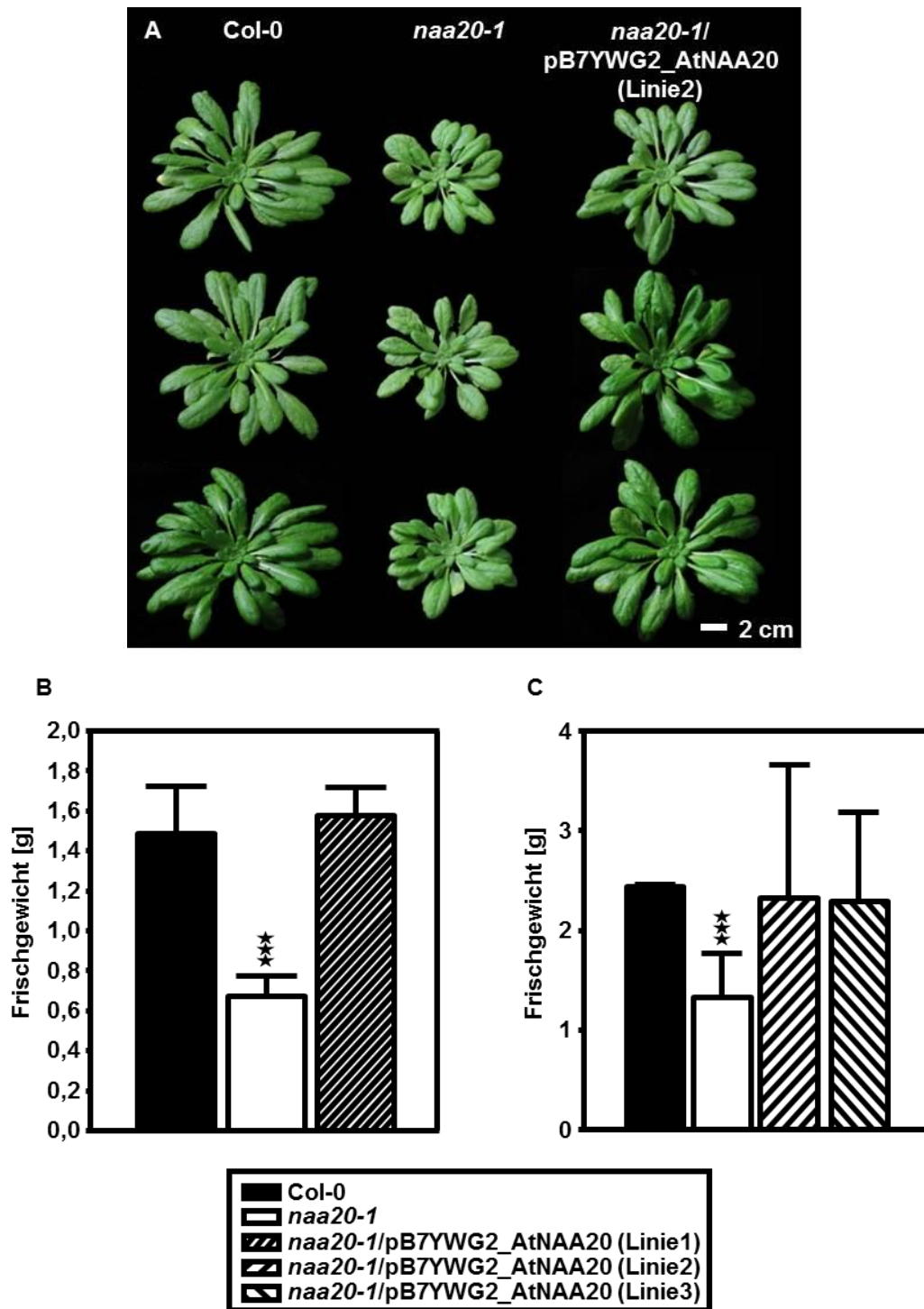


Abbildung 3.33 Komplementierung des *naa20*-Phänotyps mit AtNAA20p

Die Bilder zeigen neun Wochen alte, unter Kurztagbedingungen angezogene, repräsentative Wildtyp- (Col-0), homozygote *naa20-1*- und *naa20-1/pB7YWG2_AtNAA20*-Pflanzen der Linie 2 (A) und deren Frischgewicht (n=6) (C). Bilder der *naa20-1/pB7YWG2_AtNAA20*-Pflanzen der Linie 1 und 3 wurden nicht gezeigt, die Pflanzen entwickelten sich jedoch vergleichbar zu Col-0-Pflanzen. In B wurde das Frischgewicht acht Wochen alter *naa20-1/pB7YWG2_AtNAA20*-Pflanzen der Linie 1 (n=8) und in C das Frischgewicht neun Wochen alter *naa20-1/pB7YWG2_AtNAA20*-Pflanzen der Linie 3 (n=6) gezeigt. Die Darstellung erfolgte im Vergleich zu Col-0- und homozygoten *naa20-1*-Pflanzen. $P \leq 0.05 > 0.01^*$; $p \leq 0.01 > 0.001^{**}$; $p \leq 0.001^{***}$.

3.3.5 Identifizierung der AtNAA20-Substrate

Die NatB-Acetyltransferase acetyliert das N-terminale Methionin, wenn der darauf folgende Aminosäurerest ein Glutamat-, Asparaginsäure- oder Asparagin- ist. Die Spezifität der acetylierten Substrate ist zwischen Hefe und Menschen konserviert (Polevoda and Sherman, 2003a; Arnesen et al., 2009b). Um mögliche Zielproteine des putativen NatB-Komplexes bzw. der AtNAA20-Acetyltransferase zu identifizieren wurde das Gesamtproteinextrakt der Wildtyp- (Col-0) und der homozygoten *naa20-1*-Pflanzen mittels 2-D Gelelektrophorese (Kapitel 2.6.8) und *Nanoflow Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry* (nanoLC-MS/MS) (Kapitel 2.6.11) analysiert.

3.3.5.1 Identifizierung modifizierter Proteine in homozygoten *naa20-1*-Pflanzen

Die Identifizierung der NatB-Substrate in Hefe erfolgte unter anderem mittels 2-D Gelelektrophorese (Polevoda et al., 1999). In den entsprechenden Hefe-Deletionsmutanten wurde die fehlende Acetylierung der Proteine als basische Verschiebung in ihrem isoelektrischen Punkt (IEP) verifiziert. Das Gesamtproteinextrakt aus Blättern der homozygoten *naa20-1*- und Col-0-Pflanzen wurde für die 2-D Gel-Analyse extrahiert (Kapitel 2.6.8). Es wurden unabhängige biologische Replikate von jeweils zwei neun Wochen alten Col-0- und *naa20-1*-Pflanzen, die unter Kurztagbedingungen (Tabelle 2.2) angezogen wurden, analysiert. Um das Proteinmuster zwischen Col-0 und homozygoten *naa20-1*-Pflanzen zu vergleichen, wurden Proteine in der ersten Dimension entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt (IEP) aufgetrennt. Um möglichst viele Zielproteine der putativen AtNAA20-Acetyltransferase zu identifizieren, wurden Proteine in zwei pH-Bereichen, pH 5-8 und pH 3-6, analysiert. In der zweiten Dimension erfolgte das Auftrennen der Proteine entsprechend dem Molekulargewicht (Kapitel 2.6.7). Die aufgetrennten Proteine wurden mittels Silberfärbung visualisiert (Kapitel 2.6.9). Es wurden drei Proteine detektiert, welche eine basische Verschiebung in homozygoten *naa20-1*- im Vergleich zu Col-0-Pflanzen zeigten (Abbildung 3.34).

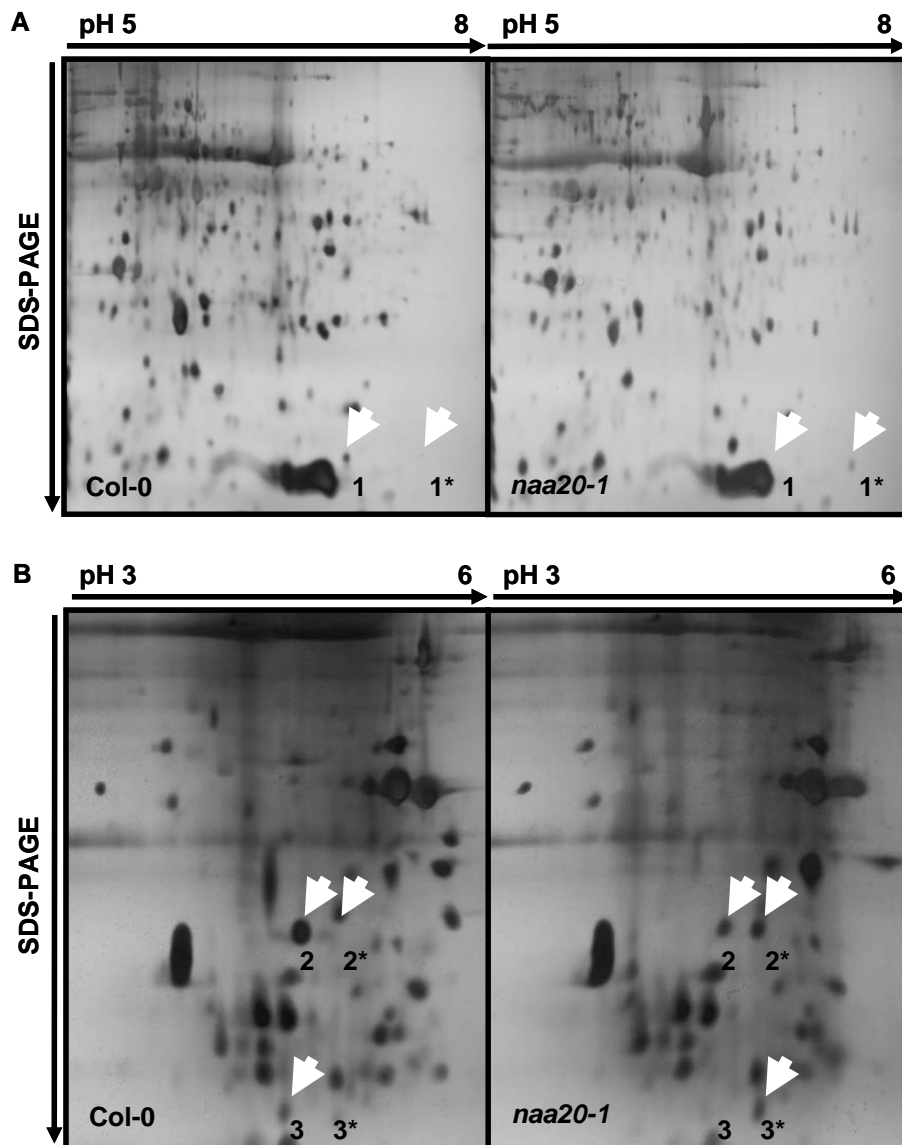


Abbildung 3.34 2-D Gel Analyse eines Gesamtproteinextrakts aus homozygoten *naa20-1*-Pflanzen

(A, B) Gesamtproteine aus neun Wochen alten, unter Kurztagbedingungen angezogenen Wildtyp- (Col-0) und homozygoten *naa20-1*-Pflanzen wurden mittels 2-D Gelelektrophorese separiert (jeweils ca. 80 µg). In der ersten Dimension wurden Proteine entsprechend ihrem IEP in zwei pH-Bereichen aufgetrennt: pH5-8 (A) und pH3-6 (B). Für jeden pH-Bereich wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt, die dieselben Ergebnisse ergaben (es wurden Daten jeweils von einem Versuch gezeigt). Das Auftrennen der Proteine in der zweiten Dimension erfolgte entsprechend dem Molekulargewicht. Visualisierung der aufgetrennten Proteine erfolgte mittels Silberfärbung. Mit den weißen Pfeilen wurden Proteinspots markiert, die bei der homozygoten *naa20-1*- eine basische Verschiebung im Vergleich zu Col-0-Pflanzen aufwiesen, was auf die fehlende Acetylierung hinweist.

Um die Proteine 1, 2 und 3 von Col-0 und die basisch verschobenen Proteine 1*, 2* und 3* der homozygoten *naa20-1*-Pflanzen zu identifizieren wurde eine massenspektrometrische Analyse in Kooperation mit Dr. Thomas Ruppert (ZMBH, Heidelberg) durchgeführt (Kapitel 2.6.11). Proteine 1 und 1* (Abbildung 3.34A)

wurden als *nucleoside diphosphate kinase 1* (At4g09320) identifiziert (Proteinsequenz: Anhang 6.1). Bei beiden Proteinen konnte kein N-Terminus detektiert werden. Proteine 2 und 2* (Abbildung 3.34B) wurden als At1g13930 identifiziert (Proteinsequenz: Anhang 6.1). Das unbekannte Protein zeigte bei Col-0-Pflanzen eine N-terminale Acetylierung, jedoch keine bei den homozygoten *naa20-1*-Pflanzen. Die Acetylierung des At1g13930-Proteins stimmt mit der vorhergesagten Substratspezifität des NatB-Komplexes in Hefe und Menschen (Kapitel 3.3.5) überein. Proteine 3 und 3* (Abbildung 3.34B) wurden als *membrane-associated progesterone binding* Protein (At2g24940) identifiziert (Proteinsequenz: Anhang 6.1). Ähnlich wie bei den Proteinen 1 und 1* konnte auch hier kein N-Terminus detektiert werden.

3.3.5.2 Identifizierung acetylierter Proteine in homozygoten *naa20-1*-Pflanzen

Es konnten mittels 2-D Gelelektrophorese lediglich drei basisch verschobene Proteine in homozygoten *naa20-1*- im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen (Col-0) gefunden werden (Kapitel 3.3.5.1). Aufgrund dessen wurde die Identifizierung der acetylierten Proteine aus einem Gesamtproteinextrakt (Kapitel 2.3.5) der homozygoten *naa20-1*-Pflanzen mittels *Nanoflow Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry* (nanoLC-MS/MS) (Kapitel 2.6.11) in Zusammenarbeit mit Fabian Hosp durchgeführt (Dept. Intracellular Signaling and Mass Spectrometry, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin). Es wurden jeweils drei technische Replikate von acht Wochen alten Col-0- und homozygoten *naa20-1*-Pflanzen unabhängig voneinander analysiert. Alle analysierten Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen angezogen (Tabelle 2.2). In dem Gesamtproteinextrakt der jeweiligen Replikate wurden von 27416 identifizierten Proteinen (www.arabidopsis.org) jeweils 6,4 % (1765), 6,9 % (1886) und 7,3 % (1989) der Proteine detektiert. In den Replikaten wurden 204, 312 und 553 N-terminale Acetylierungsstellen identifiziert. Bei den meisten identifizierten Proteinen liegt die Acetylierung sowohl bei Col-0- als auch bei homozygoten *naa20-1*-Pflanzen vor. Bei drei Proteinen, At3g52990, At2g21250.1, At3g59920, liegt die N-terminale Acetylierung in den Col-0-Pflanzen vor, jedoch nicht in den homozygoten *naa20-1*-Pflanzen (Abbildung 3.35). Zusätzlich wurde ein Protein detektiert, das bei den homozygoten *naa20-1*-Pflanzen N-terminale Acetylierung zeigte. Bei der Col-0-Pflanze wies das Protein keine NTA auf (Abbildung 3.35). Bei den anderen 18 Col-0-Proteinen

liegt die Acetylierung zwar vor, jedoch dieselben Proteine wurden in *naa20-1*-Mutanten nicht identifiziert (Abbildung 3.35), deswegen kann keine weitere Aussage getroffen werden.

Sequenz	Protein	Acetylierung in Col-0	Acetylierung in <i>naa20-1</i>
MDEEYEVIVLGTGLK	<u>RAB GDP dissociation inhibitor 2 (At3g59920)</u>	+	-
MEITLNSGFK	<u>NAD(P)-linked oxidoreductase domain-containing Protein (At2g21250.1)</u>	+	-
MHSSHLLLEPIR	<u>Pyruvate kinase (At3g52990)</u>	+	-
MDPQLTEVSQQFER	RPN12a (Regulatory Particle non-ATPase 12a)	?	+ (?)
MDATEQSLR	Isoform Mitochondrial of Glycyl-tRNA synthetase 1	+	?
MDGGAEGSQPHLILANK	Probable 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6	+	?
MDLEAEIR	T10F20.8 protein	+	?
MDSEIAVDCSPLLK	CXE12	+	?
MDSPFKPDVVR	Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	+	?
MDSPFKPDVVR	RD2	+	?
MEALVCR	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	+	?
MEGFLTDQQR	Putative uncharacterized protein F6I7.10	+	?
MEGIIVR	OTU-like cysteine protease family protein	+	?
MEGKEEDVR	Probable aquaporin PIP1-4	+	?

MEPHEAETFVNK	Proline iminopeptidase	+	?
MESAGIQQLAAER	V-type proton ATPase subunit G2	+	?
MESFPIINLEK	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	+	?
METPTMKPDTVLLIDYGSQ YTHLITR	GMP synthase (glutamine-hydrolyzing)	+	?
MEWIQSLPK	Putative adenosine deaminase	+	?
MHAPVLVLSDSLK	Chaperonin;F9D12.18 protein	+	?
M(ox)NSNLVGVFRER	DC1 domain-containing protein	+	?
MNTESVVEFLGNVPLLQK	Acyl-CoA thioesterase family protein	+	?

Abbildung 3.35 Potentielle Substrate der orthologen AtNAA20-Acetyltransferase

Die Gesamtproteinextrakte der acht Wochen alten, unter Kurztagbedingungen angezogenen Wildtyp- (Col-0) und homozygoten *naa20-1*-Pflanzen wurden mittels *Nanoflow Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry* analysiert. Es wurden jeweils drei technische Replikate durchgeführt. Es konnten drei Proteine, At3g59920, At2g21250.1 und At3g52990, gefunden werden, die ausschließlich bei Col-0-Pflanzen acetyliert vorliegen. Bei den homozygoten *naa20-1*-Pflanzen liegt bei derselben Proteinspezies keine Acetylierung vor. Die NTA der At3g59920 und At2g21250.1 Proteine stimmt mit der Substratspezifität des NatB-Komplexes in Hefe und Menschen überein (Kapitel 3.3.5). Das N-terminale Methionin ist ebenfalls bei At3g52990-Protein acetyliert, jedoch an zweiter Stelle befindet sich unerwartet ein Histidinrest. Die anderen oben genannten Proteine wurden zwar in Col-0-Pflanzen acetyliert gefunden aber sie konnten nicht in den homozygoten *naa20-1*-Pflanzen identifiziert werden. (+) Protein ist acetyliert, (-) Protein ist nicht acetyliert, (?) das Peptid wurde nicht gefunden, (+ (?)) das Protein wurde in allen Replikaten gefunden, jedoch nur in einem zeigte es N-terminale Acetylierung.

3.3.6 Komplementierung homozygoter *naa20-1*-Pflanzen durch Überexpression des *S. cerevisiae* Naa20-Orthologs

In diesem Versuch wurde überprüft, ob die orthologe Naa20-Acetyltransferase aus dem unizellulären niederen Eukaryonten *S. cerevisiae*, welche eine Substratspezifität für Met-Asn-, Met-Asp- und Met-Glu- aufweist (Polevoda and Sherman, 2003a; Arnesen et al., 2009b) den Phänotyp von homozygoten *naa20-1*-Pflanzen komplementieren kann. Aufgrund dessen wurden die homozygoten *naa20-1*-Pflanzen mit pB2GW7_ScNaa20-Konstrukt (Anhang 6.4C), dass die Expression des ScNaa20p unter Kontrolle des

CaMV 35S Promotors vermittelt, stabil transformiert (Kapitel 2.3.7.1). Dazu wurde die *ScNAA20* (*Ypr131cp*) kodierende Sequenz (Proteinsequenz: Anhang 6.1) von *S. cerevisiae* genomischer DNA mit den Primern 770 und 1113 (Anhang 6.3.3) amplifiziert und schließlich mittels Gateway-Klonierung (Kapitel 2.4.10.1) in den Expressionsvektor pB2GW7 kloniert. Die *naa20-1/pB2GW7_ScNaa20*-Pflanzen wurden in der T1-Generation mittels BASTA-Selektion (Kapitel 2.3.2) und PCR-Analyse identifiziert. In der T2-Generation wurden acht Wochen alte *naa20-1/pB2GW7_ScNaa20*-Pflanzen fünf unabhängiger Linien im Vergleich zu homozygoten *naa20-1-* und Wildtyp-Pflanzen (Col-0) charakterisiert. Alle Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen angezogen (Tabelle 2.2). Die mit pB2GW7_ScNaa20 transformierten *naa20-1*-Pflanzen zeigten denselben Phänotyp wie homozygoten *naa20-1*-Pflanzen (Abbildung 3.36A, Bilder von Linie 3, 4, 15 und 19 nicht gezeigt). Die *naa20-1/pB2GW7_ScNaa20*-Pflanzen wiesen ebenfalls signifikante Gewichtsdifferenzen im Frisch- und Trockengewicht im Vergleich zu Col-0-Pflanzen auf, jedoch keine im Vergleich zu homozygoten *naa20-1*-Pflanzen (Abbildung 3.36B; Trockengewicht: Anhang 6.7D). Um das *ScNAA20*-Transkript in den transformierten homozygoten *naa20-1*-Pflanzen nachzuweisen wurde eine semiquantitative Transkriptionsanalyse durchgeführt (Kapitel 2.4.1). Dazu wurde die RNA aus repräsentativen, acht Wochen alten *naa20-1/pB2GW7_ScNaa20*- sowie homozygoten *naa20-1-* und Col-0-Pflanzen extrahiert (Kapitel 2.3.4) und die cDNA synthetisiert (Kapitel 2.4.9). RNA der Col-0-Pflanze diente als Negativkontrolle. Anschließend wurde *ScNaa20* mit den genspezifischen Primern 1524 und 1539 (Anhang 6.3.2) amplifiziert. Bei allen analysierten *naa20-1/pB2GW7_ScNaa20*-Pflanzen wurde das *ScNAA20*-Transkript nachgewiesen (Abbildung 3.36C). Das konstitutiv exprimierte Transkript des Aktins wurde mit den Aktinspezifischen Primern 364 und 436 (Anhang 6.3.2) amplifiziert und zur Quantifizierung der *ScNAA20*-Transkriptmenge genutzt (Abbildung 3.36D). Die mit dem pB2GW7_ScNaa20 transformierten homozygoten *naa20-1*-Pflanzen wurden im Gegensatz zu den homozygoten *naa20-1-*-Pflanzen, welche mit dem pB7YWG2_AtNAA20 (Kapitel 3.3.4) transformiert wurden, nicht komplementiert. Dies kann bedeuten, dass die orthologen Naa20-Proteine aus *S. cerevisiae* und *A. thaliana* funktionell nicht identisch sind.

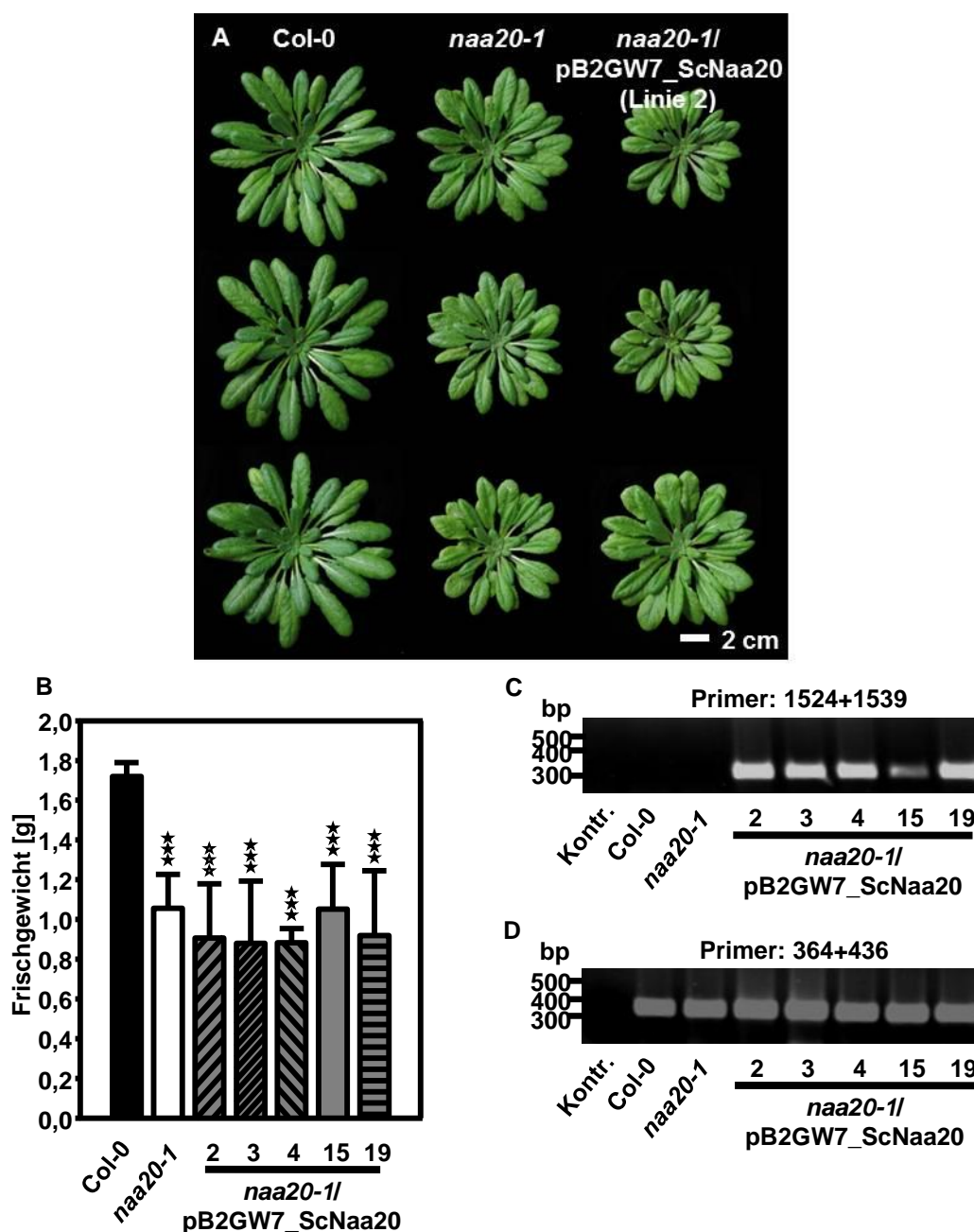


Abbildung 3.36 Wachstumsphänotyp von ScNaa20p exprimierenden homozygoten *naa20-1*-Pflanzen

(A) Die Bilder zeigen acht Wochen alte, unter Kurztagbedingungen angezogene, repräsentative Wildtyp- (Col-0), homozygote *naa20-1*- und *naa20-1/pB2GW7_ScNaa20*-Pflanzen der Linie 2. Bilder von den *naa20-1/pB2GW7_ScNaa20*-Pflanzen der Linie 3, 4, 15 und 19 wurden nicht gezeigt. Die Pflanzen entwickelten sich jedoch vergleichbar zu jenen der Linie 2. In B wurde das Frischgewicht von acht Wochen alten *naa20-1/pB2GW7_ScNaa20*-Pflanzen der fünf unabhängigen Linien im Vergleich zu Col-0- und homozygoten *naa20-1*-Pflanzen dargestellt (n=10-12). $P \leq 0.05 > 0.01^*$; $p \leq 0.01 > 0.001^{**}$; $p \leq 0.001^{***}$. (C, D) Die Transkription des *ScNaa20* (*Ypr131cp*) (C) und Aktins (*At5g09810*) (D) wurde in Blättern von unabhängigen *naa20-1/pB2GW7_ScNaa20*-Pflanzen der Linie 2, 3, 4, 15 und 19 durch semiquantitative RT-PCR untersucht. Die Col-0- und homozygoten *naa20-1*-Pflanzen wurden als Negativkontrolle verwendet. Das *ScNAA20*-Transkript wurde mit den Primern 1524 und 1539 (C) und das konstitutiv exprimierte Transkript des Aktins mit den Primern 364 und 436 (D) amplifiziert. Das *ScNAA20*-Transkript konnte in den transformierten homozygoten *naa20-1*-Pflanzen aller analysierten Linien nachgewiesen werden.

3.4 Identifizierung der katalytischen Untereinheit des NatE-Komplexes

Die katalytische Untereinheit des NatE-Komplexes wurde in Arabidopsis anhand des *Saccharomyces cerevisiae* Proteins Naa50 (Yor253wp) (Proteinsequenz: Anhang 6.1) mittels BLAST Algorithmus (TAIR BLASTP2.2.8, www.arabidopsis.org) identifiziert. Es konnte ein Protein, At5g11340, identifiziert werden, das eine höhere Homologie als andere Proteine zeigte (Anhang 6.2). Orthologe des AtNAA50p wurden genauso wie die Orthologe der AtNAA10p (Kapitel 3.1), AtNAA15p (Kapitel 3.2) und AtNAA20p (Kapitel 3.3) in Organismen wie *Oryza sativa* (76 % Identität zu Arabidopsis), *Glycine max* (79 %), *Chlamydomonas reinhardtii* (48 %), *Physcomitrella patens* (64 %), *Homo sapiens* (54 %), *Drosophila melanogaster* (54 %), *Ceanorhabditis elegans* (46 %), *Schizosaccharomyces pombe* (28 %), *Saccharomyces cerevisiae* (27 %), *Synechocystis sp. PCC6803* (27 %) gefunden (Abbildung 3.37).

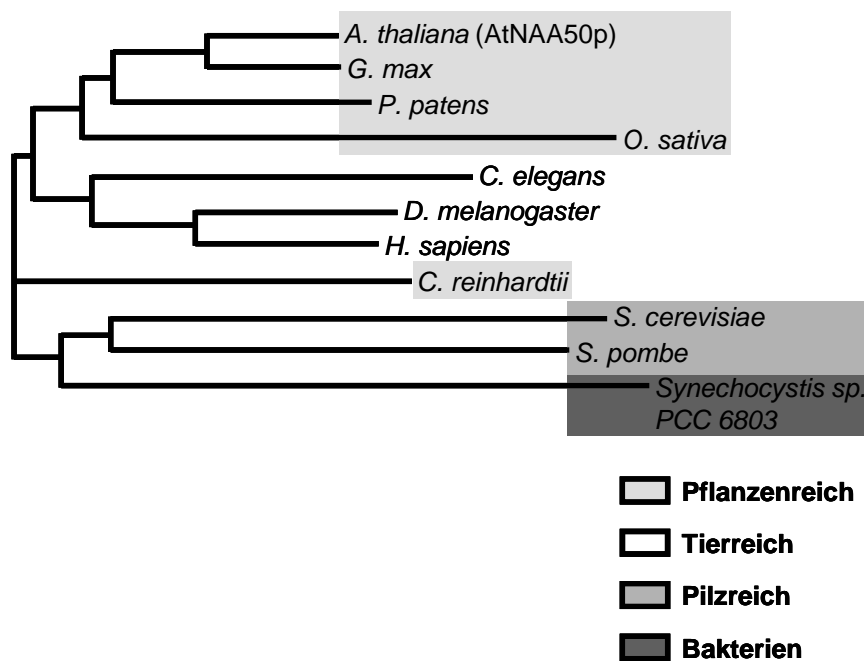


Abbildung 3.37 Die evolutionäre Verwandtschaft des AtNAA50p zu niederen und höheren Eukaryoten sowie Cyanobakterien

Die Abbildung zeigt die evolutionären Beziehungen des orthologen NAA50p aus dem Pflanzen-, Tier- und Pilzreich sowie Bakterien. Die Proteine wurden mit dem BLAST Algorithmus (TAIR BLASTP2.2.8, www.arabidopsis.org) verglichen. Die pflanzlichen Orthologe, *G. max* (02g47970), *P. patens* (XP_001762002.1) und *O. sativa* (Os01g0610400; NP_001043544.2), zeigen die höchste Identität mit dem AtNAA50p und bilden ebenso wie die Organismen aus dem Tierreich, *C. elegans* (NP_508553.1), *D. melanogaster* (NP_524779.1) und *H. sapiens* (NP_079422.1), jeweils einen Ast des Stammbaumes. *C. reinhardtii* (XP_001699802.1) zeigt deutlich niedrigere Identität im Vergleich zu den anderen pflanzlichen Orthologen und bildet mit ihnen keinen Ast des Stammbaumes. Die zwei Pilze *S. cerevisiae* (Yor253wp) und *S. pombe* (NP_588274.1) bilden zusammen mit *Synechocystis sp. PCC6803* (NP_441109.1) ebenfalls einen Ast des Stammbaumes.

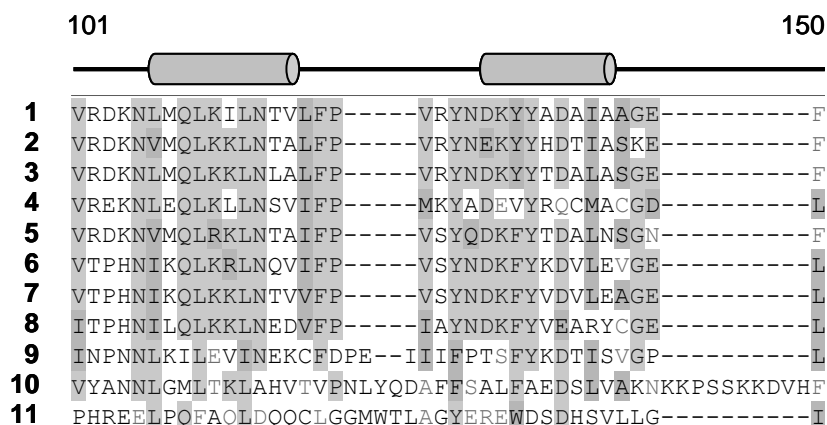
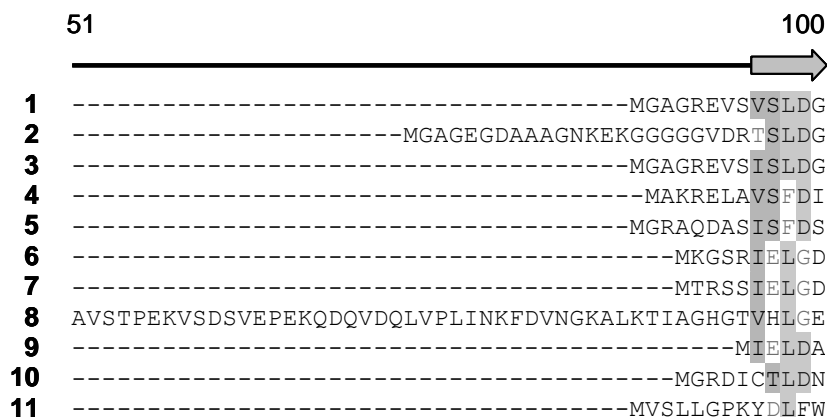
3.4.1 Biochemische Charakterisierung von AtNAA50p

Die biochemische Charakterisierung des AtNAA50p wurde durch Analyse der konservierten Domänen und Überexpression des rekombinanten AtNAA50p in *E.coli* durchgeführt.

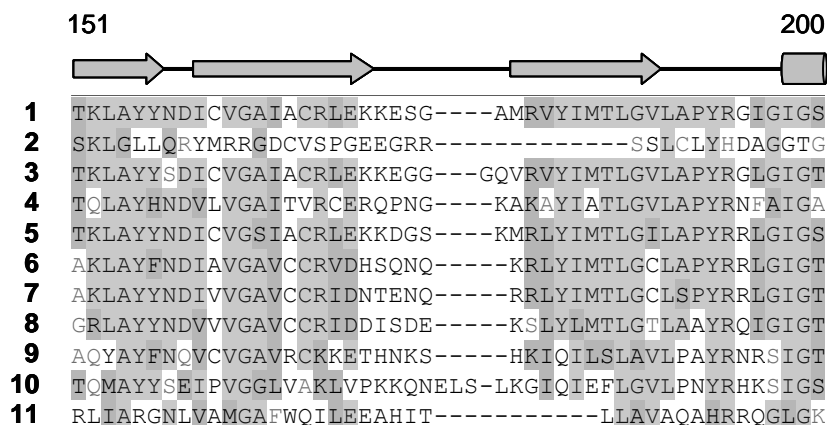
3.4.1.1 Charakterisierung der Proteinstruktur von AtNAA50p

Der Aminosäuresequenzvergleich der putativen als auch bereits bekannten NAA50-Acetyltransferasen wurde innerhalb verschiedener Eukaryoten und Prokaryoten durchgeführt. Das Arabidopsis NAA50p hat eine Länge von 164 Aminosäuren und zeigt eine hohe Sequenzidentität mit Proteinen aus dem Pflanzen-, Pilz- und Tierreich sowie Bakterien (Abbildung 3.37 und Abbildung 3.38). AtNAA50p enthält wie AtNAA10 (Kapitel 3.1.1.1) und AtNAA20 Proteine (Kapitel 3.3.1.1) vier konservierte Motive (A-D), welche für die GNAT-Superfamilie repräsentativ sind (Kapitel 3.1.3) (Neuwald and Landsman, 1997; Dyda et al., 2000). Interessanterweise weist das Naa50p von *O. sativa* (Abbildung 3.38; 2) am C-Terminus eine verkürzte Sequenz im Vergleich zu anderen Blütenpflanzen wie *A. thaliana* (Abbildung 3.38; 1) und *G. max* (Abbildung 3.38; 3) auf. Der Aminosäuresequenzvergleich zeigt auch einen N-terminalen Einschub in der Proteinsequenz von *C. elegans* (Abbildung 3.38; 8) gegenüber den anderen orthologen NAA50-Proteinen. Die Sekundärstruktur des AtNAA50p wurde mit dem Programm PSIPRED (www.bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred) vorausgesagt. Das AtNAA50p scheint aus sieben α -Helixen und vier β -Schleifen zu bestehen.

	1	50
1	-----	
2	-----	
3	-----	
4	-----	
5	-----	
6	-----	
7	-----	
8	MNDQQTNNESDHTMSKSAKKRAKKQQQKRASESNDEKNSPTKSDAENTE	
9	-----	
10	-----	
11	-----	



Motiv C



Motiv D

Motiv A

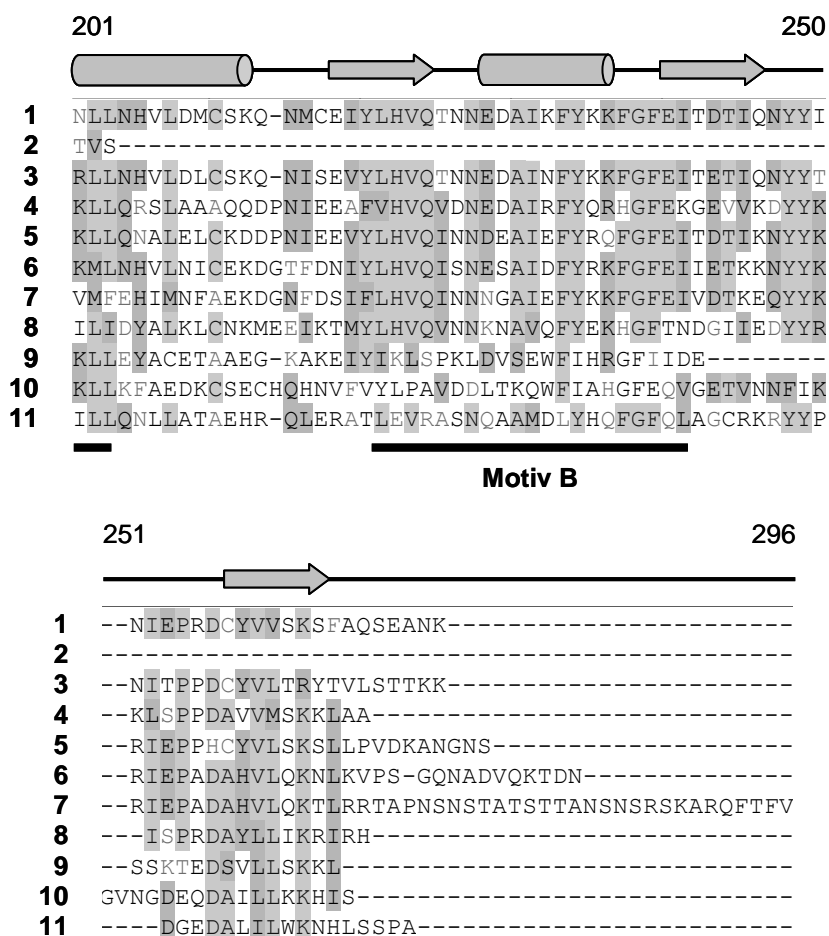


Abbildung 3.38 Proteinsequenzvergleich zwischen orthologen NAA50-Proteinen

Die Abbildung zeigt den Proteinsequenzvergleich zwischen *A. thaliana* (At5g11340), *O. sativa* (Os01g0610400; NP_001043544.2), *G. max* (02g47970), *C. reinhardtii* (XP_001699802.1), *P. patens* (XP_001762002.1), *H. sapiens* (NP_079422.1), *D. melanogaster* (NP_524779.1), *C. elegans* (NP_508553.1), *S. pombe* (NP_588274.1), *S. cerevisiae* (Yor253wp) und *Synechocystis sp.* PCC6803 (NP_441109.1). Der Aminosäuresequenzvergleich wurde mit dem Programm Vector NTI 9 (AlignX) durchgeführt und die konservierten Aminosäuren wurden als graue Felder markiert. Die Sekundärstruktur wurde mittels PSIPRED vorausgesagt und oberhalb der Proteinsequenz dargestellt: β -Schleifen wurden als Pfeile und α -Helices als Zylinder markiert. Die konservierten Motive, A, B, C und D, der GNAT-Superfamilie (Neuwald and Landsman, 1997) wurden unterhalb der Proteinsequenz gezeigt.

3.4.1.2 Überexpression und Aufreinigung des rekombinanten AtNAA50p

Der kodierende Bereich der cDNA für das AtNAA50p (Proteinsequenz: Anhang 6.1) wurde vom Klon U22744 (www.arabidopsis.org) mit den Primern 754 und 778 (Anhang 6.3.3) amplifiziert und mittels Gateway-Klonierung (Kapitel 2.4.10.1) in den Expressionsvektor pETG10a mit einem N-terminalen 6 \times His-Fusion-Tag kloniert (Expressionskonstrukt: Anhang 6.4D). Das Protein wurde in *E. coli* HMS 174 exprimiert und mittels *Immobilized Metal Affinity Chromatography* aus Proteinextrakten

aufgereinigt (Kapitel 2.6.1.1). Die Reinheit der Proteine wurde durch Auftrennung mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.6.7) und anschließender Coomassie-Färbung (Kapitel 2.6.9) überprüft. Im Rohextrakt wurden zwei überexprimierte Proteine detektiert. Ein bei ca. 22 kDa, was etwa dem voraussagten Molekulargewicht des His:NAA50p von 20,6 kDa entspricht und ein zweites Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 18 kDa, was möglicherweise ein Abbauprodukt darstellt (Abbildung 3.39; 1). Beide Proteine konnten mittels massenspektrometrischer Analyse als NAA50p identifiziert werden (Kapitel 3.4.1.3). Die an der Säule gebundenen Proteine konnten zum Teil bereits mit 80 mM Imidazol eluiert werden (Abbildung 3.39; 3). Die meisten Proteine wurden jedoch mit 400 mM Imidazol von der Säule eluiert (Abbildung 3.39; 4-6). Aus der Gesamtproteinmenge von ca. 8,4 mg konnte man bis zu 5 mg His:NAA50p aufreinigen, was mehrere unabhängige Aufreinigungen belegten. Aufgrund der benötigten Proteinmenge sowie der Proteinreinheit wurde mit dem rekombinanten His:NAA50p ein *in vitro* N^a-Acetyltransferase-Aktivitätstest durchgeführt (Kapitel 3.4.2).

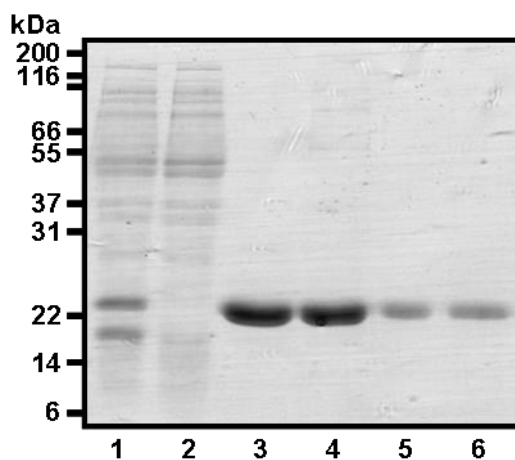


Abbildung 3.39 Aufreinigung von AtNAA50p mittels *Immobilized Metal Affinity Chromatography*

Die Proteinfractionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung visualisiert. Die Aufreinigung wurde aus 300 ml Kulturvolumen nach einer 4-stündigen Induktion bei 37 °C und 220 rpm durchgeführt. (1) Rohextrakt [ca. 10 µg], (2) Durchfluss [ca. 10 µg], (3) Das 10-malige Waschen erfolgte mit 80 mM Imidazol. Die Abbildung zeigt die zehnte Waschfraktion [ca. 10 µg]. (4-6) Die Proteine wurden mit 6 ml 400 mM Imidazol von der Säule eluiert. Die Abbildung zeigt die ersten drei Elutionsfraktionen: (4) [10 µg], (5 und 6) [3 µg].

3.4.1.3 Verifizierung der Tertiärstruktur von AtNAA50p

Um die Tertiärstruktur des His:NAA50p (Kapitel 3.4.1.2) zu klären wurde eine Größenausschluss-Chromatographie durchgeführt (Kapitel 2.6.4). Es wurden zwei unterschiedliche Mengen, ca. 2 und ca. 1 mg, des His:NAA50p auf die HiLoad16/60 Superdex 200 prepgrade Säule aufgetragen. Das Chromatogramm des His:NAA50p enthielt fünf (Abbildung 3.40A) bzw. vier (Abbildung 3.40C) Maxima, deren Molekulargewichte anhand der Kalibrierungskurve berechnet wurden (Kapitel 2.6.4). Maximum II entspricht einem Molekulargewicht von etwa 165 kDa, Maximum III von ca. 101,9 kDa und Maximum IV von etwa 22,3 kDa (Abbildung 3.40A). Durch die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.6.7) und anschließender Coomassie-Färbung (Kapitel 2.6.9) konnten zwei Banden detektiert werden, eine bei etwa 22 kDa, was etwa dem voraussagten Molekulargewicht des His:NAA50p von 20,6 kDa entspricht sowie eine zweite bei einem Molekulargewicht von ca. 18 kDa (Abbildung 3.39 und Abbildung 3.40B). Beide Proteine wurden mittels massenspektrometrischer Analyse (Kapitel 2.6.11) als NAA50p identifiziert. Die Größenausschluss-Chromatographie aus ca. 2 mg Protein ergab, dass His:NAA50p zum Teil als Octamer (Peak II), Pentamer (Peak III), jedoch hauptsächlich als Monomer (60 %) (Peak IV) vorliegt (Abbildung 3.40A). Eine Größenausschluss-Chromatographie von ca. 1 mg His:NAA50p erbrachte, in drei unabhängigen Experimenten, nahezu das gleiche Ergebnis. Maximum II entspricht einem Molekulargewicht von etwa 96,6 kDa, Maximum III von etwa 21,3 kDa. (Abbildung 3.40C). Peak I entspricht dem Ausschlußvolumen (Abbildung 3.40A, C). Peak V (Abbildung 3.40A) und Peak IV (Abbildung 3.40C) weisen aufgrund des kleinen Molekulargewichts von jeweils ca. 8,9 und 6,2 kDa auf Salze hin. Der immunologische Nachweis der Proteine in den Elutionsfraktionen erfolgte mit Hilfe des NAA50-Antikörpers. Die größte Menge des His:NAA50p wurde in den Elutionsfraktionen detektiert, die dem Peak III entsprachen. In den Elutionsfraktionen, die Peak IV entsprachen, wurde kein His:NAA50p detektiert (Abbildung 3.40D). Die Größenausschluss-Chromatographie aus ca. 1 mg Protein ergab, dass His:NAA50p nahezu ausschließlich als Monomer (80 %) (Peak IV) vorliegt (Abbildung 3.40C). Die Analyse der Tertiärstruktur mit zwei verschiedenen Mengen des His:NAA50p *in vitro* zeigt, dass das His:NAA50p hauptsächlich als Monomer

vorliegt. Des Weiteren wäre es erforderlich die Ergebnisse durch die Analyse der Tertiärstruktur *in vivo* zu verifizieren.

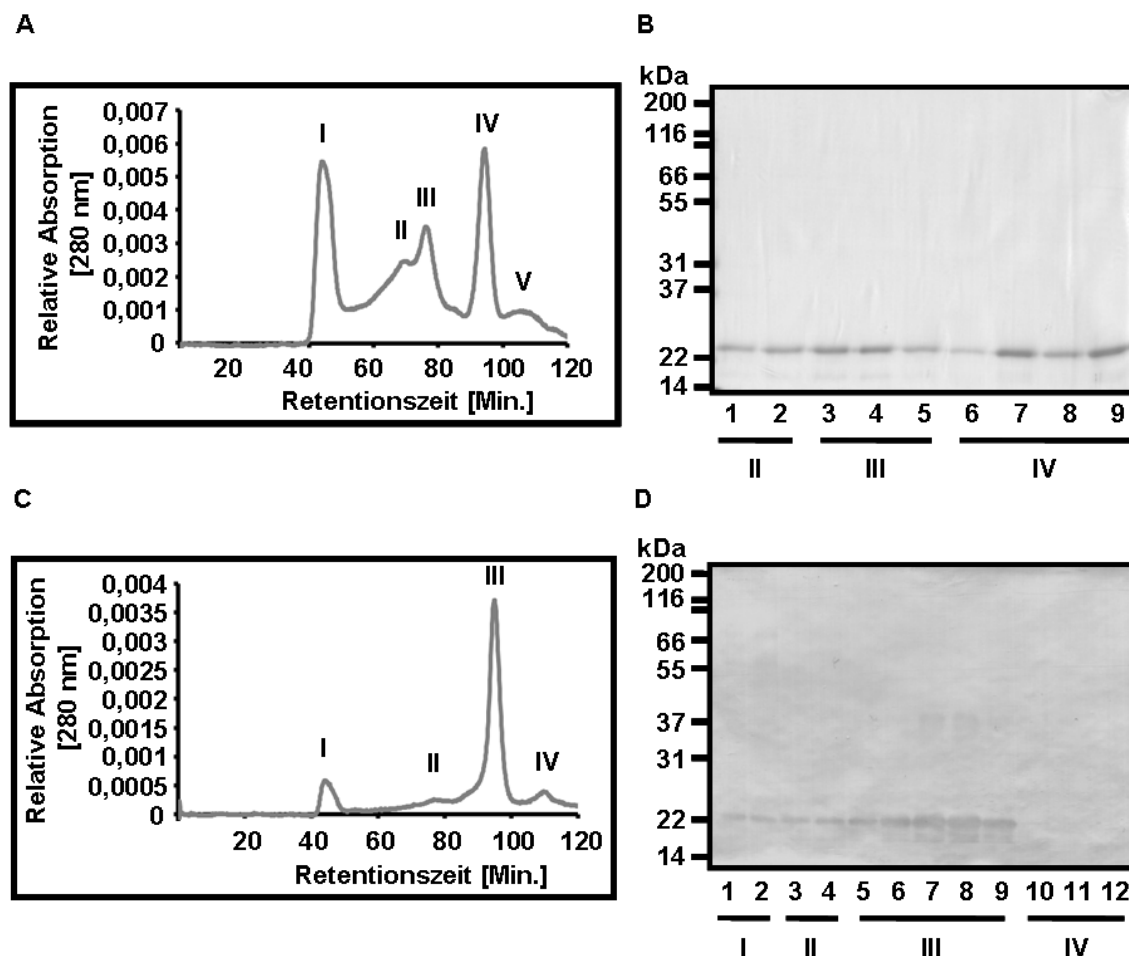


Abbildung 3.40 Größenausschluss-Chromatographie von His:NAA50p

(A, C) Die Abbildung zeigt ein Größenausschluss-Chromatogramm des His:NAA50p. Es wurden (A) 2,3 mg und (C) 1 mg His:NAA50p auf die Säule aufgetragen. Die Flussrate während der Chromatographie lag bei 1 ml/Min. und die Sensitivität bei 0,001. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 280 nm. Das Eluat wurde in 2 ml-Fractionen gesammelt. In B ist die SDS-PAGE-Analyse der Elutionsfraktionen und anschließende Coomassie-Färbung gezeigt. Die Elutionsfraktionen 68-71 (Peak II) entsprechen den Spuren 1-2, 76-81 (Peak III) den Spuren 3-5, und 90-97 (Peak IV) den Spuren 6-9. In D wurden die SDS-PAGE und anschließende *Western Blot*-Analyse gezeigt. Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgte mit Hilfe des NAA50-Antikörpers. Die Elutionsfraktionen 46-49 (Peak I) entsprechen den Spuren 1-2, 77-80 (Peak II) den Spuren 3-4, 97-100 (Peak III) den Spuren 5-9 und die Elutionsfraktionen 109-114 (Peak IV) den Spuren 10-12. Die Größenausschluss-Chromatographie ergab, dass His:NAA50p hauptsächlich als Monomer vorliegt, wobei die Tertiärstruktur des Fusionsproteins von der Konzentration abhängig erscheint.

3.4.2 *In vitro* N^α-Acetyltransferase-Aktivitätstest von His:NAA50p

Die Naa50-Proteine in Hefe und Menschen gehören zu den am besten charakterisierten Arabidopsis NAA50-Orthologen (Gautschi et al., 2003; Arnesen et al., 2006b). Trotzdem

sind Hefe-Proteine, die durch Naa50p acetyliert werden nicht bekannt. Die menschliche Naa50-Acetyltransferase acetyliert das N-terminale Methionin bei nachfolgenden Leucin-, Alanin- und Methionin- (Evjenth et al., 2009b; Van Damme et al., 2011). Um zu überprüfen, ob das AtNAA50p über eine N^α-Acetyltransferaseaktivität verfügt, wurde zwei Mal unabhängig voneinander ein *in vitro* N^α-Acetyltransferase-Aktivitätstest (Kapitel 2.6.12) mit dem rekombinanten His:NAA50p (Kapitel 2.6.1.1) sowie ADGK-RRR und MLGT-RRR Peptiden durchgeführt. Die Aktivität wurde im Scintillationszähler anhand der gebundenen Menge von [acetyl-3H]-AcCoA, jeweils nach 15, 30, 60 und 120 Minuten nachgemessen. Das ADGK-Peptid wurde als Negativkontrolle benutzt und wies dementsprechend keine Aktivität auf (Abbildung 3.41). Für das MLGT-Peptid konnte eine Aktivität gemessen werden, welche bei dem ersten Test etwa 33 nmol/mg nach 15 Minuten und ca. 56 nmol/mg nach 30 Minuten betrug (Abbildung 3.41A). Der zweite Test zeigte eine vergleichbare Aktivität von ca. 70 nmol/mg sowohl nach 15 als auch nach 30 Minuten (Abbildung 3.41B). Die Acetyltransferaseaktivität nahm während beider Tests nach 30 Minuten ab (Daten nicht gezeigt). Die Spezifität der N-terminal acetylierten NAA50-Substrate scheint in Pflanzen bzw. *A. thaliana* und Menschen konserviert zu sein.

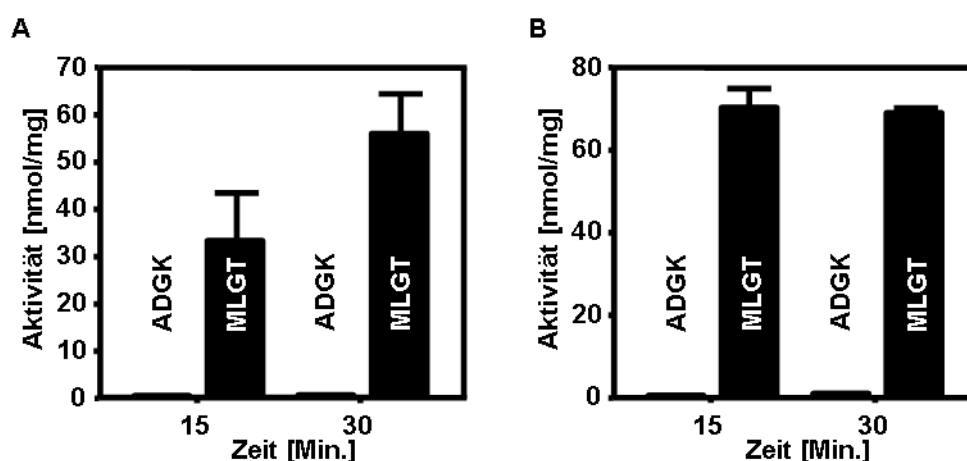


Abbildung 3.41 N^α-Acetyltransferaseaktivität des Arabidopsis His:NAA50p

Die Aktivität des His:NAA50p wurde im Scintillationszähler anhand der gebundenen Menge von [acetyl-3H]-AcCoA nachgemessen. Die zwei Aktivitätstests fanden unabhängig voneinander und mit jeweils frisch aufgereinigtem NAA50-Enzym statt. Für die erste Aktivitätsmessung wurde 4,18 (A) und für die zweite 4,78 µg (B) His:NAA50p eingesetzt. Die ADGK-Peptide wurden als Negativkontrolle verwendet. AtNAA50 acetyliert *in vitro* die N-terminale Methioninreste auf welche Leucin folgt (Daten gemeinsam mit Dr. M. Wirtz).

3.4.3 Subzelluläre Lokalisierung von AtNAA50p in *Nicotiana spec.*

Um zu überprüfen in welchem subzellulären Kompartiment das Arabidopsis NAA50p lokalisiert ist, wurde AtNAA50p mit EYFP fusioniert und in *Nicotiana spec.* exprimiert. Das Naa50-Ortholog aus Hefe (Polevoda et. al., 2008) und Menschen (Arnesen et al., 2006b) ist im Cytosol lokalisiert. Das HsNaa50p wird zudem im Zellkern exprimiert (Arnesen et al., 2006b). Die für die Gateway-Klonierung (Kapitel 2.4.10.1) benutzte *AtNAA50* kodierende cDNA (Kapitel 3.4.1.2) wurde mit Gateway-kompatiblen Primern 754 und 755 (Anhang 6.3.3) mittels PCR amplifiziert. Das hergestellte pK7YWG2_AtNAA50-Konstrukt (Anhang 6.4D), welches die Expression des NAA50:EYFP-Proteins unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors vermittelt, wurde in Epidermiszellen von *Nicotiana tabacum* und *Nicotiana benthamiana* durch Agrobakterieninfiltration transformiert (Kapitel 2.3.7.2). Die heterologe Lokalisierung mit fluoreszenzmarkiertem AtNAA50p wurde mittels *confocal laser scanning microscopy* (CLSM) durchgeführt (Kapitel 2.7). Das Protein wird im Cytosol und Zellkern sowohl in *N. tabacum* (Anhang 6.5D) als auch in *N. benthamiana* exprimiert (Abbildung 3.42).

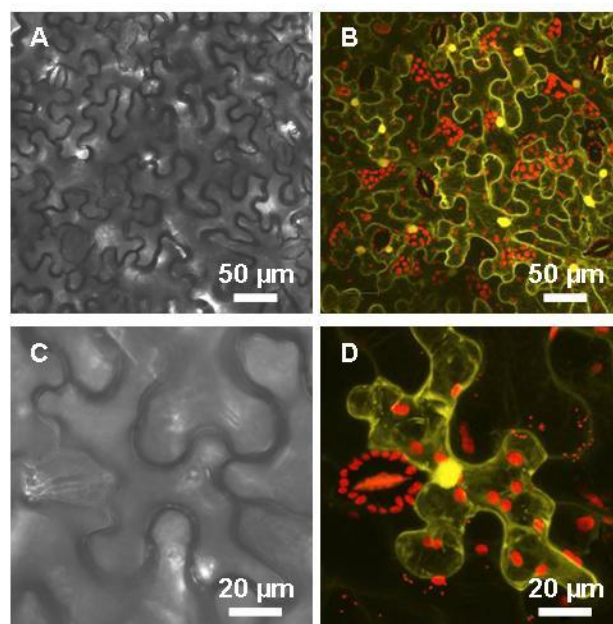


Abbildung 3.42 Lokalisierung des AtNAA50:EYFP-Fusionsproteins in *N. benthamiana*

Die Abbildungen zeigen eine *in vivo* Lokalisationsstudie von AtNAA50:EYFP im Blatt von *N. benthamiana*. Die transiente Expression von AtNAA50:EYFP wurde mittels CLSM drei Tage nach Agrobakterieninfiltration analysiert. (A, C) Durchlichtbilder, (B, D) die Detektion der EYFP-Fluoreszenz wurde gelb, die Autofluoreszenz von Plastiden rot dargestellt. Das AtNAA50:EYFP wird im Cytosol und im Zellkern exprimiert.

3.4.4 *In vivo* Charakterisierung der *naa50-1* und *naa50-2* T-DNA-Insertionslinien

Obwohl das Naa50p in Hefe mit dem NatA-Komplex interagiert, zeigen die *Scnaa50*-Deletionsmutanten keinen Phänotyp im Gegensatz zu *Scnaa10*- (Kapitel 3.1.4) und *Scnaa15*-Mutanten (Kapitel 3.2.3) (Gautschi et al., 2003; Polevoda et al., 2008). Die Bedeutung der N-terminalen Acetylierung durch den NatE-Komplex, bzw. NAA50p in Arabidopsis sollte genauso wie bei dem NatA- und NatB-Komplex *in vivo* mittels T-DNA-Insertionslinien analysiert werden (Tabelle 2.1). Mit Hilfe der Datenbank der T-DNA-Insertionslinien (www.arabidopsis.org) wurden zwei unabhängige Linien *naa50-1* und *naa50-2* identifiziert, welche das *single copy* Gen *At5g11340* betreffen. Beide T-DNA-Insertionslinien entstammten der SAIL-Sammlung (*naa50-1*: SAIL_1210_AO2 und *naa50-2*: SAIL_1186_AO3). Die T-DNA-Insertionsstellen im *At5g11340*-Gen wurden durch die Sequenzierung der *naa50-1* und *naa50-2* PCR-Produkte mittels *left border* Primer verifiziert. Die Insertionsstelle der *naa50-1*-Linie wurde im zweiten Intron und der *naa50-2*-Linie am Ende des ersten Introns, jeweils 1468 und 1159 bp unterhalb vom Start-Kodon lokalisiert (Abbildung 3.43).

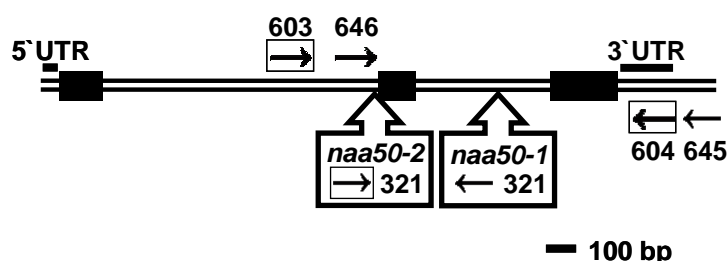


Abbildung 3.43 Struktur des *AtNAA50*-Gens (*At5g11340*) mit zwei unabhängigen T-DNA-Insertionen

Exons wurden als schwarze Boxen, Primer zur Charakterisierung der *naa50-1* und *naa50-2* T-DNA-Insertionslinien jeweils als schwarze Pfeile und schwarze Pfeile in Boxen markiert. Die Insertionsstellen der T-DNA wurden als Flächenpfeile dargestellt.

3.4.4.1 Molekulare Charakterisierung der *naa50-1* und *naa50-2* T-DNA-Insertionslinien

Die Genotypisierung der 47 potentiellen *naa50-1*- sowie 31 *naa50-2*-Mutanten, welche auf Erde unter Kurztagbedingungen (Kapitel 2.3.1.1) angezogen wurden, wies keine homozygoten Pflanzen auf. Es konnten 39 heterozygote- und acht Wildtyp-Pflanzen der *naa50-1* T-DNA-Insertionslinie sowie 29 heterozygote- und zwei Wildtyp-Pflanzen der

naa50-2 T-DNA-Insertionslinie identifiziert werden. Aus diesem Grund wurde genauso wie bei den heterozygoten *naa10-* (Kapitel 3.1.4.1) und *naa15*-Pflanzen (Kapitel 3.2.3.1) die Keimungsrate der heterozygoten *naa50-1-* und *naa50-2*-Pflanzen bestimmt. Letztendlich konnten für *naa50-1* und *naa50-2* T-DNA-Insertionslinien im Gegensatz zu *naa10* und *naa15* T-DNA-Insertionslinien homozygote Pflanzen gefunden werden. Von 61 ausgesäten Samen der heterozygoten *naa50-1-* und 244 Samen der heterozygoten *naa50-2*-Pflanzen zeigten jeweils 13 (21, 3 %) und 52 (21,3 %) einen auffällig kleinen Phänotyp (Abbildung 3.44E, F). Die repräsentativ kleinen Keimlinge beider T-DNA-Insertionslinien wurden mittels PCR als homozygote Pflanzen charakterisiert (Abbildung 3.44A-D). Für die Genotypisierung beider T-DNA-Insertionslinien wurden zwei Kombinationen von Primern (Abbildung 3.43; Anhang 6.3.1) generiert. Die Verifizierung der *naa50-1* T-DNA-Insertion erfolgte mit einem genspezifischen Primer (646) und mit einem Primer, der an die linke Flanke der T-DNA-Insertion bindet (321) (Abbildung 3.44A). Für den Nachweis des Wildtyp-Allels wurden genspezifische Primer (646 und 645) verwendet (Abbildung 3.44B). Die *naa50-2* T-DNA-Insertion wurde ebenfalls mit einem genspezifischen Primer (604) und mit einem Primer, der an die linke Flanke der T-DNA-Insertion bindet (321) verifiziert (Abbildung 3.44C). Der Nachweis des Wildtyp Allels erfolgte mit genspezifischen Primern (604 und 603) (Abbildung 3.44D).

Um die Anzahl der Insertion im *At5g11340*-Gen zu überprüfen wurde das Segregationsmusters analysiert. In drei unabhängigen Versuchen wurden heterozygote Pflanzen beider T-DNA-Insertionslinien mit BASTA selektiert (Kapitel 2.3.2). Wildtyp-Pflanzen wurden als Negativkontrolle verwendet. Von den 145 heterozygoten *naa50-1-* Pflanzen starben nach der Selektion keine Pflanzen ab, was mehrere Insertionen im Genom der *naa50-1*-Mutanten andeutet. Von den 153 selektierten heterozygoten *naa50-2*-Pflanzen starben 53 ab. Dies entspricht einer Resistenzverteilung von 65,4 % resistenten zu 34,6 % nicht resistenten-Pflanzen. Die PCR-Analyse zusammen mit dem Keimungsexperiment der Pflanzen beider T-DNA-Insertionslinien lässt darauf schließen, dass lediglich Wildtyp-, heterozygote *naa50-1-* und *naa50-2*-Pflanzen mit BASTA selektiert wurden. Das Ergebnis der PCR und Selektionsanalyse und des Keimungsexperiments mit einem annähernden Verhältnis von 3:1 deuten eine einzelne Insertion im Genom der *naa50-2*-Mutanten an.

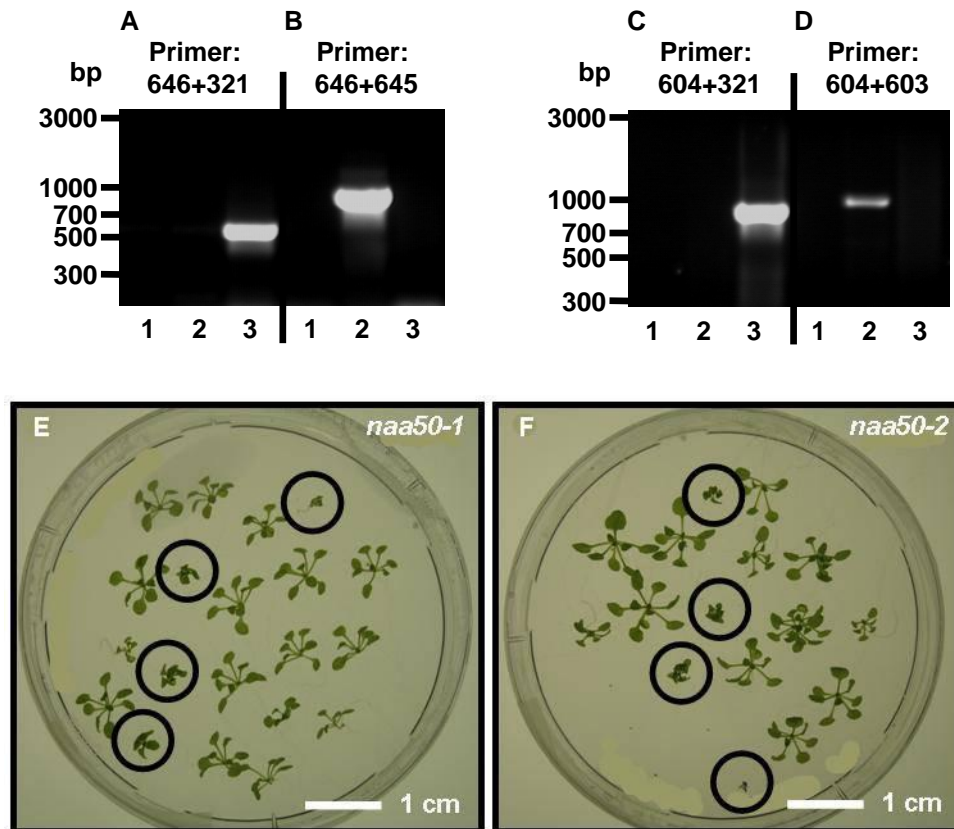


Abbildung 3.44 Zygotebestimmung von *naa50-1*- und *naa50-2*-Mutanten

Die Genotypisierung der *naa50-1*- (A, B) und *naa50-2*-Mutanten (C, D) wurde mittels PCR mit zwei Kombinationen von Primern durchgeführt. Die Verifizierung der *naa50-1* T-DNA-Insertion im *AtNAA50*-Gen erfolgte mit genspezifischem Primer (646) und *left border* Primer (321) (A). Die des Wildtyp-Allels mit genspezifischen Primern (646 und 645) (B). (1) Negativkontrolle mit H₂O, (2) genomischer DNA von Wildtyp-Pflanze, (3) genomischer DNA von einer *naa50-1*-Pflanze. Die *naa50-2* T-DNA-Insertion wurde mit genspezifischem Primer (604) und *left border* Primer (321) (C) und das Wildtyp-Allel mit genspezifischen Primern (604 und 603) (D) nachgewiesen. (1) Negativkontrolle mit H₂O, (2) genomischer DNA von Wildtyp-Pflanze, (3) genomischer DNA von einer *naa50-2*-Pflanze. Das Wildtyp-Allel konnte mit beiden Kombinationen der genspezifischen Primern nicht amplifiziert werden, was auf homozygote Pflanzen hinweist. Samen einer heterozygoten *naa50-1*- (E) und *naa50-2*-Pflanze (F) wurden auf AT-Medium ohne Selektionsmarker (Kapitel 2.3.1.2) ausgesät. Etwa 21 % der drei Wochen alten Pflanzen, die unter Kurztagbedingungen angezogen wurden zeigten einen auffälligen Phänotyp, welche mit schwarzen Kreisen markiert wurde. Die winzigen Keimlinge wurden mittels PCR als homozygote *naa50-1*- (A-B) und *naa50-2*-Pflanzen (C-D) verifiziert.

3.4.4.2 Semiquantitative Transkriptionsanalyse homozygoter *naa50-1*- und *naa50-2*-Pflanzen

Zur semiquantitativen Transkriptionsanalyse wurde Gesamt-RNA aus jeweils 40 und 50 zusammengemischten, fünf Wochen alten, unter Kurztagbedingungen angezogen (Tabelle 2.2) homozygoten *naa50-1*- und *naa50-2*- sowie zwei unabhängigen Wildtyp-Pflanzen (Col-0) extrahiert (Kapitel 2.3.4) und die cDNA synthetisiert (Kapitel 2.4.9).

AtNAA50 wurde mit zwei Kombinationen genspezifischer Primer amplifiziert (Abbildung 3.45A, B; Anhang 6.3.2). Die erste Kombination genspezifischer Primer 1000 und 1001 wurde so ausgewählt, dass sich die Insertionsstelle der *naa50-1*- und *naa50-2*-Mutanten zwischen den Primern befindet. Das *NAA50*-Transkript in homozygoten *naa50-1*- und *naa50-2*-Pflanzen konnte im Gegensatz zu Col-0-Pflanzen, die als Positivkontrolle verwendet wurden, nicht amplifiziert werden (Abbildung 3.45A). Die zweite Kombination genspezifischer Primer 1250 und 1251 bindet vor der Insertionsstelle beider Mutanten. In diesem Fall war die *NAA50*-Transkriptmenge der homozygoten *naa50-1*- und *naa50-2*-Pflanzen vergleichbar mit einer der Col-0 Pflanzen (Abbildung 3.45B).

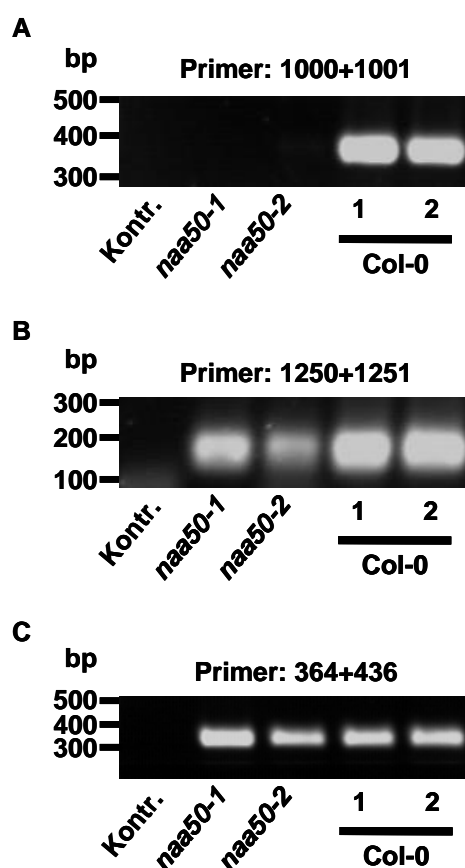


Abbildung 3.45 Semiquantitative RT-PCR-Analyse homozygoter *naa50-1*- und *naa50-2*-Pflanzen

Die Transkription des *AtNAA50* (*At5g11340*) (A, B) und Aktingens (*At5g09810*) (C) wurde in Blättern von jeweils 40 und 50 zusammengemischten homozygoten *naa50-1*-, *naa50-2*-Pflanzen sowie zwei unabhängigen Wildtyp-Pflanzen (Col-0) durch semiquantitative RT-PCR untersucht. Alle analysierten Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen angezogen. Das *AtNAA50*-Transkript wurde mit zwei Kombinationen genspezifischer Primer: 1000 und 1001 (A) sowie 1250 und 1251 (B) amplifiziert. Das konstitutiv exprimierte Transkript des Aktingens wurde mit den Primern 364 und 436 (C) amplifiziert. Das Volllänge *NAA50*-Transkript (A) konnte weder in homozygoten *naa50-1*- noch in *naa50-2*-Pflanzen nachgewiesen werden.

Beide Versuche mit unterschiedlich ausgewählten Primer lassen darauf schließen, dass nur ein Teil des *NAA50*-Transkript, jedoch kein Volllänge-Transkript in den homozygoten *naa50-1*- und *naa50-2*-Pflanzen gebildet wird. Das konstitutiv exprimierte Transkript des Aktins wurde mit Aktinspezifischen Primern 364 und 436 (Anhang 6.3.2) amplifiziert und zur Quantifizierung der *AtNAA50*-Transkriptmenge genutzt (Abbildung 3.45C). Das Ergebnis der semiquantitativen Transkriptionsanalyse zeigt, dass das beeinträchtigte Wachstum der homozygoten *naa50*-Pflanzen beider T-DNA-Insertionslinien auf die fehlende *NAA50*-Aktivität zurückzuführen ist.

3.4.4.3 Wachstum homozygoter *naa50-1*- und *naa50-2*-Pflanzen

Die drei Wochen alten, homozygoten *naa50-1*- und *naa50-2*-Pflanzen weisen ein stark beeinträchtigt Wachstum auf (Abbildung 3.44E, F). Um zu überprüfen, ob der Phänotyp ebenfalls nach der Beendigung des Wachstums sowie am Ende der Vegetationsphase bestehend bleibt wurden homozygote Pflanzen beider T-DNA-Insertionslinien in der siebten (Abbildung 3.46A) und ca. 15. Woche (Abbildung 3.46B) charakterisiert. Alle Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen (Tabelle 2.2) auf AT-Medium ohne Selektionsmarker (Kapitel 2.3.1.2) ausgesät und nach zwei Wochen auf Erde umgesetzt. Nach acht Wochen wurden sie weiter unter Langtagbedingungen kultiviert (Tabelle 2.2). Die homozygoten *naa50-1*- und *naa50-2*-Pflanzen zeigten während der gesamten Entwicklung ein sehr stark beeinträchtigt Wachstum. Wenige Ausnahmen der homozygoten *naa50-1*- und *naa50-2*-Pflanzen blühten (Abbildung 3.46B) und bildeten Schoten, jedoch keine der homozygoten Pflanzen waren fähig Saatgut hervorzubringen.

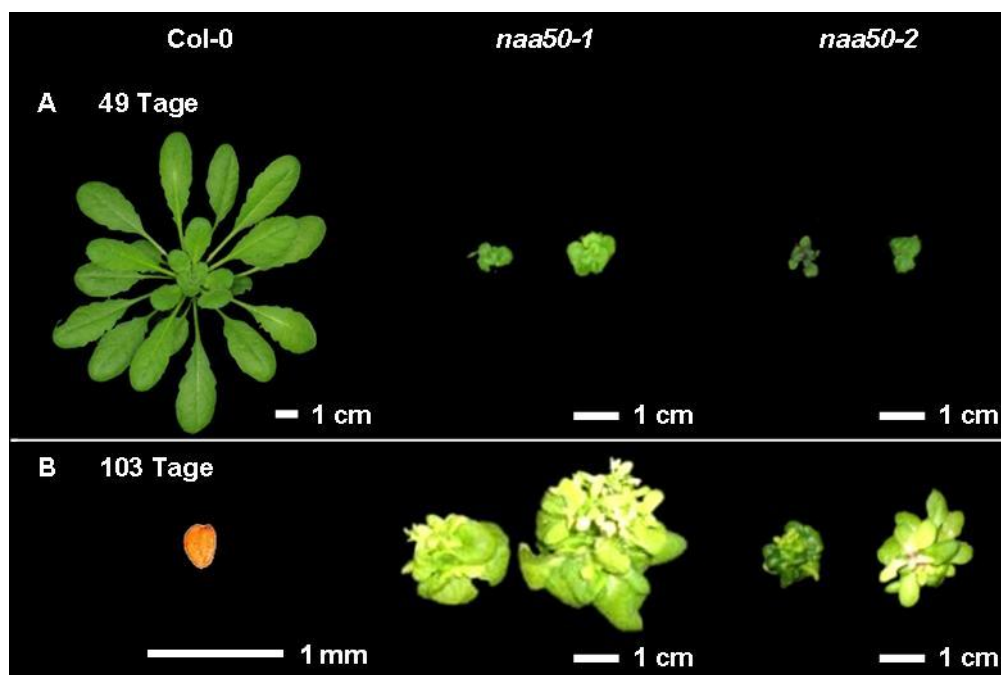


Abbildung 3.46 Wachstumsphänotyp homozygoter *naa50-1*- und *naa50-2*-Pflanzen

Die Bilder zeigen den Wachstumsphänotyp von sieben (A) und ca. 15 Wochen (B) alten homozygoten *naa50-1*- und *naa50-2*-Pflanzen im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Pflanzen (Col-0). Alle Pflanzen wurden acht Wochen unter Kurztagbedingungen und anschließend unter Langtagbedingungen kultiviert. Die homozygoten *naa50-1*- und *naa50-2*-Pflanzen weisen während der vegetativen und generativen Phase einen hervorstechenden Phänotyp im Vergleich zu Col-0-Pflanzen auf.

3.4.5 Komplementierung heterozygoter *naa50-2*-Pflanzen durch Überexpression von endogenem NAA50p

Die homozygoten *naa50-2*-Pflanzen weisen einen starken Phänotyp im Vergleich zu Col-0-Pflanzen auf (Abbildung 3.44F und Abbildung 3.46). Die semiquantitative Transkriptionsanalyse zeigt, dass der Phänotyp der homozygoten *naa50*-Pflanzen durch die T-DNA-Insertion im *NAA50*-Gen hervorgerufen wurde (Kapitel 3.4.4.2). Aufgrund dessen wurden heterozygote *naa50-2*-Pflanzen mit pK2GW7_AtNAA50-Konstrukt (Anhang 6.4D) stabil transformiert (Kapitel 2.3.7.1), welches die Expression des AtNAA50p unter Kontrolle des des CaMV 35S Promotors vermittelt. Die AtNAA50 kodierende cDNA wurde mit Gateway-kompatiblen Primern 754 und 778 (Anhang 6.3.3) amplifiziert (Kapitel 3.4.1.2) und letztendlich in den Kanamycin-resistenten Expressionsvektor pK2GW7 kloniert. In der T1-Generation wurden zehn homozygote *naa50-2*/pK2GW7_AtNAA50-Pflanzen mittels einer Selektionsanalyse auf AT-Medium mit Kanamycin (Kapitel 2.3.2) und anschließender PCR-Analyse identifiziert.

Von den zehn homozygoten *naa50-2/pK2GW7_AtNAA50*-Pflanzen hatten lediglich vier keine Probleme bei der Samenbildung, was möglicherweise auf die Infektion in der Kammer zurückzuführen war. In der T2-Generation wurden neun Wochen alte unter Kurztagbedingungen angezogene (Tabelle 2.2) homozygote *naa50-2/pK2GW7_AtNAA50*-Pflanzen drei unabhängiger Linien, 2, 7 und 13, im Vergleich zu Col-0- und homozygoten *naa50-2*-Pflanzen charakterisiert. Die homozygoten *naa50-2/pK2GW7_AtNAA50*-Pflanzen der Linie 7 und 13 entwickelten sich vergleichbar wie Col-0-Pflanzen (Abbildung 3.47A; Bilder von Pflanzen der Linie 2 und 13 nicht gezeigt). Von den komplementierten Pflanzen der drei unabhängigen Linien wurde ebenfalls das Frisch- und Trockengewicht im Vergleich zu Col-0- und homozygoten *naa50-2*-Pflanzen bestimmt. Pflanzen der zwei komplementierten Linien, 7 und 13, (Abbildung 3.47B: Linie 13 und Abbildung 3.47C: Linie 7) wiesen keine signifikante Gewichtsunterschiede im Vergleich zu Col-0-Pflanzen auf (Trockengewicht: Anhang 6.7E). Obwohl das Frisch- und Trockengewicht von den komplementierten Pflanzen der Linie 2 einen signifikanten Unterschied zu Col-0-Pflanzen aufwies (Abbildung 3.47B), sahen die homozygoten *naa50-2/pK2GW7_AtNAA50*-Pflanzen vielmehr dem Col-0-Pflanzen als den *naa50-2*-Mutanten ähnlich. Die meisten komplementierten Pflanzen der drei unabhängigen Linien waren im Gegensatz zu homozygoten *naa50-2*-Pflanzen fähig in der generativen Phase Samen zu bilden.

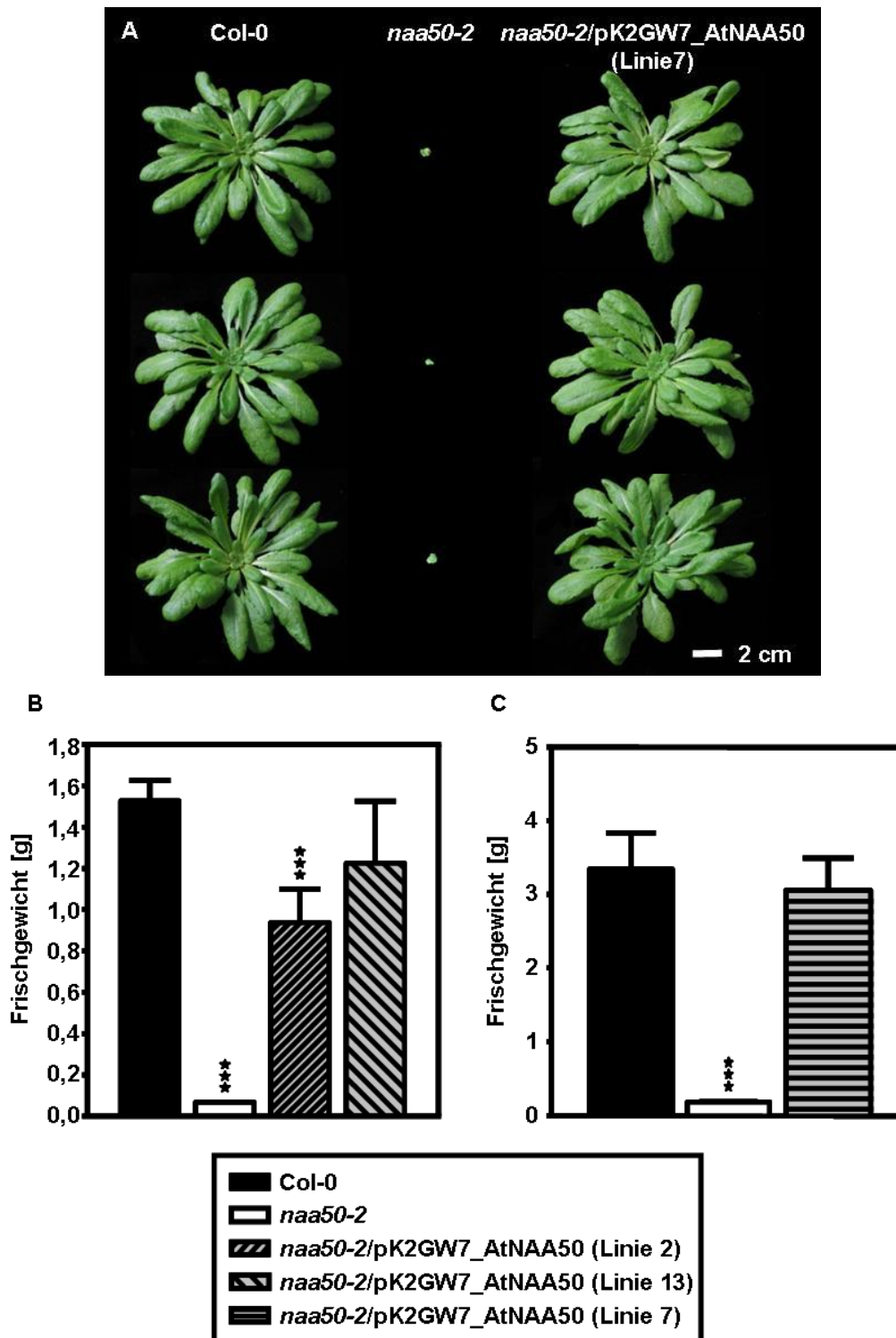


Abbildung 3.47 Komplementierung des *naa50*-Phänotyps mit AtNAA50p

Die Bilder zeigen neun Wochen alte unter Kurztagbedingungen angezogene, repräsentative Wildtyp- (Col-0), homozygote *naa50-2*- und *naa50-2/pK2GW7_AtNAA50*-Pflanzen der Linie 7 (A) und deren Frischgewicht (C). Bilder von den *naa50-2/pK2GW7_AtNAA50*-Pflanzen der Linie 2 und 13 wurden nicht gezeigt. Die Pflanzen zeigten jedoch denselben Phänotyp wie die der Linie 7. In B wurde das Frischgewicht von neun Wochen alten *naa50-2/pK2GW7_AtNAA50*-Pflanzen der Linie 2 und 13 (n=8) im Vergleich zu Col-0- (n=8) und homozygoten *naa20-1*-Pflanzen (n=12) dargestellt. $P \leq 0.05 > 0.01^*$; $p \leq 0.01 > 0.001^{**}$; $p \leq 0.001^{***}$.

3.4.6 Komplementierung heterozygoter *naa50-2*-Pflanzen durch Überexpression des *H. sapiens* Naa50-Orthologs

Um zu überprüfen, ob das HsNaa50p, welches ähnliche Substratspezifität wie AtNAA50p aufweist (Kapitel 3.4.2) (Evjenth et al., 2009b; Van Dame et al., 2011) den Phänotyp homozygoter *naa50-2*-Pflanzen komplementieren kann, wurde eine stabile Transformation (Kapitel 2.3.7.1) mit pK2GW7_HsNaa50-Konstrukt (Anhang 6.4D) im Hintergrund von heterozygoten *naa50-2*-Pflanzen durchgeführt. Dazu wurde der *HsNAA50* kodierende Bereich (*NP_079422.1*) von menschlicher cDNA (Proteinsequenz: Anhang 6.1) mit den Primern 776 und 777 (Anhang 6.3.3) amplifiziert und schlussendlich mittels Gateway-Klonierung (Kapitel 2.4.10.1) in den BASTA resistenten Expressionsvektor pK2GW7 kloniert. Die Expression vom HsNaa50p erfolgte unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors. In der T1-Generation wurden mittels einer Selektionsanalyse auf AT-Medium mit Kanamycin (Kapitel 2.3.2) und anschließender PCR-Analyse eine heterozygote und eine homozygote *naa50-2/pK2GW7_HsNaa50*-Pflanze identifiziert. In der T2-Generation wurden 64 acht Wochen alte Nachkommen der heterozygoten *naa50-2/pK2GW7_HsNaa50*-Pflanze mittels PCR-Analyse analysiert. Es konnten 21 (32,8%) homozygote *naa50-2/pK2GW7_HsNaa50*-Pflanzen identifiziert werden, deren Wachstum in der vegetativen Phase sich vielmehr dem der Wildtyp- (Col-0) als der homozygoten *naa50-2*-Pflanzen näherte (Abbildung 3.48A). Alle Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen angezogen und nach acht Wochen unter Langtagbedingungen kultiviert (Tabelle 2.2). In der 15. Woche bildeten homozygoten *naa50-2/pK2GW7_HsNaa50*-Pflanzen einen vergleichbaren, keinen oder einen kurzen Sproß im Vergleich zu Col-0-Pflanzen. Ein Teil der Transformanten bildete einen Sproß mit mehreren Hauptstängel (Abbildung 3.48C). Die homozygoten *naa50-2/pK2GW7_HsNaa50*-Pflanzen waren im Gegensatz zu Col-0-Pflanzen nicht fähig in der generativen Phase Samen zu bilden. *naa50-2/pK2GW7_HsNaa50*-Pflanzen zeigten signifikante Gewichtsunterschiede im Frisch- und Trockengewicht sowohl im Vergleich zu Col-0- als auch zu homozygoten *naa50-2*-Pflanzen (Abbildung 3.48B; Trockengewicht: Anhang 6.7F). Eine in der T1-Generation identifizierte homozygote *naa50-2/pK2GW7_HsNaa50*-Pflanze bildete in der generativen Phase zwei funktionsfähige Samen, deren Pollen analysiert wurden (Kapitel 3.4.6.1).

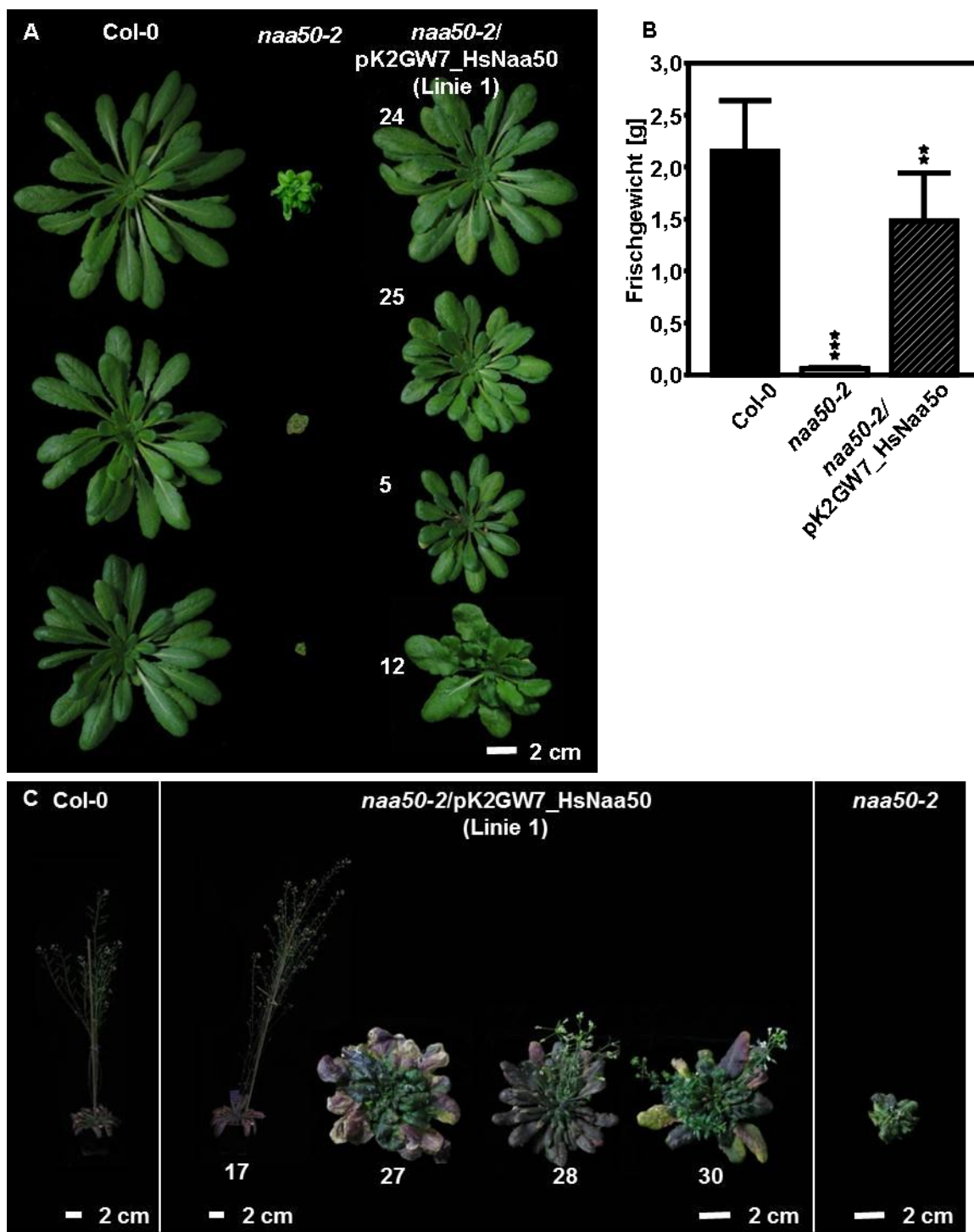


Abbildung 3.48 Komplementierung heterozygoter *naa50-2*-Pflanzen mit dem orthologen Naa50p aus Menschen

Die Bilder zeigen acht (A) und 15 Wochen (C) alte Wildtyp- (Col-0), homozygote *naa50-2*- und *naa50-2/pK2GW7_HsNaa50*-Pflanzen der Linie 1. Bilder von den *naa50-2/pK2GW7_HsNaa50*-Pflanzen der Linie 2 wurden nicht gezeigt. Die Pflanzen entwickelten sich jedoch vergleichbar wie die der Linie 1. In B wurde das Frischgewicht von acht Wochen alten *naa50-2/pK2GW7_HsNaa50*-Pflanzen der Linie 1 im Vergleich zu Col-0- und homozygoten *naa50-2*-Pflanzen dargestellt (n=6-8). Alle Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen angezogen und nach acht Wochen weiter unter Langtagbedingungen kultiviert. $P \leq 0.05 > 0.01^*$; $p \leq 0.01 > 0.001^{**}$; $p \leq 0.001^{***}$.

3.4.6.1 Pollenvitalität von HsNaa50p exprimierenden homozygoten *naa50-2*-Pflanzen

Da die HsNaa50p exprimierenden homozygote *naa50-2*-Pflanzen sehr selten fähig waren Samen zu bilden (Kapitel 3.4.6), wurde die Lebensfähigkeit deren Pollen überprüft. Es wurden zwölf Wochen alte Blüten der homozygoten *naa50-2/pK2GW7_HsNaa50*-Pflanze der Linie 2 in der T2-Generation im Vergleich zu gleichaltrigen Blüten der Wildtyp-Pflanze (Col-0) mittels Alexander-Färbung (Kapitel 2.3.8) analysiert. Zwischen 50 und 75 % Pollen der homozygoten *naa50-2/pK2GW7_HsNaa50*-Pflanze waren nicht lebensfähig und lagen als Tetraden vor (Abbildung 3.49), welche häufig an den Antheren befestigt waren (Daten nicht gezeigt). Alle Pollen der Col-0-Pflanze waren dagegen lebensfähig und kamen als einzelne Pollenkörner vor (Abbildung 3.49).

Die *naa50-2*-Linie (SAIL_1186_AO3) (Tabelle 2.1) (www.arabidopsis.org) gehört zu den Quartett-Mutanten (*qrt*), dessen Pollen als Tetraden vorliegen (Preuss et al., 1998). Dies würde die Tatsache erklären wieso die Pollen der HsNaa50p exprimierenden *naa50*-Mutanten ebenfalls als Tetraden vorlagen. Die Pollen der homozygoten *naa50-2*-Pflanzen konnten nicht analysiert werden, weil nur eine homozygote Pflanze geblüht hat und dementsprechend für das Saatgut vorgesehen wurde. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass sie an den Antheren verankert sind und dadurch Schwierigkeiten bei der Befruchtung haben, da das Segregationsmuster der *naa50-2*-Linie mit den Erwartungen für einen rezessiven Erbgang nach Mendel übereinstimmt (Abbildung 3.44).

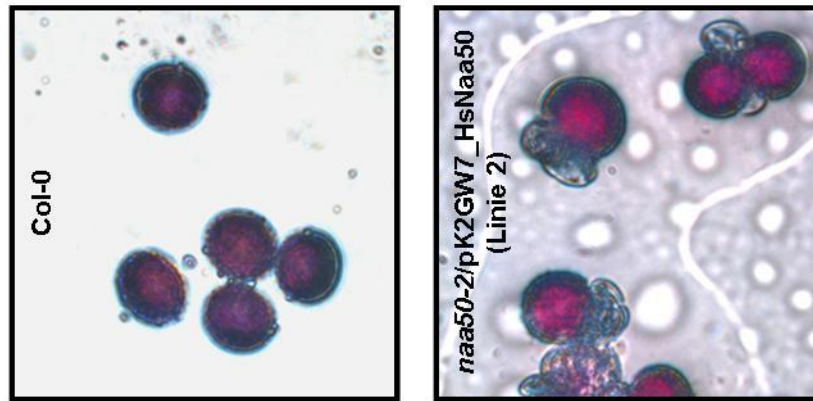


Abbildung 3.49 Lebensfähigkeit der Pollen von HsNaa50p exprimierenden *naa50-2*-Mutanten

Die Pollen der homozygoten *naa50-2/pK2GW7_HsNaa50*-Pflanzen wurden im Vergleich zu Pollen der Col-0-Pflanze mittels Alexander-Färbung analysiert. Das Protoplasma wurde durch saures Fuchsin und die Zellulose innerhalb der Zellwand durch Malachitgrün gefärbt, darum wurden lebensfähige Pollen rot und nicht lebensfähige grün dargestellt.

4 Diskussion

Im Jahr 1958 wurde das erste N-terminal acetylierte Polypeptid im Tabakmosaikvirus nachgewiesen (Narita, 1958). Seitdem wurden fünf Nat-Komplexe (NatA, NatB, NatC, NatD und NatE) in *Saccharomyces cerevisiae* und *Homo sapiens* identifiziert (Tabelle 1.1) (Arnesen et al., 2009b). In höheren Pflanzen wurde bisher ausschließlich der NatC-Komplex in der Modelnpflanze *Arabidopsis thaliana* teilweise charakterisiert (Pesaresi et al., 2003). Der zunehmende Anteil acetylierter Proteine im Proteom von Prokaryoten (ca. 20 %) über niedere (< 50 %) bis zu höheren Eukaryoten (< 80 %) deutet auf eine immer wichtigere funktionelle Bedeutung N-terminaler Acetylierung von Proteinen während der Evolution hin (Polevoda and Sherman, 2003a; Falb et al., 2006; Miao et al., 2007; Martinez et al., 2008; Arnesen et al., 2009b). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Identifizierung und Charakterisierung der orthologen AtNAA10, AtNAA15, AtNAA20 und AtNAA50 Proteine. Die Bedeutung der NTA in *Arabidopsis* wurde *in vivo* mittels T-DNA-Insertionslinien analysiert. Dies zusammen mit den massenspektrometrischen Daten N-terminaler Modifikationen in *Arabidopsis* (Martinez et al., 2008) deutet die Konservierung der NTA nicht nur in Hefe und Menschen, sondern auch in Pflanzen an.

4.1 Charakterisierung des NatA-Komplexes in *Arabidopsis*

In Hefe und Menschen interagieren Naa10p und Naa15p miteinander und bilden den NatA-Komplex (Park and Szostak, 1992; Arnesen et al., 2005b), der eine N^α-Acetyltransferaseaktivität aufweist (Mullen et al., 1989; Arnesen et al., 2005b). Im *Arabidopsis*-Proteom konnten orthologe NAA10 (At5g13780) und NAA15 (At1g80410) Proteine identifiziert werden, die eine höhere Sequenzidentität mit *H. sapiens* gegenüber dem niederen Eukaryoten *S. cerevisiae* aufweisen (67 % im Vergleich zu 44 % mit ScNaa10p und 41 % zu 30 % mit ScNaa15p) (Kapitel 3.1 und Kapitel 3.2). AtNAA10p enthält vier konservierte Motive (A-D) (Abbildung 3.2), die für alle katalytischen Untereinheiten der GNAT-Superfamilie repräsentativ sind (Neuwald and Landsman, 1997; Vetting et al., 2005b). Die Anker-Untereinheiten der Nat-Komplexe enthalten ebenfalls charakteristische Motive, die als *tetratricopeptide repeat* (TPR) bezeichnet sind. AtNAA15p besitzt ähnlich wie die orthologen Naa15-Proteine in Hefe (Gendron et al., 2000; Choi et al., 2001; Fluge et al., 2002) und

Menschen (Arnesen et al., 2005b) die TPR-Domänen (Abbildung 3.15), welche beispielsweise Protein-Protein-Interaktion ermöglichen. Zwischen Hefe und Menschen gibt es jedoch bestimmte strukturelle Unterschiede der orthologen katalytischen Untereinheiten des NatA-Komplexes. In Hefe ist der C-Terminus (Park and Szostak, 1992) und in Menschen dagegen der N-Terminus (Arnesen et al., 2005b) des Naa10p für die Interaktion mit dem Naa15p verantwortlich. Aufgrund der höheren Sequenzidentität von AtNAA10p mit dem menschlichen Ortholog (Kapitel 3.1) ist die N^α-Acetylierung in Pflanzen wahrscheinlich eher mit dem menschlichen System vergleichbar. Dies wird auch durch die erfolgreiche Komplementierung der heterozygoten *naa50-2*-Pflanzen in der vegetativen Phase durch die Expression des HsNaa50p gestützt (Kapitel 3.4.6). In der Aminosäuresequenz des pflanzlichen und menschlichen Naa10-Orthologs sind dennoch einige strukturelle Unterschiede bemerkenswert. Das HsNaa10p zeigt einen Einschub in dem C-terminalen Proteinsequenzbereich und viele potentielle Phosphorylierungsstellen im Gegensatz zu Arabidopsis sowie auch Hefe (Abbildung 3.2) (Arnesen et al., 2005b). In *A. thaliana*, *O. sativa* und *G. max* kann man dagegen wiederholte Histidin-Motive am C-terminalen Ende der NAA10p erkennen (Abbildung 3.2).

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das AtNAA10p eine Acetyltransferaseaktivität besitzt (Kapitel 3.1.2). Bisher wurde jedoch keine ausführliche Analyse der Substratspezifität des AtNatA-Komplexes bzw. der AtNAA10-Acetyltransferase durchgeführt. Da AtNAA10p genauso wie die ScNaa10p und HsNaa10p das Serin acetyliert, deuten die bisherigen Ergebnisse auf eine vergleichbare Substratspezifität der pflanzlichen NatA-Acetyltransferase mit den entsprechenden Orthologen in Hefe und Mensch hin (Polevoda and Sherman, 2003a; Arnesen et al., 2009b). Interessanterweise wurde ebenfalls gezeigt, dass die orthologen NatA-Komplexe bzw. Naa10-Acetyltransferasen aus Hefe und Menschen funktionelle Unterschiede aufweisen. Die NTA durch den NatA-Komplex in Menschen findet nicht nur co-translational sondern auch post-translational statt. Die post-translationale Acetylierung des Aktins ist überraschenderweise auch durch freie Naa10p katalysiert (Van Damme et al., 2011). In Hefe hingegen scheint die post-translationale Acetylierung durch den NatA-Komplex eher unwahrscheinlich zu sein, da beide Untereinheiten des Komplexes ausschließlich am Ribosom lokalisiert sind (Gautschi et

al., 2003; Polevoda et al., 2008). Des Weiteren weist Naa10p in Menschen zusätzlich zu der N^a- (Arnesen et al., 2005b) auch die N^e-Acetyltransferaseaktivität auf (Jeong et al., 2002, Seo et al., 2010). Die N^e-Acetylierung von HIF-1 α findet in Menschen wahrscheinlich im Zellkern unabhängig von Naa15p statt (Arnesen et al., 2005b). Zusammengenommen unterstützt dies die Hypothese der funktionellen Weiterentwicklung der Acetylierung, durch den NatA-Komplex, bzw. Naa10p unabhängig vom Komplex, von einem unizellulären zu einem multizellulären Organismus. Da AtNAA10p in dieser Arbeit sowohl im Cytosol als auch im Zellkern von *Nicotiana spec* nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.7), liegt die Vermutung nahe, dass AtNAA10p über eine ähnliche vielfältige biologische Aktivität wie das orthologe Enzym aus Menschen verfügt, welches gleiche Lokalisierung zeigt (Arnesen et al., 2005b). AtNAA10p wurde in *Nicotiana spec.* auch in ähnlichen von der Größe Strukturen wie Mitochondrien lokalisiert (Abbildung 3.7). Die negative Voraussage für die mitochondriale Lokalisierung des AtNAA10p mittels MITOPRED-Algorithmus bestärkt die Hypothese, dass es sich hier um unspezifische Aggregate handelte, die aufgrund zu hoher Expression von Proteinen in einem heterologen Organismus vorkommen können. Die transiente Expression von AtNAA15p in Tabakzellen (Abbildung 3.17) zeigte eine ähnliche Lokalisierung wie der menschliche Ortholog, der im Cytosol und schwach im Zellkern exprimiert wird (Arnesen et al., 2005b). Um die Lokalisierung der AtNAA10 und AtNAA15 Proteine zu bestätigen, müsste man die Lokalisierungsstudie in Blättern und Wurzeln von Arabidopsis durchführen.

Die strukturelle und enzymatische Ähnlichkeit zusammen mit der Lokalisierung beider Proteine sowie den unpublizierten Daten von Simon Geir Møller (persönliche Mitteilung; Centre for Organelle Research Faculty of Science and Technology University of Stavanger), welche die Interaktion zwischen den AtNAA10 und AtNAA15 Proteinen nachweisen, machen es sehr wahrscheinlich, dass die untersuchten Proteine die orthologen NAA10 und NAA15 aus Pflanzen sind.

Im Vergleich zu den anderen N-terminalen Acetyltransferasen acetyliert der NatA-Komplex in Hefe und Menschen die höchste Anzahl von Substraten (Polevoda and Sherman, 2003a; Arnesen et al., 2009b). Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass der NatA-Komplex auch in Arabidopsis der bedeutendste Nat-Komplex ist. Dies wird durch den Phänotyp der homozygoten *naa10*- und *naa15*-Pflanzen gestützt, da

sowohl der *knock out* der katalytischen Untereinheit (NAA10p) als auch der wahrscheinlich mit dem Ribosom assoziierten Anker-Untereinheit (NAA15p) des NatA-Komplexes lethal ist (Kapitel 3.1.4.2 und Kapitel 3.2.3.2). Der Zusammenhang zwischen dem lethalen Phänotyp der homozygoten *naa10-1*-Pflanzen und dem *knock out* des *NAA10*-Gens wurde durch die Komplementierung des *naa10*-Phänotyps durch die Expression des endogenen AtNAA10p bestätigt (Kapitel 3.1.5). Der teilweise chlorotische Phänotyp der Blattadern einiger komplementierten Pflanzen (Anhang 6.6) entstand möglicherweise durch die Überexpression des AtNAA10p unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors. Die konstitutive Expression des Naa10p aus *S. cerevisiae* konnte den lethalen Phänotyp der homozygoten *naa10-1*-Pflanzen in Arabidopsis nicht komplementieren (Kapitel 3.1.6). Möglicherweise weist dies auf funktionelle Unterschiede der Naa10-Acetyltransferase zwischen Hefe und Pflanzen hin. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass ausschließlich der NatA-Komplex aus Menschen die fehlende NatA-Aktivität in Hefe ersetzen kann (Arnesen et al., 2009b), ist es wahrscheinlicher, dass die katalytische Untereinheit (Naa10p) des NatA-Komplexes aus Hefe mit dem AtNAA15p in Arabidopsis nicht interagieren kann.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Acetylierung der NatA-Substrate während der Organentwicklung von Arabidopsis sowie anderen höheren Pflanzen notwendig ist. Da die homozygoten *naa10*- und *naa15*-Pflanzen denselben Phänotyp zeigen legt die Vermutung nahe, dass beide Untereinheiten des NatA-Komplexes in Arabidopsis wie in Hefe (Mullen et al., 1989) und Menschen (Arnesen et al., 2005b) für die NatA-Aktivität erforderlich sind. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die NTA durch den NatA-Komplex in anderen höheren Eukaryoten wie *Trypanosoma brucei* (Ingram et al., 2000), *Caenorhabditis elegans* (Sonnichsen et al., 2005), *Drosophila melanogaster* (Wang et al.) und in *Homo sapiens* (Rope et al., 2011) lebenswichtig ist. Beide Hefe-Deletionsmutanten *naa10* und *naa15* sind dagegen lebensfähig, zeigen jedoch konditionale Phänotypen (Whiteway and Szostak, 1985; Whiteway et al., 1987; Mullen et al., 1989; Park and Szostak, 1992; Plevoda et al., 1999). Der Phänotyp der ami NAA15-Pflanzen legt nahe, dass das NAA15p auch im adulten Stadium *in planta* erforderlich ist (Kapitel 3.2.4 und Kapitel 3.2.4.1). Dies alles zusammen zeigt, dass die Bedeutung der N^α-Acetylierung von Proteinen durch den NatA-Komplex in multizellulären Organismen im Gegenteil zu unizellulären Organismen, wie z. B. *S.*

cerevisiae, eine essentielle Rolle spielt. Insgesamt ist jedoch zu wenig über die N^α-Acetylierung in Arabidopsis bekannt, um funktionelle Alleinstellungsmerkmale des NatA-Komplexes auszuschließen.

4.2 Charakterisierung des NatE-Komplexes in Arabidopsis

Die Interaktion des orthologen Naa50-Proteins mit dem NatA-Komplex wurde bisher in Hefe, Menschen sowie in *Drosophila* gezeigt (Gautschi et al., 2003; Williams et al., 2003; Arnesen et al., 2006b), was die strukturelle Konservierung des NatE-Komplexes auch in Arabidopsis nahelegt. Das orthologe NAA50p (At5g11340) in Arabidopsis besitzt, wie alle katalytischen Untereinheiten der GNAT-Superfamilie, vier konservierte Motive (Abbildung 3.38) (Neuwald and Landsman, 1997; Vetting et al., 2005b) und zeigt eine deutlich höhere Sequenzidentität mit *H. sapiens* (54 %) und *D. melanogaster* (54 %) gegenüber dem niederen Eukaryoten *S. cerevisiae* (27 %) (Kapitel 3.4). Die subzelluläre Lokalisierung des AtNAA50:EYFP-Fusionsproteins in *Nicotiana spec.* zeigt, dass das Protein ähnlich wie das HsNaa50p (Arnesen et al., 2006b) im Cytosol und Zellkern exprimiert wird (Abbildung 3.42 und Anhang 6.5D), was auf die Rolle des AtNAA50p in der co-translationalen Acetylierung schließen lässt. Durch den *in vitro* N^α-Acetyltransferase-Aktivitätstest wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal nachgewiesen, dass das AtNAA50p über eine Acetyltransferaseaktivität verfügt und eine ähnliche Substratspezifität wie das HsNaa50p besitzt. Beide orthologen Proteine acetylieren das erste Methionin, wenn Leucin an der zweiten Stelle vorliegt (Kapitel 3.4.2) (Evjenth et al., 2009b). Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse bei allen bisher untersuchten Funktionen, dass es sich um das orthologe NAA50p *in planta* handelt.

Interessanterweise weist das Naa50p ähnlich wie das Naa10p in Menschen eine bifunktionelle Aktivität auf. Es wurde gezeigt, dass es nicht nur über N^α- sondern auch über N^ε-Acetyltransferaseaktivität verfügt (Evjenth et al., 2009b). Das HsNaa50p besitzt flexible Schleifen an der Eintrittsstelle zur Substratbindetasche, was möglicherweise die Flexibilität bieten könnte, auch größere Substrate zuzulassen (Evjenth et al., 2009b). Unter Berücksichtigung der hohen Sequenzidentität, der gleichen Lokalisierung und der ähnlichen N-terminalen Substratspezifität beider orthologen Proteine in Menschen und

Arabidopsis könnte man annehmen, dass das AtNAA50p ebenfalls die N^e-Acetyltransferaseaktivität besitzt.

Es ist bemerkenswert, dass sich das rekombinante His:NAA50p (Kapitel 3.4.1.2) im Gegensatz zu den anderen Arabidopsis Proteinen, His:NAA10p (Kapitel 3.1.1.2), His:NAA15p (Kapitel 3.2.1.2) und His:NAA20p (Kapitel 3.3.1.2), aus Bakterien problemlos aufreinigen lässt. Aus diesem Grund konnte die Tertiärstruktur des His:NAA50p *in vitro* überprüft werden. Das His:NAA50p liegt hauptsächlich als Monomer vor, wobei eine gewisse Menge des Proteins ebenfalls ein Pentamer bildet (Kapitel 3.4.1.3). Wenn man die Konzentration des His:NAA50p reduziert, verändert sich das Verhältnis umso mehr zugunsten des Monomers (Kapitel 3.4.1.3). Interessanterweise zeigte eine andere Studie, dass das AtNAA50p zu 80 % ein Pentamer bildet (Linster, 2010). Deshalb kann geschlussfolgert werden, dass die Interaktion zwischen den NAA50p durch den His-Tag behindert wurde, was auf die Rolle des N-Terminus von AtNAA50p für die Pentamerisierung und die mögliche Interaktion mit dem NatA-Komplex hindeutet.

Die Komplementierung des *naa10*- (Kapitel 3.1.6) und *naa20*-Phänotyps (Kapitel 3.3.6) mit den orthologen Proteinen aus einem unizellulären Organismus wie *S. cerevisiae* war erfolglos, darum wurden die heterozygoten *naa50-2*-Pflanzen mit einem Konstrukt transformiert, das die Expression des orthologen HsNaa50p vermittelt. Der *Atnaa50*-Phänotyp konnte tatsächlich mit dem Naa50p aus Menschen zumindest in der vegetativen Phase komplementiert werden. Dennoch zeigten die komplementierten *naa50-2*-Mutanten gewisse Unterschiede gegenüber den Col-0-Pflanzen wie z. B. eine veränderte Struktur der Blätter (Kapitel 3.4.6). Die leichten Wachstumsunterschiede zwischen Col-0-Pflanzen und HsNaa50p exprimierenden *naa50-2*-Mutanten könnten möglicherweise ähnlich wie bei AtNAA50p exprimierenden Mutanten (Kapitel 3.4.5) auf die Überexpression des jeweiligen Proteins unter Kontrolle des 35S Promotors zurückzuführen sein. Im Gegensatz zu den meisten homozygoten *naa50-2*-Pflanzen (Kapitel 3.4.4.3) haben alle HsNaa50p exprimierenden *naa50-2*-Mutanten in der generativen Phase geblüht, hatten jedoch immer noch Schwierigkeiten bei Samenbildung. Durch den Pollenvitalitätstest konnten eindeutige Unterschiede zwischen den Pollen der Col-0-Pflanzen und HsNaa50p exprimierenden *naa50-2*-Mutanten gezeigt werden (Kapitel 3.4.6.1). Die unvollständige Komplementierung der

naa50-2-Mutanten durch Überexpression des *H. sapiens* Naa50-Orthologs könnte auf die funktionellen Unterschiede zwischen den pflanzlichen und menschlichen Naa50-Proteinen hinweisen. Möglicherweise wird in diesem Stadium ein Protein exprimiert, dessen Funktion durch Acetylierung beeinflusst wird, dass aber nur durch das pflanzliche und nicht durch das menschliche Naa50p acetyliert werden kann. Es ist jedenfalls möglich, dass die Expression des HsNaa50p unter Kontrolle des starken 35S Promotors und als Folge die Acetylierung von zu viel Zielproteinen die Ursache für die unvollständige Komplementierung ist. Diese Hypothese wird dadurch bestärkt, dass die *AtNAA50p* exprimierenden *naa50-2*-Mutanten ebenfalls Probleme bei Samenbildung hatten (Kapitel 3.4.5).

Die orthologen Naa50-Proteine führen eine bedeutendere Rolle in höheren als in niederen Eukaryoten aus. Die Hefe-Deletionsmutanten *naa50* zeigen keinen nachweisbaren Phänotyp (Gautschi et al., 2003; Polevoda et al., 2008). In *D. melanogaster* ist das Naa50p möglicherweise zusammen mit dem NatA-Komplex für das Finden des Schwesterschromatids erforderlich (Williams et al., 2003). Interessanterweise ist in Menschen allein die enzymatische Aktivität des Naa50p dafür notwendig (Hou et al., 2007). Die N-terminale Acetylierung durch die NAA50-Acetyltransferase spielt eine wesentliche Rolle ebenso in der Pflanzenentwicklung, was anhand zwei T-DNA-Insertionslinien gezeigt wurde. Homozygote Pflanzen beider T-DNA-Insertionslinien waren zwar lebensfähig weisen aber während der gesamten Entwicklung einen ausgeprägten Phänotyp auf (Kapitel 3.4.4.1 und Kapitel 3.4.4.3). Die homozygoten Pflanzen waren zwar sehr selten aber doch in der Lage zu blühen, darum wäre es wichtig andere als in dieser Arbeit verwendete Wachstumsbedingungen (Kapitel 2.3.1.1) auszuprobieren. Auf Grund der erfolgreichen Komplementierung des *naa50*-Phänotyps durch die Expression von endogenem NAA50p wurde nachgewiesen, dass der Phänotyp durch die T-DNA-Insertion im *AtNAA50*-Gen hervorgerufen wurde (Kapitel 3.4.5). Ob das *AtNAA50p* ähnlich wie bei Menschen überwiegend (über 80 %) unabhängig von dem NatA-Komplex vorliegt (Hou et al., 2007), ist bisher ungeklärt. Die Unterschiede im Phänotyp zwischen dem *knock out* von der katalytischen und der Anker-Untereinheit des NatA-Komplexes (Kapitel 3.1.4.2 und Kapitel 3.2.3.2) und dem *knock out* von der katalytischen Untereinheit des NatE-Komplexes (Kapitel 3.4.4.3) suggerieren jedoch eine abweichende Rolle des NAA50p in Arabidopsis.

4.3 Charakterisierung des NatB-Komplexes in Arabidopsis

Der NatB-Komplex in Hefe (Polevoda et al., 1999; Singer et al., 2000) und Menschen (Starheim et al., 2008) besteht aus der orthologen katalytischen (Naa20p) und der Anker-Untereinheit (Naa25p), die für die NatB-Aktivität notwendig sind (Polevoda et al., 2003; Starheim et al., 2008). Beide orthologen Proteine in Arabidopsis enthalten charakteristische Motive für die Nat-Komplexe. Das AtNAA20p (At1g03150) (Abbildung 3.24) besitzt ähnlich wie alle katalytischen Untereinheiten der GNAT-Superfamilie, unter anderem die AtNAA10 (Abbildung 3.2) und AtNAA50 (Abbildung 3.38) Proteine, vier konservierte Motive und weist eine hohe Sequenzidentität mit den orthologen Proteinen in Hefe und Menschen auf (Kapitel 3.3). Das NAA25p (At5g58450) in Arabidopsis besitzt zwar ähnlich wie ScNaa25p (Polevoda et al., 2003) und HsNaa25p (Starheim et al., 2008) die typischen für die Anker-Untereinheiten TPR-Motive (NCBI), zeigt jedoch relativ niedrige Sequenzidentität mit den orthologen Proteinen aus Hefe und Menschen (20 % im Vergleich zu 24 % mit HsNaa25p; TAIR BLASTP2.2.8, www.arabidopsis.org). Es ist in Betracht zu ziehen, dass alleine das orthologe NAA20p *in planta* über N^α-Acetyltransferaseaktivität verfügt und unabhängig von dem NAA25p eine eigenständige Funktion besitzt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass trotz der Interaktion zwischen der katalytischen, NAA30p, und der Anker-Untereinheit, NAA35p, des NatC-Komplexes aus Arabidopsis (Pesaresi et al., 2003) alleine das AtNAA30p im Gegensatz zu den orthologen Proteinen aus Hefe (Polevoda and Sherman, 2001) und Menschen (Starheim et al., 2009b) eine N^α-Acetyltransferaseaktivität besitzt. Aufgrund der Differenzen in den Phänotypen beider Untereinheiten des NatB-Komplexes in Hefe, welche in den *knock down* von NAA20 und NAA25 in Menschen umso stärker auftreten, wurde ebenso auf eine jeweils eigenständige Funktion der beiden Untereinheiten des NatB-Komplexes spekuliert (Singer and Shaw, 2003; Starheim et al., 2008). Dies wird umso wahrscheinlicher, wenn man die Unterschiede in der Lokalisierung beider Proteine aus Hefe und Menschen berücksichtigt (Polevoda et al., 2008; Starheim et al., 2008). ScNaa20p liegt hauptsächlich frei im Cytosol vor, wohingegen das meiste ScNaa25p am Ribosom verankert ist (Polevoda et al., 2008). Beide Untereinheiten des menschlichen NatB-Komplexes wurden am Ribosom und frei im Cytosol gefunden. Das HsNaa20p wurde allerdings im Cytosol und Zellkern lokalisiert (Starheim et al., 2008). Das HsNaa25p

wird dagegen nur im Cytosol exprimiert (Starheim et al., 2008). Interessanterweise zeigte die CLSM-Analyse, dass das NAA20:EYFP-Fusionsprotein in Arabidopsis im Blatt und Hypokotyl im Cytosol und unerwartet auch in Mitochondrien exprimiert wird (Abbildung 3.27A-H). Die mitochondriale Lokalisierung konnte ebenfalls in den Wurzeln bestätigt werden, das EYFP-Signal war jedoch sehr stark, darum kann man auch die cytosolische Lokalisierung des NAA20p in den Wurzeln nicht ausschließen (Abbildung 3.27I-K).

Bei den Substraten der orthologen NatB-Acetyltransferasen in Hefe und Menschen wird das N-terminale Methionin acetyliert, wenn an der zweiten Stelle Glutamat-, Asparaginsäure - oder Asparagin- vorliegt (Polevoda and Sherman, 2003a; Ametzazurra et al., 2009; Arnesen et al., 2009b). In Arabidopsis wurden sechs potentielle NAA20-Substrate identifiziert, *nucleoside diphosphate kinase 1* (At4g09320), *membrane-associated progesterone binding Protein 2* (At2g24940), ein unbekanntes Protein (At1g13930) (Kapitel 3.3.5.1) sowie *RAB GDP dissociation inhibitor 2* (At3g59920), *NAD(P)-linked oxidoreductase domain-containing Protein* (At2g21250.1) und *pyruvate kinase* (At3g52990) (Kapitel 3.3.5.2). Bei den At4g09320 und At2g24940 Proteinen konnte kein N-Terminus detektiert werden, darum können auch andere Modifikationen des N-Terminus nicht ausgeschlossen werden. AtNAA20p wird im Cytosol und in Mitochondrien exprimiert (Abbildung 3.27), was auf eine cytosolische und/oder mitochondriale Lokalisierung der putativen NatB-Substrate hinweisen würde. Die meisten verwendeten Vorhersage-Programme sagen tatsächlich eine cytosolische Lokalisierung der sechs identifizierten NatB-Substrate voraus, während eine mitochondriale Lokalisierung von keinem der Programme auch nur für ein einziges der Substrate vorhergesagt wurde (Anhang 6.8). Durch die Identifizierung der potentiellen Substrate wurde zum ersten Mal, wenn auch indirekt, gezeigt, dass das NAA20p in Arabidopsis eine Acetyltransferaseaktivität besitzt. Die Acetylierung der At2g24940 (Met-Glu-), At1g13930 (Met-Asn-), At3g59920 (Met-Asp-) und At2g21250.1 (Met-Glu-) Proteine stimmt mit der vorhergesagten Substratspezifität des NatB-Komplexes in Hefe und Menschen überein. Es ist jedoch denkbar, dass der putative NatB-Komplex *in planta* möglicherweise ein größeres Spektrum der N-terminalen Sequenzen z.B. Met-Cys- (At4g09320) und Met-His- (At3g52990) acetyliert. Die Verifizierung der Substrate des putativen NatB-Komplexes in Arabidopsis könnte aufklären, ob die von

Hefe und Menschen abweichende Substratspezifität nur für die freie NAA20-Acetyltransferase zutrifft.

Die hohe Sequenzidentität des AtNAA20p mit den orthologen ScNaa20 und HsNaa20 Proteinen sowie die Identifizierung der potentiellen AtNAA20-Substrate weisen überzeugend darauf hin, dass das AtNAA20p das orthologe Protein *in planta* ist. Die Lokalisierungsergebnisse und die fehlende Komplementierung des *naa20*-Phänotyps durch die Expression des orthologen ScNaa20p (Kapitel 3.3.6) deuten jedoch funktionelle Unterschiede zwischen dem AtNAA20p und dem orthologen Protein aus Hefe an. Die fehlende Komplementierung schließt dennoch nicht aus, dass ausschließlich der NatB-Komplex aus Hefe den *naa20*-Phänotyp komplementieren könnte, obwohl die eigenständige Funktion des Naa20p in Hefe in Erwägung gezogen wurde (Polevoda et al., 2008). Die erfolgreiche Komplementierung des *naa20*-Phänotyps mit dem orthologen Naa20p aus Menschen wäre ein Hinweis dafür, dass die N^α-Acetylierung in Pflanzen eher dem menschlichen System ähnelt. Auf Grund der mitochondrialen Lokalisierung des AtNAA20p kann man jedoch für das pflanzliche System einige Besonderheiten nicht ausschließen. Es ist möglich, dass alleine das AtNAA20p mitochondriale Proteine post-translational sowie im Komplex mit NAA25p co-translational acetyliert. Um die offenen Fragen zu beantworten, sollte unbedingt das mutmaßliche Ortholog AtNAA25p charakterisiert und die Interaktion zwischen den AtNAA20 und AtNAA25 Proteinen überprüft werden.

Der *knock out* der katalytischen Untereinheit (Naa20p) des NatB-Komplexes ist lebensfähig, weist jedoch einen Phänotyp auf, unter anderem beeinträchtigt Wachstum (Kapitel 3.3.3.2) und eine Abnahme der Chlorophyllmenge (Kapitel 3.3.3.3). Der Phänotyp wurde durch die Expression des endogenen AtNAA20p komplementiert (Kapitel 3.3.4), was die Korrelation zwischen der fehlenden NAA20-Aktivität und dem *naa20*-Phänotyp bestätigt. Der *naa20*-Phänotyp ähnelt dem *knock out* der katalytischen Untereinheit des bisher einzigen charakterisierten NatC-Komplexes in Arabidopsis, welcher mit der Reduktion der Proteinmenge von Thylakoid Multiproteinkomplexen korreliert (Pesaresi et al., 2003). Aufgrund der Reduktion im Chlorophyllgehalt in den homozygoten *naa20-1*- und *naa20-2*-Pflanzen könnte man vermuten, dass eine Korrelation zwischen der fehlenden NAA20-Aktivität und der Photosynthese-Rate besteht. Zunächst wäre es jedoch erforderlich die Thylakoid-Proteine und die

Chloroplasten zu charakterisieren um den pleiotropen Effekt der Reduktion im Chlorophyllgehalt in den homozygoten *naa20-1*- und *naa20-2*-Pflanzen auszuschließen.

Nachweis orthologer Nat-Komplexe nach allen Kriterien wie Sequenz, Aktivität, Lokalisierung und Komplementierung eröffnet die Möglichkeit die Zielproteine und damit verbundenen zellulären Funktionen in Pflanzen als einfachem eukaryotischem System aufzuklären.

5 Literaturverzeichnis

- Ametzazurra, A., Gazquez, C., Lasa, M., Larrea, E., Prieto, J., and Aldabe, R.** (2009). Characterization of the human Nalpha-terminal acetyltransferase B enzymatic complex. *BMC Proc* **3 Suppl 6**, S4.
- Arai, K., Clark, B.F., Duffy, L., Jones, M.D., Kaziro, Y., Laursen, R.A., L'Italien, J., Miller, D.L., Nagarkatti, S., Nakamura, S., Nielsen, K.M., Petersen, T.E., Takahashi, K., and Wade, M.** (1980). Primary structure of elongation factor Tu from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1326-1330.
- Arfin, S.M., and Bradshaw, R.A.** (1988). Cotranslational processing and protein turnover in eukaryotic cells. *Biochemistry* **27**, 7979-7984.
- Arnesen, T., Thompson, P.R., Varhaug, J.E., and Lillehaug, J.R.** (2008). The protein acetyltransferase ARD1: a novel cancer drug target? *Curr Cancer Drug Targets* **8**, 545-553.
- Arnesen, T., Gromyko, D., Horvli, O., Fluge, O., Lillehaug, J., and Varhaug, J.E.** (2005a). Expression of N-acetyl transferase human and human Arrest defective 1 proteins in thyroid neoplasms. *Thyroid* **15**, 1131-1136.
- Arnesen, T., Anderson, D., Baldersheim, C., Lanotte, M., Varhaug, J.E., and Lillehaug, J.R.** (2005b). Identification and characterization of the human ARD1-NATH protein acetyltransferase complex. *Biochem J* **386**, 433-443.
- Arnesen, T., Gromyko, D., Pendino, F., Rynningen, A., Varhaug, J.E., and Lillehaug, J.R.** (2006a). Induction of apoptosis in human cells by RNAi-mediated knockdown of hARD1 and NATH, components of the protein N-alpha-acetyltransferase complex. *Oncogene* **25**, 4350-4360.
- Arnesen, T., Anderson, D., Torsvik, J., Halseth, H.B., Varhaug, J.E., and Lillehaug, J.R.** (2006b). Cloning and characterization of hNAT5/hSAN: an evolutionarily conserved component of the NatA protein N-alpha-acetyltransferase complex. *Gene* **371**, 291-295.
- Arnesen, T., Gromyko, D., Kagabo, D., Betts, M.J., Starheim, K.K., Varhaug, J.E., Anderson, D., and Lillehaug, J.R.** (2009a). A novel human NatA Nalpha-terminal acetyltransferase complex: hNaa16p-hNaa10p (hNat2-hArd1). *BMC Biochem* **10**, 15.
- Arnesen, T., Betts, M.J., Pendino, F., Liberles, D.A., Anderson, D., Caro, J., Kong, X., Varhaug, J.E., and Lillehaug, J.R.** (2006c). Characterization of hARD2, a processed hARD1 gene duplicate, encoding a human protein N-alpha-acetyltransferase. *BMC Biochem* **7**, 13.
- Arnesen, T., Van Damme, P., Plevoda, B., Helsens, K., Evjenth, R., Colaert, N., Varhaug, J.E., Vandekerckhove, J., Lillehaug, J.R., Sherman, F., and Gevaert, K.** (2009b). Proteomics analyses reveal the evolutionary conservation and divergence of N-terminal acetyltransferases from yeast and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8157-8162.

- Arnold, R.J., Polevoda, B., Reilly, J.P., and Sherman, F.** (1999). The action of N-terminal acetyltransferases on yeast ribosomal proteins. *J Biol Chem* **274**, 37035-37040.
- Arnon, D.I.** (1949). Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiol* **24**, 1-15.
- Barra, D., Martini, F., Bossa, F., Rotilio, G., Bannister, J.V., and Bannister, W.H.** (1978). Primary structure of human copper-zinc superoxide dismutase. Cysteine - and tryptophan - containing peptides. *Biochem Biophys Res Commun* **81**, 1195-1200.
- Ben-Bassat, A., Bauer, K., Chang, S.Y., Myambo, K., Boosman, A., and Chang, S.** (1987). Processing of the initiation methionine from proteins: properties of the *Escherichia coli* methionine aminopeptidase and its gene structure. *J Bacteriol* **169**, 751-757.
- Bradshaw, R.A., Brickey, W.W., and Walker, K.W.** (1998). N-terminal processing: the methionine aminopeptidase and N alpha-acetyl transferase families. *Trends Biochem Sci* **23**, 263-267.
- Caesar, R., and Blomberg, A.** (2004). The stress-induced Tfs1p requires NatB-mediated acetylation to inhibit carboxypeptidase Y and to regulate the protein kinase A pathway. *J Biol Chem* **279**, 38532-38543.
- Chen, S., Vetro, J.A., and Chang, Y.H.** (2002). The specificity in vivo of two distinct methionine aminopeptidases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* **398**, 87-93.
- Choi, S.C., Chang, J.Y., and Han, J.K.** (2001). A novel *Xenopus* acetyltransferase with a dynamic expression in early development. *Biochem Biophys Res Commun* **285**, 1338-1343.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.
- Cumberlidge, A.G., and Isono, K.** (1979). Ribosomal protein modification in *Escherichia coli*. I. A mutant lacking the N-terminal acetylation of protein S5 exhibits thermosensitivity. *J Mol Biol* **131**, 169-189.
- Cutforth, T., and Gaul, U.** (1999). A methionine aminopeptidase and putative regulator of translation initiation is required for cell growth and patterning in *Drosophila*. *Mech Dev* **82**, 23-28.
- Datta, B.** (2000). MAPs and POEP of the roads from prokaryotic to eukaryotic kingdoms. *Biochimie* **82**, 95-107.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J., and Leder, P.** (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* **82**, 675-684.
- Dockray, G.J.** (1987). The biosynthesis of regulatory peptides. *Am Rev Respir Dis* **136**, S9-15.

- Dores, R.M., McDonald, L.K., Steveson, T.C., and Sei, C.A.** (1990). The molecular evolution of neuropeptides: prospects for the '90s. *Brain Behav Evol* **36**, 80-99.
- Driessen, H.P., de Jong, W.W., Tesser, G.I., and Bloemendal, H.** (1985). The mechanism of N-terminal acetylation of proteins. *CRC Crit Rev Biochem* **18**, 281-325.
- Dyda, F., Klein, D.C., and Hickman, A.B.** (2000). GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**, 81-103.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C.** (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**, 1349.
- Evjenth, R., Hole, K., Ziegler, M., and Lillehaug, J.R.** (2009a). Application of reverse-phase HPLC to quantify oligopeptide acetylation eliminates interference from unspecific acetyl CoA hydrolysis. *BMC Proc* **3 Suppl 6**, S5.
- Evjenth, R., Hole, K., Karlsen, O.A., Ziegler, M., Arnesen, T., and Lillehaug, J.R.** (2009b). Human Naa50p (Nat5/San) displays both protein N alpha- and N epsilon-acetyltransferase activity. *J Biol Chem* **284**, 31122-31129.
- Falb, M., Aivaliotis, M., Garcia-Rizo, C., Bisle, B., Tebbe, A., Klein, C., Konstantinidis, K., Siedler, F., Pfeiffer, F., and Oesterhelt, D.** (2006). Archaeal N-terminal protein maturation commonly involves N-terminal acetylation: a large-scale proteomics survey. *J Mol Biol* **362**, 915-924.
- Fisher, T.S., Etages, S.D., Hayes, L., Crimin, K., and Li, B.** (2005). Analysis of ARD1 function in hypoxia response using retroviral RNA interference. *J Biol Chem* **280**, 17749-17757.
- Flinta, C., Persson, B., Jornvall, H., and von Heijne, G.** (1986). Sequence determinants of cytosolic N-terminal protein processing. *Eur J Biochem* **154**, 193-196.
- Fluge, O., Bruland, O., Akslen, L.A., Varhaug, J.E., and Lillehaug, J.R.** (2002). NATH, a novel gene overexpressed in papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* **21**, 5056-5068.
- Gautschi, M., Just, S., Mun, A., Ross, S., Rucknagel, P., Dubaquier, Y., Ehrenhofer-Murray, A., and Rospert, S.** (2003). The yeast N(alpha)-acetyltransferase NatA is quantitatively anchored to the ribosome and interacts with nascent polypeptides. *Mol Cell Biol* **23**, 7403-7414.
- Gendron, R.L., Adams, L.C., and Paradis, H.** (2000). Tubedown-1, a novel acetyltransferase associated with blood vessel development. *Dev Dyn* **218**, 300-315.
- Giglione, C., and Meinnel, T.** (2001). Organellar peptide deformylases: universality of the N-terminal methionine cleavage mechanism. *Trends Plant Sci* **6**, 566-572.
- Giglione, C., Pierre, M., and Meinnel, T.** (2000a). Peptide deformylase as a target for new generation, broad spectrum antimicrobial agents. *Mol Microbiol* **36**, 1197-1205.

- Giglione, C., Vallon, O., and Meinnel, T.** (2003). Control of protein life-span by N-terminal methionine excision. *EMBO J* **22**, 13-23.
- Giglione, C., Boularot, A., and Meinnel, T.** (2004). Protein N-terminal methionine excision. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1455-1474.
- Giglione, C., Serero, A., Pierre, M., Boisson, B., and Meinnel, T.** (2000b). Identification of eukaryotic peptide deformylases reveals universality of N-terminal protein processing mechanisms. *EMBO J* **19**, 5916-5929.
- Grand, R.J., Shenolikar, S., and Cohen, P.** (1981). The amino acid sequence of the delta subunit (calmodulin) of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* **113**, 359-367.
- Grant, P.A.** (2001). A tale of histone modifications. *Genome Biol* **2**, REVIEWS0003.
- Halbreich, A., and Rabinowitz, M.** (1971). Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial formyltetrahydrofolic acid:methionyl-tRNA transformylase and the hybridization of mitochondrial fMet-tRNA with mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 294-298.
- Hirel, P.H., Schmitter, M.J., Dessen, P., Fayat, G., and Blanquet, S.** (1989). Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8247-8251.
- Hoog, J.O., Weis, M., Zeppezauer, M., Jornvall, H., and von Bahr-Lindstrom, H.** (1987). Expression in *Escherichia coli* of active human alcohol dehydrogenase lacking N-terminal acetylation. *Biosci Rep* **7**, 969-974.
- Hou, F., Chu, C.W., Kong, X., Yokomori, K., and Zou, H.** (2007). The acetyltransferase activity of San stabilizes the mitotic cohesin at the centromeres in a shugoshin-independent manner. *J Cell Biol* **177**, 587-597.
- Hwang, C.S., Shemorry, A., and Varshavsky, A.** (2010) N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals. *Science* **327**, 973-977.
- Ingram, A.K., Cross, G.A., and Horn, D.** (2000). Genetic manipulation indicates that ARD1 is an essential N(infinity)-acetyltransferase in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **111**, 309-317.
- Isono, K., and Isono, S.** (1980). Ribosomal protein modification in *Escherichia coli*. II. Studies of a mutant lacking the N-terminal acetylation of protein S18. *Mol Gen Genet* **177**, 645-651.
- Isono, S., and Isono, K.** (1981). Ribosomal protein modification in *Escherichia coli*. III. Studies of mutants lacking an acetylase activity specific for protein L12. *Mol Gen Genet* **183**, 473-477.
- Jackson, R., and Hunter, T.** (1970). Role of methionine in the initiation of haemoglobin synthesis. *Nature* **227**, 672-676.
- Jeong, J.W., Bae, M.K., Ahn, M.Y., Kim, S.H., Sohn, T.K., Bae, M.H., Yoo, M.A., Song, E.J., Lee, K.J. and Kim, K.W.** (2002). Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell (Cambridge, Mass.)* **111**, 709-720.

- Johnson, G.G., Kronert, W.A., Bernstein, S.I., Chapman, V.M., and Smith, K.D.** (1988). Altered turnover of allelic variants of hypoxanthine phosphoribosyltransferase is associated with N-terminal amino acid sequence variation. *J Biol Chem* **263**, 9079-9082.
- Jornvall, H.** (1975). Acetylation of Protein N-terminal amino groups structural observations on alpha-amino acetylated proteins. *J Theor Biol* **55**, 1-12.
- Jornvall, H., Fairwell, T., Kratofil, P., and Wills, C.** (1980). Differences in alpha-amino acetylation of isozymes of yeast alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett* **111**, 214-218.
- Kendall, R.L., and Bradshaw, R.A.** (1992). Isolation and characterization of the methionine aminopeptidase from porcine liver responsible for the co-translational processing of proteins. *J Biol Chem* **267**, 20667-20673.
- Kendall, R.L., Yamada, R., and Bradshaw, R.A.** (1990). Cotranslational amino-terminal processing. *Methods Enzymol* **185**, 398-407.
- Kimura, Y., Takaoka, M., Tanaka, S., Sassa, H., Tanaka, K., Polevoda, B., Sherman, F., and Hirano, H.** (2000). N(alpha)-acetylation and proteolytic activity of the yeast 20 S proteasome. *J Biol Chem* **275**, 4635-4639.
- Kouzarides, T.** (1999). Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 40-48.
- Krishna, R.G., and Wold, F.** (1993). Post-translational modification of proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **67**, 265-298.
- Li, X., and Chang, Y.H.** (1995). Amino-terminal protein processing in *Saccharomyces cerevisiae* is an essential function that requires two distinct methionine aminopeptidases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 12357-12361.
- Line, A., Stengrevics, A., Slucka, Z., Li, G., Jankevics, E., and Rees, R.C.** (2002). Serological identification and expression analysis of gastric cancer-associated genes. *Br J Cancer* **86**, 1824-1830.
- Linster, E.** (2010). Expression und Aufreinigung von rekombinanten N^α-Acetyltransferasen aus der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*. AG Hell, R., Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg; Diplomarbeit
- Liu, S., Widom, J., Kemp, C.W., Crews, C.M., and Clardy, J.** (1998). Structure of human methionine aminopeptidase-2 complexed with fumagillin. *Science* **282**, 1324-1327.
- Lowther, W.T., and Matthews, B.W.** (2000). Structure and function of the methionine aminopeptidases. *Biochim Biophys Acta* **1477**, 157-167.
- Lowther, W.T., Orville, A.M., Madden, D.T., Lim, S., Rich, D.H., and Matthews, B.W.** (1999). *Escherichia coli* methionine aminopeptidase: implications of crystallographic analyses of the native, mutant, and inhibited enzymes for the mechanism of catalysis. *Biochemistry* **38**, 7678-7688.
- Mackay, D.T., Botting, C.H., Taylor, G.L., and White, M.F.** (2007). An acetylase with relaxed specificity catalyses protein N-terminal acetylation in *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Microbiol* **64**, 1540-1548.

- Manning, L.R., and Manning, J.M.** (2001). The acetylation state of human fetal hemoglobin modulates the strength of its subunit interactions: long-range effects and implications for histone interactions in the nucleosome. *Biochemistry* **40**, 1635-1639.
- Marmorstein, R.** (2004). Biochemical and structural characterization of recombinant histone acetyltransferase proteins. *Methods Enzymol* **376**, 106-119.
- Martinez, A., Traverso, J.A., Valot, B., Ferro, M., Espagne, C., Ephritikhine, G., Zivy, M., Giglione, C., and Meinnel, T.** (2008). Extent of N-terminal modifications in cytosolic proteins from eukaryotes. *Proteomics* **8**, 2809-2831.
- Meinnel, T., Mechulam, Y., and Blanquet, S.** (1993). Methionine as translation start signal: a review of the enzymes of the pathway in *Escherichia coli*. *Biochimie* **75**, 1061-1075.
- Meinnel, T., Serero, A., and Giglione, C.** (2006). Impact of the N-terminal amino acid on targeted protein degradation. *Biol Chem* **387**, 839-851.
- Miao, L., Fang, H., Li, Y., and Chen, H.** (2007). Studies of the in vitro N-alpha-acetyltransferase activities of *E. coli* RimL protein. *Biochem Biophys Res Commun* **357**, 641-647.
- Midorikawa, Y., Tsutsumi, S., Taniguchi, H., Ishii, M., Kobune, Y., Kodama, T., Makuuchi, M., and Aburatani, H.** (2002). Identification of genes associated with dedifferentiation of hepatocellular carcinoma with expression profiling analysis. *Jpn J Cancer Res* **93**, 636-643.
- Moerschell, R.P., Hosokawa, Y., Tsunasawa, S., and Sherman, F.** (1990). The specificities of yeast methionine aminopeptidase and acetylation of amino-terminal methionine in vivo. Processing of altered iso-1-cytochromes c created by oligonucleotide transformation. *J Biol Chem* **265**, 19638-19643.
- Mullen, J.R., Kayne, P.S., Moerschell, R.P., Tsunasawa, S., Gribskov, M., Colavito-Shepanski, M., Grunstein, M., Sherman, F., and Sternglanz, R.** (1989). Identification and characterization of genes and mutants for an N-terminal acetyltransferase from yeast. *EMBO J* **8**, 2067-2075.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-273.
- Narita, K.** (1958). Isolation of acetylpeptide from enzymic digests of TMV-protein. *Biochim Biophys Acta* **28**, 184-191.
- Neuwald, A.F., and Landsman, D.** (1997). GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein. *Trends Biochem Sci* **22**, 154-155.
- Park, E.C., and Szostak, J.W.** (1992). ARD1 and NAT1 proteins form a complex that has N-terminal acetyltransferase activity. *EMBO J* **11**, 2087-2093.
- Persson, B., Flinta, C., von Heijne, G., and Jornvall, H.** (1985). Structures of N-terminally acetylated proteins. *Eur J Biochem* **152**, 523-527.

- Pesaresi, P., Gardner, N.A., Masiero, S., Dietzmann, A., Eichacker, L., Wickner, R., Salamini, F., and Leister, D.** (2003). Cytoplasmic N-terminal protein acetylation is required for efficient photosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**, 1817-1832.
- Pestana, A., and Pitot, H.C.** (1974). N-terminal acetylation of histone-like nascent peptides on rat liver polyribosomes in vitro. *Nature* **247**, 200-202.
- Pestana, A., and Pitot, H.C.** (1975). Acetylation of nascent polypeptide chains on rat liver polyribosomes in vivo and in vitro. *Biochemistry* **14**, 1404-1412.
- Pimenta-Marques, A., Tostoes, R., Marty, T., Barbosa, V., Lehmann, R., and Martinho, R.G.** (2008). Differential requirements of a mitotic acetyltransferase in somatic and germ line cells. *Dev Biol* **323**, 197-206.
- Pine, M.J.** (1969). Kinetics of maturation of the amino termini of the cell proteins of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **174**, 359-372.
- Polevoda, B., and Sherman, F.** (2000). N-terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J Biol Chem* **275**, 36479-36482.
- Polevoda, B., and Sherman, F.** (2001). NatC N-terminal acetyltransferase of yeast contains three subunits, Mak3p, Mak10p, and Mak31p. *J Biol Chem* **276**, 20154-20159.
- Polevoda, B., and Sherman, F.** (2002). The diversity of acetylated proteins. *Genome Biol* **3**, reviews0006.
- Polevoda, B., and Sherman, F.** (2003a). N-terminal acetyltransferases and sequence requirements for N-terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J Mol Biol* **325**, 595-622.
- Polevoda, B., and Sherman, F.** (2003b). Composition and function of the eukaryotic N-terminal acetyltransferase subunits. *Biochem Biophys Res Commun* **308**, 1-11.
- Polevoda, B., Hoskins, J., and Sherman, F.** (2009). Properties of Nat4, an N(alpha)-acetyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae* that modifies N termini of histones H2A and H4. *Mol Cell Biol* **29**, 2913-2924.
- Polevoda, B., Norbeck, J., Takakura, H., Blomberg, A., and Sherman, F.** (1999). Identification and specificities of N-terminal acetyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **18**, 6155-6168.
- Polevoda, B., Cardillo, T.S., Doyle, T.C., Bedi, G.S., and Sherman, F.** (2003). Nat3p and Mdm20p are required for function of yeast NatB N-terminal acetyltransferase and of actin and tropomyosin. *J Biol Chem* **278**, 30686-30697.
- Polevoda, B., Brown, S., Cardillo, T.S., Rigby, S., and Sherman, F.** (2008). Yeast N(alpha)-terminal acetyltransferases are associated with ribosomes. *J Cell Biochem* **103**, 492-508.
- Preuss D., Rhee S.Y., Davis R.W.** (1994). Tetrad analysis possible in Arabidopsis with mutation of the QUARTET (QRT) genes. *Science* **264**, 1458-1460.

- Ramachandran, J., and Choh Hao, L.** (1967). Structure-activity relationships of the adrenocorticotropins and melanotropins: the synthetic approach. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **29**, 391-477.
- Ray, M.K., Datta, B., Chakraborty, A., Chattopadhyay, A., Meza-Keuthen, S., and Gupta, N.K.** (1992). The eukaryotic initiation factor 2-associated 67-kDa polypeptide (p67) plays a critical role in regulation of protein synthesis initiation in animal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 539-543.
- Ren, T., Jiang, B., Jin, G., Li, J., Dong, B., Zhang, J., Meng, L., Wu, J., and Shou, C.** (2008). Generation of novel monoclonal antibodies and their application for detecting ARD1 expression in colorectal cancer. *Cancer Lett* **264**, 83-92.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B.** (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**, 1030-1032.
- Rope, A.F., Wang, K., Evjenth, R., Xing, J., Johnston, J.J., Swensen, J.J., Johnson, W.E., Moore, B., Huff, C.D., Bird, L.M., Carey, J.C., Opitz, J.M., Stevens, C.A., Jiang, T., Schank, C., Fain, H.D., Robison, R., Dalley, B., Chin, S., South, S.T., Pysher, T.J., Jorde, L.B., Hakonarson, H., Lillehaug, J.R., Biesecker, L.G., Yandell, M., Arnesen, T., and Lyon, G.J.** (2011) Using VAAST to Identify an X-Linked Disorder Resulting in Lethality in Male Infants Due to N-Terminal Acetyltransferase Deficiency. *Am J Hum Genet* **89**, 28-43.
- Ross, S., Giglione, C., Pierre, M., Espagne, C., and Meinnel, T.** (2005). Functional and developmental impact of cytosolic protein N-terminal methionine excision in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **137**, 623-637.
- Rubio, V., Shen, Y., Saijo, Y., Liu, Y., Gusmaroli, G., Dinesh-Kumar, S.P., and Deng, X.W.** (2005). An alternative tandem affinity purification strategy applied to *Arabidopsis* protein complex isolation. *Plant J* **41**, 767-778.
- Ryan, M.T., Naylor, D.J., Hoogenraad, N.J., and Hoj, P.B.** (1995). Affinity purification, overexpression, and characterization of chaperonin 10 homologues synthesized with and without N-terminal acetylation. *J Biol Chem* **270**, 22037-22043.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., and Weigel, D.** (2006). Highly Specific Gene Silencing by Artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 1121-1133.
- Seo, J.H., Cha, J.H., Park, J.H., Jeong, C.H., Park, Z.Y., Lee, H.S., Oh, S.H., Kang, J.H., Suh, S.W., Kim, K.H., Ha, J.Y., Han, S.H., Kim, S.H., Lee, J.W., Park, J.A., Jeong, J.W., Lee, K.J., Oh, G.T., Lee, M.N., Kwon, S.W., Lee, S.K., Chun, K.H., Lee, S.J., and Kim, K.W.** (2010). Arrest defective 1 autoacetylation is a critical step in its ability to stimulate cancer cell proliferation. *Cancer Res* **70**, 4422-4432.
- Serero, A., Giglione, C., and Meinnel, T.** (2001). Distinctive features of the two classes of eukaryotic peptide deformylases. *J Mol Biol* **314**, 695-708.
- Serero, A., Giglione, C., Sardini, A., Martinez-Sanz, J., and Meinnel, T.** (2003). An unusual peptide deformylase features in the human mitochondrial N-terminal methionine excision pathway. *J Biol Chem* **278**, 52953-52963.

- Sherman, F., Stewart, J.W., and Tsunasawa, S.** (1985). Methionine or not methionine at the beginning of a protein. *Bioessays* **3**, 27-31.
- Siddig, M.A., Kinsey, J.A., Fincham, J.R., and Keighren, M.** (1980). Frameshift mutations affecting the N-terminal sequence of *Neurospora* NADP-specific glutamate dehydrogenase. *J Mol Biol* **137**, 125-135.
- Sin, N., Meng, L., Wang, M.Q., Wen, J.J., Bornmann, W.G., and Crews, C.M.** (1997). The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6099-6103.
- Singer, J.M., and Shaw, J.M.** (2003). Mdm20 protein functions with Nat3 protein to acetylate Tpm1 protein and regulate tropomyosin-actin interactions in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7644-7649.
- Singer, J.M., Hermann, G.J., and Shaw, J.M.** (2000). Suppressors of *mdm20* in yeast identify new alleles of *ACT1* and *TPM1* predicted to enhance actin-tropomyosin interactions. *Genetics* **156**, 523-534.
- Smyth, D.G., Massey, D.E., Zakarian, S., and Finnie, M.D.** (1979). Endorphins are stored in biologically active and inactive forms: isolation of alpha-N-acetyl peptides. *Nature* **279**, 252-254.
- Solbiati, J., Chapman-Smith, A., Miller, J.L., Miller, C.G., and Cronan, J.E., Jr.** (1999). Processing of the N termini of nascent polypeptide chains requires deformylation prior to methionine removal. *J Mol Biol* **290**, 607-614.
- Song, O.K., Wang, X., Waterborg, J.H., and Sternglanz, R.** (2003). An Nalpha-acetyltransferase responsible for acetylation of the N-terminal residues of histones H4 and H2A. *J Biol Chem* **278**, 38109-38112.
- Sonnichsen, B., Koski, L.B., Walsh, A., Marschall, P., Neumann, B., Brehm, M., Alleaume, A.M., Artelt, J., Bettencourt, P., Cassin, E., Hewitson, M., Holz, C., Khan, M., Lazik, S., Martin, C., Nitzsche, B., Ruer, M., Stamford, J., Winzi, M., Heinkel, R., Roder, M., Finell, J., Hantsch, H., Jones, S.J., Jones, M., Piano, F., Gunsalus, K.C., Oegema, K., Gonczy, P., Coulson, A., Hyman, A.A., and Echeverri, C.J.** (2005). Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **434**, 462-469.
- Starheim, K.K., Gromyko, D., Velde, R., Varhaug, J.E., and Arnesen, T.** (2009a). Composition and biological significance of the human Nalpha-terminal acetyltransferases. *BMC Proc* **3 Suppl 6**, S3.
- Starheim, K.K., Arnesen, T., Gromyko, D., Rynningen, A., Varhaug, J.E., and Lillehaug, J.R.** (2008). Identification of the human N(alpha)-acetyltransferase complex B (hNatB): a complex important for cell-cycle progression. *Biochem J* **415**, 325-331.
- Starheim, K.K., Gromyko, D., Evjenth, R., Rynningen, A., Varhaug, J.E., Lillehaug, J.R., and Arnesen, T.** (2009b). Knockdown of human N alpha-terminal acetyltransferase complex C leads to p53-dependent apoptosis and aberrant human *Arl8b* localization. *Mol Cell Biol* **29**, 3569-3581.

- Strous, G.J., van Westreenen, H., and Bloemendal, H.** (1973). Synthesis of lens protein in vitro. N-terminal acetylation of alpha-crystallin. *Eur J Biochem* **38**, 79-85.
- Strous, G.J., Berns, A.J., and Bloemendal, H.** (1974). N-terminal acetylation of the nascent chains of alpha-crystallin. *Biochem Biophys Res Commun* **58**, 876-884.
- Takeuchi, N., Kawakami, M., Omori, A., Ueda, T., Spremulli, L.L., and Watanabe, K.** (1998). Mammalian mitochondrial methionyl-tRNA transformylase from bovine liver. Purification, characterization, and gene structure. *J Biol Chem* **273**, 15085-15090.
- Tanaka, S., Matsushita, Y., Yoshikawa, A., and Isono, K.** (1989). Cloning and molecular characterization of the gene rimL which encodes an enzyme acetylating ribosomal protein L12 of Escherichia coli K12. *Mol Gen Genet* **217**, 289-293.
- Tercero, J.C., and Wickner, R.B.** (1992). MAK3 encodes an N-acetyltransferase whose modification of the L-A gag NH2 terminus is necessary for virus particle assembly. *J Biol Chem* **267**, 20277-20281.
- Tercero, J.C., Dinman, J.D., and Wickner, R.B.** (1993). Yeast MAK3 N-acetyltransferase recognizes the N-terminal four amino acids of the major coat protein (gag) of the L-A double-stranded RNA virus. *J Bacteriol* **175**, 3192-3194.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S., and Rothberg, J.M.** (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**, 623-627.
- Van Damme, P., Evjenth, R., Foyn, H., Demeyer, K., De Bock, P.J., Lillehaug, J.R., Vandekerckhove, J., Arnesen, T., and Gevaert, K.** (2011) Proteome-derived Peptide Libraries Allow Detailed Analysis of the Substrate Specificities of N{alpha}-acetyltransferases and Point to hNaa10p as the Post-translational Actin N{alpha}-acetyltransferase. *Mol Cell Proteomics* **10**, M110 004580.
- Vetting, M.W., de Carvalho, L.P., Roderick, S.L., and Blanchard, J.S.** (2005a). A novel dimeric structure of the RimL Nalpha-acetyltransferase from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **280**, 22108-22114.
- Vetting, M.W., LP, S.d.C., Yu, M., Hegde, S.S., Magnet, S., Roderick, S.L., and Blanchard, J.S.** (2005b). Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch Biochem Biophys* **433**, 212-226.
- Wang, Y., Mijares, M., Gall, M.D., Turan, T., Javier, A., Bornemann, D.J., Manage, K., and Warrior, R.** *Drosophila* variable nurse cells encodes arrest defective 1 (ARD1), the catalytic subunit of the major N-terminal acetyltransferase complex. *Dev Dyn* **239**, 2813-2827.

- Whiteway, M., and Szostak, J.W.** (1985). The ARD1 gene of yeast functions in the switch between the mitotic cell cycle and alternative developmental pathways. *Cell* **43**, 483-492.
- Whiteway, M., Freedman, R., Van Arsdell, S., Szostak, J.W., and Thorner, J.** (1987). The yeast ARD1 gene product is required for repression of cryptic mating-type information at the HML locus. *Mol Cell Biol* **7**, 3713-3722.
- Williams, B.C., Garrett-Engele, C.M., Li, Z., Williams, E.V., Rosenman, E.D., and Goldberg, M.L.** (2003). Two putative acetyltransferases, san and deco, are required for establishing sister chromatid cohesion in *Drosophila*. *Curr Biol* **13**, 2025-2036.
- Wroblewski, T., Tomczak, A., and Michelmore, R.** (2005). Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol J* **3**, 259-273.
- Yoshida, A., and Lin, M.** (1972). NH₂-terminal formylmethionine- and NH₂-terminal methionine-cleaving enzymes in rabbits. *J Biol Chem* **247**, 952-957.
- Yoshida, A., Watanabe, S., and Morris, J.** (1970). Initiation of rabbit hemoglobin synthesis: methionine and formylmethionine at the N-terminal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **67**, 1600-1607.
- Yoshikawa, A., Isono, S., Sheback, A., and Isono, K.** (1987). Cloning and nucleotide sequencing of the genes rimI and rimJ which encode enzymes acetylating ribosomal proteins S18 and S5 of *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* **209**, 481-488.
- Yu, M., Gong, J., Ma, M., Yang, H., Lai, J., Wu, H., Li, L., and Tan, D.** (2009). Immunohistochemical analysis of human arrest-defective-1 expressed in cancers in vivo. *Oncol Rep* **21**, 909-915.

6 Anhang

6.1 Proteinsequenzen

AtNAA10p (At5g13780): 192 bp

MVCIRRATVDDLLAMQACNLMCLPENYQMKYYLYHILSWPQLLYVAEDYNGRIVGVVLAKMEEESNECHG
 HITSLAVLRTHRKLGLATKLMTAAQAAMEQVYEAAYVSLHVRRSNRAAFNLYTETLGYKINDVEAKYYAD
 GEDAYDMRKNLKGKQNHHAHGHGHHGGCCSGDAKVVETAQAVDVGKAVSK

AtNAA15p (At1g80410.1):897 bp

MGASLPPKEANLFKLIKSYETKQYKKGLKAADAILKKFPDHGETLSMKGLTLNCOMDRKTEAYELVRLGV
 KNDIKSHVCWHVLGLLYRSREYREAIKCYRNALRIDPDNLEILRDLSLLQAQMRDLSGFVETRQQLLTL
 KPNHRMNWIGFAVSQHLNANASKAVEILEAYEGTLEDDYPPENELIEHEMILYKVSLLLEESGSDKALE
 ELHKKEPKIVDKLSYKEQEVSLLSKVGRLEEANKLYRVLLSMNPDNYRYHEGLQKCLGLYSESGQYSSDQ
 IEKLNALYQSLSEQYTRSSAVKRIPLDFLQDENFKEAVAKYIKPLLTKGVPSLFSDLSSLYDHPKPDIL
 EQLVEMKHSIGTTGSFPGSDVKEPPSTLLWTLFFLAQHYDRRGQYDVALCKIDEAIAHTPTVIDLYSVK
 SRIMKHAGDLTAAALADEARGMDLADRYINSECVKRMQLADQVPLAEKTAVLFTKEGDQLNHLHDMQCM
 WYDLASGDSYFRQDGLGRALKKFLAVEKHYADISEDQDFHSCYCLRKMTLRSYVDMLKFQDRLHSPYFH
 KAAIRAIRCYLKLHDSPKSTAGEDEMSKLAPAQKKIKKQKKAERAKKEAESKSEESTASGASKSGKRN
 VKPVDPPHGGKLIQVEEPMAEASKYLRLQLKHSPNSLETHLLSFEVNMKQKFLLAQAVKQLLKLGAE
 NPDSHRSLVKFFLMTESISAPTTEAEKLRWRVLEAERPSISQLQNKSLMEANKEFLGRHEDSLVHRAAYA
 EMLYILDPSKKTAEIKIIEDSTNKVVQTNEALGQAREWKLKDCIAVHTLLDVTLLDSQAASRWKSRCAEY
 FPCSTHFEGKHCSLMPDSVYNSSRKSNEGDTPNHPMGQTELSDGQLEAFKLSLVAT

In der Proteinsequenz von AtNAA15p, welche für die Lokalisierung in *Nicotiana sp.* benutzt wurde, wurde unbeabsichtigt Valin gegen Alanin ausgetauscht.

MGASLPPKEANLFKLIKSYETKQYKKGLKAADAILKKFPDHGETLSMKGLTLNCOMDRKTEAYELVRLGV
 KNDIKSHVCWHVLGLLYRSREYREAIKCYRNALRIDPDNLEILRDLSLLQAQMRDLSGFVETRQQLLTL
 KPNHRMNWIGFAVSQHLNANASKAVEILEAYEGTLEDDYPPENELIEHEMILYKVSLLLEESGSDKALE
 ELHKKEPKIVDKLSYKEQEVSLLSKAGRLEEANKLYRVLLSMNPDNYRYHEGLQKCLGLYSESGQYSSDQ
 IEKLNALYQSLSEQYTRSSAVKRIPLDFLQDENFKEAVAKYIKPLLTKGVPSLFSDLSSLYDHPKPDIL
 EQLVEMKHSIGTTGSFPGSDVKEPPSTLLWTLFFLAQHYDRRGQYDVALCKIDEAIAHTPTVIDLYSVK
 SRIMKHAGDLTAAALADEARGMDLADRYINSECVKRMQLADQVPLAEKTAVLFTKEGDQLNHLHDMQCM
 WYDLASGDSYFRQDGLGRALKKFLAVEKHYADISEDQDFHSCYCLRKMTLRSYVDMLKFQDRLHSPYFH
 KAAIRAIRCYLKLHDSPKSTAGEDEMSKLAPAQKKIKKQKKAERAKKEAESKSEESTASGASKSGKRN
 VKPVDPPHGGKLIQVEEPMAEASKYLRLQLKHSPNSLETHLLSFEVNMKQKFLLAQAVKQLLKLGAE
 NPDSHRSLVKFFLMTESISAPTTEAEKLRWRVLEAERPSISQLQNKSLMEANKEFLGRHEDSLVHRAAYA

EMLYILDPSKKTAEAIKIIEDSTNKVVQTNEALGQAREWKLKDCIAVHTLLDVTLLDSQAASRWKSRCAEY
FPCSTHFEGKHCSLMPDSVYNSSRKSNEGDTPNHPMGQTELSDGQLEAFKSLSVAT

AtNAA20p (At1g03150AV821903): 174 bp

MTTIRRFSCNDLLRFTSVNLDHLETETFNMSFYMTYLARWPDYFHVAEGPGNRVMGYIMGKVEGQGESWHG
HVTAVTVSPEYRRQQLAKKLMNLEDISDKIDKAYFVDLFRASNTPAIKMYEKLGYIIYRRVLRYSGE
EDGLDMRKALSRNVEKKSVIPLKRPITPDELEYD

AtNAA50p (At5g11340):164 bp

MGAGREVSVS LDGVRDKNLMQLKILNTVLFVRYNDKYYADAI AAGEFTKLAYYNDICVGAIAACRLEKKE
SGAMRVYIMTLGVLAPYRGIGIGSNLLNHVLDMCSKQNMCEIYLHVQTNNEDAIKFYKKFGFEITDTIQN
YYINIEPRDCYVVS KSFAQSEANK

ScNaa10p (Yhr013cp): 238 bp

MPINIRRATINDIICMQNANLHNL PENYMMKYMYHILSWPEASFVATTTTTLDCEDSDEQDENDKLELTL
DGTNDGRTIKLDPTYLAPGEKLVGYVLVKMNDPDPQNEPPNGHITSLSVMRTYRRMGIAENLMRQALFA
LREHVQAEYVSLHVRQSNRAALHLYRDTLAFEVLSIEKSYQDGEDAYAMKKVLKLEELQISNFTHRRLK
ENEEKLEDDLES DLLEDIIKQGVNDIIV

ScNaa15p (Ydl040cp): 854 bp

MSRKRSTKPKPAKIALKKENDQFLEALKLYEGKQYKKS LKLLDAI LKKDGS HVDSLALKGLDLYSVGEK
DDAASYVANAIKIEGASASPICCHVLGIYMRNTKEYKESIKWFTAALNNGSTNKQIYRDLATLQSQIGD
FKNALVSRKKYWEAFLGYRANWTS LAVAQDVNGERQQAINTLSQFEKLAEGKISDSEKYEHS ECLMYKND
IMYKAASDNQDKLQNVL KHLNDIEPCVFDKFLLERKATIYMKLGQLKDASIVYRTL IKRNPDNFKYYKL
LEVSLGIQGDNKLK KALYKLEQFYPRCEPPKFIPLTFLQDKEELSKKLREYVLPQLERGVPATFSNVKP
LYQRRKSKVSPLEKIVLDYLSGLDPTQDPIPF IWTNYYSQHFLFLKDFPKAQEYIDAALDHTPTLVEF
YILKARILKHLGLMDTAAGILEEGRQLDLQDRFINCKTVKYFLRANNIDKAVEVASLFTKNDDSVNGIKD
LHLVEASWFIVEQAEAYRLYLDRKKKLDL ASLKKEVESDKSEQIANDIKENQWLVRKYKGLALKRFNA
IPKFYKQFEDDQLDFHSYCMRKGT PRAYLEMLEWGKALYTKPMYVRAMKEASKLYFQM HDDRLKRKSDSL
DENSDEIQNNGQNSSSQKKKAKKEAAAMNKRKETEAKSVAAYPSDQDNDVFG EKLIETSTPMEDFATEFY
NNYSMQVREDERDYILD FEFNYRIGKLALCFASLNKFAKRFGTTSGLFGSMAIVLLHATRNDTPFDPI LK
KVVTKSLEKEYSENFP LNEISNNSFDWLN FYQEFKGN DINGLLFLYRYRDDVPIGSSNLKEMIISSLS P
LEPHSQNEILQYYL

ScNaa20p (Ypr131cp): 195 bp

MTTIQPFEPVDFLKTNNVNLDDILTENFPLEFYFEYMI IWPDLFFKSSEMTVDPTFKHNISGYMMAKTEGK
 TTEWHTHITAVTVAPRFRRISLASKLCNTLETMTDVMPEVNFIDLFVKCNNQLAIKLYEKLGYSVYRRV
 VGYYN SAEDGYPDTLKKVDDNKDAFDMRKAMARDNRNSVRPDGRSHKCYPHDVRF

HsNaa50p (NP_079422.1): 169 bp

MKGSRIELGDVTPHNIKQLKRLNQVIFPVSYNDKFKYKDVLEVGE LAKLAYFN DIAVGAVCCRVDHSQNQK
 RLYIMTLGCLAPYRRLGIGTKMLNHVLNICEKDGTFDNIYLVHQISNESAI DFYRKFGFEI IETKKNYYK
 RIEPADAHVLQKNLKVPSGQNADVQKTDN

Proteinsequenzen identifiziert mittels massenspektrometrischer Analyse**At1g13930: 155 bp**

MNFISDQVKKLSSTPEEPDHNK PVEGTETATRPATNAELMASAKVVAEAAQAAARNESDKLDKGKVAGA
 SADILDAAEKYKGFDEKSSSTGQYLDKAEKYLNDYESSHSTGAGGPPPPPTSQAEPASQPEPAAKKDDEESG
 GGLGGYAKMAQGFLK

At2g21250.1: 309 bp

MEITLNSGFKMPIVGLGVWRMEKEGIRD LILNAIKIGYRHLDCAADYRNETEVGDALTEAFKTGLVKRED
 LFITTKLWNSDHGHVIEACKDSLKQLDYLDLFLVHFVPVATKHTGVGTTDSALGDDGVLDIDTTISLET
 TWHDMEKLVSMGLVRSIGISNYDVFLTRDCLAYSKIKPAVNQIETHPYFQRDSL VKFCQKHGICVTAHTP
 LGGATANA EWFGTVSCLDDPVLKDVAEKYKKTVAQVVLRWGIQRKTVVIPKTSKPARLEENFQVDFEELS
 KEDMEVIKSMERKYRTNQPAKFWNIDL YA

At2g24940: 100 bp

MEFTAEQLSQYNGTDESKPIYVAIKGRVFDVTTGKSFYGGDYSMFAGKDASRALGKMSKNEEDVSPSL
 EGLTEKEINTLNDWETKFEAKYPVVGRVVS

At3g52990: 527 bp

MHSSHLLLEPIRMASILEPSKSSFFPALT KIVGTLGPKSRSVEALSGCLKAGMSVARFDFSWGDADYHQ
 ETLDNLKVAVRSTKKLCAVMLDVTGPELQVINKSEKAITLKADGLVTLTPNQDQEASSEVLPINFNGLAK
 AVKKGDTIFVGQYLFTGSETTSVWLEVDEVKDDVICLSRNAATLAGSLFTLHSSQVHIDLPTLTEKDKE
 VISTWGVQNKIDFLSLSYCRHAEDVRQTREMLKKLGDL SQTQIFAKIENVEGLTHFDEILQEADGIILSR
 GNLGIDLPEKVFVLFQKAALYKCNMAGKPAVLTRVVD SMTDNLRPTRAEATDVANAVLDGSDAILLGAET

LRGLYPVETISTVGRICAEAEKVFNQDLYFKKTVKYVGPEMTHLESIASSAVRAAIKVKASVIICFTSSG
 RAARLIAKYRPTMPVISVVI PRVKTNQLKWSFSGAFEARQSLIVRGLFPMLADPRHPAESTSATNESVLK
 VALDHGKHAGVIKSHDRVVVCQKVG DASVVKIIELED

At3g59920: 444 bp

MHSSHLLEPIRMASILEPSKSSFFPALTKIVGTLGPKSRSVEALSGCLKAGMSVARFDFSWGDADYHQ
 ETLDNLKVAVRSTKKLCAVMLDVTGPELQVINKSEKAITLKADGLVTLTPNQDQEASSEVLPINFNLAK
 AVKKGDTIFVGQYLFTGSETTSVWLEVDEVKGDVVICLSRNAATLAGSLFTLHSSQVHIDLPTLTEKDKE
 VISTWGVQNKIDFLSLSYCRHAEDVRQ TREMLKKLGDL SQTQIFAKIENVEGLTHFDEILQEADGIILSR
 GNLGIDL PPEKVFLFQKAALYKCNMAGKPAVLTRVDSMTDNL RPTRAEATDVANAVLDGSDAILLGAET
 LRGLYPVETISTVGRICAEAEKVFNQDLYFKKTVKYVGPEMTHLESIASSAVRAAIKVKASVIICFTSSG
 RAARLIAKYRPTMPVISVVI PRVKTNQLKWSFSGAFEARQSLIVRGLFPMLADPRHPAESTSATNESVLK
 VALDHGKHAGVIKSHDRVVVCQKVG DASVVKIIELED

At4g09320: 169 bp

MCGLYINLFCLLRITSNKKTMEQTFIMIKPDGVQRGLIGEVICRFEKKGFTLTKGLKLISVERSFAEKHYE
 DLSSKSFFSGLVDYIVSGPVVAMIWEGKNVLTGRKIIIGATNPAASEPGTIRGDFAIIDGRNVIHGSDSV
 ESARKEIALWFPDGPVNWQSSVHPWVYET

6.2 Identifizierung der orthologen AtNAA10, AtNAA15, AtNAA20, AtNAA50 Proteine

Protein	Score	E-Value
At5g13780 (NAA10p)	155	2e-38
At1g03150	69	4e-12
At1g03650	50	2e-06
At2g38130	49	4e-06
At2g38130	49	4e-06
At2g06025	45	3e-05
At5g11340	39	0,002
At2g30090	35	0,034
At5g16800	34	0,091

At5g16800	33	0,12
At5g16800	33	0,13
At3g02980	33	0,13
At2g39000	32	0,37
At2g39000	32	0,37
At1g24040	31	0,72
At1g24040	31	0,72

Protein	Score	E-Value
At1g80410.2	305	1e-82
At1g80410.1(NAA15p)	304	2e-82
At3g46220	39	0.011
At3g46220	38	0.025
At3g46220	38	0.025
At3g11540	35	0.26
At3g11540	33	0.62
At3g51770	33	1.1
At3g51770	33	1.1
At4g28010	32	2.6
At1g10810	31	3.2
At4g37460	30	5.4
At4g21065	30	6.4
At4g21065	30	6.7
At1g61080	30	8.5

Protein	Score	E-Value
At1g03150 (NAA20p)	122	2e-28
At5g13780.	75	3e-14
At3g57430	28	2.9
At2g33080	28	4.2
At2g33060	27	8.0

Protein	Score	E-Value
At5g11340 (NAA50p)	61	3e-10
At4g14920	34	0.042
At5g16800	30	1.2
At5g16800	30	1.2
At5g16800	30	1.2
At3g17360	28	2.2
At2g22620	28	3.6
At2g22620	28	3.6
At5g36740	28	4.1
At2g18260	28	4.3
At4g37950	27	9.4

6.3 Primersequenzen

6.3.1 Genotypisierungsprimer

#	Sequenz (5'→3')
309	gaccgcttgctgcaactcttcagg
321	tagcatctgaatttcataaccaatctcgatacac
597	catcatctaaaggctcttgag
598	ttctacatggttcagttatggg

601	accactggcagttgattcttc
602	gtttctcaacacagagccg
603	tcactttgtgaacccttg
604	aacaagcaaaactcgaaacc
645	gaccaacattacaacacgatg
646	aatggattgacttctctcagc
680	ccatgcttctatgcatcttc
681	ggatgatttccatctccacc
682	aactcgtcaagaaggc gatagaagg
683	cgatcaggatgatctggacgaaga
783	gggaaaactgtacaagccaag
784	ctgccatggaacaggttactc
785	tgccaaagataatgaagcagg
786	gtggatgcctatgttggtacg
789	aacgtcccaatgtgtattaagtgtc
967	ctggtgtgttgaagctcttac
1192	gacaccgcgcgcgataatttat
1193	caagccgtttacgtttggaac
1280	ggagtcgttaacgagttgac
1281	gcgtttactcataagaacgcga
1389	tccagaagaagatgttggcga
1390	tcgaaaagtgcacagcgtct
1416	ggtagaccaatcctaaccaatgt
1417	tttgaaactgctttaccatctac
1454	ctaatcgattatcatcccctc
1490	gcaagtggattgatgatatc

Primer-Kombinationen für die Selektion der T-DNA-Insertionslinien

T-DNA-Linie	Nachweis des WT-Allels	Nachweis des T-DNA-Allels
<i>naa10-1</i>	784+783	784+789
<i>naa15-1</i>	602+601	602+321
<i>naa15-2</i>	786+785	786+789
<i>naa20-1</i>	598+597 598+967	598+309
<i>naa20-2</i>	681+680	681+321
<i>naa50-1</i>	646+645	646+321
<i>naa50-2</i>	604+603	604+321
<i>nat2</i>	1280+1281	1280+309

6.3.2 Primer für die RT-PCR-Analyse

#	Sequenz (5'→3')
364	caaccggtattgtgctcgattc
436	aacctcaggacaacggaatctc
972	catgacctatttagcgagatggcctg
998	gcgagatggcctgactatttc
999	gtgtgataggtctcttgagagg
1000	gtatcgctagatggagtcagag
1001	gacaacgtagcaatctcttggc
1250	atgggagctgggagagaag
1251	caagcttggatgaattcgccg
1252	atgacgacgatacgtagattc
1253	tataaccatgacacgattgc
1522	accaccactttggactgtgaag
1523	cttcttcatggcgtatgcatctt
1524	gcacactcatataactgcagtg

1525	ccactctcctgtagactg
1539	tatggcttcttccatccggc
1562	atatcctctcatggcctcagct
1563	ctgctttaccatctacggcttg
1602	cgttacaacgacaagtactacgc
1603	ggatatctgtgatctcaaagccga
1604	gttggtcgtctagaagaagcca
1605	tagcttcacggcaagtgcag
1663	gcagttgacttgggagagtcac

Primer-Kombinationen für die RT-PCR-Analyse

Locus	5' Terminus	3' Terminus
At5g13780	1562	1563
At1g80410	1604	1605
	1604	1663
At1g03150	972	999
	998	999
	1252	1253
At5g11340	1602	1603
	1000	1001
	1250	1251
At5g09810	364	436

6.3.3 Klonierungsprimer

#	Sequenz (5'→3')
A	ctgcaaggcgattaagtccgtaac
B	gcggataacaatttcacacagaaacag
750	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctgcatggtttgcatcaggcgagcgacg

751	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctttggaaactgctttaccatctac
752	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctgcatgcctattaatattcgagagc
753	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctacaatgatatctacgccttgctt
754	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctgcatgggagctgggagagaagttag
755	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctttgttgcttcagattgagcaa
764	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctgcatgggggcttcgcttcctcctaa
765	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcgggtgcaactgagaggctcttgaa
766	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctgcatgtctaggaaaagaagtactaa
767	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtccaagtaactgtagaatttcggt
768	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctgcatgacgacgatacgtagattcag
769	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcatcactactaattcatcaggtgt
770	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctgcatgacaacaattcagcctttgaa
771	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcaaatcttacatcatgtggatagca
776	ggggacaagttgtacaaaaagcaggctgcatgaaaggtagccggatcgagct
777	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctcagttgtctgtctttgacatc
778	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctcattgttgcttcagattgagc
921	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctcaggtgcaactgagaggctcttgaa
1002	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctcattggaaactgctttaccatctac
1003	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcttaatacactactaattcatcaggtgt
1111	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctatacaatgatatcattacgccttg
1112	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctacaagtaactgtagaatttcggt
1113	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtctaaaatcttacatcatgtggatagca
1160	gatagtcataaattcaggtggtctctctttgtattcc
1161	gaccacctgaaattgcatgactatcaagagaatcaatga
1162	gaccccctgaaattgatgactttcacaggtcgtgatatg
1163	gaaagtcaccaattcaggggtctacatatattcct

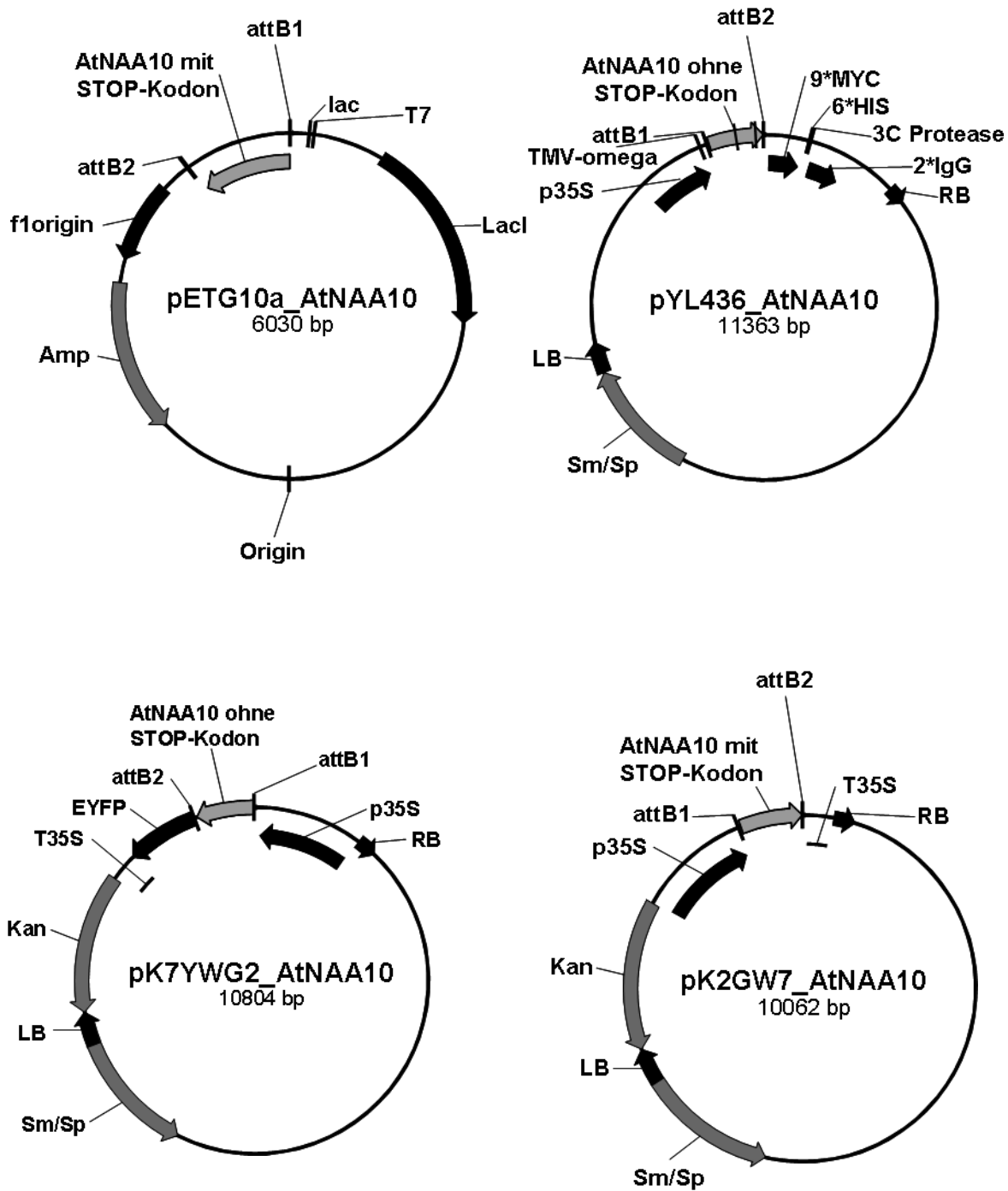
6.3.4 Sequenzierungsprimer

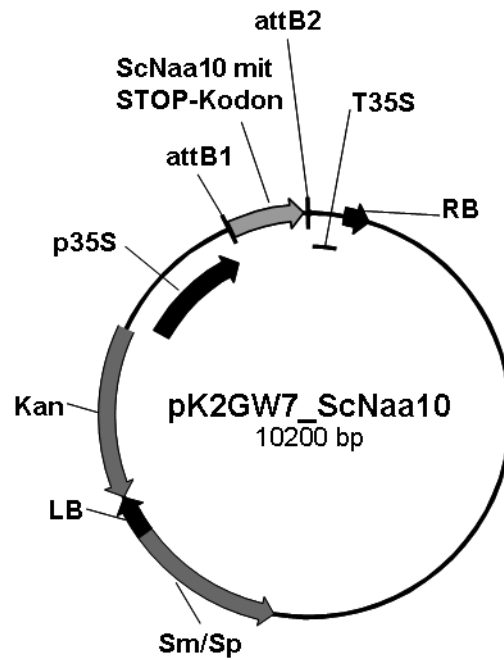
#	Sequenz (5'→3')
689	tcgcgtaacgctagcatggatctc
690	gtaacatcagagatttgagacac
895	gggaagcattccttggttac
896	ttcgccgaatacatcgttat
897	aatgaactggattggcttg
898	tgcaattgactgattgatgg
899	tggtatgatcttgcacctgg
907	ctctgtaaaattgatgaggc
908	gtccggattagatcctacgc
1142	gacaagtacaaaatgtattga
1143	catcctcaaggcacgtatcctg
1144	catctaaagaatcggactttct
1391	ttccattgccagctatctgt
1392	ccatggcgccttaataa
1451	gtcttgctaagatggaggaag
1452	cggtttgtcccgggttcgta
1453	ctggcatggtcatgtgacagc
1467	tagaggctgagcgcccatcaat

6.4 Karten hergestellter Konstrukte

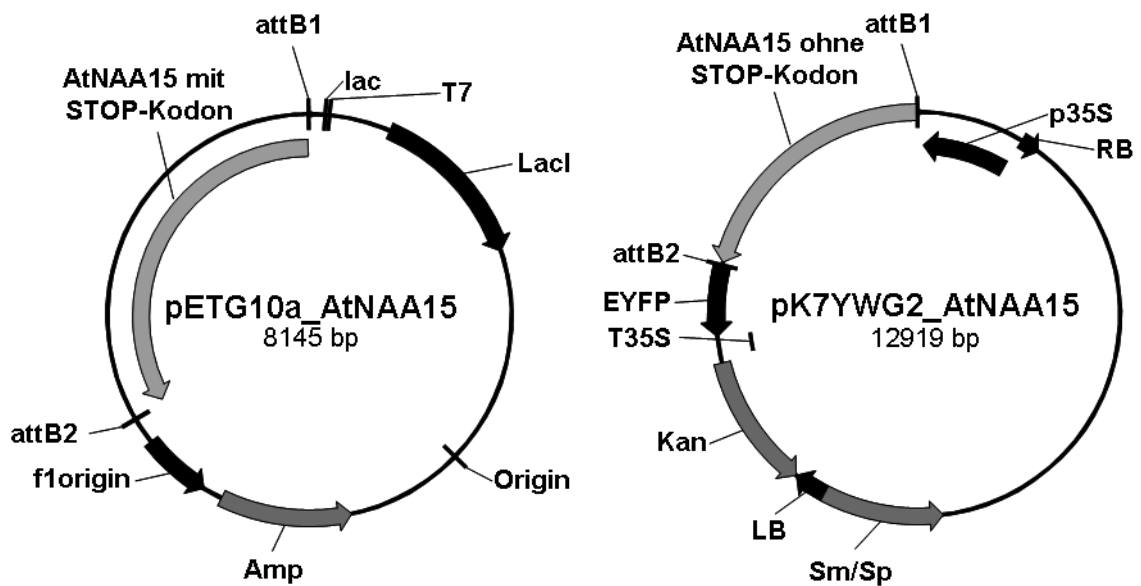
Die schematische Darstellung hergestellter Konstrukte wurde mit dem Programm Vector NTI 9 (AlignX) durchgeführt.

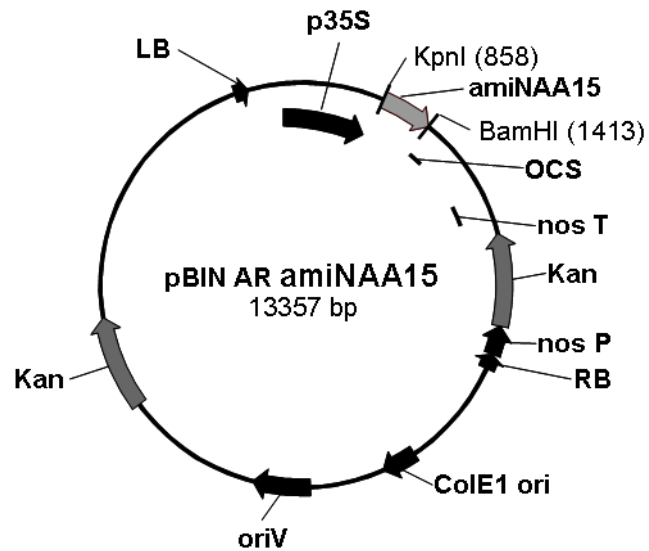
- A. Für die Charakterisierung von AtNAA10p wurden folgende Konstrukte verwendet:



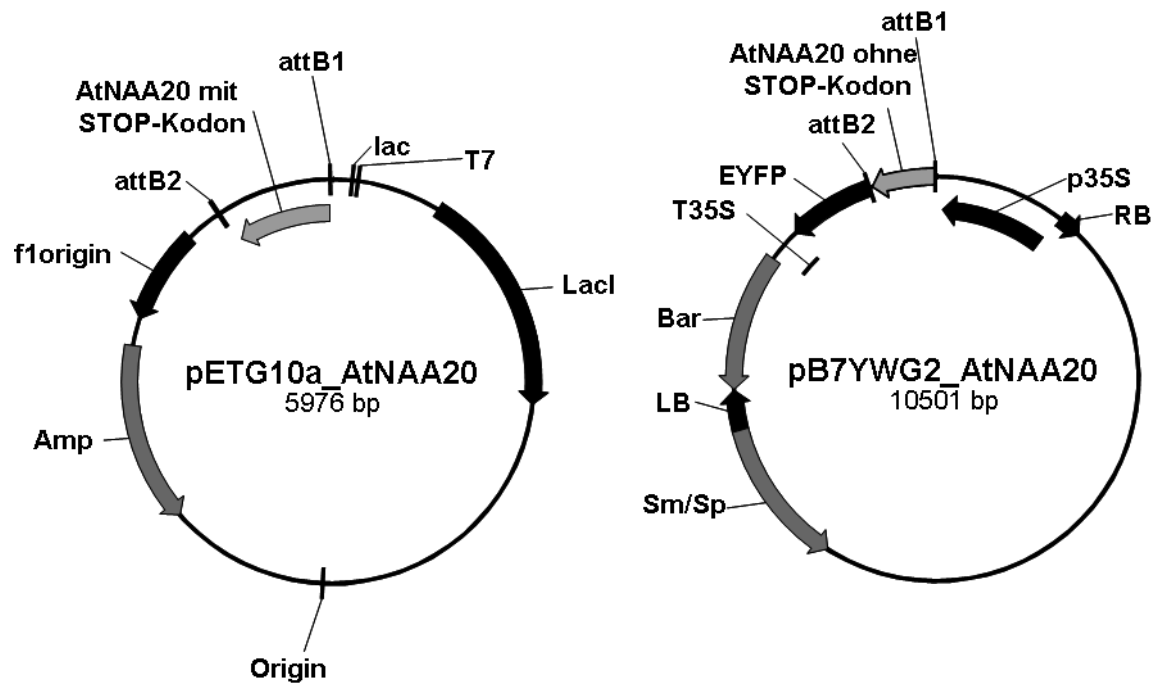


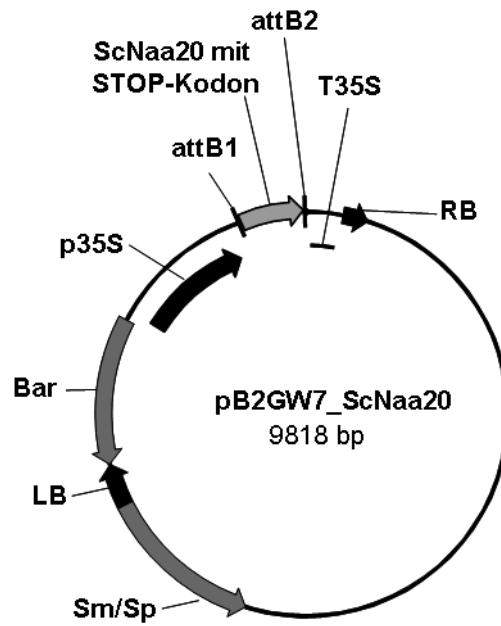
- B. Für die Charakterisierung von AtNAA15p wurden folgende Konstrukte verwendet:



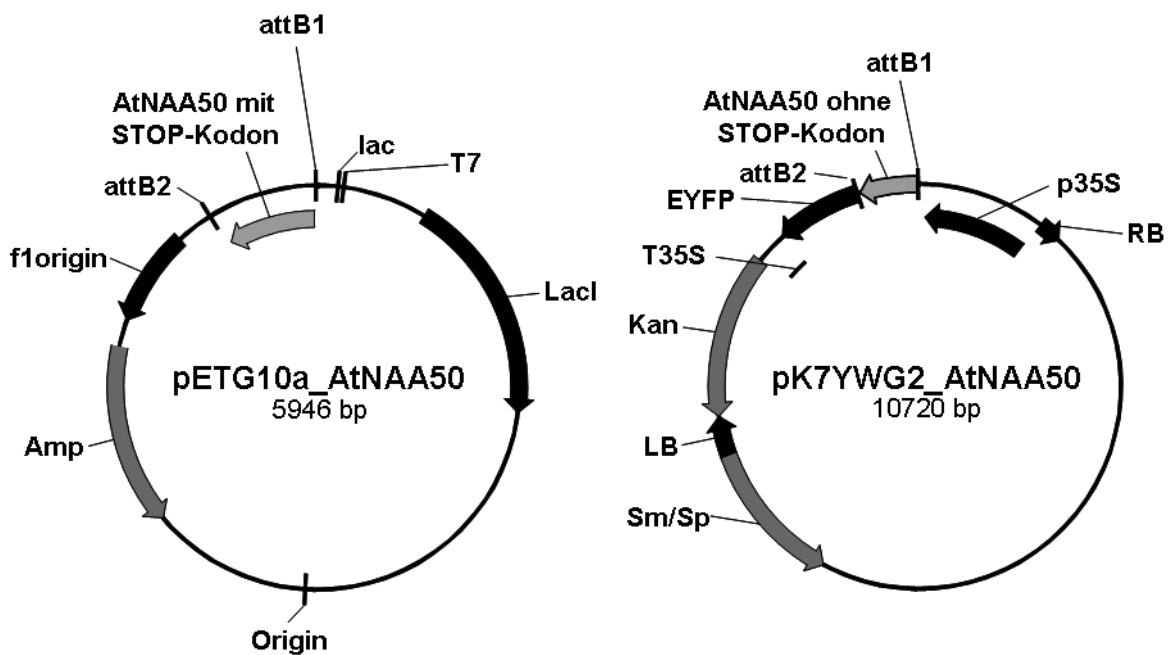


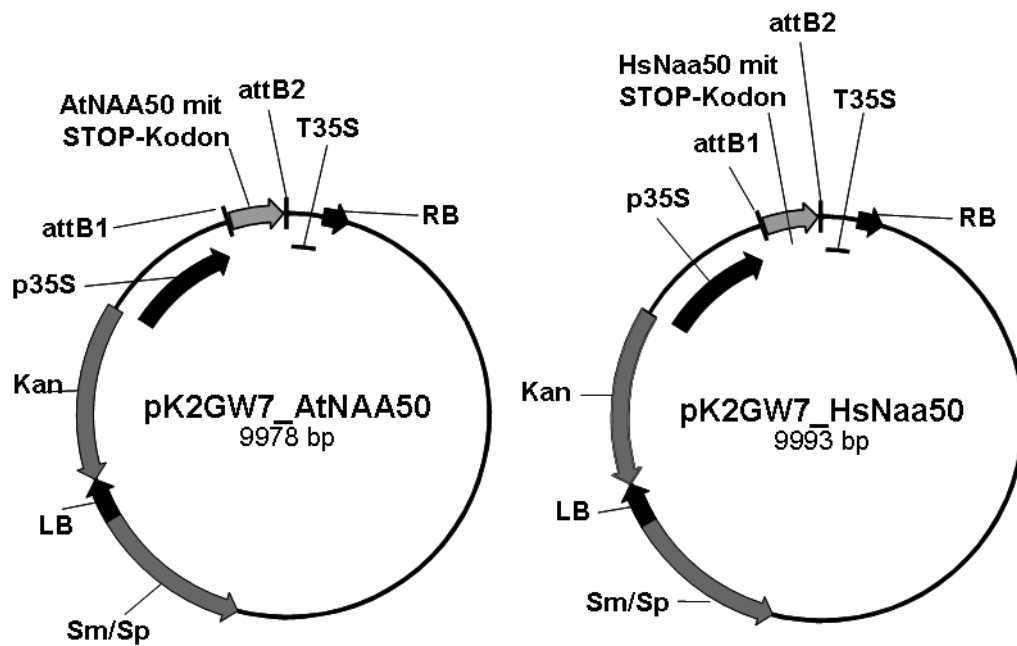
- C. Für die Charakterisierung von AtNAA20p wurden folgende Konstrukte verwendet:



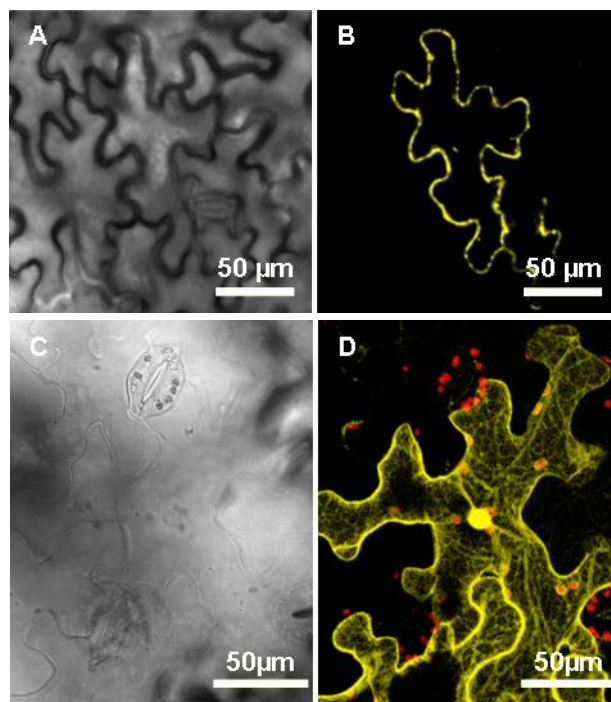


- D. Für die Charakterisierung von AtNAA50p wurden folgende Konstrukte verwendet:



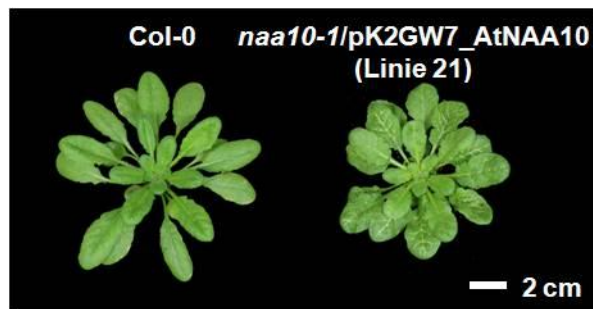


6.5 Subzelluläre Lokalisierung von AtNAA20 und AtNAA50 in *N. tabacum*



Die Expression von AtNAA20:YFP (A, B) und AtNAA50:YFP (C, D) in *N. tabacum*. (A, C) Durchlichtbilder, (B, D) Detektion der YFP-Fluoreszenz wurde gelb und Autofluoreszenz von Plastiden rot dargestellt.

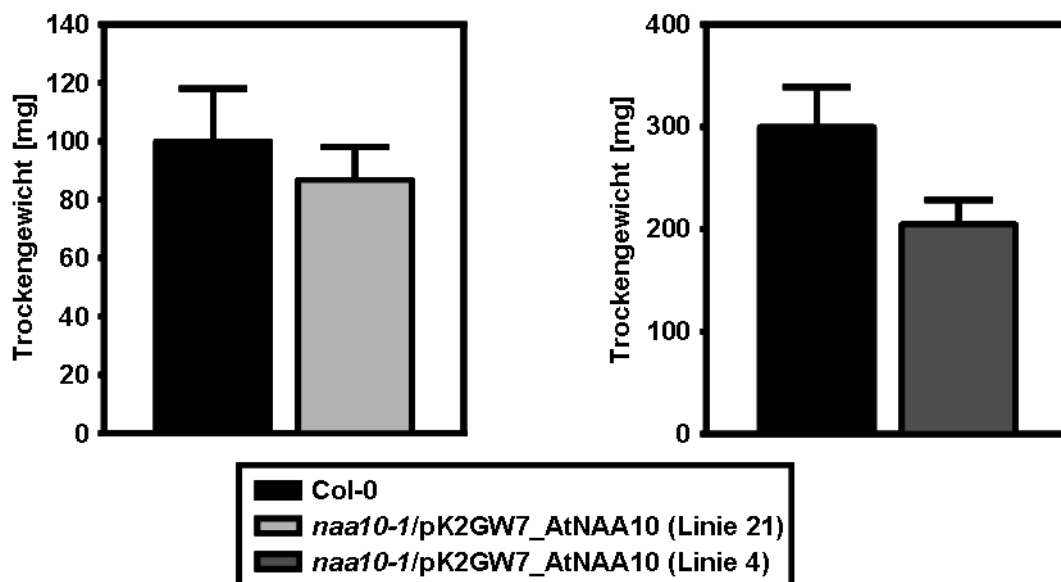
6.6 Komplementierung des *naa10*-Phänotyps



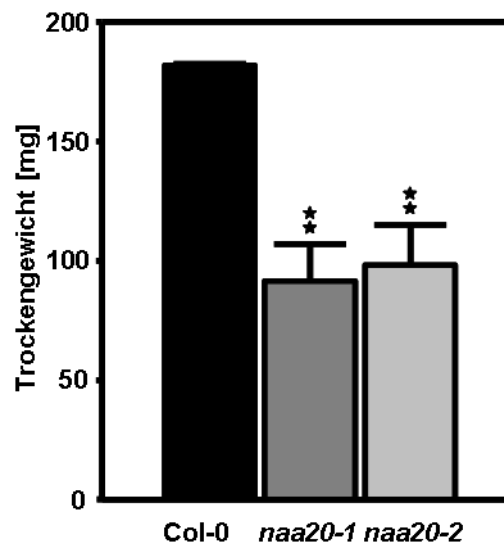
Der Phänotyp acht Wochen alter Wildtyp- (Col-0) und *naa10-1/pK2GW7_AtNAA10*-Pflanzen.

6.7 Trockengewicht

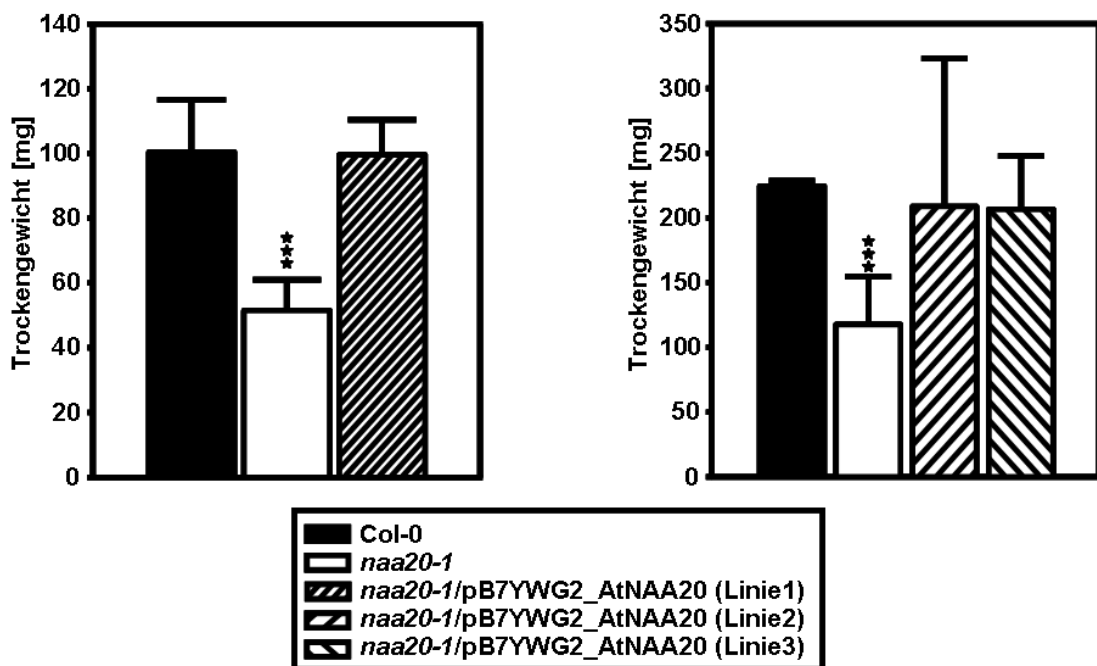
A.



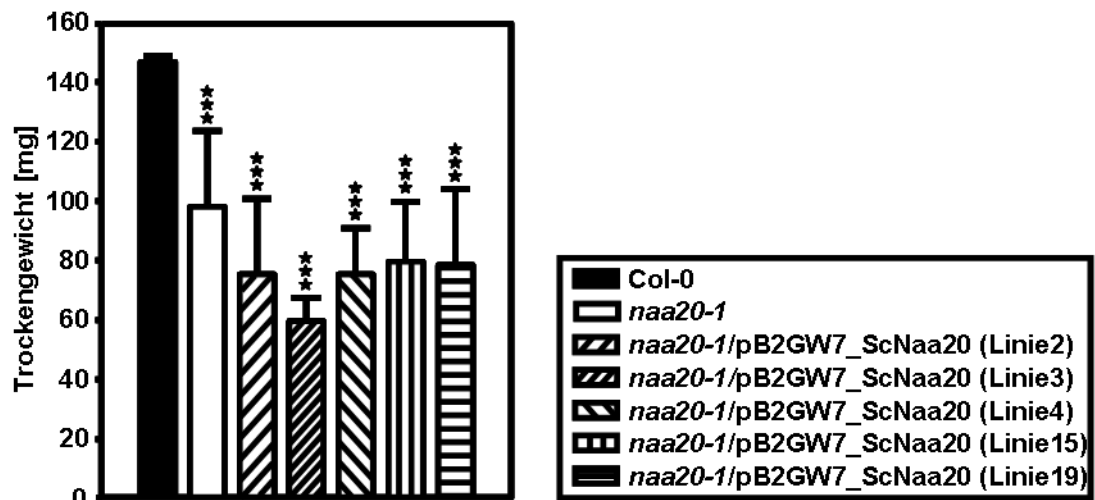
B.



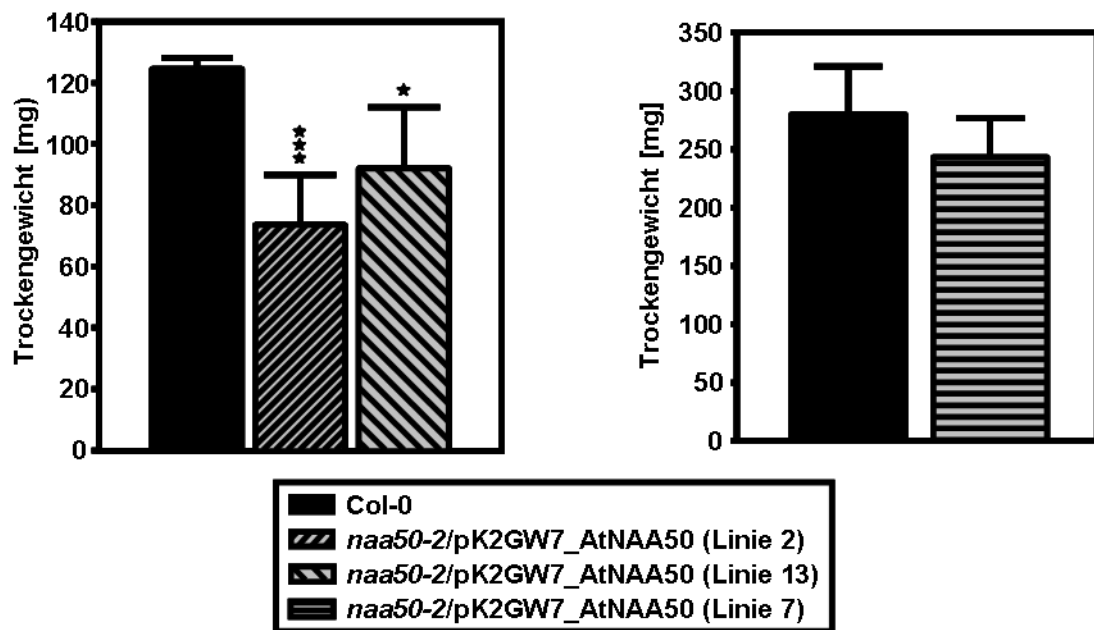
C.



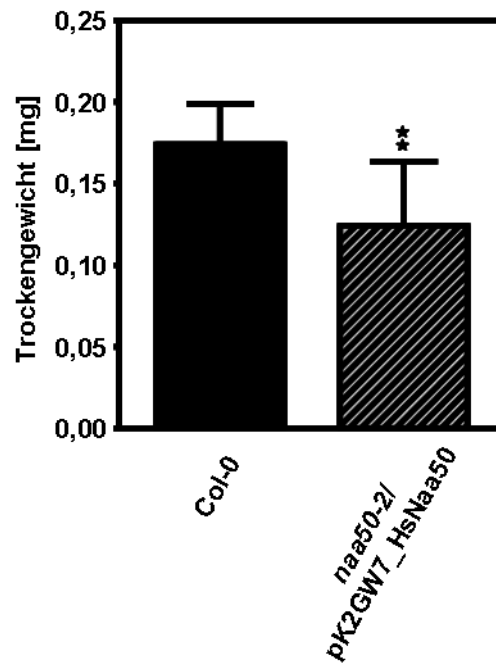
D.



E.



F.



6.8 Lokalisierungsvorhersage der putativen NatB-Substrate

Programm	At4g09320	At2g24940	At1g13930	At3g59920	At2g21250.1	At3g52990
TargetP	kein cTP, mTP, SP	kein cTP, mTP, SP	kein cTP, mTP, SP	kein cTP, mTP, SP	kein cTP, mTP, SP	kein cTP, mTP, SP
SignalP	kein Transitpept.	kein Transitpept.	kein Transitpept.	kein Transitpept.	kein Transitpept.	kein Transitpept.
MITOPRED	kein mTP	kein mTP	kein mTP	kein mTP	kein mTP	kein mTP
SubLoc	Cytosol	Cytosol	Zellkern	Cytosol	Cytosol	Cytosol
PSORT	Peroxisome	Cytosol	Cytosol	Zellkern	Peroxisome	Cytosol
WoLF PSORT	Zellkern	Zellkern	Zellkern	Cytosol	Cytosol	Cytosol
LOctree	Cytosol	Cytosol	-	Cytosol	Cytosol	Plastid

cTP: Chloroplast Transidpeptid; mTP: Mitochondrial Transidpeptid; SP: sekretorischer Weg

Publikationen

Stephan I., Hell R., Wirtz M. Possible connection of sulfur and C2-subunit metabolism by N-terminal acetylation of proteins. Editors: A. Sirko, L.J. De Kok, S. Haneklaus, M.J. Hawkesford, H. Renneberg, K. Saito, E. Schnug, I. Stulen. Sulfur metabolism in plants. Backhuys Publishers, Leiden, Margraf Publishers, Weikersheim (2009).

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werke wörtlich oder inhaltlich entnommen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Darüber hinaus erkläre ich, dass ich den Doktorgrad nicht besitze und mich auch früher nicht um die Erlangung des Doktorgrades beworben habe.

Ort, Datum

Iwona Stephan

Danksagung

Zunächst möchte ich Professor Dr. Rüdiger Hell für sein Vertrauen in mich danken, welches mir den Mut gegeben hat, solche Herausforderung wie die Dissertation anzunehmen. Ich bedanke mich auch recht herzlich für die Unterstützung während der wissenschaftlichen Arbeit, die auch weit darüber hinausging.

Besonders hervorheben möchte ich Dr. Markus Wirtz, der mit seinen großartigen Vorschlägen und umfassenden Diskussionen zum Erfolg dieser Arbeit maßgeblich beigetragen hat.

Mein Dank gilt auch PD Dr. Andreas Meyer für die unerlässliche Hilfe am CLSM.

Des Weiteren danke ich den Kooperationspartnern, Dr. Thomas Arnesen für die Durchführung des Aktivitätstests, Prof. Simon G. Møller für die wertvollen Informationen über die Interaktionsstudie, Dr. Thomas Ruppert und Fabian Hosp für die Durchführung der massenspektrometrischen Analyse.

Ein großes Dankeschön möchte ich für alle Kollegen aus der AG Hell aussprechen. Vor allem danke ich Euch für die Hilfsbereitschaft während meiner Schwangerschaft. Besonders hervorheben möchte ich Eric Linster und Dr. Malgorzata Lewandowska. Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Corinna Wolf, Monika Huber und Hannah Birke, die mich während der Schreibphase unterstützten. Außerdem danke ich Hannah für ihre sympathische Art, die mich stets zum Lächeln gebracht hat. Meiner aller ersten Praktikantin Monika, die mittlerweile zur „Nat-Familie“ gehört☺ für die fachlichen Gespräche, die auch weit darüber hinausgingen. Corinna für die anfängliche Hilfe im Labor und ihr offenes Ohr.

Moim rodzicom dziekuje za ich bezgraniczna milosc oraz wsparcie. Bez Was nigdy bym tego wszystkiego nie osiagnela! Ania dziekuje Ci za to ze jestes, ze zawsze moge na Ciebie liczyc. Ich möchte mich auch bei Willi für die liebevolle Aufnahme in die Familie und bei Helga für die Betreuung von Niklas bedanken. Meinen Freunden besonders Renata und Julija danke ich für alle Gespräche, die mir in der letzten Zeit mehrmals geholfen haben.

Meinem Mann Alex danke ich vor allem für das wunderbarste Geschenk, für unseren Sohn Niklas, der mir die Kraft gibt stets weiterzumachen!!!