

Identifizierung einer selektiven aktivitätsbasierten Sonde für Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenasen**

Farnusch Kaschani, Jérôme Clerc, Daniel Krahn, David Bier, Tram Ngoc Hong, Christian Ottmann, Sherry Niessen, Tom Colby, Renier A. L. van der Hoorn und Markus Kaiser*

Bioreaktive niedermolekulare Wirkstoffe können als chemische Werkzeuge in der biologischen Forschung eingesetzt werden.^[1] So wurden diese zum Beispiel zur proteomweiten Identifizierung chemisch-reaktiver Gruppen in Proteinen verwendet; deren Auffindung ist von besonderem Interesse, weil diese häufig posttranslational modifiziert sind.^[2] Im aktivitätsbasierten Protein-Profilng (activity-based protein profiling, ABPP) hingegen werden bioreaktive niedermolekulare Wirkstoffe als aktivitätsbasierte Sonden (ABPs) eingesetzt, um gezielt das aktive Zentrum eines Enzyms kovalent zu modifizieren. Auf diese Weise ermöglicht ABPP eine Bestimmung der Aktivitätszustände von Enzymen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen oder in verschiedenen lebenden Systemen.^[3] Trotz der kontinuierlichen Entwicklung neuartiger Sonden für verschiedene Enzymklassen ist die Anwendbarkeit dieser Methode durch eine begrenzte Zahl an geeigneten Sonden zurzeit jedoch immer noch eingeschränkt.^[4]

Dieser Aspekt ist von besonderer Bedeutung für das ABPP von „schwierigen“ Proteomen, wie den Proteomen

von pflanzlichen Organismen. In diesen dominiert oft eine Proteinspezies (nämlich RuBisCO, welches etwa 80% des Proteingehalts in Blättern ausmacht), was die Detektion anderer zellulärer Proteine sehr erschwert. Des Weiteren sind die Proteine in diesen Proteomen besonders oft posttranslational modifiziert, wodurch die Komplexität der Proteingemische noch weiter zunimmt.

Zur Entwicklung geeigneter chemischen Sonden wird häufig von irreversibel wirkenden, mechanismusbasierten Enzyminhibitoren ausgegangen.^[3a,4a,c] Alternativ werden gelegentlich auch Sammlungen chemisch reaktiver Substanzen systematisch durchmustert. Ein solcher Ansatz ermöglicht zum Beispiel die Auffindung chemischer Sonden für solche Enzymklassen, für welche bisher noch keine kovalent bindenden mechanismusbasierten Inhibitoren bekannt sind.^[5] Häufig zeigen die so gefundenen Sonden jedoch nur eine geringe Selektivität, was zu unspezifischen Markierungen führen kann. Auch eine systematische Weiterentwicklung reaktiver Naturstoffe hat sich als geeignete Quelle für aktivitätsbasierte bioreaktive Sonden erwiesen.^[1,6]

Während unserer Studien zur Synthese des Naturstoffs Syringolin beobachteten wir während einer Corey-Winter-Eliminierung eine ungewöhnliche Nebenreaktion.^[7] Diese führte zu einem bicyclischen Hydantoinderivat, das über ein potenziell bioreaktives α,β -ungesättigtes Michael-System verfügt (**Mrl**, Substanz **2** in Schema 1). Hydantoinen sind oftmals integrale Strukturelemente in bioaktiven Substanzen und finden sich daher häufig als Grundstrukturen in Substanzbibliotheken.^[8] Aufgrund seiner interessanten Molekülstruktur und unserem Interesse für chemische Sonden mit neuartigen Strukturen haben wir dieses Hydantoinderivat daher auf seine Verwendungsauglichkeit als bioreaktive Sonde untersucht.

Zur Überprüfung der Bioreaktivität von **Mrl** in Pflanzenproteomen etablierten wir zuerst eine Syntheseroute für geeignete Reporterderivate (Schema 1). So entschieden wir uns für die Einführung eines terminalen Alkinrests, weil dieser durch eine Klick-Reaktion sehr leicht mit geeigneten Reportern wie Biotin oder Rhodamin modifiziert werden kann.^[9] Vor der Synthese der eigentlichen Sonden wurde dazu erst einmal die Ausbeute der Hydantoin-Bildung durch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 150 °C während der Corey-Winter-Eliminierung optimiert. Das Anbringen des terminalen Alkins erfolgte dann durch Umsetzen von **Mrl** mit Propargylbromid und Kaliumcarbonat, wodurch die Klick-Sonde **3** in 82 % Ausbeute erhalten wurde. Um eine direkte Identifizierung der **Mrl**-Zielproteine zu ermöglichen, wurde **3**

[*] Dr. F. Kaschani,^[+] D. Krahn, Prof. Dr. M. Kaiser
Zentrum für Medizinische Biotechnologie
Fakultät für Biologie, Universität Duisburg-Essen
Universitätsstraße 2, 45117 Essen (Deutschland)
E-Mail: markus.kaiser@uni-due.de

Dr. J. Clerc^[+]
Institut für Organische und Biomolekulare Chemie
Universität Göttingen
Tammannstraße 2, 37077 Göttingen (Deutschland)

T. N. Hong, Dr. T. Colby, Dr. R. A. L. van der Hoorn
Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung
Carl-von-Linné-Weg 10, 50829 Köln (Deutschland)

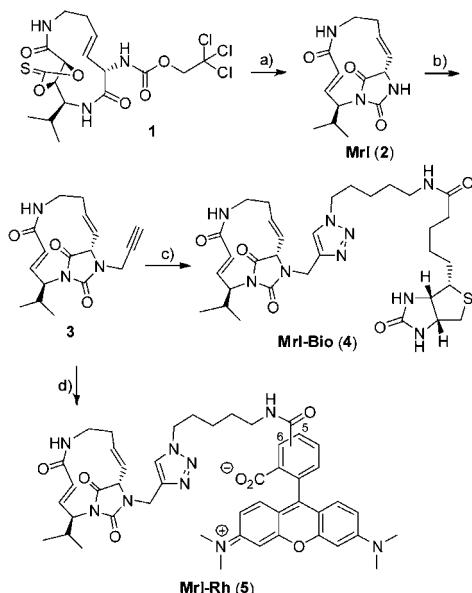
D. Bier, Dr. C. Ottmann
Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft
Otto-Hahn-Straße 15, 44227 Dortmund (Deutschland)

S. Niessen
The Center for Physiological Proteomics
The Scripps Research Institute, La Jolla (USA)

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

[**] Wir möchten uns bei folgenden Personen für ihre Unterstützung bei dieser Arbeit bedanken: Diego F. Gomez-Casati für die Bereitstellung der *gapC-1*-Mutante; Renate Scheibe für die Überlassung der GAPC-1- und GAPC-2-Überexpressionskonstrukte; Johanna Misas für technische Hilfe. Dieses Projekt wurde durch einen ERC Starting Grant gefördert (M.K.; Grant Nr. 258413).

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201107276> zu finden.



Schema 1. Synthese der von Hydantoin abgeleiteten Sonden **Mrl-Bio** (**4**) und **Mrl-Rh** (**5**). a) $P(OMe)_3$, 150°C, 2 h, 47%; b) Propargylbromid (6 Äquiv.), K_2CO_3 (5 Äquiv.), Aceton, Rückfluss, 10 h, 82%; c) Biotin-N₃ (1.1 Äquiv.), TBTA (0.1 Äquiv.), Ascorbinsäure (0.08 Äquiv.), $NaHCO_3$ (0.08 Äquiv.), $CuSO_4$ (0.02 Äquiv.), tBuOH/H₂O 2:1, RT, 10 h, 95%; d) Rh-N₃ (1.1 Äquiv.), TBTA (0.1 Äquiv.), Ascorbinsäure (0.08 Äquiv.), $NaHCO_3$ (0.08 Äquiv.), $CuSO_4$ (0.02 Äquiv.), tBuOH/H₂O 2:1, RT, 10 h, 75%.

durch Reaktion mit Biotinazid oder Rhodaminazid in die Sonden **Mrl-Bio** und **Mrl-Rh** überführt (95% bzw. 75% Ausbeute; siehe die Hintergrundinformationen für die Synthesen dieser Substanzen).

Die Bioreaktivität dieser beiden Sonden wurde dann durch Markierungsexperimente in *Arabidopsis*-Zellkulturextrakten bestimmt. Zuerst wurde das Signalmuster von **Mrl-Rh** bei unterschiedlichen pH-Werten ermittelt (Abbildung 1 A). In diesen Experimenten zeigte diese Sonde eine geringe Reaktivität bei niedrigen pH-Werten. Bei pH-Werten größer als pH 7.5 trat jedoch eine Bande bei ca. 40 kDa auf, die bei einem pH-Wert von 9.0 ihre maximale Intensität erreichte.

Ein Markierungsexperiment mit einem durch Hitzebehandlung inaktiviertem Proteom belegte, dass eine Markierung mit der Sonde **Mrl-Rh** die Gegenwart funktionsfähiger Enzyme benötigt (Abbildung 1 B, Spur 1). Zur weitergehenden Charakterisierung der Markierungseigenschaften von **Mrl-Rh** wurde anschließend ein Markierungsexperiment in Abwesenheit von DTT durchgeführt. DTT ist ein Reduktionsmittel, das oft zur Aktivierung von Enzymen mit einem Cystein im aktiven Zentrum verwendet wird. Das Fehlen von DTT führte zu einer verringerten Markierungseffizienz (Abbildung 1 B, Spur 6). Des Weiteren

führte eine Präinkubation mit einem Proteaseinhibitor-Cocktail (PIC) zu einem beinahe kompletten Verlust des 40-kDa-Signals (Abbildung 1 B, Spur 5), was darauf schließen lässt, dass eine Komponente des PIC mit dem Zielprotein von **Mrl-Rh** wechselwirkt. Dagegen wirkte sich ein entsprechendes Experiment in Anwesenheit von E-64 (einem Breitband-Inhibitor für Papain-ähnliche Cysteinproteasen, PLCPs) nicht auf die Signalintensität aus (Abbildung 1 B, Spur 2). Somit sollte es sich bei dem gesuchten Zielprotein nicht um eine PLCP handeln.^[10]

Interessanterweise konnte eine Konkurrenz der **Mrl-Rh**-Markierung mit einem 20-fachen Überschuss an **Mrl-Bio** (Abbildung 1 B, Spur 4) oder **Mrl** (Abbildung S1 A in den Hintergrundinformationen) ein Auftreten der entsprechenden Bande nicht komplett verhindern. Des Weiteren beobachteten wir, dass die Intensität des 40-kDa-Signals dosisabhängig anstieg (bis zu einer Konzentration von 250 μ M **Mrl-Rh**, siehe Abbildung S1 B), wobei Hintergrundsignale erst ab einer Konzentration von 200 μ M auftraten. Diese Experimente deuten somit an, dass das Zielprotein von **Mrl** möglicherweise sehr abundant ist; alternativ könnte aber auch die Reaktion mit dem Zielprotein sehr langsam verlaufen. In Experimenten mit **Mrl-Bio** konnten wir ein **Mrl-Rh** sehr ähnliches Signalmuster feststellen. **Mrl-Bio** verursacht im Western-Blot eine Bande bei 40 kDa, die bei sehr hohen Sondenkonzentrationen von einer schwächeren Bande begleitet wird (Abbildung S2 A).

Nach diesen ersten Experimenten identifizierten wir dann die molekulare Zielstruktur von **Mrl-Bio**. Hierzu wurden markierte Proteine durch eine Affinitätsaufreinigung an einer Avidin-Matrix vorbereitet, anschließend durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und im Gel tryptisch verdaut (Abbil-

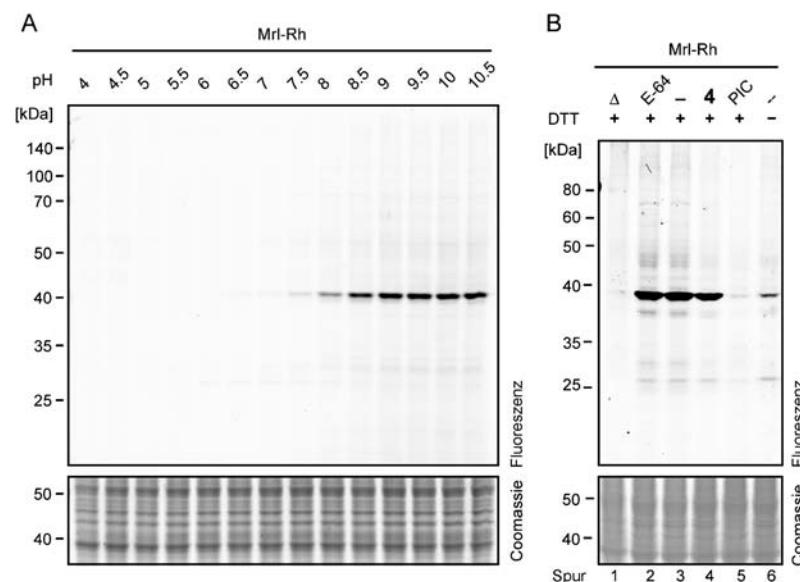


Abbildung 1. Das **Mrl-Rh**-Markierungsprofil in *Arabidopsis*-Zellkulturextrakten ist abhängig vom pH-Wert und dem Vorhandensein einer Enzymaktivität. A) Das **Mrl-Rh**-Markierungsprofil variiert mit dem pH-Wert und erreicht die maximale Intensität bei einem pH-Wert von 9.0. B) Die Markierung mit **Mrl-Rh** erfordert aktive Enzyme. Details siehe Text.

dung S2B).^[11] Das resultierende Peptidgemisch wurde mit LC-MS/MS analysiert und die erhaltenen Peptidspektren mithilfe von MASCOT mit einer Arabidopsis-Proteindatenbank abgeglichen. Identifizierte Proteine wurden dann als **Mrl**-Zielproteine akzeptiert, wenn mindestens zwei eindeutige Peptide in jedem unabhängigem Experiment nach der Behandlung mit der Sonde gefunden wurden und dabei die Zahl der identifizierten Peptidspektren den Wert zwanzig überschritt. Mithilfe dieser Analyse konnten die zwei sehr homologen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenasen (GAPDHs) GAPC-1 (At3g04120) und GAPC-2 (At1g13440) als wichtigste Zielproteine von **Mrl-Bio** im 40-kDa-Bereich identifiziert werden. Für beide Proteine wurden eindeutige Peptidsequenzen gefunden, aber auch eine Vielzahl von Peptiden, die von beiden Proteine stammen können (Abbildung S3).

Das Arabidopsis-Genom weist neben GAPC-1/2 auch noch zwei in Plastiden lokalisierte glykolytische GAPDHs, nämlich GAPCp-1 (AT1G79530) und GAPCp-2 (AT1G16300) (Abbildung S4), sowie drei nichtphosphorylierende GAPDHs, GAPA1, GAPA2 und GAPB, auf.^[12] Letztere sind jedoch nicht am photosynthetischen Kohlenstoffzyklus beteiligt. Die GAPCps sind wahrscheinlich aus zytosolischen GAPCs durch Genduplikation entstanden; ihr katalytischer Mechanismus ist identisch mit dem der zytosolischen GAPCs.^[13] Interessanterweise haben wir bei unseren MS-Analysen keine signifikanten Peptide für GAPCp-1/2 oder die nichtphosphorylierenden GAPDHs gefunden. Wir können jedoch nicht ausschließen, dass GAPCp-1/2 bei hohen Sondenkonzentrationen auch Zielproteine von **Mrl**-Derivaten darstellen. In **Mrl-Bio** behandelten Extraktten finden sich schwache zusätzliche Signale, die z.B. von einer solchen Markierung von GAPCp-1/2 stammen können (Abbildung S2A).

Im nächsten Schritt konnten wir dann GAPC-1/2 als die Zielproteine von **Mrl-Rh** bestätigen. Zu diesem Zweck wurden nichtaufgereinigte *E. coli*-Extrakte markiert, welche heterolog überexprimiertes GAPC-1/2 enthielten.^[14] Wie erwartet konnte nach der Markierung mit **Mrl-Rh** für beide Extrakte jeweils ein Fluoreszenzsignal im 40-kDa-Bereich detektiert werden. Interessanterweise konnten wir unter diesen Bedingungen keine Markierung von endogenen, bakteriellen GAPDHs feststellen. Um die Nachweigrenze der GAPDH-Markierung zu bestimmen, wurde anschließend rekombinant hergestelltes und aufgereinigtes AtGapC-2 zum *E. coli*-Proteom gegeben und mit **Mrl-Rh** umgesetzt (Abbildung S5 A,C). Unter diesen Bedingungen konnte AtGapC-2 ab einer Konzentration von ca. 20 ng μ L⁻¹ detektiert werden. Allerdings war die Markierungseffizienz für das rekombinante AtGapC-2 im *E. coli*-Proteom sehr niedrig, sodass wir davon ausgehen, dass das Detektionsniveau von GAPDHs in Arabidopsis-Extrakten in der Tat deutlich niedriger ist. Markierungsexperimente mit Arabidopsis-Col0-Wildtyp-Extrakten und Extraktten einer *gapC-1*-Knock-out-

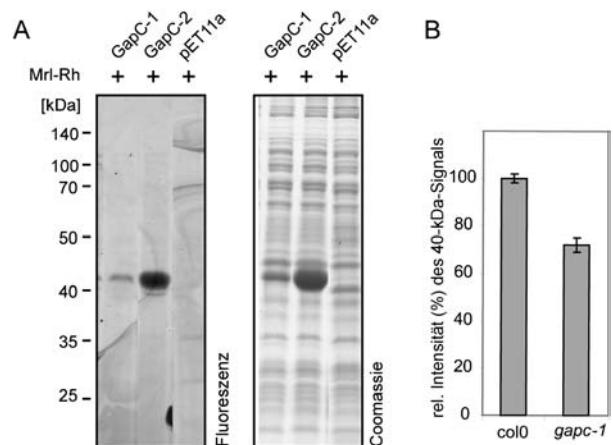


Abbildung 2. Die Zielproteine von **Mrl** in Arabidopsis-Zellkulturextrakten sind die beiden homologen Enzyme GapC-1 und GapC-2. A) Überexpression von GapC-1 und GapC-2 in *E. coli* und daran anschließende Markierung der nichtgereinigten Extrakte mit **Mrl-Rh**. B) Nach Markierung mit **Mrl-Rh** ist die Intensität des 40-kDa-Signals in der *gapc-1*-Mutante um 25 % reduziert. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts von 6 unabhängigen Quantifizierungen.

Linie bestätigten dabei die Ergebnisse aus der Überexpression (Abbildung 2B).^[15] Wir beobachteten, dass die Signalintensitäten im 40-kDa-Bereich im Vergleich zum Arabidopsis-Wildtyp um 25 % reduziert waren. Die partiell niedrigere Aktivität ist hierbei wahrscheinlich das Resultat einer Rückkopplungsüberexpression von GapC-2, die den Verlust der GapC-1-Aktivität ausgleicht.^[15]

Anschließend testeten wir, wie sich die Markierungseffizienz in Anwesenheit des natürlichen Substrats Ga3P (Abbildung 3 A), des milden Oxidationsmittels Glutathiondisulfid (GSSG, Abbildung 3 B) und des starken Oxidationsmittels H₂O₂ (Abbildung 3 C) veränderte. Die Anwesenheit dieser Substanzen führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der GAPDH-Markierung. Diese Beobachtung stimmt mit früheren Berichten überein, in denen eine Abnahme der GAPDH-Aktivität bei Behandlung mit diesen Substanzen beobachtet wurde.^[14]

Schließlich untersuchten wir auch noch die Markierungseffizienz von **Mrl-Rh** gegenüber Säugetier-GAPDHs (Abbildung S5B). Hierzu wurde kommerziell erhältliches

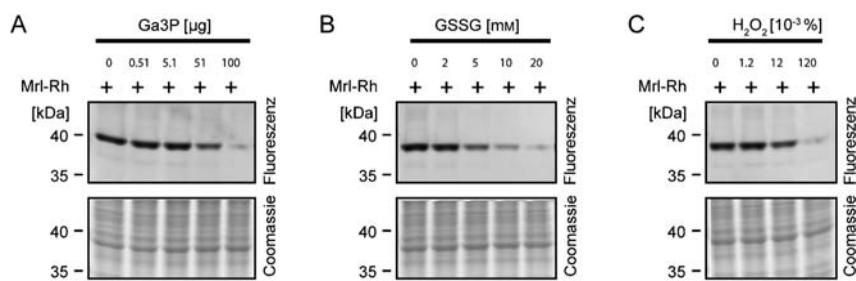


Abbildung 3. Die Markierung von GapC-1/2 mit **Mrl-Rh** wird durch Ga3P und die Oxidationsmittel GSSG und H₂O₂ inhibiert. A) Eine zunehmende Konzentration von (D,L)-Glycerinaldehyd-3-phosphat (Ga3P) inhibiert die Reaktion von GapC-1/2 mit **Mrl-Rh**. B, C) Eine zunehmende Konzentration der Oxidationsmittel GSSG (B) und H₂O₂ (C) verhindert die Reaktion von GapC-1/2 mit **Mrl-Rh**.

humanes GAPDH zu einem *E.-coli*-Proteom gegeben und ein Markierungsexperiment durchgeführt. Dieses zeigte, dass humanes GAPDH zwar auch von **Mrl-Rh** markiert wird, jedoch mit einer viel geringeren Effizienz als pflanzliche GAPDHs. Nichtsdestotrotz belegen diese Experimente, dass von **Mrl** abgeleitete Sonden prinzipiell auch außerhalb der Pflanzenforschung eingesetzt werden können.

GAPDHs spielen in allen Organismen Schlüsselrollen bei der Glykolyse und sind essenziell für die Energiebilanz und die Versorgung mit Kohlenstoff. Sie katalysieren die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-phosphat (Ga3P) in (D)-Glycerat-1,3-bisphosphat unter Reduktion von NAD⁺ zu NADH/H⁺. Neben ihrer heutzutage gut verstandenen Rolle im Primärmetabolismus zeigen neuere Untersuchungen in Säugern jedoch, dass GAPDHs auch weitere, nichtglykolytische Aufgaben übernehmen. Zusehends wird klar, dass diese altbekannte Enzymklasse ein Schlüsselfaktor in den unterschiedlichsten biologischen Prozessen ist.^[16] Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren verschiedene biologisch hochaktive Naturstoffe identifiziert, die mit GAPDHs wechselwirken. Prominente Beispiele hierfür sind neben dem antikarzinogenen Naturstoff Saframycin auch das Insulinmimetikum Demethylasterriquinone B1.^[17]

Die Funktion von GAPDHs in Pflanzen ist bisher jedoch weniger gut untersucht, und bisherige Untersuchungen beruhen weitestgehend auf genetischen Studien, weil es an biochemischen und zellbiologischen Werkzeugen mangelt. Durch genetische Studien lässt sich die zelluläre Funktion eines Proteins jedoch nur eingeschränkt untersuchen. Die von uns beschriebene molekulare Sonde **Mrl** und ihre Fluorophor- (**Mrl-Rh**) bzw. Biotin-modifizierten (**Mrl-Bio**) Derivate könnten somit nützliche Werkzeuge zur Aufklärung der genauen Funktion von GAPDH darstellen, da die bevorzugte Reaktion mit den zytosolischen GAPDHs GAPC-1/2 in *Arabidopsis-thaliana*-Zellkulturextrakten eine effiziente Bestimmung der Aktivität dieser Enzyme ermöglicht. Die **Mrl**-Sonden sind dabei die ersten vollständig charakterisierten chemischen Werkzeuge für diese wichtige Enzymklasse und können zum Beispiel zur Untersuchung der Funktion von GAPDHs in Pflanzen-Pathogen-Wechselwirkungen eingesetzt werden. Pflanzen reagieren auf Pathogeninfektionen mit der transkriptionalen Überexpression von GAPDH.^[18] Demgegenüber zieht eine Pathogeninfektion die Aktivierung von oxidativen Abwehrmechanismen nach sich, die zu einem Verlust der GAPDH-Aktivität führen sollten.^[19] Des Weiteren sekretieren einige Pflanzenpathogene, z.B. der Pilz *Trichoderma koningii*, endogene GAPDH-Inhibitoren wie den Naturstoff Koninginsäure (Synonym Heptelinsäure), die somit ebenfalls Einfluss auf die Aktivität von GAPDHs nehmen können.^[20] Um die biologische Rolle von GAPDH für die Pathogenese besser zu verstehen, sind daher Informationen über die tatsächliche Enzymaktivität essenziell.^[21] Um die Anwendbarkeit der **Mrl**-Sonden in dieser Fragestellung zu zeigen, haben wir ein Markierungsexperiment an einem bereits etablierten Botrytis-Pflanzeninfektionsmodell durchgeführt (Abbildung S6).^[11] Bei diesem Experiment konnten tatsächlich Unterschiede in der Aktivität von GAPDH in Abhängigkeit der Resistenz der Pflanze gegen Botrytis nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis unter-

streicht, wie wertvoll **Mrl** als Werkzeug für die Untersuchung von GAPC-1/2 während der Pathogeninfektion einer Pflanze sein kann.

Hier haben wir die erste selektive aktivitätsbasierte Sonde für GAPDHs beschrieben. Diese Sonde kann entscheidend zu unserem Verständnis der GAPDH-Aktivität in einer Vielzahl von biologischen Prozessen beitragen, insbesondere bei Studien zu Pflanzen-Pathogen-Wechselwirkungen.

Eingegangen am 14. Oktober 2011,
veränderte Fassung am 1. Februar 2012
Online veröffentlicht am 5. April 2012

Stichwörter: Aktivitätsbasiertes Protein-Profilierung · Chemische Biologie · Chemische Proteomik · GAPDH · Inhibitoren

- [1] a) C. Drahla, B. F. Cravatt, E. J. Sorensen, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5936–5958; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5788–5809;
- b) M. J. Evans, A. Saghatelian, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1303–1307.
- [2] E. Weerapana, C. Wang, G. M. Simon, F. Richter, S. Khare, M. B. Dillon, D. A. Bachovchin, K. Mowen, D. Baker, B. F. Cravatt, *Nature* **2010**, *468*, 790–795.
- [3] a) B. F. Cravatt, A. T. Wright, J. W. Kozarich, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 383–414; b) D. A. Jeffery, M. Bogyo, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 87–95.
- [4] a) M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3279–3301;
- b) M. Uttamchandani, J. Li, H. Sun, S. Q. Yao, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 667–675; c) W. P. Heal, T. H. Dang, E. W. Tate, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 246–257.
- [5] a) G. C. Adam, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 805–809; b) G. C. Adam, B. F. Cravatt, E. J. Sorensen, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 81–95.
- [6] a) T. Böttcher, S. A. Sieber, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4677–4680; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4600–4603; b) I. Staub, S. A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6271–6276; c) T. Böttcher, M. Pitscheider, S. A. Sieber, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2740–2759; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2680–2698.
- [7] a) J. Clerc, B. I. Florea, M. Kraus, M. Groll, R. Huber, A. S. Bachmann, R. Dudler, C. Driessens, H. S. Overkleft, M. Kaiser, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2638–2643; b) J. Clerc, M. Groll, D. J. Illich, A. S. Bachmann, R. Huber, B. Schellenberg, R. Dudler, M. Kaiser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 6507–6512; c) J. Clerc, N. Li, D. Krahn, M. Groll, A. S. Bachmann, B. I. Florea, H. S. Overkleft, M. Kaiser, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 385–387;
- d) J. Clerc, B. Schellenberg, M. Groll, A. S. Bachmann, R. Huber, R. Dudler, M. Kaiser, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *3991*–4003; e) M. Groll, B. Schellenberg, A. S. Bachmann, C. R. Archer, R. Huber, T. K. Powell, S. Lindow, M. Kaiser, R. Dudler, *Nature* **2008**, *452*, 755–758.
- [8] M. A. Koch, A. Schuffenhauer, M. Scheck, S. Wetzel, M. Casaluta, A. Odermatt, P. Ertl, H. Waldmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17272–17277.
- [9] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4686–4687.
- [10] a) R. A. van der Hoorn, M. A. Leeuwenburgh, M. Bogyo, M. H. Joosten, S. C. Peck, *Plant Physiol.* **2004**, *135*, 1170–1178; b) Z. Wang, C. Gu, T. Colby, T. Shindo, R. Balamurugan, H. Waldmann, M. Kaiser, R. A. van der Hoorn, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 557–563.
- [11] F. Kaschani, C. Gu, S. Niessen, H. Hoover, B. F. Cravatt, R. A. van der Hoorn, *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*, 1082–1093.

- [12] J. Munoz-Bertomeu, B. Cascales-Minana, J. M. Mulet, E. Baroja-Fernandez, J. Pozueta-Romero, J. M. Kuhn, J. Segura, R. Ros, *Plant Physiol.* **2009**, *151*, 541–558.
- [13] J. Petersen, H. Brinkmann, R. Cerff, *J. Mol. Evol.* **2003**, *57*, 16–26.
- [14] S. Holtgrefe, J. Gohlke, J. Starmann, S. Druce, S. Klocke, B. Altmann, J. Wojtera, C. Lindermayr, R. Scheibe, *Physiol. Plant.* **2008**, *133*, 211–228.
- [15] S. P. Rius, P. Casati, A. A. Iglesias, D. F. Gomez-Casati, *Plant Physiol.* **2008**, *148*, 1655–1667.
- [16] a) M. A. Sirover, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2011**, *1810*, 741–751; b) N. Sen, M. R. Hara, M. D. Kornberg, M. B. Cascio, B. I. Bae, N. Shahani, B. Thomas, T. M. Dawson, V. L. Dawson, S. H. Snyder, A. Sawa, *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 866–873.
- [17] a) C. Xing, J. R. LaPorte, J. K. Barbay, A. G. Myers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5862–5866; b) H. Kim, L. Deng, X. Xiong, W. D. Hunter, M. C. Long, M. C. Pirrung, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3423–3426; c) B. Zhang, G. Salituro, D. Szalkowski, Z. Li, Y. Zhang, I. Royo, D. Vilella, M. T. Diez, F. Pelaez, C. Ruby, R. L. Kendall, X. Mao, P. Griffin, J. Calaycay, J. R. Zierath, J. V. Heck, R. G. Smith, D. E. Moller, *Science* **1999**, *284*, 974–977.
- [18] A. M. Laxalt, R. O. Cassia, P. M. Sanllorenti, E. A. Madrid, A. B. Andreu, G. R. Daleo, R. D. Conde, L. Lamattina, *Plant Mol. Biol.* **1996**, *30*, 961–972.
- [19] J. T. Hancock, D. Henson, M. Nyirenda, R. Desikan, J. Harrison, M. Lewis, J. Hughes, S. J. Neill, *Plant Physiol. Biochem.* **2005**, *43*, 828–835.
- [20] M. Kato, K. Sakai, A. Endo, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1992**, *1120*, 113–116.
- [21] I. Kolodziejek, R. A. van der Hoorn, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 225–233.