

# **Klonierung, Expression und erste biochemische Charakterisierung einer Xaa-Pro Aminopeptidase aus *L. esculentum***

Institut für Pflanzenwissenschaften ETH Zürich

Biochemie und Physiologie der Pflanzen

Prof. Dr. N. Amrhein

Betreuer:

Dr. A. Schaller

Diplomarbeit vorgelegt von:

Felix Hauser

Zürich, September 2000

**FELIX QUI POTUIT RERUM COGNOSCERE CAUSAS**

Vergil, Georgica, 2, 490

## Zusammenfassung

Zur Identifizierung Prosystemin bzw. Systemin spaltender Enzyme in Tomatenpflanzen wurde, auf Grund einer bekannten Teilsequenz einer Xaa-Pro Aminopeptidase (J. Strassner, unveröffentlicht), in einer cDNA  $\lambda$  Phagenbibliothek von *L. esculentum* (Schmid et al., 1992) nach einem vollständigen Klon der Protease gesucht. Es wurden zwei Klassen von cDNAs identifiziert, von denen eine mit dem von J. Strassner identifizierten Klon (*LeAPP1*) übereinstimmt. Die zweite Klasse von cDNAs kodierte für eine bislang unbekannte Xaa-Pro Aminopeptidase (*LeAPP2*). Southern-Blot Analysen mit Sonden für den 3'-untranslatierten Bereich der beiden Xaa-Pro Aminopeptidasen waren spezifisch für die *LeAPP2* nicht aber für die *LeAPP1*. Dies weist auf ein drittes mit der *LeAPP1* nahe verwandtes Gen im haploiden Genom der Tomate hin. Northern-Blot Analysen mit diesen Sonden zeigten, dass beide Xaa-Pro Aminopeptidasen aus *L. esculentum* hauptsächlich in Wurzeln exprimiert werden und die Expression nicht durch Verwundung beeinflusst wird. Die *LeAPP2* wurde als Fusionsprotein mit der Glutathion S-Transferase in *E. coli* überexprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt. Das Fusionsprotein wies bei elektrophoretischer Trennung unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen eine apparente Masse von 105 kDa auf. Die Abspaltung der Glutathion S-Transferase mit der Protease Faktor Xa war unter den getesteten Bedingungen nicht ausreichend. Quervernetzungsexperimente mit Dimethylsuberimidat zeigten, dass das Protein in Lösung als Dimer oder Trimer vorliegt. Das Fusionsprotein zeigte für ein fluorogenes Substrat (Stiebitz et al., 1997) maximale Aktivität bei pH 7.5 und 4 mM  $Mn^{2+}$ . Unter diesen Bedingungen wurde für das fluorogene Substrat ein  $K_m$  von  $(1.52 \pm 0.24) \times 10^{-5}$  M und ein  $k_{cat}$  von  $17.3 \pm 1.9$  s<sup>-1</sup> gemessen. Die *LeAPP2* wurde durch Kupfer und Zink inhibiert. Calcium, Magnesium und Kobalt wirkten je nach Konzentration aktivierend oder inhibierend. EDTA, 1,10-Phenanthrolin, 2-Mercaptoethanol, N-Ethylmaleimid und Diethylpyrocarbonat inhibierten die *LeAPP2*. Massenspektrometrische Analysen (MALDI-TOF MS) zeigten, dass Systemin von der *LeAPP2* nicht gespalten wird. Die aminoternale Xaa-Pro Bindungen in Bradykinin und Substanz P, zwei Substraten von Xaa-Pro Aminopeptidasen in Tieren, wurden durch die *LeAPP2* hydrolysiert. Mit deutlich verminderter Effizienz und für die Xaa-Pro Aminopeptidasen untypisch wurde Substanz P an einer zweiten Stelle endoproteolytisch gespalten.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1 Wundsignalisierung in Pflanzen	8
1.2 Vorausgehende Arbeiten	12
1.3 Xaa-Pro Aminopeptidase (X-Pro Aminopeptidase, Prolin Aminopeptidase, Aminopeptidase P, Aminoacylprolin Aminopeptidase, EC 3.4.11.9)	13
1.3.1 Prolin und prolinspezifische Proteasen	13
1.3.2 Xaa-Pro Aminopeptidase	15
1.3.2.1 Vorkommen und Eigenschaften	15
1.3.2.2 Substratspezifität, Inhibitoren und Mechanismus der Katalyse	17
1.3.2.3 Bedeutung der Xaa-Pro Aminopeptidase und Ziel der Arbeit	19
<b>2. Materialien und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1 Bakterienstämme	21
2.2 Medien und Reagentien	22
2.2.1 Nährmedien	22
2.2.2 Puffer	24
2.2.3 Weitere Lösungen und Gele	27
2.3 Chemikalien und Materialien	31
2.4 Methoden	34
2.4.1 Titration der cDNA $\lambda$ Phagenbibliothek	34
2.4.2 Plattieren der cDNA $\lambda$ Phagenbibliothek	34

2.4.3 Herstellung der radioaktiv markierten cDNA Sonden	35
2.4.4 Sichtung der cDNA $\lambda$ Phagenbibliothek	36
2.4.5 "in vivo excision" der cDNAs und Analyse der Klone	36
2.4.6 Sequenzanalyse	38
2.4.7 Northern- und Southern-Blot Analysen	38
2.4.8 Transformation der <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ Zellen und Amplifikation des pGEX-G Vektors	39
2.4.9 Amplifikation des offenen Leserasters mit Pwo DNA-Polymerase, Restriktion und Ligation in den pGEX-G Vektor	40
2.4.10 Expression des Fusionsproteins	42
2.4.11 Reinigung des Fusionsproteins	43
2.4.12 Amplifikation des offenen Leserasters mit der Pfu Turbo <sup>®</sup> DNA-Polymerase	44
2.4.13 Aminoterninale Sequenzierung	45
2.4.14 Spaltung des Fusionsproteins mit Faktor Xa	46
2.4.15 Analyse der Substratspezifität mit der Matrix Assisted Laser Desorbtion/Ionization Time Of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS)	46
2.4.16 Bestimmung des $K_m$ -Wertes sowie des Einflusses von pH, Metallionen und Inhibitoren auf die Hydrolyse eines fluoreszenzmarkierten Peptidsubstrates	47
2.4.17 Quervernetzung mit Dimethylsuberimidat	47
<b>3. Resultate</b>	<b>49</b>
3.1 Bestimmung der Primärstruktur der LeAPP2	49
3.2 Southern- und Northern-Blot Analysen	54

3.3	Reinigung des Fusionsproteins und Abspaltung der Glutathion S-Transferase mit Faktor Xa	56
3.4	Quervernetzung mit Dimethylsuberimidat	58
3.5	Stabilitätsanalyse des Fusionsproteins	59
3.6	Einfluss von pH, Puffer und Metallionen auf die Hydrolyse eines fluorogenen Peptidsubstrates und Bestimmung der katalytischen Konstanten	61
3.7	Unspezifische Inhibitoren der GST- <i>LeAPP2</i>	64
3.8	Substratspezifität der GST- <i>LeAPP2</i>	66
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>69</b>
4.1	Analyse der Primärstruktur	69
4.2	Enzymatische Eigenschaften der GST- <i>LeAPP2</i>	72
4.3	Mögliche Funktionen der <i>LeAPP2</i> in <i>L. esculentum</i>	78
<b>5.</b>	<b>Referenzen</b>	<b>80</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang</b>	<b>91</b>
6.1	Statistik	91
6.1.1	Regression	91
6.1.2	Fehlerrechnung	92
6.2	Eichgerade der Proteinkonzentration	94
6.3	Auswertung des Quervernetzungsexperimentes	95
6.4	Eigenschaften der Metalle	96
6.5	Datenbankeinträge der verwendeten Sequenzen	97

6.6 Primerkarte	99
6.6.1 Standard-Primer	99
6.6.2 Xaa-Pro Aminopeptidase Primerkarte	99
6.7 Alignment von <i>LeAPP2</i> mit <i>LeAPP1</i> und der Xaa-Pro Aminopeptidase aus <i>A. thaliana</i> (1)	101
6.8 Abkürzungsverzeichnis	104

# 1. Einleitung

## 1.1 Wundsignalisierung in Pflanzen

Pflanzen und Tiere müssen sich, um zu überleben, an verändernde Umweltbedingungen anpassen können. Biochemische, physiologische, morphologische und bei Tieren auch ethologische Anpassungen, sowie die ihnen zugrundeliegenden genetischen Veränderungen ermöglichen es, ökologische Nischen zu besetzen, die für andere Arten nicht oder nur schwer zugänglich sind. Für Pflanzen spielt dabei die Bedrohung durch Parasiten und Pathogene eine wichtige Rolle, da für sie auf Grund ihrer Lebensweise die Möglichkeit der Flucht entfällt. Dieser Bedrohung kann einerseits durch Ausbildung von Dornen, Brennhaaren, Stacheln und verdickter Epidermis begegnet werden. Sobald jedoch dieser erste Schutzwall durch bestimmte morphologische Anpassungen der Feinde umgangen worden ist, bietet sich eine andere Lösung an: Nämlich die Produktion von kleinen organischen Molekülen, Proteinen und Enzymen, die auf molekularer Ebene die Abwehr ermöglichen. Eine solche Verteidigung kann entweder generell gegen Frassfeinde und Pathogene oder auch spezifisch gegen bestimmte Familien, Gattungen, Arten und sogar einzelne Stämme von Pathogenen gerichtet sein. Dies erfordert einerseits Rezeptoren und andererseits auch Signaltransduktionswege, die die Ausbildung einer spezifischen Antwort auslösen können. In Tomaten und den meisten anderen untersuchten höheren Pflanzen existieren generell zwei solche Systeme, wobei sich die Signalisierungswege auch gegenseitig beeinflussen. Das eine ist auf die Abwehr von Pathogenen und das andere auf die Abwehr von Herbivoren spezialisiert (Bowles, 1998). Im Falle der durch Herbivoren ausgelösten Abwehrreaktion wird die Akkumulation von über zwanzig Proteinen, sogenannte SWRPs, induziert (Bergey et al., 1996), von denen die meisten in drei funktionelle Klassen (Tab. 1) einzuteilen sind. Es handelt sich dabei einerseits um Proteinaseinhibitoren und



Polyphenoloxidasen und andererseits um Proteine des Signalisierungsweges selbst. Die dritte Klasse umfasst Proteasen, die vermutlich den Umsatz von Proteinen steigern, um die Neusynthese grosser Mengen von Abwehrproteinen zu ermöglichen, die aber auch an der spezifischen Prozessierung von Vorläuferproteinen beteiligt sein mögen. Neueste Untersuchungen in *Arabidopsis* zeigen, dass die Zahl der wundinduzierten Proteine

Abwehr Proteine	Signalisierungs Proteine	Proteasen
Serin-Proteaseinhibitor I	Prosystemin	Leucin-Aminopeptidase
Serin-Proteaseinhibitor II	Lipoxygenase	Aspartat-Protease
Cystein-Proteaseinhibitor	Allenoxid Synthase	Cystein-Protease
Aspartat-Proteaseinhibitor	Calmodulin	Carboxypeptidase
Metallocoxyproteaseinhibitor	Polygalacturonase	
Polyphenoloxidase	ACC Synthase	
	NADPH Oxidase	
	Systemin Rezeptor	

**Tab. 1:** Die drei Klassen von systemischen Wundantwort Proteinen (aus Ryan, 2000).

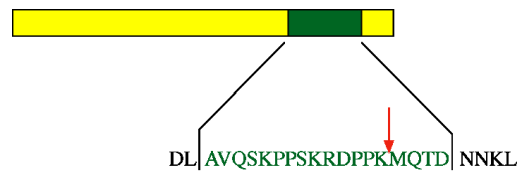
noch erheblich grösser zu sein scheint (Reymond et al., 1998, 2000). Die Expression der SWRPs wird sowohl lokal als auch systemisch durch verschiedene Faktoren ausgelöst und reguliert.

Auf der zellulären Ebene spielen dabei Lipide eine zentrale Rolle. Im Octadecanoid-Weg wird aus  $\alpha$ -Linolensäure, welche durch eine Lipase aus Membranlipiden freigesetzt wird, Jasmonsäure synthetisiert, die ihrerseits auf bisher ungeklärte Weise zur Aktivierung der SWRP-Gene führt (Fig. 2; Farmer et al., 1992). Es gibt jedoch Hinweise, dass  $H_2O_2$  (Orozco-Cardenas et al., 1999) und Oligogalacturonide insbesondere bei der Aktivierung von Abwehrgenen eine Rolle als "second messenger" (Ryan, 2000) spielen könnten. Zusätzlich beeinflussen Ethylen (O'Donnell et al., 1996; Rojo et al., 1999), Salicylsäure (Durner et al., 1997), Auxin (Kernan et al., 1989) und Abscisinsäure (Birkenmeier et al., 1998 sowie darin angegebene Referenzen) massgeblich die Stärke der Expression.

Im extrazellulären Raum spielen dagegen drei bislang bekannte Signalmoleküle eine Rolle. Im Falle der Herbivoren handelt es sich dabei um Galacturonide, bei Pathogenen

um Chitosane, welche entweder durch Enzyme der Herbivoren bzw. Pathogene oder von pflanzlichen Enzymen (Bergey et al., 1999a) aus der Zellwand freigesetzt werden. Sie beeinflussen über bestimmte, spezifische, membranständige Rezeptoren die Bildung der Jasmonsäure. Von diesen Molekülen vermutet man, dass sie, wegen der fehlenden Translokation ins vaskuläre System (Baydon and Fry, 1985), nur lokal an der verwundeten bzw. durch Pathogene geschädigten Stelle wirken. Auf Grund der Beobachtung, dass die SWRPs nicht nur lokal, sondern auch systemisch exprimiert werden, schloss man, dass es

noch ein weiteres an der Signalisierung beteiligtes Molekül geben musste (Ryan, 1992). Es handelt sich hierbei

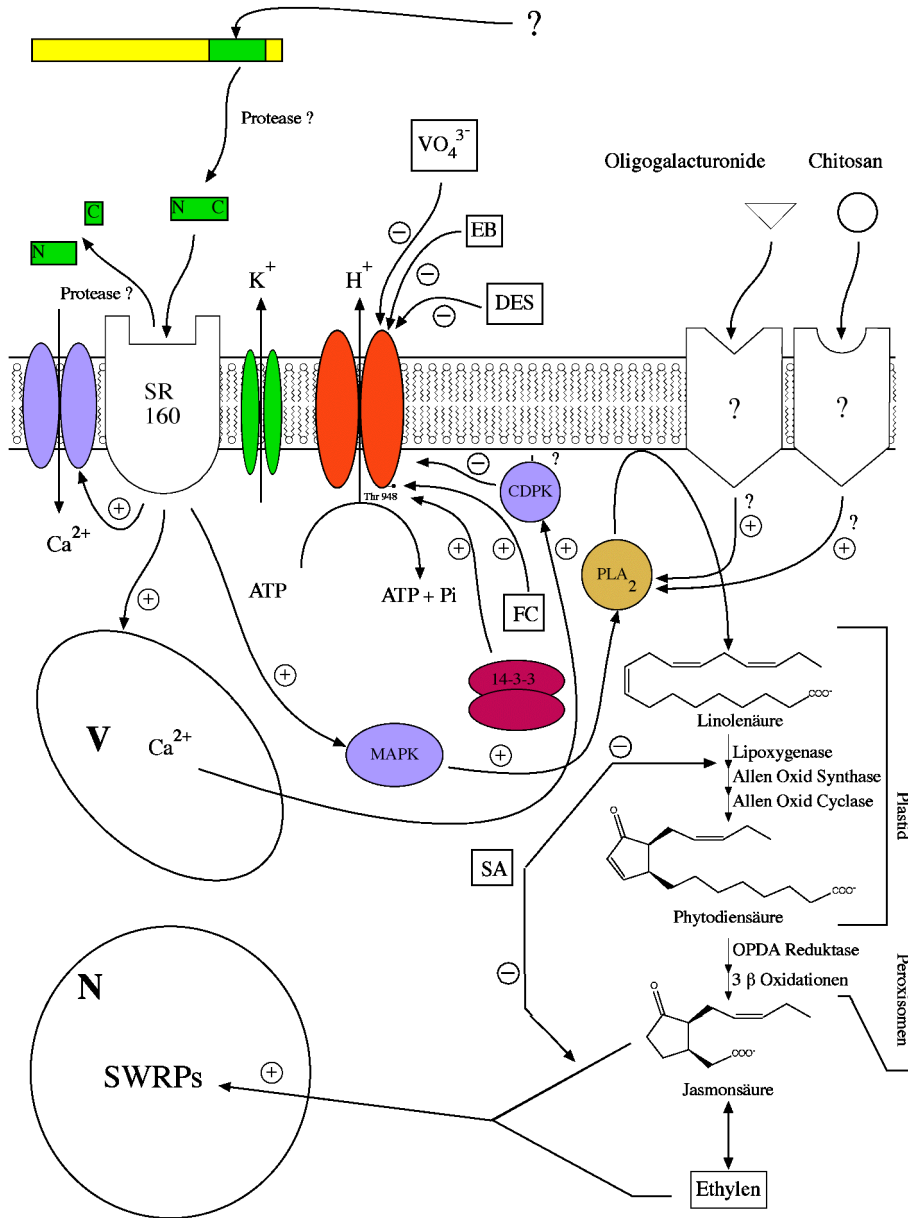


**Fig. 1:** Schema von Prosystemin, grün symbolisiert ist Systemin. Die Aminosäuresequenz von Prosystemin, die Teil des GAL4 Linkers (siehe 1.2) ist, ist unten dargestellt. Der rote Pfeil markiert die Stelle, an welcher Systemin bei der Inaktivierung vermutlich gespalten wird (Meindl et al., 1998, Schaller A., 1998).

um Systemin (Fig. 1), ein aus 18 Aminosäuren bestehendes, unstrukturiertes Polypeptid (Pearce et al., 1991; Russel et al., 1992), welches zusammen mit ENOD 40 und Phytosulfokinen zu den bekannten pflanzlichen Signalpeptiden gehört (Constabel et al., 1998; Schaller et al., 1995, 1999). Wie tierische Peptidhormone, z.B. Insulin und Glucagon, wird es als Teil eines Vorläufers (Prosystemin) exprimiert. Man vermutet, dass Prosystemin durch Verwundung freigesetzt (McGurl et al., 1992) und dann durch Proteinasen im Apoplasten prozessiert wird (Dombrowski et al., 1999). Anschliessend wird es vermutlich durch den Apoplasten und das Phloem in der Pflanze verteilt (Ryan, 2000 sowie darin angegebene Referenzen). Durch die Bindung an den Rezeptor SR160 (SR: Systemin Rezeptor; Scheer et al., 1999) strömen  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen in die Zelle (Bergey et al., 1999b; Moyer et al., 1998). Dies führt einerseits zur Aktivierung einer Mitogen-aktivierten Protein- (MAP) Kinase, Öffnung von Ionenkanälen, Hemmung einer  $\text{H}^+$ -ATPase und zur Depolarisierung des Membranpotentials sowie andererseits zur Aktivierung einer Phospholipase  $\text{A}_2$  beziehungsweise des Octadecanoidweges und damit zur Expression der SWRPs (Schaller, 1999 und dort angegebene Referenzen). Der  $\text{H}^+$ -ATPase, bzw. dem durch sie generierten elektrochemischen Gradienten über die

Plasmamembran, scheint dabei eine regulatorische Schlüsselfunktion zuzukommen (Schaller et al., 2000).

Dieses Modell (Fig. 2) setzt Proteasen voraus, die einerseits Systemin aus Prosystemin durch limitierte Proteolyse freisetzen und andererseits Systemin durch Proteolyse



**Fig. 2 :** Modell der Wundsignalisierung in Pflanzen (nach Ryan (2000) und Schaller (1999); ergänzt nach Camoni et al., 2000; Michelet et al., 1995; Olivari et al., 1998; Roberts et al., 1999; Schaller et al., 2000; Svennelid et al., 1999; Xing et al., 1996). DES: Diethylstilbestrol, EB: Erythrosin B, FC: Fusicoccin, N: Nucleus, SA: Salicylsäure, V: Vakuole VO<sub>4</sub><sup>3-</sup>: Orthovanadat. Die Wirkung der einzelnen Faktoren wurde aktivierend (+) oder inhibierend (-) klassifiziert. Nicht dargestellt ist die Phosphatase, welche ebenfalls zur Inaktivierung der H<sup>+</sup>-ATPase beiträgt.

inaktivieren können. Die proteolytische Aktivität von möglichen Prohormonconvertasen (Meichtry et al., 1999; Dombrowski et al., 1999), welche Systemin aus Prosystemin abspalten könnten, und von Proteasen, die Systemin spalten (Schaller, 1998), konnte zwar nachgewiesen, die Proteasen selbst aber noch nicht identifiziert werden.

## 1.2 Vorausgehende Arbeiten

Um Proteasen zu finden, die potentiell Systemin oder Prosystemin spalten können, wurde eine Variante des "two-hybrid" Systems verwendet (Smith et al., 1991). Man verband dazu die DNA-Sequenzen von DNA-bindender und transkriptionsaktivierender Domäne des GAL4 Transkriptionsaktivators durch ein Oligonucleotid, das sowohl für Systemin als auch für einige flankierende Aminosäuren von Prosystemin (Fig. 1) kodierte. Für die Transformation mit einer cDNA Bibliothek aus Tomatenblättern wurde ein Hefestamm verwendet, der das Reporter-gen LacZ unter der Kontrolle des GAL4 Promotors enthielt. Wird der transformierte Hefestamm auf einer Platte kultiviert, die das Suizid-Substrat 2-deoxy Galactose enthält, so überleben nur diejenigen Klone, in denen die cDNA für ein Protein kodiert, das durch Bindung oder Spaltung des Linkers im GAL4 Aktivator die Transkription des LacZ-Genes unterbindet. Ein Teil der Klone wurde zur weiteren Analyse sequenziert. Einige der erhaltenen Sequenzen wiesen Homologien zu drei verschiedenen Proteasen auf. Es handelte sich hierbei um Homologe der katalytischen Untereinheit von CLP Protease, der Insulinase und der Xaa-Pro Aminopeptidase (J. Strassner und A. Schaller unveröffentlicht). Letztere sollte im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden. Insbesondere galt zu klären, ob (Pro) Systemin *in vitro* ein Substrat der Xaa-Pro Aminopeptidase ist. Die Sequenz von Systemin enthält vier Prolin Reste; daher schien eine Interaktion mit einer Protease mit Affinität für Prolin nicht unwahrscheinlich.

## 1.3 Xaa-Pro Aminopeptidase (X-Pro Aminopeptidase, Prolin Aminopeptidase, Aminopeptidase P, Aminoacylprolin Aminopeptidase, EC 3.4.11.9)

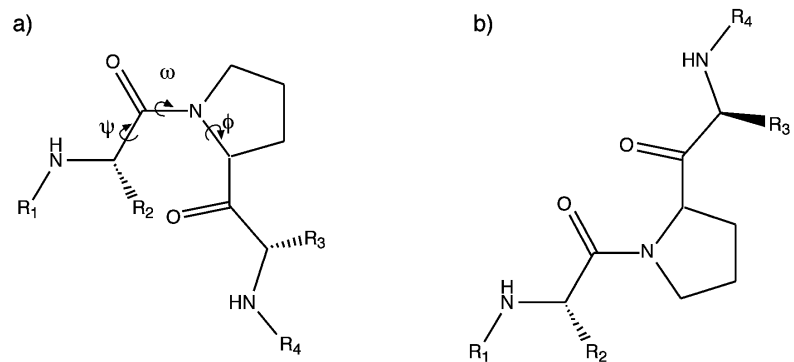
### 1.3.1 Prolin und prolinspezifische Proteasen

In über 2 Billionen Jahren der Evolution von Proteinen erwiesen sich zwanzig Aminosäuren auf Grund ihrer Eigenschaften als die optimalen Grundbausteine (Yaron et al., 1993). In besonderer Weise einzigartig unter ihnen ist die Iminosäure Prolin, in der die Aminogruppe mit dem  $\alpha$ -Kohlenstoff und der Seitenkette verbunden ist und so einen 5 Ring schliesst. Auf dieser strukturellen Eigenheit beruht die Besonderheit von Prolin.

Die zyklische Natur dieser Aminosäure sowie das Fehlen von funktionellen Gruppen fixiert das Polypeptid an dieser Stelle in zwei möglichen Konformationen (Fig. 3), d.h. Prolin kann nicht in  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblättern vorkommen (Cunningham et al., 1997). Die Rotation um die Bindung ( $\omega$ ) zwischen Stickstoff und der Carbonylgruppe (*cis/trans* Iso-

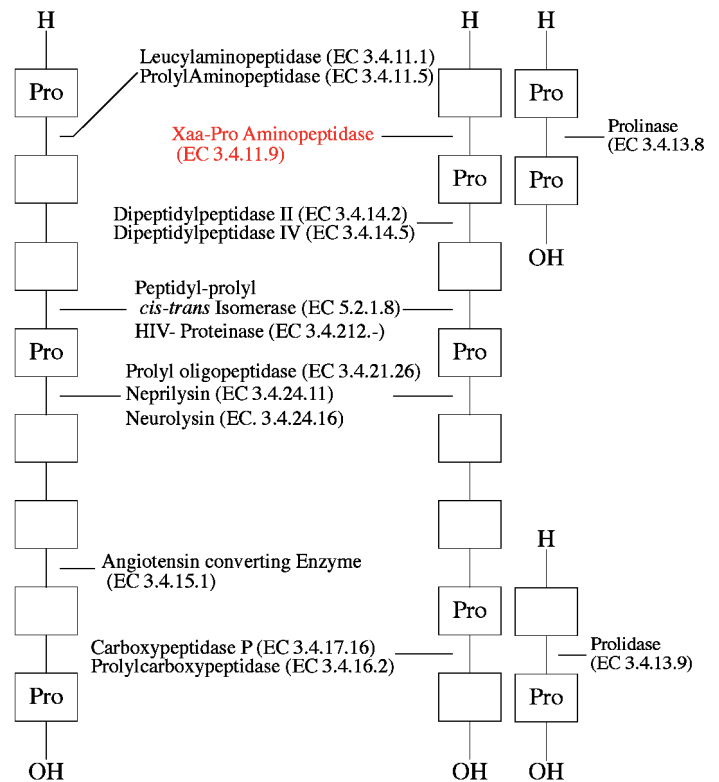
merisierung), die in der normalen Peptidbindung in einer Ebene liegt, ermöglicht Richtungsänderungen der Peptidkette.

Prolin wirkt wie Amidierung, Acetylierung und N-terminale Zyklisierung als strukturelles Element, das einen wirksamen Schutz gegen unspezifische proteolytische Degradation bietet (Vanhoof et al., 1995). Dies stimmt für die Xaa-Pro und teilweise auch für die Pro-X Bindung. Zusätzlich werden auch Peptidbindungen geschützt, die nicht unmittelbar



**Fig. 3:** Konformationen von Prolin. Der Torsionswinkel  $\phi$  ist durch die Zyklisierung festgelegt, der Winkel  $\omega$  kann  $0^\circ$  oder  $180^\circ$  sein **a)** Peptidbindung mit Prolin in der *cis* Konformation. **b)** Peptidbindung mit Prolin in der energetisch bevorzugten *trans* Konformation. Nur in 4 bekannten Proteinen liegt die *cis* Konformation vor (drei in Carboxypeptidase A und eine in der Dihydrofolat Reduktase).

benachbart sind (Yaron et al., 1993). Prolinspezifische Proteasen (Fig. 4) spielen folglich eine wichtige Rolle im Abbau von Proteinen, d.h. sie sind für die vollständige Hydrolyse und die anschließende Wiederverwertung der verschiedenen Aminosäuren notwendig (Cunnigham et al. 1997; Tamura et al., 1998; Yao et al., 1999). In Hormonen und Neurotransmittern (Zusammenstellung siehe Yaron et al., 1993 und Vanhoof et al., 1995 sowie dort angegebene Referenzen), die durch Endopeptidasen aus Vorläufern prozessiert werden, verhindert meist eine Xaa-Pro Bindung die weitere Degradation des Peptidhormons und andererseits verändert sich, wenn die Xaa-Pro Bindung gespalten wird, auch die physiologische Aktivität des Peptides. Die Spaltung dieser Bindung ist ein Schlüsselschritt in der hormonellen Regulation, die von prolinspezifischen Proteasen gesteuert wird. Bezeichnenderweise nutzen auch Pathogene der Schleimhäute wie *Neisseria gonorrhoea* prolinspezifische Proteasen, die IgA1 spalten, um damit die menschliche Immunabwehr zu umgehen (Vanhoof et al., 1995). Ebenso gehört die retrovirale HIV 1 Protease, die sich autokatalytisch durch Spaltung von Phenylalanin-Prolin Bindungen an ihrem N- und C-Terminus freisetzt, in die Familie der prolinspezifischen Proteasen (Yaron et al. 1993).

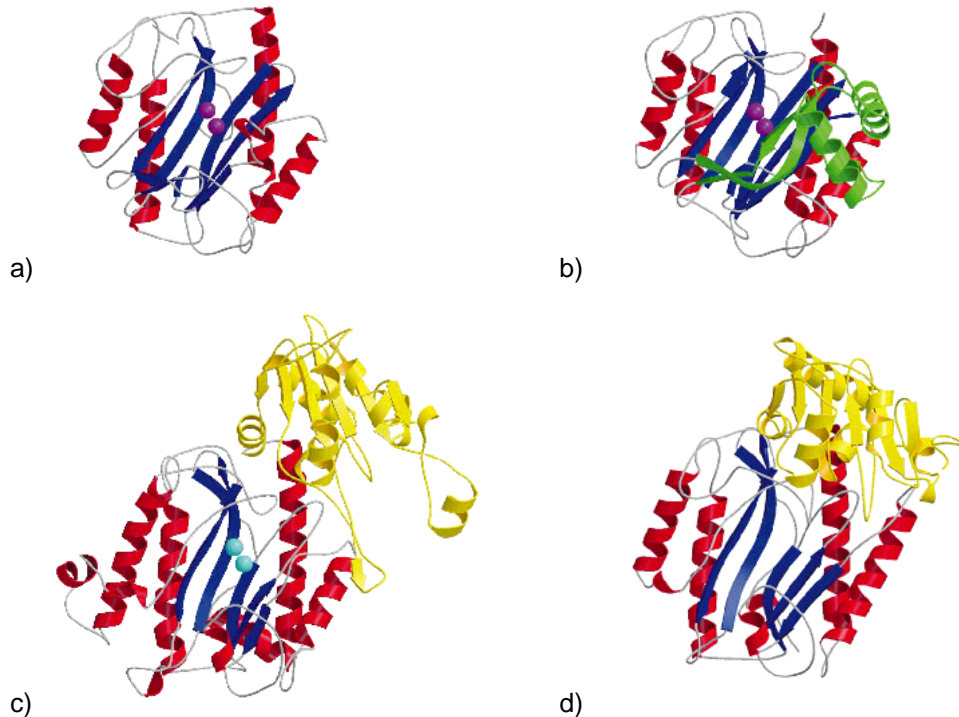


**Fig. 4:** Peptidasen und Isomerasen, von denen bekannt ist, dass sie in Menschen zu Prolin benachbarte Bindungen spalten.

## 1.3.2 Xaa-Pro Aminopeptidase

### 1.3.2.1 Vorkommen und Eigenschaften

Die Xaa-Pro Aminopeptidase gehört zu den ubiquitären prolinspezifischen Proteasen, die sowohl in Bakterien (erstmalig aus *E. coli* isoliert; Yaron et al., 1968) als auch in Hefe und Säugetieren für die spezifische Spaltung von N-terminalen Xaa-Pro Bindungen verantwortlich ist. Untersuchungen von bakteriellen und eukaryotischen Homologen zeigten, dass die Protease nur als Multimer aktiv ist. Das *E. coli* Enzym liegt als Tetramer mit einem Molekulargewicht von 200 kDa vor (Wilce et al., 1998). Das Monomer ist nicht nachweisbar und die Assoziationskonstante ( $K_a$ ) von Di- zu Tetramer ist grösser als  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  (Wilce et al., 1998). In Säugetieren dagegen ist die Vielfalt erheblich grösser. Die Xaa-Pro Aminopeptidase liegt dort in zwei Formen vor, einer zytosolischen und einer membrangebundenen (durch Glykosylphosphatidylinositol Anker mit der Membran verbunden) Form, die beide im aminoterminalen Bereich N-glykosyliert sind (Cunningham et al., 1997, Romero et al., 1995). Die lösliche Form liegt meist als Di- oder Trimer (Rusu et al., 1992; Ryan, J. W. et al., 1992) vor, während die membrangebundene als Tri- oder Tetramer (Hooper et al., 1990; Simmons et al., 1992) vorliegt. Man geht davon aus, dass alle Xaa-Pro Aminopeptidasen wie auch die Methionin Aminopeptidase, Prolidase und Creatinase ein sogenanntes "pita-bread" Faltungsmotiv (Bazan et al., 1994; Lowther et al., 2000; Fig. 5) aufweisen. Die C-terminale Domäne hat in all diesen Enzymen dasselbe Faltungsmotiv, während sich der N-terminale Bereich in seiner Grösse unterscheidet. Mit Ausnahme der Creatinase sind alle anderen Proteine Metalloproteasen. Die Liganden des dinucleären Metallzentrums sind identisch und bei Xaa-Pro Aminopeptidase und Methionin Aminopeptidase auch räumlich deckungsgleich (S. 159 in Lowther et al., 2000). Wie bei Metalloproteasen zu erwarten, sind die Xaa-Pro Aminopeptidasen durch Metallchelatoren wie 1,10-Phenanthrolin und EDTA inhibierbar und reagieren empfindlich auf Metallionen wie  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  (Lloyd et al., 1996; Ryan, J. W. et al., 1992). Einige Unklarheit herrscht in Bezug auf die Art des Metalles im aktiven Zentrum. So wurde bis anhin



**Fig. 5:** Proteasen mit "pita-bread" Faltung (aus Lowther et al. 2000). Mangan Zyan und Kobalt magenta gefärbt **a)** Methionin Aminopeptidase aus *E. coli* (PDB Code: 2MAT) **b)** Methionin Aminopeptidase aus *H. sapiens* (1BN5) **c)** Xaa-Pro Aminopeptidase aus *E. coli* (1A16) **d)** Creatinase aus *P. putida* (1CHM).

angenommen, dass  $Zn^{2+}$  das Metall im aktiven Zentrum sei (Zusammenfassung bei Cunningham et al. 1997). Im Homologen aus Schweineiere wurde mittels Atomabsorbtionsspektrometrie ein Atom  $Zn^{2+}$  pro Untereinheit (Hooper et al., 1992) und in Anlehnung an das Zn-Bindungs Motiv von Metalloproteasen (Hooper et al., 1994) auch zwei putative Zn-Liganden nachgewiesen (Lim et al., 1996). Seltsamerweise wird dabei, als Beispiel für die Aktivierung durch  $Zn^{2+}$ , auch mehrfach auf Ryan, J. W. et al. (1992) verwiesen, obwohl dort keineswegs von einer Aktivierung durch  $Zn^{2+}$  gesprochen wird. Unberücksichtigt blieben dabei der im allgemeinen hemmende Effekt von  $Zn^{2+}$  und der aktivierende Effekt von  $Mn^{2+}$ . Durch die Bestimmung der Röntgenstruktur der Xaa-Pro Aminopeptidase aus *E. coli* (Wilce et al., 1998) wurde andererseits aber nachgewiesen, dass im aktiven Zentrum zwei Metallionen vorhanden sind, und dass Mangan diese Rolle einnehmen kann. Auch in der Methionin Aminopeptidase (Zusammenfassung bei Lowther et al. 2000) ist nicht klar, welches Metall im aktiven Zentrum liegt. Vielmehr vermutet man dort, dass die Art des Metalles durch die

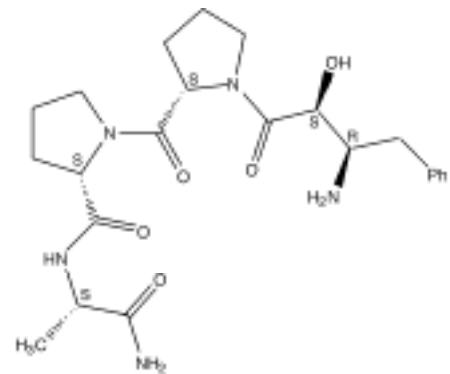


Konzentration der Ionen im Organismus bestimmt wird (Kobayashi et al., 1999; Lowther et al., 2000). Dies könnte sich auch bei der Xaa-Pro Aminopeptidase als zutreffend erweisen. Wichtig scheint hier zudem, dass der Effekt der Metallionen auch von der Natur des Substrates abhängt (Lloyd et al., 1995).

### 1.3.2.2 Substratspezifität, Inhibitoren und Mechanismus der Katalyse

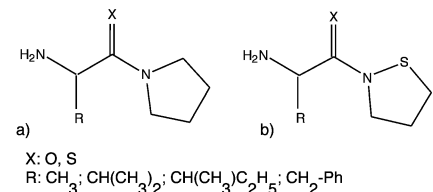
Xaa-Pro Aminopeptidasen aus Bakterien wie auch aus Säugetieren zeigen ähnliche Substratspezifitäten (Cunningham et al., 1997; Yaron et al., 1993). Sie schneiden zwischen einer N-terminalen Aminosäure und Prolin. Die N-terminale Aminosäure muss dabei eine freie  $\alpha$ -Aminogruppe haben und der Prolin Rest muss in der *trans* Konfiguration sein (Yaron et al., 1993). Das Enzym aus *R. norvegicus* hydrolysiert sowohl Dipeptide als auch Oligopeptide mit N-terminalem Xaa-Pro Motiv, wobei Xaa vorzugsweise eine aromatische oder basische Seitenkette aufweist (Cunningham et al., 1997). Studien mit verschiedensten Substraten zeigten einerseits, dass Dipeptide im Vergleich zu höheren Oligomeren sehr langsam hydrolysiert werden und andererseits, dass die Bindung des Substrates mindestens vier Kontaktstellen mit dem Enzym erfordern (Yoshimoto et al., 1994; Cunningham et al., 1997).

Neben Metallchelatoren und Metallionen testete man eine Reihe weiterer Inhibitoren (Yaron et al., 1993). Apstatin (Fig. 6) und seine Derivate gehören zu den besten bislang bekannten spezifischen Inhibitoren (Maggiore et al., 1999; Prechel et al., 1995). Dieser Inhibitor ist ein Substratanalogon. Der Aminoterminus von Apstatin, (2S,3R)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutansäure, ist derselbe wie in Bestatin, einem natürlichen Inhibitor von verschiedenen Aminopeptidasen. Dieser Rest koordiniert in Leucin Aminopeptidasen die Zinkionen im katalytischen Zentrum. Das Prolin in der P<sub>1</sub> Position besetzt die spezifische Bindungsstelle in der Xaa-Pro



**Fig. 6:** Apstatin, (N-[(2S,3R)-3-amino-2-hydroxy-4-phenyl-butanoyl]-L-prolyl-L-prolyl-alaninamid), ein Xaa-Pro Aminopeptidase spezifischer Inhibitor ( $IC_{50 H. sapiens}$  2.9  $\mu$ M).

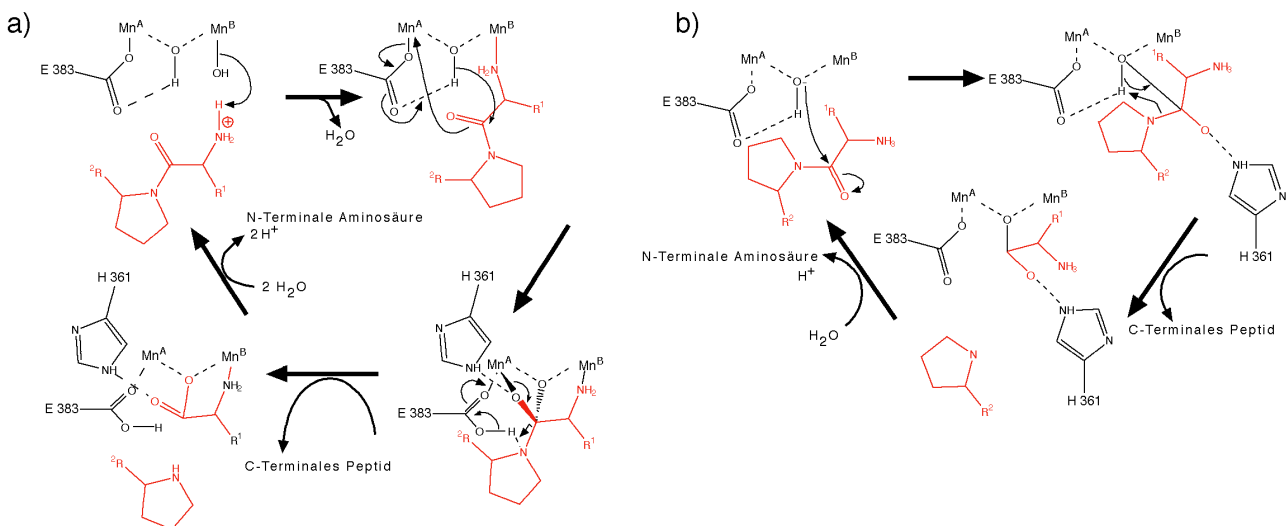
Aminopeptidase. Die beiden anderen Aminosäuren wurden aufgrund von Studien mit verschiedensten Substraten (Yoshimoto et al., 1994) so ausgewählt, dass der Inhibitor gut an die Xaa-Pro Aminopeptidase binden kann (Prechel et al., 1995). Andere prolinspezifische Inhibitoren wie Aminosäurepyrrolidide und Thiazolidide (Fig. 7) scheinen dagegen keine effizienten Inhibitoren zu sein (für Details siehe Stöckel-Maschek et al., 2000).



**Fig. 7:** Aminosäurepyrrolidide (a) und Thiazolidide (b) (aus Stöckel-Maschek et al., 2000).

Dagegen wirken erstaunlicherweise auch ACE (Angiotensin Converting Enzyme, eine Metalloendopeptidase) Inhibitoren wie Enalaprilat und Ramiprilat je nach Substrat und Metallkonzentrationen inhibierend (Hooper et al., 1992; Lloyd et al., 1995).

Genauere mechanistische Studien wie die zur Methionin Aminopeptidase (Lowther et al., 1999a, 1999b, 2000) sind zwar für die Xaa-Pro Aminopeptidase nicht vorhanden, doch wurden aufgrund von Analogieschlüssen sowie durch Analyse der Kristallstruktur (Wilce et al., 1998) katalytische Mechanismen vorgeschlagen (Fig. 8). Gemeinsam ist allen Mechanismen, die für Metalloproteasen vorgeschlagen werden, dass ein



**Fig. 8:** Mechanismen der Katalyse durch Xaa-Pro Aminopeptidasen. Das Substrat ist rot, die Reste der Protease sind schwarz dargestellt. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die *E. coli* Xaa-Pro Aminopeptidase. Zur Vereinfachung der Schemata wurde die Wechselwirkung zwischen H 243 mit dem Carbonyl des Rückgrates nicht dargestellt. a) Mechanismus verändert nach Lowther et al., 2000. b) Mechanismus nach Wilce et al., 1998. In beiden Fällen wird ein tetrahedraler Übergangszustand durchschritten. Die Mechanismen unterscheiden sich nur in der Wechselwirkung zwischen Metall und Substrat.

Hydroxylion, welches durch die Metallionen aktiviert wird, als Nucleophil agiert (Chen et al., 1997; Cummins et al., 1999; Griffith et al., 1998; Mock et al., 1994, 1995; Sträter et al., 1995; Wilcox et al., 1996). Ein Glutamat (E 383 in *E. coli*) wirkt dabei als Protonentransporter (Lowther et al., 2000). Durch ein nicht kovalentes, tetrahedrales Intermediat wird anschliessend die Peptidbindung gespalten und die Aminosäure freigesetzt. Umstritten ist bislang nur die Koordination des Substrates (Wilce et al., 1998; Lowther et al., 2000), wobei die Tatsache, dass bei der Xaa-Pro Aminopeptidase die  $\alpha$ -Aminogruppe frei sein muss (Yaron et al., 1993), zumindest ein Hinweis auf die Koordination des N-Terminus (Fig. 8 a) sein könnte.

### 1.3.2.3 Bedeutung der Xaa-Pro Aminopeptidase und Ziel der Arbeit

Die Vielzahl von bioaktiven Peptiden mit N-terminalem Xaa-Pro Motiv (Tab. 2) könnte ein Hinweis für die einzigartige biologische Rolle von Xaa-Pro Aminopeptidasen sein. Die Hydrolyse von Xaa-Pro Motiven führt zum Verlust bzw. zur Änderung der biologischen Aktivität oder möglicherweise zur Initiation der Protein Degradation. Solche Überlegungen führen zu mindestens zwei möglichen Funktionen der Xaa-Pro Aminopeptidase. Sie kann erstens ein primärer Regulator der Aktivität von bestimmten Peptiden und zweitens ein Schlüssel bei der Initiation der Proteindegradation sein. Ferner besteht die Möglichkeit einer Beteiligung an der postrans-

Polypeptid	N-terminale Sequenz
basischer Trypsin Inhibitor ( <i>B. taurus</i> )	Arg-Pro-Phe-Cys-
Bradykinin ( <i>H. sapiens</i> )	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-
Cathepsin B ( <i>H. sapiens</i> )	Leu-Pro-Ala-Ser-Phe-
Erythropoietin ( <i>H. sapiens</i> )	Ala-Pro-Pro-Leu-Leu-
Interleukin 6 ( <i>H. sapiens</i> )	Val-Pro-Pro-Gly-Glu-
Papain	Ile-Pro-Glu-Tyr-Val-
Streptavidin	Asp-Pro-Ser-Lys-Asp-
Substanz P ( <i>H. sapiens</i> )	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-
Wachstumshormon ( <i>H. sapiens</i> )	Phe-Pro-Thr-Ile-Pro-

**Tab. 2:** Beispiele für Polypeptide mit Prolin als zweiter Aminosäure am N-Terminus. Weitere Peptide siehe Vanhoof et al. (1995) und Yaron et al. (1993) sowie dort angegebene Referenzen.

lationellen Prozessierung von Vorläufern nativer Proteine. Für Bradykinin und Substanz P (Funktion der beiden Peptide siehe z.B. Kopp et al., 2000; Snyder et al., 1999) konnte nachgewiesen werden, dass eine membrangebundene Xaa-Pro Aminopeptidase zusammen mit dem Angiotensin Converting Enzyme (ACE) an der Degradation und damit auch der Inaktivierung der beiden Kinine beteiligt ist (Kitamura et al., 1999; Prechel et al., 1995). Es Bedarf allerdings weiterer Arbeiten um die vollständige biologische Bedeutung der Xaa-Pro Aminopeptidase ermessen zu können.

Ziel dieser Arbeit war es ein pflanzliches Homologe aus *L. esculentum* zu isolieren und biochemisch zu charakterisieren. Damit würde eine Grundlage geschaffen, um in weitergehenden Untersuchungen zur Klärung der biologischen Funktionen dieser Protease in Pflanzen beitragen zu können.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> BL21 codon plus (DE3)-RIL	B <sup>-</sup> F <sup>-</sup> <i>ompT hsd S</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal</i> λ (DE3) <i>end A Hte</i> [ <i>arg U ile Y leu W Cam</i> <sup>r</sup> ]
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> φ80d <i>lac Z</i> ΔM15 Δ( <i>lac ZYA-arg F</i> ) U 169 <i>deo R</i> <i>rec A1 end A1 pho A hsd R</i> 17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>snp E44</i> λ <sup>-</sup> <i>thi -1 gyr A96 rel A1</i>
<i>E. coli</i> SOLR™	e14 <sup>-</sup> ( <i>McrA</i> <sup>-</sup> ) Δ( <i>mcr-hsdSMR-mrr</i> ) 171 <i>sbcC recB</i> <i>recJ uvrC umuC::Tn5</i> (Kan <sup>r</sup> ) <i>lac gyrA96 relA1 thi-1</i> <i>endA1</i> λ <sup>R</sup> [F <sup>'</sup> <i>proAB lacI</i> <sup>q</sup> ΔM15] Su <sup>-</sup> (nonsuppressing)
<i>E. coli</i> TOP10F <sup>'</sup>	F <sup>'</sup> { <i>lacI</i> <sup>q</sup> Tn10 (Tet <sup>R</sup> ) } <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-</i> <i>mcrBC</i> )Φ80 <i>lac Z</i> ΔM15 Δ <i>lac X74 recA1 deoR</i> <i>araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>gal U gal K rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i>
<i>E. coli</i> W3110 <i>pREP4groESL</i>	F <sup>-</sup> LAM <sup>-</sup> IN( <i>rrn D-rrn E</i> )1 <i>rph-1</i> (Amrein et al, 1995)
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF <sup>'</sup>	Δ( <i>mcrA</i> )183 Δ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>end A1 sup</i> <i>E44 thi-1 rec A1 gyrA96 rel A1 lac</i> [F <sup>'</sup> <i>proAB</i> <i>lacI</i> <sup>q</sup> ΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]



<i>LB Amp Cam Kana Agar</i>	25 g LB Broth, Miller (Difco) 20 g Agar aqua dest. ad 1 Liter autoklaviert (20 min) Zugabe von 1 ml Ampicillin Stocklösung (100 mg/ml) 1 ml Chloramphenicol Stocklösung (34 mg/ml) und 500 µl Kanamycin Stocklösung (34 mg/ml)
<i>LB Medium</i>	25 g LB Broth, Miller (Difco) aqua dest. ad 1 Liter autoklaviert (20 min)
<i>NZY Agar</i>	5 g NaCl 2 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 5 g Yeast extract 10 g Caseinhydrolysat 15 g Agar aqua dest. ad 1 Liter pH 7.5 ( 10 M NaOH) autoklaviert (20 min)
<i>NZY Medium</i>	5 g NaCl 2 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 5 g Yeast extract 10 g Caseinhydrolysat aqua dest. ad 1 Liter pH 7.5 ( 10 M NaOH) autoklaviert (20 min)

*NZY Top Agar*                      1 Liter NZY  
0.7 % (w/v) Agarose  
autoklaviert (20 min)

### 2.2.2 Puffer

*Blotting Puffer*                      14.5 g Glycin  
2.9 g Tris (hydroxymethyl) aminomethan  
800 ml aqua dest.  
200 ml Methanol

*Crystal violet Ladepuffer*              30 % Glycerol  
20 mM EDTA  
100 µg/ml Crystal Violet

*1M Kaliumphosphatpuffer*              1 M  $K_2HPO_4$   
1 M  $KH_2PO_4$   
pH 7  
autoklaviert (30 min)

*Ladepuffer*                              50 % Glycerin  
Acridin Orange (5 mg/ml)  
50 % TE-Puffer (pH 8)

*Mini-Prep Puffer*                      25 mM Tris/HCl (pH 7.5)  
50 mM Glucose  
10 mM EDTA  
autoklaviert (20 min)



---

<i>10 x Northern Puffer</i>	0.4 M MOPS 100 mM NaOAc 10 mM EDTA pH 7 (NaOH) autoklaviert (30 min)
<i>Puffer A</i>	10 mM NaCl 1 mM EDTA 50 mM Tris/HCl pH 8
<i>10 x SDS-PAGE Laufpuffer</i>	30 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS pH 8.3
<i>2 x SDS-PAGE Probenpuffer</i>	3 ml Sammelpuffer 2 ml 20 % SDS 1 ml 87 % Glycerol 1 ml 2-Mercaptoethanol 3 ml aqua dest Spatelspitze Bromphenolblau
<i>4 x SDS-PAGE Probenpuffer</i>	6 ml Sammelpuffer 400 mg SDS 2 ml 87 % Glycerin 2 ml 2-Mercaptoethanol Spatelspitze Bromphenolblau
<i>SDS-PAGE Sammelpuffer</i>	0.5 M Tris/HCl pH 6.8 0.4 % SDS

---

<i>SDS- PAGE Trennpuffer</i>	1.5 M Tris/HCl pH 8.8 0.4 % SDS
<i>Sequenzierladepuffer</i>	4 Teile Formamid 1 Teil 25 mM EDTA pH 8 50 mg/ml Blue Dextran
<i>SM Puffer</i>	5.8 g NaCl 2 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 50 ml 1M Tris/HCl (pH 7.5) 5 ml 2 % (w/v) Gelatine aqua dest. ad 1 Liter autoklaviert (30 min)
<i>20 x SSC</i>	173.3 g NaCl 100 g Natriumcitrat x 3 H <sub>2</sub> O aqua dest. ad 800 ml pH 7 aqua dest. ad 1 Liter autoklaviert (30 min)
<i>10 x STE</i>	0.1 M NaCl 10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 8 autoklaviert (30 min)

<i>1 x TAE</i>	40 mM Tris/AcOH pH 8 1 mM EDTA autoklaviert (30 min)
<i>10 x TBE</i>	0.9 M Tris 0.9 M Borsäure 0.03 M EDTA (pH 8) autoklaviert (30 min)
<i>TE</i>	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 8 autoklaviert (30 min)

### 2.2.3 weitere Lösungen und Gele

<i>1 % Agarose Gel</i>	1 g Agarose 100 ml aqua dest. 2 ml 50 x TAE lösen unter erhitzen 10 µl EtBr (5 mg/ml)
<i>Ampicillin Stocklösung</i>	Ampicillin (100 mg/ml) in H <sub>2</sub> O steril filtriert
<i>Chloramphenicol Stocklösung</i>	34 mg/ml Chloramphenicol in Ethanol

---

<i>Coomassie Entfärbelösung</i>	600 ml aqua dest. 100 ml Essigsäure 300 ml Methanol
<i>Coomassie Färbelösung</i>	50 % Methanol 0.05 % Coomassie Brilliant Blue R 250 10 % Essigsäure
<i>1% Crystal violet Agarose Gel</i>	1g Agarose 100 ml aqua dest. 2 ml 50 x TAE lösen unter erhitzen 60 µl Crystal violet (2 mg/ml in aqua dest.)
<i>Denaturierungslösung</i>	0.5 M NaOH 1.5 M NaCl autoklaviert (30 min)
<i>50 x Denhardts Reagens</i>	5 g Ficoll 5 g Polyvinylpyrrolidon 5 g BSA aqua dest. ad 500 ml steril filtriert
<i>Heringssperma DNA</i>	8 mg/ml, partiell hydrolysiert in TE pH 8
<i>1 M IPTG</i>	2.4 g Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid aqua dest. ad 10 ml steril filtriert

---

<i>Kanamycin Stocklösung</i>	34 mg/ml Kanamycin in aqua dest.
<i>Kristallisationsmatrix (DHβ)</i>	600 µl in Aceton gesättigte Dihydroxybenzoesäure 300 µl 0.1 % Trifluoressigsäure
<i>20% Maltose</i>	20 % (w/v) Maltose in aqua dest. steril filtriert
<i>1M MgSO<sub>4</sub></i>	1 M MgSO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O autoklaviert (30 min)
<i>Neutralisierungslösung</i>	1.5 M NaCl 0.5 M Tris/HCl pH 8 autoklaviert (30 min)
<i>Ponceau Färbelösung</i>	0.2 % Ponceau S 3 % Trichloressigsäure 3 % Sulfosalicylsäure
<i>20 % (w/v) SDS</i>	200 g SDS aqua dest. ad 1 Liter
<i>SDS-PAGE Sammelgel (4.5 %)</i> <i>(für 2 Gele)</i>	1 ml Monomeregemisch 4 ml aqua dest. 1.7 ml SDS-PAGE Sammelpuffer 20 µl 10 % Ammoniumpersulfat 12 µl TEMED

*SDS-PAGE Trenngel (8 %)**(für 2 Gele)*

3.2 ml Monomergemisch  
5.8 ml aqua dest.  
3 ml SDS-PAGE Trennpuffer  
40 µl 10 % Ammoniumpersulfat  
9 µl TEMED

*SDS-PAGE Trenngel (10 %)**(für 2 Gele)*

4 ml Monomergemisch  
5 ml aqua dest.  
3 ml SDS-PAGE Trennpuffer  
40 µl 10 % Ammoniumpersulfat  
9 µl TEMED

*(Vor) hybridisierungslösung*

50 % Formamid  
5 x SSC  
50 mM KPP (pH 7)  
2 x Denhardt's  
Herinssperma DNA (100 µg/ml), vor Zugabe 10 min in  
siedendem Wasser denaturiert und auf Eis abgekühlt  
0.5 % SDS  
aqua dest. auf  $V_{\text{tot}}$

*Waschlösung 1*

1 x SSC  
0.5 % SDS

*Waschlösung 2*

0.5 x SSC  
0.5 % SDS

## 2.3 Chemikalien und Materialien

Alle Chemikalien stammen, sofern unten nicht speziell aufgeführt, von Fluka (Buchs).

Amersham Pharmacia Biotech	Glutathionsepharose 4B Sephadex G50
Amicon	Microcon Zentrifugenfilter (MwCO 30 kDa)
Amresco	Ammoniumpersulfat TEMED
Bachem	Fluoreszenz Substrat
BioRad	30 % Acrylamid/Bis 19:1 (5% C)Acrylamid N,N'Methylenbisacrylamid Kaleidoscop prestained standard Poly-prep chromatographycolumns PVDF Membran SDS-PAGE prestained low range standard
Biosolve Ltd	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
Boehringer Mannheim/Roche	Pwo DNA-Polymerase Faktor Xa
Calbiochem	N-Ethylmaleimid

---

DIFCO	Agar LB-Medium
Eurobio	Agarose Ampicillin Chloramphenicol Kanamycin
Gibco BRL	Caseinhydrolysat 1kb- Marker
ICN Biomedicals Inc	Glycin
Kodak	Röntgenfilm X-OMAT AR
MBI Fermentas	alkalische Phosphatase (CIAP) Restriktionsenzyme T4 DNA-Ligase
Microsynth	Primer
National Diagnostics	Sequenziergel Mix
Packard	Emulsifier Safe™
Perkin Elmer	"cycle sequencing kit"
Pierce	Albumin Standard Coomassie® Protein assay reagent



---

Promega	PCR Puffer und Taq Bead® "hot start" DNA-Polymerase
Schleicher & Schuell	Nitrocellulose Membran (BA 85)
Sigma	Bradykinin Crystal violet Dihydroxybenzoesäure Heringssperma DNA Mineralöl 1,10-Phenanthrolin Ponceau S Substanz P Tergitol NP 40 (nonyl phenoxy polyethoxy ethanol)
Stratagene	10 x cloned Pfu DNA-Polymerase Reaktionspuffer Ex Assist™ Helferphage pBluescript SK Plasmid Pfu Turbo® DNA-Polymerase

## 2.4 Methoden

### 2.4.1 Titration der cDNA $\lambda$ Phagenbibliothek

Medium, bestehend aus 100 ml LB, 100  $\mu$ l 1M MgSO<sub>4</sub> und 100  $\mu$ l 20 % Maltose, wurde mit *E. coli* XL1-Blue MRF' Zellen angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 200 rpm angezogen. Nach Zentrifugation (10 min, 500 x g) wurde der Überstand dekantiert, das Sediment mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0.5 (Beckmann Du 62 Spektrophotometer) resuspendiert und bis zum weiteren Gebrauch auf Eis gelagert.

Zur Titration der cDNA  $\lambda$  Phagenbibliothek (Schmid et al., 1992) wurden Verdünnungen von 1/1000 bis 1/10<sup>6</sup> in SM Puffer hergestellt. Jeweils 10  $\mu$ l dieser Verdünnungen wurden mit 200  $\mu$ l der Bakterienkultur während 15 min bei 37 °C inkubiert. Das Bakterien-Phagengemisch gab man dann zu 2 ml NZY Top Agar (48 °C) und verteilte dieses Gemisch gleichmässig auf einer NZY Agar Platte ( $\varnothing$  90 mm). Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C konnte nach Auszählen der Plaques der Titer (pfu/ml) bestimmt werden.

### 2.4.2 Plattieren der cDNA $\lambda$ Phagenbibliothek

*E. coli* XL1-Blue MRF' (600  $\mu$ l, siehe unter 2.4.1.) wurde mit 48'000 pfu versetzt, während 15 min bei 37 °C inkubiert, nach Addition zu 7 ml NZY Top Agar (48 °C) auf NZY Agar Platten ( $\varnothing$  150 mm) plattiert und während 7 Stunden bei 37 °C inkubiert. Das oben beschriebene Vorgehen wurde mit 40 Platten durchgeführt, um eine genügend grosse Anzahl an Plaques ( $9.6 \times 10^5$ ) sichten zu können.

Zur Analyse der Plaques wurde die DNA auf Nitrocellulosemembranen (Schleicher & Schuell, BA 85) übertragen. Dazu wurde eine Membran auf die zuvor während 2 Stunden auf 4 °C abgekühlte Platte gelegt. Während einer Wartezeit von 1 min (erste Membran) bzw. 2 min (zweite Membran) wurde die Orientierung der Nitrocellulosemembran mit einer Nadel markiert. Anschliessend transferierte man die

Membran mit der der Platte zugewandten Seite nach oben auf ein mit Denaturierungslösung getränktes Whatman® 3 MM Papier und liess sie dort während 2 min liegen. Auf mit Neutralisierungslösung befeuchteten Whatman® 3 MM Papieren wurden die Membranen je dreimal für mindestens 5 min neutralisiert. Die Nitrocellulosemembran wurde kurz in 2 x SSC geschwenkt und auf Whatman® 3 MM Papier angetrocknet. Anschliessend wurde die DNA durch UV-Licht (UV Stratalinker 1800 von Stratagene (120'000 µJ)) an die noch leicht feuchte Membran gebunden.

### 2.4.3 Herstellung der radioaktiv markierten cDNA Sonden

Auf Grund der bekannten Teilsequenz der Xaa-Pro Aminopeptidase 1 (*LeAPP1*, J. Strassner unveröffentlicht) wurde ein cDNA Fragment von 870 bp mittels PCR amplifiziert. Dazu verwendete man auf ein Gesamtvolumen von 50µl 100 ng Templat (cDNA in pYes2 Vektor), 1 µM 5'-Primer (T7)\*, 1µM 3'-Primer PC31\* (interner Primer), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1 x PCR Puffer, 0.2 mM dNTPs, Taq Bead® "hot start" DNA-Polymerase (Promega), drei Tropfen Mineralöl sowie steriles Wasser. Die PCR (Perkin Elmer Cetus DNA thermal cycler) umfasste 35 Zyklen (95 °C, 30 sec; 55 °C, 30 sec; 72 °C, 1 min). Das Produkt wurde mit Ethanol gefällt und über ein 1 % Agarosegel aufgetrennt. Man isolierte die erhaltenen Fragmente mittels des Prep-A-Gene DNA Purification Kit von BioRad (Produktbeschreibung unter <http://www.bio-rad.com>) aus dem Gel. Zur Bestimmung der Konzentration nach der Reinigung entnahm man ein Viertel des Endvolumens und analysierte es mittels Gelelektrophorese (Vergleich der Bandenintensität mit derjenigen des 1kb Markers). Die Herstellung der radioaktiven Sonde erfolgte nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983). Dazu verwendete man das Prime-it® II Random Primer labelling Kit von Stratagene (Protokoll online unter <http://www.stratagene.com> verfügbar) unter Einsatz von 25 ng des gereinigten PCR Produktes. Die nicht inkorporierten Nucleotide trennte man mittels Gelfiltration über Sephadex G50 ab. Die

spezifische Aktivität der Sonde bestimmte man mit einem Scintillationszähler (1  $\mu$ l Probe auf 4ml Emulsifier™ Safe; Beckmann LS 1801 Scintillationszähler).

\*Sequenzen siehe Anhang

#### 2.4.4 Sichtung der cDNA $\lambda$ Phagenbibliothek

Nach der Vorhybridisierung (42 °C, ~ 3 Stunden) transferierte man die Membranen in ein Gefäß, das ein minimales Volumen an Hybridisierungslösung sowie die denaturierte Sonde enthält. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42 °C. Am folgenden Tag spülte man die Membranen mit je zweimal 300 ml Waschlösung 1. Anschliessend wurden die Filter in eine neue Schale transferiert und einmal mit 300 ml Waschlösung 1 und je dreimal mit 300 ml Waschlösung 2 während 30 min bei 60 °C gewaschen. Die Detektion der positiven Plaques erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilmes (Kodak X-OMAT AR) während dreier Tage bei – 80 °C (mit Verstärkerfolie).

Die positiven Plaques wurden mit dem stumpfen Ende einer Pasteurpipette ausgestochen und in Eppendorfgefässe, die 1ml SM und 3 Tropfen Chloroform enthielten, transferiert. Mit einer Verdünnung von 1/500 dieser Phagensuspensionen wiederholte man das unter 2.4.2 - 2.4.4 beschriebene Vorgehen. Die nach zweiter Sichtung erhaltenen Phagenlösungen wurden einerseits wie unter 2.4.5 beschrieben weiterverwendet und andererseits erneut ausplattiert.

#### 2.4.5 "*In vivo excision*" der cDNAs und Analyse der Klone

Die cDNAs im pBluescript SK Plasmid (Stratagene) konnten durch *in vivo excision* mittels eines Helferphagen aus der  $\lambda$  Phagen DNA gewonnen werden. Dazu wurden *E. coli* XL1-Blue MRF' (200  $\mu$ l, siehe 2.4.1) Zellen mit 250  $\mu$ l des Phagenstocks und 1 $\mu$ l Ex Assist™ Helferphage ( $4.7 \times 10^{10}$  pfu/ml, Stratagene) in einem 15 ml Falcon

Polypropylenröhrchen während 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml LB Medium inkubierte man erneut über Nacht bei 37 °C und 200 rpm. Anschliessend erhitzte man die Proben während 20 min auf 68 °C und zentrifugierte während 15 min mit 1000 x g. Der Überstand enthielt den ausgeschnittenen pBluescript SK Phagemid in filamentösen Phagen. Eine Übernachtkultur von *E. coli* SOLR™ Zellen (LB Medium, resuspendiert in 10 mM MgSO<sub>4</sub>, davon 200 µl verwendet) wurde mit 100 µl des Phagenüberstandes während 15 min bei 37 °C inkubiert, auf LB Amp Agar Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C herangezogen. Dabei wurde auf Bakterienkolonien selektioniert, die den pBluescript SK enthielten.

Die Plasmid-DNA wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse isoliert (Sambrook et al., 1989). Die Anzucht der Bakterien erfolgte in 2 ml LB Medium (100 µg/ml Ampicillin) über Nacht bei 37 °C und 200 rpm. Die Übernachtkultur (1.5 ml) wurde bei 18'680 x g abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Sediment in 100 µl Mini-Prep Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl 0.2 M NaOH, 1 % SDS und 5 min Inkubation auf Eis ergänzte man die Suspension mit 150 µl 3 M Kaliumacetat und stellte sie erneut für 5 min auf Eis. Durch Zentrifugation entfernte man das Präzipitat und transferierte den Überstand in ein neues Mikrozentrifugengefäss, in welchem 800µl Ethanol vorgelegt waren. Es folgten weitere 15 min auf Eis und 15 min Zentrifugation. Die gefällte DNA wurde in 200 µl TE aufgenommen, mit 1 µl pankreatischer RNase (10 mg/ml) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Extraktion mit Phenol (equilibriert in 100 mM Tris/HCl pH 8.0) und mit Phenol/Chloroform (1:1, v/v) sowie einer Ethanol-fällung nahm man das Plasmid in 50 µl TE auf. Mittels Restriktion mit Pst I und Xho I und anschliessender Analyse durch Auftrennung über ein 1 % Agarose Gel wurde die Länge der cDNA abgeschätzt.

Die der unter 2.4.3 - 2.4.5 beschriebenen Methoden zugrundeliegenden Prinzipien sowie weiterführende Protokolle sind im Beiheft des ZAP-cDNA® Synthese Kit (200400) sowie des ZAP-cDNA® Gigapack II (200402) (online verfügbar unter <http://www.stratagene.com>) ausführlich beschrieben.

### 2.4.6 Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der unter 2.4.5 erhaltenen und ausgewählten Plasmide erfolgte nach der von Sanger et al. (1977) beschriebenen Kettenabbruchmethode unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Dideoxynucleotide. In der PCR (95 °C, 30 s; 50 °C, 15 s; 60 °C, 4 min; 25 Zyklen) verwendete man auf ein Gesamtvolumen von 10 µl 1.6 µl Primer (1 µM, T7\*, T3\*, sowie konstruktsspezifische Primer), 2 µl Templat (ca. 200 ng Plasmid-DNA), 2.4 µl H<sub>2</sub>O und 4 µl Sequenziermix (Perkin Elmer). Das Produkt wurde mit Ethanol gefällt und in 4 µl Sequenzierladepuffer aufgenommen. Die Trennung der Oligonucleotide erfolgte über ein 5 % (w/v) Polyacrylamidgel in Gegenwart von 8 M Harnstoff (gepuffert mit 1 x TBE). Die Elektrophorese dauerte bei 2500 V und 38 W 17 Stunden (ABI 373 DNA Sequencer, Perkin Elmer). Die erhaltenen Daten wurden mit dem Software Paket der University of Wisconsin Genetics Computer Group analysiert.

\*Sequenzen siehe Anhang

### 2.4.7 Northern- und Southern-Blot Analysen

RNA (5.5 µg), welche aus Tomatenpflanzen (*L. esculentum* cv. Castelmart II) von A. Schaller und D. Frasson gewonnen worden war, versetzte man mit 1 µl 10 x Northern Puffer (Sambrook et al. 1989), 3.5 µl Formaldehyd und 10 µl Formamid, denaturierte sie während 15 min bei 65 °C und schreckte die Probe auf Eis ab. Nach Zugabe von 2 µl 10 x Northern Puffer trennte man die RNA auf einem 1.2 % (w/v) Agarosegel (1 x Northern Puffer) während 6 h auf. Der Kapillartransfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte über Nacht in Gegenwart von 10 x SSC. Nach der Waschung mit 2 x SSC und kurzer Trocknung auf Whatman® 3 MM Papier erfolgte die Bindung der RNA an die Membran mit UV-Licht (UV Stratalinker 1800 von Stratagene (120'000 µJ)). Zur Southern-Blot Analyse wurden zwei von D. Frasson hergestellte DNA Gel Blots verwendet, auf denen je 10 µg bzw. 20 µg genomische DNA von Tomatenpflanzen, restringiert mit Dra I, EcoR I, Hind III bzw. Xba I, fixiert waren.

Auf Grund der Sequenzähnlichkeit der beiden in *L. esculentum* bekannten Xaa-Pro Aminopeptidasen (*LeAPP1* und *LeAPP2*) wählte man als Templat für die Herstellung der Sonden den untranslatierten Bereich am 3'-Ende der cDNAs (PCR wie unter 2.4.3 beschrieben und den Oligonucleotiden X-Pro Sonde\* und T7\* als Primer). Nach der Vorhybridisierung (42 °C, ~ 3 Stunden) transferierte man die Membranen in ein Gefäß, das ein minimales Volumen an Hybridisierungslösung sowie die radioaktiv markierte und denaturierte Sonde (siehe unter 2.4.3) enthielt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42 °C. Am folgenden Tag spülte man die Membranen mit je zweimal 300 ml Waschlösung 1. Anschliessend wurden die Filter in eine neue Schale transferiert, einmal mit Waschlösung 1 und einmal mit Waschlösung 2 während 30 min bei 60 °C gewaschen. Zur Analyse wurde die Nitrocellulose während 5 Tagen auf einer Phosphor Imager Kassette (Molecular Dynamics) exponiert und anschliessend mit der entsprechenden Software (Image Quant, Molecular Dynamics) ausgewertet. Die Nitrocellulose Membranen wurden zur Entfernung der gebundenen Sonde dreimal mit kochender Waschlösung (0.05 % SDS, 0.05 x SSC) übergossen, 30 min geschwenkt und anschliessend an der Luft getrocknet.

\*Sequenzen siehe Anhang

#### **2.4.8 Transformation der *E. coli* DH5 $\alpha$ Zellen und Amplifikation des pGEX-G Vektors**

Um die Xaa-Pro Aminopeptidase 2 (*LeAPP2*) als GST-Fusionsprotein exprimieren und reinigen zu können wurde zuerst der Vektor amplifiziert. Dazu transformierte man die *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen mit dem pGEX-G Vektor (Görlach et al., 1996; Smith et al., 1988) wie folgt: Ein Eppendorfgefäß mit 400  $\mu$ l der bei -80 °C gelagerten *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde langsam auf Eis aufgetaut und so früh als möglich transferierte man 200  $\mu$ l der Zellsuspension in ein zweites Mikrozentrifugengefäß, in dem man zuvor 0.5  $\mu$ l Plasmid (ca. 50 ng) vorgelegt hatte. Nach 30 min auf Eis erhitzte man die Zellen 30 Sekunden auf 42 °C und kühlte sie 5 min auf Eis. Anschliessend fügte man 800  $\mu$ l LB Medium hinzu und inkubierte die Zellen während 45 min bei 37 °C. Danach plattierte man 2

Aliquots (hier: 1  $\mu$ l bzw. 20  $\mu$ l) auf LB Amp Agar Platten aus und inkubierte über Nacht bei 37 °C.

Mit diesen Zellen impfte man eine Übernachtskultur (200 ml LB mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin, 200 rpm) an, reinigte das Plasmid am folgenden Tag mit dem Wizard<sup>®</sup> Plus Midiprep DNA Purification Kit von Promega (Protokoll online verfügbar unter <http://www.promega.com/tbs/tb173/>) und überprüfte die Reinheit mittels Gelelektrophorese. Die Konzentration der gereinigten DNA wurde spektrophotometrisch ( $OD_{260nm}$  von 1 entspricht 50  $\mu$ g/ml DNA; UVIKON 933 Double Beam UV/VIS Spektrophotometer) bestimmt.

#### **2.4.9 Amplifikation des offenen Leserasters mit Pwo DNA-Polymerase, Restriktion und Ligation in den pGEX-G Vektor**

Zur fehlerfreien Amplifikation des offenen Leserasters verwendete man die Pwo DNA-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* mit 3'-5' Exonuclease Aktivität. Dabei führte man durch den Primer eine Kpn I Schnittstelle am 3'-Ende ein. Der 5'-Primer war am 5'-Ende phosphoryliert. Für die PCR mischte man 23  $\mu$ l steriles Wasser, 2  $\mu$ l Desoxynucleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 10 mM), 10  $\mu$ l 5'-Primer (AP25 pGEX p\*, 10  $\mu$ M Stocklösung), 10  $\mu$ l 3'-Primer (AP23 pGEX\*, 10  $\mu$ M Stocklösung) und 5  $\mu$ l Plasmid (ca. 500 ng). Nach Denaturierung während einer Minute bei 95 °C wurden 50  $\mu$ l einer zweiten Mischung, welche aus 39.5  $\mu$ l sterilem Wasser, 10  $\mu$ l 10 x PCR Puffer mit 20 mM  $MgSO_4$  und 0.5  $\mu$ l Pwo DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l) bestand, hinzugefügt und eine weitere Minute denaturiert. Die anschließende PCR (Perkin Elmer Cetus DNA thermal cycler) umfasste 30 Zyklen (10 Zyklen: 95 °C 15 s, 52 °C 30 s, 72 °C 2 min; 20 Zyklen: 95 °C 15 s, 52 °C 30 s, 72 °C 2 min wobei die Reaktionszeit bei 72 °C in jedem Zyklus um 5 s verlängert wurde; 72 °C 2 min). Der Reaktionsansatz wurde mit Ethanol gefällt. Anschliessend wurde die DNA mit Kpn I (10 Units, 1 h 30 min, Zugabe von 5 Units, erneut 1h 30 min) restringiert und das Enzym durch Phenol/Chloroform- (1:1 v/v) Extraktion entfernt. Die Reinigung der DNA erfolgte mittels



Gelelektrophorese und nachfolgender Isolation aus dem Gel mit dem Prep-A-Gene DNA Purification Kit von BioRad.

Der pGEX-G Vektor (10 µg) wurde mit Stu I (50 Units 1 h 30 min, Zugabe von 25 Units, erneut 1 h 30 min) verdaut und nach Hitzeinaktivierung (10 min bei 65 °C) mit Ethanol gefällt. Anschliessend wurde das Plasmid mit Kpn I (50 Units 1 h 30 min, Zugabe von 25 Units, erneut 1 h 30 min) verdaut, wobei man zum gleichen Ansatz nach 30 min Restriktion alkalische Phosphatase (1 Unit CIAP, erneute Zugabe von 1 Unit CIAP nach 1h) hinzufügte. Der Restriktionsansatz wurde zunächst mit Phenol (equilibriert in 100 mM Tris/HCl pH 8.0), dann mit Phenol/Chloroform (1:1 v/v) extrahiert und die DNA mit Ethanol gefällt. Das Sediment wurde in 12.5 µl Wasser und 2.5 µl Crystal violet Ladepuffer aufgenommen. Die elektrophoretische Reinigung des Vektors wurde in Gegenwart von Crystal violet durchgeführt, welches DNA (mehr als 200 ng) direkt im Gel sichtbar macht, um Schädigung durch UV-Licht zu vermeiden. Die DNA wurde mit dem Prep-A-Gene DNA Purification Kit von BioRad aus dem Gel extrahiert. Die DNA Konzentrationen der Lösungen von Vektor und PCR Produkt wurden durch Vergleich mit DNA Lösungen bekannter Konzentration auf einer Ethidiumbromid-haltigen (0.5 µg/ml) Agarose Platte abgeschätzt. Die anschliessende Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Dazu verwendete man PCR Produkt (50 ng) und Vektor (40 ng) in einem molaren Verhältnis von 3:1 sowie T4 DNA-Ligase (10 Units) im empfohlenen Puffer. Die Transformation erfolgte wie unter 2.4.8 beschrieben (*E. coli* DH5α oder *E. coli* TOP10F' Zellen). Von 18 erhaltenen Kolonien wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.4.5) und durch Restriktionsanalyse (EcoR I und Hind III) untersucht. Von diesen Kolonien zeigten 17 ein Fragment mit der zu erwartenden Grösse. Zwei Klone wurden durch Sequenzierung (siehe 2.4.6) überprüft und einer für die weiteren Arbeiten verwendet.

\*Sequenzen siehe Anhang

### 2.4.10 Expression des Fusionsprotein

Der pGEX-G Vektor erlaubt die Expression eines offenen Leserasters als Fusionsprotein mit der Glutathion S-Transferase (GST) aus *S. japonicum*. Die Plasmid-DNA (siehe 2.4.9) wurde in die Bakterienstämme *E. coli* BL21 codon plus (DE3)-RIL und *E. coli* W3110 pREP4groESL wie unter 2.4.8 beschrieben transformiert. Die *E. coli* BL21 codon plus (DE3)-RIL Zellen wurden dabei auf LB Ampicillin Chloramphenicol Agar Platten, die *E. coli* W3110 pREP4groESL Zellen auf LB Ampicillin Chloramphenicol Kanamycin Agar Platten selektioniert.

Die nun folgenden Experimente führte man mit beiden Bakterienstämmen unter Verwendung der entsprechenden Antibiotika durch. Mit zwei Vorkulturen (5 ml LB, 100 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol bzw. 34 µg/ml Kanamycin; 200 rpm, 15 h, 37 °C) wurden zwei 200 ml LB Kulturen (in 1000 ml Erlenmeyerkolben, Antibiotikakonzentrationen siehe oben) angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (600 nm; Beckmann Du 62 Spektrophotometer) von 1 bei 37 °C herangezogen. Vor der Induktion der Expression mit 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) transferierte man 10 ml der Kultur in einen 100 ml Erlenmeyerkolben und inkubierte sie bei 30 °C (Kontrolle). Anschliessend induzierte man die Bakterien Kulturen mit IPTG und schüttelte je einen Ansatz bei 30 °C bzw. bei Raumtemperatur (20 °C–25 °C; RT). Nach 0 h, 1 h, 1h 30 min, 2 h, 3 h (30 °C) bzw. nach 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, (RT) entnahm man den Kulturen jeweils 1 ml Proben. Von diesen wurden 100 µl mit 100 µl 2 x SDS-PAGE Probenpuffer versetzt und 3 min bei 95 °C denaturiert. Den Rest lagerte man zur weiteren Verwendung bei –20 °C. Von der nicht induzierten Kontrollkultur wurde nach 3 h und 5 h Proben entnommen und wie oben beschrieben behandelt. Die Expression des GST-Fusionsproteines wurde mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese (4.5 % Sammelgel, 8% Trenngel; 130 V, 80 mA (Laemmli, 1970)) und anschliessender Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R 250 analysiert.

Zur Analyse der Löslichkeit des Fusionsproteines zentrifugierte man die verbliebenen 900 µl der Proben (Zeitpunkte 1 h 30 min, 3 h (30 °C) bzw. 2 h, 5 h (RT)) bei 3430 x g und resuspendierte das Sediment in 90 µl Puffer A, der zusätzlich mit 1 mg/ml Lysozym und 1 mM PMSF versetzt worden war. Nach 20-minütiger Inkubation bei

Raumtemperatur und 30 min im Ultraschallbad (Elgasonic) zentrifugierte man erneut 10 min bei  $18'680 \times g$ . Der Überstand wurde in ein neues Gefäss überführt, mit 2 x SDS-PAGE Probenpuffer versetzt und während 10 min bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  denaturiert. Das Sediment wurde mit 1 ml Puffer A (mit 1 % NP 40) gewaschen, 5 min zentrifugiert und erneut mit Puffer A gewaschen. Anschliessend zentrifugierte man 5 min, resuspendierte das Sediment in  $100 \mu\text{l}$  1x SDS-PAGE Probenpuffer und denaturierte während 10 min bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die Proben analysierte man mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese (siehe oben).

Die Expression war in *E. coli* BL21 codon plus (DE3)-RIL nach 2 Stunden bei Raumtemperatur optimal. Im weiteren wurden zur Reinigung des Fusionsproteins 500 ml Kulturen dieses Stamms wie oben beschrieben angezogen. Die Expression des Fusionsproteins wurde durch 1 mM IPTG induziert und nach 2 Stunden Inkubation bei RT wurden die Zellen bei  $2450 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  während 15 min sedimentiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 2.4.11 Reinigung des Fusionsproteins

Das Zellsediment einer 500 ml Bakterienkultur wurde in 20 ml Puffer A, der 1 mg/ml Lysozym und eine Spatelspitze DNase enthielt, auf Eis resuspendiert und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Man verzichtete vollständig auf die Zugabe von Proteaseinhibitoren wie PMSF und Benzamidin, da aus der Literatur (Ryan et al., 1992) bekannt war, dass diese beiden Reagenzien auf die Xaa-Pro Aminopeptidase hemmend wirken könnten. Die Suspension wurde 10 mal je 30 s mit Ultraschall (Sonicator W380 LSL Secfroid mit Microtip<sup>®</sup> Spitze) behandelt und zwischendurch 30 s auf Eis gekühlt. Alle nun folgenden Arbeiten wurden bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt. Nach Zentrifugation (15 min,  $38'190 \times g$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) wurde der Überstand dekantiert und mit einer Flussrate von ca. 10 ml/h (Pharmacia LKB Pump P1) auf eine Glutathionsepharose-Säule (1 ml Bettvolumen, equilibriert mit 10 Bettvolumen Puffer A) aufgetragen. Anschliessend wusch man mit 10 Bettvolumen Puffer A und 10 Bettvolumen 50 mM Tris/HCl pH 8 (Flussrate ca. 18 ml/h). Das Fusionsprotein wurde mit 10 mM reduziertem Glutathion (in 50 mM Tris/HCl pH 8)

eluiert. Dazu wurde die Glutathionsepharose in 1 ml Elutionspuffer (siehe oben) aufgeschwemmt und nach 10 min wurde das Eluat abgelassen (Flussrate ca. 10 ml/h). Dieser Vorgang wurde 6 mal wiederholt. Zur Analyse durch SDS-PAGE Gelelektrophorese entnahm man von Überstand, Durchfluss und Waschläufen je 100  $\mu$ l und von den Elutionsfraktionen je 10  $\mu$ l und denaturierte sie nach Zugabe der entsprechenden Mengen an 2 x SDS-PAGE Probenpuffer 3 min bei 95 °C.

Die Proteinkonzentrationen der Eluate wurde nach der Methode von Bradford (Bradford et al.,1976) bestimmt, wobei Serum Albumin von *B. taurus* als Standard diente (Eichgerade siehe Anhang; UVIKON 933 Double Beam UV/VIS Spektrophotometer). Anschliessend konzentrierte man die Eluate mit Hilfe eines Zentrifugenfilters (Amicon, MwCO 30 kDa) auf ein Volumen von 1 ml, wusch 3 mal mit 1 ml 0.1 M Tris/HCl pH 7.5 und fror Aliquots von 10  $\mu$ l bzw. 50  $\mu$ l in flüssigem Stickstoff ein. Der Vergleich der Aktivität von eingefrorenem und bei 4 °C gelagertem Protein ergab zunächst keinen Unterschied (Details der Aktivitätsmessungen siehe 2.4.14). Es stellte sich allerdings heraus, dass das Protein bei -20 °C erheblich länger haltbar war.

Das unlösliche Sediment aus 10 ml Sonicat resuspendierte man in 10 ml Puffer A, der 1% NP 40 enthielt, und entnahm davon 1 ml. Nach 5 min Zentrifugation bei 18'680 x g wurde das erhaltene Sediment mit 1 ml Puffer A gewaschen, erneut 5 min zentrifugiert und in 1 ml 1 x SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen. Vor der Verwendung wurde die Probe 3 min bei 95 °C denaturiert.

### **2.4.12 Amplifikation des offenen Leserasters mit der Pfu Turbo<sup>®</sup> DNA-Polymerase**

Das Protein, welches auf Grund der Sequenz des isolierten Klons (siehe 2.4.1-2.4.6) exprimiert worden war, erwies sich als am N-Terminus unvollständig, wie ein Vergleich mit der homologen Xaa-Pro Amino peptidase 1 (*LeAPP1*) aus *L. esculentum* zeigte. Das 5'-Ende der *LeAPP2* cDNA wurde von J. Strassner unabhängig ermittelt. Ein auf dieser Sequenz beruhender 5'-Primer (AP2Gex5 p\*) und ein für die *LeAPP2* spezifischer 3'-

Primer (AP2Gex3\*) wurden verwendet um das verlängerte offene Leseraster mittels PCR zu amplifizieren. Dabei wurde durch Reverse Transkriptase generierte einzelsträngige cDNA (Oligo (dT) als Primer, von A. Schaller zur Verfügung gestellt) als Templat eingesetzt. Es wurde die Pfu Turbo<sup>®</sup> DNA-Polymerase (Stratagene) verwendet, die die gleiche 3'-5' Exonuclease Aktivität hat wie die Pwo DNA-Polymerase, allerdings erheblich weniger Templat benötigt. Für die PCR wurden 5 µl 10 x cloned Pfu DNA-Polymerase Reaktionspuffer, 1 µl Desoxynucleotidtriphosphat Stocklösung (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 10 mM), 2.5 µl 3'-Primer (10 µM Stocklösung), 2.5 µl 5'-Primer (10 µM Stocklösung), 1 µl Pfu Turbo<sup>®</sup> DNA-Polymerase (2.5 U/µl) und 35.5 µl steriles Wasser verwendet. Die PCR (Robo Cycler<sup>®</sup> Gradient 96 von Stratagene) wurde wie vom Hersteller empfohlen (Instruktionsmanual S.9; online unter <http://www.stratagene.com>) durchgeführt (30 Zyklen: 95 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 2 min). Das PCR Produkt wurde wie unter 2.4.9 beschrieben gereinigt und in den pGEX-G ligiert. Zwei Klone, die nach Restriktionsanalyse (Sma I und Hind III) ein Fragment mit der erwarteten Grösse enthielten, wurden sequenziert (siehe 2.4.6). Anschliessend verfuhr man wie unter 2.4.10 bis 2.4.11 beschrieben.

\*Sequenzen siehe Anhang

### 2.4.13 Aminoterminaler Sequenzierung

Zur Untersuchung der Spaltprodukte, die bei der Lagerung (4 °C) auftraten, wurden die einzelnen Polypeptide aminoterminal ansequenziert. Dazu fällte man die Probe (7 µg Protein) mit Methanol/Chloroform (Wessel et al., 1984), denaturierte sie für 3 min bei 95 °C und trennte sie mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese (10 % Trenngel, 4.5 % Sammelgel) auf. Anschliessend wurde das Protein auf eine mit Methanol angefeuchtete Polivinyliden-Difluorid (PVDF) Membran mittels "Western Blotting" (1h bei 200 mA, 100 V; RT) übertragen. Nach Färbung mit Ponceau S, wurden die Protein tragenden Membranstücke zur aminoterminalen Sequenzierung gegeben (Dr. R Brunisholz, Institut für Molekularbiologie und Biophysik der ETH Zürich).

#### **2.4.14 Spaltung des Fusionproteins mit Faktor Xa**

Die Spaltung erfolgte wie vom Hersteller (Boehringer Mannheim/Roche) empfohlen. Man inkubierte dazu das Protein bei Raumtemperatur mit Faktor Xa im Gewichtsverhältnis 1/1, 1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100 in Gegenwart von 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.1 M NaCl und 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Nach 4 h, 6 h, 8 h, 15 h und nach 20 h wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese (siehe 2.4.10) analysiert.

#### **2.4.15 Analyse der Substratspezifität mit Matrix Assisted Laser Desorbition / Ionization Time Of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS)**

Zur Analyse der Substratspezifität verwendete man zwei aus Tieren bekannte Substrate von Xaa-Pro Aminopeptidasen, Bradykinin und Substanz P, sowie Systemin.

Man inkubierte dazu das Fusionsprotein (250 nM) in Anwesenheit von 4 mM MnCl<sub>2</sub>, einem bekannten Aktivator von Xaa-Pro Aminopeptidasen (Lloyd et al., 1996), mit dem Substrat (50 µM). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 1 µl des Ansatzes entnommen und zusammen mit 1 µl DHβ Matrix auf die MALDI-TOF MS-Probenplatte pipettiert. Dabei bildeten sich weisse Kristalle. Nachdem die Kristalle an der Luft getrocknet waren, wurden sie dreimal mit kaltem, sterilem Wasser gewaschen und erneut getrocknet. Von den Proben wurden anschliessend von Y. Huet und Dr. P. Marcheroux Massenspektren (Massenspektrometer: Voyager Elite Biospectrometry Research Station von PerSeptive Biosystems) aufgenommen. Die Daten wurden anschliessend mit den Programmen Data Explorer (PE Biosystems) sowie PAWS (ProteoMetrics) analysiert.

### 2.4.16 Bestimmung des $K_m$ -Wertes sowie des Einflusses von pH, Metallionen und Inhibitoren auf die Hydrolyse eines fluoreszenzmarkierten Peptidsubstrates

Als Substrat wurde H-Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA (Bachem) eingesetzt, das spezifisch für Xaa-Pro Aminopeptidasen ist (B.Stiebitz et al., 1997). In diesem Molekül unterdrückt (quencht) die *para*-Nitroanilin Gruppe (pNA) die Fluoreszenz der 2-Aminobenzoesäure (Abz), solange die beiden Gruppen miteinander verbunden sind. Werden sie jedoch durch die Aktivität einer Protease voneinander getrennt entfällt dieser Effekt und die Fluoreszenz wird um ein vielfaches verstärkt. Die Änderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zeit entspricht der Reaktionsgeschwindigkeit. Die Fluoreszenzmessungen (Kontron SFM 25 Fluoreszenzspektrophotometer;  $\lambda_{exc}$ : 320 nm,  $\lambda_{em}$ : 411 nm, PM-Voltage: 300 V, Scan-Geschwindigkeit 100 nm/s) wurden in einer Quarzglasküvette in einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ l in 0.1 M Tris/HCl pH 7.5 durchgeführt. Dabei wurden 125 ng Fusionsprotein und das Substrat, sofern nicht anders angegeben, in einer Konzentration von 50  $\mu$ M eingesetzt. Zur Untersuchung des Effektes von Metallionen wurde das Protein 5 min mit dem Salz inkubiert, bevor das Substrat zugegeben wurde. Für die Analyse von Inhibitoren inkubierte man das Protein mit dem jeweiligen Hemmstoff (30 min bei Phenylmethylsulfonylfluorid, N-Ethylmaleimid, 1,10-Phenanthrolin, 2-Mercaptoethanol, Diethylpyrocarbonat (in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer; Lim et al., 1996) bzw. 60 min bei EDTA) bevor eine Reaktion durch Zugabe des Substrates gestartet wurde. Die Daten wurden mit Hilfe des Programmes Excel (Microsoft) ausgewertet.

### 2.4.17 Quervernetzung mit Dimethylsuberimidat

Um nähere Aussagen über die Ausbildung einer möglichen Quartärstruktur machen zu können, wurde das Fusionsprotein mit Dimethylsuberimidat behandelt (White et al., 1988). Die Reaktion wurde in 0.1 M Triethanolamin pH 8 und 40 mM NaCl in Gegenwart

von 50 mM Dimethylsuberimidat bei Raumtemperatur durchgeführt. Man verwendete dazu 40 µg Fusionsprotein, welches mit Hilfe eines Zentrifugenfilters (Amicon MwCO 30 kDa) umgepuffert worden war. Nach einer Stunde wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  auf eine Endkonzentration von 0.5 M im Ansatz abgestoppt. Anschliessend fällt man das Protein mit Methanol/Chloroform (Wessel et al., 1984), um die bei der Gelelektrophorese störenden Salze zu entfernen sowie um das Protein aufkonzentrieren zu können. Aufgrund der zu erwartenden Grösse eines möglichen Tetramers wurde für die SDS-PAGE Gelelektrophorese ein Gradientengel (4-15% Polyacrylamid, BioRad) verwendet. Als Grössenmarker wurde der Kalaidoscop Prestained Marker (BioRad) eingesetzt.



## 3. Resultate

### 3.1 Bestimmung der Primärstruktur der *LeAPP2*

Von J. Strassner wurde die partielle cDNA einer Xaa-Pro Aminopeptidase (*LeAPP1*) aus Tomate isoliert. Um die vollständige cDNA der Xaa-Pro Aminopeptidase zu isolieren, wurde diese partielle cDNA zur Sichtung einer cDNA  $\lambda$  Phagenbibliothek aus *L. esculentum* (Schmid et al., 1992) eingesetzt. Im ersten „Screening“ von  $9.6 \times 10^5$  pfu wurden 37 Plaques ausgewählt und die Phagen für die zweite Selektion eingesetzt. Nach dieser zweiten Runde wurden 14 gut definierbare Plaques ausgewählt, die Plasmid-DNA gewonnen und der Sequenzanalyse zugeführt. Sieben dieser Klone zeigten Ähnlichkeit zu einer in der Datenbank bereits bekannten Xaa-Pro Aminopeptidase von *A. thaliana* (gi |7270625|), vier dieser Klone waren identisch mit der von J. Strassner identifizierten Xaa-Pro Aminopeptidase (*LeAPP1*). Die verbleibenden drei Klone kodierten für eine neue Xaa-Pro Aminopeptidase (*LeAPP2*; Fig. 9).

```

ATGGCGGATACACTCCGAGCTCTGAGGTCTTTGATGGCTTCTCACTCTCCTCCTCAATGCTTTAATCGTTCCTCCGAAGATTATCATCAGAGCGAAT 100
M A D T L A A L R S L M A S H S P P L N A L I V P S E D Y H Q S E
ATGTTTCTGCACGAGATAAGAGGCGCGATTTTCGTCTCTGGATTCAACCGAAGTGCTGGTATAGCGCTTATATCAATGAACGAAGCACTTCTGTGGACCGA 200
Y V S A R D K R R D F V S G F T G S A G I A L I S M N E A L L W T D
TGGTCGCTACTTTTTGCAGGCAGCTCAGCAGCTTAGTGAGCAATGGAAGCTCATGCGTATGGGAGAAGACCCTGCACTTGATATTTGGATGGCAGATAAT 300
G R Y F L Q A A Q Q L S E Q W K L M R N G E D P A L D I W M A D N
CTGCCAAAGGATGCAGCTATTGGTGTGATCCATGGTGTATATCAGTAGACTGCACAGAAATGGGAGCGTGCTTTTGCTAAGAAACAGCAAAAGTTGG 400
L P K D A A I G V D P W C I S V D T A Q K W E R A F A K K Q Q K L
TTCCAACAGCTAGAACTTGGTAGATGAAGTCTGGAAAAATCAGCCACCTGCCGAAACAAATCCCTTGATCGTGCATCCTTTAGAATTTGCTGGTGGCTC 500
V P T A R N L V D E V W K N Q P P A E T N P L I V H P L E F A G R S
TGTTGCAGATAAGTTGAAAGATTTGAGAGCAAAGCTTGTAAAGGAAAAAGCTCGTGCCATAATAATAACAGCACTTGATGAAGTTGCTGGTGTATAAT 600
V A D K L K D L R A K L V K E K A R A I I I T A L D E V A W L Y N
GTCCGTGGAACAGATGTATCATATAGCCCGGTTGTTTCATGCATTTGCTATTGTGACATTGACCTCGGCCTTCTTGTATGTGGATAAAAGAAAGTTGTCAT 700
V R G T D V S Y S P V V H A F A I V T L T S A F L Y V D K R K L S

```

```

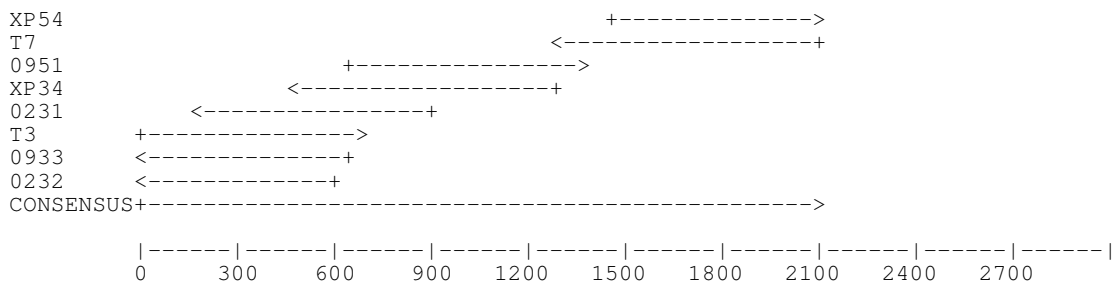
CTGAGGCCAAACTCTTACATGAAGGAAAATGGAATTTTTGTACGGGAATATGGTGATGTTAGCTCAGATGCAGTCTACTTGCATCTGATCAACTCACTCC
800
S E A N S Y M K E N G I F V R E Y G D V S S D A V L L A S D Q L T P
TTCTTCAGCTGACAAAACCTCCGTCGGGATTGAATACGGGAGACTAATTGTGGCAAGGATACAGAAAATGGTAAAATTTCAGACAGCAGAGCTTGTGAATGAC
900
S S A D K T P S G L N T E T N C G K D T E N G E I Q T A E L V N D
CTCATTGGGTTGACACTGGTGCATGCTGCTTTGCTTTGTAAGTGAATGCTGATAAAGTCTCTTAAGCAGTCACCATTGGCTCTTGCGAAAG
1000
L I W V D T G A C C F A L Y L K L N A D K V L L K Q S P L A L A K
CCCTAAAGAACCCTGTTGAGATGAAAGGATTGAAGAAGCCACATTCCGGGATGGGGCAGCAGTCGTGCAATATCTCGCTGGCTGGATAGGCAGATGCA
1100
A L K N P V E M K G L K N A H I R D G A A V V Q Y L A W L D R Q H Q
GGAAATCTATGGGGCATCCGGTACTTCGCAGAGGCTGAGAGTATGAGCATGAACAAAATAAAGGATTTGAAACGGCTTACAGAAGTTTCTGCAAGTGAT
1200
E I Y G A S G Y F A E A E S M S M N K L K D L K R L T E V S A S D
AAGCTAGAGGAGTTCGGGCATCTAAAGAGCATTTTCAGAGGGCTGAGTTTTCCAACATTTTCATCTGTTGGTTCAAATGGAGCCATTATCCATTATCCC
1300
K L E E F R A S K E H F R G L S F P T I S S V G S N G A I I H Y S
CTGAGGCAGAAACATGTGCTGAACCTTGACCCAGATCAAATGTAAGTATGTTGATTCAGGAGCACAGTATCTGGATGGAACAACATGATATTACCGGACTGT
1400
P E A E T C A E L D P D Q M Y L C D S G A Q Y L D G T T D I T R T V
TCATTTTGGAAAACCTACTGCACATGAGAAAACATGTTACACTGCGGTTCTCAAAGGACATATTTTCATTGGGTAATGCACGGTTTCCCAATGGAACAAT
1500
H F G K P T A H E K T C Y T A V L K G H I S L G N A R F P N G T N
GGTTATGCTCTTGATGTTCTTCTCGAACTCCTTTATGGAAGTATGGGCTTGACTATAGGCATGGTACAGGTCATGGGATCGGGTCTTACTTAAATGTCC
1600
G Y A L D V L A R T P L W K Y G L D Y R H G T G H G I G S Y L N V
ATGAAGGACCTCATCAGATCAGTTTCAGACCATCAGCGCAGAATGTGCCACTACAAGTTTCAATGACAGTCACAGATGAACCTGGTACTACGAGGATGG
1700
H E G P H Q I S F R P S A Q N V P L Q V S M T V T D E P G Y Y E D G
AAAGTTTGGTATAAGATTGGAGAATGTGCTTATTGTCAAAGAGGGCAATACTAAGTTCAACTTTGGCGACAAGGGTTACTTGACATTGAGCATATAACT
1800
K F G I R L E N V L I V K E G N T K F N F G D K G Y L T F E H I T
TGGGCACCATATCAGAGGAAGTTGATTGATGTTAGCCTTCTGGTGCCCGAAGAGATCCAAATGGTTGAACGAGTACCACTGTAATGCTCGGAAAACCTCG
1900
W A P Y Q R K L I D V S L L V P E E I Q W L N E Y H C K C S E I L
CTCCTTATTGAAATCAATCTGAGATGGAATGGTTGAAGAATGCTACTGCACCCATTGCAGCTTGAGATGTTCAAGTGCTCTTACCCTTTATTGAATAAAGT
2000
A P Y L N O S E M E W L K N A T A P I A A
TTGTAATAATTCAGCACTCATACAATAAAAAACCTATACTTGTCAATTATTATATATATACGCATTACTGCATTTGGAGATGGTGGTCTCGGAAAAAAGA
2100
AAGGGTTTTATTTTGGTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

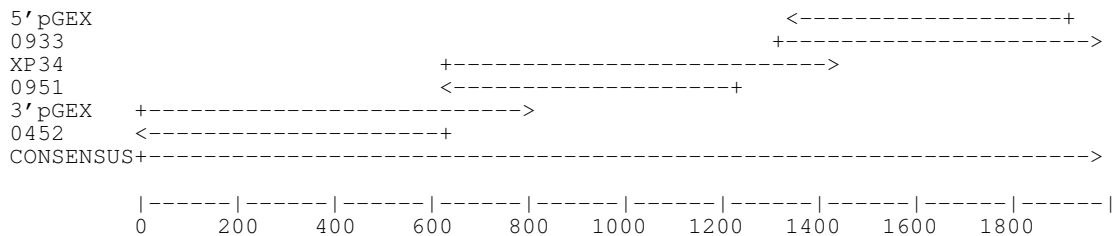
→ 2138

**Fig. 9:** Sequenz der cDNA sowie der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz. Das Startkodon ist grün, das Stoppkodon rot markiert. Blau markiert sind die Basen bzw. die Aminosäuren, die im Teillängeklon fehlten. Rot gefärbt Aminosäuren sind in der Xaa-Pro Aminopeptidase Familie (Fig. 13) konserviert. Die Aminosäuren, welche zum "pita-bread" Sequenzmotiv gehören sind mit einer roten Linie gekennzeichnet. Die orange markierten Aminosäuren sind Erkennungssequenzen für N-Glykosylierung.

Die längste der drei cDNAs wurde auf beiden Strängen vollständig sequenziert (Fig. 10) und schien den gesamten Protein-kodierenden Bereich zu umfassen. Die acht auf das



a)



b)

**Fig. 10:** Sequenzierstrategien, für den Teillängeklon (a) sowie für das vollständige offene Leseraster (b). Mit XP 54, T7, 0951, XP34, 0231, T3, 0933, 0232, 0452, 5' pGEX, 3' pGEX sind die Namen der Primer (Sequenzen im Anhang) bezeichnet.

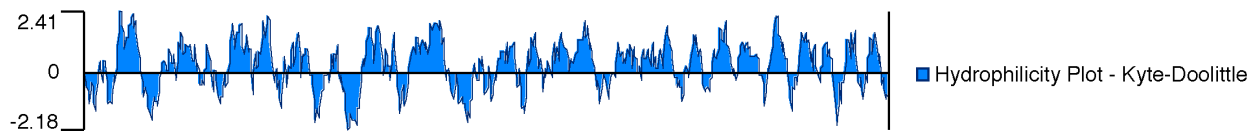
erste von dieser cDNA kodierte Methionin folgenden Aminosäuren stimmten exakt mit dem vorhergesagten Aminoterminus der im *Arabidopsis* Genomprojekt identifizierten Xaa-Pro Aminopeptidase (gi |7270625|) überein.

Die Expression dieses offenen Leserasters (siehe Fig. 9, zweites "ATG" in Position 34) in *E. coli* führte aber nicht zur Bildung einer aktiven Protease. Vergleiche mit der LeAPP1 sowie mit einem von J. Strassner unabhängig isolierten Klon der LeAPP2

<i>L. esculentum</i>	APP 1	MADTLAALRSLMSSHSPSLHALIIPSEDYHQSEYVSARDKRR
<i>L. esculentum</i>	APP 2	<b>MADTLAALRSL</b> MASHSPPLNALIVPESEDYHQSEYVSARDKRR
<i>A. thaliana</i>	1	-----MASHSPPLDALVPESEDYHQSEYVSARDKRR

**Fig. 11:** Alignment des aminoterminalen Bereiches der beiden Homologen aus *L. esculentum* mit der Xaa-Pro Aminopeptidase aus *A. thaliana* (gi|7270625|). Die zu Beginn fehlenden Aminosäuren wurden rot eingefärbt.

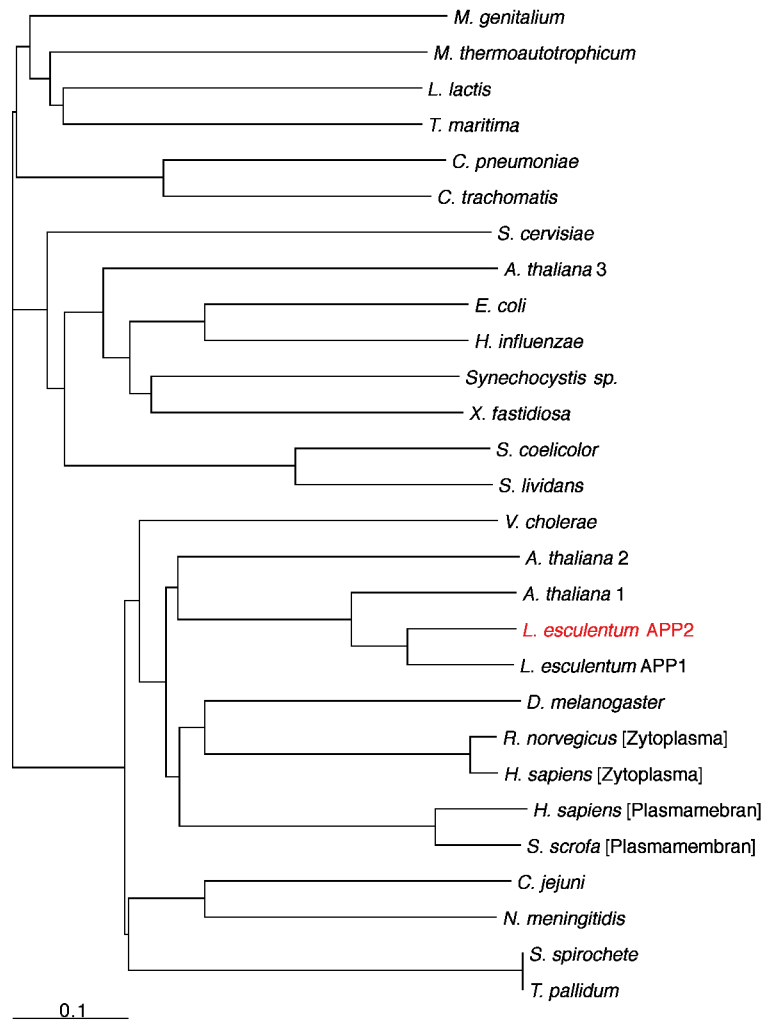
zeigten, dass am Aminoterminus offensichtlich noch insgesamt 11 Aminosäuren fehlen mussten (Fig. 11). Die in Figur 9 gezeigte Sequenz ist um die am 5'-Ende fehlenden Basen vervollständigt. Die cDNA umfasst 2120 bp. Das offene Leseraster von 1965 bp kodiert für ein Protein von 654 Aminosäuren mit einer errechneten molekularen Masse von 72.68 kDa. An das Stoppkodon in Position 1963 schliesst sich eine 3'-untranslatierte Region von 155 bp an. Das Programm PROSITE (<http://www.expasy.ch> → PROSITE) sagt drei mögliche N-Glykosylierungsstellen voraus (Fig. 9). Eine Modifizierung durch einen Glykosylphosphatidylinositol Anker wurde nicht vorausgesagt. Aus der Verteilung von hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren (Fig. 12) kann man die Existenz eines



**Fig. 12:** Hydrophilizität nach Kyte-Doolittle.

Signalpeptides oder einer Transmembrandomäne ausschliessen. Weiterhin fehlen bekannte Signalsequenzen (<http://www.expasy.ch> → SignalP), die auf einen Transport in andere Zellkompartimente hinweisen. Bei der *LeAPP2* handelt es sich daher aller Voraussicht nach um ein zytosolisches Protein.

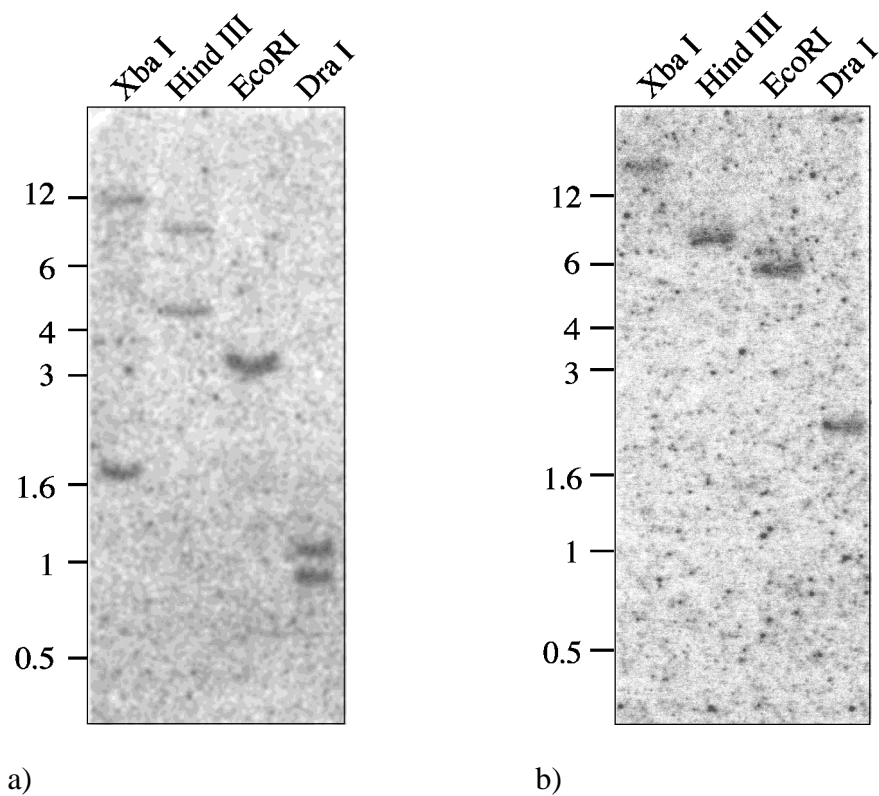
Figur 13 zeigt einen phylogenetischen Stammbaum resultierend aus einem Vergleich der Aminosäuresequenz von *LeAPP1* und *LeAPP2* mit denen anderer Xaa-Pro Aminopeptidasen. Er deutet auf die nahe Verwandtschaft der Tomatenenzyme mit zwei der drei im *Arabidopsis* Genomprojekt identifizierten Sequenzen und den homologen Enzymen anderer höherer Eukaryoten hin. Dennoch ist die in der PROSITE Datenbank für diese Proteasenfamilie beschriebene charakteristische Erkennungssequenz ([HA]-[GSYR]-[LIVMT]-[SG]-H-x-[LIV]-G-[LIVM]-x-[IV]-H-[DE]; PROSITE Schema) nicht konserviert. In der *LeAPP2* ist nach dem konservierten Glycinrest der Erkennungssequenz ein Serin und ein Tyrosin (Ser<sub>529</sub>, Tyr<sub>530</sub>; Fig. 9) eingeschoben.



**Fig. 13:** Phylogenetischer Baum der Xaa-Pro Aminopeptidase Familie. Distanzen in Gonnet Einheiten. Erzeugt mit Hilfe der Programme Clustal X (Thompson et al., 1997; Jeanmougin et al., 1998) und TreeView (Page, 1996). Die Datenbankeinträge der Sequenzen sind im Anhang aufgelistet.

### 3.2 Southern- und Northern-Blot Analysen

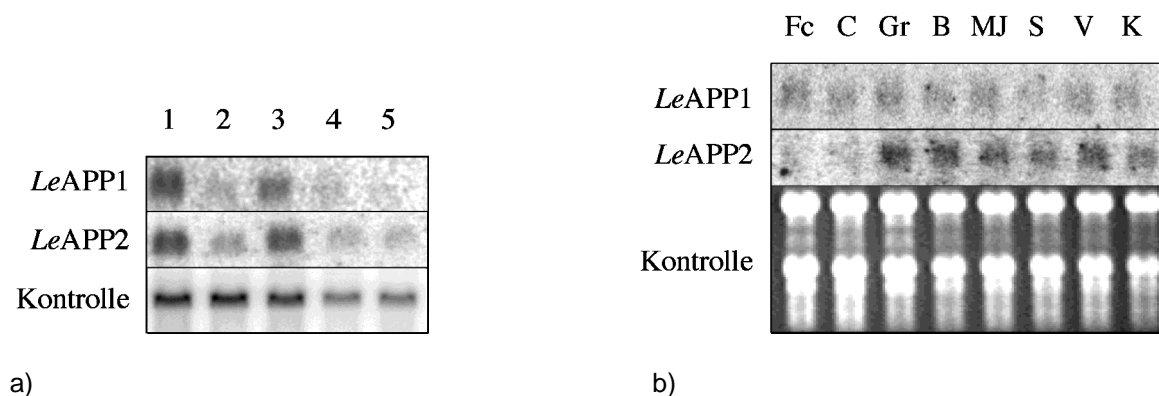
Das Auffinden einer bislang unbekanntenen Xaa-Pro Aminopeptidase bestätigt die Befunde aus der Southern-Blot Analyse von *LeAPP1* (J. Strassner, unveröffentlicht), welche auf die Existenz mehrerer verwandter Gene im Tomatengenom hindeutet. Für die Untersuchung der Expression der beiden Xaa-Pro Aminopeptidasen aus der Tomate waren genspezifische Sonden erforderlich, die es ermöglichen, auf Northern-Blots zwischen den Transkripten von *LeAPP1* und *LeAPP2* zu unterscheiden. Um solche Sonden zu generieren, wurde der 3'-untranslatierte Bereich der cDNAs mittels PCR amplifiziert. Die so gewonnenen DNA Fragmente wurden zunächst im Southern-Blot auf ihre Spezifität hin überprüft. Fig. 14 zeigt eine Southern-Blot Analyse von *LeAPP1* und



**Fig.14:** Southern-Blot Analyse von *LeAPP1* (a) und *LeAPP2* (b). Je 10 µg (a) bzw. je 20 µg (b) genomischer Tomaten DNA wurden mit den angegebenen Enzymen restringiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die DNA wurde auf der Membran mit einer genspezifischen DNA Sonde (entsprechend dem 3'-untranslatierten Bereich der cDNA) hybridisiert. Die Position der DNA Fragmente bekannter Länge (in kb; Gibco/BRL 1 kb ladder) ist angegeben.

*LeAPP2*. Während die Sonde für *LeAPP2* in jeder Bahn mit jeweils nur einem DNA-Fragment hybridisiert, zeigt die Sonde für *LeAPP1* mehrere Banden. Die geringe Übereinstimmung der verwendeten Sonden sowie die unterschiedliche Grösse der markierten Fragmente schliessen eine Kreuzhybridisierung aus. Es muss daher angenommen werden, dass noch ein drittes, mit *LeAPP1* nahe verwandtes Gen existiert.

Mit der spezifischen *LeAPP2* sowie mit der *LeAPP1* Sonde wurde nun die Expression in verschiedenen Geweben, sowie die Reaktion auf verschiedene Elicitoren der Wundantwort untersucht (Fig. 15).



**Fig. 15:** Northern-Blot Analysen der Expression von *LeAPP1* und *LeAPP2*. Je 5.5  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschliessend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die RNA wurde auf der Membran mit einer genspezifischen DNA Sonde (entsprechend dem 3'-untranslatierten Bereich der cDNA) hybridisiert. **a)** Expression von *LeAPP1* und *LeAPP2* in verschiedenen Geweben. Man untersuchte die RNA aus Zellkulturen (1), Blüten (2), Wurzeln (3), Blättern (4) und Kotyledonen (5). Als Kontrolle der RNA Mengen in den einzelnen Bahnen verwendete man eine für Ubiquitin spezifische Sonde. **b)** Einfluss verschiedener Elicitoren der Wundantwort auf die Expression von *LeAPP1* und *LeAPP2*. Zwei Wochen alte Tomatenpflanzen wurden mit Fusicoccin (Fc, 3  $\mu\text{M}$  während 6 h), Calyculin A (C, 1  $\mu\text{M}$ , 4 h), Gramicidin A (Gr, 1  $\mu\text{M}$ , 6 h), Bestatin (B, 1 mM, 8 h), Methyljasmonat (MJ, 1  $\mu\text{l}$  auf 2 l Luft, 8 h) und Systemin (S, 28 nM, 8 h) behandelt. Weiterhin untersuchte man die Wirkung der Verwundung (V, Quetschung des terminalen Fiederblattes, 8 h) auf die Expression. Nach Behandlung der Pflanze wurde die RNA aus dem Sprossmaterial apikal der Kotyledonen isoliert. Man verglich die Expression mit unbehandelten Pflanzen (K). Als Kontrolle der RNA-Mengen ist das mit Ethidiumbromid gefärbte Agarosegel dargestellt.

Beide Xaa-Pro Aminopeptidasen werden hauptsächlich in Zellkulturen und Wurzeln exprimiert (Fig. 15a). Die Expression von *LeAPP1* liess sich durch keinen der verwendeten Elicitoren beeinflussen (Fig. 15b). Wegen der fehlenden Spezifität der *LeAPP1* Sonde ist es allerdings denkbar, dass ein drittes bislang nicht identifiziertes Gen zum Expressionsmuster der *LeAPP1* beiträgt. Bei den Elicitoren handelte es sich

einerseits um Systemin und Methyljasmonat, die beide in der Wundsignalisierung eine Rolle spielen und andererseits um Stoffe, die durch die Veränderung des elektrochemischen Ionengradienten über die Plasmamembran (Fusicoccin, Gramicidin A) oder durch die Hemmung von Phosphatasen (Calyculin A) die Wundsignalisierung beeinflussen. Daraus konnte man schliessen, dass die Expression weder durch Verwundung noch durch Veränderung des Membranpotentials beeinflusst wird. Auch Bestatin, ein Inhibitor von Aminopeptidasen (Schaller et al., 1995), konnte die Expression nicht induzieren. Das gleiche gilt auch für *LeAPP2*, obwohl man aus Fig. 15b entnehmen könnte, dass die Expression durch Fusicoccin und Calyculin A unterdrückt wird. Weitere Analysen von A. Schaller mit unterschiedlichen Konzentrationen und verschiedenen Inkubationszeiten der Elicitoren konnten aber diesen Befund nicht bestätigen (Daten nicht gezeigt).

### **3.3 Reinigung des Fusionsproteins und Abspaltung der Glutathion S-Transferase mit Faktor Xa**

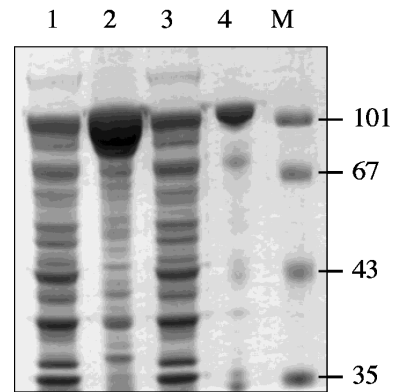
Das offene Leseraster der *LeAPP2* wurde mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pGEX-G kloniert. Die Identität des Konstrukts wurde durch Sequenzanalyse bestätigt. (Fig. 10b). Das Konstrukt wurde in *E. coli* transformiert und die Expression der *LeAPP2* als Fusionsprotein mit Glutathion S-Transferase (GST-*LeAPP2*) wurde mit IPTG induziert. Das Fusionsprotein wurde aus der löslichen Fraktion bakterieller Extrakte affinitätschromatographisch über eine Glutathionsepharose-Säule gereinigt (Fig. 16). Mit dieser Methode erhielt man aus einem Liter *E. coli* Kultur insgesamt etwa 4 mg Fusionsprotein. Auf einem SDS-PAGE Polyacrylamidgel (Fig. 16) zeigte das Fusionsprotein eine apparente Masse von ca. 105 kDa, was gut mit der erwarteten Masse aus der Summe der *LeAPP2* (72.7 kDa) und GST (26 kDa) übereinstimmt. Die Präparation wies noch einige Verunreinigungen auf (schwache Banden bei 70, 43 und 35 kDa), die teilweise auch über den Aminoterminus von GST verfügten (siehe 3.4), bei denen es



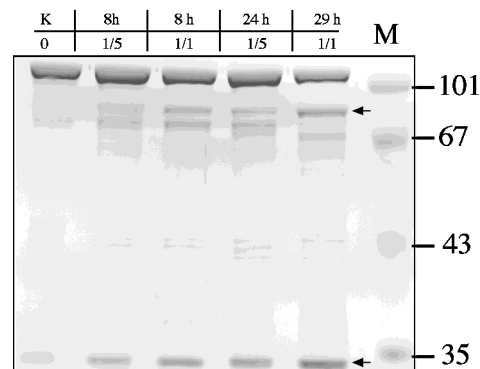
sich also wahrscheinlich um Degradationsprodukte der GST-LeAPP2 handelt. Es wurde versucht durch kurze Expressionszeiten (2h) sowie tiefere Temperaturen (25 °C) nach der Induktion mit IPTG die Menge dieser Produkte so gering wie möglich zu halten, doch gelang es unter den getesteten Bedingungen nicht, das Protein vollständig rein zu gewinnen.

Hinweise aus der Literatur (siehe Einleitung), wonach die Xaa-Pro Amino-

peptidase in der Regel nur als Multimer aktiv ist, legten die Vermutung nahe, dass die GST-Einheit die Aktivität der Protease beeinträchtigen könnte. Es wurde daher versucht, die Glutathion S-Transferase mit der Protease Faktor Xa abzuspalten. Das erwies sich jedoch selbst unter Einsatz von stöchiometrischen Mengen des Faktors Xa als unmöglich (Fig. 17). Weitere Degradationsprodukte bildeten sich fast ebenso schnell wie das gewünschte Fragment. Möglicherweise führt gerade die Ausbildung einer oligomeren Quartärstruktur dazu, dass die Prozessierungsstelle für den Faktor Xa schlecht zugänglich ist. Interessanterweise wurde das Fusionsprotein der N-terminal verkürzten LeAPP2 (siehe 3.1) effizient prozessiert (Daten nicht gezeigt). Das könnte darauf hin deuten, dass dieses Fusionsprotein zur Ausbildung der Quartärstruktur nicht in der Lage ist, dass hieran also der N-Terminus des Proteins beteiligt ist.



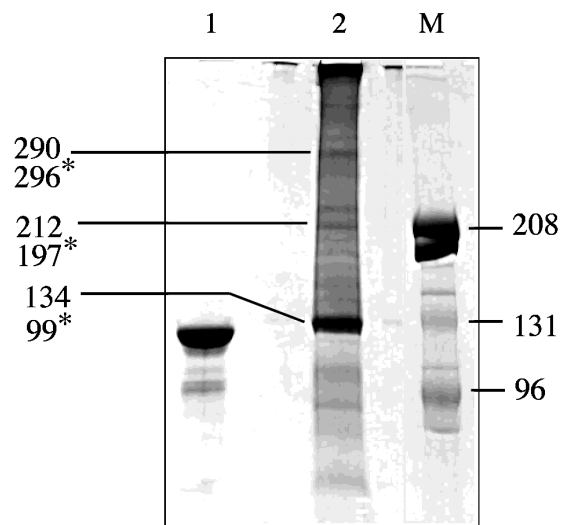
**Fig. 16:** Mit Coomassie gefärbtes SDS-PAGE Polyacrylamidgel der Proteinreinigung. Aufgetragen wurden Überstand (1; 1/2000 des Gesamtvolumens), Sediment (2; 1/4000) Durchfluss (3; 1/2000) und Eluat (4; 1/2000) sowie der SDS-PAGE prestained low range Marker von BioRad (M). Die Grössen sind in kDa angegeben.



**Fig. 17:** SDS-PAGE Gelelektrophorese der Faktor Xa Spaltprodukte. Das Fusionsprotein wurde in verschiedenen Gewichtsverhältnissen zum Faktor Xa (Tabelle zweite Reihe) eingesetzt und während den angegebenen Zeiten (Tabelle erste Reihe) bei Raumtemperatur inkubiert. Die prozessierte LeAPP2 und die Glutathion S-Transferase sind mit Pfeilen gekennzeichnet. M: SDS-PAGE prestained low range Marker.

### 3.4 Quervernetzung mit Dimethylsuberimidat

Die Tatsache, dass alle bislang charakterisierten Xaa-Pro Aminopeptidasen eine Quartärstruktur ausbilden, legte nahe, dass dies auch bei der *LeAPP2* der Fall sein könnte. Um die Quartärstruktur sichtbar zu machen wurde eine GST-*LeAPP2* Proteinlösung mit Dimethylsuberimidat behandelt. Dieses Reagens verbindet Aminogruppen kovalent, sofern der Abstand zwischen diesen ausreichend klein ist. Auf einem Polyacrylamidgel lassen sich dann höhermolekulare Spezies identifizieren (Fig. 18). Mit dieser Methode liessen sich das Dimer und Trimer der GST-*LeAPP2* nachweisen. Ein mögliches Tetramer konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Es waren eine Reihe weiterer Banden zu beobachten, die sich nicht eindeutig zu ordnen lassen. Möglicherweise sind diese Banden auf Heterooligomere aus GST-*LeAPP2* und Abbauprodukten zurückzuführen.

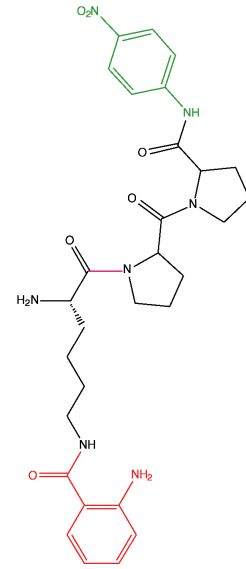


**Fig. 18:** Quervernetzungsexperiment mit der GST-*LeAPP2*. Das Fusionsprotein wurde während einer Stunde bei Raumtemperatur mit Dimethylsuberimidat inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. 1: GST-*LeAPP2*; 2: mit Dimethylsuberimidat behandelte GST-*LeAPP2*; M: Kaleidoscop prestained standard von BioRad. Die Massen sind in kDa angegeben. Mit Stern markierte Werte sind die aufgrund der Proteinsequenz berechnete Massen der Multimere. Die Massen ohne Stern wurden aus der jeweiligen Laufstrecke im Vergleich zur Mobilität der Marker-Proteine (M) errechnet (siehe Anhang).

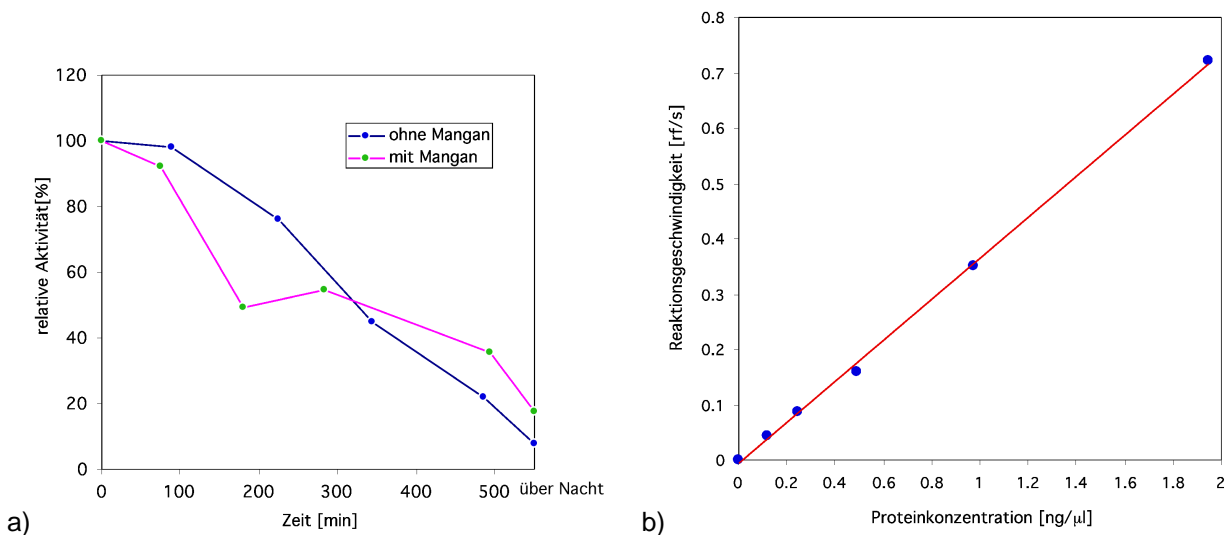
### 3.5 Stabilitätsanalyse des Fusionsproteins

Zur Messung der proteolytischen Aktivität der GST-LeAPP2 wurde ein Substrat eingesetzt (Fig. 19), in dem die Fluoreszenz des N-terminalen 2-Aminobenzoylrestes durch Interaktion mit dem C-terminalen *para*-Nitroanilid unterdrückt wird. Werden beide Gruppen durch Hydrolyse der dazwischen liegenden Lysin-Prolin Bindung getrennt, kommt es, nach Anregung bei 320 nm, zur Fluoreszenz des 2-Aminobenzoylrestes (Stiebitz et al., 1997).

Während der ersten Aktivitätsmessungen mit dem fluorogenen Substrat zeigte sich, dass die Aktivität verdünnter Proteinlösungen (12.5 ng/μl) mit der Zeit schnell abnahm (Fig. 20a). Andererseits blieb die Aktivität des konzentrierten (500 ng/μl) bei 4 °C gelagerten Proteins während etwa einem halben Monat konstant. Auch bei -20 °C erwies sich



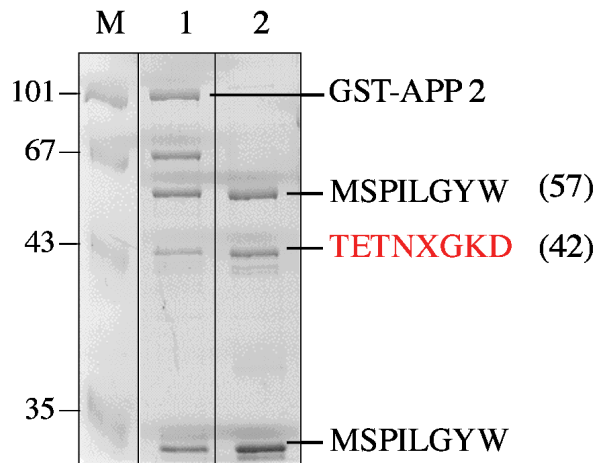
**Fig. 19:** Schematische Darstellung des fluorogenen Substrates. Die fluorogene Gruppe ist rot, die fluoreszenzlöschende Gruppe grün und die zu spaltende Bindung magenta dargestellt.



**Fig. 20:** a) Abnahme der Aktivität des verdünnten Proteins in Abhängigkeit der Zeit. Die eingesetzte Mangankonzentration war 4 mM. 100 % relative Aktivität entsprechen  $0.05 \text{ nmol s}^{-1} \text{ ml}^{-1}$  (ohne Mangan; relativer Fehler: 0.2 %) bzw.  $0.04 \text{ nmol s}^{-1} \text{ ml}^{-1}$  (mit Mangan; relativer Fehler: 0.4 %). Der relative Fehler der Datenpunkte liegt zwischen 0.2 % und 3 %. b) Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeit (Änderung der Fluoreszenz (rf) pro Zeit (s)) zur Proteinkonzentration. Die eingesetzte Mangankonzentration war 4 mM. Der relative Fehler der Datenpunkte liegt zwischen 0.2 % und 0.7 %. Die Proteinkonzentration weist einen relativen Fehler von 2 % auf.

die Aktivität als stabil. Für die weiteren Untersuchungen wurde die GST-*Le*APP2 daher aus eingefrorenen Stocklösungen direkt vor Versuchsbeginn frisch verdünnt. Unter diesen Bedingungen wies die Reaktionsgeschwindigkeit im untersuchten Bereich eine lineare Abhängigkeit zur Proteinkonzentration auf (Fig. 20b).

Während der Aktivitätsverlust verdünnter Proteinlösungen innerhalb eines Tages nicht auf einen Abbau der GST-*Le*APP2 zurückzuführen war (Daten nicht gezeigt), führte eine längere Lagerung (2 Monate) bei 4 °C zum vollständigen Abbau des Fusionsproteins (Fig. 21). Die aminoterminalen Sequenzen der Abbauprodukte wurden ermittelt (Fig. 21), wodurch eine der internen Spaltstellen als die Asn<sub>278</sub>-Thr<sub>279</sub>-Bindung bestimmt werden konnte.

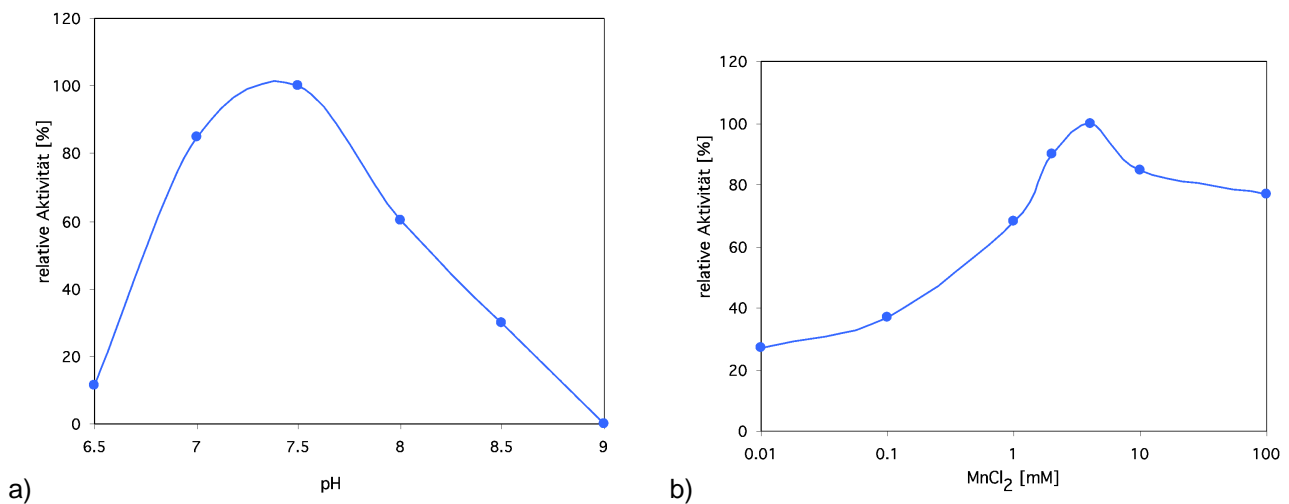


**Fig. 21:** Mit Coomassie gefärbtes SDS-PAGE Polyacrylamidgel für die Analyse der Degradationsprodukte. Die Proteine wurden nach der Gelelektrophorese auf eine PVDF-Membran übertragen und anschliessend aminoterminal ansequenziert. In Bahn 1 wurden die Degradationsprodukte nach 1 Monat bei 4 °C aufgetragen. In Bahn 2 die Degradationsprodukte nach 2 Monaten bei 4 °C. Die bestimmten Aminosäuresequenzen entsprechen dem N-Terminus von GST (schwarz) oder dem eines internen Spaltproduktes der *Le*APP2 (rot). Die für diese Spaltprodukte errechnete Massen (kDa) sind in Klammern angegeben. Die mit X bezeichnete Aminosäure konnte durch aminoterminal Sequenzierung nicht ermittelt werden.

Eine Spaltung dieser Bindung durch eine Xaa-Pro Aminopeptidase wäre sehr ungewöhnlich. Es bleibt hier ungeklärt, ob die Spaltung autokatalytisch oder durch eine verunreinigende bakterielle Protease erfolgte.

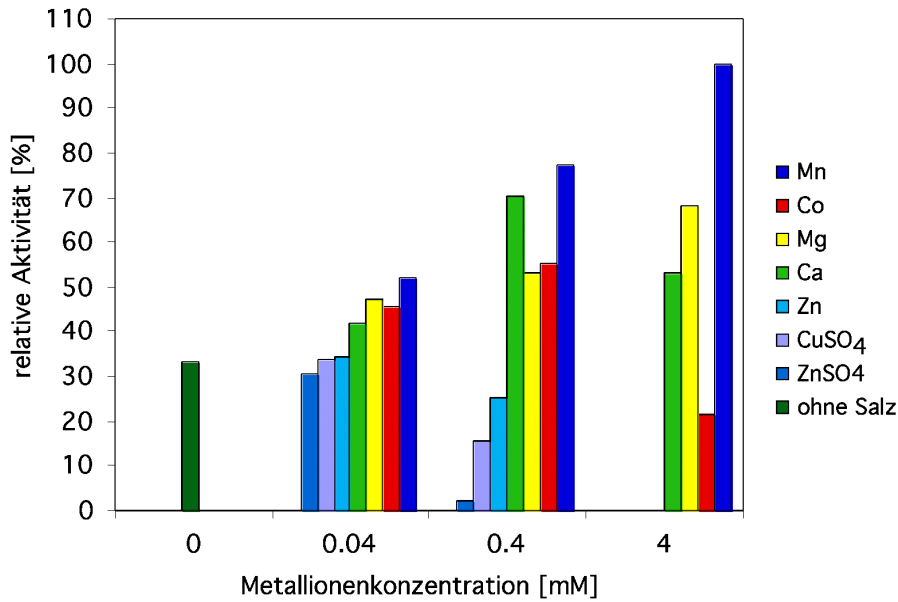
### 3.6 Einfluss von pH, Puffer und Metallionen auf die Hydrolyse eines fluorogenen Peptidsubstrates und Bestimmung der katalytischen Konstanten

Unter Einsatz des fluorogenen Substrates (vgl. 3.5) zeigte die GST-*LeAPP2* in 0.1 M Tris/HCl bei pH 7.5 und einer Mangankonzentration von 4 mM die höchste Aktivität. (Fig. 22). Die Aktivität der GST-*LeAPP2* war in Phosphatpuffer (0.1 M Kaliumphosphat)



**Fig. 22:** **a)** Einfluss des pH auf die Aktivität. Gemessen wurde in 0.1 M Tris/HCl Puffer in Anwesenheit von 4 mM Manganchlorid. 100 % relative Aktivität entsprechen  $0.05 \text{ nmol s}^{-1} \text{ ml}^{-1}$  (relativer Fehler: 0.3 %). Der relative Fehler der Datenpunkte (eine Messung) liegt zwischen 0.2 % und 1 %. **b)** Einfluss der Mangankonzentration auf die Aktivität. Gemessen wurde in 0.1 M Tris/HCl pH 7.5. Die Abszisse besitzt in diesem Fall eine logarithmische Skalierung. 100 % relative Aktivität entsprechen  $0.02 \text{ nmol s}^{-1} \text{ ml}^{-1}$  (relativer Fehler: 0.2 %). Der relative Fehler der Datenpunkte (eine Messung) liegt zwischen 0.1 % und 0.2 %.

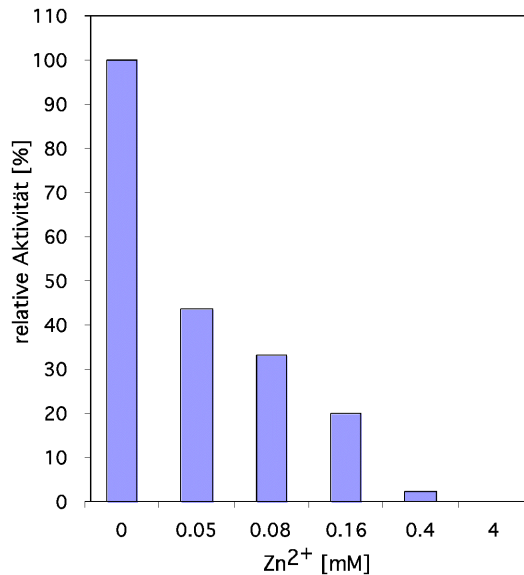
deutlich vermindert, aber auch hier lag das Optimum bei einem pH von 7.5 (Daten nicht gezeigt). Der Einfluss von verschiedenen zweiwertigen Metallionen auf die Aktivität der GST-*LeAPP2* wurde untersucht (Fig. 23). Die GST-*LeAPP2* zeigte auch ohne Zusatz von zweiwertigen Kationen eine gewisse Aktivität (ca. 33 % der maximalen Aktivität), die vermutlich auf die Bindung von Metallionen während der Expression in *E. coli* zurückzuführen ist. Die Natur des gebundenen Metalles wurde nicht bestimmt. Durch Zusatz von zweiwertigen Kationen liess sich die Aktivität der GST-*LeAPP2* über diesen basalen Wert steigern. Während Mangan in allen getesteten Konzentrationen die grösste Aktivierung bewirkte, waren Kupfer und Zink bei Konzentrationen von 0.4 mM



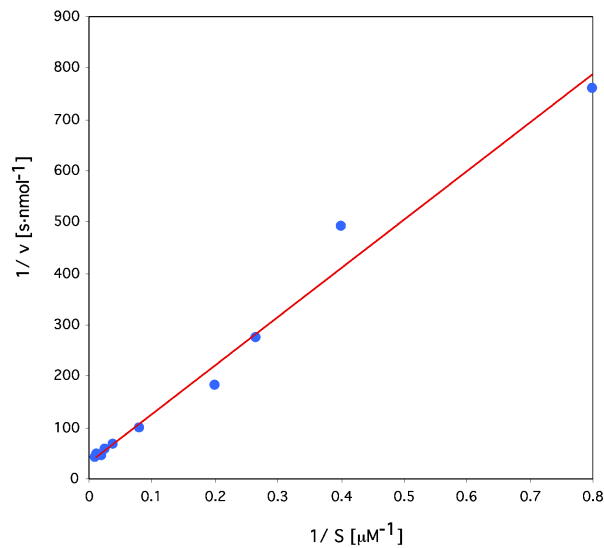
**Fig. 23:** Einfluss verschiedener Metalle auf die Aktivität der GST-LeAPP2. Vor der Zugabe des Substrates wurde das Protein mit den angegebenen Salzen während 5 min inkubiert. Gemessen wurde in 0.1 M Tris/HCl pH 7.5. Wenn nicht anders angegeben wurden die jeweiligen Metallchloride eingesetzt. 100 % relative Aktivität entsprechen  $0.08 \text{ nmol s}^{-1} \text{ ml}^{-1}$  (relativer Fehler: 0.01%). Der relative Fehler der Datenpunkte (eine Messung) liegt zwischen 0.01 % und 0.2 %.

und darüber inhibierend (Fig. 23). Kobalt und Calcium aktivierten bei einer Konzentration von 0.4 mM am stärksten. Dagegen zeigte Magnesium - ähnlich wie Mangan - eine Aktivierung mit zunehmenden Konzentrationen. Der inhibierende Effekt von Zink war stärker als die aktivierende Wirkung von Mangan, d.h. bei gleichen Konzentrationen der Metalle überwog der Effekt von Zink (Fig. 24).

Die Bestimmung der katalytischen Konstanten erfolgte durch Messung der Reaktionsgeschwindigkeiten mit verschiedenen Konzentrationen des fluorogenen Substrates in 0.1 M Tris/HCl pH 7.5 mit 4 mM Mangan. Anschliessend linearisierte man die Daten unter Annahme einer Michaelis Menten Kinetik nach der

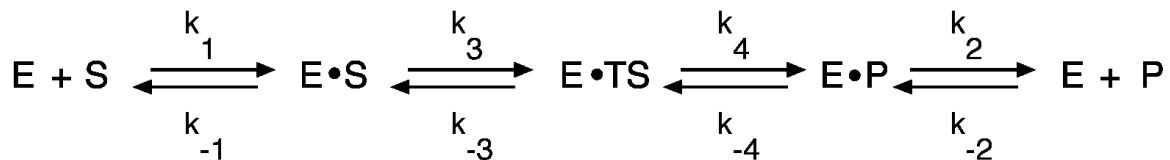


**Fig. 24:** Einfluss von Mischungen aus 4 mM Mangan und verschiedenen Konzentrationen an Zink. Gemessen wurde in 0.1 M Tris/HCl pH 7.5. 100 % relative Aktivität entsprechen  $0.06 \text{ nmol s}^{-1} \text{ ml}^{-1}$  (relativer Fehler: 0.1 %). Der Fehler der Datenpunkte (eine Messung) liegt zwischen 0.1 % und 1 %.



**Fig. 25:** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration. Die Daten wurden nach der Methode von Lineweaver-Burk linearisiert. Die Messungen wurden in 0.1 M Tris/HCl pH 7.5 und 4 mM Mangan durchgeführt. Der relative Fehler der Datenpunkte (eine Messung) liegt zwischen 0.002 % und 0.03 %.

Methode von Lineweaver-Burk (Fig. 25). Dabei wird angenommen, dass die Rückreaktion vernachlässigbar klein und die Konzentration des Enzym-Substrat Komplexes, in diesem Fall die der drei Intermediate (Fig. 26), konstant sind. Weiterhin setzt man



**Fig. 26:** Modell des Reaktionsmechanismus einer Metalloprotease (nach Lowther et al., 2000). E•S: Enzym-Substrat Komplex; E•TS: Enzym-Übergangszustand Komplex; E•P: Enzym-Produkt Komplex.

voraus, dass sich die Substratkonzentration während der Reaktion nicht ändert, d.h. die eingesetzte Substratkonzentration muss viel grösser als die Enzymkonzentration sein. Die folgenden Konstanten für die Umsetzung des fluorogenen Substrates entsprechen dem gewichteten Mittel aus acht unabhängigen Messungen:

$$K_m: (1.52 \pm 0.24) \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$v_{\max}: 0.021 \pm 0.002 \text{ nmol s}^{-1}$$

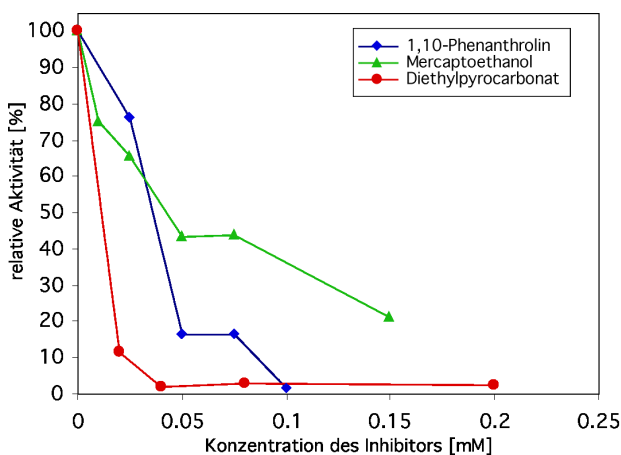
$$k_{\text{cat}}: 17.3 \pm 1.9 \text{ s}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}: (69.7 \pm 8.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

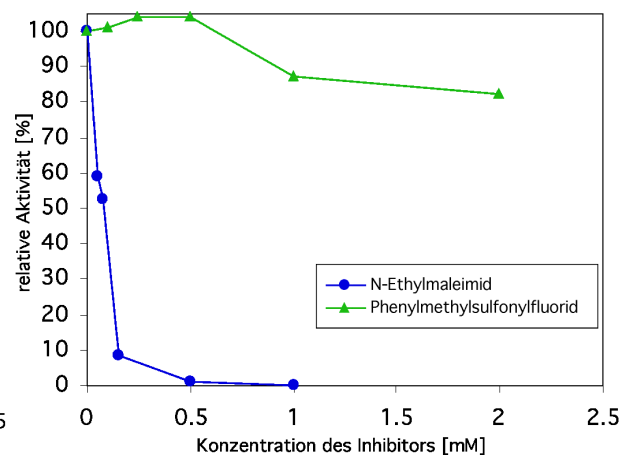
Die zu Beginn exprimierte und aus bakteriellen Extrakten gereinigte GST-LeAPP2, deren Aminoterminus unvollständig war, zeigte keinerlei Aktivität. Daraus folgt, dass die hier für die vollständige GST-LeAPP2 erhaltenen Daten nicht durch Verunreinigungen mit einer bakteriellen Xaa-Pro Aminopeptidase hervorgerufen worden sind.

### 3.7 Unspezifische Inhibitoren der GST-LeAPP2

In der Folge untersuchte man den Einfluss mehrerer unspezifischer Inhibitoren auf die Hydrolyse des fluorogenen Substrates (Fig. 27). Metallchelatoren wie EDTA und 1,10-Phenanthrolin bewirkten, wie für eine Metalloprotease erwartet, eine Hemmung, wobei 1,10-Phenanthrolin in wesentlich geringeren Konzentrationen (0.1 mM gegenüber 100 mM bei EDTA) eine nahezu vollständige Inhibition bewirkte. Gab man nach der Behandlung mit EDTA oder 1,10-Phenanthrolin wieder Metallionen zu, so liess sich die Aktivität bei 1,10-Phenanthrolin wieder steigern (Fig. 27d). Unter den bei EDTA

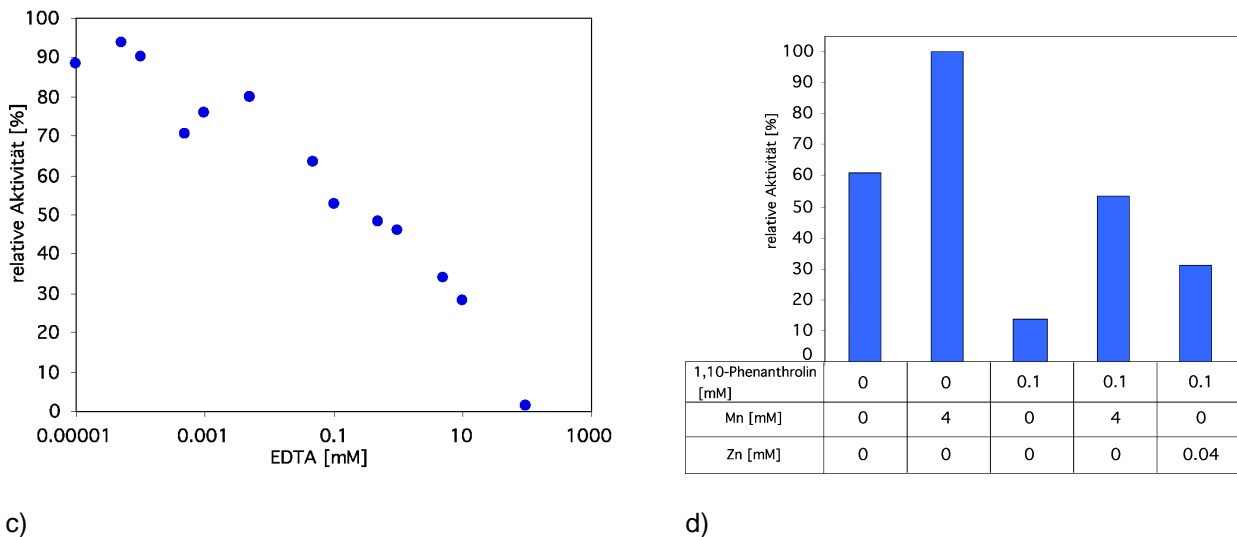


a)



b)





c)

d)

**Fig. 27:** Unspezifische Inhibitoren der GST-LeAPP2. Das Fusionsprotein wurde vor der Zugabe des fluorogenen Substrates 30 min (a, b, d) bzw. 60 min (c) bei Raumtemperatur mit den unspezifischen Inhibitoren inkubiert. In der Grafik d ist der Einfluss von anschließender Zugabe von Salzen dargestellt. 100 % relative Aktivität entsprechen: 1,10-Phenanthrolin:  $0.3 \text{ nmol s}^{-1} \text{ ml}^{-1}$  (relativer Fehler: 0.5 %); 2-Mercaptoethanol:  $0.01 \text{ nmol s}^{-1} \text{ ml}^{-1}$  (relativer Fehler: 0.2 %); Diethylpyrocarbonat:  $0.01 \text{ nmol s}^{-1} \text{ ml}^{-1}$  (relativer Fehler: 0.2 %); Phenylmethylsulfonylfluorid:  $0.02 \text{ nmol s}^{-1} \text{ ml}^{-1}$  (relativer Fehler: 0.01 %); N-Ethylmaleimid:  $0.01 \text{ nmol s}^{-1} \text{ ml}^{-1}$  (relativer Fehler: 2 %); EDTA:  $0.03 \text{ nmol s}^{-1} \text{ ml}^{-1}$  (relativer Fehler: 0.3 %); Reaktivierung:  $0.01 \text{ nmol s}^{-1} \text{ ml}^{-1}$  (relativer Fehler: 0.1 %). Der relative Fehler der einzelnen Datenpunkte (eine Messung) liegt zwischen 0.2 % und 3 %.

getesteten Bedingungen (100 mM EDTA) war die Reaktivierung auch nach der Entfernung des Chelators kaum messbar (Daten nicht gezeigt). Der beste getestete unspezifische Inhibitor ist Diethylpyrocarbonat, welches Histidine alkyliert. Eine halbmaximale Hemmung wurde hier schon bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  erreicht (Tab. 3).

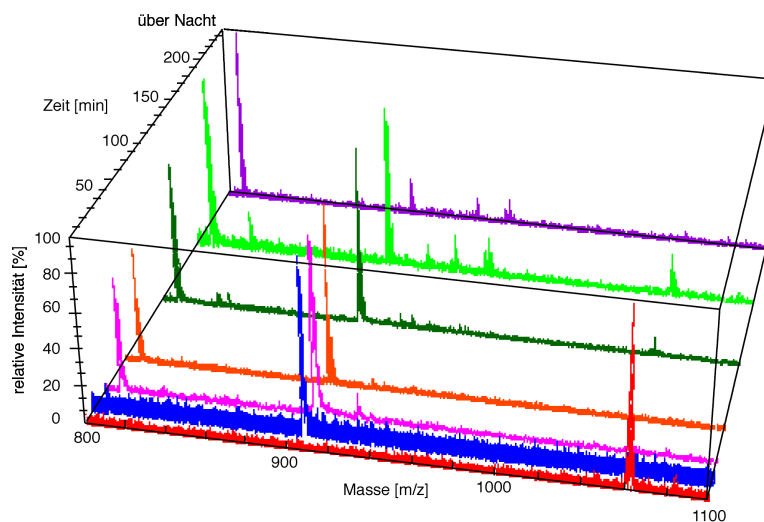
Inhibitor	$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	Wirkungsweise des Inhibitors
Diethylpyrocarbonat	11 (0.3 %)	Alkylierung von Histidinen
1,10-Phenanthrolin	36 (0.5 %)	Metallchelator
2-Mercaptoethanol	43 (0.5 %)	Alkylierung von Sulfhydrylgruppen
N-Ethylmaleimid	79 (3 %)	Alkylierung von Sulfhydrylgruppen
EDTA	344 (3 %)	Metallchelator
Phenylmethylsulfonylfluorid	>> 2000	Alkylierung von Hydroxylgruppen

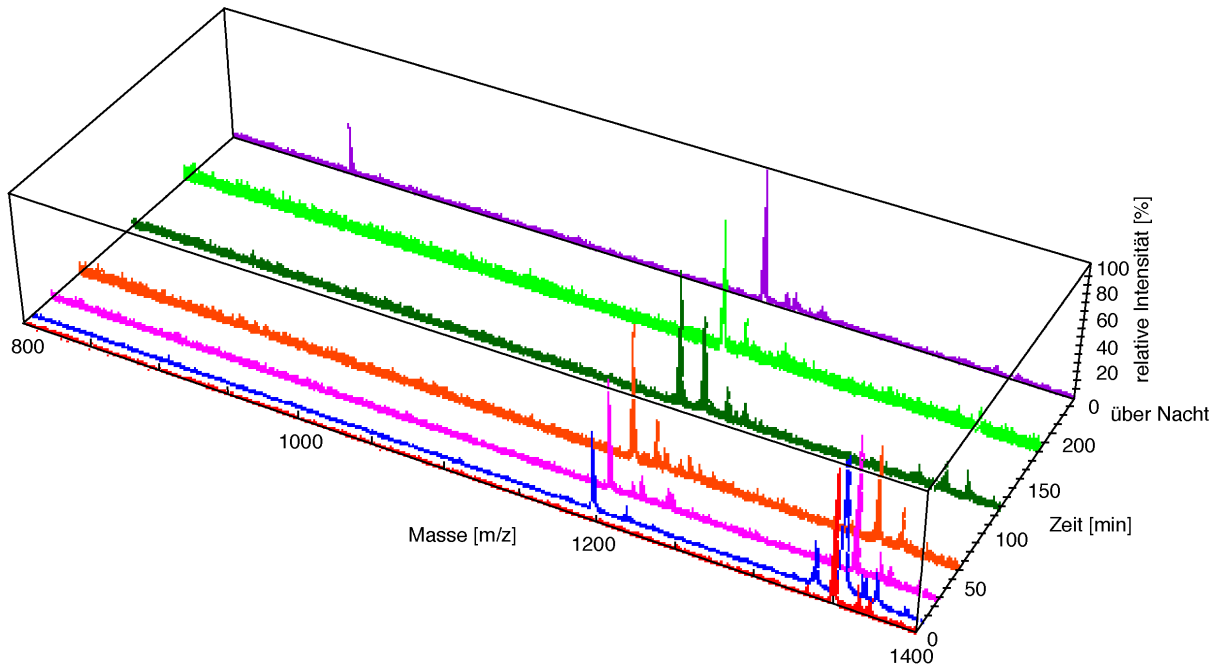
**Tab. 3:** Einfluss von unspezifischen Inhibitoren auf die Aktivität der GST-LeAPP2. Für jeden Inhibitor ist die Konzentration angegeben, bei der eine Hemmung der Hydrolyse des fluorogenen Substrats um 50 % erreicht wurde. In Klammern sind die aus einer Messung stammenden relativen Fehler der  $\text{IC}_{50}$ -Werte angegeben.

Reagenzien, die Sulfhydrylgruppen modifizieren (2-Mercaptoethanol, N-Ethylmaleimid) waren erheblich wirksamer als diejenigen, welche Hydroxylgruppen modifizieren (PMSF). Wichtig ist auch, dass unter den getesteten Bedingungen nur N-Ethylmaleimid die Aktivität vollständig zu hemmen vermochte. Bei allen anderen Inhibitoren blieb eine geringe Aktivität erhalten. Dies ist besonders gut für Diethylpyrocarbonat zu sehen, bei dem auch bei höheren Konzentrationen eine Restaktivität von ca. 0.05 % erhalten blieb.

### 3.8 Substratspezifität der GST-LeAPP2

Für die genauere Untersuchung der Substratspezifität wurden zwei aus Tieren bekannte Substrate der Xaa-Pro Aminopeptidase, Bradykinin und Substanz P, eingesetzt. Die durch Proteolyse entstandenen Fragmente wurden massenspektrometrisch mittels MALDI-TOF MS untersucht (Fig. 28).

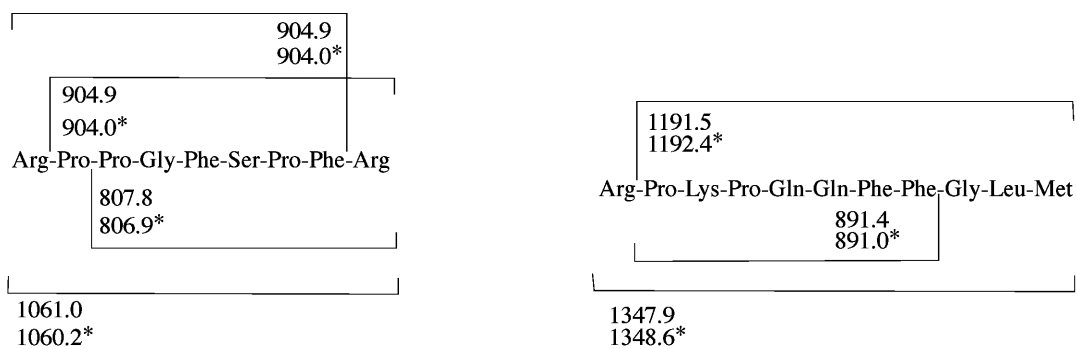




b)

**Fig. 28:** MALDI-TOF MS-Spektren der Abbauprodukte von Bradykinin (a) und Substanz P (b). Bradykinin und Substanz P wurden unter optimalen Reaktionsbedingungen mit der GST-LeAPP2 bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots des Reaktionsansatzes entnommen und auf der MALDI-TOF MS-Probenplatte kristallisiert. Von den Proben wurden anschließend Massenspektren aufgenommen.

Anhand der Masse der aus Bradykinin und Substanz P entstandenen Abbauprodukte konnte der Ort der proteolytischen Spaltung innerhalb der Oligopeptidketten eindeutig identifiziert werden (Fig. 29).



a)

b)

**Fig. 29:** Fragmente der Proteolyse von Bradykinin (a) und Substanz P (b). Die massenspektrometrisch bestimmten Massen der Peptide sind angegeben. Die mit einem Stern gekennzeichneten Werte entsprechen den mit dem Programm Paws (ProteoMetrics) berechneten Massen.

Das erste für Bradykinin beobachtete Spaltprodukt wies eine Masse von 905.0 auf, die auf die Abtrennung eines Argininrestes hindeutet. Dabei könnte es sich um das N-terminale oder aber das C-terminale Arginin des Bradykinin handeln. Die Masse eines zweiten Abbauproduktes (807.8) deutet auf die Abspaltung eines Prolinrestes hin. Die Tatsache, dass ein dritter Peak, der um die Massen zweier Arginine und eines Prolins vermindert ist, nicht beobachtet wurde, weist darauf hin, dass ausschliesslich die N-terminale, nicht aber die C-terminale Bindung zu Arginin hydrolysiert wurde. Die für Bradykinin beobachtete Substratspezifität stimmt demnach mit der anderer zytosolischer Xaa-Pro Aminopeptidasen überein, die die Bindung zwischen einer beliebigen N-terminalen Aminosäure (einschliesslich Prolin) und Prolin hydrolysieren. Substanz P wurde zudem endoproteolytisch zwischen Phe<sub>8</sub> und Gly<sub>9</sub> gespalten, was für die Xaa-Pro Aminopetidase eine untypische Spaltstelle darstellt (Fig. 29b). Diese Bindung wurde aber erst nach sehr langen Inkubationszeiten geschnitten (Fig. 28b). Die Spaltung von Systemin durch die GST-*LeAPP2* konnte nicht beobachtet werden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Analyse der Primärstruktur

Die Sichtung einer cDNA  $\lambda$  Phagenbibliothek (Schmid et al., 1992) und anschließende RACE-PCR lieferte sowohl Teilkclone einer bereits bekannten Xaa-Pro Aminopeptidase (*LeAPP1*; J. Strassner unveröffentlicht), als auch einen Vollängklon einer bislang unbekanntes Xaa-Pro Aminopeptidase (*LeAPP2*). Die beiden Xaa-Pro Aminopeptidasen aus *L. esculentum* sind auf Aminosäureebene zu 81 % identisch (siehe Anhang). Im Vergleich zu der Xaa-Pro Aminopeptidase aus *A. thaliana* (gi|7270625|) ist die *LeAPP2* auf Aminosäureebene zu 70 % identisch. Wie bei den anderen eukaryotischen und nahe verwandten Sequenzen ist das Erkennungsmotiv der Xaa-Pro Aminopeptidase (PROSITE; vgl. 3.1) um zwei Aminosäuren (bei *LeAPP2* um SY; vgl. Fig. 30) erweitert. Beiden Xaa-Pro Aminopeptidasen aus *L. esculentum* fehlen bekannte Signalsequenzen für den Transport in andere subzelluläre Kompartimente (<http://www.expasy.ch> →SignalP) sowie Erkennungssequenzen für einen GPI-Anker (<http://www.expasy.ch> →DGPI). Es wird daher angenommen, dass beide Xaa-Pro Aminopeptidasen, wie diejenigen aus Bakterien, im Zytosol lokalisiert sind. Daraus folgt auch zugleich, dass, wegen der fehlenden Translokation in das endoplasmatische Reticulum, weder *LeAPP1* noch *LeAPP2* glykosyliert sind. Im Gegensatz zu den membrangebundenen Xaa-Pro Aminopeptidasen aus *S. scrofa* (Mann et al., 1996) haben *LeAPP1* und *LeAPP2* aus diesen Gründen vermutlich auch keine Disulfidbrücken.

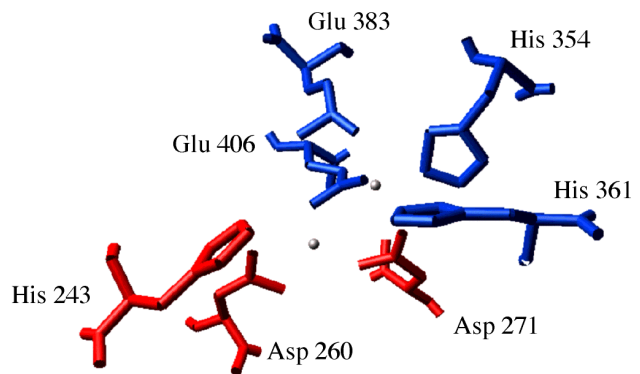
Wie in den bekannten Xaa-Pro Aminopeptidasen, Methionin Aminopeptidasen, Creatinasen und Prolidasen, ist auch in der *LeAPP2* auf Aminosäureebene das "pita-bread" Faltungsmotiv konserviert (Fig. 30; Bazan et al., 1994). Das lässt vermuten, dass das katalytische Zentrum grundsätzlich gleich aufgebaut ist. In diesem Fall würden die Aspartate (D 451, D 462 in *LeAPP2*) und Glutamate (E 383, E 574 in *LeAPP2*) zusammen mit dem Histidin (H 525) wie in der Xaa-Pro Aminopeptidase von *E. coli* die

<i>E. coli</i> APP	237	ENGCILHYT <sup>245</sup>	252	RDGDLVLI <sup>245</sup> DAGCEYK-GYAGDITRTFPVN <sup>279</sup>
<i>L. esculentum</i> APP2	425	SNGAIHYS <sup>433</sup>	443	DPDQMYLCDSGAQYL-DGTTDITRTVHFG <sup>470</sup>
<i>L. esculentum</i> APP1	426	SNAAIHYK <sup>434</sup>	444	DPDCIYLFDSGAQYL-DGTTDITRTIHFG <sup>471</sup>
<i>A. thaliana</i> 1	403	SNAAVIHY <sup>411</sup>	421	DPDKIYLCDSGAQYL-DGTTDITRTVHFG <sup>448</sup>
<i>A. thaliana</i> 2	339	ANGAIHYK <sup>347</sup>	357	DPQKLFLLD <sup>347</sup> SGAQYV-DGTTDITRTVHFS <sup>384</sup>
<i>A. thaliana</i> 3	231	SNASVIHY <sup>239</sup>	246	KDGDVLMDMGCELH-GYVSDL <sup>246</sup> TRTWPPC <sup>273</sup>
<i>E. coli</i> Prolidase	222	EHAAVLHYT <sup>230</sup>	238	EEMRSFLLDAGAEYN-GYAADL <sup>238</sup> TRTWSAK <sup>265</sup>
<i>E. coli</i> APM	73	INEVVC <sup>73</sup> HGI <sup>81</sup>	89	KDGDIVNIDVTVIKD-GFHGDT <sup>89</sup> SKMFIVG <sup>116</sup>
<i>P. putida</i> Creatinase	225	INTDGAHNP <sup>233</sup>	240	NKGDILSLNCFPMIA-GYYTALERTLFLD <sup>267</sup>
<i>E. coli</i> APP	350	HGLSHWL <sup>350</sup> G--LDVHDVGVYQDR <sup>370</sup>	374	LEPGMVLTV <sup>374</sup> EPGLYIAP <sup>390</sup>
<i>L. esculentum</i> APP2	521	HGTGHGIGSYLNVHEGPHQISFR <sup>543</sup>	551	LQVSMVTVD <sup>551</sup> EPGYEDG <sup>567</sup>
<i>L. esculentum</i> APP1	522	HGTGHGIGSYLNVHEGPHNISFR <sup>544</sup>	552	LQVSMVAVTD <sup>552</sup> EPGYEDG <sup>568</sup>
<i>A. thaliana</i> 1	499	HGTGHGVGSYLCVHEGPHQVSFR <sup>521</sup>	529	LQATMTVTD <sup>529</sup> EPGYEDG <sup>545</sup>
<i>A. thaliana</i> 2	435	HGTGHGVGAALNVHEGPQSISFR <sup>457</sup>	464	LQNGMIVSNE <sup>464</sup> PGYEDH <sup>480</sup>
<i>A. thaliana</i> 3	337	TSIGHYL <sup>337</sup> G--MDVHDSSAVGYDR <sup>357</sup>	359	LQPGFVITIE <sup>359</sup> PGYIPS <sup>375</sup>
<i>E. coli</i> Prolidase	335	HGIGHPL <sup>335</sup> G--LQVHDVAGFMQDD <sup>355</sup>	375	LQPGMVLTI <sup>375</sup> EPGIYFIE <sup>391</sup>
APM [ <i>E. coli</i> ]	167	EYCGHGIG <sup>167</sup> --RGFHEEPQVLHYD <sup>187</sup>	195	LKPGMTFTIE <sup>195</sup> PMVNAGK <sup>211</sup>
<i>P. putida</i> Creatinase	319	FGYGH <sup>319</sup> SFGTLSHYYGREAGLELR <sup>341</sup>	348	LEPGMVVSM <sup>348</sup> EPMIMLPE <sup>364</sup>
<i>E. coli</i> APP	401	IG--IRIEDDIVITETG <sup>415</sup>		
<i>L. esculentum</i> APP2	569	FG--IRLENVLIVKEGN <sup>583</sup>		
<i>L. esculentum</i> APP1	570	FG--IRLENVLIVKEGH <sup>584</sup>		
<i>A. thaliana</i> 1	547	FG--IRLENVLVVND <sup>561</sup> AE <sup>561</sup>		
<i>A. thaliana</i> 2	482	FG--IRIENLLHVRDAE <sup>496</sup>		
<i>A. thaliana</i> 3	386	IG--IRIEDDVLITETG <sup>400</sup>		
<i>E. coli</i> Prolidase	402	FSKHFNWQKIEALKPFG <sup>418</sup>		
APM [ <i>E. coli</i> ]	219	DGWTVKTKDRSLSAQYE <sup>235</sup>		
<i>P. putida</i> Creatinase	369	AGG-YREHDILIVNENG <sup>384</sup>		

**Fig. 30:** Sequenzmotiv der "pita-bread" Faltung. Die rot gekennzeichneten Aminosäuren sind charakteristisch für dieses Faltungsmotiv. Das grün markierte Histidin stabilisiert das tetrahedrale Intermediat (siehe Einleitung). Die magenta markierten Aminosäuren sind in allen berücksichtigten Xaa-Pro Amino-peptidasen konserviert, während die hellblau gefärbten Aminosäuren zusätzlich in der Prolidase konserviert sind. Von den dunkelblau markierten Aminosäuren nimmt man an, dass sie in der Xaa-Pro Amino-peptidase von *E. coli* eine Rolle in der Prolinspezifität spielen (Wilce et al., 1998). Alignment mit dem Programm Clustal X (Thompson et al., 1997, 1998) erzeugt. APP: Xaa-Pro Aminopeptidase, APM: Methionin Aminopeptidase (Datenbankeintrag der Sequenzen siehe Anhang). Das zweite Glutamat (E 574 in *LeAPP2*) ist in diesem Alignment nicht stark konserviert. Andere Daten (Bazan et al., 1994) zeigen jedoch, dass das Glutamat auch in Prolidase und Methionin Aminopeptidase konserviert ist.

beiden Metalle des aktiven Zentrums koordinieren. Das Histidin 534 (*LeAPP2*) stabilisiert den nicht kovalenten tetrahedralen Übergangszustand (Fig. 30; siehe auch Einleitung, Fig. 8), während das Histidin 431 (*LeAPP2*) die Bindung des Substrates durch Wechselwirkung mit einer Carbonylfunktion des Peptidrückgrates stabilisiert. Daneben wird vermutet (Wilce et al., 1998), dass das Histidin 431 und das nur in den Xaa-Pro Aminopeptidasen konservierte Histidin 521 auch eine Rolle als "Protonenshuttle" spielen können (Wilce et al., 1998). Von einigen Aminosäuren nimmt

man an (L 258, H 350, G 385, Y 387, I 405, G 262, A 269, V 360 in der *E. coli* Xaa-Pro Aminopeptidase), dass sie zur Spezifität für Prolin beitragen (Wilce et al., 1998). Ein Teil dieser Reste sind zwischen der *LeAPP2* (G 453, G 562, Y 564 in der *LeAPP2*), den anderen Xaa-Pro Aminopeptidasen und Prolidase konserviert (Fig. 30). Vergleicht man das katalytische Zentrum von *LeAPP2* mit demjenigen der Xaa-Pro Aminopeptidase aus *E. coli* durch "molecular modelling", so zeigt sich, dass drei der insgesamt sieben für die Katalyse wichtigen Aminosäuren deckungsgleich



**Fig. 31:** Aktives Zentrum der Xaa-Pro Aminopeptidase aus *E. coli*. Rot gefärbt sind die Aminosäuren die im "molekular modelling" mit der *LeAPP2* Teilsequenz deckungsgleich waren. Grau dargestellt sind die Mangationen des aktiven Zentrums. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die Xaa-Pro Aminopeptidase aus *E. coli* (PDB: 1A16) ("molecular modelling" wurde mit <http://www.expasy.ch> → SWISS-MODEL durchgeführt).

sind (Fig. 31). Die verbleibenden katalytisch wichtigen Aminosäuren sind ebenfalls in der *LeAPP2* erhalten (vgl. Fig. 30), können aber durch "molecular modelling" nicht eindeutig einer Position zugeordnet werden. Das ist möglicherweise auf die unterschiedliche Abstände der katalytisch wichtigen Reste in den Sequenzen der Xaa-Pro Aminopeptidase von *E. coli* und der *LeAPP2* zurückzuführen (vgl. SY zwischen H 354 und H 361 in der *LeAPP2*; Fig. 30).

Alle vorhandenen Daten unterstützen eine strukturelle und mechanistische Verwandtschaft von *LeAPP2* mit den anderen Xaa-Pro Aminopeptidasen. Obwohl sich diese Verwandtschaft letztlich nur durch Strukturermittlung und "site-directed mutagenesis" beweisen lassen wird, sind die hier erhaltenen und im Folgenden diskutierten Enzymcharakteristika mit den oben dargestellten Funktionen der Aminosäuren vereinbar: Die Hemmung durch Metallionen und Metallchelatoren belegt, dass die GST-*LeAPP2* eine Metalloprotease sein muss. Diethylpyrocarbonat modifiziert die Histidine des aktiven Zentrums und inhibiert damit die katalytische Aktivität. N-Ethylmaleimid, ein sulfhydrylalkylierendes Agens hemmt die GST-*LeAPP2*, nicht aber die aus Schweineniere isolierte Xaa-Pro Aminopeptidase (Hooper et al., 1990).

Vergleiche der Sequenzen zeigen, dass bei der *LeAPP2* ein Cystein benachbart zum Aspartat 451 ist, nicht aber bei der Xaa-Pro Aminopeptidase aus Schweineniere.

## 4.2 Enzymatische Eigenschaften der GST-*LeAPP2*

Die als Fusionsprotein in *E. coli* überexprimierte GST-*LeAPP2* wurde affinitätschromatographisch gereinigt und biochemisch charakterisiert. Die gemessenen Daten ermöglichen einen Vergleich der Eigenschaften mit anderen eukaryotischen und prokaryotischen Xaa-Pro Aminopeptidasen.

Die molekulare Masse des Monomers (SDS-PAGE : 79 kDa, berechnet 73 kDa) ist denen aus *H. sapiens* (Rusu et al., 1992) und *R. norvegicus* (Harbeck et al., 1991) isolierten zytosolischen Xaa-Pro Aminopeptidasen sehr ähnlich. Ebenso verhält es sich mit der beobachteten Quartärstruktur der GST-*LeAPP2* (Homodimer und Homotrimer). Im Gegensatz zu den membrangebundenen Xaa-Pro Aminopeptidasen, die meist ein Tetramer bilden, liegen zytosolische Formen, deren Monomer eine vergleichbar Masse aufweist (*H. sapiens*: 71 kDa (Rusu et al., 1992); *R. norvegicus* 71 kDa (Harbeck et al., 1991); *C. porcellus* 89 kDa (Ryan, J. W. et al., 1992)), je nach Ionenstärke als Dimere oder Trimere vor.

Das pH-Optimum von Xaa-Pro Aminopeptidasen liegt, je nach Substrat, bei pH 7.0 – 8.5 (zytosolische Formen; Harbeck et al., 1991; Rusu et al., 1992; Yaron et al., 1993; Yoshimoto et al., 1988 ) bzw. pH 6.5 – 7.5 (membrangebundene Formen; Orawski et al., 1995; Simmons et al., 1992; Yaron et al., 1993). Die GST-*LeAPP2* verhält sich sehr ähnlich, d.h. sie hat, vergleichbar mit den zytosolischen Xaa-Pro Aminopeptidasen, ein pH-Optimum von pH 7.5 in Tris/HCl gepufferten Lösungen. In Kaliumphosphatpuffer war ebenfalls ein pH-Optimum von 7.5 zu beobachten, allerdings war hier die Aktivität der GST-*LeAPP2* um einen Faktor 2 erniedrigt. Diese Beobachtung kann durch die schlechte Löslichkeit von Metallphosphaten erklärt werden. Der gleiche inhibierende

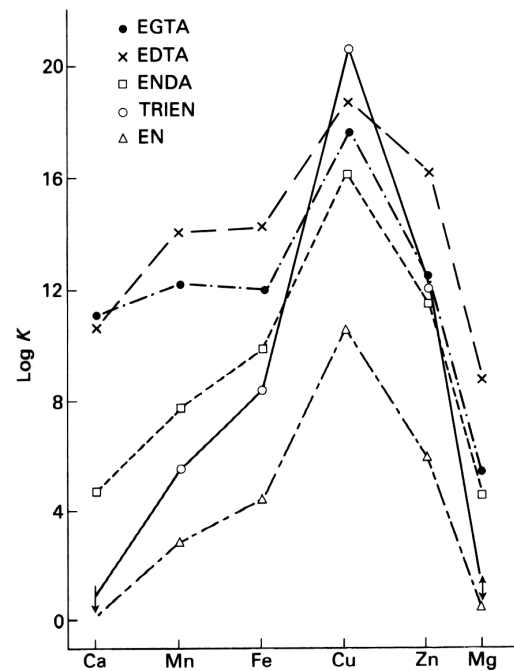


Effekt von Phosphatpuffern wurde auch bei der zytosolischen Xaa-Pro Aminopeptidase von *R. norvegicus* (Faktor 1.25; Orawski et al., 1995) beobachtet.

Vergleicht man den Einfluss der Metallionen auf die Aktivität der GST-LeAPP2 mit den Eigenschaften der Metalle selbst (siehe Anhang) zeigt sich, dass grössere Ionen in Abhängigkeit der Konzentration und des Substrates aktivierend wirken. So wirken etwa Manganionen in Konzentrationen von 4 – 10 mM stimulierend auf die Aktivität von Xaa-Pro Aminopeptidasen (Faktor von 1.6 bis 4 (Lloyd et al., 1996, 1995; Rusu et al., 1992) vgl. GST-LeAPP2 um Faktor 3 bei 4 mM  $MnCl_2$ ). Die Degradation von Bradykinin durch die membrangebundene Xaa-Pro Aminopeptidase in *S. scrofa* wird aber durch 10 mM Mangan gehemmt (Lloyd et al., 1996). Andere zweiwertige Metallionen wie Calcium, Magnesium, Zink und Kupfer wirken in vergleichbarer Weise aktivierend bzw. inhibierend auf die GST-LeAPP2 und auf andere Xaa-Pro Aminopeptidasen. Der Einfluss von Kobalt auf die Aktivität der GST-LeAPP2 ist dagegen nur mit den zytosolischen Xaa-Pro Aminopeptidasen vergleichbar, d.h. die inhibierende Wirkung von Kobalt überwiegt bei Konzentrationen grösser oder gleich 1 mM (Hooper et al., 1990; Rusu et al., 1992; Ryan, J. W. et al., 1992). Die Degradation von Gly-Pro-Hyp durch die membrangebundene Xaa-Pro Aminopeptidase aus *S. scrofa* wird bis zu einer Konzentration von 4 mM Kobalt stimuliert, während die Degradation von Bradykinin gehemmt wird (Lloyd et al., 1996).

Welches und wieviele Metallionen im aktiven Zentrum der in *E. coli* exprimierten GST-LeAPP2 vorhanden sind, konnte nicht geklärt werden, doch geben Vergleiche mit anderen Xaa-Pro Aminopeptidasen bestimmte Hinweise. Proteasen mit "pita-bread" Struktur haben im aktiven Zentrum im allgemeinen zwei Metallionen gebunden. Eine Ausnahme bildet möglicherweise die membrangebundene Xaa-Pro Aminopeptidase aus Schweineniere für die widersprüchliche experimentelle Daten (Hooper et al., 1992) auf ein bzw. zwei (Lloyd et al., 1996) im aktiven Zentrum gebundene Metallionen hindeuten. Unklar bleibt auch, um welches Metallion es sich dabei handelt. Betrachtet man den Einfluss der Metallionen auf die Aktivität so erlaubt das nicht unbedingt einen Rückschluss auf das *in vivo* gebundene Metall, da die in den Experimenten verwendeten Metallionenkonzentrationen sich um ein Vielfaches von den physiologischen Konzentrationen unterscheiden. Im aktiven Zentrum der Xaa-Pro

Amino-peptidase von Schweineleiere wurde  $Zn^{2+}$  nachgewiesen (Hooper et al., 1992). Im Gegensatz dazu finden sich im aktiven Zentrum der kristallisierten *E. coli* Xaa-Pro Amino-peptidase zwei Manganionen (Wilce et al., 1998). Für die Methionin Amino-peptidase, ein anderes "pita-bread" Protein, werden Kobalt und Eisen ( $Fe^{2+}$ ) als Metalle im aktiven Zentrum diskutiert (Lowther et al., 2000). Demnach sind lediglich Magnesium und Calcium nicht im aktiven Zentrum bekannter "pita-bread" Proteine zu finden. Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass Komplexe von Kobalt, Mangan, Zink und Kupfer mit N- bzw. O-Donor Liganden (vgl. Aspartate, Glutamate und Histidin im katalytisch aktiven Zentrum) erheblich stabiler sind als diejenigen Komplexe mit Calcium oder Magnesium (Fig. 32; Fraústo da Silva et al., 1991). Die hohe Stabilität der  $Cu^{2+}$ - und  $Zn^{2+}$ -Komplexe erklärt auch die hohe Wirksamkeit von Kupfer in niedrigen Konzentrationen (vgl. Fig. 23) und die inhibierende Wirkung von Zink in Gegenwart des aktivierenden Mangans (vgl. Fig. 24). Die Art des Metalles im aktiven Zentrum hat entscheidenden Einfluss auf die zu katalysierende Reaktion. Bei den Amino-peptidasen ist wichtig, dass das Substrat schnell gebunden und die Fragmente schnell entlassen werden können. Hinzu kommt, dass das Hydroxylion, welches als Nucleophil agiert, einerseits nicht zu stark an das Metall gebunden und andererseits nach der Reaktion auch schnell wieder gebildet werden sollte. In solchen Überlegungen zeigt sich, dass Mangan die Liganden (Wasser oder Substrat) am schnellsten austauschen kann (Fraústo da Silva et al., 1991). Im Gegensatz dazu



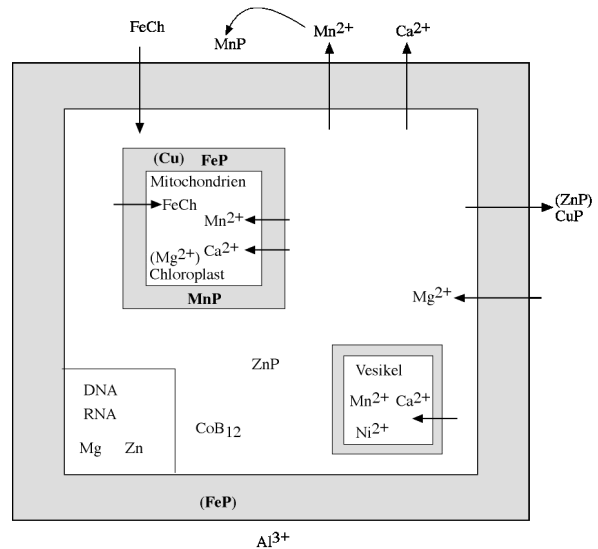
**Fig. 32:** Stabilität von verschiedenen Komplexen mit divalenten Metallionen (aus Fraústo da Silva et al., 1991). EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure; EGTA: Ethylenbis (oxyethylenitrilo) tetraessigsäure; EN: Ethylendiamin; TRIEN: Triethylendiamin; ENDA: Ethylendiamindiacetat.

binden Zink und Kobalt die Liganden zwar viel stärker, stabilisieren aber aufgrund der erhöhten Elektronegativität das Hydroxylion besser und binden es fest an das Protein.

Die Art des gebundenen Metallionens hängt *in vivo* wesentlich von der Verfügbarkeit der Metalle unter physiologischen Bedingungen ab (Lowther et al., 2000; Wilce et al., 1998; Wilcox et al., 1996). Bei Betrachtung der Verteilung und Konzentration der einzelnen Metallionen in den verschiedenen

Kompartimenten der Zelle (Fig. 33) wird deutlich, dass von den in Frage kommenden Metallionen Mangan ( $\leq 10^{-8}$  M) und Zink ( $10^{-9}$  M) in erheblich höheren Konzentrationen im Zytoplasma vorliegen als Kobalt und Kupfer (Fraústo da Silva et al., 1991). Ein weiterer Faktor, der die Wahl des Metalles beeinflusst, so vermutet man (Wilce et al., 1998), ist der pH der Umgebung. Zink ist, im Gegensatz zu Mangan, aufgrund seiner Eigenschaften auch unter sauren Bedingungen in der Lage, das Hydroxylion des aktiven Zentrums zu bilden. Übereinstimmend damit trägt die *E. coli* Xaa-Pro Aminopeptidase mit einem pH-Optimum von 8.5  $Mn^{2+}$  im aktiven Zentrum, während einerseits die membrangebundenen Enzyme von *R. norvegicus* und *B. taurus* ein vergleichsweise saures pH-Optimum (6.8 – 7.5) haben und andererseits in der membrangebundenen Xaa-Pro Aminopeptidase von *S. scrofa* Zink nachgewiesen wurde. Die für die GST-LeAPP2 beobachtete Aktivitätsstimulierung durch  $MnCl_2$ , die Verfügbarkeit von  $Mn^{2+}$  *in vivo* sowie ein leicht basisches pH-Optimum von 7.5 lassen vermuten, dass die LeAPP2 unter physiologischen Bedingungen  $Mn^{2+}$  im aktiven Zentrum bindet.

Die für das fluorogene Substrat gemessenen apparenten katalytischen Konstanten sind mit den von anderen Xaa-Pro Aminopeptidasen bekannten Daten vergleichbar (Tab. 4). Die Abspaltung des N-terminalen Lysins im fluorogenen Substrat erfolgt bei der GST-LeAPP2 effizienter als bei der Xaa-Pro Aminopeptidase aus *E. coli*. Gegenüber der Xaa-



**Fig. 33:** Verteilung einiger Metallionen in eukaryotischen Zellen. (nach Fraústo da Silva et al., 1991). P : Protein, Ch: Chelator.

Pro Aminopeptidase aus *R. norvegicus* ist die katalytische Effizienz ( $K_m/k_{cat}$ ) um einen Faktor 2 erniedrigt.

Organismus	Substrat	$K_m$ [M]x $10^{-4}$	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$K_m/k_{cat}$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ] x $10^6$
<i>B. taurus</i> (Lunge, membrangebunden)	Bradykinin (1)	0.76	26	0.34
<i>C. porcellus</i> (Serum, zytosolisch)	Arg-Pro-benzylamide (2)	0.007	2.07	2.97
<i>E. coli</i>	Bradykinin (3)	3.6	69	0.193
	Pro-pro-pro-pro-pro (4)	0.9	105	12
	Pro-Pro-Ala (4)	11	1210	10
	Phe(pNO <sub>2</sub> )-Pro-Eda Abz (4)	30	135	0.45
	H-Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA (5)			0.029
<i>H. sapiens</i> (Leukozyten)	Peptid A (6)	0.145	12.8	
<i>L. esculentum</i> (GST-LeAPP2)	H-Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA (7)	0.152	17.3	0.697
<i>L. lactis</i>	Arg-Pro-Pro (8)	1.4		
<i>R. norvegicus</i> (Hirn, zytosolisch)	Bradykinin (9)	2.8	38	0.136
	Substanz P (9)	5.8	5	0.008
	H-Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA (5)			1.142
<i>R. norvegicus</i> (Lunge, membrangebunden)	Bradykinin (10)	0.21	12	0.57
<i>S. scrofa</i> (Niere, membrangebunden)	Gly-Pro-Hyp (11)	27		
	Bradykinin (12)	30.6		
	H-Lys-(εDNP)-Pro-Pro-(R,S)-Amp-NH <sub>2</sub> (13)	0.048		

**Tab. 4:** Vergleich der katalytischen Daten von Xaa-Pro Aminopeptidasen aus verschiedenen Organismen und für verschiedene Substrate. Abz: 2-Aminobenzoyl, Dnp: 2,4-Dinitrophenyl, Eda: Ethylendiamin, pNA: *para* Nitroanilin, pNO<sub>2</sub>: *para* Nitrophenylalanin; **1:** Simmons et al., 1992; **2:** Ryan, J. W. et al., 1992; **3:** Yoshimoto et al., 1994; **4:** Yaron et al., 1993; **5:** Stiebitz et al., 1997; **6:** Rusu et al., 1992; **7:** vorliegende Arbeit; **8:** Mc Donnell et al., 1997; **9:** Harbeck et al., 1991; **10:** Orawski et al., 1995; **11:** Lloyd et al., 1996; **12:** Lloyd et al., 1995; **13:** Hawthorne et al., 1997.

Auch in der Substratspezifität ähnelt die GST-LeAPP2 anderen bekannten Xaa-Pro Aminopeptidasen. Die GST-LeAPP2 spaltet wie alle anderen Xaa-Pro Aminopeptidasen

effizient die aminoternale Arg-Pro Bindung in Bradykinin und Substanz P. Im Gegensatz zur membrangebundenen Xaa-Pro Aminopeptidase aus *B. taurus* (Simmons et al., 1992) kann die GST-*LeAPP2*, wie auch die Xaa-Pro Aminopeptidase aus *E. coli* und die zytosolische Form aus *R. norvegicus*, mit verminderter Effizienz auch eine aminoternale Pro-Pro Bindung spalten (vgl. 3.8). Parallelen zu den zytosolischen Xaa-Pro Aminopeptidasen aus *E. coli*, *H. sapiens* und *R. norvegicus* werden auch in der Fähigkeit in der P'<sub>2</sub> Position Lysin zu tolerieren deutlich. Während die membrangebundenen Xaa-Pro Aminopeptidasen aus *B. taurus* und *R. norvegicus* in Peptiden mit Lysin, Tyrosin u.a. (vgl. Yoshimoto et al., 1994) in der P'<sub>2</sub> Position nicht spalten, ist die Geschwindigkeit der Hydrolyse von Substanz P bei der GST-*LeAPP2* und der zytosolischen Xaa-Pro Aminopeptidase von *R. norvegicus* lediglich reduziert (vgl. 3.8; Harbeck et al., 1991). Dieser Einfluss von Aminosäuren in der P'<sub>2</sub> Position auf die Hydrolysegeschwindigkeit unterstützt die aus der Sequenzanalyse gewonnene Annahme, dass die katalytischen Zentren der zytosolischen Xaa-Pro Aminopeptidasen und damit auch der *LeAPP2* ähnlich aufgebaut sind.

Ein unerwarteter Befund war die beobachtete endoproteolytische Aktivität der GST-*LeAPP2* gegenüber der Phe-Gly Bindung in Substanz P. Die beiden hydrophoben Reste in der P<sub>1</sub> (Phe 8) und der P'<sub>2</sub> (Leu 10) Position der Spaltstelle könnten eine mögliche Erklärung sein. So bevorzugen zytosolische Xaa-Pro Aminopeptidasen in *R. norvegicus* und *E. coli* in der P<sub>1</sub> Position hydrophobe Reste (Hawthorne et al., 1991; Yoshimoto et al., 1994). Die Xaa-Pro Aminopeptidase aus *E. coli* kann im Gegensatz zu den membrangebundenen Enzymen in der P'<sub>2</sub> Position hydrophobe Reste binden und wird durch Pro-Leu Dipeptide kompetitiv gehemmt (Yoshimoto et al., 1994). Daraus folgt, dass diese Spaltung, in Abwesenheit von natürlichen Spaltstellen, durch eine verstärkte Bindung des Substrates begünstigt wird. Interessanterweise spaltet aber das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) in Substanz P an der gleichen Stelle wie die GST-*LeAPP2* (Jaspard et al., 1993). Unter diesem Gesichtspunkt scheint es auch nicht mehr erstaunlich, dass verschiedene ACE Inhibitoren in Anwesenheit von Mangan auf Xaa-Pro Aminopeptidasen inhibierend wirken können (Hooper et al. 1992).

EDTA, 1,10-Phenanthrolin, Diethylpyrocarbonat und 2-Mercaptoethanol wirken, wie auch bei den anderen Xaa-Pro Aminopeptidasen, inhibierend auf die GST-*LeAPP2*.

Unterschiede zeigen sich lediglich in der Stärke der Inhibition. Für PMSF und N-Ethylmaleimid sind dagegen erhebliche Unterschiede fest zu stellen. Wie die zytosolische Xaa-Pro Aminopeptidase aus *R. norvegicus* wird die GST-*LeAPP2* durch N-Ethylmaleimid gehemmt, nicht aber durch PMSF. Es scheint als wäre die GST-*LeAPP2* besonders empfindlich gegenüber N-Ethylmaleimid. Dieses Verhalten steht im Gegensatz zur Xaa-Pro Aminopeptidase aus *C. porcellus*, die durch PMSF (1.5 mM 0% Aktivität) nicht aber durch N-Ethylmaleimid (1 mM 101% Aktivität) vollständig gehemmt werden kann (Harbeck et al., 1991; Hooper et al., 1990; Lim et al., 1996; Mc Donnell et al., 1997; Orawski et al., 1995; Rusu et al., 1992; Ryan, J. W. et al., 1992; Simmons et al., 1992; Yoshimoto et al., 1988). Die Ähnlichkeit vieler Eigenschaften der GST-*LeAPP2* zu den zytosolischen Xaa-Pro Aminopeptidasen unterstützt zusätzlich die aus der Sequenzanalyse gewonnene Annahme, dass die *LeAPP2* auch im Zytosol lokalisiert ist.

### 4.3 Mögliche Funktionen der *LeAPP2* in *L. esculentum*

Xaa-Pro Aminopeptidase, Prolidase, Prolinase und Peptidyl *cis/trans* Isomerase sind die bislang einzigen bekannten Enzyme, die spezifisch das Xaa-Pro Motiv spalten bzw. erkennen können. Aufgrund dieser Eigenschaft sind für die Xaa-Pro Aminopeptidase zwei Funktionen denkbar, die in Bakterien und Tieren nachgewiesen werden konnten. Einerseits sind Xaa-Pro Aminopeptidasen am Proteinmetabolismus, d.h. Degradation bzw. Prozessierung von Proteinen, beteiligt (Pro- und Eukaryoten) und andererseits tragen membrangebundene Formen an der Inaktivierung von Peptidhormonen bei. Dass diese Funktion nicht durch andere Proteasen wahrgenommen werden kann, belegt ein erblicher Stoffwechseldefekt (erhöhte Konzentration von Imino-oligopeptiden im Urin), der auf einem Mangel an Xaa-Pro Aminopeptidase Aktivität beruht (Blau et al., 1988). Eine mehrfach nachgewiesene Funktion von mittels GPI-Anker in der Membran verankerter Xaa-Pro Aminopeptidasen ist die Degradation von Bradykinin (Prechel et al., 1995; Kitamura et al., 1999). In Pflanzen existieren dagegen bislang keine bekannten

membrangebundenen Xaa-Pro Aminopeptidasen, obschon pflanzliche Zellen zu dieser posttranslationalen Modifikation in der Lage wären (Tako et al., 2000). Für die *LeAPP2* scheint eine Modifikation durch einen GPI-Anker unwahrscheinlich. Desweiteren kennt man bislang keine pflanzlichen Peptidhormone mit aminoterminaler Xaa-Pro Bindung, die ein mögliches Substrat darstellen könnten. Die Funktion der zytosolischen Aminopeptidasen und damit aller Voraussicht nach auch die der *LeAPP1* und *LeAPP2* scheint die Regulation von Degradation beziehungsweise Prozessierung von Oligopeptiden und Proteinen zu sein. Im Gegensatz zur Systemin- und Bestatin-induzierbaren Leucin Aminopeptidase (Chao et al., 1999; Schaller et al., 1995) wird die Expression der *LeAPP2* durch diese Elicitoren der Wundantwort nicht verändert. Die fehlende Wirkung von Bestatin ist nicht erstaunlich, da andere bekannte Xaa-Pro Aminopeptidasen durch Bestatin (1 mM) kaum gehemmt werden (Yoshimoto et al., 1988). Bei den Leucin Aminopeptidasen nimmt man an, dass sie an der Degradation von Proteinen, die durch verschiedenste mit der Verwundung verbundene Einflüsse beschädigt wurden, beteiligt sind. Eine vergleichbare Funktion für die *LeAPP2* scheint unwahrscheinlich. Northern-Blot Analyse zeigten, dass die *LeAPP2* vorwiegend in Zellkulturen und Wurzeln von Tomatenpflanzen exprimiert wird. Dort ist also auch die Funktion bzw. das physiologische Substrat dieser Protease zu suchen. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang mit Peptidtransportern, wie sie z.B. in Wurzeln von *A. thaliana* (Steiner et al., 1994) nachgewiesen worden sind. Diese Transporter importieren Di- und Tripeptide, welche möglicherweise auch Substrate für eine Xaa-Pro Aminopeptidase sein könnten. Die freigesetzten Aminosäuren würden so für die Neusynthese von Proteinen zu Verfügung gestellt. Wie bei anderen Pro- und Eukaryoten bleibt auch hier unklar, ob die Spezifität der *LeAPP2* einen regulatorischen Einfluss auf die Proteindegradation hat und welche Proteine durch die *LeAPP2* prozessiert werden.

## 5. Referenzen

- Amrein, K. E., Takacs, B., Stieger, M., Molnos, J., Flint, N. A., Burn, P.** (1995). Purification and characterization of recombinant human p50<sup>CSK</sup> protein-tyrosine kinase from an *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial chaperones GroES and GroEL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1048-1052.
- Baydon, E. A.-H. and Fry, S. C.** (1985). The immobility of pectic substances in injured tomato leaves and its bearing on the identity of the wound hormone. *Planta* **165**, 269-276.
- Bazan, J. F., Weaver, L. H., Roderick, S. L., Huber, R., Matthews, B. W.** (1994). Sequence and structure comparison suggest that methionin aminopeptidase, prolidase, aminopeptidase P, and creatinase share a common fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2473-2477.
- Bergey, D. R., Howe, G. A., Ryan, C. A.** (1996). Polypeptide signalling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signalling in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12053-12058.
- Bergey, D. R., Orozco-Cardenas, M., De Moura, D. S., Ryan, C. A.** (1999a). A wound- and systemin- inducible polygalacturonase in tomato leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1756-1760.
- Bergey, D. R., Ryan, C. A.** (1999b). Wound and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. *Plant Mol. Biol.* **40**, 815-823.
- Birkenmeyer, G. F., Ryan, C. A.** (1998). Wound signaling in tomato plants, evidence that ABA is not a primary signal for defense gene activation. *Plant Physiol.* **117**, 687-693.



- Blau, N., Niederweiser, A., Shmerling, D. H.** (1988). Peptiduria presumably caused by aminopeptidase-P deficiency. A new inborn error of metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* **11**, 240-2.
- Bowles, D.** (1998). Signal transduction in the wound response of tomato plants. *Phil. Trans. R. Soc. London B* **353**, 1495-1510.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Camoni, L., Iori, V., Marra, M., Aducci, P.** (2000). Phosphorylation-dependent interaction between plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and 14-3-3 Proteins. *J. Biol. Chem.* **275**, 9919-9923.
- Chao, W. S., Gu, Y. Q., Pautot, V., Bray, E. A., Walling, L. L.** (1999). Leucine aminopeptidase RNAs, proteins, and activities increase in response to water deficit, salinity, and the wound signals systemin, methyl jasmonate, and abscisic acid. *Plant Physiol.* **120**, 979-992.
- Chen, G., Edwards, T., D'souza, V. M., Holz., R. C.** (1997). Mechanistic studies on the aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica*: a two-metal ion mechanism for peptide hydrolysis. *Biochemistry* **36**, 4278-4286.
- Constabel, C. P., Yip, L., Ryan, C. A.** (1998). Prosystemin from potato, black nightshade, and bell pepper: primary structure and biological activity of predicted systemin polypeptides. *Plant Mol. Biol.* **36**, 55-62.
- Cummins, P. M., Pabon, A., Margulies, E. H., Glucksman, M. J.** (1999). Zinc coordination and substrate catalysis within the neuropeptide processing enzyme endopeptidase EC 3.4.24.15. *J. Biol. Chem.* **274**, 16003-16009.
- Cunningham, D. F., O'Connor, B.** (1997). Proline specific peptidases. *Biochim. Biophys. Acta* **1343**, 160-186.

**Dombrowski, J. E., Pearce, G., Ryan, C. A.** (1999). Proteinase inhibitor-inducing activity of the prohormone prosystemin resides exclusively in the C-terminal systemin domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **26**, 12947-12952.

**Durner, J., Shah, J., Klessing, D. F.** (1997). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* **2**, 266-274.

**Farmer, E.E., Ryan, C. A.** (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* **4**, 129-134.

**Feinberg, A. P., Vogelstein, B.** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.

**Fraústo da Silva, J. J. R., Williams, R. J. P.** (1991). The biological chemistry of the elements; the inorganic chemistry of life. Clarendon Press, Oxford.

**Görlach, J., Schmid, J.** (1996). Introducing *Stu I* sites improves vectors for the expression of fusion proteins with factor Xa cleavage sites. *Gene* **170**, 145-146.

**Gränicher, W. H. H.** (1996). Messung beendet-was nun ? Verlag der Fachvereine, Zürich, und B. G. Teubner, Stuttgart.

**Griffith, C.E., Su, Z., Niwayama, S., Ramsay, C. A., Chang, J. H.** (1998). Molecular recognition of angiogenesis inhibitors fumagilin and ovalicin by methionin aminopeptidase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15183-15188.

**Harbeck, H. T., Mentlein, R.** (1991). Aminopeptidase P from rat brain, purification and action on bioactive peptides. *Eur. J. Biochem.* **198**, 451- 458.

**Hawthorne, S. J., Harriott, P., Lim, J., Turner, A. J., Walker, B., Williams, C. H.** (1997). Evaluation of some fluorogenic substrates for continuous assay of aminopeptidase P. *Anal. Biochem.* **253**, 13-17.

**Hooper, N. M.** (1994). Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* **354**, 1-6.

**Hooper, N. M., Hrysko J., Oppong, S. Y., Turner, A. J.** (1992). Inhibition by converting enzyme inhibitors of pig kidney aminopeptidase P. *Hypertension* **19**, 281-285.

**Hooper, N. M., Hryszko, J., Turner, A. J.** (1990). Purification and characterisation of pig kidney aminopeptidase P, a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored ectoenzyme. *Biochem. J.* **267**, 509-515.

**Jaspard, E., Wie, L., Alhenc-Gelas, F.** (1993). Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II); studies with bradykinin and other natural peptides. *J. Biol. Chem.* **268**, 9496-9503.

**Jeanmougin, F., Gouy, M., Higgins, D. G., Gibson, T. J., Thompson, J. D.** (1998). Multiple sequence alignment with clustal X. *Trends Biochem. Sci.* **23**;403-405.

**Kernan, A., Thornburg, W.** (1989). Auxin levels regulate the expression of a wound-inducible proteinase inhibitor II-chloramphenicol acetyltransferase gene fusion *in vitro* and *in vivo*. *Plant. Physiol.* **91**, 73-78.

**Kitamura, S. Carhini, L. A., Simmons, W. H., Scicli, A. G.** (1999). Effects of aminopeptidase P inhibition on kinin-mediated vasodepressor responses. *Am. J. Physiol.* **276** (Heart Circ. Physiol. **45**), H1664-H1671.

**Kobayashi, M., Shimizu, S.** (1999). Cobalt proteins. *Eur. J. Biochem.* **261**, 1-9.

**Kopp, U. C., Farley, D. M., Cicha, M. Z., Smith, L. A.** (2000). Activation of renal mechanosensitive neurons involves bradykinin, protein kinase C, PGE<sub>2</sub>, and substance P. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **278**, R937-R946.

**Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**, 680-685.

**Lim, J., Turner, A. J.** (1996). Chemical modification of porcine kidney aminopeptidase P indicates the involvement of two critical histidine residues. *FEBS Lett.* **381**, 188-190.

- Lloyd, G. S., Hryszko, J., Hooper, N. M., Turner, A.** (1996). Inhibition and metal ion activation of pig kidney aminopeptidase P. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 229-236.
- Lloyd, G. S., Turner, A. J.** (1995). Aminopeptidase P: cation activation and inhibitor sensitivity are substrate dependent. *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 60S.
- Lowther, W. T., Matthews, B. W.** (2000). Structure and function of the methionin aminopeptidases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1477**, 157-167.
- Lowther, W. T., Orville, A. M., Madden, D. T., Lim, S., Rich, D. H., Matthews, B. W.** (1999a). *Escherichia coli* methionin aminopeptidase: implications of crystallographic analyses of the native, mutant, and inhibited enzymes for the mechanism of catalysis. *Biochemistry.* **39**, 7678-7688.
- Lowther, W. T., Zhang, Y., Sampson, P. B., Honek, J. F., Matthews, B. W.** (1999b). Insights into the mechanism of *Escherichia coli* methionin aminopeptidase from the structural analysis of reaction products and phosphorous-based transition-state analogues. *Biochemistry.* **38**, 14810-14819.
- Maggiara, L. L., Orawski, A. T., Simmons, W. H.** (1999). Apstatin analogue inhibitors of aminopeptidase P, a bradykinin-degrading enzyme. *J. Med. Chem.* **42**, 2394-2402.
- Mann, K.** (1996). Disulfide bonds and free SH-groups in pig kidney aminopeptidase P. *Biol. Chem.* **377**, 857-858.
- Mc Donnell, M., Fitzgerald, R., Fhaoláin I. N., Jennings, P. V., O'Cuinn, G.** (1997). Purification and characterization of aminopeptidase P from *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris*. *J. Dairy Res.* **64**, 399-407.
- McGurl, B., Pearce, G., Orozco-Cardenas, M., Ryan, C. A.** (1992). Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science* **255**, 1570-1573.
- Meichtry, J., Amrhein, N., Schaller, A.** (1999). Characterization of the subtilase gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Mol. Biol.* **39**, 749-760.

**Meindl, T., Boller, T., Felix, G.** (1998). The Plant wound hormone systemin binds with the N-terminal part to its receptor but needs the C-terminal part to activate it. *Plant Cell* **10**, 1561-1570.

**Michelet, B., Boutry, M.** (1995). The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase, a highly regulated enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol.* **108**, 1-6.

**Mock, W. L., Aksamawati, M.** (1994). Binding to thermolysin of phenolate-containing inhibitors necessitates a revised mechanism of catalysis. *Biochem J.* **302**, 57-68.

**Mock, W. L., Liu, Y.** (1995). Hydrolysis of picolinylprolines by prolidase, a general mechanism for the dual-metal ion containing aminopeptidases. *J. Biol. Chem.* **31**, 18437-18446.

**Moyen, C., Hammond-Kosack, K. E., Jones, J., Knight, M. R., Johannes, E.** (1998). Systemin triggers an increase of cytoplasmic calcium in tomato mesophyll cells: Ca<sup>2+</sup> mobilization from intra- and extracellular compartments. *Plant Cell Envir.* **21**, 1101-1111.

**O'Donnell, P. J., Calvert, C. M., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H. M. O., Bowles, D. J.** (1996). Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* **274**, 1914-1917.

**Olivari, C., Meanti, C., De Michelis, M. I., Rasi-Caldogno, F.** (1998). Fusicoccin binding to its plasma membrane receptor and the activation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol.* **116**, 529-537.

**Orawski, A. T., Simmons, W. H.** (1995). Purification and properties of membrane-bound aminopeptidase P from rat lung. *Biochemistry* **34**, 11227- 11236.

**Orozco-Cardenas, M., Ryan, C. A.** (1999). Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6553-6557.

**Page, R. D. M.** (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**,357-358.

- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., Ryan, C. A.** (1991). A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* **253**, 895-898.
- Prechel, M. M., Orawski, A. T., Maggiora, L. L., Simmons, W. H.** (1995). Effect of a new aminopeptidase P inhibitor, apstatin, on bradykinin degradation in the rat lung. *J. Pharm. Exp. Ther.* **275**, 1136-1142.
- Reymond, P., Farmer, E. E.** (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 404-411.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M., Farmer, E. E.** (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 707-719.
- Riedel, E.** (1994). *Anorganische Chemie*. de Gruyter, New York.
- Roberts, M. R., Bowles, D. J.** (1999). Fusicoccin, 14-3-3 proteins, and defense responses in tomato plants. *Plant Physiol.* **119**, 1243-1250.
- Rojo, E., Leon, J., Sanchez-Serrano, J. J.** (1999). Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **20**, 135-142.
- Romero, C. V., Neudorfer, I., Mann, K., Schäfer, W.** (1995). Purification and amino acid sequence of aminopeptidase P from pig kidney. *Eur. J. Biochem.* **229**, 262-269.
- Russell, D. J., Pearce, G., Ryan, C. A.** (1992). Proton-NMR assignments of systemin. *J. Protein Chem.* **11**, 265-274.
- Rusu, I., Yaron, A.** (1992). Aminopeptidase P from leukocytes. *Eur. J. Biochem.* **15**, 93-100.
- Ryan, C. A.** (1992). The search for the proteinase-inhibitor inducing factor, PIIF. *Plant Mol. Biol.* **19**, 123-133.

- Ryan, C. A.** (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 112-121.
- Ryan, J. W., Valido, F., Berryer, P., Chung, A. Y. K., Ripka, J. E.** (1992). Purification and characterisation of guinea pig serum aminoacylproline hydrolase (Aminopeptidase P). *Biochim. Biophys. Acta* **1119**, 140-147.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, N., Nicklen, S., Coulson, A. R.** (1977). DNA-sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schaller A., Oecking, C.** (1999). Modulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell* **11**, 263-272.
- Schaller, A.** (1998). Action of proteolysis-resistant systemin analogues in wound signalling. *Phytochemistry* **47**, 605-612.
- Schaller, A.** (1999). Oligopeptide signalling and the action of systemin. *Plant Mol. Biol.* **40**, 763-769.
- Schaller, A., Bergey, D., Ryan, C. A.** (1995). Induction of wound response genes in tomato leaves by bestatin, an inhibitor of aminopeptidases. *Plant Cell* **7**, 1893-1898.
- Schaller, A., Roy, P., Amrhein, N.** (2000). Salicylic acid-independent induction of pathogenesis-related gene expression by fusicoccin. *Planta* **210**, 599-606.
- Schaller, A., Ryan, C. A.** (1995). Systemin – a polypeptide defense signal in plants. *BioEssays* **18**, 27-33.
- Scheer, J. M., Ryan, C. A.** (1999). A 160-kD systemin receptor on the surface of *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells. *Plant Cell* **11**, 1525-1535.

**Schmid, J., Schaller, A., Leibinger, U., Boll, W., Amrhein, N.** (1992). The in vitro-synthesized tomato shikimate kinase precursor is enzymatically active and is imported and processed to the mature enzyme by chloroplasts. *Plant J.* **2**, 375-383.

**Simmons, W. H., Orawski, A. T.** (1992). Membrane-bound aminopeptidase P from bovine lung. *J. Biol. Chem.* **267**, 4897-4903.

**Smith, D. B. and Johnson, K. S.** (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathion S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.

**Smith, T. A., and Kohorn, B.D.** (1991). Direct selection for sequences encoding proteases of known specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5159-5162.

**Snyder, S. H., Jaffrey, S. R.** (1999). Vessels vivified by akt acting on NO synthase. *Nature Cell Biol.* **1**, E95-E96.

**Steiner, H. Y., Song, W., Zhang, L., Naider, F., Becker, J. M., Stacey, G.** (1994). An *Arabidopsis* peptide transporter is a member of a new class of membrane transport proteins. *Plant Cell* **6**, 1289-1299.

**Stiebitz, B.** (1997). Internally quenched fluorogenic substrate which allows aminopeptidase P (APP) activity determination by a continuous fluorescent assay. Poster 57, 3. Dt. Peptidkolloquium Konstanz, D.

**Stöckel-Marschek, A., Mrestani-Klaus, C., Stiebitz, B., Demuth, H. U., Neubert, K.** (2000). Thioxo amino acid pyrrolidides and thiazolidides: new inhibitors of proline specific peptidases. *Biochim. Biophys. Acta* **1479**, 15-31.

**Sträter, N., Lipscomb, W. N.** (1995). Two metal ion mechanism of bovine lens leucine aminopeptidase: active site solvent structure and binding mode of L-leucinal, a *gem*-diolate transition state analogue, by X-ray crystallography. *Biochemistry* **34**, 14792-14800.



**Svennelid, F., Olsson, A., Piotrowski, M., Rosenquist, M., Ottman, C., Christer, L., Oecking, C., Sommarin, M.** (1999). Phosphorylation of Thr-948 at the C-terminus of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase creates binding site for the regulatory 14-3-3 protein. *Plant Cell* **11**, 2379-2391.

**Taiz, L., Zeiger, E.** (1998). *Plant physiology*. second ed., Sunderland, Massachusetts.

**Takos, A. M., Dry, I. B., Soole, K. L.** (2000). Glycosyl-phosphatidylinositol-anchor addition signals are processed in *Nicotiana tabacum*. *Plant Journal* **21**, 43-52.

**Tamura, N., Lottspeich, F., Baumeister, W., Tamura, T.** (1998). The role of tricorn protease and its aminopeptidase-interacting factors in cellular protein degradation. *Cell* **95**, 637-648.

**Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G.** (1997). The clustal x windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**, 4876-4882.

**Vanhoof, G., Goossens, F., De Meester, I., Hendriks, D., Scharpé, S.** (1995). Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J.* **9**, 736-744.

**Wessel, D., Flugge, U. L.** (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138**, 141-43.

**White, P. J., Millar, G., Coggins, J. R.** (1988). The overexpression, purification and complete amino acid sequence of chorismate synthase from *Escherichia coli* K12 and its comparison with the enzyme from *Neurospora crassa*. *Biochem. J.* **251**, 313-322.

**Wilce, M. C. J., Bond, C. S., Dixon, N.E., Freeman, H. C., Guss, J. M., Lilley, P. E., Wilce, J. A.** (1998). Structure and mechanism of a proline-specific aminopeptidase from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3472-3477.

**Wilcox, D. E.** (1996). Binuclear metallohydrolases. *Chem. Rev.* **96**, 2435-2458.

**Xing, T., Higgins, V. J., Blumwald, E.** (1996). Regulation of plant defense response to fungal pathogens: two types of protein kinases in the reversible phosphorylation of the host plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Cell* **8**, 555-564.

**Yao, T., Cohen, R. E.** (1999). Giant proteases: beyond the proteasom. *Curr. Biol.* **9**, R551-R553.

**Yaron, A., Mlynar, D.** (1968). Aminopeptidase-P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **32**, 658-663.

**Yaron, A., Naider, F.** (1993). Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**, 31-81.

**Yoshimoto, T., Murayama, N., Honda, T., Tone, H., Tsuru, D.** (1988). Cloning and expression of aminopeptidase P gene from *Escherichia coli* HB101 and characterization of expressed enzyme. *J. Biochem.* **104**, 93-97.

**Yoshimoto, T., Orawski, A. T., Simmons, W. H.** (1994). Substrate specificity of aminopeptidase P from *Escherichia coli*: comparison with membrane-bound forms from rat and bovine lung. *Arch. Biochem. Biophys.* **311**, 28-34.

## 6. Anhang

### 6.1 Statistik

Die unten dargestellten Formeln wurden in der Arbeit verwendet. Eine ausführlichere Diskussion ist in allgemeinen Lehrbüchern der Statistik zu finden.

#### 6.1.1 Regression

Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden mit dem Programm Excel 98 (Microsoft) ermittelt. Das Programm führt dazu eine lineare Regression nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate durch (allgemeine Formel:  $y = mx + b$  wobei gilt:  $m$  : Steigung;  $b$ : x-Achsenabschnitt). Daraus ergibt sich nach Gleichung (1) und (2) die Steigung bzw. der Achsenabschnitt sowie nach den Gleichungen (3), (4) und (5) die dazugehörigen Fehler.

$$m = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})(x_i - \bar{x})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (1)$$

$$b = \bar{y} - m\bar{x} \quad (2)$$

$$s_m = \sqrt{\frac{s^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (3)$$

$$s_b = s \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (4)$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - b - mx_i)^2}{n - 2} \quad (5)$$

Als Mass für die Linearität wurde ein Korrelationskoeffizient (Gleichung (6)) berechnet.

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (6)$$

### 6.1.2 Fehlerrechnung

Für die Ermittlung der katalytischen Konstanten erfolgte die Regression über die ersten 100 Messwerte.  $K_m$ ,  $v_{\max}$ ,  $k_{\text{cat}}$  und  $k_{\text{cat}}/K_m$  wurden für jede der 8 Messungen einzeln berechnet und anschliessend nach Gleichungen (7) - (10) das gewichtete Mittel  $\bar{x}_w$  bestimmt ( $w_j$ : Gewichtungsfaktoren;  $s$ : Standardabweichung).

$$\bar{x}_w = \sum_{j=1}^m w_j \bar{x}_j \quad (7)$$

$$w_j = \frac{1/s_{\bar{x},j}^2}{\sum_{k=1}^m 1/s_{\bar{x},k}^2} \quad (8)$$

$$s_{w(\text{int})}^2 = \sum_{j=1}^m w_j^2 s_{\bar{x},j}^2 \quad (9)$$

$$s_{w(EXT)}^2 = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m w_j (x_j - \bar{x}_w)^2 \quad (10)$$

Im Resultat wurde mit der grösseren der beiden Varianzen die konservative Lösung gewählt (Gränich et al., 1996). Die berechneten Gewichtungskonstanten  $w_i$  wurden nach Gleichung (11) überprüft.

$$\sum_j w_j = 1 \quad (11)$$

Die Standardabweichungen der einzelnen Konstanten resultierte dabei nach der allgemeinen Gleichung (12) aus den Standardabweichungen von  $K_m$ ,  $v_{max}$  und der Enzymkonzentration.

$$\sigma_s^2 = \sum_{i=1}^n \left( \frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 \cdot \sigma_i^2 \quad (12)$$

Danach gelten für die einzelnen Konstanten die Gleichungen (13)-(16) wobei E die Gesamtkonzentration an eingesetztem Fusionsprotein ist.

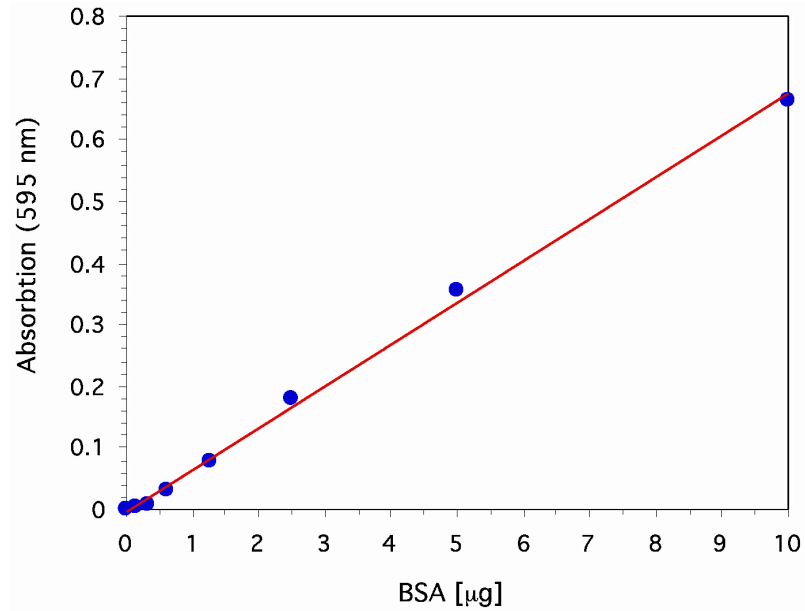
$$K_m: \quad s_{K_m}^2 = \frac{1}{b^2} s_m^2 + \left( \frac{m}{b^2} \right)^2 s_b^2 \quad (13)$$

$$v_{max}: \quad s_{v_{max}}^2 = \frac{1}{b^2} s_m^2 + \left( \frac{l}{b} \right)^2 s_l^2 \quad (14)$$

$$k_{cat}: \quad s_{k_{cat}}^2 = \left( \frac{1}{E} \right)^2 s_{v_{max}}^2 + \left( \frac{v_{max}}{E^2} \right)^2 s_E^2 \quad (15)$$

$$k_{cat}/K_m: \quad s_{k_{cat}/K_m}^2 = \left( \frac{1}{k_{cat}} \right)^2 + \left( \frac{k_{cat}}{K_m^2} \right)^2 s_{K_m}^2 \quad (16)$$

## 6.2 Eichgerade der Proteinkonzentration



Die erhaltenen Konstanten waren :

m:  $(0.068 \pm 0.0013) \mu\text{g}^{-1}$

b:  $- 0.003 \pm 0.005$

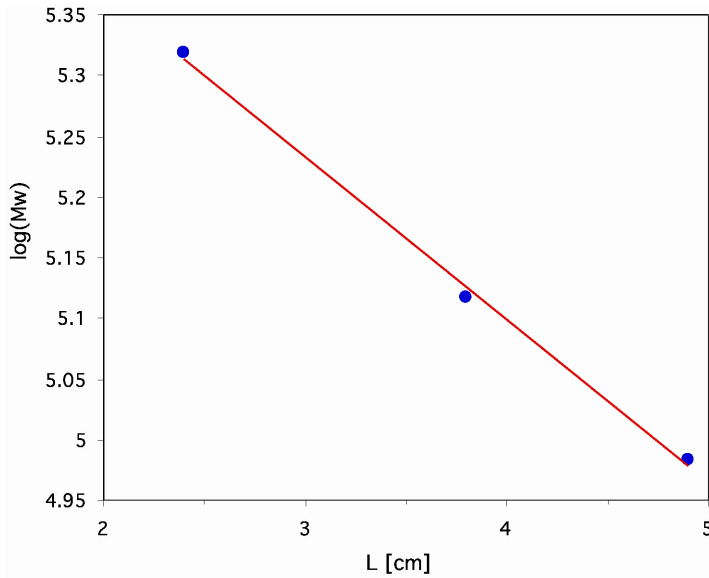
$R^2: 0.998$

Die Enzymkonzentration wurde mittels dieser Konstanten aus der gemessenen Absorption berechnet, wobei die Standardabweichung der Konzentration nach Gleichung (17) berechnet wurde (A: Absorption).

$$s_E^2 = \left( \frac{A - b}{m} \right)^2 s_m^2 + \left( \frac{1}{m} \right)^2 s_b^2 \quad (17)$$

### 6.3 Auswertung des Quervernetzungsexperimentes

Die folgenden Werte ergaben sich aus der Laufstrecke des Kaleidoscop prestained Markers.



Die erhaltenen Konstanten waren:

$$m: (-0.135 \pm 0.006) \text{ cm}^{-1}$$

$$b: 2.64 \pm 0.022$$

$$R^2: 0.998$$

	experimentell		berechnet	
	Mw [kDa]	L [cm]	Mw [kDa]	L [cm]
Monomer	134 ± 11	3.8	99	4.8 ± 0.3
Dimer	212 ± 7	2.3	197	2.5 ± 0.2
Trimer	290 ± 5	1.3	296	1.2 ± 0.2
Tetramer			395	0.3 ± 0.2

Die Fehler der Größen ergaben sich nach Gleichung (18) bzw. (19) (ln : Logarithmus mit der Basis e; log: Logarithmus mit der Basis 10; Mw: Molekulargewicht; L: Laufstrecke).

$$s_{Mw}^2 = \left(10^b m \ln(10) 10^{mx}\right)^2 s_m^2 + \left(10^{mx} \ln(10) 10^b\right)^2 s_b^2 \quad (18)$$

$$s_L^2 = \left(\frac{\log(Mw) - b}{m^2}\right)^2 s_m^2 + \left(\frac{1}{m}\right)^2 s_b^2 \quad (19)$$

## 6.4 Eigenschaften der Metalle

	Mangan	Kobalt	Calcium	Magnesium	Zink	Kupfer
Oxidationsstufen	7, 6, 4, <b>2</b> , 3	<b>2</b> , 3	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b> , 1
Atomradius [Å]	1.79	1.67	2.23	1.72	1.53	1.57
Radius der stabilen Oxidationsstufe [Å]	0.78	0.69	0.99	0.72	0.65	0.65
Koordinationszahl	6 (+)	6	7 (±)	6	6	7
Elektronegativität (nach Pauling)	1.55	1.88	1.00	1.31	1.65	1.90
Säure Base Eigenschaften der Ionen	sauer	amphoter	basisch	basisch	amphoter	basisch
Total Konzentration im Meerwasser [log (mol/l)]	$5 \times 10^{-10}$	$2 \times 10^{-11}$	0.01	$5 \times 10^{-2}$	$8 \times 10^{-9}$	$4 \times 10^{-9}$
Konzentration im Boden [ppm]	200-300	0.02-0.5	$3.64 \times 10^{-4}$	$0.05-0.5 \times 10^{-4}$	80, 10-300	5-50
Verteilung in der Zelle bzw. Kompartimente mit erhöhter Konzentration	Mitochondrien Peroxisom Vakuole	Zytoplasma (Coenzym B <sub>12</sub> )	überall ausser im Kern	Zytoplasma	überall	Ausserhalb der Zelle
Konzentration in Pflanzen [µmol/g Trockengewicht]	1		125	80	0.3	0.1
Substitution mit anderen Ionen in Enzymen			Mn <sup>2+</sup> , Lanthanide	Mn <sup>2+</sup> , Cr <sup>3+</sup>	Co <sup>2+</sup> , (Mn <sup>2+</sup> )	
Auswahl an bekannten Proteinen	Saure Phosphatase Superoxid dismutase Glycosyltransferase	Vitamin B <sub>12</sub> Coenzym Methionin-Synthetase Glutamat-mutase	Calmodulin Troponin C Faktor Xa	ATPase Kinase Glutamin-synthetase	Trankriptions faktoren RNA Synthetase Carboxy-peptidase Thermolysin	Cytochrom-oxidase Superoxid-dismutase Galactose-oxidase

Daten aus: Fraústo da Silva et al., 1991; Riedel, 1994; Taiz et al., 1998. Rot gekennzeichnet sind die stabilen Oxidationstufen der Metalle; (±): grössere oder kleinere Koordinationszahl möglich.



## 6.5 Datenbankeinträge der verwendeten Sequenzen

**A. thaliana\_1** gi|7270625|emb|CAB80342.1| aminopeptidase-like protein [*Arabidopsis thaliana*]

**A. thaliana\_2** gi|6729045|gb|AAF27041.1|AC009177\_31 putative aminopeptidase [*Arabidopsis thaliana*]

**A. thaliana\_3** gi|4337174|gb|AAD18095.1| Similar to gi|1573829 HI0816 aminopeptidase P homolog (pepP) from *Haemophilus influenzae* genome gb|U32764. [*Arabidopsis thaliana*]

**C. jejuni** gi|6968120|emb|CAB75289.1| putative aminopeptidase [*Campylobacter jejuni* ]

**C. pneumoniae** gi|8979187|dbj|BAA99021.1| aminopeptidase P [*Chlamydomophila pneumoniae*]

**C. trachomatis** gi|3329016|gb|AAC68176.1| Aminopeptidase P [*Chlamydia trachomatis*]

**D. melanogaster** gi|4107172|emb|CAA10526.1| aminopeptidase P [*Drosophila melanogaster*]

**E. coli APP** PDB 1A16

**E. coli APM** PDB 1MAT

**E. coli Prolidase** sp|P21165|PEPQ\_ *E. coli* Xaa-Pro Dipeptidase (EC 3.4.13.9) (X-Pro Dipeptidase) (Proline Dipeptidase) (Prolidase) (Imidodipeptidase) [*Escherichia coli*]

**H. influenzae** gi|1573829|gb|AAC22475.1| aminopeptidase P (pepP) [*Haemophilus influenzae* Rd]

**H. sapiens [Plasmamembran]** gi|4507941|ref|NP\_003390.1| X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 2, membrane-bound [*Homo sapiens*]

**H. sapiens [Zytoplasma]** gi|9739017|gb|AAF97866.1|AF195530\_1 soluble aminopeptidase P [*Homo sapiens*]

**L. lactis** gi|1915907|emb|CAA70068.1| aminopeptidase P [*Lactococcus lactis*]

**M. genitalium** gi|3844901|gb|AAC71546.1| aminopeptidase P (pepP) [*Mycoplasma genitalium*]

**M. thermoautotrophicum** gi|2622080|gb|AAB85477.1| aminopeptidase P [*Methanobacterium thermoautotrophicum*]

***N. meningitidis*** gi|7380282|emb|CAB84868.1| putative aminopeptidase [*Neisseria meningitidis*]

***P. putida*** Creatinase PDB 1CHM

***R. norvegicus***\_[Zytoplasma] gi|2760920|gb|AAB95331.1| cytoplasmic aminopeptidase P [*Rattus norvegicus*]

***S. cerevisiae*** gi|6321118|ref|NP\_011196.1| Yfr006wp [*Saccharomyces cerevisiae*]

***S. coelicolor*** gi|8977942|emb|CAB95809.1| Xaa-Pro aminopeptidase II (EC 3.4.11.9) [*Streptomyces coelicolor* A3(2)]

***S. lividans*** gi|484336|pir||JN0491 X-Pro aminopeptidase (EC 3.4.11.9) [*Streptomyces lividans*]

***S. pombe*** gi|3859775|emb|CAA91125.1| putative aminopeptidase p [*Schizosaccharomyces pombe*]

***S. scrofa***\_[Plasmamembran] gi|994862|gb|AAB34314.1| aminopeptidase P, AP-P [swine, kidney cortex, Peptide, 624 aa] [*Sus scrofa domestica*]

***S. spirochete*** gi|7520904|pir||G71308 probable aminopeptidase P [*Syphilis spirochete*]

***Synechocystis***\_sp. gi|1653657|dbj|BAA18569.1| aminopeptidase P [*Synechocystis* sp.]

***T. maritima*** gi|4980527|gb|AAD35136.1|AE001691\_10 aminopeptidase P, putative [*Thermotoga maritima*]

***T. pallidum*** gi|3322861|gb|AAC65543.1| aminopeptidase P [*Treponema pallidum*]

***V. cholerae*** gi|9654463|gb|AAF93245.1| aminopeptidase P [*Vibrio cholerae*]

***X. fastidiosa*** gi|9107124|gb|AAF84811.1|AE004020\_2 aminopeptidase P [*Xylella fastidiosa*]

Die in der Arbeit verwendeten Namen sind hervorgehoben. Mit Ausnahme der mit PDB gekennzeichneten Einträge stammen alle Sequenzen aus der NCBI Datenbank.

## 6.6 Primerkarte

### 6.6.1 Standard-Primer

T7 Primer: 5'- GTAATACGACTCACTATAGGGC -3'

T3 Primer: 5'- AATTAACCCTCACTAAAGGG -3'

PC31: 5'- CTTCGGCAATAAGGGCTACT -3'

5' pGEX: 5'- GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG -3'

3' pGEX: 5'- CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG -3'

### 6.6.2 Xaa-Pro Aminopeptidase Primerkarte

```

ATGGCGGATACACTCGCAGCTCTGAGGTCCTTTGATGGCTTCTCACTCTCCTCCTCTCAATGCTTTAATCGTTCCCTCCGAAGATTATCATCAGAGCGAAT 100
TACCGCCTATGTGAGCGTCGAGACTCCAGAACTACCGAAGAGTGAGAGGAGGAGAGTTACGAAATTAGCAAGGAAGGCTTCTAATAGTAGTCTCGCTTA

AP2Gex5 p →                AP25 pGEX p →

ATGTTTCTGCACGAGATAAGAGGCGCGATTTCTGCTCTGGATTACCGGAAGTGCTGGTATAGCGCTTATATCAATGAACGAAGCACTTCTGTGGACCGA 200
TACAAAGACGTGCTCTATTCTCCGCGCTAAAGCAGAGACCTAAGTGGCTTCACGACCATATCGCGAATATAGTTACTTGCTTCGTGAAGACACCTGGCT

TGGTCGCTACTTTTTGCAGGCAGCTCAGCAGCTTAGTGAGCAATGGAAGCTCATGCGTATGGGAGAAGACCCTGCACTTGATATTTGGATGGCAGATAAT 300
ACCAGCGATGAAAAACGTCCGTCGAGTCGTGGAATCACTCGTTACCTTCGAGTACGCATACCCTCTTCTGGGACGTGAACTATAAACCTACCGTCTATTA

CTGCCAAAGGATGCAGCTATTGGTGTGATCCATGGTGTATATCAGTAGATACTGCACAGAAATGGGAGCGTGCTTTTGCTAAGAAACAGCAAAAGTTGG 400
GACGGTTTCCTACGTCGATAACCCACAAC TAGGTACCACATATAGTCATCTATGACGTGCTTTACCCTCGCACGAAAACGATTCCTTGTCGTTTTCAACC

```



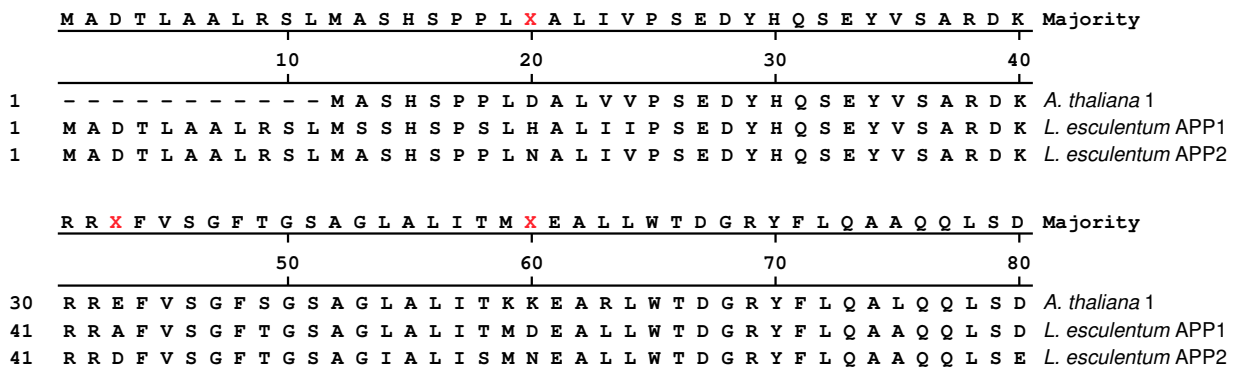


Die Sequenzen der Primer sind hervorgehoben. Die vollständigen Sequenzen der Primer AP23 pGEX und AP2Gex3 lauten:

AP23 pGEX: 5'- GGGGTACCTCAAGCTGCAATGGGTGCAG -3'

AP2Gex3: 5'- GGGGTACCTAAGAGCACTGAACATCTCA –3'

### 6.7 Alignment von *LeAPP2* mit *LeAPP1* und der Xaa-Pro Amino-peptidase aus *A. thaliana* (1)



	Q W K L M R M G E D P X V D I W M A D N L P K D A A I G V D X W C V S V D T A Q	Majority
	90 100 110 120	
70	E W T L M R M G E D P L V E V W M S D N L P E E A N I G V D S W C V S V D T A N	<i>A. thaliana</i> 1
81	Q W K L M R M G E D P P V D I W M A N N L P K D A A I G V D T W C V S V D T A Q	<i>L. esculentum</i> APP1
81	Q W K L M R M G E D P A L D I W M A D N L P K D A A I G V D P W C I S V D T A Q	<i>L. esculentum</i> APP2
	K W E X A F A K K Q Q K L V X T T R N L V D E V W K N R P P A E X N P V I V H P	Majority
	130 140 150 160	
110	R W G K S F A K K N Q K L I T T T D L V D E V W K S R P P S E M S P V V V H P	<i>A. thaliana</i> 1
121	K W E C A F A K K Q Q K L V Q T T R N L V D D V W K N R L P A Q A N P V I V H P	<i>L. esculentum</i> APP1
121	K W E R A F A K K Q Q K L V P T A R N L V D E V W K N Q P P A E T N P L I V H P	<i>L. esculentum</i> APP2
	L E F A G R S V A X K L K D L R A K L V X E K A R A I I I T A L D E V A W L Y N	Majority
	170 180 190 200	
150	L E F A G R S V S H K F E D L R A K L K Q E G A R G L V I A A L D E V A W L Y N	<i>A. thaliana</i> 1
161	L Q F A G Q S V A E K L K E L R K K L V M G K A C A I I I T A L D E V A W L Y N	<i>L. esculentum</i> APP1
161	L E F A G R S V A D K L K D L R A K L V K E K A R A I I I T A L D E V A W L Y N	<i>L. esculentum</i> APP2
	V R G T D V S Y C P V V H A F A I V T X D S A F L Y V D K X K L S X E A N S Y M	Majority
	210 220 230 240	
190	I R G T D V A Y C P V V H A F A I L T T D S A F L Y V D K K K V S D E A N S Y F	<i>A. thaliana</i> 1
201	V R G S D V S Y C P V V H A F A I V T I D S A F F Y V D K Q K L S P E A N S Y M	<i>L. esculentum</i> APP1
201	V R G T D V S Y S P V V H A F A I V T L T S A F L Y V D K R K L S S E A N S Y M	<i>L. esculentum</i> APP2
	X E N G I X V R E Y G D V S S D V V L L A S D Q L T S S S A X K T X X G X - X X	Majority
	250 260 270 280	
230	N G L G V E V R E Y T D V I S D V A L L A S D R L I S S F A S K T - - - - - V	<i>A. thaliana</i> 1
241	E E N G I M V R D Y G D V S S D V V L L A S D Q L T S C S S T K G S K G N P K I	<i>L. esculentum</i> APP1
241	K E N G I F V R E Y G D V S S D A V L L A S D Q L T P S S A D K T P S G L - N T	<i>L. esculentum</i> APP2
	X X X X A K D X E N X X X Q X A E L V N D L I W V D P G A C C F A L Y S K L X A	Majority
	290 300 310 320	
264	Q H E A A K D M E I D S D Q P D R L - - - - - W V D P A S C C Y A L Y S K L D A	<i>A. thaliana</i> 1
281	D V R N A T Y V G N S D S H A A E F V N D L I W V D P G A C C F A L Y S K L S A	<i>L. esculentum</i> APP1
280	E T N C G K D T E N G E I Q T A E L V N D L I W V D T G A C C F A L Y L K L N A	<i>L. esculentum</i> APP2
	D K V L L Q Q S P L A L A K A L K N P V E X E G L K N A H X R D G A A V V Q Y L	Majority
	330 340 350 360	
299	E K V L L Q P S P I S L S K A L K N P V E L E G I K N A H V R D G A A V V Q Y L	<i>A. thaliana</i> 1
321	D K V L L Q Q S P L A L A K A L K N P V E I E G L K K A H F R D G A A V V Q Y L	<i>L. esculentum</i> APP1
320	D K V L L K Q S P L A L A K A L K N P V E M K G L K N A H I R D G A A V V Q Y L	<i>L. esculentum</i> APP2
	V W L D X Q M Q E I Y G A S G Y F X E A E S X K X K K X X X T K R L T E V S V S	Majority
	370 380 390 400	
339	V W L D N Q M Q E L Y G A S G Y F L E A E A S K - K K P S E T S K L T E V T V S	<i>A. thaliana</i> 1
361	V W L D K Q M Q E I Y G A S G Y F M E A E S T K Q K K Q L G T K R L T E V S V S	<i>L. esculentum</i> APP1
360	A W L D R Q M Q E I Y G A S G Y F A E A E S M S M N K L K D L K R L T E V S A S	<i>L. esculentum</i> APP2

	D K L E E F R A S K E H F R G L S F P T I S S V G S N A A I I H Y S P E A E T C	Majority
	410                      420                      430                      440	
378	D K L E S L R A S K E H F R G L S F P T I S S V G S N A A V I H Y S P E P E A C	<i>A. thaliana</i> 1
401	D K L E E F R A S K E H F R G L S F R T T S S V G S N A A I I H Y K P E A E T C	<i>L. esculentum</i> APP1
400	D K L E E F R A S K E H F R G L S F P T I S S V G S N G A I I H Y S P E A E T C	<i>L. esculentum</i> APP2
	A E L D P D X I Y L C D S G A Q Y L D G T T D I T R T V H F G K P S A H E K X C	Majority
	450                      460                      470                      480	
418	A E M D P D K I Y L C D S G A Q Y L D G T T D I T R T V H F G K P S A H E K E C	<i>A. thaliana</i> 1
441	A E L D P D C I Y L F D S G A Q Y L D G T T D I T R T I H F G K P S P H E K S S	<i>L. esculentum</i> APP1
440	A E L D P D Q M Y L C D S G A Q Y L D G T T D I T R T V H F G K P T A H E K T C	<i>L. esculentum</i> APP2
	Y T A V L K G H I S L G N A R F P N G T N G Y A L D I L A R X P L W K Y G L D Y	Majority
	490                      500                      510                      520	
458	Y T A V F K G H V A L G N A R F P K G T N G Y T L D I L A R A P L W K Y G L D Y	<i>A. thaliana</i> 1
481	Y T A V L K G H I S L G N A R F P N G T N G Q A L D I L A R I P L W K D G L D Y	<i>L. esculentum</i> APP1
480	Y T A V L K G H I S L G N A R F P N G T N G Y A L D V L A R T P L W K Y G L D Y	<i>L. esculentum</i> APP2
	R H G T G H G I G S Y L N V H E G P H Q I S F R P S A R N V P L Q V S M T V T D	Majority
	530                      540                      550                      560	
498	R H G T G H G V G S Y L C V H E G P H Q V S F R P S A R N V P L Q A T M T V T D	<i>A. thaliana</i> 1
521	R H G T G H G I G S Y L N V H E G P H N I S F R P S A R D V P L Q V S M A V T D	<i>L. esculentum</i> APP1
520	R H G T G H G I G S Y L N V H E G P H Q I S F R P S A Q N V P L Q V S M T V T D	<i>L. esculentum</i> APP2
	E P G Y Y E D G N F G I R L E N V L I V K E G X T K F N F G D K G Y L X F E H I	Majority
	570                      580                      590                      600	
538	E P G Y Y E D G N F G I R L E N V L V V N D A E T E F N F G D K G Y L Q F E H I	<i>A. thaliana</i> 1
561	E P G Y Y E D G N F G I R I E N V L I V K E G H T K F N F G N K G Y L S F E H I	<i>L. esculentum</i> APP1
560	E P G Y Y E D G K F G I R L E N V L I V K E G N T K F N F G D K G Y L T F E H I	<i>L. esculentum</i> APP2
	T W A P Y Q R K L I D V S L L X P E E I X W L N E Y H X K C X E I L A P Y L N Q	Majority
	610                      620                      630                      640	
578	T W A P Y Q V K L I D L D E L T R E E I D W L N T Y H S K C K D I L A P F M N Q	<i>A. thaliana</i> 1
601	T W A P Y Q R K L I D V S L L I P E E I E W L N E Y H A K C R E I L T P Y L N T	<i>L. esculentum</i> APP1
600	T W A P Y Q R K L I D V S L L V P E E I Q W L N E Y H C K C S E I L A P Y L N Q	<i>L. esculentum</i> APP2
	S E M E W L K K A T E P I A A - -	Majority
	650	
618	T E M E W L K K A T E P V S V S A	<i>A. thaliana</i> 1
641	S E M E W L K K A T E P I A A	<i>L. esculentum</i> APP1
640	S E M E W L K N A T A P I A A	<i>L. esculentum</i> APP2

## 6.8 Abkürzungsverzeichnis

ACC	1-Aminocyclopropan-carbonsäure
Apm	Ampicillin
APM	Methionin Aminopeptidase
APP	Xaa-Pro Aminopeptidase
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary DNA
Da	Dalton
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'- tetraessigsäure
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GST	Glutathion S-Transferase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
MALDI-TOF MS	<b>Matrix Assisted Laser Desorbition/Ionization Time Of Flight MassenSpektrometrie</b>
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
MwCO	"molecular weight cut off"
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
PAGE	Polyacrylamidgelelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
pfu	plaque forming unit
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
RACE	rapid amplification of cDNA ends
(m) RNA	(messenger) Ribonucleinsäure



---

RNAse	Ribonuclease
SDS	Sodium dodecyl sulfat
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin
Tris/HCl	Tris (hydroxymethyl) aminomethan Hydrochlorid

# Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. N. Amrhein ganz herzlich bedanken, dass er es mir ermöglichte in einer seiner Arbeitsgruppen das Vollpraktikum und die Diplomarbeit zu machen. Ein besonderer Dank gebührt Andreas Schaller, der mich, zusammen mit Jochen Strassner, mit viel Geduld in einen kleinen Teil der Arbeitsmethoden des Biologen einführte und oftmals mit Rat und Tat der Labortätigkeit beistand. Peter Marcheroux und Yoan Huet danke ich für die unkomplizierte Durchführung der MALDI-TOF MS Messungen sowie für andere wertvolle Hinweise. Insbesondere seien an dieser Stelle auch Werner Schmidt und David Frasson erwähnt, die mit Witz, Erfahrung und Teamgeist ein äusserst angenehmes Arbeitsklima schufen. Nicht zuletzt danke ich der ganzen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. N. Amrhein für ihre Gastfreundschaft.