

**Proteomanalysen zur Charakterisierung
agronomisch bedeutender Merkmale in
Brassica napus L. und *Solanum tuberosum* L.**

Von dem Fachbereich Biologie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Ing. agr. Christina Mihr

geboren am 18.08.1970 in Homberg/Efze

2003

Referent: Professor Dr. Hans Peter Braun
Korreferent: Professor Dr. Hans-Jörg Jacobsen

Tag der Promotion: 18.06.2002

Berichte aus der Biologie

Christina Mihr

**Proteomanalysen zur Charakterisierung
agronomisch bedeutender Merkmale in
Brassica napus L. und *Solanum tuberosum* L.**

Shaker Verlag
Aachen 2003

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Mihr, Christina:

Proteomanalysen zur Charakterisierung agronomisch bedeutender Merkmale in
*Brassica napus*L. und *Solanum tuberosum*L. / Christina Mihr.

Aachen : Shaker, 2003

(Berichte aus der Biologie)

Zugl.: Hannover, Univ., Diss., 2002

ISBN3-8322-1153-5

Copyright Shaker Verlag 2003

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen
oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungs-
anlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-1153-5

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Kurzzusammenfassung

Die Proteomanalyse basiert in der Regel auf zweidimensionalen Gelelektrophoresen zur Auftrennung komplexer Proteingemische und massenspektrometrischen Verfahren zur Identifizierung der interessierenden Eiweiße. Sie dient der Untersuchung des Proteoms, das heißt der Gesamtheit der Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus.

Die Darstellung pflanzlicher Proteome ist aufgrund der Widerstandsfähigkeit der Zellwand, dem Vorkommen von Vakuolen, sowie zahlreicher sekundärer Inhaltsstoffe und Pigmente besonders schwierig. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb zunächst Methoden zur Isolation von Gesamteiweißfraktionen aus Kartoffel und Raps etabliert. Bei verschiedenen Kartoffelgeweben erwies sich die Präzipitation mit Ammoniumacetat in Methanol nach einer Phenolextraktion als geeignet, während bei Raps mit der TCA/Aceton-Fällung gute Ergebnisse erzielt wurden. Da im Fall von Raps ein Großteil der anvisierten Untersuchungen am mitochondrialen Proteom durchgeführt werden sollten, wurden darüber hinaus Mitochondrienisolationen für etiolierte und grüne Rapsgewebe optimiert.

Die optimierten Methoden wurden zur Darstellung der Proteome verschiedener Gewebe von Kartoffel und Raps bezüglich der nachfolgend dargestellten Fragestellungen eingesetzt.

1) Im Fall der Kartoffel wurden Gesamteiweißextrakte aus Blättern, Stängeln, Wurzeln und Knollen engerwandter Kartoffellinien, die sich hinsichtlich ihrer Ertragsleistung unterscheiden, mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt, wobei zahlreiche genotyp- aber auch entwicklungs- und organspezifische Unterschiede festgestellt werden konnten.

2) In erster Linie wurde die vergleichende Proteomanalyse jedoch zur Untersuchung molekularer Ursachen der cytoplasmatischen männlichen Sterilitätsysteme *Tournefortii* und *Tokumasa* eingesetzt. Bei der Gegenüberstellung der Gesamtproteome männlich steriler und männlich fertiler Pflanzen konnten bei der CMS *Tournefortii* zahlreiche Unterschiede detektiert werden. Hingegen wurden beim Vergleich mitochondrialer Proteome bei der CMS *Tournefortii* ein Unterschied und bei der CMS *Tokumasa* acht Unterschiede festgestellt. Das im Fall der CMS *Tournefortii* betroffene Eiweiß konnte als Peroxiredoxin identifiziert werden und wird in Knospen männlich steriler Pflanzen vermindert gebildet. Dies verursacht möglicherweise Probleme bei der Reduktion von Sauerstoffradikalen, was wiederum zur Entstehung männlicher Sterilität führen könnte.

3) Des weiteren wurde die Proteomtechnologie genutzt, um gewebespezifische Unterschiede in der Zusammensetzung der mitochondrialen Proteine bei Raps zu untersuchen. Beim Vergleich etiolierter und grüner Keimlinge bzw. grüner Keimlinge und Knospen zeigten sich große Übereinstimmungen zwischen den jeweiligen Proteomen. Dies deutet darauf hin, dass die Proteinmuster vorwiegend sogenannte „house-keeping“-Proteine repräsentieren. Die massenspektrometrische Auswertung der detektierten Unterschiede konnte bislang noch nicht abgeschlossen werden.

4) In einem weiteren Projekt wurden mitochondriale Proteome unterschiedlicher *Brassica*-Arten sowie von Ackerbohne und Kartoffel miteinander verglichen, die dem bereits charakterisierten Proteom von *Arabidopsis thaliana* gegenübergestellt wurden. Bei nahe verwandten Arten deutete sich das Potential der Proteomanalyse hinsichtlich phylogenetischer Fragestellungen an.

Schlagworte: 2D-Gelelektrophorese, pflanzliche Proteome, Mitochondrien

Abstract

In general Proteome analysis is based on (i) two-dimensional electrophoresises and (ii) on mass spectrometry. It allows the separation of complex protein samples and is used to examine the proteome which comprises all the proteins of a cell, a tissue or an organism.

Plant proteomes are especially difficult to analyse because of the robust cell wall and the presence of vacuoles, phenolic compounds and pigments. The aim of the present work was to establish methods for the extraction of total protein from different potato and rapeseed tissues. The precipitation with ammonium acetate in methanol after a phenol extraction proved to be a good method for the extraction of proteins from different potato tissues, whereas in rapeseed the precipitation with TCA in acetone was the best method. Since we strove for a thorough proteome analysis of mitochondria, it was necessary to optimise isolation procedures for mitochondria from etiolated and green rapeseed tissue.

All these methods were used to work on the following fields of plant molecular biology using potato and rapeseed:

1) Total protein extracts of leaves, stems, tubers and roots of closely related potato lines differing in yield were separated by two dimensional gel electrophoresis. Many genotypic, stage specific and organ specific differences could be detected.

2) Comparative proteome analysis was also used to study the molecular background of the two cytoplasmic male sterility systems *Tournefortii* and *Tokumasu*. With the comparison of the total proteomes of male sterile and male fertile plants many differences could be detected in the case of CMS *Tournefortii*. In contrast the comparison of mitochondrial proteomes revealed one difference in CMS *Tournefortii* and eight differences in CMS *Tokumasu*. The concerned spot in CMS *Tournefortii* was identified as a peroxiredoxin, which is reduced in flower buds of male sterile plants. This might lead to problems during the reduction of reactive oxygen species and is maybe one reason for male sterility.

3) Furthermore the proteomic approach was employed to investigate tissue specific differences relating to the composition of the mitochondrial proteome of rapeseed. Therefore two-dimensionally separated proteins of etiolated and green seedlings, respectively, green seedlings and flower buds were compared. The protein patterns showed a high degree of correspondence, which indicates that most of the spots represent so-called house-keeping proteins. The mass spectrometric identification of the detected differences could not be finished yet.

4) Two dimensionally separated mitochondrial proteins of different *Brassica* species as well as of bean and potato were compared with the already characterised mitochondrial proteome of *Arabidopsis thaliana*. In the case of closely related species the proteome analysis was found to be an effective method to carry out phylogenetic studies.

Keywords: 2D-gelectrophoresis, plant proteomes, mitochondria

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Untersuchung der Proteome verschiedener pflanzlicher Gewebe am Beispiel von <i>Solanum tuberosum</i> L.	3
1.2	Proteomanalysen zur Untersuchung cytoplasmatischer männlicher Sterilität (CMS) in <i>Brassica napus</i> L.	4
1.2.1	CMS in der praktischen Züchtung.....	4
1.2.2	Molekulare und histologische Hintergründe verschiedener CMS-Systeme in <i>Brassica napus</i> L.....	7
1.3	Proteomanalysen zur Untersuchung art- und gewebespezifischer Unterschiede in pflanzlichen Mitochondrien	12
2	Material und Methoden	15
2.1	Chemikalien	15
2.2	Pflanzenmaterial	15
2.2.1	Herkunft des Pflanzenmaterials	15
2.2.2	Kreuzungen zur Herstellung männlich fertiler und männlich steriler Rapslinien	16
2.2.3	Anzuchtbedingungen und Ernte des Pflanzenmaterials	16
2.3	Gesamteiweißextraktion aus pflanzlichem Gewebe	17
2.3.1	Fällung von pflanzlichen Eiweißen mit 10 % TCA in Aceton.....	17
2.3.2	Fällung von pflanzlichen Eiweißen mit 0,1 M Ammoniumacetat in Methanol nach Phenol/Tris-Extraktion	18
2.3.3	SDS Extraktion und Eiweißfällung nach HURKMAN und TANAKA (1986).....	19

2.4	Mitochondrienisolation	20
2.4.1	Präparation von Mitochondrien aus nicht-grünem Gewebe	20
2.4.2	Präparation von Mitochondrien aus grünem Gewebe	21
2.5	Blaunative Gelelektrophorese - BN-PAGE (nach SCHÄGGER und VON JAGOW 1979)	23
2.6	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	25
2.7	Tricin-SDS-PAGE	28
2.8	Färben von Proteingelen	31
2.8.1	Coomassie Blau-Färbung	31
2.8.2	Coomassie Colloidal-Färbung	31
2.8.3	Silberfärbung (modifiziert nach HEUKESHOVEN und DERNICK 1986)	32
2.9	Computergestützte Bildauswertung von Proteingelen mit Image Master® 2D Elite Software von Amersham Pharmacia Biotech	33
2.10	Statistische Auswertung detektierter Expressionsunterschiede	34
2.11	Charakterisierung von Proteinen durch massenspektrometrische Methoden	35
2.11.1	Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie	35
2.11.2	Electrospray Ionisations Tandem Massenspektrometrie (ESI-MS/MS)	36
2.12	Elektronische Datenauswertung	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Darstellung der Proteome verschiedener pflanzlicher Organe am Beispiel von <i>Solanum tuberosum</i> L.	39
3.1.1	Die Extraktion von Gesamteiweiß aus Kartoffelblättern	39
3.1.2	Die Proteome von Blättern, Stängeln, Wurzeln und Knollen	41

3.2	Untersuchungen zur cytoplasmatischen männlichen Sterilität auf Gesamteiweißebene	46
3.3	Die Präparation von Mitochondrien aus verschiedenen Gewebearten von <i>Brassica napus</i> L.	50
3.4	Vergleich mitochondrialer Proteome zur Analyse cytoplasmatischer männlicher Sterilität in Raps	57
3.4.1	Mitochondriale Proteome aus etiolierten Keimlingen.....	57
3.4.2	Vergleich mitochondrialer Proteome aus Rapsknospen zur Untersuchung der CMS <i>Tournefortii</i>	59
3.4.3	Vergleich mitochondrialer Proteome aus Rapsknospen zur Untersuchung der CMS <i>Tokumasa</i>	70
3.5	Mitochondriale Proteome unterschiedlicher Pflanzengattungen und -arten	77
3.6	Dokumentation differentieller Genexpression am Beispiel mitochondrialer Proteome unterschiedlicher Gewebetypen von <i>Brassica napus</i> L.	84
4	Diskussion	95
4.1	IEF/Tricin-SDS-PAGE als Methode der Proteomanalyse	95
4.1.1	Probenaufbereitung	95
4.1.1.1	Fällungsmethoden zur Gewinnung von Gesamteiweißextrakten.....	95
4.1.1.2	Mitochondrienisolation aus etioliertem und grünem Pflanzengewebe	98
4.1.1.3	Lysierung der Eiweißproben.....	103
4.1.2	Verwendung von Gelstreifen mit engen pH-Bereichen	107
4.1.3	Computergestützte und statistische Auswertung von 2D-Gelen	107
4.1.3.1	Bildanalyse mit Image Master® Elite Software.....	107
4.1.3.2	Statistische Auswertung.....	109

4.2	Untersuchungen zur cytoplasmatischen männlichen Sterilität.....	110
4.1.1	Der Nachweis CMS-spezifischer Proteine.....	111
4.1.2	Der Nachweis von Sekundäreffekten.....	115
4.3	Mitochondriale Proteome unterschiedlicher Pflanzengattungen und -arten.	119
4.4	Dokumentation differentieller Genexpression am Beispiel mitochondrialer Proteome aus verschiedenen Rapsgeweben.....	120
5	Zusammenfassung	123
	Literaturverzeichnis	125
	Anhang	139
	Abbildungsverzeichnis	155

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
ACA	Aminocapronsäure
APS	Ammoniumpersulfat
ASB-14	Tetradecanoyl-Amidopropyl-Dimethyl-Ammoniumpropansulfonat
ATP	Adenosintriphosphat
BC	„backcross“
BN	blau-nativ
BSA	Rinderserumalbumin
C8Ø	4-octyl Benzoylamidopropyldimethyl-Ammonio-propansulfonat
CHAPS	3[(3-Cholomidopropyl)Dimethyl-Ammonio]-1-Propansulfonat
CMS	cytoplasmatische männliche Sterilität
cp	chloroplastidär
Cys	Cystein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ESI-MS/MS	Elektrospray-Injektion-Tandem-Massenspektrometrie
g	Erdbeschleunigung
HSP	Hitze-Schock-Protein
IEF	isoelektrische Fokussierung
IPG	immobilisierter pH-Gradient
kDa	Kilodalton
M	molar
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
mt	mitochondrial
MW	Molekulargewicht
NADII	Nicotinamid-adenin-Dinukleotid
NP-40	Nonidet P-40
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP-40	Polyvinylpyrrolidon 40
QTL	„Quantitative trait loci“
RNA	Ribonukleinsäure
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RubisCO	Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
s	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SB 3-10	Decyl-dimethyl-ammonio-propan-sulfonat
TBP	Tributylphosphin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylmethylen-diamin
Tris	Tris [hydroxymethyl]aminomethan
V	Volt
\bar{x}	Mittelwert