

**Biologikum Weihenstephan
Lehrstuhl für Botanik
Technische Universität München**

**Proteasen in pflanzlichen Organellen: Funktionelle
Charakterisierung und Strukturanalyse der Cystein-Endopeptidase
in Ricinosomen und Reinigung einer Processing Peptidase aus
Glyoxysomen**

Michael Helm

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:		Univ.-Prof. Dr. E. Grill
Prüfer der Dissertation:	1.	Priv.-Doz. Dr. Chr. Gietl
	2.	Univ.-Prof. Dr. B. Hock
	3.	Univ.-Prof. Dr. G. Forkmann

Die Dissertation wurde am 23.02.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 10.05.2006 angenommen.

Don't waste your time harvesting low-hanging fruits!

Wolfram Bode

Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Than, M. E., Helm, M., Simpson, D. J., Lottspeich, F., Huber, R. und Gietl, C. (2004) The 2.0 Å crystal structure and substrate specificity of the KDEL-tailed cysteine endopeptidase functioning in programmed cell death of *Ricinus communis* endosperm. *J. Mol. Biol.* 336: 1103-1116. © 2004 Elsevier Science Ltd..

Greenwood, J. S., Helm, M. und Gietl, C. (2005) Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 2238-2243. © 2005 The National Academy of Sciences of the U.S.A.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	10
1. Danksagung.....	13
2. Zusammenfassung.....	16
3. Einleitung.....	20
3.1 Protein-Umsatz.....	20
3.1.1 Chaperon-abhängige Proteinfaltung und Qualitätskontrolle.....	20
3.1.2 Proteinabbau.....	23
3.1.3 Das Ubiquitin-Proteasom-System.....	24
3.1.4 Cytosolische Proteolyse von Oligopeptiden	26
3.1.5 Lysosomale Proteolyse.....	27
3.2 Ricinosomen.....	28
3.3 Programmierter Zelltod.....	30
3.4 Peroxisomen und Glyoxysomen	32
3.4.1 Glyoxysomale Fettmobilisierung	32
3.4.2 Photorespiration der Blatt-Peroxisomen	35
3.4.3 Weitere Stoffwechselabläufe in Peroxisomen.....	37
3.4.4 Peroxisomales Targeting.....	38
3.5 Peroxisomale Peptidasen.....	42
3.5.1 Lon-Proteasen	43
3.5.2 Metallopeptidasen der Pitrilysin-Familie.....	47
3.5.3 Deg-Proteasen.....	49

3.6 Protein Processing oder limitierte Endoproteolyse.....	54
3.6.1 Proprotein-Convertasen	54
3.6.2 Processing Peptidasen.....	55
3.6.2.1 Mitochondriale Processing Peptidasen.....	55
3.6.2.2 Chloroplasten Stroma Processing Peptidase.....	57
3.7 Zielsetzung.....	59
4. Material und Methoden.....	61
4.1 Allgemeiner Teil.....	61
4.1.1 Anzucht von Versuchspflanzen.....	61
4.1.1.1 <i>Ricinus communis</i>	61
4.1.1.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	61
4.1.1.3 <i>Citrullus vulgaris</i>	63
4.1.2 Gewinnung von Proteinextrakten	63
4.1.2.1 <i>Ricinus communis</i>	63
4.1.2.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	63
4.1.3 Proteinbestimmung.....	65
4.1.4 Aufkonzentrieren von verdünnten Proteinlösungen.....	65
4.1.5 SDS-PAGE und Western-Blot.....	66
4.1.5.1 Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	66
4.1.5.2 Western-Blot.....	67
4.1.5.3 Coomassie-Färbung.....	68
4.1.5.4 Silberfärbung	69
4.1.5.5 Native “SDS-PAGE”.....	70
4.1.5.6 Aktivitätsgel-Assay.....	70
4.1.6 Herstellung und Kontrolle von anti-AtCep-Peptid-Antikörpern	71

4.1.7 Mikroskopie.....	73
4.1.7.1 Histologische GUS-Färbung.....	73
4.1.7.2 Einbettungen.....	75
4.1.7.3 Immunocytochemie.....	77
4.1.7.4 TUNEL-Assay.....	79
4.1.7.5 Transmissionselektronenmikroskopie.....	80
4.2 Spezieller Teil.....	81
4.2.1 Untersuchung der Substratspezifität sowie Reinigung der CysEP aus <i>Ricinus communis</i> für die Kristallographie.....	81
4.2.1.1 Ricinosomen-Isolierung.....	81
4.2.1.2 Untersuchung der Substrat- und Spaltspezifität der <i>Ricinus</i> CysEP durch β -Casein-Verdau.....	82
4.2.1.3 Bestimmung der Substratspezifität der <i>Ricinus</i> CysEP mittels fluoreszenzgequenchter Peptide	83
4.2.1.4 Reinigung der <i>Ricinus</i> CysEP über Säulenchromatographie.....	85
4.2.1.5 Bestimmung der N- und C-terminalen Sequenz der inhibierten und gereinigten <i>Ricinus</i> CysEP.....	86
4.2.1.6 Kristallographische Methoden.....	87
4.2.1.7 Modellbau und Verfeinerung	88
4.2.1.8 Graphische Darstellungen und Sequenzvergleiche	89
4.2.2 Reinigung und Charakterisierung der Glyoxysomalen Processing Peptidase aus <i>Citrullus vulgaris</i>.....	90
4.2.2.1 Anreicherung von Glyoxysomen aus Kotyledonen von <i>Citrullus vulgaris</i>	90
4.2.2.2 Bestimmung der proteolytischen Aktivität.....	92
4.2.2.3 Aufbereitung der isolierten Glyoxysomen-Präparationen.....	93
4.2.2.4 Reinigung der Glyoxysomalen Processing Peptidase über Säulenchromatographie.....	94
4.2.2.5 Vorfraktionierung mittels präparativer nativer isoelektrischer Fokussierung im Sephadex-Flachbett	97
4.2.2.6 Zwei-Dimensionale Elektrophorese (2-D).....	98
4.2.2.7 Versuche zur Charakterisierung der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15	102

5. Ergebnisse.....	108
5.1 Gewebsspezifische Expression der drei KDEL-Peptidasen in <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	108
5.1.1 Histochemische Lokalisation der <i>AtPCEP1</i>, <i>AtPCEP2</i> und <i>AtPCEP3</i>-Aktivität in transgenen Promotor-GUS-Linien.....	108
5.1.1.1 GUS-Expression unter der Kontrolle des <i>AtCEP1</i> -Promoters.....	109
5.1.1.2 Expression unter der Kontrolle des <i>AtCEP2</i> -Promoters.....	117
5.1.1.3 GUS-Expression unter der Kontrolle des <i>AtCEP3</i> -Promoters.....	120
5.1.2 Nachweis der drei KDEL-Peptidasen in Gewebeextrakten von <i>Arabidopsis thaliana</i> durch spezifische Antikörper	126
5.2 Die <i>Ricinus</i> CysEP unterstützt auch in reifenden Samen den Zelltod kollabierender Gewebe.....	132
5.3 Die 2.0 Å Kristallstruktur und Substratspezifität der nativen CysEP aus Ricinosomen von <i>Ricinus communis</i>.....	141
5.3.1 Vorhersage der Spaltspezifität der <i>Ricinus</i> CysEP auf der Grundlage der Hydrolyse von synthetischen Peptiden.....	142
5.3.2 Analyse der Spaltmotive des proteolytischen β-Casein-Verdau durch Ricinosomen-CysEP aus <i>Ricinus communis</i>.....	146
5.3.3 Reinigung der reifen <i>Ricinus</i> CysEP mit dem kovalent gebundenen Inhibitor H-D-Val-Leu-Lys-Chloromethylketon und die Bestimmung von N- und C-Terminus.....	152
5.3.4 Die Kristallstruktur und das aktive Zentrum.....	152
5.3.4.1 Kristallisation und Datensammlung.....	152
5.3.4.2 Kristallisation und Gesamtstruktur.....	157
5.3.4.3 Die Substratsbindungsfurche.....	161
5.3.4.4 Spezifitäts-Subdomänen.....	163

5.4 Die Reinigung und Charakterisierung der Glyoxysomalen Processing Peptidase aus dunkel gewachsenen Kotyledonen von <i>Citrullus vulgaris</i>.....	165
5.4.1 Reinigung der Glyoxysomalen Processing Peptidase über Säulenchromatographie.....	168
5.4.1.1 DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie.....	169
5.4.1.2 Gelfiltrations-Chromatographie	171
5.4.1.3 Hydroxyapatit-Chromatographie.....	173
5.4.1.4 MonoQ-Anionenaustausch-Chromatographie.....	175
5.4.2 Im Durchlauf der Amicon-Ultrafiltration ist ein Aktivator nachweisbar.....	179
5.4.2.1 Beständigkeit des Aktivators.....	181
5.4.2.2 Die Korrelation von Fluoreszenz-Aktivitätsgel-Assay und Western-Blot mit anti- <i>At</i> Deg15-Peptid-Antikörper identifiziert die Glyoxysomale Processing Peptidase als Deg15-Peptidase	183
5.4.3 Reinigung der Glyoxysomalen Processing Peptidase über DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie, präparative native Sephadex-IEF und 2-D-PAGE.....	185
5.4.3.1 Analyse des Reinigungsverlaufs der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15 mittels Gelatine-Aktivitätsgel	187
5.4.3.2 Durch die Korrelation von 2-D-Gel und 2-D-Western-Blot mit anti- <i>At</i> Deg15-Peptid-Antikörper konnten Molekülmasse und pI der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15 bestimmt werden.....	189
5.4.4 Charakterisierung der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15.....	192
5.4.4.1 Die Untersuchung der Spaltspezifität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15 mit synthetischen Peptiden erbrachte eine Spezifität für Substrate mit Cys an P1 oder P2.....	192
5.4.4.2 Das pH-Optimum der proteolytischen Aktivität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15 liegt im basischen Bereich.....	194
5.4.4.3 Phosphat-Puffer erhöhte die proteolytische Aktivität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15.....	198
5.4.4.4 Das Temperatur-Optimum der proteolytischen Aktivität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15 liegt bei 45°C.....	199
5.4.4.5 Einige ausgewählte Proteine zeigen einen aktivierenden Einfluß auf die proteolytische Aktivität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15	200

5.4.4.6	Einige ausgewählte Cofaktoren zeigen keinen Einfluß auf die proteolytische Aktivität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15	202
5.4.4.7	Der Einfluß von Inhibitoren auf die proteolytische Aktivität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15	203
5.4.4.8	Die Glyoxysomale Processing Peptidase/Deg15 zeigt <i>in-vitro</i> bei 45°C starke proteolytische Aktivität gegenüber glyoxysomalen Matrix-Proteinen	205
5.4.4.9	Die Dimerisierung der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15 ist von Ca ²⁺ -Ionen abhängig.....	207
6.	Diskussion.....	210
6.1	Peptidasen mit C-terminalem KDEL.....	210
6.2	Peroxisomale Peptidasen.....	221
6.3	Ausblick.....	235
7.	Referenzen.....	237

Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozente
% (w/v)	Gewichtsprozente
Å	Ångström (1 Å = 10 ⁻¹⁰ m)
Abb.	Abbildung
Ac-	Acetyl-
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CMK	Chloromethylketon
DAP	<i>days after pollination</i> , Tage nach Bestäubung
-CHO	-aldehyd
ddH ₂ O	aqua bidestillata
DEAE	Diethylaminoethyl
DFP	Diisopropylfluoro-phosphat
DIC	<i>differential interference contrast</i>
DMF	N-N Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FG	Frischgewicht
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
gCS	glyoxysomale Citrat-Synthase

gMDH	glyoxysomale Malatdehydrogenase
HAc	Essigsäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-ethansulfonsäure
ICL	Isocitrat-Lyase
i.d.R.	in der Regel
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IUBMB	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
(k)Da	(kilo) Dalton
keV	kilo Elektronenvolt
K_i	Inhibitionskonstante
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
L	Liter
LB	Luria-Bertani
M	molar, mol/l
MAD	<i>Multiple Anomalous Dispersion</i>
MeOH	Methanol
MES	Morpholinoethansulfonsäure
mm	millimeter
mQ	Milliporewasser
MR	<i>Molecular Replacement</i>
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i> (Molekülgrößenausschluß)
NaOH	Natriumhydroxid
NCS	<i>noncrystallographic symmetry</i> (nichtkristallographische Symmetrie)
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Magnetische Kernresonanz)
OD	Optische Dichte
P1, P2, usw.	bezeichnet den ersten, zweiten, usw. Protein-Substratrest vor der Spaltstelle
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCD	<i>Programmed Cell Death</i> (Programmierter Zelltod)
PDB	<i>Protein Database</i>
PEG	Polyethylenglykol

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
<i>r.m.s.</i> -Abweichung	mittlere Standardabweichung (<i>root mean square deviation</i>)
S1, S2, usw.	bezeichnet Reste, die an der Bindung des P1, P2, usw. Restes des Protein-Substrats beteiligt sind
SA	<i>simulated annealing</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	<i>terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling</i>
usw.	und so weiter
u.U.	unter Umständen
V	Volt
Vermiculit	(Mg, Fe ³⁺ , Al) ₃ [(OH) ₂ Al _{1,25} Si _{2,75} O ₁₀] Mg _{0,33} (H ₂ O) ₄), "Blähglimmer"
vgl.	vergleiche
Z-	Benzyloxycarbonyl-

1. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Botanik am Wissenschaftszentrum Weihenstephan der Technischen Universität München und in der Abteilung für Struktur- und Biochemie am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Zu allererst möchte ich mich bei Frau PD Dr. Christine Gietl bedanken, daß sie mir die Möglichkeit gegeben hat, diese interessanten Themen zu bearbeiten. Auch in der Folge hat sie mir jede nur erdenkliche Hilfe zukommen lassen und stand jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Anfänglich war die Beforschung der *Ricinus* CysEP und der drei KDEL-Peptidasen in *Arabidopsis* geplant. Als das Programm im Herbst 2003 abgearbeitet war, wurde zusätzlich die Reinigung und Charakterisierung der GPP übernommen. Diese Protease wurde bereits von einigen anderen Arbeitsgruppen aus dem Bereich der Peroxisomenforschung und seit 1997 auch von mehreren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Gietl ohne Ergebnis gesucht.

In der Einarbeitungszeit standen mir Dr. Michael Meinhard, Dr. Alex Christmann und Dipl. Biol. Uwe Schuhmann bei labortechnischen, insbesondere molekularbiologischen Problemen mit Rat und Tat zur Seite. Das gilt auch für Dr. Axel Himmelbach, dem ich zusätzlich für die vielen gemeinsamen Trainingseinheiten auf dem Rennrad und den Langlaufplatten danke. Ganz besonders hervorheben möchte ich den Feinmechanikermeister und Werkstattleiter Josef Reischenbeck, der mir bei technischen Problemen trotz ständiger Überlastung immer schnell und unbürokratisch weitergeholfen hat und meine Konstruktionspläne souverän und professionell umgesetzt hat. Dank gebührt Georg Hierl, der im Rahmen seiner Diplomarbeit die Analyse von KO-Mutanten in *Arabidopsis* für die potentielle Processing Peptidase übernommen hat und in letzter Minute noch einen wichtigen Befund beigesteuert hat.

Sehr dankbar bin ich den Gärtnerinnen Caroline Claus und Lisa Heldt für die bei der Aufzucht, Pflege und Aberntung der Pflanzen geleistete Syssiphus-Arbeit. Nicht zuletzt danke ich Prof. Dr. Wolfgang Höll, einem der Letzten, der über den Tellerrand hinausblickt, für die interessanten Gespräche und dem Ordinarius des Lehrstuhls für Botanik Prof. Dr. E. Grill für seine zahlreichen und stets hilfreichen Anregungen. Bedanken möchte ich mich auch bei den guten Geistern des Instituts, ohne die ein geregelt Arbeiten nur sehr schwer möglich wäre: PD Dr. Klaus Lenzian, Beate Seeliger, Christoph Heidersber-

ger und Christian Kornbauer.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Prof. Dr. Robert Huber für die Einladung, in seiner Arbeitsgruppe (“Strukturfabrik”) am MPI in Martinsried die Kristallstruktur der *Ricin* CysEP zu lösen (“Das wäre doch eine schöne Arbeit?!”) und den allgegenwärtigen Dr. Manuel Than, der mir durch seine außerordentlich engagierte und zeitintensive Betreuung den Einstieg in die Kristallographie ermöglicht hat. Begeistert hat mich die unglaublich kameradschaftliche Atmosphäre und die seltene Kombination von Kompetenz und Lässigkeit. In welcher Arbeitsgruppe trifft man am 21. Dezember um 3 Uhr nachts noch drei Kollegen für ein gemeinsames Bier? Hervorheben möchte ich, allerdings ohne Anspruch auf Vollständigkeit, folgende Mitarbeiter am MPI: Den phänomenalen Dr. Peter Sondermann (“Forschung braucht Zeit. Das kann man zum Teil dadurch kompensieren, daß man draufhält.”), meine Bench-Nachbarn Dipl.Chem. Katja Wenig und Dipl.Chem. Stephan Henrich, Dipl.Biol. Martin “Gustl” Augustin, Dipl.Chem. Michael Koch (“Protein braucht Dreck!”), Dipl.Chem. Constanze Breithaupt (“Ich brauch keine Stereo-Brille, ich sehe das auch so.”), Dipl.Biotechnologe Tobias Krojer, Dr. Peter Göttig, Dipl.Chem. Werner Atzenhofer, Dipl.Chem. Michael Engel, “Zeugwart” Dipl.Chem. Rasso Willkomm, Snezan Marinkovic und nicht zuletzt die Proteasen-Legende Prof. Dr. Wolfram Bode.

Ein herzliches Dankeschön gilt der “2-D-Kapazität” Frau Prof. Dr. A. Görg vom Fachgebiet für Proteomik am Wissenschaftszentrum Weihenstephan der TU München, die uns trotz hoffnungsloser personeller Unterbesetzung durch Stellenstreichungen (“Der Prophet gilt nichts im eigenen Land.”) eine Kooperation im Rahmen des GPP-Projektes ermöglicht hat. Deshalb ein besonderes Dankeschön an den unermüdlichen Dipl.Biol. Carsten Lück, der mit mir in “Rambo-Manier” die Proteinreinigung über Sephadex-IEF und 2-D auf die Beine gestellt hat und Andreas Köpf, der uns etliche 2-D-Gele gefahren hat.

Ganz besonderer Dank gilt dem “Protein-Guru” Prof. Dr. Friedrich Lottspeich mit seiner Arbeitsgruppe für Proteinforschung am MPI in Martinsried, der uns aufgrund seiner enormen Erfahrung immer wieder wertvolle Ratschläge geben konnte und die zahlreichen, im Rahmen der Arbeit erforderlichen Sequenzierungsarbeiten ermöglicht hat. In diesem Zusammenhang gebührt ein großes Lob Reinhard Mentele, der einen Großteil der Sequenzierungen durchgeführt und damit wesentlich zur Arbeit beigetragen hat.

Danksagung

Danken möchte ich auch Dr. Georg J. Arnold und Dr. Thomas Fröhlich vom Genzentrum der LMU in Großhadern für die aufwendige Synthese der fluorogenen Peptide, die uns am Ende den wichtigen Funktionsnachweis für die gereinigte GPP/Deg15 lieferten.

Nicht vergessen werden darf Dr. David Simpson, seinerzeit noch am Department für Chemie des Carlsberg-Instituts in Valby (Kopenhagen, Dänemark), bevor die Pflanzenforschung eingestellt wurde. Ihm gebührt großer Dank für die aufwendigen kinetischen Experimente mit der *Ricinus* CysEP und die Datenaufbereitung.

Unerwartete Hilfe kam zur rechten Zeit von Frau Prof. Dr. I. Adamska vom Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen der Universität Konstanz, die mit ihrer Gruppe selbst auf dem Gebiet der pflanzlichen Deg-Proteasen forscht und die uns großzügig ihren anti-*At*Deg15-Peptid-Antikörper überlassen hat. Vielen Dank hierfür.

Unendlich dankbar bin ich auch dem grandiosen Prof. Dr. Diter von Wettstein, Mitglied der National Academy of Sciences U.S.A. und vormals Leiter der Pflanzenforschung am Carlsberg-Institut in Kopenhagen (Dänemark) und jetzt in Pullman (Washington State University, USA), der unsere Arbeit immer wieder durch seine zahlreichen Vorschläge bereichert hat.

“Last but not least” danke ich dem unerschütterlichen Dr. John Greenwood von der University of Guelph (Canada) für ein Jahr fruchtbarer gemeinsamer Laborarbeit im Rahmen seines “*Sabbaticals*” von Juli 2002 bis Juli 2003. In unzähligen gemeinsamen Sessions haben wir die fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *Ricinus* und *Arabidopsis* gemacht.

Mein größter Dank gilt meiner Freundin Esther, die mich im Verlaufe der Arbeit und besonders im letzten halben Jahr immer wieder moralisch unterstützt hat und meinem Bruder Thomas, der mir seinen Rechner zur Verfügung gestellt hat, als mein Notebook „abgeschmiert“ ist.

Kurz vor Redaktionsschluß geht noch ein sehr herzliches Dankeschön an Pamela Steinbis, die die sicherlich anstrengende Korrektur der Arbeit übernommen hat.

Und ganz zum Schluß möchte ich mich noch bei all jenen Kollegen bedanken, die ich nicht explizit erwähnt habe, und die nichtsdestotrotz in irgendeiner Weise zur Arbeit beigetragen haben.

2. Zusammenfassung

Der Programmierte Zelltod (PCD) ist essentiell für die Entwicklung der Pflanze, im Speziellen für den Abbau nicht mehr benötigter Gewebe zur Rückführung von Nährstoffen an die weiterlebenden Teile der Pflanze. *Ricinus* (*R. communis*) speichert Öl und Eiweiß in einem lebenden Endosperm, das die Kotyledonen umgibt. Die Speicherstoffe werden während der Keimung mobilisiert und den Kotyledonen zugeführt. Der PCD des Endosperm-Gewebes wird eingeleitet, sobald dieser Transfer abgeschlossen ist. Ein spezielles Organell – die Ricinosomen – wurde im seneszierenden Endosperm keimender *Ricinus*-Samen entdeckt. Ricinosomen werden zu Beginn des PCD am Endoplasmatischen Retikulum gebildet und schütten im Endstadium des zellulären Zerfalls große Mengen einer Papain-ähnlichen Cystein-Endopeptidase mit C-terminalem KDEL-Motiv (CysEP) aus.

Drei zur *Ricinus* CysEP homologe Cystein-Peptidasen mit C-terminalem KDEL-Motiv wurden in *Arabidopsis* identifiziert. In *Arabidopsis*-Pflanzen, die den Reporter Glucuronidase (GUS) unter der Kontrolle der drei entsprechenden Promotoren *AtCEP1*, *AtCEP2* und *AtCEP3* exprimieren, wurde eine spezifische Expression in generativen und vegetativen Geweben nachgewiesen, die in ihrer Entwicklung den Programmierten Zelltod erfahren. Ricinosomen und ihre CysEP spielen auch eine entscheidende Rolle für den Abbau bzw. Kollaps des Nucellus-Gewebes in reifenden *Ricinus*-Samen, um dem expandierenden, Speicherstoffe akkumulierenden Endosperm Raum zu geben. Ricinosomen und ihr Markenzym CysEP finden sich exklusiv in Pflanzenzellen, und zwar speziell in letztlich kollabierenden Geweben. Die native *Ricinus* CysEP wurde kristallisiert und ihre Struktur mit einer Auflösung von 2,0 Å aufgeklärt. Die katalytische Tasche wurde durch den kovalent gebundenen Inhibitor H-D-Val-Leu-Lys-CMK eindeutig definiert. Untersuchungen der Spaltspezifität mit β -Casein als Substrat ergaben eine breite Substratspezifität, die sogar Prolin N- und C-terminal zur Spaltstelle akzeptiert. Dies steht in Einklang mit ihrer Funktion beim Abbau cytosolischer Proteine bzw. Zellwandproteine in der Endphase des PCD.

Glyoxysomen sind in fettspeichernden Samen bei der Keimung an der Fettmobilisierung beteiligt. Einige glyoxysomale Matrixproteine werden als höhermolekulare Vorstufe im Cytoplasma synthetisiert und unter Abspaltung der Präsequenz in die Glyoxysomen importiert. In Nachbarschaft zur Spaltstelle findet sich charakteristischerweise ein Cystein. Die zur Abspaltung der N-terminalen Präsequenz notwendige Glyoxysomale (oder auch

Peroxisomale) Processing Peptidase aus Pflanzen und Säugern war bisher nicht bekannt.

Die Glyoxysomale Processing Peptidase wurde aus fettspeichernden Kotyledonen der Wassermelone (*Citrullus vulgaris*) über Säulenchromatographie, präparative native Isoelektrische Fokussierung und 2-D-Polyacrylamidgelelektrophorese gereinigt. Die GPP aus *C. vulgaris* tritt in zwei Formen auf, als 72 kDa-Monomer und als 144 kDa-Dimer. Die beiden Formen stehen miteinander im Gleichgewicht und konnten über Gelatine-Aktivitätsgele detektiert werden. *In-vitro* ließ sich die Gleichgewichtslage durch Ca^{2+} -Entzug in Richtung Monomer und durch Ca^{2+} -Zugabe in Richtung Dimer verschieben. Das Monomer scheint eine generell degradierende Protease zu sein und zeigt ein für eukaryontische Proteasen ungewöhnliches Temperatur-Optimum bei 45°C, ein pH-Optimum im basischen Bereich und ist durch denaturierte Proteine aktivierbar. Bei dem Dimer handelt es sich höchstwahrscheinlich um die Glyoxysomale Processing Peptidase, denn die für das Monomer nachgewiesene Substratspezifität (Φ -Arg/Lys↓) ist stark verschieden von der im Gemisch beider Proteasen gefundenen prozessierenden Substratspezifität (Cys-Xxx↓ bzw. Xxx-Cys↓). Die Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms ergab drei vermutlich in den Peroxisomen lokalisierte Peptidasen, eine Deg-Protease, eine Pitriylisin-ähnliche Metallopeptidase und eine Lon-Protease. Spezifische Antikörper gegen die peroxisomale Deg-Protease aus *Arabidopsis* (Deg15) identifizieren die Wassermelonen-GPP als Deg15. Damit gehört die GPP/Deg15 in eine Gruppe Trypsin-ähnlicher Serin-Peptidasen mit *E. coli* DegP als Prototyp. Sie besitzt gleichwohl spezifische Eigenschaften und gehört damit einer neuen Untergruppe innerhalb der Deg-Peptidasen an.

Abstract

Programmed cell death (PCD) is essential for the development of the plant. In one form of PCD the tissues or cells no longer required by the plant are degraded and the low molecular weight compounds transferred as nutrients to remaining living parts of the plant. *Ricinus* stores oil and protein in a living endosperm, which surrounds the cotyledons. The storage materials are mobilized during germination and supplied to the cotyledons. The PCD of the endosperm tissue is induced, as soon as this transfer is completed. A special organelle –the ricinosome– was discovered in the senescing endosperm of germinating *Ricinus* seeds. Ricinosomes are budded off the endoplasmatic reticulum (ER) at the beginning of the PCD and deliver in the final stage of cellular disintegration large quantities of a papain-like cysteine endopeptidase (CysEP) with a C-terminal KDEL motif.

Three homologous cystein peptidases with a KDEL-tail were identified in *Arabidopsis thaliana*. The highly specific localization of the three CysEPs in cell groups and tissues of *Arabidopsis* plants was identified by expression of the reporter glucuronidase (GUS) with their endogenous promoters *AtCEP1*, *AtCEP2* and *AtCEP3*. Each of these CysEPs marked a different pattern of PCD in generative and vegetative tissues.

Ricinosomes and their CysEP play also a crucial role for the disassembly and/or collapse of the nucellus tissue in maturing *Ricinus* seeds, in order to make room for the expanding endosperm cells during synthesis of storage proteins and oil. Ricinosomes with their marker enzymes CysEP are exclusively found in plant cells, with preference for tissues destined for collapse.

The native *Ricinus* CysEP was crystallized and its structure was solved at 2.0 Å resolution. The specificity subsites were clearly defined by covalent binding of the inhibitor H-D-Val-Leu-Lys-CMK in the active site. Investigations of cleavage specificity with β -casein as substrate resulted in a broad substrate specificity that even allowed prolin N- and C-terminal to the cleavage site. This is in accord with its putative function for disassembly of cytosolic and cell wall proteins in the final stages of PCD.

In the first days of germination the endosperm of *Ricinus* seeds contain glyoxysomes which are involved in fat mobilization. Some glyoxysomal matrix proteins are synthesized as high-molecular precursor in the cytoplasm and the N-terminal propeptide is cleaved off upon import into the glyoxysomes. The neighbourhood of the cleavage site typically con-

tains a cysteine. The glyoxysomal (or also peroxisomal) processing peptidase for removal of the N-terminal presequence in plants and mammals was so far unknown. It was purified from the fat-storing cotyledons of the watermelon (*Citrullus vulgaris*) by means of column-chromatography, preparative native isoelectric focusing and 2-D-polyacrylamide-gel electrophoresis. The GPP from *C. vulgaris* appears in two forms, as a 72 kDa monomer and as a 144 kDa dimer. The two forms are in equilibrium with one another and could be detected with gelatin-activity gels. The equilibrium is shifted upon Ca^{2+} -removal towards the monomer and upon Ca^{2+} -addition towards the dimer.

The monomer seems to be a generally degrading peptidase and shows a for eucaryotic proteases unusual temperature optimum at 45°C, a pH optimum in the basic range and is activated by denatured proteins. The dimer constitutes most likely the Glyoxysomal Processing Peptidase, since the substrate specificity proven for the monomer (Φ -Arg/Lys↓) is very different from the processing substrate specificity (Cys-Xxx↓/Xxx-Cys↓) found with the mixture of the mono- and dimeric forms. The Sequencing of the *Arabidopsis* Genoms resulted so far in the identification of three peptidases located in the peroxisomes, a Deg-protease, a pitrilysin-like metallopeptidase and a Lon-protease. Specific antibodies against the peroxisomal Deg-protease from *Arabidopsis* (Deg15) identifies the watermelon GPP as a Deg15. Thus the GPP/Deg15 belongs to a group of trypsin-like serine peptidases with *E. coli* DegP as prototype. Nevertheless the GPP/Deg15 possesses specific characteristics and is therefore to be assigned to a new sub-group within the Deg peptidases.

3. Einleitung

3.1 Protein-Umsatz

Die Lebensspanne der meisten zellulären Proteine ist, gemessen an der Lebensdauer des Organismus, sehr kurz (Estelle, 2001). Sie durchlaufen nach der Proteinsynthese einen Zyklus, der über Faltung, Prozessierung, Modifikation und Transport zum richtigen Kompartiment verläuft und früher oder später mit dem Abbau endet (Wickner *et al.*, 1999). Der aktuelle Bestand eines bestimmten Proteins ergibt sich aus dem Gleichgewicht von Biosynthese und Degradation und erfordert ein exakt reguliertes und ökonomisches System von Qualitätskontrolle, Reparatur, Abbau und Neusynthese. Alle Organismen haben Wege gefunden haben, dieses Gleichgewicht in effektiver Weise zu erhalten. In jüngster Zeit ist klar geworden, daß die Proteolyse genauso präzise reguliert wird, wie die Proteinsynthese (Hunt, 1997).

3.1.1 Chaperon-abhängige Proteinfaltung und Qualitätskontrolle

Polypeptide, die aus der ribosomalen Proteinsynthese hervorgehen, müssen sich, um Funktionalität zu erreichen, in eine stabile Tertiärstruktur falten und diese über einen bestimmten Zeitraum erhalten (eine Gegenüberstellung der Verhältnisse bei Pro- und Eukaryonten findet man bei Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Die korrekte Faltung von Proteinen und die Assemblierung zu Multiproteinkomplexen (Quartärstruktur) erfordert die Mitwirkung von molekularen Chaperonen und Faltungsfaktoren; 10-20% der de-novo synthetisierten Proteine findet man mit Chaperonen assoziiert (Teter *et al.*, 1999). Der Transport der cytosolisch synthetisierten Vorläufer der Chloroplasten- und Mitochondrien-Proteine in die Organellen ist sowohl von cytosolischen, als auch von Organellen-lokalisierten Chaperonen abhängig: 97% der mitochondrialen Präsequenzen und 82,5% der Chloroplasten-Transitpeptide besitzen Hsp70-Bindungsstellen (Zhang und Glaser, 2002). Beschädigte oder aufgrund von Mutationen und Transkriptions- oder Translationsfehlern fehlgefaltete Proteine neigen zum Aggregieren; um dies zu verhindern, werden Proteine entweder durch Chaperone wiederhergestellt oder durch energieabhängige cytosolische Proteasen zerstört (Wickner *et al.*, 1999). Etwa 20% der neu synthetisierten Proteine werden als fehlerhaft

eingestuft und gleich wieder degradiert (Yen *et al.*, 1980). Eine gewisse Überlappung besteht darin, daß bestimmte Proteasen über ihre ATPase-Domänen Chaperonfunktion ausüben können (Gottesman *et al.*, 1997).

Die bei eukaryontischen Chaperonen übliche Hsp-Nomenklatur bezieht sich auf das Molekulargewicht, wogegen sich für prokaryotische Chaperone spezielle Bezeichnungen etabliert haben:

- Die Hsp20-Chaperone oder sHsps sind kleine, wenig konservierte globuläre Moleküle, die sich zu großen dynamischen Komplexen von 300-800 kDa Masse zusammenschließen. Bei Hitzeeinwirkung wird die Aggregation entfalteter Proteine durch Bindung an der Oberfläche unterbunden, die Polypeptidketten werden in einem faltungskompetenten Zustand gehalten und nach Wiederherstellung der physiologischen Bedingungen zur ATP-abhängigen Rückfaltung an Hsp70 weitergegeben (Lee *et al.*, 1997; Haslbeck *et al.*, 2005).
- Die eukaryontischen Hsp60-Chaperonine oder TriC (GroEL bei Prokaryonten) bilden faßförmige Proteinkomplexe aus zwei achtzähligen Ringen von Untereinheiten. In den Reaktionskammern laufen die Faltungsprozesse ab; dabei erkennen die Chaperonine hydrophobe Bereiche an nicht-nativen globulären Konformationen und falten das Substrat unter ATP-Verbrauch (Hartl und Hayer-Hartl, 2002).
- Hsp70 (DnaK bei Prokaryonten) gehören zu den mengenmäßig mit am stärksten vertretenen Chaperonen der Eukaryontenzelle und erfüllen eine ganze Reihe Funktionen im Rahmen der Faltung neuentstehender Polypeptidketten. Hsp70 ist dabei in Komplexen mit Hsp90 und dem Co-Chaperon Hop anzutreffen. Hsp70 bevorzugt dabei hydrophobe Regionen von gestreckten Polypeptidketten, wie sie beispielsweise bei der Membranpassage auftreten. Unter ATP-Verbrauch und unter Mitwirkung des Co-Chaperons Hsp40 wird die Polypeptidkette wieder freigesetzt und den darauffolgenden Schritten der Biogenese zugeführt (Wegele *et al.*, 2003).
- Hsp90 ist ein großes Homodimer mit N-terminaler ATPase-Domäne, das große Komplexe mit Hsp70 und weiteren Co-Chaperonen bildet. Die Funktion ist vor allem auf regulatorische Proteine wie z.B. Kinasen und Hormonrezeptoren spezialisiert. Die Substratmoleküle werden bis zum Zusammentreffen mit dem Liganden (z.B. einem Steroidhormon) gebunden und erst dann in nativer Konformation freigegeben (Jackson *et al.*, 2004).

- Die Chaperone der Hsp100- oder Clp-Familie bestehen aus einem oder zwei sechs- bis siebenzähligen Ringen von Untereinheiten mit einer zentralen Kammer und sind damit den Chaperoninen der Hsp60- oder GroEL-Familie strukturell verwandt. *E. coli* ClpB ist ausschließlich Chaperon (Weibezahn *et al.*, 2004), wohingegen ClpA und ClpX aus *E. coli* sowohl als Chaperone und auch als Komponenten von ATP-abhängigen Proteasen mit AAA⁺-Modul agieren können (Zeth *et al.*, 2002). Sie sind in der Lage sowohl multimere als auch aggregierte Proteine zu zerlegen, zu entfalten und zur Degradation weiterzuleiten.

Chaperone werden auch als Hitzeschockproteine bezeichnet, da sie verstärkt nach Hitzeeinwirkung exprimiert werden. Durch Hitzeschock, aber auch durch vielfältige andere Stressfaktoren, wie z.B. reaktive Sauerstoffspezies, werden Proteine geschädigt. Die daraus resultierenden nicht-nativen Proteinkonformationen werden von den Chaperonen erkannt und, soweit reparabel, in charakteristischer Art und Weise rückgefaltet (Hengge und Bukau, 2003). Allen Chaperonen ist gemeinsam, daß sie exponierte hydrophobe Bereiche eines Proteins erkennen, die bei korrekter Faltung normalerweise im Inneren der Tertiärstruktur verborgen sind. Bei ungefalteten Polypeptidketten treten diese mit einer durchschnittlichen Wahrscheinlichkeit von 1/36 auf (Rüdiger *et al.*, 1997). In Zyklen von ATP-Bindung und -Hydrolyse werden Proteine gebunden und wieder freigesetzt. Die Transformation der bei der ATP-Hydrolyse freiwerdenden Energie in Konformationsänderungen und die gezielte Weiterleitung an assoziierte Domänen erfolgt durch ATPasen, deren Aktivität für die Erkennung des Substrates, dessen Dissoziation, Entfaltung, und Translokation innerhalb des Protease-Komplexes und für den kontrollierten Zugang wichtig ist (Sauer *et al.*, 2004). Die ATPase-Domänen oligomerisieren bevorzugt zu hexameren Ringen mit gleicher Ausrichtung der Subdomänen (Lenzen *et al.*, 1998). Wegen der kooperativen Natur der ATP-Bindung und -Hydrolyse sind diese Proteasen nur im hexameren Zustand aktiv (Maurizi und Li, 2001).

3.1.2 Proteinabbau

Proteinabbau vollzieht sich in allen Zelltypen und wahrscheinlich in allen Kompartimenten, wobei sich die Abbauraten für verschiedene Proteine gewaltig unterscheiden. Kurze biologische Halbwertszeiten findet man bei regulatorischen Proteinen, lange bei Strukturproteinen, aber selbst diese sind einem ständigen Umbau unterworfen. Das Maß an Proteinabbau hängt entscheidend vom Ernährungsstatus und Alter der Zelle ab.

Der klassische Abbauweg in Cytosol, Kern und Organellen eukaryontischer Zellen und im Cytoplasma von Bakterien verläuft zum großen Teil über komplexe, multimere ATP-abhängige Proteasen (Gottesman *et al.*, 1997). Dabei sind die unterschiedlichen Aktivitäten entweder in distinkten Domänen auf einer Polypeptidkette angeordnet, die dann i.d.R. zu Hexa- oder Heptameren assemblieren (z.B. Lon-Protease) oder es liegen Komplexe von funktionell unterschiedlichen Untereinheiten (z.B. das eukaryontische 26S Proteasom) vor. In *E. coli* sind die fünf verschiedenen ATP-abhängigen Proteasetypen Lon (Botos *et al.*, 2001 a,b), FtsH (Karata *et al.*, 1999), ClpAP (Dougan *et al.*, 2002), ClpXP (Levchenko *et al.*, 1997) und HslUV (Azim *et al.*, 2005) beschrieben worden, homologe Proteasen wurden in anderen Eubakterien und Eukaryonten gefunden, bei Pflanzen in Mitochondrien und Chloroplasten (Adam *et al.*, 2001).

Die heterooligomeren ATP-abhängigen bakteriellen Proteasen (ClpAP, ClpXP und HslUV) und auch das eukaryontische 26S Proteasom (Groll *et al.*, 1997) besitzen, obwohl die Monomere keinerlei Ähnlichkeiten bezüglich Sequenz und Faltung aufweisen, das übereinstimmende allgemeine Bauprinzip der Selbstkompartimentierung, d.h. die Ausbildung eines gegen die Umgebung abgeschirmten Reaktionsraums (Lupas *et al.*, 1997). Die proteolytischen Untereinheiten sind zu faßartigen Sechser- oder Siebenerringen mit einer zentralen Höhle zusammengefügt. Im Zentralraum sind die proteolytischen Reaktionszentren lokalisiert und die ATPase-Domänen befinden sich ebenfalls in ringförmiger Anordnung an beiden Enden und regulieren den Zugang (Groll *et al.*, 2005).

Die komplexe Gesamtsituation der zellulären Proteolyse wird durch die Tatsache dokumentiert, daß im *Arabidopsis*-Genom über 550 Sequenzen identifiziert wurden, die Proteasen der fünf bekannten Katalyse-Typen (Cystein-, Serin-, Aspartat-, Metallo- und Threoninpeptidasen) zugeordnet werden können (Barrett *et al.*, 2001b; MEROPS *Peptidase Database*; <http://merops.sanger.ac.uk/>).

Ohne den Abbau unbrauchbar gewordener Eiweiße durch zelluläre Proteasen käme es zur Akkumulation schadhafter Proteine und zur Bildung von für die Zelle und den Organismus toxischen Aggregaten. Beispiele für mit Proteinaggregaten assoziierte Krankheitsbilder beim Menschen sind Creutzfeldt-Jakob, Parkinson, Alzheimer und Typ II-Diabetes (Dobson, 1999).

3.1.3 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Im Cytoplasma aller Eukaryonten wird der Protein-Umsatz über das ATP-abhängige Ubiquitin-26S-Proteasom-System reguliert. Die Bedeutung wird schon allein dadurch dokumentiert, daß mehr als 1300 Gene oder 5% des Proteoms bei *Arabidopsis* am Aufbau des Ubiquitin-Proteasom-Systems beteiligt sind (Viestra, 2003). Unter Stressbedingungen werden Proteine auch in Lysosomen und Vakuolen abgebaut, jedoch ist der lysosomale Abbau, bei dem Portionen des Cytoplasmas durch autophagische Prozesse verdaut werden, eher unspezifisch (Lee und Goldberg, 1998).

Ein selektiver Umsatz kurzlebiger Proteine ist energieaufwändig (Gronostajski *et al.*, 1985), denn degradierte Proteine müssen resynthetisiert werden. Andererseits ermöglicht dies der Zelle schnell auf neue Stoffwechselsituationen zu reagieren und komplexe Abläufe zu steuern, die eine exakte Koordination erfordern, wie beispielsweise bei der Embryogenese, dem Zellzyklus, der Photomorphogenese, circadianen Abläufen, Signaltransduktionsvorgängen und Seneszenz. Obgleich im Cytosol und Nucleoplasma lokalisiert, ist das Proteasom auch für den ER-assoziierten Proteinabbau zuständig (Hiller *et al.*, 1996; Wiertz *et al.*, 1996).

Für den Abbau durch das Proteasom vorgesehene Proteine werden über eine ATP-abhängige mehrstufige Kaskade mit Ubiquitin (Ub), einem hochkonservierten 76 Aminosäuren-Protein, konjugiert (Ingvarsdén und Veierskov, 2001). Das Ub-aktivierende Enzym E1 bindet Ub, das im weiteren Verlauf von Ub-konjugierenden Enzymen des Typs E2 unter Mitwirkung der Ub-Protein-Ligasen vom Typ E3 über das C-terminale Glycin unter Bildung einer Isopeptidbindung mit dem Lysin des zu markierenden Proteins verknüpft wird. Pflanzen haben große Gen-Familien für die E2- und E3-Enzyme, wahrscheinlich, um ein breites Spektrum an Substraten abzudecken (Vierstra, 2003). Die metabolische Stabilität oder *in-vivo*-Halbwertszeit von Proteinen wird über das N-Degron, bestehend aus N-

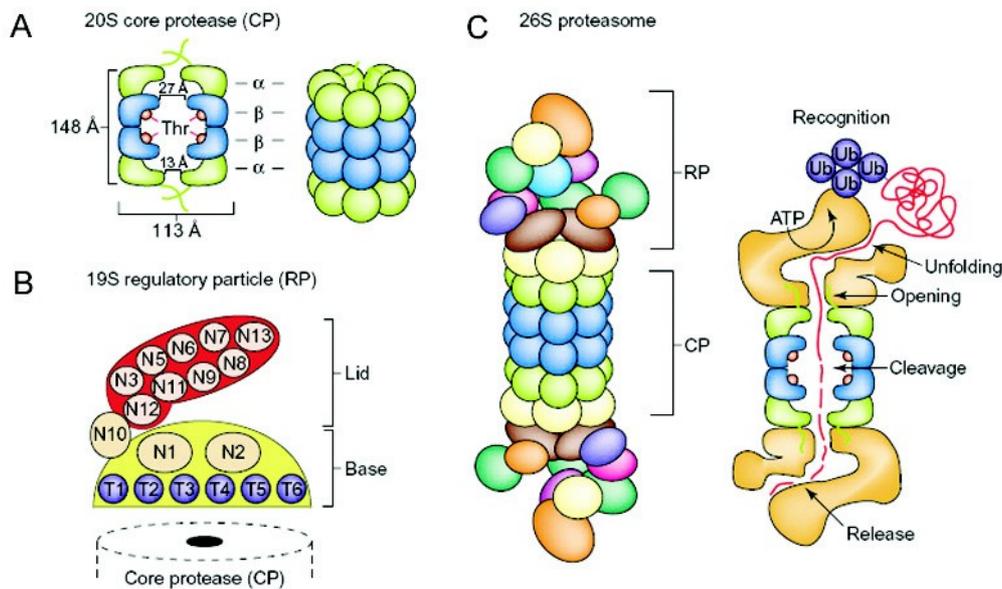


Abbildung 3.1: Aufbau und Struktur des 26S Proteasoms.

A: Die 20S Core Protease (CP) besteht aus einem faßförmigen Stapel vier siebenzähliger Ringe von Untereinheiten. Jeder β -Ring trägt drei aktive Zentren mit N-terminalem Threonin (Thr). **B:** Das Regulatorische Partikel (RP) mit den beiden Subpartikeln Deckel (Lid) und Basis (Base). Die Abmessungen der CP stammen von der Kristallstruktur des Hefe-Komplexes (Groll *et al.*, 1997). N-terminale Threonin-Reste der Untereinheiten β 1, β 2 und β 5 der CP bilden die aktiven Zentren. **C:** Die vorgeschlagene Struktur des 26S Proteasoms (links) und die Abfolge von Vorgängen, die zum Abbau eines ubiquitinierten Proteins durch das 26S-Holoenzym führen (rechts). N, nicht-ATPase-Untereinheit des RP; T, AAA-ATPase-Untereinheit des RP; Ub, Ubiquitin. [Abbildung aus Viestra (2003); © 2003 Elsevier Science Ltd..]

Terminus und einem oder mehreren internen Lysin-Resten, bestimmt (Varshavsky, 1996). Ausgehend von einem Lysin-Rest wird eine Multi-Ub-Kette gebildet. Im Gegensatz zur gut untersuchten „*N-end rule*“ bei Bakterien (Bachmair *et al.*, 1986) und *Saccharomyces* (Turner *et al.*, 2000) sind die entsprechenden Abläufe bei Pflanzen kaum bekannt. Bei Pflanzen, wie auch anderen Organismen, bilden große Aminosäurereste am N-Terminus (Tyr, Arg, Lys, Phe) das Degradationssignal (Worley *et al.*, 1998; Stary *et al.*, 2003). Durch Multi-Ub markierte Proteine werden von der regulatorischen 19S Domäne (RP) des Proteasoms erkannt und unter ATP-Verbrauch entfaltet (siehe Abbildung 3.1B und C); gleichzeitig werden die wiederverwendbaren Ubiquitin-Reste abgespalten (Glickmann *et al.*, 1998). Zum Abbau tritt das Substrat in das Innere des 20S *core particles* (CP) des Proteasoms ein (Groll *et al.*, 2000). Der CP besteht aus einem Stapel vier siebenzähliger Ringe von Untereinheiten, zwei äußeren α -Ringen und zwei inneren β -Ringen (siehe Abbildung 3.1A). Bei beiden β -Ringen besitzen je drei von sieben β -Untereinheiten ein N-terminales Threonin, das als aktives Zentrum der Threonin-Protease fungiert (Groll *et al.*,

1997), jedoch haben die drei Protease-Domänen eines β -Rings unterschiedliche Spaltspezifitäten (Dick *et al.*, 1998). Im Cytosol müssen die Degradationsprodukte des Proteasoms, Peptide mit 3-25 Resten und einer Peaklänge von 7-8 Resten (Nussbaum *et al.*, 1998), weiter prozessiert werden.

3.1.4 Cytosolische Proteolyse von Oligopeptiden

Bei höheren Organismen verläuft der den Proteasomen nachfolgende cytosolische Abbau der Oligopeptide zu den freien Aminosäuren über mehrere Stufen. Die Vorgänge wurden vor allem bei Säugern erforscht. Bezüglich der entsprechenden pflanzlichen Proteasen ist das Wissen lückenhaft, wenngleich entsprechende Sequenzen für einige Oligopeptidasen und Exopeptidasen im *Arabidopsis*-Genom gefunden wurden (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; Barrett *et al.*, 2001b).

Bei der Tripeptidyl-Peptidase II (TPP II) handelt es sich um ein walzenförmiges Oligomer von 138 kDa-Untereinheiten und einer Größe von 50 nm x 17 nm (Geier *et al.*, 1999). Die gut erforschte Peptidase aus Säugern spaltet von den Oligopeptiden N-terminal Tripeptide ab, zeigt dabei eine Präferenz für hydrophobe Reste an P1 und kann nicht vor oder nach Prolin spalten (Balów *et al.*, 1986; Tomkinson, 1999). Das aktive Zentrum der TPP II entspricht dem der Serin-Proteasen vom Subtilisin-Typ (Tomkinson, 2004), enthält jedoch zusätzlich einen für die Aktivität essentiellen Cystein-Rest (Balów *et al.*, 1986). Im Genom von *Arabidopsis thaliana* wurde die Sequenz eines zur bekannten TPP II aus Ratte homologen Proteins gefunden (Protein-ID: CAB45880; *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

Ein weiteres Enzym, die Prolyl-Oligopeptidase, eine Serin-Peptidase aus dem Clan SC und der Familie S9, ist weit verbreitet und wurde in Bakterien, Pflanzen und Säugern nachgewiesen (Polgar, 1994). Die Prolyl-Oligopeptidase aus Schweineherz ist eine monomere 80 kDa-Serinpeptidase von becherartiger Form, deren aktives Zentrum mit der katalytischen Triade Ser-His-Asp zum Innenraum exponiert ist und deren röhrenförmige Domäne, der sogenannte „ β -Propeller“, nur Oligopeptiden den Zutritt erlaubt (Fülöp *et al.*, 1998). Die Peptidase spaltet 3-6 Reste vom N-Terminus ab und akzeptiert Prolin an P1 (Ito *et al.*, 2004). Eine entsprechende Sequenz wurde auch bei *Arabidopsis* gefunden (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

Ebenfalls eine Serin-Peptidase ist die Oligopeptidase B (OpdB) aus dem Clan SC und der Familie S9, die aus verschiedenen Pflanzengeweben isoliert wurde (Morty und Burleigh, 2004). Die Peptidase spaltet kleine Peptide und bevorzugt basische Reste an P1 und P2 (Morty *et al.*, 1999). Eine Sequenz für die OpdB wurde auch im Genom von *Arabidopsis* gefunden (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

Weitere Peptidasen, für die ebenfalls Sequenzen im Genom von *Arabidopsis* gefunden wurden und die für den Abbau von Oligopeptiden in Betracht kommen, sind Oligopeptidase A (Miller, 2004) und Aminopeptidase PS (Dando und Barrett, 2004).

3.1.5 Lysosomale Proteolyse

Die Rolle der Lysosomen bzw. Vakuolen für den Abbau cytosolischer Proteine wird unter Normalbedingungen als marginal erachtet, da Inhibitoren der lysosomalen Proteolyse nur 10-20% des Totalabbaus blockieren (Gronostajski *et al.*, 1985). Allerdings sind sie für den Abbau Membran-assoziiierter Proteine und insbesondere für den unspezifischen und raschen Abbau unter Mangel-, Stress- und Seneszenzbedingungen und im Rahmen des PCD bedeutsam. Vakuolen als lytisches Kompartiment werden als Äquivalent der tierischen Lysosomen betrachtet. Mitunter werden bei Pflanzen auch transiente lytische Vesikel als Lysosomen bezeichnet. Im Zusammenhang mit der lysosomalen Proteolyse werden dreierlei Mechanismen unterschieden: (1) die Vesikulation, bei der cytosolische Proteine unter Mitwirkung von Hsp70 in die Vakuolen transferiert werden (Cuervo und Dice, 1998), (2) die Mikroautophagie, bei der ganze Organellen vom Tonoplasten phagozytiert werden (Dunn, 1994) und (3) die Makroautophagie bei der große Cytoplasmaportionen durch aus dem ER hervorgehende tubuläre Provakuolen eingeschlossen und als Autophagosomen zur Vakuole transportiert werden. Im Zusammenhang mit dem Vakuolen-Targeting bei autophagischen Vorgängen wurden bei *Arabidopsis* zur Ubiquitinierung analoge Konjugationsmechanismen gefunden (Doelling, 2002). In den Vakuolen werden die Vesikel samt ihrer Proteinfracht von sauren Proteasen abgebaut (Dunn, 1994), für den Abbau zu den freien Aminosäuren sind Exopeptidasen notwendig. Bei *Arabidopsis* wurden von Beers *et al.* (2004) zwei Proteine identifiziert (Protein IDs: AAK63991 und AAK44008), die bezüglich ihrer Genstruktur innerhalb der pflanzlichen C1A-Proteasen isoliert dastehen und zu Cathepsin B aus Säugern homolog sind.

Der lysosomale Abbau von Proteinen erfolgt bei Säugern mehrstufig und stärker reguliert als bei Pflanzen. Bei Säugern wird der initiale Abbau durch die papainartigen Cysteinpeptidasen Cathepsin D und L aus der Familie C1A vollzogen (Barrett *et al.*, 2004). Im nächsten Schritt spaltet die Tripeptidyl-Peptidase I (TPP I), ein 46 kDa-Glycoprotein, das von der cytosolischen Tripeptidyl-Peptidase II (TPP II) strukturell völlig verschieden ist, vom N-Terminus der Oligopeptide mit breiter Substratspezifität Tripeptide ab (Vines und Warburton, 1999). Bei TPP I handelt es sich um eine Carboxy-Peptidase, die insofern ungewöhnlich ist, da sie von keinem der klassischen Inhibitoren der fünf Protease-Typen inhibiert wird, jedoch von CMK-Analoga der Tripeptidylsubstrate, allerdings nicht mit der für Serin- oder Cysteinproteasen typischen Kinetik (Vines und Warburton, 1998). Bei Säugern spaltet die Dipeptidyl-Peptidase II (DPP II) vom N-Terminus Dipeptide ab und zwar bevorzugt von Tripeptiden der Sequenz Gly-Pro-X, dem Grundmotiv des Strukturproteins Kollagen (Maes *et al.*, 2005). Im letzten Abbauschritt werden Dipeptide durch Exopeptidasen zu den freien Aminosäuren zerlegt (Tomkinson, 1999). Bei Pflanzen liegen bislang keine Indizien für die Existenz von zu TPP I und DPP II homologen Proteasen vor, nichtsdestotrotz muß man davon ausgehen, daß eine vollständige und effiziente Proteolyse auch hier erfolgt.

3.2 Ricinosomen

Ricinosomen und Glyoxysomen wurden nebeneinander erstmals im fettspeichernden Endosperm von *Ricinus* beschrieben (Mollenhauer und Totten, 1970; Vigil, 1970). Wenn die Protein- und Fettmobilisierung abgeschlossen ist, wandelt sich das lebende *Ricinus*-Endosperm in ein seneszierendes Gewebe um, produziert dabei zahllose Ricinosomen und stirbt letztlich ab (Schmid *et al.*, 1999; Schmid *et al.*, 2001). Vigil (1970) erkannte bereits, daß sich Glyoxysomen und Ricinosomen am Saccharose-Dichtegradienten in der selben Dichtefraktion anreichern. Allerdings blieben die Ricinosomen über 25 Jahre unbeachtet, da seinerzeit kein Marker-Enzym bekannt war (Mollenhauer und Totten, 1970). Viele den Glyoxysomen zugeschriebenen Enzymaktivitäten muß man der Kontamination durch Ricinosomen zuschreiben, u.a. die „Processing-Aktivität“ in *Ricinus*-Glyoxysomen (Gietl und Hock, 1986).

Gietl und Mitarbeiter versuchten die Glyoxysomale Processing Peptidase aus dem Endosperm keimender *Ricinus*-Samen zu reinigen und entdeckten eine Papain-artige Cystein-Peptidase mit C-terminalem KDEL-Motiv (Gietl *et al.*, 1997), dem ER-Rückhaltesignal, welches sich als Markerenzym für Ricinosomen in *Ricinus communis* herausstellte (Schmid *et al.*, 1998). Die *Ricinus* CysEP wird im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) als enzymatisch kaum aktives 45 kDa-Pro-Enzym mit N-terminalem und C-terminalem Propeptid synthetisiert und durch das C-terminale KDEL-Peptid zurückgehalten. Es wurde gezeigt, daß bei beginnendem PCD (*programmed cell death*, Programmierter Zelltod), erkennbar an der Fragmentierung der Kern-DNA, eine Vielzahl von "Dilated cisternae" mit etwa 500 nm Durchmesser, die Ricinosomen, vom ER abgegliedert werden (Schmid *et al.*, 1999). Da die Aktivierung und Abspaltung der Propeptide *in-vitro* nach Ansäuerung erfolgt, wird angenommen, daß die Aktivierung *in-vivo* unter Beteiligung der sauren Vakuolen erfolgt (Schmid *et al.*, 2001).

Die Cystein-Peptidase mit KDEL-Signal gehört einer eigenständigen Untergruppe von hochhomologen Papain-artigen Peptidasen an. Man findet sie in Geweben, die den programmierten Zelltod (PCD) durchlaufen. Beispiele sind die hypogäischen Kotyledonen von *Vicia sativa* (Becker *et al.*, 1997), die reifenden Schoten von *Phaseolus vulgaris* (Tanaka *et al.*, 1991), die Samenanlagen von *Pisum sativum* (Cercos *et al.*, 1999), die verblühenden Blütenblätter von *Hemerocallis* (Valpuesta *et al.*, 1995) und *Sandersonia aurantiaca* (O'Donoghue *et al.*, 2005), der den Keimling von *Picea glauca* umgebende Megagametophyt (He und Kermode, 2003), sowie die epigäischen Kotyledonen von *Vigna mungo* (Toyooka *et al.*, 2000). Es gibt drei KDEL-Peptidasen in *Arabidopsis* (Gietl *et al.*, 2000), die zusammen mit der *Ricinus* CysEP in dieser Arbeit von Interesse sind.

3.3 Programmierter Zelltod

Der Zelltod ist ein hochregulierter, genetisch festgelegter Prozeß, der essentiell für alle vielzelligen Eukaryonten ist. Ganz allgemein lassen sich die Abläufe, die zum PCD führen, in drei Phasen unterteilen: (1) Der Eingang der induzierenden Signale, (2) deren Verarbeitung im Rahmen der Signaltransduktion und (3) die Tätigkeit der ausführenden Organe (Roberts *et al.*, 1999). Das Ziel der Zelltod-Enzyme bilden zwei distinkte Gruppen von Proteinen, jene die für die Organisation und Aufrechterhaltung der Zellstruktur zuständig sind und solche, die die Homöostase gewährleisten (Thornberry *et al.*, 1997). Dabei sind spezifische Proteasen wichtiger Bestandteil eines Systems, das schnell und irreversibel funktioniert. Die hieraus resultierende potentielle Lethalität aktiver Proteasen macht allerdings eine strenge Regulation der Zelltod-Vorgänge auf den Ebenen von Transkription, Translation, Kompartimentierung, Prozessierung und Inhibierung notwendig (Lam und del Pozo, 2000a).

In Tieren wurden die Vorgänge bei der Apoptose aufgeklärt und die beteiligten Faktoren charakterisiert. Neben einer Vielzahl von Regulatoren spielen die Caspasen, eine Familie von Cystein-Peptidasen mit einer Spezifität für Aspartat-Reste an P1, eine zentrale Rolle bei der apoptotischen Signaltransduktion und Ausführung (Salvesen und Boattin, 2004). Die Apoptose ist charakterisiert durch eine Reihe von morphologischen und biochemischen Kennzeichen, wie Kernfragmentation und Fragmentation des Cytoplasmas in apoptotische Körper, das Auftreten von Kern-DNA-Fragmenten, was eine Detektion durch TUNEL-Assay (*terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*) ermöglicht (Gavrieli *et al.*, 1992) und die abschließende Phagozytose durch Nachbarzellen (Übersichtsartikel von Cuervo, 2004).

Der PCD bei Pflanzen unterscheidet sich morphologisch insoweit, daß apoptotische Körper und Phagozytose nicht auftreten und von toten Pflanzenzellen i.d.R. die Zellwand zurückbleibt (Lam *et al.*, 1999). Pflanzlicher Zelltod spielt sich in einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen mit bestimmten Aufgaben ab. Das *Ricinus*-Endosperm während der Keimung ist ein Beispiel für die Eliminierung eines Organs mit temporärer Funktion durch PCD (Schmid *et al.*, 1999). Bei Pflanzen bezeichnet man den PCD von ganzen Organen wie Blüten, Blättern und Früchten auch als Seneszenz (Hadfield und Bennett, 1997). Von besonderer Bedeutung für die Gefäßpflanzen und ihren Wasserhaushalt sind

die, durch programmierten Zelltod (PCD) entstehenden Tracheen-Elemente (TE) des Xylems (Ito und Fukuda, 2002). Während tote Zellen nach Auflösung des Zellinhalts meist kollabieren und Zellwandreste zurückbleiben (Schmid *et al.*, 2001), bleiben die TE aufgrund ihrer druckstabilen Bauweise erhalten. Der PCD bei Pflanzen wird im Rahmen der Entwicklung, unter Stressbedingungen, im Verlaufe der Seneszenz und als Antwort auf Pathogeninfektion beobachtet (Lam *et al.*, 1999). Seneszenz-Vorgänge stehen in Verbindung mit dem Ubiquitin-Proteasom-System (Yoshida *et al.*, 2002).

Bei Pathogenbefall werden zwei Typen von Zelltod-Antworten der Pflanze unterschieden: (1) Resistenz mit schneller *hypersensitive response* (HR) am primären Infektionsherd (Heath, 2000) und (2) Erkrankung mit langsam verlaufenden Zelltodvorgängen als Folge von lokaler und systemischer Infektion (Shirasu und Schulze-Lefert, 2000). Bislang gibt es keinerlei Hinweis für ein im Cytosol oder im Kern lokalisiertes proteolytisches System, das der Caspase-Kaskade bei der Apoptose in Tieren entspräche (Lam und del Pozo, 2000a).

Im Gegensatz zu den gut untersuchten tierischen Modellsystemen (z.B. der Nematode *Caenorhabditis elegans*) gibt es z. Zt. zwar zahlreiche Beispiele für an den Zelltodvorgängen in Pflanzen beteiligte Proteasen wie z.B. die *Ricinus* CysEP (Schmid *et al.*, 1999), jedoch kennt man in keinen Fall die exakte Funktion. Das liegt zum Teil am hohen Protease-Hintergrund mit daraus resultierender undefinierbarer Fremdaktivität, aber auch am Fehlen spezifischer Inhibitoren (Beers *et al.*, 2000).

3.4 Peroxisomen und Glyoxysomen

Peroxisomen sind in allen eukaryotischen Zellen vorkommende und von einer einfachen Membran umgebene Organellen (DeDuve und Baudhuin, 1966). Sie wurden bereits in den 1950ern als *microbodies* elektronenmikroskopisch in Rattenleberzellen beschrieben (Novikoff *et al.*, 1956). Eine wichtige Eigenschaft der Peroxisomen ist die metabolische Plastizität, denn die verschiedenen Funktionen hängen sowohl von Spezies und Zelltyp, als auch von den Umweltbedingungen und vom jeweiligen Entwicklungsstadium ab. Ein anschauliches Beispiel ist die lichtinduzierte Umwandlung der Glyoxysomen in Blatt-Peroxisomen in den ergrünenden Kotyledonen keimender Ölsamen (Titus und Becker, 1985; Sautter, 1986). Dem gegenüber verändert sich während der Seneszenz der Metabolismus dergestalt, daß sich Blatt-Peroxisomen in Glyoxysomen verwandeln (Vicentini und Matile, 1993). Dieser Vorgang wurde auch nach Cadmium-Belastung beschrieben, kann also durch abiotischen Streß induziert werden (del Rio, 2000).

Viele Stoffwechselwege in den Peroxisomen führen zur Bildung von Wasserstoffperoxid. Der Abbau dieser toxischen Verbindung durch das Leitenzym Katalase ist der für die Peroxisomen charakteristische Prozeß (Baudhuin *et al.*, 1965; De Duve und Baudhuin, 1966). Darüberhinaus sind Peroxisomen beteiligt an der α - und β -Oxidation der Fettsäuren, an der Synthese von Etherlipiden wie den Plasmalogenen, sowie an der Oxidation von Harnsäuren und Cholesterol. Störungen der Peroxisomen-Biogenese sind die Ursache für schwere Erkrankungen (Woodward und Bartel, 2005).

3.4.1 Glyoxysomale Fettmobilisierung

Ricinus-Endosperm ist im Gegensatz zum Endosperm der *Gramineae* ein lebendes Gewebe, das neben Protein vor allem Fett speichert. Während der Keimung werden unter Beteiligung von Glyoxysomen, das sind auf den Fettabbau spezialisierte Peroxisomen, die Speicherfette mobilisiert und im Zuge der Gluconeogenese in den Transportmetaboliten Saccharose verwandelt (Breidenbach *et al.*, 1968; Beevers, 1979).

Reservefette werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) als Triglyceride (TAG) synthetisiert und durch einen Abknospungsprozeß mit einer Phospholipidmembran mit eingebetteten Oleosinen ummantelt und als Ölkörper (*oil bodies*) von etwa 1 μm Durchmes-

ser gespeichert (Übersichtsartikel von Huang, 1996). Die Fette werden bei der Mobilisierung zunächst durch *de-novo* synthetisierte Lipasen der Membran in Glycerol und Fettsäuren gespalten. Letztere werden dann in den Glyoxysomen in einer als β -Oxidation bezeichneten Reaktionsfolge stufenweise abgebaut. Dabei erfolgt zuerst die carboxyterminale Aktivierung über die Veresterung mit Coenzym A; der Fettsäure-CoA-Ester wird durch Acyl-CoA-Oxidase unter Mitwirkung von FAD-Coenzym reduziert, dann hydratisiert, in Gegenwart von NAD^+ in β -Stellung oxidiert und schließlich wird durch Thiolase der aktivierte C_2 -Körper Acetyl-CoA abgespalten (Cooper und Beevers, 1969a; Graham und Eastmond, 2002).

Während bei der mitochondrialen β -Oxidation in Säugern Acetyl-CoA in den Citratzyklus einfließt und der Energiegewinnung über die Atmungskette dient, mündet Acetyl-CoA aus der glyoxysomalen β -Oxidation vor allem in die Gluconeogenese. Im Glyoxylatzyklus mit den Enzymen Malatsynthase, Malatdehydrogenase, Citratsynthase, Aconitase und Isocitrat-Lyase wird aus zwei Acetyl-CoA der C_4 -Körper Succinat generiert (Kornberg und Krebs, 1957; Cooper und Beevers, 1969b). Die Enzyme der β -Oxidation sowie ein Teil der Enzyme des Glyoxylatzyklus sind an die Glyoxysomen-Membran gebunden (Bieglmayer *et al.*, 1974). Succinat wird in den Mitochondrien zu Malat, dieses im Cytoplasma zu Saccharose metabolisiert, die im weiteren für Keimung und Wachstum benötigt wird (Beevers, 1979). Die beschriebenen Vorgänge sind in Abbildung 3.2 zusammengefaßt (Gietl, 1992).

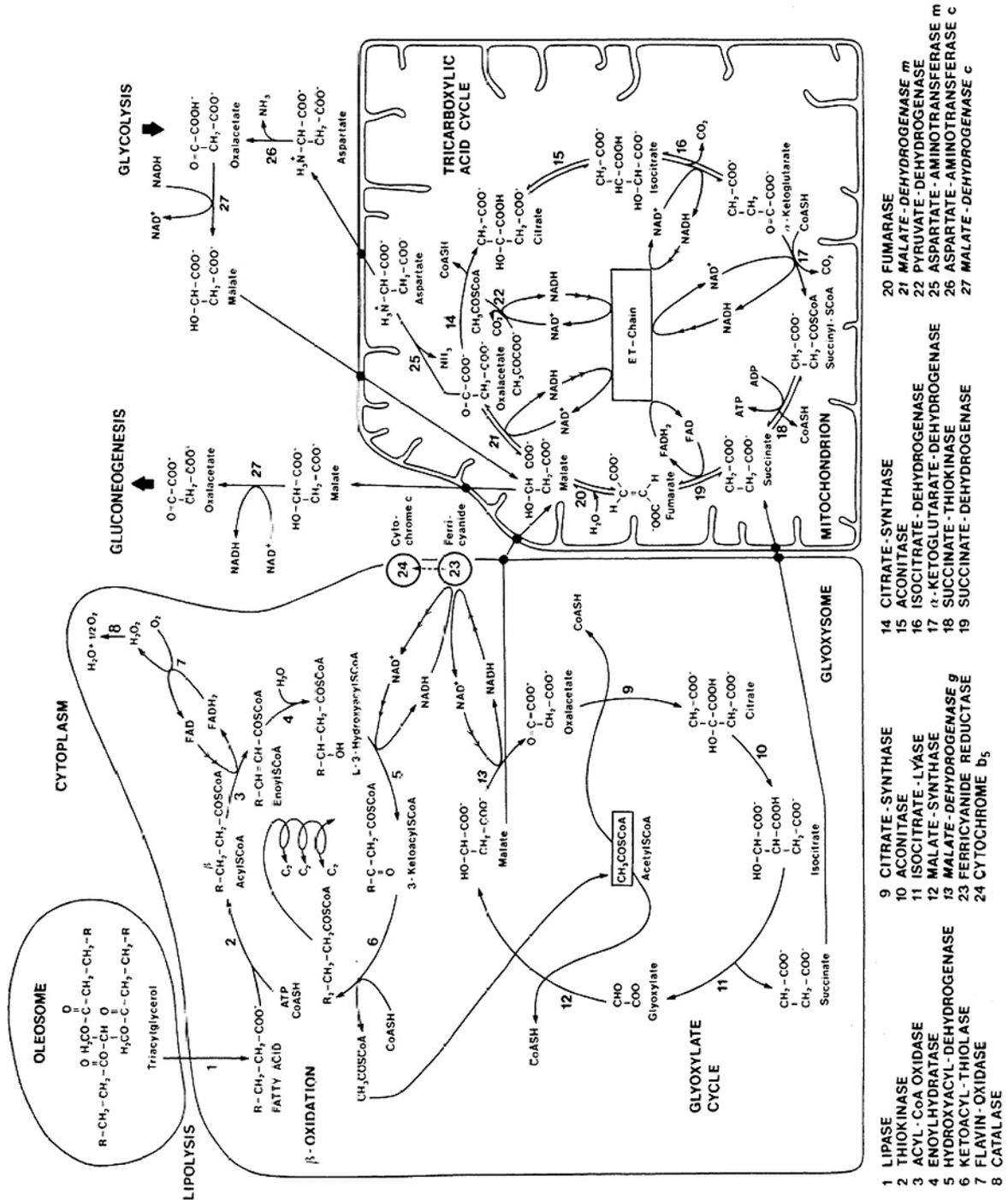


Abbildung 3.2: Reaktionen und der Transport von Zwischenprodukten bei der Umwandlung von Fettsäuren in Saccharose im Verlaufe der Keimung von fettspeichernden Samen. [Abbildung aus Gietl (1992); © 1992 Elsevier Science Ltd..]

3.4.2 Photorespiration der Blatt-Peroxisomen

Charakteristisch für die Blattperoxisomen höherer Pflanzen ist die Photorespiration mit den Enzymen des Glycolat-Weges (Tolbert *et al.*, 1968). Im Prinzip gelangen große Mengen des Photosynthesenebenprodukts Glycolat, und zwar bis zu 50% des fixierten CO₂ aus dem Calvin-Zyklus, aus den Chloroplasten in die Peroxisomen. In letzteren wird das Glykolat unter H₂O₂-Verbrauch zu Glyoxylat oxidiert, zu Glycin transaminiert und in die Mitochondrien transferiert. Dort wird aus zwei Glycin Serin gebildet, welches wiederum in den Peroxisomen zu Hydroxypyruvat desaminiert wird, dann zu Glycerat reduziert und nach Phosphorylierung wieder dem Calvin-Zyklus zugeführt wird (Tolbert, 1971). Die Abläufe sind in Abbildung 3.3 zusammengefaßt (Gietl, 1992).

Nächste Seite:

Abbildung 3.3: Reaktionen, Kompartimentierung und der Transport von Zwischenprodukten des Glycolat-Weges der Photorespiration. [Abbildung aus Gietl (1992); © 1992 Elsevier Science Ltd..]

3.4.3 Weitere Stoffwechselabläufe in Peroxisomen

Im Zuge des oxidativen Stoffwechsels wird durch Flavin-Oxidasen das Zellgift Wasserstoffperoxid (H_2O_2) erzeugt, welches, um oxidative Schäden zu vermeiden, an Ort und Stelle durch die Katalase entfernt werden muß (McClung, 1997; Willekens *et al.*, 1997). Zu den Flavin-abhängigen Oxidasen, die Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen und dadurch H_2O_2 generieren, gehören die Acyl-CoA-Oxidasen der β -Oxidation (Eastmond *et al.*, 2000), die Glycolat-Oxidase (Tolbert, 1971; Eastmond und Graham, 2001), die Aminoxidasen (Medda *et al.*, 1995) und die Urat-Oxidase (Schubert, 1986). Das von der Xanthin-Oxidase (del Rio *et al.*, 1992; Corpas *et al.*, 1997) und einer membranständigen NADH-abhängigen Elektronentransportkette (Fang *et al.*, 1987; del Rio *et al.*, 1992) erzeugte Superoxid-Radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$) wird von der Superoxid-Dismutase entgiftet (del Rio *et al.*, 1998). Ein weiteres System für die Kompensation von oxidativem Streß ist der Ascorbat-Gluthathion-Zyklus (Bunkelmann und Trelease, 1996; Jimenez *et al.*, 1997). Gut erforscht ist die Rolle der Peroxisomen im Stickstoff- und Purin-Metabolismus bei Pflanzen (Huang *et al.*, 1983; Schubert, 1986). Seit den 1990ern sind weitere Funktionen nachgewiesen worden, wie der Abbau der verzweigt-kettigen Aminosäuren (Zolman *et al.*, 2001; Lange *et al.*, 2004), die Bereitstellung der osmotisch wirksamen Substanz Glycin-Betain (Nakamura *et al.*, 1997), die Beteiligung an der Synthese der Phytohormone Auxin und Jasmonsäure (Stintzi und Browse, 2000; Feussner und Wasternack, 2002) und die Kompensation von oxidativem Streß (Lopez-Huertas *et al.*, 2000). Desweiteren spielen Peroxisomen eine Rolle bei Seneszenz-Vorgängen in Blättern; durch massive Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS) wird eine Desintegration der Zelle und damit letztendlich der Zelltod herbeigeführt (Buchanan-Wollaston, 1997; del Rio *et al.*, 1998).

In jüngster Zeit hat sich herausgestellt, daß die Peroxisomen als organisierende Plattform und als Signalkompartiment für Entwicklung, Differenzierung und Morphogenese fungieren. Einen Überblick zu diesem aktuellen Thema geben Titorenko und Rachubinski (2004). Als Botenstoffe fungieren Lipide, die beiden reaktiven Sauerstoffspezies H_2O_2 und $\text{O}_2^{\bullet-}$, sowie das Signalmolekül NO (Corpas *et al.*, 2001). Im Kern lokalisierte Transkriptionsfaktoren wurden als Ziele identifiziert (Hu *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2002).

3.4.4 Peroxisomales Targeting

Peroxisomale Membran- und Matrixproteine werden an freien cytosolischen Ribosomen synthetisiert und post-translational in die bereits vorhandenen Organellen importiert (Übersichtsartikel von Subramani *et al.*, 2000). Die meisten peroxisomalen Matrixproteine besitzen eines von zwei charakteristischen Peroxisomalen Targetingsignalen (PTS1 und PTS2) und werden für den Import in die Peroxisomen vom entsprechenden cytosolischen Rezeptor Pex5p bzw. Pex7p erkannt und gebunden, der die Proteinfracht wiederum zum Pex13p-Pex14p-Rezeptor-Komplex der Peroxisomenmembran bringt (Albertini *et al.*, 1997). In die Peroxisomen werden gefaltete und sogar oligomere Proteine importiert, was den peroxisomalen Translokations-Apparat deutlich vom gut charakterisierten Protein-Import anderer Organellen unterscheidet (Erdmann und Schliebs, 2005).

Die Mehrzahl der peroxisomalen Matrixproteine wird in ihrer reifen Form synthetisiert und mit Hilfe eines C-terminalen Targetingsignals (PTS1), dem Tripeptid SKL oder einer konservierten Variation davon, importiert (Gould *et al.*, 1989; Neuberger *et al.*, 2003). Proteine mit PTS1 binden im Cytosol an den löslichen Rezeptor Pex5p und werden von diesem zum Pex13p-Pex14p-Rezeptor-Komplex der Peroxisomenmembran transferiert (Kragler *et al.*, 1998; Dammai und Subramani, 2001; Costa-Rodrigues *et al.*, 2005). Die Translokation des Proteins in die peroxisomale Matrix hängt von den Faktoren Pex2p, Pex10p und Pex12p ab (Dodt und Gould, 1996; Chang *et al.*, 1999). Der Pex5p-Rezeptor gibt seine Proteinfracht ins Peroxisomenlumen ab und wird zurück ins Cytosol befördert, woran die AAA-Peroxine Pex1p und Pex6p, sowie das Ubiquitin-konjugierende Enzym Pex4p (Brown und Baker, 2003) und Pex22p (Collins *et al.*, 2000) beteiligt sind. Für den PTS1-Rezeptor Pex5p wurde unlängst die Ubiquitinierung nachgewiesen (Platta *et al.*, 2004). Bei Pex1p und Pex6p handelt es sich um cytosolische und membranassoziierte AAA-ATPasen der peroxisomalen Protein-Import-Maschinerie, deren Funktion im Detail jedoch noch nicht bekannt ist (Brown und Baker, 2003). Die AAA-Peroxine vermitteln die ATP-abhängige Freisetzung des PTS1-Rezeptors von der peroxisomalen Membran ins Cytosol (Platta *et al.*, 2005).

In den meisten eukaryontischen Organismen wurden einige Proteine, wie z.B die Thiolase in Pflanzen und *Saccharomyces cerevisiae* oder die Aminoxidase in *Hansenula polymorpha* mit einem PTS2, das ist ein sich innerhalb der ~30 ersten Aminosäuren des

N-Terminus befindendes Nonapeptid der Struktur RLX₅HL oder einer Variation davon, gefunden (Subramani *et al.*, 2000; Petriv *et al.*, 2004). Diese Gruppe von Proteinen wird vom cytosolischen Rezeptor Pex7p erkannt und vom selben Protein-Import-Komplex, wie oben für Proteine mit PTS1 beschrieben, ins Peroxisom geschleust (Stein *et al.*, 2002). Pex7p interagiert mit weiteren cytosolischen Faktoren; das sind bei *S. cerevisiae* die beiden funktionell redundanten Proteine Pex18p und Pex21p (Purdue *et al.*, 1998), in höheren Eukaryonten Pex5pL, die lange Isoform von Pex5p (Braverman *et al.*, 1998) und in *Yarrowia lipolytica* Pex20p (Titorenko *et al.*, 1998). Die genannten PTS2-Rezeptor-spezifischen Proteine besitzen keine Sequenz-Homologie, haben jedoch ähnliche Funktion (Einwächter *et al.*, 2001). Pex5pL und Pex18p/Pex21p interagieren mit Pex7p und transportieren den beladenen Rezeptor zur Peroxisomenmembran, wogegen Pex7 für die Bindung des PTS2 zuständig ist (Matsumura *et al.*, 2000). Da Pex7p in *Yarrowia lipolytica* bislang nicht identifiziert wurde, nimmt man an, daß Pex20p die Aktivitäten von Pex7p und Pex18p/Pex21p in sich vereint. Für *Yarrowia lipolytica* wurde gezeigt, daß Pex20p an der für den Import notwendigen Oligomerisierung der Thiolase beteiligt ist. Da Pex20p auch mit dem intraperoxisomalen Pex8p interagiert, ist es auch an nachfolgenden Ereignissen des Imports beteiligt (Smith und Rachubinski, 2001).

Es gibt Hinweise, daß Pex5p und Pex7p hinsichtlich ihrer Funktionen in Glyoxysomen und Blatt-Peroxisomen unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen. Bei *Arabidopsis* hat die Ausschaltung von Pex5p verringerte Aktivitäten sowohl in Glyoxysomen als auch in Blatt-Peroxisomen zur Folge. Dem gegenüber beeinträchtigte die Ausschaltung von Pex7p nur die Funktion der Glyoxysomen (Hayashi *et al.*, 2005). Der PTS2-abhängige Import ist bei *Arabidopsis* notwendig für Embryo-Entwicklung, Keimung und vegetatives Wachstum (Woodward und Bartel, 2005).

In höheren Eukaryonten, wie Säugern und Pflanzen wird das PTS2 abgespalten, nicht jedoch in Hefen und Pilzen. Für die glyoxysomale Citrat-Synthase in *Cucurbita* wurde gezeigt, daß Cys an P2 zwar für die Prozessierung der höhermolekularen Vorstufe essentiell ist, aber die nicht-prozessierte Citrat-Synthase mit dem N-terminalen Propeptid jedoch trotzdem funktionsfähig ist (Kato *et al.*, 1996). Interessanterweise befindet sich bei den bekannten höhermolekularen Vorstufen ein Cys-Rest an P1 oder P2 (siehe Tabelle 3.1). Die für die Abspaltung der Präsequenzen notwendigen Peroxisomalen Processing Peptidasen in Säugern und Pflanzen sind bislang noch nicht identifiziert worden. Im Rahmen dieser

Arbeit wurde die Glyoxysomale Processing Peptidase von *Citrullus vulgaris* bearbeitet.

Das *Arabidopsis*-Genom (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) wurde von Reumann *et al.* (2004) nach Proteinen mit PTS1 oder PTS2 durchsucht. Dabei wurden etwa 220 Proteine mit einem möglichen PTS1 und 60 Proteine mit einem möglichen PTS2 identifiziert (Datenbank AraPerox; www.araperox.uni-goettingen.de; Reumann *et al.*, 2004). Von den gefundenen Proteinen konnten nur 24 (15%) den bekannten peroxisomalen Proteinen aus Pflanzen zugeordnet werden; hierbei handelt es sich vor allem um Proteine des Grundstoffwechsels. Das Wissen über peroxisomale Matrix-Proteine mit regulatorischer Funktion ist sehr begrenzt. Das ist in erster Linie darauf zurückzuführen, daß *low-abundance* Proteine und induzierte Proteine wie Protein-Kinasen, Hitzeschockproteine und Proteasen schwer identifizierbar sind.

Tabelle 3.1: N-Terminus der höhermolekularen Vorstufen peroxisomaler Matrixproteine aus Pflanzen mit einem Targeting Signal. Rot unterlegt ist das Nonapeptid, die Erkennungssequenz, im N-terminalen Propeptid. Grün unterlegt ist der Cystein-Rest an P1 oder P2 bezüglich der markierten Spaltstelle (↓). Blau unterlegt ist der N-Terminus des reifen glyoxysomalen Matrixproteins.

Protein	Species	N-Terminus
Malat-dehydrogenase	<i>Citrullus</i>	MQPIPDVNQRIARISAHLHPPKSQMEESSALRRANCR↓ AKGGAPGFKVAI
	<i>Cucurbita</i>	MQPIPDVNQRIARISAHLHPPKYQMEESSVLRRANCR↓ AKGGAPGFKVAI
	Alfalfa	MEPNSYANSRITRIASHLNPPNLKMNEHGGSSLTNVHCR↓ AKGGTPGFKVAI
	<i>Brassica</i>	MPHKRIAMISAHLQPSFTPQMEAKNSVMGLES CR↓ AKGGNPGFKVAI
	<i>Oryza</i>	MEDAAAAARRMERLASHLRPPASQMEESPLL RGSNCR↓ AKGAAPGFKVAI
<i>Arabidopsis</i>	MEFRGDANQRIARISAHLTPQMEAKNSVIGRENC R↓ AKGGNPGFKVAI	
Citrat-Synthase	<i>Cucurbita</i>	MPTDMELSPSNVARHRLAVLAAHLSAASLEPPVMAS SLEAHCV↓ SAQTMVAPPEL
	<i>Arabidopsis</i>	MEISERVARLAVLSGHLSEGKQDSPAIERWCT↓ SADTSVAPLGS
Thiolase	<i>Cucurbita</i>	MEKAINRQSILLHHLRPSSSAYTN-ESSLSASVC↓ AAGDSASY
	<i>Mangifera</i>	MEKAINRQSILLHHLRPSNSSSHNYESALAASVC↓ AAGDSAAY
	<i>Arabidopsis</i>	MEKAIERQRVLLEHLRPSSSSSHNYEASLSASAC↓ LAGDSAAY
	<i>Brassica</i>	MEKAMERQRVLLEHLRPSSSSSHSFEGLSASAC↓ LAGDSAAY
Acyl-CoA-Oxidase	<i>Cucurbita</i>	MASPGEPNRTAEDESQAAARRIERLSLHLTIPLDD SQQVEMETC↓ AAGKAKAKIEVD
	<i>Arabidopsis</i>	MESRREKNPMTEEESDGLIAARRIQRLSLHLSP S LTLSPSLPLVQTETC↓ SARSKKLDVNGE

3.5 Peroxisomale Peptidasen

Die Informationen über peroxisomale Peptidasen sind spärlich, wenngleich proteolytische Aktivität verschiedentlich nachgewiesen wurde (Gray *et al.*, 1970; Komov *et al.*, 1988; Authier *et al.*, 1995). Del Rio und Mitarbeiter (Distefano *et al.*, 1997) haben mittels SDS-PAGE mit nachfolgendem Gelatine-Aktivitätsgel eine beträchtliche Anzahl von Endopeptidasen in Blattperoxisomen von *Pisum sativum* nachgewiesen, drei (EP2, EP4 und EP5) mit Molekülmassen von 88, 64 und 50 kDa in jungen Blättern und vier zusätzliche (EP1, EP3, EP6 und EP7) mit Molekülmassen von 220, 76, 46 und 34 kDa in seneszenten Blättern. Durch Klassen-spezifische Inhibitoren wurden EP1, EP3 und EP4 als Serin-Peptidasen, EP5 als mögliche Metall-abhängige Serin-Peptidase, EP2 und EP6 als Cystein-Peptidasen und EP7 als Metallopeptidase charakterisiert. Mit Antikörpern gegen eine Cystein-Peptidase aus seneszenten Ovarien von *Pisum sativum* wurde eine weitere mögliche 64 kDa-Peptidase detektiert. In einer weiteren Arbeit (Distefano *et al.*, 1999) wurde die Rolle dieser Endopeptidasen im allgemeinen Proteinabbau im Rahmen der Blatt-Seneszenz beschrieben. Bis dato wurde jedoch keine der beschriebenen Peptidasen *in-situ* lokalisiert oder sequenziert.

Eine *in-silico* Analyse des *Arabidopsis*-Genoms (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) auf mögliche peroxisomale Proteine erbrachte drei anhand des C-terminalen PTS1 SKL bzw. PKL identifizierte Peptidase-Sequenzen (www.araperox.uni-goettingen.de; Reumann *et al.*, 2004).

- At5g47040 kodiert für ein Protein mit 888 Aminosäuren, SKL-Terminus und einem Molekulargewicht von 97,9 kDa. Bei dem zur *E. coli* Lon-Protease homologen Protein handelt es sich um eine Serin-Protease (Clan SF, Familie S16; Barrett *et al.*, 2001b) mit Serin als Nucleophil in der katalytischen Tasche und der charakteristischen katalytischen Diade Ser-Lys (Besche und Zwickl, 2004).
- At2g41790 kodiert für ein Protein mit 970 Resten, PKL-Terminus und einer Molekülmasse von 111 kDa. Bei dem zur Insulinase (*Insulin-degrading enzyme*, IDE) aus Maus homologen Protein handelt es sich um eine Zn-Metallopeptidase mit dem für die Pitrilysin-Familie (Clan MB, Familie M16; Rawlings *et al.*, 2001b) typischen, inversen HXXEH-Zinkbindungsmotiv (Roth, 2004).

- At1g28320 kodiert für ein Protein mit 709 Aminosäuren, SKL-Terminus und einer Molekülmasse von 76,1 kDa. Bei dem Protein handelt es sich um eine Trypsin-artige Serin-Protease vom Typ der Deg-Peptidasen mit der katalytischen Triade His-Asp-Ser (Chung und Goldberg, 2004).

Zwischen den acht von Del Rio und Mitarbeitern nachgewiesenen peroxisomalen Peptidasen (Di Stefano *et al.*, 1997) und den drei von Reumann und Mitarbeitern (2004) auf der Grundlage einer Genom-Analyse vermuteten Peptidasen besteht eine auffällige Diskrepanz.

Die drei Proteasen werden im folgenden eingehend beschrieben.

3.5.1 Lon-Proteasen

Die Lon-Protease von *E. coli* (Protease La) war die erste beschriebene ATP-abhängige Protease (Swamy und Goldberg, 1981). Sie wird vom *lon*-Gen kodiert und steht unter der Kontrolle eines Hitzeschock-Promotors (Goff und Goldberg, 1985). Sie wird bei der Anreicherung von fehlgefalteten Proteinen induziert, deshalb nimmt man an, daß sie einerseits zur Qualitätskontrolle von Proteinen beiträgt, indem sie mißgefaltete oder andersweitig fehlerhafte Proteine degradiert und andererseits kurzlebige regulatorische Proteine abbaut (Van Melderen und Gottesman, 1999). Die Lon-Protease von Bakterien ist hochhomolog zu den in den Mitochondrien von Eukaryonten vorkommenden Lon-Proteasen. Sie wurden bei Säugern (Desautels und Goldberg, 1982), Pflanzen (Malek *et al.*, 1984) und Hefen (Kutejova *et al.*, 1993) beschrieben. Die entsprechende Hefe-Peptidase wurde als PIM1-Protease (*proteolysis in mitochondria*; *PIM1*-Gen) bezeichnet. In *Arabidopsis* wurden für Lon-Proteasen drei kodierende Gene gefunden (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000): Lon1 (Protein-ID AAB61060) wurde aufgrund der Homologie zu einer Lon-Protease in Hefe (Suzuki *et al.*, 1994) in den Mitochondrien lokalisiert (Sarria *et al.*, 1998). Lon2 (Protein-ID AAC05085) wurde *in-silico* in den Chloroplasten lokalisiert, obwohl kein Transitpeptid gefunden wurde (Adam *et al.*, 2001). Dabei wurde übersehen, daß die Protein-Sequenz ein C-terminales PTS1 besitzt und höchstwahrscheinlich in den Peroxisomen lokalisiert ist (Reumann *et al.*, 2004). Dagegen gibt es Anhaltspunkte dafür, daß Lon3 (Protein-ID AAF26080) in den Chloroplasten lokalisiert ist (Adam *et al.*, 2001).

Die Lon-Proteasen besitzen zwei katalytische Domänen, eine ATPase-Domäne und eine C-terminale proteolytische Domäne (Rasulova *et al.*, 1998; Roudiak und Shrader, 1998). Die proteolytische Domäne mit Serin im aktiven Zentrum und der katalytischen Diade Ser-Lys hat keinerlei Ähnlichkeit mit anderen Peptidasen, ist aber innerhalb der Lon-Proteasen hochkonserviert. N-terminal von der Protease-Domäne liegt die ATPase Domäne vom Walker-Typ mit konserviertem Walker A- (GPPGVGKTS bei PIM1) und Walker B-Motiv (DEV/ID). Für die ATPase-Domäne von Lon-Proteasen wird wie bei anderen ATP-abhängigen Proteasen (z.B. ClpAP und HslUV) der AAA⁺-Superfamilie innerhalb der AAA-Proteine (*ATPase-associated with a variety of cellular activity*) eine Chaperonfunktion angenommen. Analog zu anderen AAA-Proteinen ist es wahrscheinlich, daß innerhalb der Lon-Proteasen der variable N-Terminus an der Substraterkennung beteiligt ist (Ogura und Wilkinson, 2001).

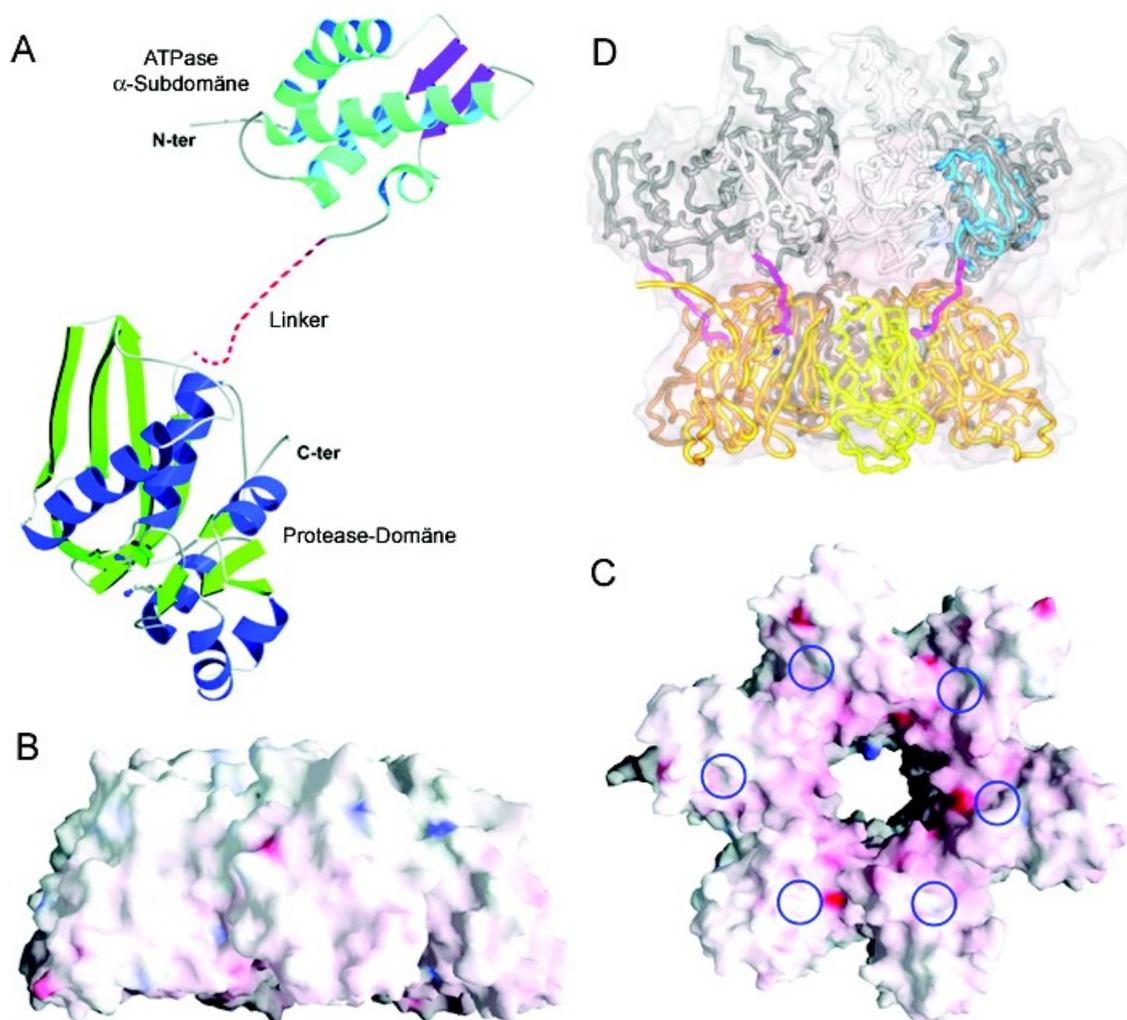
Die ATP-abhängigen Peptidasen assemblieren zu Molekül-Komplexen, in deren Mikrokompartimenten die Proteolyse reguliert abläuft. Die Angaben über die Größe der Komplexe variieren; für die PIM1-Protease mit einer 117 kDa-Untereinheit wurden Hexamere (Kutejova *et al.*, 1993), Heptamere (Stahlberg *et al.*, 1999) und noch größere Komplexe (Wagner *et al.*, 1997) beschrieben. Die von Botos *et al.* (2004a,b) aufgeklärte Kristallstrukturen der α -Subdomäne der ATPase und der C-terminalen Protease-Domäne der Lon-Protease aus *E. coli* zeigten eine hexamere Anordnung der Untereinheiten (siehe Abbildung 3.4). Die katalytischen Eigenschaften der Lon-Protease in *E. coli* sind eingehend von Goldberg und Mitarbeitern untersucht worden (Übersichtsartikel von Chung und Goldberg, 2004). Die Biochemie der eukaryontischen Lon-Proteasen wurde dagegen kaum untersucht, jedoch nimmt man aufgrund der vorhandenen Sequenzhomologien mit der *E. coli* Lon-Protease ähnliche Eigenschaften an (de Walque *et al.*, 2002).

Da Peptidspaltung und ATP-Hydrolyse gekoppelt sind, ist die Lon-Protease zugleich ATP-abhängige Protease und Protein-aktivierte ATPase (Waxman und Goldberg, 1982). Die Energieabhängigkeit läßt sich nicht thermodynamisch erklären und im Verlaufe der Proteolyse werden weder Protease noch Polypeptidsubstrat adenyliert oder phosphoryliert (Waxman und Goldberg, 1985). Die Lon-Protease degradiert in Gegenwart von ATP und Mg²⁺ ungefaltete Polypeptide rasch zu kurzen Peptiden von 6-20 Aminosäuren. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Proteolyse ist die Freisetzung des gebundenen

ADP; sie wird in Gegenwart von Polypeptid-Substraten stimuliert. Für jede gespaltene Peptid-Bindung werden etwa zwei Moleküle ATP benötigt (Menon und Goldberg, 1987), jedoch konnten ATP-Hydrolyse und Proteolyse experimentell entkoppelt werden. Die Ausschaltung des aktiven Zentrums durch kovalente Inhibierung (Waxman und Goldberg, 1982) oder Mutagenese (Fischer und Glockshuber, 1993) blockiert zwar die Proteolyse, nicht jedoch die ATP-Hydrolyse und den die Proteolyse stimulierenden Einfluß von Polypeptidsubstraten. Während der Abbau von Polypeptiden von der ATP-Spaltung abhängt, werden kurze Peptide am besten in Gegenwart von nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga gespalten (Hilliard *et al.*, 1998). Nach ATP-Hydrolyse bewirken initiale Konformationsänderungen im AAA⁺-Modul eine Entfaltung der Substratkette, die Translokation des Substrates zum aktiven Zentrum der Protease und die koordinierte Aktivierung der Protease (Wickner *et al.*, 1999; Zwickl *et al.*, 2000; Maurizi und Li, 2001; Lupas und Martin, 2002).

Bei der ATP-abhängigen Lon-Protease in *E. coli* handelt es sich um ein Hitzeschockprotein, das mit der Chaperon-artigen ATPase-Domäne fehlgefaltete Proteine erkennt und degradiert (Chung und Goldberg, 2004). Bei regulär gefalteten Proteinen liegen diese Bereiche im Molekülinneren verborgen und werden nicht ins Solvens exponiert (Maurizi, 1987). Die Substratspezifität der Lon-Protease ist Chymotrypsin-artig und für die Spaltung eines physiologischen Substrates mit kurzer biologischer Halbwertszeit, dem Zellteilungsregulator Sula, wurde eine Präferenz für Leu (und in geringerem Maße anderen hydrophoben und ungeladenen Resten) an P1, Ser an P1' und ein oder zwei Gln an P2-P5 gefunden (Nishii *et al.*, 2002). In den eukaryontischen Mitochondrien haben die ATP-abhängigen Peptidasen die Funktion der initialen Spaltung von Proteinen, die für die Degradation vorgesehen sind, wogegen der weitere Abbau zu kurzen Peptiden und Aminosäuren dann von ATP-unabhängigen Peptidasen vollzogen wird (Rep und Grivell, 1996). Allerdings kann die Lon-Protease *in-vitro* selbst unabhängig von der ATP-Hydrolyse Oligopeptide spalten (Hilliard *et al.*, 1998). Die in der Mitochondrienmatrix von Eukaryonten beschriebenen Lon-Proteasen wurden nicht näher untersucht (Wang *et al.*, 1993; Kutejova *et al.*, 1993). Die PIM1-Protease von *Saccharomyces* hat in der Mitochondrienmatrix die Aufgabe, die Funktionsfähigkeit des mitochondrialen Genoms und der Atmungskette zu erhalten (Suzuki *et al.*, 1994). Es wurde beobachtet, daß die PIM1-Protease direkt und spezifisch an mitochondriale Promotoren bindet (Fu und Markovitz, 1998). Bei fehlgefalteten Protei-

nen verhindert die Assoziation mit Chaperon Hsp70, daß diese zu Protease-resistenten *inclusion-bodies* aggregieren (Suzuki *et al.*, 1994; Van Dijn *et al.*, 1998). Die Lon-Protease, die in den Pflanzen-Peroxisomen lokalisiert ist, könnte eine Funktion als Streßprotein erfüllen. Es ist anzunehmen, daß es im oxidierenden Milieu der Peroxisomen, hervorgerufen durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), zu irreversiblen Schäden an Proteinen kommt (del Rio *et al.*, 1998). Solche Proteine müssen rasch entsorgt werden, um zu verhindern, daß es zur Aggregation mißgefalteter Proteine kommt.



Vorherige Seite:

Abbildung 3.4: Struktur der *E. coli* Lon-Protease.

A: Bändermodell. N-terminal die überwiegend α -helikale ATPase α -Subdomäne (Botos *et al.*, 2004b), C-terminal die Protease-Domäne mit katalytischer Ser-Lys-Diade (Botos *et al.*, 2004a); beide Domänen sind verbundenen durch den modellierten Linker. **B und C:** Hexamer der Protease-Domäne als feste Oberfläche mit dem elektrostatischen Oberflächenpotential von rot (negativ) bis blau (positiv). **B:** Seitenansicht. Unten die distale, oben die proximale Oberfläche. **C:** Distale Oberfläche. Die aktiven Zentren sind durch Kreise markiert, der axiale Kanal hat einen Durchmesser von ~ 18 Å. **D:** Die ATPase α -Subdomäne (blau) und die Protease-Domäne (gelb/orange) der *E. coli* Lon-Protease wurden über die entsprechenden Domänen der ähnlich aufgebauten ATPase-abhängigen Protease HslUV aus *Hemophilus influenzae* (grau; PDB 1kyi) gelegt. [Abbildungen aus Botos *et al.* (2004); © 2004 American Society for Biochemistry and Molecular Biology.]

3.5.2 Metallopeptidasen der Pitrilysin-Familie

Cheng und Zipser (1979) identifizierten in *E. coli* eine Endopeptidase (Protease III) anhand ihrer Eigenschaft, β -Galaktosidase-Fragmente zu spalten. Swamy und Goldberg (1981, 1982) zeigten, daß sich mit cytosolischen und periplasmatischen Extrakten die Insulin-B-Kette spalten läßt und daß die periplasmatische Aktivität (Pi-Aktivität) mit der Protease III identisch ist. Bei der Peptidase handelt es sich um das Produkt des *ptr*-Gens von *E. coli*, das mit 962 Aminosäuren ungewöhnlich groß für ein bakterielles Protein ist (Dykstra *et al.*, 1984). Der Name Pitrilysin (EC 3.4.24.55) wurde 1992 durch die IUBMB eingeführt.

Die Metallopeptidasen Pitrilysin wird durch das inverse Zinkbindungsmotiv HXXEH charakterisierte (Becker und Roth, 1992) und ist der Prototyp für den Clan ME, die Pitrilysin-Familie M16 und die Subfamilie M16A (Barrett *et al.*, 2001b). Pitrilysin ist eine Oligopeptidase und zeigt keine Aminopeptidase- oder Carboxypeptidase-Aktivität (Anastasi *et al.*, 1993). Die *in-vivo*-Funktion der periplasmatischen Peptidase Pitrilysin ist unklar, *in-vitro* werden kleine Peptide degradiert (Cornista *et al.*, 2004). Die Kristallstruktur wurde unlängst von Maskos *et al.* aufgeklärt (PDB 1Q2L; 2003), ohne daß man dadurch der biologischen Funktion näher gekommen wäre.

Das Interesse an Pitrilysin war wieder gestiegen, nachdem sich herausstellte, daß sie hochhomolog zur humanen Peptidase Insulysin (EC 3.4.24.56) ist (Affolter *et al.*, 1988). Der Name Insulysin wurde 1992 von der IUBMB festgelegt. Eine in Leberextrakt von Ratten gefundene Insulin-degradierende Aktivität wurde von Mirsky und Broh-Kahn (1949) dem Enzym Insulinase zugeordnet. Trotz enormer Anstrengungen gelang es erst Shii und Mitarbeitern (1986) die Insulinase aus humanen Erythrozyten zu reinigen und zu charakte-

risieren. Das pH-Optimum liegt abhängig vom Substrat zwischen 7 und 8,5 (Kirschner und Goldberg, 1983; Shii *et al.*, 1986). Die Aktivität wird durch Metallchelatoren wie EDTA und 1,10-Phenanthrolin, sowie durch alkylierende Reagenzien und bemerkenswerterweise durch das Antibiotikum Bacitracin gehemmt (Shii *et al.*, 1986). In der Zelle scheint Insulysin ein funktionelles Homodimer zu bilden (Ding *et al.*, 1992). Das Peptidhormon Insulin wird in den Zielzellen aller Gewebe, vor allem jedoch im Leberparenchym rezeptorvermittelt internalisiert (Levy und Olefsky, 1990; Becker *et al.*, 1996) und in Endosomen oder im Cytoplasma abgebaut (Duckworth *et al.*, 1998). Ob, wo und in welchem Maße der Insulin-Abbau durch Insulysin erfolgt, wird nach wie vor kontrovers diskutiert, denn Insulysin weist ein C-terminales PTS1-PKL auf und wurde im Leberparenchym von Ratten nicht in den lysischen Vesikeln, sondern im Cytosol und in den Peroxisomen lokalisiert (Authier *et al.*, 1994). Die cDNA für Human-Insulin weist am 5'-Ende zwei AUG-Start-Codons auf; daher besteht die Möglichkeit, daß zwei Formen mit unterschiedlicher zellulärer Lokalisation existieren (Affholter *et al.*, 1988). Im *in-vitro*-Versuch spaltete Insulysin das 27 Aminosäuren lange synthetische Propeptid der Ratten prä-Thiolase, prozessierte jedoch nicht die komplette prä-Thiolase zur reifen Form (Authier *et al.*, 1995). Duckworth *et al.* (1994) beschreiben eine Assoziation von Insulysin und dem 26S-Proteasoms, was eine Funktion in der Proteindegradation möglich erscheinen läßt.

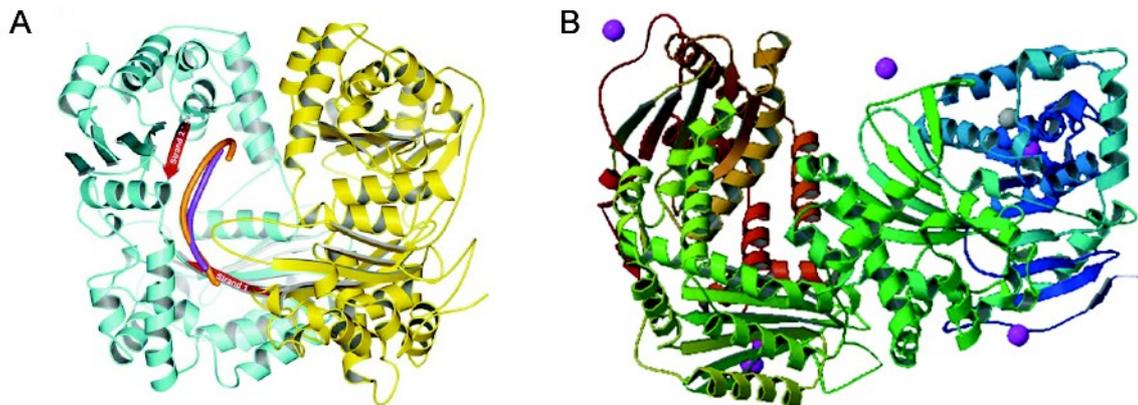


Abbildung 3.5: Bändermodelle der Mitochondrialen Processing Peptidase aus Hefe (links) und der Zn-Metallopeptidase Pitrilysin aus *E. coli* (rechts). A: Die Mitochondriale Processing Peptidase aus Hefe (Taylor *et al.*, 2001) besteht aus zwei Untereinheiten von je etwa 50 kDa, der proteolytisch aktiven β -Untereinheit (linke Domäne, blau) und der proteolytisch inaktiven α -Untereinheit (rechte Domäne, gelb), die zusammen eine Zentralhöhle bilden. Zwei Signalpeptide (COX IV 2-25, orange; MDH 2-17, violett) sind in der Zentralhöhle in gestreckter Konformation an zwei β -Stränge (rot) der Protease-Untereinheit gebunden. B: *E. coli* Pitrilysin (PDB 1Q2L; Maskos *et al.*, 2003) besteht aus einer Substratkette von etwa 100 kDa und besitzt einen der MPP ähnlichen Aufbau mit zwei Hemisphären und vier ausgedehnten β -Faltblättern. [(A) aus Taylor *et al.* (2001); © 1992 Elsevier Science Ltd.. (B) mit Swiss PDB Viewer (Guex *et al.*, 1999) erstellt.]

3.5.3 Deg-Proteasen

Goldberg und Mitarbeiter (Swamy und Goldberg, 1981) isolierten aus *E. coli* neun verschiedene Endopeptidasen, darunter die Protease Do, eine oligomere Serin-Protease von ~500 kDa (Swamy *et al.*, 1982). Da die Peptidase eine wichtige Funktion in der Degradation von periplasmatischen Proteinen hat, wurde das entsprechende Gen *degP* (*degrading of proteins*) und das Protein DegP genannt (Strauch *et al.*, 1989). Unabhängig davon wurde gefunden, daß *E. coli* DegP als Hitzeschockprotein (*high temperature requirement, htrA*) für das Wachstum oberhalb von 42°C benötigt (Lipinska *et al.*, 1990).

Bei DegP handelt es sich um eine Serin-Endopeptidase der S1C-Familie mit der für Trypsin-artige Proteasen charakteristischen katalytischen Triade His-Asp-Ser und zwei PDZ-Domänen am C-Terminus (Pallen und Wren, 1997). PDZ-Domänen gehören zu den am meisten verbreiteten modularen Protein-Interaktionsdomänen in Metazoen (Übersichtsartikel von Harris und Lim, 2001). Durch Sequenzvergleiche wurden Homologe zu PDZ-Domänen auch bei Pflanzen identifiziert (Pointing, 1997). Die primäre Funktion von PDZ-Domänen besteht in der Erkennung eines ~5-Reste-Motivs, das sich i.d.R., jedoch nicht zwingend, am C-Terminus des Interaktionspartners befindet (Doyle *et al.*, 1996). Sie

bestehen aus einer ~90-Aminosäuren-Polypeptidkette mit sechs β -Strängen und zwei α -Helices in einer kompakten globulären Faltung, wobei N- und C-Terminus in enger Nachbarschaft liegen (Harrison, 1996). Die Deletion der PDZ-Domänen hat eine Auswirkung auf die Funktion der Protease (Spiess *et al.*, 1999).

Das 48 kDa-Monomer von DegP assembliert zu Hexameren von ~300 kDa, dessen Struktur von Krojer *et al.* (2002) aufgeklärt wurde (siehe Abbildung 3.6). Ein DegP-Hexamer besteht aus zwei sandwichartig übereinandergelagerten trimeren Ringen, deren Protease-Domänen sich vom Solvens abgeschirmt in einem Innenraum befinden und umgeben sind von den sehr beweglichen PDZ-Domänen, die die Seitenwände bilden. Krojer *et al.* (2002) beschreiben zwei Konformationen des Hexamers, eine unzugängliche geschlossene und eine offene Konformation. Bei letzterer liegen die katalytischen Zentren jedoch nicht in einer aktiven Konformation vor, weil sie durch Interaktion jeweils dreier *Loops* blockiert sind. *E. coli* DegP wurde bei 18°C in einem Temperaturbereich kristallisiert (Krojer *et al.*, 2002), in dem von Ehrmann und Mitarbeitern im *in-vitro*-Assay keinerlei proteolytische Aktivität festgestellt wurde (Spiess *et al.*, 1999). Maurizi (2002) nimmt an, daß die von Krojer *et al.* (2002) beschriebene geschlossene Konformation gänzlich inert ist und daß es sich bei der offenen Konformation mit blockierten aktiven Zentren um die Chaperon-Funktion handelt. Die proteolytisch aktive Form besitzt ebenfalls eine offene Konformation; hier treten die PDZ-Domänen mit Substratmolekülen in Wechselwirkung und leiten diese zu den aktiven Zentren weiter. Das ist konsistent mit der Beobachtung, daß *E. coli* DegP *in-vitro* unter 28°C proteolytisch inaktiv ist und als Chaperon fungiert und erst mit höheren Temperaturen ansteigende Proteaseaktivität zeigt (Skorko-Glonek *et al.*, 1995; Spiess *et al.*, 1999). Anders als bei den Chaperon-assoziierten Proteasen mit ATPase-Subdomänen, wie z.B. FtsH und Clp (Gottesmann *et al.*, 2003), ist die Chaperonfunktion bei DegP ATP-unabhängig, denn die unter Streßbedingungen akkumulierten potentiellen Substrate sind bereits teilweise entfaltet (Lipinska *et al.*, 1990).

DegP degradiert *in-vitro* das unstrukturierte Substrat β -Casein, nicht jedoch Proteine in nativer Konformation und synthetische Peptide (Skorko-Glonek *et al.*, 1995). An P1 werden die unpolaren verzweigten Aminosäuren Val und Ile bevorzugt, jedoch scheint es im Rahmen der Spaltspezifität zusätzliche strukturelle Determinanten zu geben (Kolmar *et al.*, 1996). Die proteolytische Aktivität steigt von 37°C bis 55°C an und fällt darüber bis

60°C steil ab. Es ist keine pH-Abhängigkeit der Aktivität im pH-Bereich von 4,8-10 zu erkennen. DegP wird von DFP, einem irreversiblen Inhibitor von Serin-Proteasen, nicht jedoch vom Serin-Proteasen-Hemmer PMSF inhibiert (Lipinska *et al.*, 1990; Skorko-Glonek *et al.*, 1995).

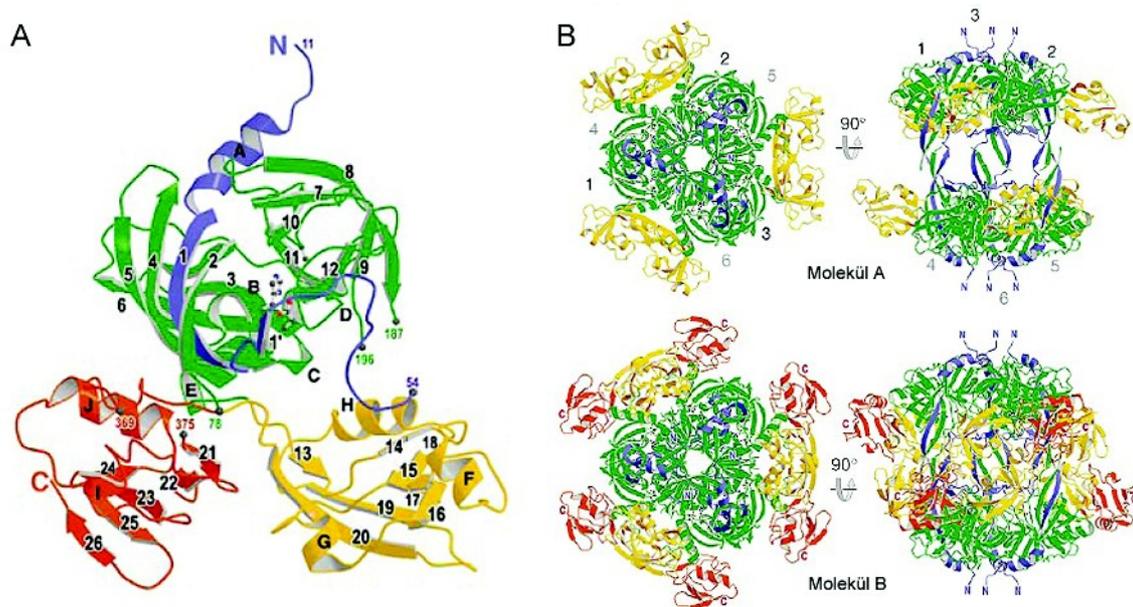


Abbildung 3.6: Kristallstruktur von *E. coli* DegP (Krojer *et al.*, 2002).

A: Bändermodell des Monomers aus Molekül B mit unterschiedlich farbigen Domänen. N-Terminus, blau; Protease, grün; PDZ1, gelb; PDZ2, rot. Die Reste der katalytischen Triade sind als Ball-Stäbchen-Modell wiedergegeben. Die Sekundärstrukturelemente (α -Helices durch Buchstaben, β -Stränge durch Zahlen), die Termini des Proteins und die nicht durch Elektronendichte definierten Regionen sind gekennzeichnet. B: Aufsicht (links) und Seitenansicht (rechts) des DegP-Hexamers, oben von Molekül A, unten von Molekül B. Die Elektronendichte von PDZ2 war im Molekül A nicht definiert. [Abbildungen aus Krojer *et al.* (2002); © 2002 Macmillan Publishers Ltd..]

Zwei weitere verwandte Deg-Proteasen bei *E. coli*, DegS und DegQ dienen der Kompensation von Faktoren wie erhöhter Temperatur oder oxidativem Stress (Waller und Sauer, 1996; Pallen und Wren, 1997). DegQ (HhoA) zeigt ähnliche Eigenschaften wie DegP und ist ebenfalls im Periplasma lokalisiert (Kolmar *et al.*, 1996). Die Protease DegS (HhoB) ist im Gegensatz zu DegP über eine N-terminale Domäne fest in der cytoplasmatischen Membran verankert und ragt in den periplasmatischen Raum hinein. Sie aktiviert, induziert vom C-Terminus mißgefalteter Porine aus der äußeren Membran (OMPs), über eine proteolytische Kaskade mit anschließender Signaltransduktion durch die innere Membran die Transkription von streßassoziierten Genen (Walsh *et al.*, 2003; Wilken *et al.*, 2004).

Die homologe Protease HtrA2/Omi aus Säuger-Mitochondrien unterscheidet sich von DegP zum einen im Aufbau, da die Monomere nur eine PDZ-Domäne aufweisen und zu einem Trimer assemblieren, andererseits aber auch in ihrer Funktionsweise, denn die konstitutiv in aktiver Konformation vorliegenden aktiven Zentren werden durch die PDZ-Domänen sterisch blockiert und erst nach Aktivierung freigegeben. Interessanterweise sind die Monomere von HtrA2/Omi proteolytisch inaktiv, dagegen sind HtrA-Fragmente, denen die PDZ-Domäne fehlt (also die isolierte Protease-Domäne), ebenso proteolytisch aktiv, wie die Trimere dieser Fragmente (Li *et al.*, 2002). Deg-Proteasen sind in allen Organismen von Bakterien bis zu den Pflanzen vertreten und wurden im Periplasma von gram-negativen Bakterien, im ER und in den Mitochondrien von Eukaryonten, in den Chloroplasten von Pflanzen, sowie im Extrazellularraum nachgewiesen (Wilken *et al.*, 2004). Aufbau und Funktionsweisen der vier Deg-Proteasen DegS, HtrA, DegP und DegQ sind vergleichend in Abbildung 3.7 zusammengefaßt (Kim und Kim, 2005).

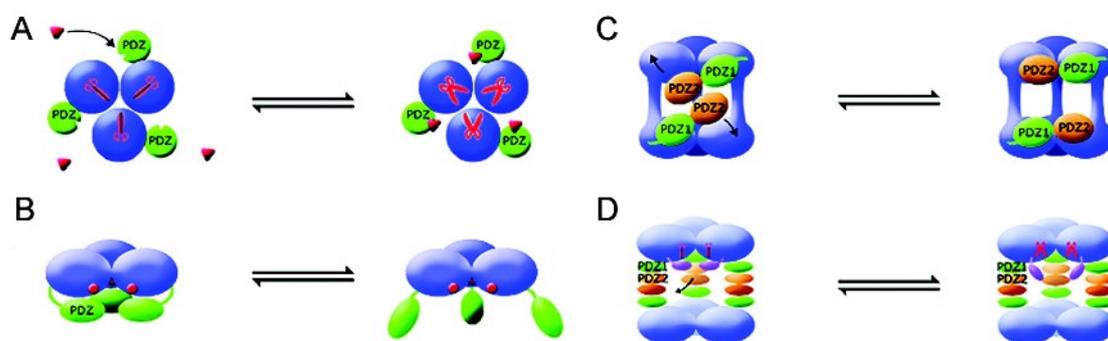


Abbildung 3.7: Schematische Modelle der Aktivierungsmechanismen bei Proteasen der HtrA-Familie. **A:** *E. coli* DegS. Die reversible Aktivierung von DegS wird durch die Bindung des OMP-Signals an die starre PDZ-Domäne bewirkt, dabei werden Konformationsänderungen im Bereich der katalytischen Triade induziert. **B:** Humanes HtrA. Die über einen flexiblen *Loop* mit der Protease-Domäne verbundene PDZ-Domäne blockiert das aktive Zentrum und gibt dieses nach Aktivierung frei. **C:** *E. coli* DegP. DegP zeigt entweder Chaperon- (links) oder Protease-Aktivität (rechts), wobei der funktionelle Wechsel von den PDZ-Domänen reguliert wird. **D:** *Thermotoga maritima* HtrA (homolog zu *E. coli* DegQ). Eine kurze deckelartige α -Helix (H_I) blockiert das aktive Zentrum bei niedrigen Temperaturen. Bei hohen Temperaturen wird H_I angehoben und ermöglicht den Zutritt zum aktiven Zentrum. Die primäre Funktion der PDZ-Domänen von DegQ ist die Bildung der Seitenwand, die für die Kontrolle des Substratzutritts zum aktiven Zentrum erforderlich ist. [Abbildungen aus Kim und Kim (2005); © 2005 Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology.]

Deg-Proteasen in Pflanzen

Das *Arabidopsis*-Genom enthält 16 Gene (*DEG1-16*) die für Deg-Proteasen kodieren (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), wovon auf der Grundlage von *in-silico*-Analysen mindestens vier in den Chloroplasten, sechs in den Mitochondrien und drei in einem von beiden Organellen lokalisiert sein sollen. Bei drei weiteren Deg-Peptidasen ist eine eindeutige Lokalisation nicht möglich (Huesgen *et al.*, 2005). Bemerkenswerterweise sind die verschiedenen Deg-Peptidasen in *Arabidopsis* enger miteinander verwandt, als Peptidasen gleicher Bezeichnung aus verschiedenen Organismen, weshalb von Adamska und Mitarbeitern die Umbenennung der *Arabidopsis*-Proteasen DegP1-16 in Deg1-16 vorgeschlagen wird (Huesgen *et al.*, 2005).

Deg1, Deg5 und Deg8 sind im Thylakoidlumen lokalisiert (Itzhaki *et al.*, 1998; Peltier *et al.*, 2002; Schubert *et al.*, 2002). Deg1 und Deg8 sind zueinander hoch homolog und Deg5 ist zwar bezüglich der Protease-Domäne zu ersteren homolog, besitzt jedoch keine PDZ-Domäne. Bislang sind nur Deg1 (Chassin *et al.*, 2002) und Deg2 (Haussuhl *et al.*, 2001) biochemisch charakterisiert.

In *E. coli* überexprimiertes *Arabidopsis* Deg1 spaltet *in-vitro* sowohl in der monomeren Form, als auch in der hexameren Form das nichtphysiologische amorphe Substrat β -Casein, sowie Proteine des Thylakoidlumens; dabei steigt die proteolytische Aktivität mit der Temperatur an und zeigt ein Aktivitätsmaximum beim pH 6 (Chassin *et al.*, 2002). Während Deg1 ein eher breites Substratspektrum zu haben scheint und die genaue Funktion unklar ist, wurde für Deg2 eine spezifische Funktion im Umsatz des Chloroplastenmembran-Proteins D1 des Photosystems II gefunden (Mizusawa *et al.*, 2003). Dabei wird D1 in zwei Schritten gespalten, zuerst in einem stromseitigen *Loop* durch Deg2 und im zweiten Schritt durch die Zn-Metallopeptidase FtsH der Thylakoidmembran (Lindahl *et al.*, 2000).

3.6 Protein Processing oder limitierte Endoproteolyse

Die limitierte Endoproteolyse von biologisch inaktiven Polypeptid-Präkursoren ist ein evolutionär alter Mechanismus, durch den biologisch aktive Proteine generiert werden (Übersichtsartikel von Seidah und Chrétien, 1997). Beispiele aus dem Bereich der Humanbiologie sind die Aktivierung der Zymogene der Pankreas-Verdauungspeptidasen Trypsin und Chymotrypsin (Neurath, 1989), die Insulin-Biosynthese (Steiner *et al.*, 1967) und die Freisetzung von Neuro- und endokrinen Peptid-Hormonen wie β -Endorphin bzw. Adrenocorticotropin. Bei Pflanzen sind vor allem die Processing Peptidasen in Mitochondrien und Chloroplasten erforscht worden. Da es bisher keinerlei Anhaltspunkte für die peroxisomale Protein-Prozessierung gibt, ist es sinnvoll sich einen Überblick über die bereits bekannten Prozessierungsmechanismen zu verschaffen.

3.6.1 Proprotein-Convertasen

In Eukaryonten werden zahlreiche sekretierte Proteine und Peptidhormone von Calcium-abhängigen Serin-Proteasen, den Proprotein-Convertasen (PC), aus höhermolekularen Vorstufen zurechtgeschnitten (Henrich *et al.*, 2005). Die sieben PCs in Säugern und das orthologe Kexin in *Saccharomyces* sind Multidomänen-Proteine bestehend aus einer katalytischen Domäne, einer konservierten P-Domäne, die essentiell für die Faltung innerhalb des ER ist, und einer variablen, oft Cys-reichen Domäne, an die sich bei manchen Proprotein-Convertasen C-terminal eine Transmembran- und eine kurze cytosolische Domäne anschließt. Das aktive Zentrum umfaßt die konservierte katalytische Triade vom Subtilisin-Typ bestehend aus Asp, His und Ser, sowie ein Oxyanion-stabilisierendes Asn (Lusson *et al.*, 1997). Die Spaltung der Substrate erfolgt sehr spezifisch nach mehreren basischen Resten. Eines der Haupterkennungsmotive ist (R/K)-X_n-(R/K)↓ (n = 0, 2, 4 oder 6; X kann jede AS sein außer Cys), wobei an P1 bevorzugt Arg auftritt. Die Feinregulierung der Substratspezifität wird über die P'-Reste und die X-Reste distal vom basischen Rest an P1 definiert (Jean *et al.*, 1995).

Mit den Proprotein-Convertasen ist das Subtilisin-Kexin-Isoenzym-1 (SKI-1) verwandt, der wichtigsten Processing-Peptidase im ER bei Säugern (Seidah *et al.*, 1999). Das Haupterkennungsmotiv für die spezifische Spaltung ist (R/K)-X-(V/L/I)-Z↓ (wo-

bei $Z \neq$ Pro, Glu, Asp und Cys; X ist oft basisch). Ein Orthologes wurde auch in *Arabidopsis* identifiziert (Seidah und Chretien, 2004).

3.6.2 Processing Peptidasen

Eine spezifische Gruppe von intrazellulären Peptidasen, die als Processing Peptidasen bezeichnet werden, sind notwendig für die Abspaltung der Signalsequenzen von neusynthetisierten Proteinen während oder nach dem Import ins spezifische Organell. Gut untersucht sind die Processing Peptidasen in Mitochondrien und Chloroplasten.

3.6.2.1 Mitochondriale Processing Peptidasen

Die meisten höhermolekularen Vorstufen mitochondrialer Proteine besitzen eine N-terminale Signalsequenz, die sie durch Interaktion mit den Chaperonen Hsp70 und Hsp90, sowie den Translokasen des äußeren und inneren Mitochondrienmembran-Komplexes (TOM- bzw. TIM-Komplex) in den Intermembranraum und die Mitochondrienmatrix befördert (Neupert *et al.*, 1997; Young *et al.*, 2003). Beim Import von Präkursoren von mitochondrialen Proteinen interagiert mitochondriales Hsp70 über eine Bindungsstelle (97% der Pflanzenmitochondrien-Präsequenzen besitzen eine Hsp70-Bindungsstelle) mit dem Signalpeptid und fungiert als molekularer Motor, indem es die Polypeptidkette unter ATP-Verbrauch durch die Mitochondrienmembranen zieht (Zhang und Glaser, 2002). In der Mitochondrienmatrix spaltet die Mitochondriale Processing Peptidase (MPP; EC 3.4.24.64) das i.d.R. 20-60 Aminosäuren lange Signalpeptid der meisten Vorläufer-Proteine in einem Schritt ab und generiert das reife Protein (Taylor *et al.*, 2001; Kitada *et al.*, 2003). Einige Proteine der inneren Membran und Matrix werden zweistufig prozessiert, sie enthalten C-terminal vom, durch die MPP abgespaltenen, Signalpeptid ein weiteres Oktapeptid mit dem Motiv (F/L/I)-X₂-(S/T/G)-X₄↓, das von der Mitochondrialen Intermediären Peptidase (MIP; EC 3.4.24.59, Subfamilie M3A, HEXGH-Zinkbindungsmotiv; ~75 kDa in Säugern) abgespalten wird (Kaloušek *et al.*, 1988, 1992). Bei Hefe besitzen cytosolisch synthetisierte und für den Intermembranraum vorgesehene Proteine (z.B. Cytochrom c₁) ebenfalls eine zweite Signaldomäne, die nach Re-Export in den Intermembranraum vom Inneren Membran Peptidase-Komplex (IMP; EC 3.4.21.89, Subfamilie S26A) bestehend aus den zwei Peptidasen IMP1 und IMP2 abgespalten wird (Schneider *et al.*, 1994).

Die Mitochondrialen Processing Peptidasen (MPP, Subfamilie M16B) bilden eine der drei Subfamilien innerhalb der Pitrylsin-Familie. Die MPP wurde von Schatz und Mitarbeitern in Extrakten mitochondrialer Matrix aufgrund ihrer Fähigkeit, synthetische mitochondriale Vorläufer-Proteine zu spalten, entdeckt (Böhni *et al.*, 1980). Sie wurden zuerst aus *Neurospora crassa* isoliert (Hawlitschek *et al.*, 1988) und dann in weiteren Organismen gefunden. In *Neurospora crassa* ist die MPP ein 110 kDa-Hetero-Dimer zweier homologer Untereinheiten, einer katalytisch inaktiven α -Untereinheit (α -MPP) von 57 kDa und einer aktiven β -Untereinheit (β -MPP) von 52 kDa. Die enzymatische Aktivität hängt von zweiwertigen Metallionen wie Zn^{2+} oder Mn^{2+} ab und wird von Metallchelatoren wie EDTA gehemmt. Bei *N. crassa* ist die β -Untereinheit identisch mit dem Core I-Protein des bc_1 -Komplexes der Atmungskette und hat sich als bifunktionelles Protein herausgestellt (Schulte *et al.*, 1989). In Pflanzen ist die MPP in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und α - und β -Untereinheiten entsprechen dem Core II- bzw. Core I-Protein des Ubiquinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase-Komplexes (Cytochrom bc_1 -Komplex oder Komplex III der Atmungskette); jedoch ist die proteolytische Aktivität unabhängig vom Elektronenfluß (Emmermann und Schmitz, 1993; Braun und Schmitz, 1995). Die Kristallstruktur der MPP aus Hefe wurde von Deisenhofer und Mitarbeitern aufgeklärt (Taylor *et al.*; 2001).

Während die mitochondriale Importmaschinerie helikale Konformationen der Signalsequenz erkennt (Abe *et al.*, 2000), deren Bildung durch den hohen Anteil an basischen Resten begünstigt ist (Roise *et al.*, 1986), ist für die Prozessierung eine Konformationsänderung notwendig, denn das Polypeptidsubstrat wird in flexibler gestreckter Anordnung gebunden. Innerhalb der Substrathöhle geht die Hauptkette Wasserstoffbrückenbindungen mit β -Strängen der katalytisch inaktiven α -MPP ein (siehe Abbildung 3.5A, Taylor *et al.*, 2001). Die Oberflächenladung der Substrathöhle ist negativ, demgegenüber weisen Signalsequenzen mitochondrialer Proproteine einen Überschuß an basischen Resten und damit an positiven Ladungen auf. Hinsichtlich des Substrats besteht eine Präferenz für Arg an P2 („proximales Arg“) sowie weiteren basischen Aminosäuren 3-10 Reste distal von P2, einen aromatischen oder selten auch hydrophoben Rest an P1' und polare Reste an P2' und P3' (Hendrick *et al.*, 1989; Ogishima *et al.*, 1995; Song *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1998). Trotzdem bleibt völlig unklar, wie die MPP spezifisch unterschiedliche Präsequenzen von mehreren hundert Proproteinen erkennt (Mukhopadhyay *et al.*, 2002). Zhang *et al.* (2001)

nehmen an, daß Tertiärstrukturelemente eine Hauptdeterminante der Substraterkennung darstellen. α -MPP weist einen konservierten Glycin-reichen flexiblen Oberflächen-*Loop* (Reste 284-301) auf, der sich an der Außenseite des Moleküls in der Nähe des aktiven Zentrums befindet und der, wie Versuche mit Deletionsmutanten gezeigt haben, für die enzymatische Aktivität essentiell ist (Nagao *et al.*, 2000). Die β -Untereinheit mit dem inversen Zinkbindungsmotiv HXXEH vollzieht die Spaltung der Peptidbindung durch koordinativ an Zink gebundenes und durch den Glutamat-Rest polarisiertes („aktiviertes“) Wasser, das nucleophil den Carbonyl-Kohlenstoff der Peptidbindung angreift.

Die MPP ist homolog zur Stroma Processing Peptidase (SPP) in Chloroplasten, die ebenfalls der Pitrilysin-Familie zugerechnet wird.

3.6.2.2 Chloroplasten Stroma Processing Peptidase

Die kernkodierte Proteine des Chloroplasten-Proteoms werden an freien Ribosomen des Cytoplasmas als höhermolekulare Vorstufen mit N-terminalen Transitpeptiden synthetisiert. Mittels zweier heterooligomerer Proteinkomplexe der äußeren und inneren Chloroplastenmembran (Toc- bzw. Tic-Translokation) werden die Proteine importiert und anschließend die Transitpeptide entfernt (Vothknecht und Soll, 2003). Die allgemeine Stroma Processing Peptidase (SPP) fungiert als prozessierendes Enzym im Chloroplasten (Robinson und Ellis, 1984; Richter und Lamppa, 1998). Proteine, die für das Thylakoidlumen vorgesehen sind, wie z.B. Plastocyanin, besitzen zweiteilige Transitpeptide, die zunächst von der SPP und im zweiten Schritt durch eine Signalpeptidase der Thylakoidmembran prozessiert werden (Hagemann *et al.*, 1986).

Die Aminosäuresequenz der Transitpeptide divergiert stark; Transitpeptide besitzen eine Länge von 31 bis 142 Aminosäuren, haben keine offensichtliche Konsensus-Sequenz und wahrscheinlich keine Sekundärstrukturelemente, sondern liegen als *random coil* vor (von Heijne und Nishikawa, 1991). Transitpeptide enthalten vermehrt die hydroxylierten Aminosäuren Serin und Threonin, wenig saure Aminosäuren und tragen basische Reste in der C-terminalen Region (Claros *et al.*, 1997; Emanuelsson *et al.*, 1999). Die wenigen bis heute bekannten Spaltstellen tragen Lys/Arg an P1 und neutrale Reste an P2 und P1' (Bruce, 2001). Das Transitpeptid verbleibt zunächst nach dem Prozessieren am Enzym und wird erst nach weiterer Spaltung freigesetzt (Richter und Lamppa, 1999). Die SPP besitzt wie Insulysin und β -MMP das für die M16 Pitrilysin-Familie typische inverse Zinkbin-

dungsmotiv HXXEH (Becker und Roth, 1992). Einige Chloroplasten-Importsignale werden auch von der MPP prozessiert, jedoch nicht an den authentischen Spaltstellen (Brink *et al.*, 1994).

Im Lysat von *Chlamydomonas reinhardtii* (Dobberstein *et al.*, 1977) und in isolierten Chloroplasten von *Pisum sativum* (Smith und Ellis, 1979) wurde *in-vitro* die prozessierende Aktivität gegenüber dem Präkursor der kleinen Untereinheit der Rubisco (preRBCS) nachgewiesen. Die SPP-Aktivität von *Chlamydomonas* eluiert über Gelfiltration als 90 kDa-Protein und ist insensitiv gegenüber divalenten Chelatoren (Chreighton *et al.*, 1993; Su und Boschetti, 1993). In *Pisum* wurden zwei monomere SPP-Isoenzyme mit 143 kDa und 145 kDa gefunden (Oblong und Lamppa, 1992). Die prozessierende Aktivität ist *in-vitro* ATP-unabhängig und wird durch EDTA, EGTA und 1,10-Phenanthrolin gehemmt (Robinson und Ellis, 1984). Die Tatsache, daß es in Weizen, einer Monokotylen, zwei SPP-Formen mit ~100 kDa und 110 kDa identifiziert wurden, deutet darauf hin daß die SPP innerhalb der Pflanzen eine gewisse Heterogenität zeigen (Oblong und Lamppa, 1992).

Liz und Sousa (2005) wiesen in einem erst kürzlich erschienenen Übersichtsartikel darauf hin, daß im Gegensatz zu den gut untersuchten Verhältnissen in Mitochondrien und Chloroplasten die Peroxisomalen Processing Peptidasen nach wie vor nicht identifiziert wurden.

3.7 Zielsetzung

Die Rolle der Cystein-Endopeptidase (CysEP) mit dem C-terminalem ER-Rückhaltessignal KDEL im Programmierten Zelltod des seneszierenden Endosperms von *Ricinus communis* ist gut belegt (Gietl *et al.*, 1997; Gietl und Schmid, 2001). Allerdings ist das Substrat und deshalb auch die exakte Funktion nicht bekannt. Eine denkbare Funktion wäre der Abbau cytosolischer Proteine sowie Zellwandproteine wie Extensine für die Rückführung der entsprechenden Degradationsprodukte an weiterlebende Gewebe der Pflanze.

Um Hinweise auf die Substratspezifität der *Ricinus* CysEP zu erhalten, wurde der Komplex der nativen *Ricinus* CysEP mit dem kovalent gebundenen Inhibitor H-D-Val-Leu-Lys-Chloromethylketon kristallisiert. In einem weiteren Ansatz zur Klärung der Substrat- und Spaltspezifität erfolgte die biochemische Analyse des proteolytischen β -Casein-Verdaus.

Nach Minamikawa und Mitarbeitern sind in *Vigna mungo* mit einer KDEL-Peptidase gefüllte Vesikel (KV-Vesikel) nach Fusion mit Proteinspeichervakuolen (PSV) an der Mobilisierung von Speicherproteinen beteiligt (Toyooka *et al.*, 2000). In Endosperm von keimendem *Ricinus* ist dies nicht anzunehmen, da die Speichereiweißmobilisierung (Tag 1-2) zeitlich deutlich vom PCD getrennt ist (Tag 5-7; Gietl *et al.*, 1997). Um eindeutig zu belegen, daß Ricinosomen in *Ricinus communis* am PCD beteiligt sind und nicht an der Speichermobilisierung, wurden reifende Samen, also eindeutig Gewebe zum Zeitpunkt der Speicherbildung, untersucht.

Um die Funktion und Gewebespezifität der drei KDEL-Peptidasen in *Arabidopsis* zu untersuchen, wurden transformierte Pflanzen, die Glucuronidase (GUS) unter der Kontrolle der drei Promotoren von *AtCEP1*, *AtCEP2* und *AtCEP3* exprimieren (Gietl und Schmid, 2001), hinsichtlich ihrer Funktion analysiert. Dabei wurden Ort und Zeitpunkt der Expression erfasst und durch Licht- und Fluoreszenz-Mikroskopie dokumentiert.

Desweiteren sollten die drei KDEL-Proteasen in Geweben von *Arabidopsis* nachgewiesen werden. Hierzu wurden Antikörper gegen synthetische Peptide generiert, die jeweils möglichst spezifische Bereiche für *AtCep1*, *AtCep2* und *AtCep3* repräsentieren.

Da die früher als Glyoxysomale Processing Peptidase vermutete *Ricinus* CysEP (Gietl *et al.*, 1997) sich als nicht in den Glyoxysomen, sondern in den Ricinosomen lokalisierte und im PCD bei Pflanzen tätige Protease herausstellte, wurde erneut versucht die

Glyoxysomale Processing Peptidase zu reinigen und zu charakterisieren. Untersuchungsobjekt waren die fettspeichernden Kotyledonen von *Citrullus vulgaris*, da sie nach Abschluß der Fettmobilisierung ergrünen und Seneszenz mit programmiertem Zelltod erst viel später durchlaufen. Ursprünglich war man von der Wassermelone zum Untersuchungsobjekt *Ricinus* gewechselt, da beobachtet wurde, daß die prä-gMDH-prozessierende Aktivität in Kotyledonen der Wassermelone instabil ist (Gietl und Hock, 1984), in *Ricinus* Endosperm dagegen stabil (Gietl und Hock, 1986). Unveröffentlichte Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Gietl vor allem geleistet von Dipl.Biol. M. Schmid in Zusammenarbeit mit Dr. F. Kaloucek von der Yale University hatten ergeben, daß sich die glyoxysomale Malatdehydrogenase (prä-gMDH) mit einer angereicherten glyoxysomalen Peptidase aus Wassermelonen-Kotyledonen *in-vitro* prozessieren läßt. Aus den angereicherten Glyoxysomen sollte die Peptidase über Säulenchromatographie gereinigt und charakterisiert werden und die Aminosäure-Sequenz mittels Edman-Abbau bestimmt werden. Um eine spezifische Anreicherung der Glyoxysomalen Processing Peptidase zu dokumentieren und einen Funktionsnachweis zu erhalten, wurden fluoreszenzgequenchte Peptide synthetisiert, die die postulierten Spaltstellen von in den Glyoxysomen prozessierten Proteinen mit PTS2 abdecken.

4. Material und Methoden

4.1 Allgemeiner Teil

4.1.1 Anzucht von Versuchspflanzen

4.1.1.1 *Ricinus communis*

Für die Isolation der Ricinisomen wurden *Ricinus*-Samen (*Ricinus communis* L., Ernte 2000; Landreth Seed Co., Baltimore, MD, USA) nach dem Wässern in fließendem Leitungswasser über Nacht in feuchtes, autoklaviertes Vermiculit gesetzt, damit knapp bedeckt und mit stabiler Alufolie lichtdicht verschlossen. Anschließend wurden die Samen fünf Tage bei 30°C im Dunkeln zur Keimung gebracht. In diesem Stadium ließ sich das Endosperm leicht von den Kotyledonen abnehmen.

Für die Analyse von reifenden *Ricinus*-Samen wurden Samen in Töpfe mit Gartenerde gesetzt und im Gewächshaus bei einer Umgebungstemperatur von 25°C bis zur Samenreife herangezogen. Alternativ wurde entsprechendes, im Freien gewachsenes Pflanzenmaterial vom Botanischen Garten München bezogen.

4.1.1.2 *Arabidopsis thaliana*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden GUS-Reportergen-Linien mit Kanamycin-Resistenz in Columbia als genetischer Hintergrund untersucht (Gietl und Schmid, 2001). Die Anzucht erfolgte auf MS-Agar (Murashige und Skoog, 1962) mit Mikrosalzen und Vitaminen nach Gamborg *et al.* (1968). Nach dem Autoklavieren wurde dem Medium bei einer Temperatur von 60°C Kanamycin als Selektionsmittel in einer Endkonzentration von 50 µg/mL zugefügt. Vor dem Ausbringen wurden Samen mit 80% Ethanol / 0,1% Triton-X-100 im Schüttler (Eppendorf) bei maximaler Geschwindigkeit 30 min sterilisiert und danach fünfmal je 5 min unter Schütteln mit sterilem mQ gewaschen. Die Samen wurden entweder mit der 1000 µL-Pipette gleich auf MS-Agar-Platten ausgebracht oder bis zur Aussaat im Kühlschrank gelagert. Für die Keimung wurden die Platten mit Parafilm abgedichtet, vertikal aufgestellt und danach im klimatisierten Kulturraum bei 22°C dauerbelichtet (Belichtungsintensität 100 µE/m²s). Nach spätestens 7–10 Tagen konnten trans-

gene Pflanzen eindeutig erkannt und vor dem Umsetzen in PE-Töpfe mit Erde (Einheitserde Typ T mit Perlit) zur Regeneration 1-2 Tage auf normale MS-Agar-Platten gebracht werden. Für die Ausbildung der Wurzeln war in den ersten Tagen auf reichliche Wasserzufuhr zu achten. Dazu kamen die Pflanzen in unten geschlossene Schalen und wurden bis zur einsetzenden Ausbildung der Blattrosette mit einer Klarsicht-Schutzhaube abgedeckt. Das weitere Wachstum erfolgte in Phytokammern (Convion, Canada) unter Langtagbedingungen mit 16 h Belichtung bei 65% rel. Luftfeuchte und 22°C bzw. 8 h Dunkelheit bei 75% rel. Luftfeuchte und 18°C. Alternativ wurden die Versuchspflanzen im Gewächshaus herangezogen. Zu Beginn der Blüte nach etwa 20 Tagen wurde ein Aracon aufgesetzt, das später die Samen auffing und eine unerwünschte Ausbreitung der Samen, sowie direkten Kontakt mit Nachbarpflanzen verhinderte. Infloreszenzen für mikroskopische oder biochemische Untersuchungen wurden etwa nach vier Wochen bis zur einsetzenden Samenreife nach etwa sieben Wochen gewonnen. Bis dahin wurden die Pflanzen etwa zweimal wöchentlich gegossen. Um eine völlige Austrocknung zu gewährleisten, wurden die Pflanzen kurz vor der Samenreife nach 10-12 Wochen nicht mehr gegossen. Zur Gewinnung der Samen wurden die Aracons kräftig geklopft und unter Mitnahme aller Schoten nach oben abgestreift. Das Aracon wurde auf ein gefaltetes Blatt weißen Papiers ausgeschüttet und die Samen mit kleinen Sieben von anderem Pflanzenmaterial getrennt. Abschließend wurden die Samen in Reaktionsgefäßen mit perforiertem Deckel gesammelt und im Kühlraum gelagert.

MS-Agar:	100 mL 10x Makrosalze
	2,5 mL 400x Mikrosalze
	2,5 mL 400x Vitamine
	10 g Saccharose
	1 g MES
	in ca. 900 mL dH ₂ O lösen
	mit ca. 230 mL 10 N KOH auf pH 5,8 einstellen
	9 g Agar (Difco) zufügen und autoklavieren

4.1.1.3 *Citrullus vulgaris*

Wassermelonen-Samen der Sorte „*Dixie Queen*“ (Landreth Seed Co., Baltimore, MD, USA) wurden in Pflanzschalen (60 x 40 cm) mit feuchtem Vermiculit gekeimt. Dazu wurden die Samen (~150 Samen oder 15 g je Schale) in mit Hilfe eines Lineals geformte parallele Rinnen gelegt und leicht mit Vermiculit bedeckt. Die Schalen wurden mit stabiler Alufolie lichtdicht verschlossen und zur Keimung der Samen 3 Tage im Dunkeln bei 30°C inkubiert. Für die Anreicherung von Glyoxysomen wurden die Kotyledonen geerntet. Dabei sollte die Ausbeute etwa 50 g aus 4 Schalen betragen.

4.1.2 Gewinnung von Proteinextrakten

4.1.2.1 *Ricinus communis*

Reifende Samen von *Ricinus* entsprechender Stadien (für die Nomenklatur siehe Abbildung 5.19 und Greenwood und Bewley, 1982) wurden geerntet. Die Kapseln wurden mit einer Rasierklinge längs geteilt. Samenschale, Karunkula, Nucellus und Endosperm wurden mittels Rasierklinge und Skalpell voneinander getrennt. Die entsprechenden Gewebe eines Samens 10, 15 und 20 Tage nach Bestäubung (DAP: *days after pollination*), mit Ausnahme der 20 DAP Samenschale (in diesem Stadium bereits verholzt), wurden gewogen und im 1,5 mL-Reaktionsgefäß in Puffer (3 µL/mg Frischgewicht) bei 4°C homogenisiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit 3x SDS-Probenpuffer aufgekocht, und 30 µL Probe mittels 12,5%-SDS-PAGE und *Western-blotting* mit anti-CysEP-Antikörper bzw. den anti-*AtCep*-Antikörpern (siehe Tabelle 5.2) untersucht.

Extraktionspuffer:	50 mM HEPES pH 7,5
	1 mM DTT
	100 µM PMSF
	100 µM N- <i>p</i> -tosyl-L-Lys-CMK

4.1.2.2 *Arabidopsis thaliana*

Die Proteinextraktion aus vegetativen und generativen Geweben von *Arabidopsis* erfolgte nach der geringfügig modifizierten Methode von Martinez-Garcia et al. (1999). Die Konzentration an Bromphenolblau im Puffer Z wurde um den Faktor 100 erhöht. Für den Test von anti-*AtCep*-Antikörpern (siehe Abbildung 5.18) wurden 4 Tage alte *Ara-*

bidopsis-Keimlinge (40/200 μ L Puffer E), Wurzeln von 10 Tage alten Keimlingen (50/200 μ L), Blüten (Stadium 14; 30/200 μ L), grüne Schoten (St.16; 30/200 μ L), reife grüne Samen (St.17; Samen aus 30 Schoten/200 μ L) und gelb-werdende Schoten (St.18; 20/200 μ L) für die Protein-Extraktion verwendet. Für den Nachweis der KDEL-Peptidasen aus *Arabidopsis*-Geweben mit dem anti-CysEP-Antikörper (siehe Abbildung 5.15) wurden 10 Tage alte Keimlinge (25/200 μ L), Kotyledonen und Primärbätter (25/200 μ L), der Übergang vom Hypokotyl zur Wurzel (50/200 μ L), Wurzeln von 10 Tage alten Keimlingen, Blüten (St.14), grüne Schoten (St.16), Schoten ohne Narben (St.16; 30/200 μ L), isolierte Narben (St.16; 50/200 μ L) und reife grüne Samen (St.17) verwendet. Die Isolierung von *Arabidopsis*-Geweben erfolgte mit dem Skalpell. Keimlinge wurden mit einem Zahnstocher vom Agar gehoben und in ein Eppendorf-Tube überführt. Das Pflanzenmaterial wurde in Flüssigstickstoff schockgefroren und mit einem ebenfalls vorgekühlten Glaspestill fein zermörsert, nach Zugabe von 200 μ L Puffer E mit dem Pestill homogenisiert und auf Eis gekühlt. Nachdem alle Proben aufgearbeitet waren, wurden die Proben auf RT angewärmt, um SDS wieder in Lösung zu bringen und anschließend 10 min mit der Tischzentrifuge bei 14000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, in ein neues Tube überführt, mit 1/10 Volumen Puffer Z eingestellt und 3 min aufgekocht. Jeweils 30 μ L des Proteinextraktes wurden aufs Gel geladen und danach über SDS-PAGE analysiert.

Puffer E:	125 mM Tris/HCl pH 6,8
	1% (w/v) SDS
	10% (v/v) Glycerol
	50 mM Na ₂ S ₂ O ₅
Puffer Z:	125 mM Tris/HCl pH 6,8
	12% (w/v) SDS
	10% (v/v) Glycerol
	22% (v/v) β -ME
	0,1% (w/v) Bromphenolblau

4.1.3 Proteinbestimmung

Der Bradford-Assay (Bradford, 1976) ist der sensitivste quantitative Proteinfärbere-Assay. Im sauren Milieu und in Gegenwart von Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Säurefarbstoffs Coomassie-Brillantblue von 465 nach 595 nm. Der Farbstoff bindet unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Reste. Am wichtigsten sind Wechselwirkungen mit Arg, in geringerem Maße mit Lys, His, Trp, Tyr und Phe. Die Stammlösung besteht aus Farbstoff, Phosphorsäure und Ethanol (Biorad, München).

Der Assay ist sehr tolerant gegenüber den gebräuchlichen Reduktionsmitteln β -ME und DTT in Puffern. Die Nachweisgrenze liegt abhängig von der Aminosäure-Zusammensetzung eines Proteins bei 0,05–0,5 μg Protein/mL. Der Hauptnachteil ist, daß gleiche Mengen an verschiedenen Standardproteinen erhebliche Differenzen in ihren resultierenden Absorptionskoeffizienten verursachen können.

Ansatz (1000 μL):	x μL Probe	Nullwert:
	(800-x) μL mQ	800 μL mQ
	200 μL Bradford-Reagenz	200 μL Bradford-Reagenz

Mit dem Standardprotein BSA wurde eine Eichgerade ermittelt, aus der sich zur Errechnung der Proteinkonzentration folgende Formel ergab:

$$\text{mg/mL} = \text{Abs}/(0,0576 \cdot x \text{ } \mu\text{L})$$

4.1.4 Aufkonzentrieren von verdünnten Proteinlösungen

Verdünnte Proteinlösungen wurden mit Ultrazentrifugations-Filtereinheiten (500 μL , 7 mL und 15 mL; 5 und 10 kDa-MWCO; Vivascience, Hannover oder alternativ Millipore, Schwalbach) in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (500 μL -Einheiten) oder einer Kühlzentrifuge (7 mL- und 15 mL-Einheiten) mit Swing-Out-Rotor (Labofuge GL 4400; Heraeus-Christ) bei 4°C aufkonzentriert. Zum Minimieren unspezifischer Adsorption wurden die Filtereinheiten vor Gebrauch mindestens eine Stunde mit 5% Tween-20 / 0,02% NaN_3 in mQ vorbehandelt, danach zur Entfernung des Detergens gut mit dH_2O , zuletzt mit Puffer gespült.

4.1.5 SDS-PAGE und *Western-Blot*

4.1.5.1 Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden aufgrund ihres Molekulargewichtes im elektrischen Feld in einer diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamid Gelelektrophorese mit Na-dodecylsulfat (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die SDS-PAGE erfolgte in 10% oder 12,5% Trenngelen mit 5% Sammelgel nach Lämmli (1970) unter Verwendung der Biorad Mini-Protean II-Kammer (Biorad, München). Die Trenngellösung wurde nach Zugabe des Radikalbildners APS und des Vernetzers TEMED (Serva, Heidelberg) in die vorbereitete Apparatur gegossen und zur Ausbildung einer geraden Front mit Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde die Alkoholschicht entfernt und das Sammelgel eingefüllt. Teflon-Kämme wurden luftblasenfrei in das Sammelgel eingesetzt und die ausgehärteten Gele sofort verwendet oder durch Einwickeln in Klarsichtfolie gegen Austrocknung geschützt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Für die Gelelektrophorese wurden die Proteinproben mit 3-fach Probenpuffer versetzt und 2 min bei 95°C aufgeköcht. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 130 V.

Acrylamid-Stammlösung:	Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1 (Rotiphorese 30, #3029.1; Roth)
10% Trenngel:	9,3 mL mQ 3,72 mL 2 M Tris/HCl pH 8,8 6,7 mL Acrylamid-Stammlösung 200 µL 10% SDS 200 µL 10% APS 6,7 µL TEMED
12,5% Trenngel:	7,7 mL mQ 3,72 mL 2M Tris/HCl pH 8,8 8,3 mL Acrylamid-Stammlösung 200 µL 10% (w/v) SDS 200 µL 10% (w/v) APS 6,7 µL TEMED

5% Sammelgel:	6,9 mL mQ 1,25 mL 1 M Tris/HCl pH 6,6 1,7 mL Acrylamid-Stammlösung 100 µL 10% SDS 150 µL 10% APS 5 µL TEMED
3-fach Probenpuffer:	175 mM Tris/HCl pH 6,6 15% Glycerol 5% SDS 0,25% Bromphenolblau 5% β-Mercaptoethanol, wurden vor dem Ansetzen der Proben frisch zugegeben
10-fach SDS-Laufpuffer:	250 mM Tris pH 8,3 1,9 M Glycin 1% SDS

4.1.5.2 *Western-Blot*

Der Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen (Protran; Schleicher & Schüll, Dassel) erfolgte durch *Tankblotting* (5 L-Tank; Hoefer/Pharmacia) bei 4°C und 170 mA über Nacht (etwa 16-18 h). Anschließend wurden die Blots mit 1% Rindersealbumin (Fluka, Buchs) oder 5% Magermilchpulver (Saliter, Kempten) in TBST (*Tris-buffered-saline* + Tween-20) bei RT 1 h unter Schwenken geblockt. Die Blots wurden 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper, verdünnt in 1% BSA in TBST dekoriert und 6x 5 min mit TBST unter ständigem Schwenken gewaschen (ca. 5 mL/cm² Blot). Die immunoreaktiven Proteine wurden über Sekundär-Antikörper (z.B. anti-*Rabbit* aus Ziege; Sigma) gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase und anschließender Farbreaktion zwischen Nitrotetrazoliumblau (NBT; Boehringer, Ingelheim) und dem künstlichen Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat (BCIP; Boehringer, Ingelheim) detektiert. Hierzu wurde der Blot nach dem Waschen 5 min mit AP-Puffer pH 9,5 äquilibriert. Bei *low-abundance*-Proteinen wurde das wesentlich sensitivere Chemilumineszenz-System bestehend aus Sekundär-Antikörper gekoppelt mit *Horseradish*-Peroxidase (anti-*Rabbit*-HRP aus Ziege; Pierce) und den Substraten ECL-Plus (RPN 2132; Amersham-Pharmacia) oder alternativ Western-Pico/-Femto (Pierce) gemäß Herstellerangaben

eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit Biomax Röntgenfilm (Kodak), CCD-Kamera (ORCA II ERG, Hamamatsu) oder Typhoon-Laserscanner (Amersham-Pharmacia).

5x <i>Blotting</i> -Puffer:	1,32 M Glycin 100 mM Tris/HCl pH 8,3
10x TBS:	200 mM Tris/HCl pH 7,5 1,5 M NaCl
TBST:	20 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl 0,05% (v/v) Tween-20
AP-Puffer:	100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 100 mM Tris/HCl pH 9,5
NBT-Stammlösung:	5% (w/v) in 70% DMF
BCIP-Stammlösung:	5% (w/v) in 100% DMF
Färbelösung für AP:	50 µL BCIP-Stammlösung (0,025% Endkonzentration) 40 µL NBT-Stammlösung (0,02% Endkonzentration) in 10 mL AP-Puffer

4.1.5.3 Coomassie-Färbung

Polyacrylamid-Gele wurden nach abgeschlossener Elektrophorese in Coomassie-Lösung gefärbt. Dazu wurden die Gele in der Färbelösung über Nacht geschüttelt oder in der Mikrowelle kurz erhitzt und 15 min bei RT geschüttelt, danach in Entfärbelösung solange gewaschen, bis der Hintergrund farblos erschien.

Coomassie-Färbelösung:	0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 40% (v/v) Ethanol (oder alternativ Methanol) 10% (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung:	40% (v/v) Ethanol (oder alternativ Methanol) 10% (v/v) Essigsäure

4.1.5.4 Silberfärbung

Das Funktionsprinzip der Silberfärbung wird bei Rabilloud (1990) eingehend besprochen. Gegenüber der Anfärbung der Proteingele mit dem Farbstoff Coomassie-Brillantblue (Nachweisgrenze je nach Farbstoffbindevermögen 50–500 ng) ist die Silberfärbung mit einer Nachweisempfindlichkeit von 1-10 ng um den Faktor 50 sensitiver (Shevchenko *et al.*, 1996). Die Proteine werden im Gel fixiert und nach Waschen, einer Sensibilisierung mit Natriumthiosulfat und wieder Waschen mit einer Silbernitratlösung imprägniert. Silber-Ionen werden von geladenen Resten der Proteine komplexiert und im Bereich der funktionellen Gruppen und Peptidbindungen zu Silberkeimen reduziert. Wie im fotografischen Prozeß, werden durch das Reduktionsmittel Natriumthiosulfat alle Silber-Ionen bevorzugt wegen eines geringfügig höheren Redoxpotentials an den Keimen reduziert. Damit nicht auch die Silberionen in der proteinfreien Gelmatrix reduziert werden (*Background*), ist die Reaktion rechtzeitig abubrechen. Die Färbung ist im Kühlschrank einige Wochen stabil. 1-D- und 2-D-Gele wurden nach Blum *et al.* (1987) gefärbt. Die Gele wurden für die Dokumentation gescannt (Epson 1610) oder am Leuchttisch (Leitz) mit der Digital-Kamera fotografiert (Coolpix 4500; Nikon) und danach getrocknet.

Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987)

1. Fixieren	> 1 h	50% MeOH, 12% HAc, 0,02% Formaldehyd (FA)
2. Waschen	3x 20 min	50% EtOH
3. Sensibilisieren	1 min	0,02% Na-thiosulfat
4. Waschen	3x 20 sec	mQ
5. Imprägnieren	20 min	0,2% Silbernitrat, 0,03% FA
6. Waschen	2x 20 sec	mQ
7. Entwickeln	2-4 min	6% Na-carbonat, 0,02% FA, 0,0004% Na-thiosulfat
8. Waschen	2x 2 min	mQ
9. Abstoppen	10 min	50% MeOH, 12% HAc
10. Waschen	> 20 min	50% MeOH

4.1.5.5 Native “SDS-PAGE”

Für die native „SDS-PAGE“ wurden Gele ohne SDS gegossen, jedoch in Standard-SDS-Laufpuffer gefahren. Die Proben wurden mit 30% nativem Probenpuffer versetzt und nicht erhitzt. Die Elektrophorese wurde bei 25 V über Nacht bei 8°C durchgeführt.

8% Trenngel:	10,1 mL mQ 3,75 mL 2 M Tris/HCl pH 8,8 6,2 mL Acrylamid-Stammlösung 150 µL 10% APS 15 µL TEMED
10% Trenngel:	8,55 mL mQ 3,75 mL 2 M Tris/HCl pH 8,8 7,75 mL Acrylamid-Stammlösung 150 µL 10% APS 15 µL TEMED
5% Sammelgel:	14,55 mL mQ 2,85 mL 1 M Tris/HCl pH 6,6 3,75 mL Acrylamid-Stammlösung 211 µL 10% APS 21,1 µL TEMED
Ladepuffer für native Gele:	0,4 M Tris/HCl pH 6,6 50% Glycerol 0,2% Bromphenolblau
50 µL Probe werden mit 20 µL nativem Ladepuffer versetzt.	
10-fach SDS-Laufpuffer:	250 mM Tris pH 8,3; 1,9 M Glycin 1% (w/v) SDS

4.1.5.6 Aktivitätsgel-Assay

Für die Aktivitätsgelassays wurde die von Heussen und Dowdle (1980) beschriebene Methode für die eigenen Erfordernisse adaptiert.

Fluoreszenz-Aktivitätsgel-Assay

Die Gele wurden zum Auswaschen des SDS und Rückfalten der Proteine einmal 1 h mit 2,5% Triton-X-100 in Tris-Puffer pH 7,4 und 4x 30 min bei 4°C in Äquilibrium-

puffer geschwenkt. Aktivitätsgele wurden nach dem Äquilibrieren 10–30 min in Substrat (100 μ M Cbz-Phe-Arg-AMC in Äquilibrierungspuffer) inkubiert, die Detektion der Fluoreszenz erfolgte nach Anregung unter der Geldokumentationapparatur bei 354 nm mit einer Digitalkamera (Nikon Coolpix 4500).

Gelatine-Aktivitätsgel-Assay

Für Gelatine-Aktivitätsgele wurden 10% Gelatine (G-2625; Sigma) in mQ bei 60°C im Thermoschüttler (Eppendorf) in Lösung gebracht und vor dem Gießen von Trenn- bzw. Sammelgel 50 μ L pro 10 mL (Endkonzentration 0,05%) eingerührt und einpolymerisiert (Heussen und Dowdle, 1980). Nach der Rückfaltung wurden die Gelatinegele auf eine Glasplatte gelegt, in Cellophan eingewickelt und mind. 24 h bei 30°C bzw. 45°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend bis zum deutlichen Erscheinen der Verdauungshöfe entfärbt.

Triton-X-100-Puffer: 2,5% (v/v) in 10 mM Tris/HCl pH 7,4

Äquilibrierungspuffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,4

20 mM NaCl

1 mM MgCl₂

1 mM KCl

Substrat-Stammlösung: 20 mM Cbz-FR-AMC in N,N-Dimethylformamid (DMF);
2,24 mg in 200 μ L)

Coomassie-Färbelösung für Sequenziergele:

0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250

10% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung für Sequenziergele:

10% (v/v) Essigsäure

4.1.6 Herstellung und Kontrolle von anti-AtCep-Peptid-Antikörpern

Es wurden Affinitäts-gereinigte Antikörper gegen synthetische Peptide, die nichtkonservierten Regionen von *AtCep1*, *AtCep2* bzw. *AtCep3* entsprachen, erzeugt (Eurogentec, Belgien). Für jede KDEL-Peptidase wurden zwei Kaninchen immunisiert, um die Chance auf eine Immunreaktion zu erhöhen. Dazu wurden für jede der drei Peptidasen zwei unterschiedliche exponierte Epitope von 14 bis 16 Aminosäureresten Länge ausgewählt und die

zwei entsprechenden synthetischen Peptide beiden Kaninchen als Antigen gespritzt. Vor der Immunisierung wurde den Kaninchen als negative Kontrolle Blut entnommen (*Prebleeding*). Aliquots der *Final-Bleedings* wurden einer Affinitätsreinigung gegen die entsprechenden Peptide unterzogen. Im *Dot-blot*-Experiment wurde untersucht, ob die Antikörper die Peptide erkennen, gegen die das Kaninchen immunisiert wurde und ob sie Kreuzreaktivität zeigen. Desweiteren wurden die Antikörper im *Western-blot* eingesetzt, um in Gewebeextrakten aus *Arabidopsis*-Gewebe die KDEL-Peptidasen nachzuweisen.

Kontrolle der Antikörper mittels Dot-blot

Jedes der synthetischen Peptide wurde in Lösung gebracht und auf eine Konzentration von 1 mg/mL eingestellt. Hierzu wurde jeweils etwa 1 mg eingewogen und die schwach sauren bzw. basischen Peptide wurden mit 1/20 des Endvolumens mQ aufgenommen, mit 1/10 10x TBS gepuffert und mit 0,02% NaN₃ aufgefüllt. Davon abweichend wurde das basische Peptid Cep1-I zunächst mit verdünnter Essigsäure, das saure Peptid Cep2-I mit Ammoniakwasser in Lösung gebracht. 5 µL einer nochmals 1:10 mit TBS verdünnten Peptidlösung – was einer Peptidmenge von 500 ng je *Spot* entsprach - wurden mittels einer *Dot-blot*-Apparatur (Eigenbau) und angeschlossener Vakuumpumpe (VacuGenePump; Pharmacia-LKB), auf Nitrocellulose-*Blotting*-Membran (Protran B85; Schleicher&Schuell, Dassel) aufgebracht. Die Auftragung der Peptide erfolgte in Zeilen. Darunter wurde eine Zeile Spots mit ~0,5 mg CysEP aus Ricinosomen aufgetragen. Die Membran wurde vor dem Montieren mit mQ gewässert. Im weiteren wurde analog dem *Western-Blotting* verfahren: Nach dem Blocken mit 5% Magermilchpulver in TBST wurde die Membran mit Schere in senkrechte Streifen geteilt, die jeweils Spots der 7 verschiedenen Antigene enthielten. Danach wurde mit dem primären Antikörper dekoriert, gewaschen, mit dem sekundären Antikörper anti-*Rabbit*-HRP dekoriert und wieder gewaschen. Die Detektion erfolgte über das Western-Pico Chemolumineszenz-System von Pierce und die Blots wurden mit einer CCD-Kamera (ORCA II ERG, Hamamatsu) fotografiert.

4.1.7 Mikroskopie

Die mikroskopischen Arbeiten wurden zusammen mit Dr. J. Greenwood (University of Guelph, Canada) durchgeführt, der im Zeitraum Juli 2002 bis Juli 2003 als Gastforscher in der Arbeitsgruppe Gietl tätig war.

4.1.7.1 Histologische GUS-Färbung

Die Glucuronidase (GUS)-Aktivität von *Arabidopsis*-Transformanten (Jefferson, 1987), in denen das Reportergen unter der Kontrolle der Promotoren von *AtCEP1*, *AtCEP2* und *AtCEP3* exprimiert wird (Gietl und Schmid, 2001), wurde zum einen mit dem Substrat X-Gluc (A 1113.0100; AppliChem, Darmstadt) anhand der blauen Färbung des gebildeten Indolpräzipitats im Lichtmikroskop, zum anderen mit dem Substrat ELF97-Gluc (Molecular Probes, Leiden, NL) fluoreszenzmikroskopisch anhand der grünen Fluoreszenz des Reaktionsproduktes nachgewiesen. Es wurden Keimlinge und Infloreszenzen oder Teile davon präpariert und mikroskopiert. Objekte mit X-Gluc-Färbungen wurden, da der Farbstoff in Ethanol stabil ist, in Paraffin eingebettet.

Glucuronidase-Substrat X-Gluc

Die Färbung wurde nach der Methode von Rodriguez-Pousada *et al.* (1993) durchgeführt. Zur Fixierung wurden die Gewebe in 90%iges eiskaltes Aceton (-20°C) getaucht und 15–20 min auf Eis inkubiert. Nach Abschütten des Acetons wurde das Gewebe 5 min in Spüllösung äquilibriert. Für die Farbreaktion wurde die Spüllösung durch Reaktionslösung ersetzt. Die Objekte wurden 10 min oder länger bis zur völligen Benetzung vakuum-infiltriert und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Reaktionsende wurde verbliebenes Chlorophyll mit einer Alkohol-Reihe (30%, 50%, 70%) entfernt. In 70% Ethanol waren die Objekte dauerhaft lagerfähig.

X-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D-Glucuronid-Cyclohexylammonium-Salz):

Stammlösung: 100 mM (100 mg wurden in 1,92 mL DMF gelöst und bei -20°C gelagert)

Spüllösung: 50 mM NaP_i pH 7,2
 0,5 mM K₃Fe(CN)₆
 0,5 mM K₄Fe(CN)₆

Reaktionslösung:	50 mM NaP _i pH 7,2
	0,5 mM K ₃ Fe(CN) ₆
	0,5 mM K ₄ Fe(CN) ₆
	2 mM X-Gluc (Stammlösung 1:50)

Glucuronidase-Substrat ELF97-Gluc (ELF97-β-D-Glucuronid)

Das fluorogene Substrat ELF97-Gluc (Molecular Probes, Leiden, NL) ist gegenüber X-Gluc wesentlich sensitiver. Weitere Vorteile sind das Fluoreszenzmaximum im physiologischen pH-Bereich, der breite *Stokes shift* von 160 nm zwischen der Anregungswellenlänge 365 nm und der Emissionswellenlänge 525 nm (Zhou *et al.*, 1996) sowie die optionale Mikroskopie mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM).

Pflanzenmaterial von *Arabidopsis* wurde zunächst gewaschen, dann in Fixierungspuffer 10min auf Eis vakuumfiltriert, unter Bewegung 1 h auf Eis weiter fixiert, 15 min auf Eis in Äquilibrierungspuffer äquilibriert und für die Reaktion 1 h in Reaktionspuffer bei 37°C inkubiert. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop (Axioskop) und dem ELF97-Filtersatz (Anregung 365 nm / *Beamsplitter* 395 nm / Emission 520 nm LP). Alternativ wurde zur Eliminierung der Chlorophyll-Autofluoreszenz der Filter Emission 535/50 HQ eingesetzt. Ausgewählte Objekte wurden mit einem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM, Zeiss) im Haus am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München (Weihenstephan) aufgenommen. Die Fluoreszenz war stabil gegen *Photobleaching* und im Lagerpuffer mehrere Wochen haltbar. In 70% Ethanol war das Präzipitat nicht beständig.

ELF97-Stammlösung:	5 mM ELF97-Gluc in DMSO
Waschpuffer:	0,15 M NaP _i pH 7,0 0,02% (w/v) NaN ₃
Fixierungspuffer ELF97:	0,15 M NaP _i pH 7,0 0,2% (v/v) Triton-X-100 1% Formaldehyd
Äquilibrierungspuffer:	0,15 M NaP _i pH 7,0 0,02% Triton-X-100
Reaktionspuffer:	0,15 M NaP _i pH 7,0 0,02% Triton-X-100 1:200 ELF97-Stammlösung

Lagerpuffer: 0,15 M NaP_i pH 7,2
0,02% NaN₃

4.1.7.2 Einbettungen

Paraffin-Einbettung

Keimlinge oder generative Pflanzenteile von *Arabidopsis* mit GUS-Expression, sowie reifende und keimende Samen von *Ricinus* wurden in Paraplast Plus (Sigma) eingebettet. Maximal 2-5 mm dicke Gewebestücke von *Ricinus* wurden in 4% Formaldehyd (FA) in PBS pH 7,4 über Nacht bei 4°C fixiert, dann 2x 1 h in PBS (*phosphate buffered saline*) pH 7,4 gewaschen und über eine aufsteigende Alkoholreihe in mQ (30%, 50%, 70%, 2x 90%, 96%, 2x 100%, 2x 100% Isopropanol; jeweils für 1 h) entwässert. Anschließend wurden die Proben 3x für 1 h mit dem Zwischenmedium Rotihistol (Roth, Karlsruhe) infiltriert. Ab hier wurde dann bis zum Abschluß der Einbettung bei 60°C im Wärmeschrank zunächst 1 h mit einer (1:1)-Rotihistol-Paraplast-Mischung, über Nacht mit einer (1:10)-Rotihistol-Paraplast-Mischung und 2x 1 h mit 100% Paraplast (Smp. 56°C; Paraplast Plus, Sigma) infiltriert. Abschließend wurden die Objekte in Aluförmchen gegossen. Die X-Gluc-GUS-Färbungen von *Arabidopsis* (siehe oben) wurden zur Nachfixierung vor der Einbettung in Paraplast statt in 50% Ethanol für 30 min (Keimlinge) bis 2 h (Infloreszenzen) in FAA-Fixativ überführt. Danach wurde ab dem Schritt 50% Ethanol gleich verfahren wie oben beschrieben. Jeder Schritt dauerte abhängig von der Objektstärke 15 min (Keimling) bis 60 min (*Ricinus*-Gewebestückchen, *Arabidopsis*-Blüten und Schoten).

FAA-Fixativ: 3,7% Formaldehyd (Stammlösung: 37% FA, Fluka)

50% EtOH

5% Essigsäure

in mQ

10x PBS: 1,37 M NaCl

27 mM KCl

100 mM Na₂HPO₄

18 mM KH₂PO₄

mit HCl auf pH 7,4 einstellen

PBS: 10x PBS mit mQ 1:10 verdünnen

4% Formaldehyd in PBS:	4 g Paraformaldehyd (Sigma) werden mit wenigen Tropfen 1 M NaOH in 50 mL PBS bei 60°C vollständig in Lösung gebracht. Anschließend wird mit PBS auf 100 mL aufgefüllt, der pH ggf. mit HCl auf pH 7,4 eingestellt.
100% EtOH:	96% EtOH werden mit geglühtem CuSO ₄ entwässert

Technovit-Einbettung für Immunfluoreszenz (von Dr. J. Greenwood modifizierte Gebrauchsanleitung des Herstellers)

Pflanzenmaterial von *Arabidopsis* wurde in Technovit 8100 (Kulzer, Wehrheim) eingebettet. Dazu wurden die Objekte in Fixierungspuffer auf Eis 10 min vakuuminfiltiert und anschließend 1 h unter ständiger Bewegung auf Eis weiter fixiert. Die Infiltration wurde durch Eintauchen mit einer mit Triton-X-100 benetzten Pinzettenspitze beschleunigt. Nach der Fixierung wurde 3x 30 min mit eiskaltem Waschpuffer gespült. Die Objekte wurden in einer ansteigenden Alkoholreihe dehydriert (50%, 70%, 80%, 90%, 3x 100% EtOH, 100% Aceton, 100% EtOH; bis 90% EtOH auf Eis, dann RT; jeweils 30 min, nur die letzten beiden Schritte jeweils 15 min). Der Zwischenschritt in 100% Aceton entfernt Wachsrreste und verhindert das Herauslösen der Objekte beim Schneiden. Die Objekte kamen zunächst in 100% EtOH-Technovit 8100 (v/v 1:1) + Härter 1, dann 3x in 100% Technovit 8100 + Härter 1 (jeweils 30 min) und wurden schließlich in mit Technovit 8100 + Härter 1 gefüllte Teflonformen gebracht und optimal positioniert. Die reichlich (wegen der Material schrumpfung im Verlauf der Polymerisation) gefüllten Formen wurden um Sauerstoff auszuschließen, mit PE-Folie abgedeckt und im Wärmeschrank bei 60°C über Nacht ausgehärtet. (Bemerkung: Der vom Hersteller für die Polymerisation vorgesehene Härter 2 führte zu suboptimalen Durchhärtungsergebnissen und kam nicht zum Einsatz).

Fixierungspuffer:	25 mM NaPO ₄ pH 7,2 3,7% FA
Waschpuffer:	25 mM NaPO ₄ pH 7,2
100% EtOH:	96% EtOH wurde mit geglühtem CuSO ₄ entwässert
Einbettungsmedium (bei 4°C etwa 4 Wochen haltbar):	100 mL Technovit 8100 mit 0,6% (w/v) Härter I

Silanisierung der Objektträger

Die verwendeten Objektträger (76 x 24 mm; Menzel) wurden zum optimalen Anhaften der aufgetragenen Schnitte mit TESPA (3-Aminopropyltriethoxysilan; Sigma) beschichtet. Die Objektträger wurden (jeweils 10 Stück im Edelstahlträger) in Entfettungslösung gereinigt, mit mQ und Ethanol jeweils 5 min gespült und anschließend an der Luft getrocknet. Für die Silanisierung wurden die Objektträger in der TESPA-Lösung inkubiert, dann 2x mit 100% Aceton gespült, jeder Arbeitsgang dauerte 5 min, und abschließend luftgetrocknet. Bis zur Verwendung wurden die silanisierten Objektträger staubgeschützt in Kunststoff-Behältern gelagert. Alternativ wurden gebrauchsfertige Objektträger mit Reaktionsfeldern (Roth) verwendet.

Entfettungslösung: 70% Ethanol und 9% HCl in mQ

Silanisierlösung: 1% (v/v) TESPA in Aceton

Schneiden des eingebetteten Materials

Von Paraplast-Einbettungen wurden mit einem C-Messer am Rotationsmikrotom (Leitz) etwa 8-10 µm dicke Schnitte gemacht. Die Technovit-Einbettungen wurden mit Glasmesser am Ultramikrotom (LKB) etwa 1 µm dick geschnitten. Die Schnitte wurden mit einer feinen Nadel oder einer auf einem Zahnstocher fixierten Wimper vom Messer auf den Objektträger überführt. Zum Strecken der Schnitte nach dem Schneiden wurden diese auf einem Tropfen Wasser inkubiert und im Wärmeschrank bei 45°C getrocknet. Die Schnitte wurden mit Wachsmalkreide eingekreist, um ein Auseinanderlaufen der im Rahmen der Immunocytochemie aufpipettierten Tropfen zu verhindern.

4.1.7.3 Immunocytochemie

Paraplast-Einbettung

Alle Arbeitsschritte erfolgten, sofern nicht anders angegeben, bei RT. Zur Entfernung des Einbettungsmediums wurden die Objektträger mit den Schnitten 15 min in Roticlear (Roth) und dann zum Rehydrieren jeweils 10-15 min nacheinander in 100% Isopropanol, 100% Ethanol, 90% Ethanol, 70% Ethanol und PBS inkubiert. Die Schnitte wurden abgetrocknet, dann etwa 1-2 h in Permeabilisierungslösung inkubiert und nach dreimaligem kurzen Abspülen mit PBS 2x 30 min in PBS eingeweicht. Die bisherigen Arbeitsschritte erfolgten in Glasgefäßen (Färbeküvetten), ab jetzt wurden die Objektträger waagrecht la-

gernd in einer feuchten Kammer (z. B. große Petrischale, ausgelegt mit feuchtem Zellstoff) gehalten. Die jeweilige Lösung wurde auf die Schnitte pipettiert, der hydrophobe Wachskreidekreis verhinderte das Auseinanderlaufen des Tropfens. Es wurde zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen mit BSA (Reduktion des unspezifischen *Backgrounds*) Blockinglösung auf die Schnitte pipettiert und 60 min inkubiert. Die Blockinglösung wurde abgesaugt, der Antikörper (anti-*Ricinus* CysEP-Antikörper, direkt mit Alexa Fluor 546 markiert (Schmid *et al.*, 2001); 1:200 in Blockinglösung) aufpipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Schnitte wurden 3x 5 min mit PBST und 3x 5 min mit PBS gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden die Schnitte zum Schutz gegen Ausbleichen mit Fluoreszenzmedium montiert und mikroskopiert. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop (Axioskop) und dem Cy3-Filtersatz Anregung 548/10 nm / *Beamsplitter* 565 nm DLLP / Emission 610/75 nm. Für die Kernfärbung wurden die Schnitte 5 min mit DAPI inkubiert und mit dem DAPI-Filtersatz (Anregung 365 nm / *Beamsplitter* 395 nm / Emission 420 nm LP) mikroskopiert.

Technovit-Einbettung

Alle Arbeitsschritte erfolgten, sofern nicht anders angegeben, bei RT. Zur Entfernung des Einbettungsmediums wurden die Objektträger mit den Schnitten 5 min in 100% Aceton und dann zum Rehydrieren jeweils 5min nacheinander in 100% Ethanol, 90% Ethanol, 70% Ethanol und PBS inkubiert. Die Schnitte wurden abgetrocknet, dann etwa 1 h in Permeabilisierungslösung inkubiert und nach dreimaligem kurzem Abspülen mit PBS 2x 10 min in PBS eingeweicht. Dann wurde zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen BSA-haltige Blockinglösung auf die Schnitte pipettiert und 60 min inkubiert. Die Blockinglösung wurde abgesaugt, der direkt markierte anti-*Ricinus* CysEP-Antikörper oder der primäre Antikörper (anti-*Ricinus* CysEP-Antikörper aus Kaninchen, 1:200 in Blockinglösung; anti-Cep2-Antikörper aus Kaninchen, 1:50; Präimmunserum als negative Kontrolle) aufpipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Schnitte wurden 3x 5 min mit PBST und 3x 5 min mit PBS gewaschen. Danach wurden die mit dem direkt markierten Antikörper dekorierten Schnitte mit dem Fluoreszenzmedium montiert und mikroskopiert. Die mit dem Primärantikörper (anti-*Ricinus* CysEP-Antikörper aus *Rabbit*) behandelten Schnitte wurden mit dem sekundären Antikörper (anti-*Rabbit*-Fab-Fragment-FITC, 1:200; Rockland) dekoriert. Hierzu wurde 3 h bei RT inkubiert, anschließend wie oben be-

schrieben mit PBS gewaschen und mit dem Fluoreszenzmedium montiert. Die Fluoreszenzmikroskopie der mit dem direkt markierten Antikörper dekorierten Schnitte erfolgte mit dem Cy3-Filtersatz (Anregung 548/10 nm / *Beamsplitter* 565 nm / Emission 610/75 nm), die der mit dem anti-*Rabbit*-FITC-gelabelten Antikörper mit dem Cy2-Filtersatz (Anregung 450-490 nm / *Beamsplitter* 510 nm / Emission 520 nm LP). Für die Kernfärbung wurden die Schnitte 5 min mit DAPI inkubiert und mit dem DAPI-Filtersatz (Anregung 365 nm / *Beamsplitter* 395 nm / Emission 420 nm LP) mikroskopiert.

Permeabilisierungslösung: 5% (v/v) Tween-20 in PBS

PBST: 0,05% (v/v) Tween-20 in PBS

Blockinglösung: 2% (w/v) BSA in PBST + 0,02% NaN₃

DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol):

Stammlösung: 100 µg/mL mQ

Arbeitskonzentration: 100 ng/mL (1:1000)

Fluoreszenzmedium: 540 µL mQ

450 µL 100% Glycerol

10 µL 2M Tris/HCl pH 8

2 mg DABCO (1,4-Diazabicyclo-[2,2,2]-Octan; Sigma)

4.1.7.4 TUNEL-Assay

Im Rahmen des TUNEL-Assay werden freie 3-OH-Enden der DNA, wie sie bei der Fragmentierung der Kern-DNA im Zuge des Zelltodes entstehen, mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gelabelt. Die Reaktion wird durch das Enzym Terminale Desoxynukleotid Transferase (TdT) katalysiert. Reifende Samen wurden, wie vorher beschrieben in Paraplast Plus eingebettet, geschnitten, auf silanisierte Objektträger aufgebracht, deparaffiniert und rehydriert. Nach dem Spülen mit PBS wurden die Schnitte mit Proteinase K 30 min bei 30°C permeabilisiert und 2x 10 min in PBS gespült. Anschließend wurde der TUNEL-Assay (Roche, Ingelheim) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden 50 µL TUNEL-Reaktionsgemisch aufpipettiert und 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer (z.B. große Petrischale, ausgelegt mit feuchtem Zellstoff) inkubiert. Danach wurden die Schnitte kurz mit PBS ab gespült, 2x 10 min in PBS gewaschen und mit Fluoreszenzmedium montiert. Für die negative Kontrolle wurde das Enzym Terminale Transferase weggelassen. Für die positive Kontrolle wurde die Kern-DNA für 10 min bei 37°C mit

DNase (Sigma) behandelt. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop (Axioskop) und dem Cy2-Filtersatz (Anregung 450-490 nm / *Beam-splitter* 510 nm / Emission 520 nm LP).

Permeabilisierungslösung: 20 µg/mL Proteinase K in 10 mM Tris/HCl pH 7,5

TUNEL-Reaktionsgemisch: 5 µL TUNEL-Enzym (#1767305, Roche)

45 µL TUNEL-Label (#1767291, Roche)

DNase: 3 Units/mL in 10 mM Tris/HCl pH 7,5

4.1.7.5 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Proben - Fixieren, Einbetten, Schneiden, Vorbereitung der *Grids* und Immunocytochemie - wurde von J. Greenwood im Hause durchgeführt. Die Präparate wurden an einem JEOL 100 CX Transmissions-Elektronenmikroskop (JEOL, Japan) bei 80 keV untersucht. Die EM-Aufnahmen wurden zusammen mit Dr. J. Greenwood am Department für Chemie der TU München in Garching bei der Arbeitsgruppe Dr. S. Weinkauff gemacht.

4.2 Spezieller Teil

4.2.1 Untersuchung der Substratspezifität sowie Reinigung der CysEP aus *Ricinus communis* für die Kristallographie

4.2.1.1 Ricinosomen-Isolierung

Die Isolierung von Ricinosomen aus dem Endosperm von gekeimten *Ricinus*-Samen erfolgte wie von Schmid *et al.* (2001) beschrieben. Dazu wurden *Ricinus*-Samen 24 h in fließendem Leitungswasser gewässert, in feuchtem, autoklavierten Vermiculit in Plastikschaalen ausgesät und dabei mit Vermiculit bedeckt. Die Schalen wurden mit Alufolie abgedeckt und 5 Tage bei 30°C im Dunkeln inkubiert.

Zum Erntezeitpunkt war die Samenschale abgefallen und die Kotyledonen ließen sich leicht aus dem Endosperm herausziehen. Das Endosperm war außen fest und innen an der Kontaktstelle zu den Kotyledonen schleimig. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis oder im Kühlraum durchgeführt. Die Gesamternte wurde gewogen, mit Homogenisationspuffer im Mixer schonend zerkleinert (3,75 mL Homogenisationspuffer pro g Frischgewicht; drei Zyklen zu 10 s bei maximaler Geschwindigkeit mit jeweils 10 s Pause). Das Homogenisat wurde durch zwei Lagen Miracloth (#475855; Calbiochem, Schwalbach) filtriert, 15 min bei 1500 rpm zentrifugiert (JA-10 Rotor, Avanti J-25 Zentrifuge; Beckman-Coulter). Das Pellet mit den Zelltrümmern wurde verworfen, der Überstand 30 min bei 9500 rpm zentrifugiert, das Organellen-Pellet mit wenigen mL eiskaltem Homogenisationspuffer mit dem Pinsel resuspendiert und die Suspension auf die Saccharose-Dichtegradienten geladen. Die Schichtung erfolgte nach dem in Tabelle 4.1 vorgegeben Schema in verschließbaren Zentrifugenröhrchen (#362183, Optiseal 26 x 87 mm, 36,2 mL; Beckman). Nach Aufsichtung der Organellen-Suspension auf den Gradienten - die Beladung des Gradienten lag bei etwa 30-35 g FG - wurde das verbleibende Leervolumen vollständig mit Homogenisationsmedium aufgefüllt. Die Auftrennung der Organellen erfolgte im Vertikalrotor in der Ultrazentrifuge (VTI 50 Rotor, Ultrazentrifuge 7-55; Beckman) 3 h bei 45000 rpm und 4°C. Zum Ernten wurden die Gradienten mit einer 1,2 mm-Kanüle am tiefsten Punkt angestoßen und Fraktionen zu 1,25 mL aufgefangen. Die untersten vier Fraktionen jedes Gradienten wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Matrixproteine bestehen zu ~95% aus der Proform der CysEP (Schmid *et al.*, 2001).

Tabelle 4.1: Pipettierschema für die Schichtung von 44-65% Saccharose-Dichtegradienten in Zentrifugenröhrchen für die Isolierung von Ricinosomen.

Saccharose-Konzentration [%]	Saccharose-Stammlösung [mL]	Gradientenmedium [mL]	Effektives Volumen [mL]
65	4	0	4
57	2,2	0,3	2,5
52	2	0,5	2,5
50	1,9	0,6	2,5
48	3,7	1,3	4
46	2,1	0,9	3
44	2,7	1,3	4

Gradientenmedium: 1 mM HEPES/KOH pH 7,5
10 mM Na₂EDTA
5 mM MgCl₂

Saccharose-Stammlösung: 65% (w/w) in Gradientenmedium
(143 g Saccharose in 77 mL Gradientenmedium)

Homogenisationspuffer: 50 mM HEPES/KOH pH 7,5
500 mM Saccharose
10 mM KCl
1 mM MgCl₂
1 mM Na₂EDTA
1 mM DTT

4.2.1.2 Untersuchung der Substrat- und Spaltspezifität der *Ricinus* CysEP durch β -Casein-Verdau

Die Substratspezifität der *Ricinus* CysEP aus Ricinosomen wurde durch Verdau des unphysiologischen Substrates β -Casein (C-6905; Sigma) analysiert. Dazu wurden gereinigte Ricinosomen mit ~1 mg/mL Pro-CysEP 1:40 bzw. 1:8 mit Assay-Puffer pH 5,5 verdünnt und 10 min bei 25°C inkubiert, um reife, proteolytisch aktive CysEP zu erhalten. Der proteolytische Verdau wurde durch Zugabe von ¼ Volumen 1%-iger β -Casein-Lösung in HEPES-Puffer pH 7,4 (0,2% β -Casein Endkonzentration im Assay) gestartet und bei 25°C in-

kubiert. Nach 0 s, 10 s und 1, 2, 3, 5, 8 und 10 min wurden Proben genommen, wobei der Verdau durch Schockfrieren in Flüssigstickstoff abgestoppt wurde. 40 µL Probe wurden mit 20 µL 3-fach-SDS-Probenpuffer aufgekocht und mittels 17,5%-SDS-PAGE mit abschließender Coomassie-Färbung untersucht. Das Signal für unverdautes β-Casein verschwand im Verlauf des Verdau, wogegen die Reaktionsprodukte über die Zeit zunahm. Die nach 1 min (1:50 Verdünnung) und 8 min (1:10 Verdünnung) genommenen Proben wurden für die eingehende Analyse mit MALDI ausgewählt.

Assay-Puffer:	50 mM MES/KOH pH 5,5 10 mM DTT
β-Casein-Stammlösung:	1% β-Casein in 50 mM HEPES/KOH pH 7,4 / 10 mM DTT
Versuchsansätze:	4 µL Ricinosomen, 156 µL Assay-Puffer, 40 µL 1% β-Casein 20 µL Ricinosomen, 140 µL Assay-Puffer, 40 µL 1% β-Casein
CysEP-Konzentrationen:	4 µg CysEP/200 µL Assay (1:50) 20 µg CysEP/200 µL Assay (1:10)

Der β-Casein-Verdau wurde von der Abteilung für Proteinanalytik am MPI Martinsried unter Prof. Dr. F. Lottspeich mittels LC aufgetrennt und mit MALDI analysiert.

4.2.1.3 Bestimmung der Substratspezifität der *Ricinus* CysEP mittels fluoreszenzgequenchter Peptide

Die eingehende Analyse der Substratspezifität der CysEP wurde von Dr. David Simpson vom Department für Chemie am Carlsberg Laboratorium in Valby/Dänemark mit Hilfe von synthetischen fluorogenen Peptiden (Davy *et al.*, 2000) durchgeführt. Er verwendete zum einen Peptide der allgemeinen Sequenz Abz-Xaa-Arg-↓-Gln-Gln-Tyr(NO₂)-Asp, mit 19 verschiedenen Aminosäureresten an der P2-Position zur Charakterisierung der S2-Tasche des Enzyms, zum anderen eine Serie von Peptiden der allgemeinen Sequenz Abz-Leu-Xaa-↓-Gln-Pro-Tyr(NO₂)-Asp, mit 20 verschiedenen Aminosäureresten an der P1-Position zur Charakterisierung der S1-Tasche. Basierend auf der Annahme, dass eine Spaltung zwischen Pro und Gln eher unwahrscheinlich ist, wurde ein Pro-Rest (anstelle des Gln) an P2' gesetzt, um die Spaltung zwischen Xaa und Gln zu dirigieren.

Die enzymatische Hydrolyse der Peptidsubstrate wurde auf einem Fluoreszenz-Spektrometer (LS 50; Perkin Elmer, Foster City, CA) bei 360 nm Anregung und 460 nm Emission

verfolgt. Der Assay wurde, wie bei Davy *et al.* (1998) beschrieben durchgeführt und die kinetischen Konstanten k_{cat} und K_m ermittelt.

Die Reinigung und Kristallisation der CysEP, sowie die Strukturaufklärung erfolgte unter der Leitung von Dr. Manuel Than von der Abteilung für Strukturforschung unter Prof. Dr. Robert Huber am MPI für Biochemie in Martinsried.

Die Proform der *Ricinus* CysEP in den Ricinosomen verfügt neben dem N-terminalen Propeptid über das C-terminale KDEL-Signal. Bei der *in-vitro*-Reifung der CysEP aus isolierten Ricinosomen durch Ansäuerung wurden N- und C-terminales Propeptid abgespalten. Ricinosomen von 32 Saccharose-Gradienten wurden mit Aktivierungspuffer 1:10 verdünnt und für 20 min bei RT gerührt. Danach wurden die verdünnten Ricinosomen im Eisbad mit Ultraschall behandelt (20 Zyklen zu 10 Impulsen von 1 s, gefolgt von 50 s Pause) und bei 45000 rpm und 4°C 1 h zentrifugiert (Festwinkelrotor Ti50, Ultrazentrifuge 7-55; Beckman).

Um einen für die Inhibierung der CysEP geeigneten Inhibitor zu finden, wurden kinetische Experimente mit drei kovalenten Chloromethylketon(CMK)-Inhibitoren, nämlich N *p*-tosyl-Lys-CMK (N-1155; Bachem), H-D-Pro-Phe-Arg-CMK (N-1210; Bachem) und H-D-Val-Leu-Lys-CMK (N-1385; Bachem) durchgeführt. Dazu wurden im 1000 μ L-Assay (detaillierte Zusammensetzung unten) 20 μ L der Verdünnungen der 10 mM-Inhibitor-Stammlösungen (200, 100, 10 und 1 nmol) mit 50 μ L Ricinosomen (1:100 verdünnt, 10 min in Assay-Puffer pH 5,5 aktiviert) für 5 min inkubiert und dann durch Zugabe von 10 μ L Substrat die Reaktion gestartet und deren Kinetik über 5 min verfolgt.

Aufgrund dieser Vorversuche wurde der Inhibitor H-D-Val-Leu-Lys-CMK für die Hemmung der aktiven CysEP aus Ricinosomen ausgewählt. Hierzu wurde die Probe nach der Zentrifugation mit dem Inhibitor H-D-Val-Leu-Lys-CMK in einer Konzentration von 25 μ M inkubiert. Ausgehend von der Endausbeute an CysEP von 5 mg bzw. 200 nmol entsprach das einem 40-fachen Inhibitorüberschuß. Die Inhibierung der CysEP wurde anhand der proteolytischen Aktivität gegen das fluorogene Substrat Cbz-Phe-Arg-AMC (C-9521; Sigma) in einer Arbeitskonzentration von 1 μ M in einer 1 mL-Fluoreszenzküvette (108F-QS; Hellma) im Fluoreszenz-Spektrometer (SFM 25; Kontron) bei 360 nm Anregung und 460 nm Emission kontrolliert. Die Hemmung wurde als vollständig erachtet, als in einem Zeitraum von 30 min keine Aktivität mehr messbar war. Danach wurde der Probe eine Tablette eines Protease-Inhibitor-Cocktails (#1836170; Roche) zugefügt, um andere

möglicherweise vorhandene Proteasen zu hemmen und abschließend steril filtriert (0,22 µm-Steritop-Sterilfilteraufsatz, PF1597EN00; Millipore).

Fluoreszenz-Assay:

Aktivierungspuffer:	20 mM MES pH 5,5 10 mM DTT
Substrat-Stammlösung:	10 mM Cbz-FR-AMC in Dimethylformamid (DMF)
Substrat-Verdünnung:	20 µM in Assay-Puffer (Stammlösung 1:500)
Inhibitor-Stammlösungen:	jeweils 10 mM H-D-Val-Leu-Lys-CMK, H-D-Pro-Phe-Arg-CMK und N- <i>p</i> -Tosyl-Lys-CMK in DMF
Assay-Puffer:	100 mM Na-Acetat pH 5,5 2 mM Cystein 2 mM β-Mercaptoethanol 0,08% Brij35
Reaktionsansatz:	950-x µL Assay-Puffer x µL Protease-Lösung 50 µL Substrat-Verdünnung (Arbeitskonzentration 1 µM) →5 min Messintervall
Inhibitor-Ansatz:	940 µL Assay-Puffer 50 µL Ricinosomen (aktiviert bei pH 5,5; 1:100) 20 µL Inhibitor (200, 100, 10, 1 nmol) →5 min Inkubation 10 µL Substrat-Verdünnung →5 min Messintervall

4.2.1.4 Reinigung der *Ricinus* CysEP über Säulenchromatographie

Die sterilfiltrierte Probe wurde mit einer Flußrate von 3 mL/min auf eine DEAE-Säule (5 mL DEAE-Sepharose Fast-Flow HiTrap-Säule, #17-5157-01; Amersham-Pharmacia) geladen, die Säule mit 10 Säulenvolumina Puffer A bis zum Erreichen der Basislinie gewaschen und mit einem linearen Gradienten von 0–2 M NaCl eluiert. Die Fraktionen wurden gesammelt und mittels SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung analysiert. Die CysEP wurde bei 0,3 M NaCl eluiert. Die Peak-Fraktionen wurden vereinigt (27 mL) und auf ein Volumen von 2 mL einkonzentriert (Centriprep 5 kDa-MWCO; Millipore). Die Probe wurde auf eine Superdex 75-Gelfiltrationsäule (26x600, #17-1070-01; Amersham-Phar-

macia) geladen und mit dem Gelfiltrationspuffer bei einer Flußrate von 1 mL/min eluiert. Die Fraktionen wurden wiederum gesammelt und durch SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung analysiert. Die Peak-Fraktionen wurden vereinigt und über eine NAP5-Säule (#17-0853-01; Amersham-Pharmacia) vom Gelfiltrationspuffer auf den Lagerpuffer umgepuffert. Das bis zur Homogenität gereinigte Protein wurde auf eine Konzentration von 9 mg/mL ankonzentriert (Centriprep 5 kDa-MWCO; Millipore), aliquotiert und bis zum Pipettieren der Kristallisationsansätze bei -70°C gelagert.

Anionenaustausch-Chromatographie: DEAE-Sepharose-FF 5 mL

Puffer A:	Puffer B:
	2 M NaCl
10 mM MES / NaOH pH 5,5	10 mM MES / NaOH pH 5,5
1 mM EDTA	1 mM EDTA
2 mM β-Mercaptoethanol	2 mM β-Mercaptoethanol
0,02% (w/v) NaN ₃	0,02% (w/v) NaN ₃

Gelfiltration: Superdex 75 26/60

Gelfiltrationspuffer:
150 mM NaCl
2 mM MES / NaOH pH 5,5
1 mM EDTA
2 mM β-Mercaptoethanol
0,02% (w/v) NaN ₃

Die Puffer für die Säulen-Chromatographie wurden sterilfiltriert und entgast.

Lagerpuffer:
3 mM MES/NaOH pH 5,5
1 mM β-Mercaptoethanol
0,02% NaN ₃

Der Puffer wurde sterilfiltriert.

4.2.1.5 Bestimmung der N- und C-terminalen Sequenz der inhibierten und gereinigten *Ricinus* CysEP

Die Analysen wurden von der Abteilung für Proteinanalytik am MPI Martinsried unter Prof. Dr. F. Lottspeich durchgeführt. Die N-terminale Sequenzanalyse wurde mit einem Sequenzanalyser Modell 492 (Applied Biosystem/Perkin Elmer, Langen) durchgeführt. Die C-terminale Sequenz wurde durch LC-MS ermittelt.

4.2.1.6 Kristallographische Methoden

Kristallisation

Die Kristallisationsansätze erfolgten bei 20°C nach der Dampfdiffusionsmethode im sitzenden Tropfen (*sitting drop*) in CrysChem Platten (Charles Supper Company). Die CrysChem Platten wurden mit transparenter Klebefolie (CrystalClear, Manco Inc., Avon, USA) verschlossen. Der Kristallisationsverlauf wurde über mehrere Monate verfolgt.

Für das *Screening* einer großen Anzahl von Kristallisationsbedingungen wurde das Prinzip des *sparse matrix sampling* (Jancarik und Kim, 1991) angewandt. Dabei wurden jeweils 2 µl (9 mg/mL in 3 mM MES / NaOH pH 5,5 / 1 mM β-ME) Proteinlösung mit 2 µl des Kristallisationspuffers vermischt und gegen 500 µl Reservoirlösung äquilibriert.

Initiale Kristallisationsversuche unter Verwendung von selbstgemachten „*In-House*“-*Screens* mit 96 unterschiedlichen Bedingungen führten zu vielen erfolgversprechenden Bedingungen. Diese Bedingungen lassen sich durch Variation verschiedener Parameter (Konzentration von Protein und Präzipitant, pH-Wert, *Screening* verschiedener Additive, Tropfenvolumen und Mischungsverhältnis) optimieren. Neben einigen anderen Bedingungen lieferte der Ansatz mit 29% PEG 4000 / 190 mM Li₂SO₄ / 100 mM Na-Citrat pH 5,9 vielversprechende Kristalle. Bei der weiteren systematischen Verfeinerung (*Fine-Screen*) der initialen Kristallisationsbedingungen wurden auf den 24-Well (4 x 6) Crys-Chem Platten jeweils zwei Parameter um einen fixen Wert herum variiert.

Initiale Bedingung: 29% PEG 4000 / 190 mM Li₂SO₄ / 100 mM Na-Citrat pH 5,9

Fine-Screen: konstant gehalten wurde: 190 mM Li₂SO₄
 variiert wurde PEG 4000: 21%, 25%, 29%, 33%
 und der pH: pH 5,0 / 5,5 / 6,0 (100 mM Na-Citrat)
 pH 6,5 / 7,0 / 7,5 (100 mM HEPES)

Die aus den initialen Kristallisationsversuchen resultierenden Bedingungen wurden weiter optimiert bis letztendlich ausgezeichnet streuende Kristalle aus 31% PEG 4000 / 190 mM Li₂SO₄ / 100 mM Na-Citrat pH 5,04 erhalten wurden. Die Kristalle neigten zur Bildung von „Büscheln“, so daß für die Vermessung dieser Kristalle einzelne, gut gewachsene Kristalle mit einem Skalpell herauspräpariert werden mußten.

Datensammlung und Datenreduktion

Zur Aufnahme von Röntgendiffraktionsdaten wurde ein Kristall in einer Nylon-Schleife (Hampton Research) montiert. Zur Vermeidung von Kristallschäden wurden die Kristalle kurz in Mutterlauge, die zuvor mit 10% Glycerol versetzt worden war, überführt und im Cryo-Strom (Oxford Cryosystems) bei 100 K schockgefroren. Die Messungen erfolgten mit Graphit-monochromatisierter CuK_α -Strahlung ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) auf einer MAR345 *Image Plate* (MAR Research, Hamburg). Die Datensätze wurden als Serie von Rotationsaufnahmen auf einem Rigaku R300B-Drehanodengenerator (Rigaku, Tokyo, Japan) bei 100 kV und 50 mA gesammelt. Da die Kristallsymmetrie nicht eindeutig aus den ersten Diffraktionsbildern bestimmt werden konnte, wurde ein Datensatz über einen Winkelbereich von 180° mit Inkrementen von je $0,2^\circ$ pro Bild aufgenommen.

Die Diffraktionsdaten wurden in DENZO (Otwinowski und Minor, 1993) und SCALEPACK zunächst ohne Symmetriebeschränkungen (P1) integriert und aufeinanderskaliert. Nachdem die 222-Symmetrie des Datensatzes mittels einer Patterson-Selbstrotation mit GLRF (Tong und Rossmann, 1990) bestimmt worden war, wurden die Daten in der korrekten Raumgruppe ($P2_12_12_1$) erneut prozessiert.

Die weitere Analyse der Daten wurde mit dem HKL-Programmpaket (Otwinowski und Minor, 1997) durchgeführt.

4.2.1.7 Modellbau und Verfeinerung

Das Phasenproblem wurde durch molekularen Ersatz unter Verwendung der Struktur der Prolin-spezifischen Cystein-Proteinase aus *Zingiber officinale* (PDB-Eintrag 1CQD; Choi *et al.*, 1999) als Suchmodell in AmoRe (Navaza, 1994) gelöst. Die Rotationsfunktion zeigte in Einklang mit zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit zwei stark abgehobene Peaks (Korrelationskoeffizienten von je ca. 25 über 16). Nach der Translationsfunktion und dem *Rigid-body-Refinement* lagen der Korrelationskoeffizient bei 41,4% und der R_{cryst} bei 47,7 (Auflösung 15–3 Å). Das Modell wurde mit der Aminosäure-Sequenz der CysEP von Hand überbaut und in mehreren Zyklen manuell vervollständigt. Alle manuellen Modellbauschritte wurden unter Benutzung der $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ und $2 F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Differenzdichten in MAIN (Turk, 1992) durchgeführt. In den frühen Stadien des Überbauens wurde die Qualität der Elektronendichtekarte durch zweifache NCS-Mittelung in MAIN weiter verbessert. Die Verfeinerungsprozedur wurde in CNSv1.1 (Brunger *et al.*, 1998) ausge-

führt und beinhaltete Geometrieverfeinerung (*positional refinement*), individuelles B-Faktor-*Refinement*, sowie *simulated annealing* in den ersten Schritten des Modellbaus. Im weiteren wurden während der Verfeinerung starke NCS-Beschränkungen zwischen den beiden Molekülen der asymmetrischen Einheit angewendet, wobei einzelne Haupt- und Seitenkettenbereiche, die der NCS nicht entsprachen, herausgenommen wurden. Es wurden die von Engh und Huber (1991) beschriebenen Zielparameter und die anisotropische B-Faktor-Skalierung angewandt. Die Wassermoleküle wurden automatisch eingebaut und durch Begutachtung der $F_{obs}-F_{calc}$ Differenzdichte manuell überprüft. Die endgültige Struktur mit guter Stereochemie und einem R-Faktor von 18,1% ($R_{free} = 22,6\%$; gemäß Brunger (1992) wurden 5% der Reflexe zufällig ausgewählt und als Test-Set nicht in die Verfeinerung einbezogen) wurde mit PROCHECK und SFCHECK (Bailey, 1994) untersucht. Die *Alignments* zu den homologen Strukturen wurden mit TOP3D (Lu, 1996) und MAIN errechnet.

4.2.1.8 Graphische Darstellungen und Sequenzvergleiche

Zur graphischen Darstellung von Molekülmodellen wurden die Programme BOBSCRIPT (Esnouf, 1999), MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) und Raster3D (Meritt und Bacon, 1997) benutzt. Moleküloberflächen wurden mit dem Programm GRASP (Nicholls *et al.*, 1993) berechnet und dargestellt. Zur graphischen Darstellung von Sequenzvergleichen wurde das Programm ALSCRIPT (Barton, 1993) verwendet. Zur Nachbearbeitung von Bildern, sowie zu deren Konvertierung wurden die Programme PHOTOSHOP (Adobe Systems Inc., USA), XV (J. Bradley, Pennsylvania, USA) und CorelDRAW (Corel Corporation Limited, 1998) verwendet.

4.2.2 Reinigung und Charakterisierung der Glyoxysomalen Processing Peptidase aus *Citrullus vulgaris*

4.2.2.1 Anreicherung von Glyoxysomen aus Kotyledonen von *Citrullus vulgaris*

Die Präparation der Glyoxysomen erfolgte nach der von Sautter und Hock (1982) modifizierten Methode von Cooper und Beevers (1969). Dazu wurden Wassermelonen-Samen („Dixie-Queen“; Landreth Seed Co., Baltimore, MD, USA) in feuchtem, autoklavierten Vermiculit in Pflanzschalen aus Plastik ausgesät und dabei knapp mit Vermiculit bedeckt. Es wurden 15 g Samen (~150 Samen) pro Schale in acht parallelen Reihen ausgesät. Die Schalen wurden mit Alufolie verschlossen und zur Keimung 3 Tage bei 30°C im Dunkeln inkubiert.

Zum Erntezeitpunkt ließ sich die Samenschale leicht von dem Kotyledonen abziehen. Alle weiteren Schritte wurden gekühlt auf Eis oder im Kühlraum durchgeführt. Die gesammelten Kotyledonen wurden gewogen, mit Homogenisationspuffer (3,75 mL pro g Frischgewicht) im Mixer schonend zerkleinert (dreimal 10 s bei maximaler Geschwindigkeit, dazwischen jeweils 10 s Pause). Das Homogenisat wurde durch zwei Lagen Miracloth filtriert, 15 min bei 1500 rpm zentrifugiert (JA-10 Rotor; Avanti J-25 Zentrifuge; Beckman-Coulter). Das Pellet mit den Zelltrümmern wurde verworfen und der Überstand 30 min bei 9500 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Rohorganellen-Pellet wurde mit wenigen mL eiskaltem Homogenisationspuffer mit einem Pinsel resuspendiert und die Suspension auf die Saccharose-Dichtegradienten geladen. Die Schichtung erfolgte nach dem in Tabelle 4.2 vorgegeben Schema in offenen Zentrifugenröhrchen (#344060, Ultra clear Polylallymer, 14 x 95 mm; Beckman). Die Kapazität eines Gradienten lag bei etwa 4 g Frischgewicht. Die Auftrennung der Organellen erfolgte im *Swing-out*-Rotor (SWTI 40 Rotor; Beckman oder alternativ Kontron) in der Ultrazentrifuge (Modell 7-55; Beckman) 3 h bei 25000 rpm und 4°C. Zur Gewinnung der in distinkten Banden angereicherten Organellen wurde die Probe nach dem Durchstechen der seitlichen Wand mit einer 1,2 mm-Kanüle abgezogen. Als erstes wurde die, von unten gesehen, zweite Bande zwischen 43% und 50% Saccharose abgezogen, sie enthielt Plastiden und Glyoxysomen. Anschließend wurde in gleicher Weise die reine Glyoxysomen enthaltende, unterste Bande zwischen 50% und 57% Saccharose abgezogen. Das abgezogene Volumen je Fraktion und Gradient lag bei ~0,75 mL für die reine Glyoxysomen-Fraktion bzw. ~1 mL für die mit Plastiden verunrei-

nigte Glyoxysomen-Fraktion. Die gewonnenen Glyoxysomen- und Glyoxysomen-/Plastiden-Fractionen wurden bei -20°C eingefroren und bis zur Proteinreinigung gelagert.

Die Glyoxysomen wurden mittels *in-vitro*-Assay auf das glyoxysomale Markerenzym Isocitrat-Lyase (ICL) getestet. Die Messung erfolgte in Glasküvetten (Hellma; Müllheim) bei 324 nm und 30°C im Photometer mit angeschlossenen Schreiber (Kontron). Der Absorptionskoeffizient ϵ beträgt $14,29 \text{ cm}/\mu\text{mol}$.

Tabelle 4.2: Pipettierschema für die Schichtung von 10-57% Saccharose-Dichtegradienten in Zentrifugenröhrchen für die Isolierung von Glyoxysomen.

Saccharose-Konzentration [%]	Saccharose-Stammlösung [mL]	Gradientenmedium [mL]	Effektives Volumen [mL]
57	1,9	0,1	2
50	2,5	0,5	3
43	1,8	0,7	2,5
33	1,1	0,9	2
20	0,33	0,67	1
10	0,17	0,83	1

Homogenisationspuffer: 50 mM HEPES/KOH pH 7,5
250 mM Saccharose
10 mM KCl
1 mM MgCl_2
1 mM Na_2EDTA
1 mM DTT

Saccharose-Stammlösung: 60% (w/w) in Gradientenmedium
(132 g Saccharose in 88 mL Gradientenmedium)

Gradientenmedium: 1 mM HEPES/KOH pH 7,5
10 mM Na_2EDTA
5 mM MgCl_2

ICL-Assay (Hock, 1973):

ICL-Puffer: 3,37 mM Phenylhydrazin•HCl (P-7126; Sigma)
 1,5 mM DTT (D-0632; Sigma)
 67 mM KH₂PO₄ pH 6,9
 1,67 mM MgCl₂

0,5% Triton-X-100 (X-100; Sigma)

50 mM D,L-Na₃-Isocitrat (I-1252; Sigma)

ICL-Assay: 1000 µL Puffer
 100 µL Probe
 25 µL Triton
 100 µL Isocitrat

Die Berechnung der Aktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$U/mL = [\Delta A] \cdot 1,225 / 14,29 \cdot 0,1 \text{ } [\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mL}]$$

4.2.2.2 Bestimmung der proteolytischen Aktivität

Die Aktivitätsmessungen im Rahmen der Reinigung und Charakterisierung der Glyoxysomalen Processing Peptidase wurden mit dem fluorogenen Dipeptid Cbz-Phe-Arg-AMC (α -N-Carboxy-Benzoyl-Phe-Arg-7-Amido-4-Methylcoumarin, kurz: Cbz-FR-AMC, C-9521; Sigma), einem Substrat für die Plasma-Peptidase Kallikrein und für zahlreiche Serin- und Cystein-Proteasen mit Arg-Spezifität (Morita *et al.*, 1977) analysiert. Dieses war von den zur Verfügung stehenden fluorogenen Peptiden das einzige, mit dem die prozessierende Aktivität im 80-120 mM DEAE-Stufeneluat reproduzierbar nachgewiesen werden konnte.

In dem durch die Peptidkette verwendeten Donor-Akzeptor-Paar ist die Amidomethyl-Coumarin-Gruppe (AMC-Gruppe) der Donor, der, solange das Molekül intakt ist, die Fluoreszenzenergie intramolekular an den Akzeptor, die Carboxymethyl-Gruppe weitergibt, ohne das dabei Strahlung emittiert wird. Durch die proteolytische Spaltung der Peptidkette werden Donor und Akzeptor entkoppelt und der Donor, die fluorogene Gruppe kann Strahlung der Emissionswellenlänge abgeben. Anregungs- und Emissionswellenlänge der AMC-Gruppe liegen bei 360 nm bzw. 460 nm. Theoretische Hintergrundinformationen zum Intramolekularem Fluoreszenz Energie Transfer (IFETS) finden sich im Übersichtsartikel von Gershkovich und Kholodovych (1996).

Die Messungen wurden mit einem Perkin-Elmer Plattenreader (HTS 7000 Plus; Programm: HT Soft 2.0) in schwarzen *96-well* Microtiterplatten (Greiner) durchgeführt. Das Assay-Volumen betrug 100 μL und die Substratmenge war mit 1,6 nmol (je Ansatz etwa 12000 RFU) im Überschuß. Als negative Kontrolle diente 10 mM Tris/HCl pH 7,4 / 2 mM β -ME / 0,02% NaN_3 , als positive Kontrolle 0,1 mg/mL Trypsin. Es wurde immer die nach 30 min akkumulierte Fluoreszenz (RFU/30 min) in einem Temperaturbereich von 27-30°C (Raumtemperatur) gemessen.

Substrat-Stammlösung:	10 mM Cbz-Phe-Arg-AMC in DMF
Substrat-Verdünnung:	1:500 in 50 mM NaP_i pH 7,4 / 0,02% NaN_3
Arbeitskonzentration:	16 μM im 100 μL -Assay
Fluoreszenz-Assay:	20 μL Probe 80 μL Substrat-Verdünnung (= 1,6 nmol)

4.2.2.3 Aufbereitung der isolierten Glyoxysomen-Präparationen

150 mL isolierte Glyoxysomen wurden aufgetaut und vereinigt. Die Glyoxysomen wurden zur Absenkung des Saccharose-Gehaltes für das Beladen der DEAE-Säule 1:10 mit DEAE-Puffer A (10 mM Tris/HCl pH 7,4 / 2 mM β -ME / 0,02% NaN_3) verdünnt und anschließend in 250 mL Portionen in einer Rosettenzelle (Stölting, Dortmund) im Eisbad sonifiziert (10 min bei *9x-Cycle* und 80% Intensität). Die sonifizierte Probe wurde zum Pelletieren der Membranen und Partikel in vorgekühlten 50 mL Schraubröhrchen im Beckman-Coulter JA 25.50 Festwinkel-Rotor 30 min bei 25.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Avanti J-25; Beckman-Coulter). Die Pellets wurden einmal gewaschen, dazu nochmals mit Puffer A resuspendiert, beschallt und zentrifugiert. Der gesammelte Überstand wurde vor dem Beladen der DEAE-Säule sterilfiltriert (Steritop Express Plus 0,22 μm ; Millipore).

4.2.2.4 Reinigung der Glyoxysomalen Processing Peptidase über Säulenchromatographie

DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie

Die wie oben beschrieben aufbereitete Probe (Probenvolumen 1,5 L, 10 mM Tris pH 7,4 / 2 mM β -ME / 0,02% NaN_3) wurde mit einer Flußrate von 5 mL/min auf zwei hintereinandergeschaltete DEAE-Säulen (DEAE-Sepharose HitrapFF 5 mL, #17-5154-01; Amersham-Pharmacia) geladen. Nach dem Probenauftrag wurde bis zum Erreichen der Basislinie mit Puffer A gewaschen. Anschließend wurde bei einer Flußrate von 5 mL/min in zwei Stufen eluiert: Zunächst mit einem linearen Gradienten von 0-250 mM NaCl in 250 mL. Der Gradient wurde bei 80 mM NaCl bis zur vollständigen Elution des bei Fraktion 15 einsetzenden Absorptions-Peaks für 12 Fraktionen gehalten. Abschließend wurde von 250 mM–1 M NaCl in 50 mL eluiert. Die gesammelten 5 mL-Fraktionen wurden auf proteolytische Aktivität gegen das fluorogene Peptid Cbz-FR-AMC analysiert. Die Hauptaktivität (Fraktionen 19-32, 70 mL) wurde vereinigt.

DEAE-Sepharose FF 5 mL; Flußrate 5 mL/min

Puffer A:	Puffer B:	Puffer C:
10 mM Tris pH 7,4	200 mM NaCl	1 M NaCl
2 mM β -ME	sonst wie Puffer A	
0,02% (w/v) NaN_3		

Größenausschluß-Chromatographie (Gelfiltration)

Die vereinigte Hauptaktivität der DEAE-Elution wurde mit einer Amicon Ultra-15-Filtereinheit (10 kDa-MWCO, 15 mL, Millipore, Schwalbach) in einer Kühlzentrifuge bei 4°C mit *Swing-out*-Einsätzen (Labofuge GL 4400; Heraeus-Christ, Osterode) bei 3500g auf das Injektionsvolumen von 2 mL einkonzentriert. Die Probe wurde per Injektion auf die mit dem Gelfiltrationspuffer äquilibrierte Säule (Superdex 75 prep grade, HiLoad 16/60, #17-1068-01; Amersham-Pharmacia) appliziert. Bei einer Flußrate von 0,5 mL/min wurden nach dem Ausschlußvolumen von 40 mL Fraktionen mit 2 mL gesammelt und auf proteolytische Aktivität gegen das fluorogene Peptid Cbz-FR-AMC analysiert. Die Hauptaktivität (Fraktionen 10-14, insgesamt 10 mL) wurde vereinigt.

Superdex 75 16/60; Flußrate 0,5 mL/min

Gelfiltrations-Puffer:

150 mM NaCl

10 mM Tris pH 7,4

2 mM β -ME

0,02% (w/v) NaN_3

Hydroxyapatit-Chromatographie

Bei keramischem Hydroxyapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$)₂ handelt es sich um ein für die Auftrennung von Biomolekülen von Tiselius und Mitarbeitern (1956) etabliertes Säulenmaterial. Für die Herstellung wird kristalliner Hydroxyapatit bei hohen Temperaturen zur deutlich stabileren und gleichermaßen leistungsfähigen porös-keramischen Form gesintert. Die Bindungskapazität der verwendeten CHT II-Säule (5 mL, CHT II, 10 μm ; Biorad, München) liegt bei 12,5 mg Lysozym/g CHT.

Die vereinigte Hauptaktivität der Gelfiltration wurde über NAP25-Säule (Pharmacia) auf den Startpuffer (10 mM KP_i pH 7,2 / 2 mM β -ME / 0,02% NaN_3) der Hydroxyapatit (HAP)-Säule umgepuffert; die Probe wurde mit einer Flußrate von 0,5 mL/min geladen. Im Anschluß wurde mit 5 Säulenvolumina Puffer A bis zur Basislinie gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte im linearen Gradienten von 10-400 mM KP_i in 30 mL. Ladedurchlauf und *Wash*, sowie die gesammelten Fraktionen der Elution wurden auf die proteolytische Aktivität gegen das fluorogene Peptid Cbz-FR-AMC analysiert. Die Hauptaktivität der HAP-Säule (Durchlauf und *Wash*) wurde vereinigt.

Hydroxyapatit, 5 mL; Flußrate 0,5 mL/min

Puffer A:

10 mM KP_i pH 7,2

2 mM β -ME

0,02% (w/v) NaN_3

Puffer B:

400 mM KP_i pH 7,2

2 mM β -ME

0,02% (w/v) NaN_3

MonoQ-Anionenaustausch-Chromatographie

Die Hauptaktivität der HAP-Elution wurde mit Amicon Ultra-15 (10 kDa-MWCO, 15 mL; Millipore, Schwalbach) auf den Puffer A (20 mM NaCl / 10 mM Tris / HCl pH 7,4 / 2 mM β -ME / 0,02% NaN_3) eingestellt und auf das Injektionsvolumen von 2 mL für die MonoQ-Säule (MonoQ 5/50 GL, #17-5166-01; Amersham-Pharmacia) einkonzentriert. Nach dem Probenauftrag wurde mit Puffer A bei einer Flußrate von 1 mL/min bis zum Erreichen der Basislinie gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte im linearen Gradienten von 20-250 mM NaCl in 25 mL. Die gesammelten 1 mL-Fractionen wurden auf die proteolytische Aktivität gegen das fluorogene Peptid Cbz-FR-AMC analysiert. Die Hauptaktivität wurde vereinigt und Aliquots (1/7 bzw. 6/7) auf ein natives Aktivitäts- bzw. Sequenziergel geladen.

MonoQ 5/50; Flußrate 1 mL/min

Puffer A:	Puffer B:	Puffer C:
20 mM NaCl	250 mM NaCl	1 M NaCl
10 mM Tris pH 7,4	sonst wie Puffer A	
2 mM β -ME		
0,02% (w/v) NaN_3		

Affinitäts-Chromatographie mit Benzamidin-Sepharose

Für die Untersuchung des Aktivators sowie den *Western-blot* mit dem anti-Deg15-Antikörper wurden etwa 50 mL Glyoxysomen-Präparation aufbereitet und im ersten Schritt über DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie gereinigt. 1/4 der einkonzentrierten Aktivität (2,5 Mio. RFU pro mL) wurde mit 19 mL Puffer A auf 500 mM NaCl eingestellt und mit einer Flußrate von 1 mL/min auf die Benzamidin-Affinitätssäule (Benzamidin FF high sub 1 mL, #17-5143-02; Amersham-Pharmacia) geladen. Nachdem die Säule zum Erreichen der Basislinie mit 20 mL Puffer A gewaschen war, wurde in 50 mL von 500 mM–2 M NaCl eluiert. Die gesammelten Fractionen mit 1 mL wurden auf die proteolytische Aktivität gegen das fluorogene Peptid Cbz-FR-AMC analysiert. Die Hauptaktivität (Fractionen 18-37) wurde vereinigt, einkonzentriert und (1) für die Untersuchung des Aktivators, sowie (2) für den *Western-blot* mit dem anti-*At*Deg15-Peptid-Antikörper verwendet.

Benzamidin, 1 mL; Flußrate 1 mL/min

Puffer A:	Puffer B:
500 mM NaCl	2 M NaCl
10 mM Tris pH 7,4	10 mM Tris pH 7,4
2 mM β -ME	2 mM β -ME
0,02% (w/v) NaN ₃	0,02% (w/v) NaN ₃

Alle Puffer für die Säulenchromatographie wurden steril filtriert (0,22 μ m Steritop, Millipore, Schwalbach) und unter Rühren durch Vakuum entgast.

4.2.2.5 Vorfraktionierung mittels präparativer nativer isoelektrischer Fokussierung im Sephadex-Flachbett

In einem zweiten unabhängigen Ansatz erfolgte die Reinigung der Glyoxysomalen Processing Peptidase über DEAE-Säulenchromatographie, Vorfraktionierung über präparative native isoelektrische Fokussierung im Sephadex-Flachbett und 2-D-PAGE. Die im folgenden beschriebene Vorfokussierung (Görg *et al.*, 2002) und die nachgeschaltete 2-D-Elektrophorese wurde zusammen mit Dipl.Biol. Carsten Lück vom Fachgebiet für Proteomik der TU München unter der Leitung von Frau Prof. Dr. A. Görg durchgeführt.

135mg Sephadex G200 Superfine (Amersham-Pharmacia) wurden mit 3 mL mQ und 120 μ L Pharmalyte 3-10 (#17-0456-01; Amersham-Pharmacia) drei Tage bei 4°C „gequollen“. Die Probe wurde mit mQ auf ein Volumen von 1,4 mL aufgefüllt und mit pI-Markern (je 7 μ L: 4,7 dunkelrot; 5,2 lila; 5,6 gelb; 6,3 rotbraun; 7,5 rot; 8,3 orange; 8,6 braun-violett; Šlais und Friedl, 1995; Štastná *et al.*, 2005) versetzt. Probe und „gequollene“ Sephadex-Matrix wurden mit der Pipette luftblasenfrei homogen vermischt, anschließend in einer Bahn von etwa 10 x 1,5 cm in den Träger pipettiert und mit 400 μ L Siliconöl (#35132; Serva) überschichtet. Bei dem auf der temperierten Keramik-Platte der Elektrophorese-Apparatur (Multiphor II IEF System; Amersham-Pharmacia) montierten Träger handelt es sich um eine im Rahmen dieser Arbeit vorgenommene Weiterentwicklung der bei Görg *et al.* (2002) beschriebenen Anordnung (siehe Abbildung 5.46). Um die Leitfähigkeit zwischen den Elektroden und dem Sephadex-Bett herzustellen, wurden am anodischen und kathodischen Ende je 2 Lagen mit deionisiertem Wasser getränkten Whatman-Papiers (#3030917, 1 mm; Whatman) als Elektroden-Auflage positioniert. Für die Fokussierung wurde die Apparatur auf 4°C temperiert. Bei einem Strom von 4 mA je Bahn wurde die Fokussierung bei einer Spannung von 150 V (30 min) begonnen und mit 300 V (30 min),

600 V (30 min) und 1000 V (1 h) weitergeführt. Die Fokussierung wurde anhand der farbigen Marker überwacht und bei einsetzender Kathodendrift nach etwa 2,5 h beendet.

Vom fokussierten Sephadex-Bett wurden sofort im Anschluß etwa 5-10 mm breite Fraktionen mit dem Spatel ausgehoben und nach Elution (10 mM Tris/HCl pH 7,4 / 2 mM β -ME / 0,02% NaN_3) durch Assay mit dem fluorogenen Substrat Cbz-FR-AMC auf proteolytische Aktivität untersucht. Anhand der pI-Marker wurde der pI der detektierten Peptidase näherungsweise ermittelt.

4.2.2.6 Zwei-Dimensionale Elektrophorese (2-D)

Die Zwei-Dimensionale Elektrophorese wurde zusammen mit Dipl.Biol. Carsten Lück vom Fachgebiet für Proteomik entsprechend dem von Görg und Mitarbeitern (2003; <http://www.weihenstephan.de/blm/deg>) erarbeiteten Laborhandbuch durchgeführt.

Isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG)

Die proteolytische Aktivität aus der Vorfraktionierung wurde direkt auf die vorbereiteten IPG-Streifen geladen oder mit salzfreiem Puffer eluiert, auf 30 μL einkonzentriert und mit 60 μL Lysis-Puffer (2 M Thioharnstoff; 7 M Harnstoff; 2% DTT; 2% Pharmalyte 3-10, #17-0456-01, Amersham-Pharmacia; 2% Chaps, #17-1314-01, Amersham-Pharmacia) mindestens 30 min inkubiert und aufgetragen. Die IPG-Streifen (Dry Strip pH 4-7, 18 cm, #17-1233-01; Amersham-Pharmacia; Lagerung bei -20°C) wurden nach dem Auftauen im Immobiline Dry-Strip Reswelling Tray (#80-6465-32; Amersham-Pharmacia) über Nacht in Quell-Puffer (2 M Thioharnstoff; 6 M Harnstoff; 0,4% DTT; 0,5% Pharmalyte 3-10, #17-0456-01, Amersham-Pharmacia; 1% Chaps, #17-1314-01, Amersham-Pharmacia) gequollen und mit Mineralöl (#17-1335-01, Cover Fluid; Amersham-Pharmacia) als Austrocknungsschutz überschichtet. Vor der Montage wurden die Streifen durch mehrmaliges Eintauchen in mQ abgewaschen und durch Auflegen auf Whatman-Papier leicht getrocknet. Nach dem anodischen Auftrag der mit Lysis-Puffer versetzten Probe wurde zum Schutz vor Austrocknung mit Mineralöl überschichtet. Zum Einwandern der Probe in die IPG-Matrix wurde mit niedriger Spannung begonnen (je 1 h bei 150 V, 300 V und 600 V). Im Anschluß daran erfolgte die eigentliche Fokussierung beginnend mit einem Gradienten von 0-8000 V in 1 h und 8000 V bis zum Erreichen von 40000 Vh. Die IPG-Streifen wurden nach der Fokussierung zum Lösen der Protein-Disulfidbrücken unter Schwenken 15 min in DTT (1% in Trenngelpuffer pH 8,6) inkubiert. Die erneute Ver-

brückung der freien SH-Gruppen wurde durch anschließende Behandlung mit Iodacetamid (4% in Trenngelpuffer pH 8,6) unterbunden.

SDS-PAGE

SDS-PAGE und die nachfolgenden Färbungen der Gele wurden von Dipl.Biol Carsten Lück und Andreas Köpf vom Fachgebiet für Proteomik durchgeführt. Hierzu wurden die IPG-Streifen der Länge nach zwischen die Glasplatten luftblasenfrei auf das 13%-Polyacrylamidgel positioniert; am rechten Rand wurde ein mit 10 µL Molekülmassen-Standard getränkter Streifen (15 x 3 mm) Whatman-Papier aufs Gel gelegt. Zur Abdichtung wurde mit 2 mL 75°C heißer Agarose-Lösung (1% LM-Agarose in Trenngelpuffer pH 8,6 mit Bromphenolblau) überschichtet. Die fertig montierten Gele wurden in den mit Laufpuffer befüllten Elektrophorese-Tank (5 L 4x Laufpuffer + 15 L mQ, Konzentrationsausgleich nach 15 min) gesteckt. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V und 150 mA über 18 h. Nach dem Lauf wurde die Gele mit Silber oder Coomassie gefärbt oder für 2-D-*Western-blot* verwendet.

Western-blot-Analyse mit dem anti-*At*Deg15-Peptid-Antikörper

Der anti-*At*Deg15-Peptid-Antikörper, der für die Immunodetektion der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15 verwendet wurde, wurde großzügigerweise von Prof. Dr I. Adamska von der Universität Konstanz zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um einen, im Kaninchen gebildeten Antikörper gegen das 15-Aminosäuren-Fragment ET-TAAVHPGGSGGAV der Peptidase *At*Deg15 aus dem Bereich um das katalytische Serin. Der Antikörper wurde für die Immunodetektion in der Verdünnung 1:1000 in 1% BSA in TBST 24 h bei 8°C inkubiert.

Analyse des Reinigungsverlaufs der präparativen nativen Sephadex-IEF mit Gelatine-Aktivitätsgel

Die wesentlichen Stufen des Reinigungsverlaufs wurden über ein 8%-Nativgel mit 0,05% einpolymerisierter Gelatine, wie unter Abschnitt 4.1.5 beschrieben, analysiert. Es wurden verdünnte Glyoxysomen-Probe, DEAE-Pool und Sephadex-IEF-Eluat, sowie zusätzlich durch Ultrafiltration-Einheit (100 kDa-MWCO, Vivascience) in die zwei Fraktionen >100 kDa und <100 kDa aufgetrennter DEAE-Pool untersucht. Für die Probe "verdünnte Glyoxysomen" wurden 300 µL angereicherte Glyoxysomen 10-fach verdünnt, für 30 s auf Eis mit Ultraschall behandelt, 10 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und der

Überstand mit 5 kDa-Vivaspin-500 auf 120 μ L einkonzentriert. 60 μ L Konzentrat wurden mit 25 μ L Nativ-Ladepuffer versetzt und aufs Gel geladen. Für die Probe "DEAE-Pool" wurden 4 mL DEAE-Pool (~500000 RFU) wie vorher auf 120 μ L einkonzentriert, davon 60 μ L mit 25 μ L Nativ-Ladepuffer versetzt und geladen. 4 mL DEAE-Pool wurden bei 3000g im Swing-out-Rotor bei 4°C auf etwa 500 μ L einkonzentriert (Labofuge, Heraeus). Nach dem Durchlaufen der Probe wurde mit 4 mL 10 mM Tris pH 7,4 nachgespült und nochmals auf 500 μ L einkonzentriert. Der "<100 kDa"-Durchlauf wurde mit dem Puffer auf exakt 8 mL aufgefüllt, das >100 kDa-Konzentrat auf exakt 4 mL. Zur Überprüfung der Fraktionierung wurden Aliquots der beiden Fraktionen mittels Protease-Assay auf Aktivität gegen das fluorogene Substrat Cbz-FR-AMC getestet. Es befand sich 100% der eingesetzten Aktivität im Durchlauf, im Konzentrat war keinerlei Aktivität nachweisbar. Beide Fraktionen wurden auf jeweils 120 μ L einkonzentriert und davon wiederum jeweils 60 μ L mit 25 μ L Nativ-Ladepuffer versetzt und aufs Gel geladen. Vom Sephadex-IEF-Eluat wurden etwa 35 μ L mit 15 μ L Nativ-Ladepuffer versetzt und geladen. Die elektrophoretische Auftrennung im 8%-Nativgel dauerte 16 h bei 25 V und 4°C. Anschließend wurden die Gele wie im Abschnitt 4.1.5 beschrieben zurückgefaltet, dann 30 h bei 45°C inkubiert, in Coomassie gefärbt und abschließend zum Sichtbarmachen der Verdauungshöfe entfärbt.

Probenaufbereitung für die Reinigung der GPP/Deg15 über DEAE-Säule und Sephadex-IEF bzw. Benzamidin-Säule

Etwa 50 mL Glyoxysomen-Präparationen wurden, wie im Abschnitt „Aufbereitung der isolierten Glyoxysomen-Präparationen“ beschrieben, aufbereitet und anschließend über DEAE-Säule gereinigt. Die Fraktionen wurden anhand der proteolytischen Aktivität gegen das fluorogene Peptid Cbz-FR-AMC analysiert und die Hauptaktivität vereinigt (10 Mio. RFU). Nach dem Einkonzentrieren mit einer Amicon-Ultra15-Einheit (10 kDa-MWCO, Millipore) wurden 3/4 der Hauptaktivität über native präparative Sephadex-IEF weiter gereinigt. Die gewonnene proteolytische Aktivität wurde nach Konzentrieren (Vivaspin-500, 5 kDa-MWCO; Vivascience) zum einen für Spaltassays mit synthetischen Peptiden, zum anderen für 2-D-PAGE mit (1) abschließender Silberfärbung und (2) um den, der gesuchten Protease entsprechenden Spot auf dem silbergefärbten 2-D-Gel zu identifizieren, im 2-D-*Western-blot* mit dem anti-*AtDeg15*-Peptid-Antikörper (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. I. Adamska, Universität Konstanz) in 1:1000 Verdünnung,

eingesetzt. Das andere Viertel aus der nach DEAE-Säule konzentrierten Hauptaktivität (ca. 2,5 Mio. RFU) wurde über Benzamidin-Affinitätssäule gereinigt. Die Fraktionen wurden wie oben auf proteolytische Aktivität analysiert, die Hauptaktivität gepoolt, über NAP25 entsalzt und über Amicon-Ultra15 und Vivaspin-500 (10 kDa bzw. 5 kDa-MWCO) ankonzentriert. Davon wurden 2/3 für *Western-blot* mit dem anti-*AtDeg15*-Peptid-Antikörper auf ein 8%-Nativgel geladen und 1/3 für Aktivator-Versuche verwendet.

Die Probenaufteilung zusammengefasst:

Das DEAE-Pool-Konzentrat (4 mL) wurde aufgeteilt, von 3 mL wurden:

- 2700 μ L über präparative native Sephadex-IEF gereinigt und einkonzentriert, dann je 1/3 des Volumens eingesetzt für:
 - 2-D-PAGE mit abschließender Silberfärbung
 - 2-D-PAGE und 2-D-*Western-blot* mit dem anti-*AtDeg15*-Peptid-Antikörper
 - Spaltassays mit synthetischen Peptiden
- 300 μ L für Inhibitorversuche verwendet

1 mL wurde, wie beschrieben, über Benzamidin-Affinitätssäule gereinigt, mit Amicon-Ultra15 (15 mL, 10 kDa-MWCO; Millipore) und Vivaspin-500 (500 μ L, 5 kDa-MWCO; Vivascience) auf 100 μ L einkonzentriert, davon:

- 40 μ L auf ein natives 8%-Polyacrylamid-Gel für *Western-blot* mit dem anti-*AtDeg15*-Peptid-Antikörper geladen
- 60 μ L für Fluoreszenz-Assays und Aktivator-Versuche eingesetzt

Untersuchung des Aktivators im Amicon-Durchlauf

Für die Untersuchung des Aktivators wurde der Amicon-Durchlauf von der Konzentrierung des DEAE-Pools unterschiedlichen Behandlungen unterzogen und anschließend im Protease-Assay untersucht. Der Amicon-Durchlauf wurde (1) in der Speedvac eingetrocknet und in 20% des ursprünglichen Volumens mQ aufgenommen, was einem Konzentrierungsfaktor von 5 entsprach, (2) 20 min bei 95°C erhitzt und (3) 2 h in Phosphorsäure pH 2 bei 95°C hydrolysiert. 10 μ L der GPP/Deg15-Probe (DEAE-Pool) wurden mit 10 μ L des behandelten Amicon-Durchlaufs 15 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte der Fluoreszenz-Assay durch Zugabe von 1,6 nmol Protease-Substrat Cbz-FR-AMC in 80 μ L 50 mM NaP_i pH 7,4 / 0,02% NaN₃. Die akkumulierte Aktivität wurde nach 30 min gemessen.

4.2.2.7 Versuche zur Charakterisierung der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15

Bestimmung der Spaltspezifität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15 mit synthetischen Peptiden

Für die Analyse der GPP/Deg15 wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Arnold vom Genzentrum der LMU München in Martinsried fluoreszenzgequenchte Peptide synthetisiert, die die Spaltstellen von in den Glyoxysomen prozessierten höhermolekularen Vorstufen abdecken: (1) Glyoxysomale Citrat-Synthase (gCS), Abz-EAHCV↓SAQTM-(NO₂)Y-D; (2) Glyoxysomale Malatdehydrogenase (gMDH), Abz-RANCR↓AKGGA-(NO₂)Y-D; (3) Thiolase (T), Abz-SASVC↓AAGDS-(NO₂)Y-D und als Kontrolle das an P1 modifizierte Thiolase-Peptid Abz-SASVG↓AAGDS-(NO₂)Y-D (siehe auch Tabelle 5.12 und 5.13; ↓ steht N-terminal vom *in-vivo* gefundenen N-Terminus des reifen Proteins). Die Peptide wurden durch Festphasensynthese nach Merrifield unter Verwendung der Fmoc-Schutzgruppenstrategie hergestellt. Als Harz diente mit einer Aminosäure beladenes Hydroxymethylphenoxy-Harz (Wang-Harz) von Novabiochem; die Fmoc-Aminosäurederivate mit Schutzgruppen wurden von Novabiochem und die Abz-Aminosäurederivate von Bachem bezogen. Die Peptidsynthesen wurden mit einem Peptidsynthesizer (ABI433A; Applied Biosystems) im 100 µmol Maßstab durchgeführt. Die synthetisierten Peptide wurden über *Reversed-Phase* HPLC (SYCAM, Fürstenfeldbruck; Säule Ultrasphere C18, Beckman) im linearen Gradienten bis 70% Acetonitril gereinigt. Die Analyse der Peptidfraktion erfolgte über *Reversed-Phase* HPLC (System-Gold, Beckman; Säule Source 5RPC ST 4,6/150 mit 5 µm C18 Styrol/Divinylbenzol-Matrix, Pharmacia) im linearen Gradienten bis 80% Acetonitril. Das Molekulargewicht der Proben wurde mittels ESI-MS (LCQ DecaXP +; Thermo-Finnegan) überprüft. Hierzu wurden MS-Spektren in einem Massenbereich von 200-2000 m/z aufgenommen. Weiterhin wurde ein Substrat der eukaryontischen Ca²⁺-abhängige Proprotein-Convertase Furin (siehe Abschnitt 3.4.6) verwendet (Anglikar *et al.*, 1995). Dieses Peptid Abz-RVKRGLA-(NO₂)Y-D (M-2115; Bachem) mit gleichem Donor-Akzeptor-Paar (Fluorogen-Quencher-Paar) enthält an den Positionen P1 und P4 jeweils Arg.

In dem verwendeten Donor-Akzeptor-Paar ist die Aminobenzoyl-Gruppe (Anthranilyl-, Abz-Gruppe) der Donor und die Nitro-Tyrosyl-Gruppe der Akzeptor. Anregungs- und Emissionswellenlänge sind 320 nm bzw. 420 nm. Der C-terminale Asp-Rest fungiert als

Schutzgruppe gegen die proteolytische Aktivität von Carboxy-Peptidasen.

Zum Funktionsnachweis der GPP/Deg15 wurden für den Spaltassay 10 nmol jedes der vier synthetischen Peptide in 4 μ L DMF bzw. 10 nmol des Peptids Abz-RVKRGLA-Y(NO₂)-D in 4 μ L DMSO mit 10 μ L Protease-haltiger Probe (67.000 RFU pro Ansatz; siehe oben) in 186 μ L Puffer (10 mM Tris pH 7,4) 3 h im Wasserbad bei 24°C inkubiert und die Reaktion dann durch Schockfrieren in Flüssigstickstoff abgestoppt. Die negativen Kontrollen enthielten anstelle der Probe 10 μ L des verwendeten Puffers. Die Spaltprodukte der Proben wurden von der Abteilung für Proteinanalytik am MPI Martinsried unter der Leitung von Prof. Dr. F. Lottspeich mittels Edman-Sequenzierung und Massenspektroskopie analysiert.

Spaltassay:

Peptid-Stammlösung: 2,5 mM (50 nmol in 20 μ L Dimethylformamid)

Probe: Glyoxysomale Processing Peptidase, angereinigt aus Glyoxysomen mittels DEAE-Säule und präparativer nativer Sephadex-IEF, 67.000 RFU

Reaktionsansatz (200 μ L): 4 μ L Peptid-Stammlösung (Endkonzentration 50 μ M)
10 μ L Probe
186 μ L Puffer 10 mM Tris pH 7,4 / 2 mM β -ME / 0,02% NaN₃
→ Inkubation 3 h bei 24°C im Wasserbad
→ nach Reaktionsende Einfrieren in Flüssig-N₂

Untersuchung der pH-Abhängigkeit

Die pH-Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität der Glyoxysomalen Processing Peptidase gegenüber dem fluorogenen Substrat Cbz-FR-AMC wurde im Bereich von pH 4,5 bis 9,0 in Acetat-, MES- und Tris-Puffer bzw. Phosphat-Puffer untersucht. Desweiteren wurde die proteolytische Aktivität in Tris-Puffer und Phosphat-Puffer bei pH 8,5 direkt miteinander verglichen.

10 μ L Protease-haltige Probe (DEAE-Pool-Konzentrat) wurde mit 1,6 nmol des fluorogenen Substrates Cbz-FR-AMC in 90 μ L 500 mM Acetat-Puffer (pH 4,5; 5,0; 5,5), 250 mM MES-Puffer (pH 5,5; 6,0; 6,5) und 500 mM-Tris-Puffer (pH 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0) versetzt und bei RT inkubiert. Nach 30 min wurde die akkumulierte Fluoreszenz gemessen. Als Kontrolle wurde bei jedem pH-Wert der Blindwert mit 90 μ L Substrat im Puffer mit 10 μ L DEAE-Puffer A bestimmt und vom erhaltenen Bruttowert subtrahiert. Je-

der Meßwert wurde vierfach bestimmt.

DEAE-Pool-Konzentrat und Sephadex-Eluat wurden auf die pH-Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität gegen das fluorogene Substrat Cbz-FR-AMC untersucht. Dazu wurden NaP_i -Puffer in pH-Schritten von 0,5 Einheiten von pH 4,5 bis 9,0 hergestellt und von jeder Stufe Substrat-Verdünnungen mit 1,6 nmol des fluorogenen Substrates Cbz-FR-AMC pro 80 μL 50 mM Phosphat-Puffer angesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μL Protease-haltiger Probe gestartet, so daß ein Meßvolumen von 100 μL gegeben war. Als Kontrolle dienten jeweils 80 μL Substratansatz der entsprechenden pH-Stufe mit 20 μL mQ. Es wurde die nach 30 min akkumulierte Fluoreszenz ermittelt, jeder Meßwert wurde vierfach bestimmt.

Für den direkten Vergleich der proteolytischen Aktivität der GPP in Tris-Puffer und Phosphat-Puffer wurden Ansätze bei pH 8,5 direkt miteinander verglichen. 10 μL Protease-haltige Probe (DEAE-Pool-Konzentrat) wurde mit 1,6 nmol des fluorogenen Substrates Cbz-FR-AMC in 90 μL 50 mM NaP_i - bzw. 20 mM Tris-Puffer pH 8,5 versetzt und bei RT inkubiert. Es wurde die nach 30 min akkumulierte Fluoreszenz gemessen jeder Meßwert wurde dreifach bestimmt.

Untersuchung der Temperatur-Abhängigkeit

Die proteolytische Aktivität des Sephadex-Eluates gegen das fluorogene Substrat Cbz-FR-AMC wurde im Temperaturbereich von 25°C bis 70°C untersucht. Dazu wurde die Protease-haltige Probe 30 min bei der entsprechenden Temperatur vorinkubiert und dann die Reaktion durch Zugabe von Substrat gestartet. Pro 20 μL Probe wurden 80 μL Substrat-Verdünnung mit 1,6 nmol Substrat zugefügt. Parallel wurde bei jeder Temperaturstufe die Autolyse des Substrates ermittelt. Die nach 30 min akkumulierte Fluoreszenz wurde ermittelt und jeder Meßwert vierfach bestimmt.

Untersuchung des Einflusses von Testproteinen auf die proteolytische Aktivität bei 30°C und 45°C

Nachdem im Amicon-Durchlauf ein Aktivator identifiziert war, wurden die drei Testproteine β -Casein (C-6905; Sigma), Magermilchpulver (Saliter) und Rinderserum-Albumin (Fluka) auf ihre Wirkung auf die proteolytische Aktivität der GPP/Deg15 bei Inkubationstemperaturen von 30°C und 45°C untersucht. Dazu wurden jeweils 1%ige Stammlösungen in mQ angesetzt und hiervon im 100 μ L-Assay 10 μ L Testprotein (0,1% Endkonzentration) mit 10 μ L Protease-haltiger Probe (DEAE-Pool-Konzentrat) und 1,6 nmol fluorogenem Substrat Cbz-FR-AMC in 80 μ L 50 mM NaP_i -Puffer pH 7,4 / 0,02% NaN_3 angesetzt und 30 min im Eppendorf Thermoschüttler inkubiert. Nach 30 min wurde die akkumulierte Fluoreszenz gemessen.

Selbstverdau des DEAE-Pools bei 30°C und 45°C

Nach Ermittlung des Temperatur-Optimums der GPP/Deg15 lag es nahe, das Verhalten der Protease bei verschiedenen Temperaturen gegenüber glyoxysomalen Matrix-Proteinen zu untersuchen. Dazu wurde GPP/Deg15-haltiger DEAE-Pool bei 30°C und 45°C im Eppendorf Thermoschüttler inkubiert. Bei Reaktionsbeginn sowie nach 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h wurden 30 μ L Aliquots entnommen, mit 15 μ L 3-fach Probenpuffer 3 min bei 95°C aufgeköcht und über 17,5%-SDS-PAGE analysiert. Die nach 24 h vorhandene Aktivität gegen das fluorogene Substrat Cbz-FR-AMC wurde im Standard-Assay mit einer 30-minütigen Inkubationszeit bestimmt.

Der Einfluß ausgewählter Cofaktoren auf die proteolytische Aktivität

Einige biochemische Cofaktoren wurden auf einen die Aktivität beeinflussenden Effekt hin untersucht. Die Cofaktoren (1) ZnCl_2 und (2) MnCl_2 (beide jeweils 100 nM und 100 μ M), (3) Mg^{2+} +ATP, (4) Mg^{2+} +ADP und (5) NADH (jeweils 100 μ M) wurden mit 10 μ L der GPP/Deg15-haltigen Probe (DEAE-Pool) 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Fluoreszenz-Assay durch Zugabe von 1,6 nmol Peptidase-Substrat Cbz-FR-AMC in 80 μ L 50 mM NaP_i pH 7,4 / 0,02% NaN_3 gestartet. Gemessen wurde die nach 30 min akkumulierte Fluoreszenz. Es wurde eine dreifache Bestimmung der Meßwerte durchgeführt.

Der Einfluß von Protease-Inhibitoren auf die proteolytische Aktivität

Die 14 aufgeführten Inhibitoren (Tabelle 4.3) wurden eingesetzt, um die GPP/Deg15 zu charakterisieren. Je Ansatz wurden 10 µL GPP/Deg15-Probe (DEAE-Pool-Konzentrat und Sephadex-Eluat) mit 10 µL des Inhibitors in der in Tabelle 4.3 angegebenen Arbeitskonzentration 1 h bei RT inkubiert. Danach erfolgte der Fluoreszenz-Assay durch Zugabe von 1,6 nmol fluorogenem Protease-Substrat Cbz-FR-AMC in 80 µL 50 mM NaP_i pH 7,4 / 0,02% NaN₃, so daß ein Meßvolumen von 100 µL gegeben war. Die akkumulierte Aktivität wurde nach 30 min gemessen. Es wurde eine vierfache Bestimmung der Meßwerte durchgeführt.

Der Einfluß von Ca²⁺-Ionen und EDTA auf die proteolytische Aktivität

Die proteolytische Aktivität in den Glyoxysomen wurde über DEAE-Säule gereinigt und mittels Ultrafiltration aufkonzentriert (DEAE-Pool-Konzentrat). Von dieser Probe wurden 5 µL bei RT (1) 10 min mit 6,25 mM EDTA, (2) 10 min mit 25 mM Ca²⁺ und (3) 10 min mit 6,25 mM EDTA und anschließend 10 min mit 25 mM Ca²⁺ ((1), (2) und (3) jeweils in 15 µL) inkubiert. Danach erfolgte der Fluoreszenz-Assay durch Zugabe von 1,6 nmol fluorogenem Protease-Substrat Cbz-FR-AMC in 80 µL 20 mM Tris-Puffer pH 8,5 / 0,02% NaN₃, so daß ein Meßvolumen von 100 µL resultierte. Die akkumulierte Aktivität wurde nach 30 min gemessen. Es wurde eine dreifache Bestimmung der Meßwerte durchgeführt.

Tabelle 4.3: Verwendete Protease-Inhibitoren. In den Spalten sind (1) die Protease-Inhibitoren, (2) deren Bezugsquelle, (3) die Konzentration der Stammlösung und das jeweils verwendete Lösungsmittel, sowie (4) die Arbeitskonzentration angegeben.

Inhibitor	Herkunft	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Antipain	Sigma, A-6191	10 mM in MeOH	75 μ M
Bestatin	Sigma, B-8385	6,5 mM in MeOH	130 μ M
Chymostatin	Sigma, C-7268	10 mM in DMSO	10 μ M
Leupeptin	Sigma, L-0649	1 mM in mQ	1 μ M
Pepstatin A	Sigma, P-5318	1 mM in MeOH	1 μ M
PMSF	Boehringer, 837091	10 mM in Isopropanol	100 μ M
TLCK	Sigma, T-7254	10 mM MES pH 5,5	100 μ M
TPCK	Sigma, T-4376	10 mM in EtOH	200 μ M
VLK-CMK	Bachem, N-1385	10 mM in DMF	5 μ M
PFR-CMK	Bachem, N-1210	10 mM in DMF	5 μ M
Benzamidin	Sigma, B-6506	30 mM in mQ	1 mM
p-Amino-Benzamidin	Sigma	5 mg/mL in mQ	5 mM
EDTA	Fluka	0,5 M pH 8	10 mM
Cystatin aus Hüh- nereiweiß	Sigma, C-0408	5,3 mg/mL 10 mM Tris pH 8	1:200

5. Ergebnisse

5.1 Gewebespezifische Expression der drei KDEL-Peptidasen in *Arabidopsis thaliana*

„KDEL-Peptidasen“ bilden eine distinkte Gruppe innerhalb der Papain-artigen Cystein-Peptidasen. Die im Rahmen dieser Arbeit behandelte *Ricinus* CysEP darf als Prototyp dieser Peptidasen betrachtet werden. Der KDEL-Terminus stellt das ER-Rückhaltesignal dar. Um die Funktion der drei KDEL-Peptidasen *AtCEP1*, *AtCEP2* und *AtCEP3* in *Arabidopsis* zu untersuchen, wurden transformierte Pflanzen, die Glucuronidase (GUS) unter der Kontrolle der drei Promotoren von *AtCEP1*, *AtCEP2* und *AtCEP3* exprimieren (Gietl und Schmid, 2001), einer Funktionsanalyse unterzogen. Dabei wurden Ort und Zeitpunkt der Expression erfaßt und dokumentiert.

Desweiteren sollten die drei KDEL-Proteasen in Geweben von *Arabidopsis* nachgewiesen werden. Hierzu wurden Antikörper gegen synthetische Peptide generiert, die gering-konservierte Regionen der drei KDEL-Peptidasen *AtCEP1*, *AtCEP2* und *AtCEP3* repräsentieren, in denen sich diese Peptidasen unterscheiden.

5.1.1 Histochemische Lokalisation der *AtPCEP1*-, *AtPCEP2*- und *AtPCEP3*-Aktivität in transgenen Promotor-GUS-Linien

Es wurden Transformanten von *Arabidopsis* untersucht (Gietl und Schmid, 2001), die den Reporter Glucuronidase (GUS) unter der Kontrolle der Promotoren von *CEP1*, *CEP2* und *CEP3* exprimieren. Die transgenen Pflanzen sind im folgenden mit *PCEP1*-, *PCEP2*- und *PCEP3-GUS* bezeichnet. Es wurden vegetative Gewebe, das heißt 4–10 Tage alte Keimlinge und generative Gewebe untersucht. Die Stadien der Blütenentwicklung wurden nach Müller (1961; siehe Tabelle 5.1) und die Stadien der Seitenwurzelentwicklung nach Malamy und Benfey (1997; siehe Abbildung 5.1) klassifiziert.

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Stadien der Blütenentwicklung bei *Arabidopsis*. Aufgeführt sind die Ereignisse, die den Beginn des jeweiligen Stadiums definieren, sowie deren ungefähre Dauer. Die Stadien der Blütenentwicklung entsprechen der von Müller (1961) eingeführten Nomenklatur; die Tabelle entspricht auszugsweise der von Bowman (1993).

Stadium	Ereignis zu Beginn des Stadiums	Dauer	Alter am Ende des Stadiums
13	Knospe öffnet sich, Petalen sind sichtbar, Anthesis	6 h	0,5 d
14	lange Antheren überragen die Narbe	18 h	1 d
15	Narbe überragt Antheren	24 h	2 d
16	Petalen und Sepalen welken	12 h	2,5 d
17	alle Organe fallen von den grünen Schoten ab	192 h	10,5 d
18	Schoten werden gelb	36 h	12 d
19	Schotenwände trennen sich von der trockenen falschen Scheidewand	bis 24 h	13 d
20	Samen fallen		

5.1.1.1 GUS-Expression unter der Kontrolle des *AtCEP1*-Promoters

In Keimlingen ließ sich nur eine schwache GUS-Expression nachweisen. Der Promotor war nur in der äußersten Wurzelspitze (Abbildung 5.2A), jedoch nicht in der Kalyptra aktiv (Abbildung 5.2B). Promotoraktivität fand sich auch an Orten der Seitenwurzelbildung. Die ersten Seitenwurzeln entstehen meist am Übergang vom Hypokotyl zur Wurzel (Abbildung 5.2C). Eine Abfolge verschiedener Stadien der Seitenwurzelbildung ist in Abbildung 5.3A-G gezeigt. GUS-Aktivität fand man in den Zellen, die von dem, aus dem Perizykel hervorgehenden Seitenwurzelprimordium mechanisch verdrängt werden. Dabei werden von innen nach außen Endodermis, Cortex und Epidermis durchstoßen. Bereits in den Stadien II und III der Seitenwurzelentwicklung (Einteilung nach Malamy und Benfey, 1997) war GUS-Expression in Endodermiszellen zu erkennen (Abbildung 5.3A und B). Bei weiterem Wachstum des Seitenwurzelprimordiums trat die GUS-Expression in der Rinde (Cortex), der Endodermis benachbarten Zellschicht auf (Abbildung 5.3E). Mit Umfangserweiterung fand sich auch an der Basis der wachsenden Seitenwurzel GUS-Expression (Abbildung 5.3G).

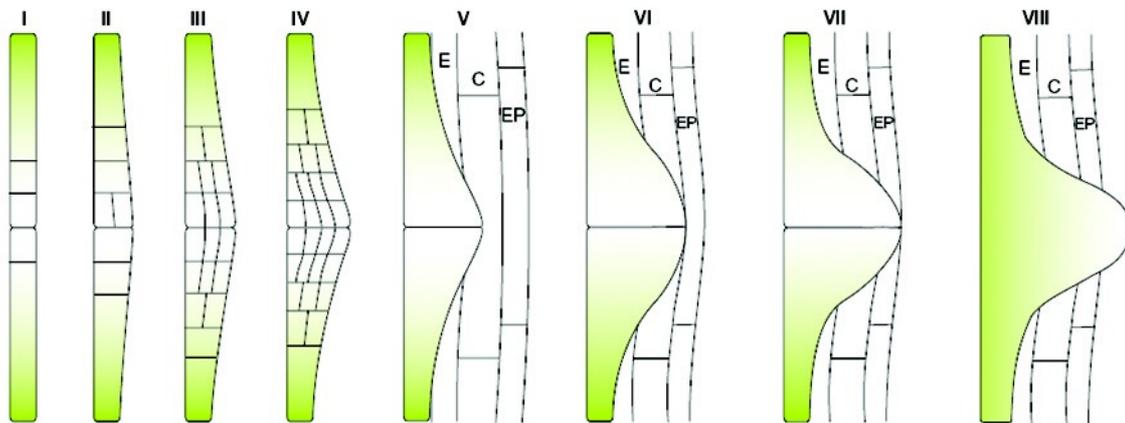


Abbildung 5.1: Stadien der Seitenwurzel (SW)-Entwicklung bei *Arabidopsis* nach Malamy und Benfey (1997). Gezeigt ist eine entwicklungsmäßige Abfolge von Längsschnitten durch Seitenwurzel-Primordien. I: Kurze Perizykelzellen werden von längeren Zellen flankiert. II: Durch transversale Zellteilung bildet sich eine innere und eine äußere Zellschicht. III: Die Zellen der äußeren Schicht durchlaufen perikline Teilungen. IV: Durch perikline Teilungen der inneren Zellschicht ist das SW-Primordium vierlagig. V-VII: Das SW-Primordium durchstößt Cortex und Epidermis. VIII: Das SW-Primordium tritt aus der Hauptwurzel hervor. C, Cortex; E, Endodermis; EP, Epidermis. [Abbildung aus Casimiro *et al.* (2003) modifiziert; © 2003 Elsevier Science Ltd..]

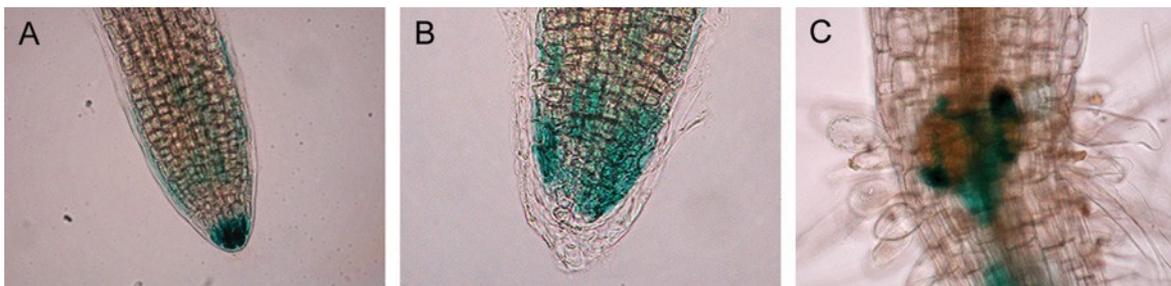


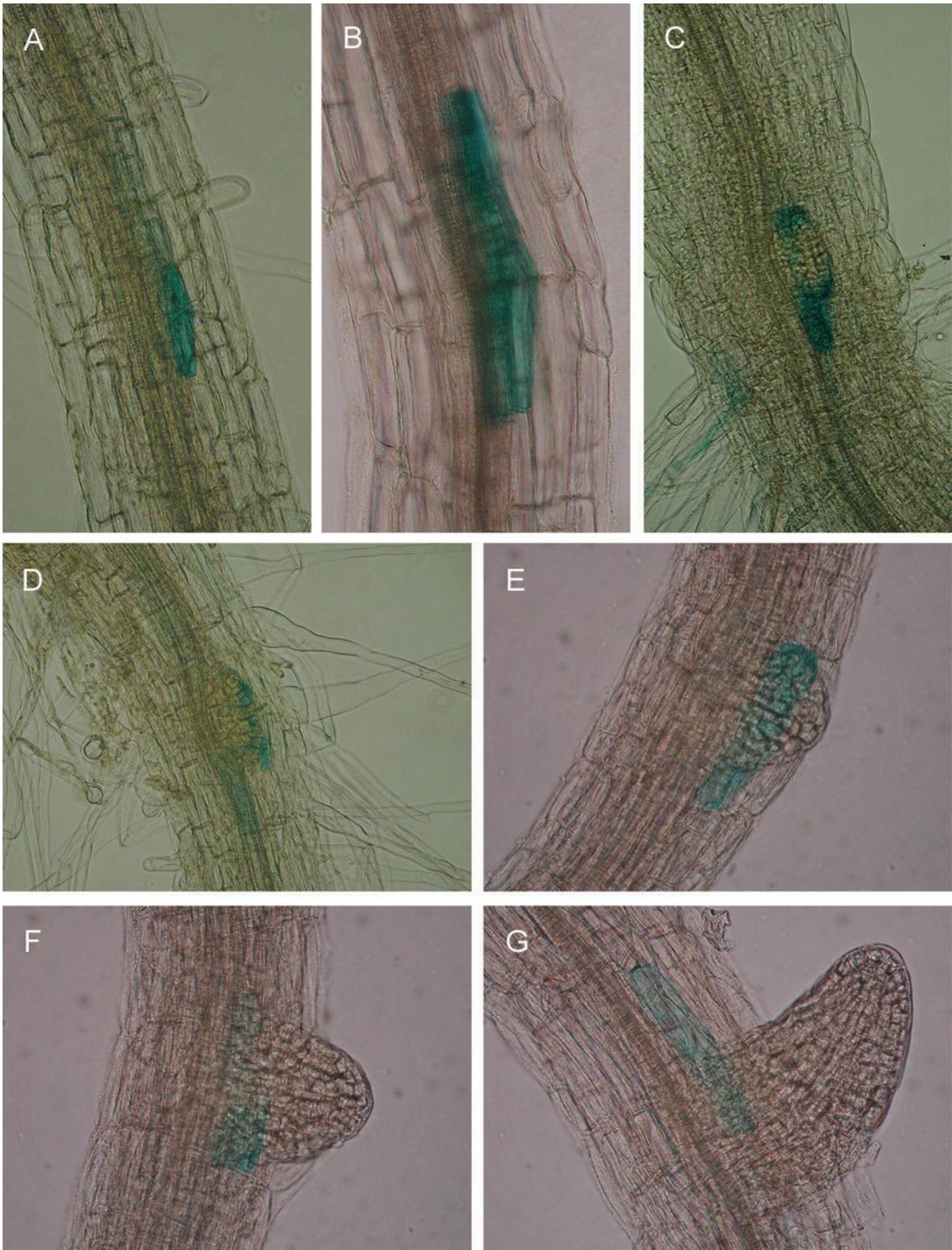
Abbildung 5.2: Histochemische Lokalisation der GUS-Expression in den Wurzeln von *PCEPI-GUS*-Keimlingen.

A: Wurzelspitze B: Wurzelspitze mit Kalyptra C: Seitenwurzelbildung am Übergang vom Hypokotyl zur Wurzel. [Objekte waren 5-7 Tage alte Keimlinge; GUS-Substrat X-Gluc; DIC, 100x.]

Nächste Seite:

Abbildung 5.3: Histochemische Lokalisation der GUS-Expression in den Wurzeln von *PCEPI-GUS*-Keimlingen im Rahmen der Seitenwurzel-Entwicklung.

A und B: In einem frühen Stadium der Seitenwurzelentwicklung (Stadium II, III) ist GUS-Aktivität in Endodermiszellen zu erkennen. C und D: Das Seitenwurzelprimordium (Stadium IV) hat die Endodermis durchstoßen, die verdrängten Endodermiszellen zeigten GUS-Expression. Cortex und Rinde sind noch intakt. E: Das Seitenwurzelprimordium (Stadium VII) hat die Epidermis durchstoßen. GUS-Expression findet sich in den durchstoßenen Cortexzellen. F und G: Das Seitenwurzelprimordium hat die Epidermis durchstoßen und tritt deutlich hervor (Stadium VIII); Leitgefäße sind in (G) bereits ausgebildet. GUS-Expression findet sich in einzelnen Zellen an der Basis der Seitenwurzel. [Objekte waren 5-7 Tage alte Keimlinge; Nomenklatur der Stadien der Seitenwurzelentwicklung nach Malamy und Benfey (1997); GUS-Substrat X-Gluc; DIC, 200x.]



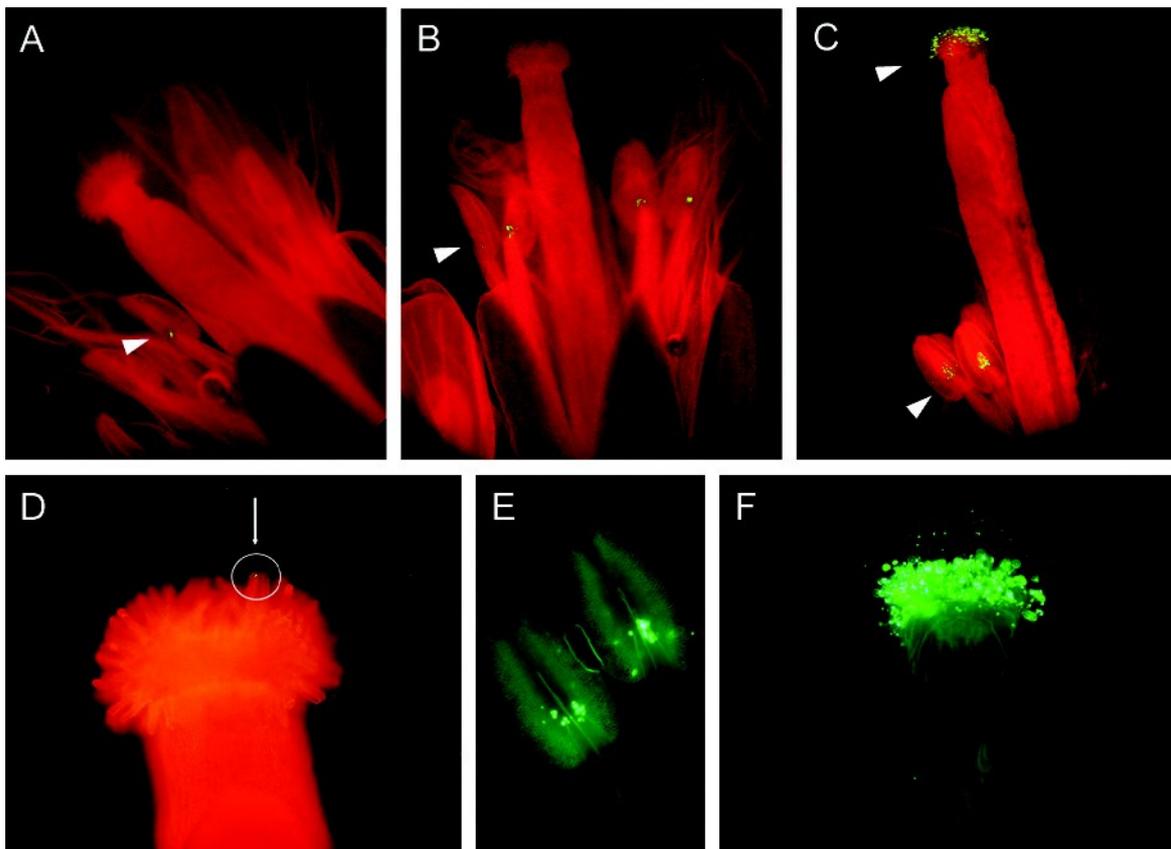


Abbildung 5.4: Histochemische Lokalisation der GUS-Expression in *PCEPI-GUS*-Blüten der Stadien 15 und 16.

Die GUS-Expression ist durch Pfeile hervorgehoben. A: Frühes Stadium 15. B: Spätes Stadium 15. C: Stadium 16. D: Narbe von (B) im Detail mit einsetzender GUS-Expression. E: Antheren im Stadium 16. F: Narbe im Stadium 16. [Nomenklatur der Stadien der Blütenentwicklung nach Müller (1961); GUS-Substrat ELF97-Gluc; Fluoreszenz-Filtersätze Ex 450-490 / Em LP 520 (A, B, C und D) bzw. HQ 535 (E und F); 40x (A, B und C) bzw. 100x (D, E und F).]

In Stadium 15 der Blütenentwicklung, wenn sich der Fruchtknoten verlängert und die Narbe oberhalb der Antheren sichtbar ist, zeigte sich *PCEPI-GUS*-Aktivität in den Antheren und zwar an den Stellen, an denen das Filament ansetzt (Blüte im Überblick in Abbildung 5.4A und B, Antheren im Detail in Abbildung 5.4E). Die GUS-Expression in der Narbe zeigte sich erstmals beim Übergang zum Stadium 16 (Abbildung 5.4B und D). Im späteren Stadium 16, wenn Kelch- und Fruchtblätter zu welken beginnen, zeigte auch die gesamte Narbe deutliche GUS-Expression (Abbildung 5.4C und F).

In Stadium 17, wenn alle Blütenblätter von den grünen Schoten abgefallen sind, zieht sich die GUS-Aktivität wie ein Band um den gesamten Umfang (Abbildung 5.5A). Besonders auffällige GUS-Expression zeigte sich im Bereich der nicht mehr benötigten lateralen Nektarien (Abbildung 5.5A und C und 5.6C). Auf Höhe der Nektarien befinden sich hier

die Abscissionsstellen der Petalen (Abbildung 5.5B). Die Trennzonen der sechs Staubblätter befinden sich über den Nektarien, die der vier Sepalen unter den Nektarien (zur Orientierung bezüglich der Lage der Blütenorgane siehe Abbildung 5.5B und D). Bei den betroffenen Geweben handelt es sich hier um kollabierende und absterbende Zellen.

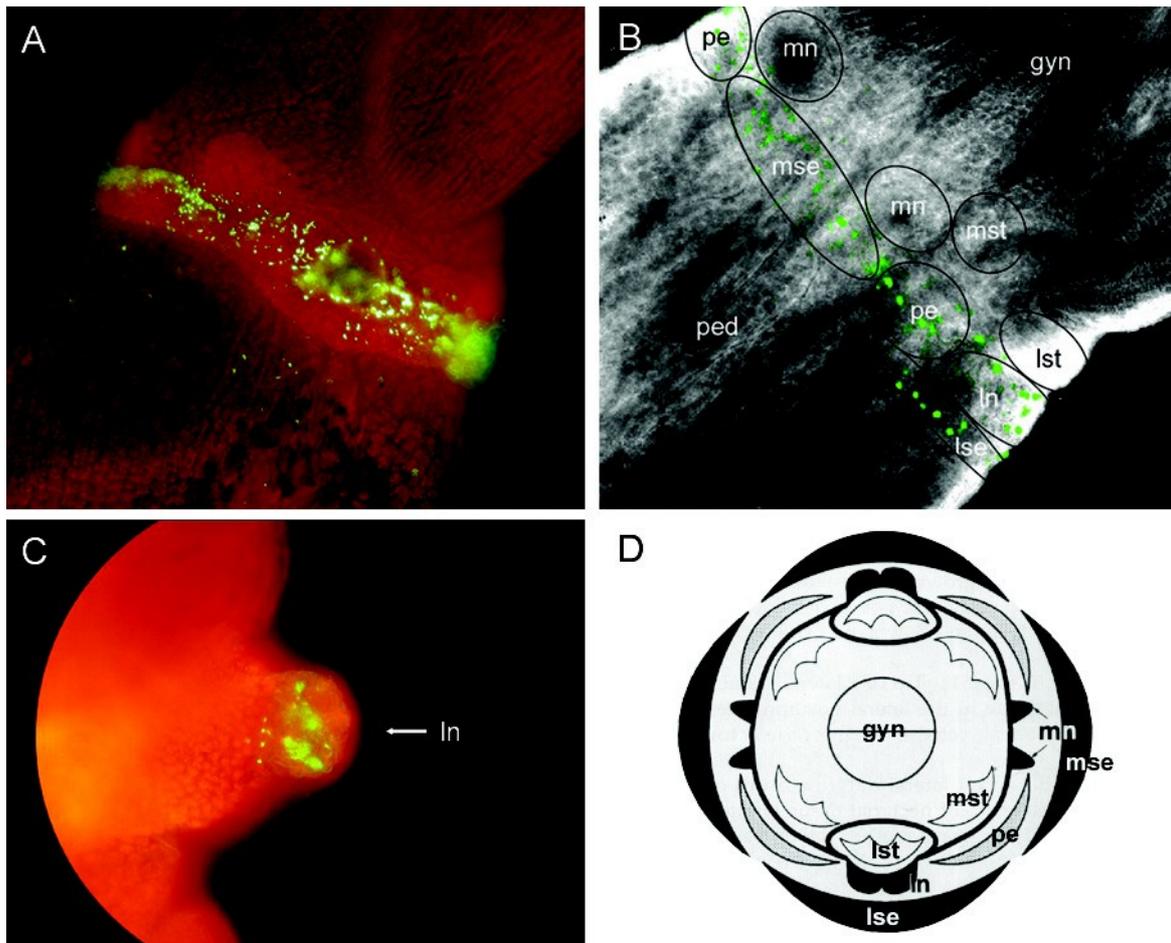
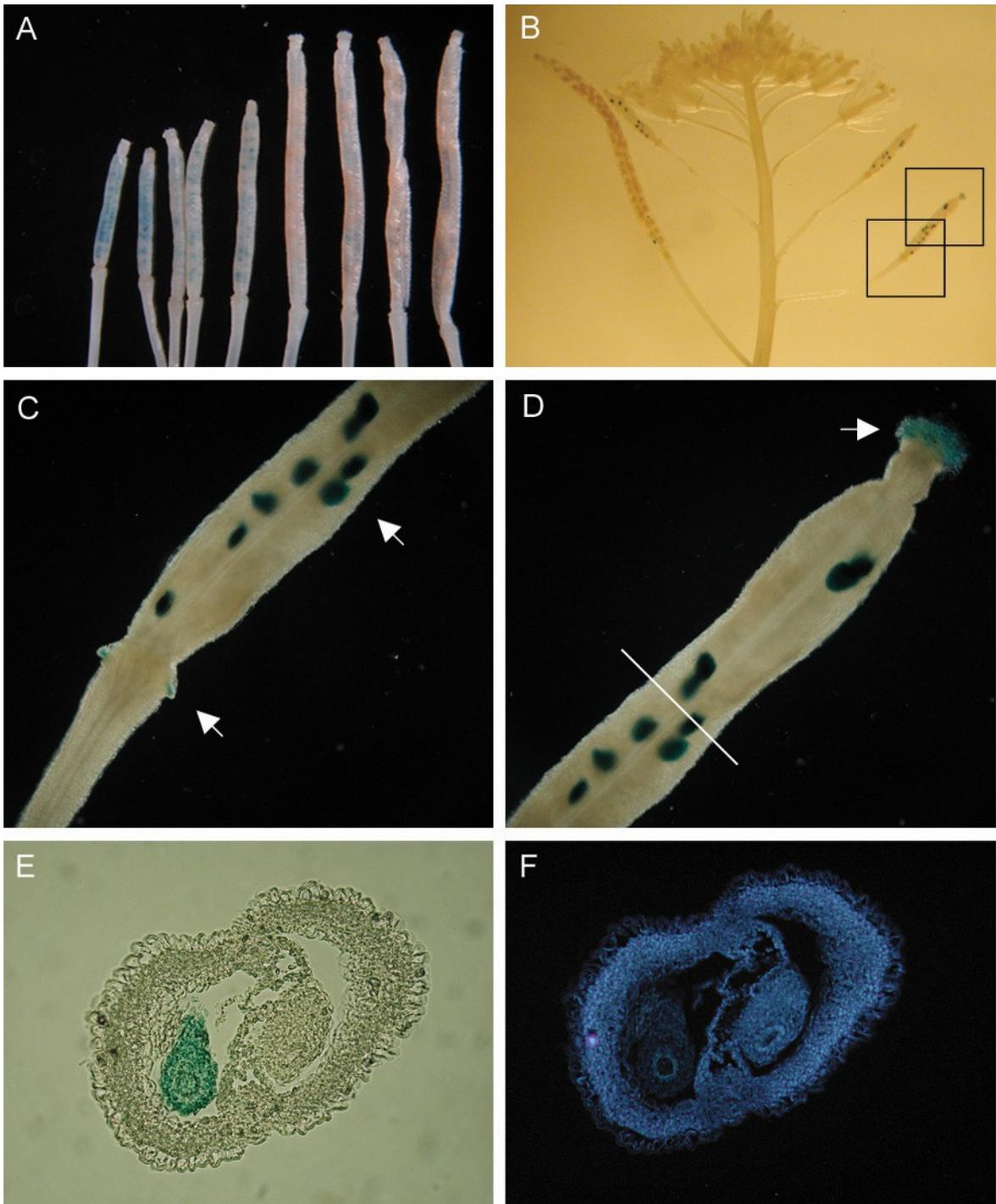


Abbildung 5.5: Details der Histochemischen Lokalisation der GUS-Expression an der Abscissionszone von *PCEP1-GUS*-Schoten des Stadiums 17.

A: Abscissionszone und Nektarien einer Schote im frühen Stadium 17. **B:** Konfokale Mikroskopie der gleichen Situation wie (A). Zur Orientierung sind Trennzonen der Blütenorgane umrissen und beschriftet. **C:** Detailansicht eines lateralen Nektariums (Pfeil). **D:** Blütendiagramm von *Arabidopsis*. Abbildung aus Bowman (1993); © 1994 Springer-Verlag New York, Inc.. Abkürzungen: gyn, Gynoeceum; lst, laterales Staubblatt; mst, medianes Staubblatt; ln, laterales Nektarium; mn, medianes Nektarium; pe, Petal; lse, laterales Sepal; mse, medianes Sepal; ped, Pedikel.

[Nomenklatur der Stadien der Blütenentwicklung nach Müller (1961); GUS-Substrat ELF97-Gluc; Fluoreszenz-Filtersatz Ex 450-490 / Em LP 520 (A und C) bzw. HQ 535 (B); 100x.]



Vorherige Seite:

Abbildung 5.6: Histochemische Lokalisation der GUS-Aktivität in *PCEPI-GUS*-Schoten. A: Abfolge verschiedener Entwicklungsstadien von Schoten einer Infloreszenz (von links nach rechts). In jungen Schoten (Schoten 1 und 2; spätes Stadium 16) zeigen zahlreiche Samenanlagen (SA) GUS-Aktivität. Im weiteren Verlauf der Entwicklung geht die GUS-Expression zurück (Stadium 17; Schoten 3-5) und verschwindet bei Samenreife (Stadium 18; Schoten 6-9). B: Eine Infloreszenz mit verschiedenen Entwicklungsstadien von Blüten und Schoten. Die beiden eingerahmten Bereiche entsprechen den Detailaufnahmen (C) und (D) einer Schote im Stadium 17. Die GUS-Expression der Nektarien, SA und Narbe ist durch Pfeile markiert. Der durch die Linie (D) angezeigte Querschnitt ist in (E) und (F: DAPI-Färbung von (E)) abgebildet. E: Von den beiden querschnittenen SA zeigt die linke GUS-Expression. F: Die SA mit GUS-Expression (links) enthält im Gegensatz zur benachbarten SA keine anfärbaren Kerne mehr. [Nomenklatur der Stadien der Blütenentwicklung nach Müller (1961); GUS-Substrat X-Gluc; Einbettung Paraplast Plus (E und F), 10 µm Schnitte; 10x (A und B), 40x (C und D), 100x (E und F).]

Bei der in Abbildung 5.6A abgebildeten Abfolge unterschiedlicher Entwicklungsstadien von Schoten fällt auf, daß die GUS-Expression nach dem Abfallen der Blütenorgane in zunächst sehr vielen Samenanlagen auftrat, im weiteren Verlauf der Entwicklung dann zurückging. Der Blick auf eine *PCEPI-GUS*-Infloreszenz (Abbildung 5.6B) verdeutlicht dies: GUS-Aktivität war erst nach der Blüte im Stadium 16-17 nachzuweisen und bei der längsten Schote der Infloreszenz fast wieder verschwunden. In einer Samenanlage mit GUS-Expression ließen sich die Kerne mit dem Kernfarbstoff DAPI nicht mehr anfärben (Abbildung 5.6E und F). Weitere Stadien der Rückbildung von absterbenden Samenanlagen mit GUS-Aktivität sind in Abbildung 5.7 gezeigt. Abbildung 5.7A und B zeigt absterbende Samenanlagen in einer Schote des späten Stadiums 17. In einer gelben Schote des Stadium 18 (Abbildung 5.7C) war bei regulärer Entwicklung die Samenschale ausgebildet; daneben war noch ein Überrest einer zurückgebildeten unbefruchteten Samenanlage vorhanden und an dieser GUS-Aktivität erkennbar. Des weiteren fand sich in reifenden Schoten des Stadiums 18 GUS-Expression auf der Samenoberfläche (Abbildung 5.7D), dabei dürfte es sich um das sich auflösende äußere Integument handeln. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es sich bei der innerhalb der Schoten beobachteten GUS-Expression um zwei unterschiedliche Vorgänge handelt. Bei den sich regulär entwickelnden Samen zeigt das sich auflösende äußere Integument GUS-Expression, die nach Ausbildung der Samenschale in Schoten fortgeschrittener Stadien (17 und 18) wieder verschwindet. Allerdings finden sich in den Schoten dieser Stadien neben reifenden Samen mit ausgebildeter Samenschale auch verkümmerte Samenanlagen mit GUS-Expression, in denen keine anfärbaren Kerne mehr vorhanden, also vollständig abgestorben sind.

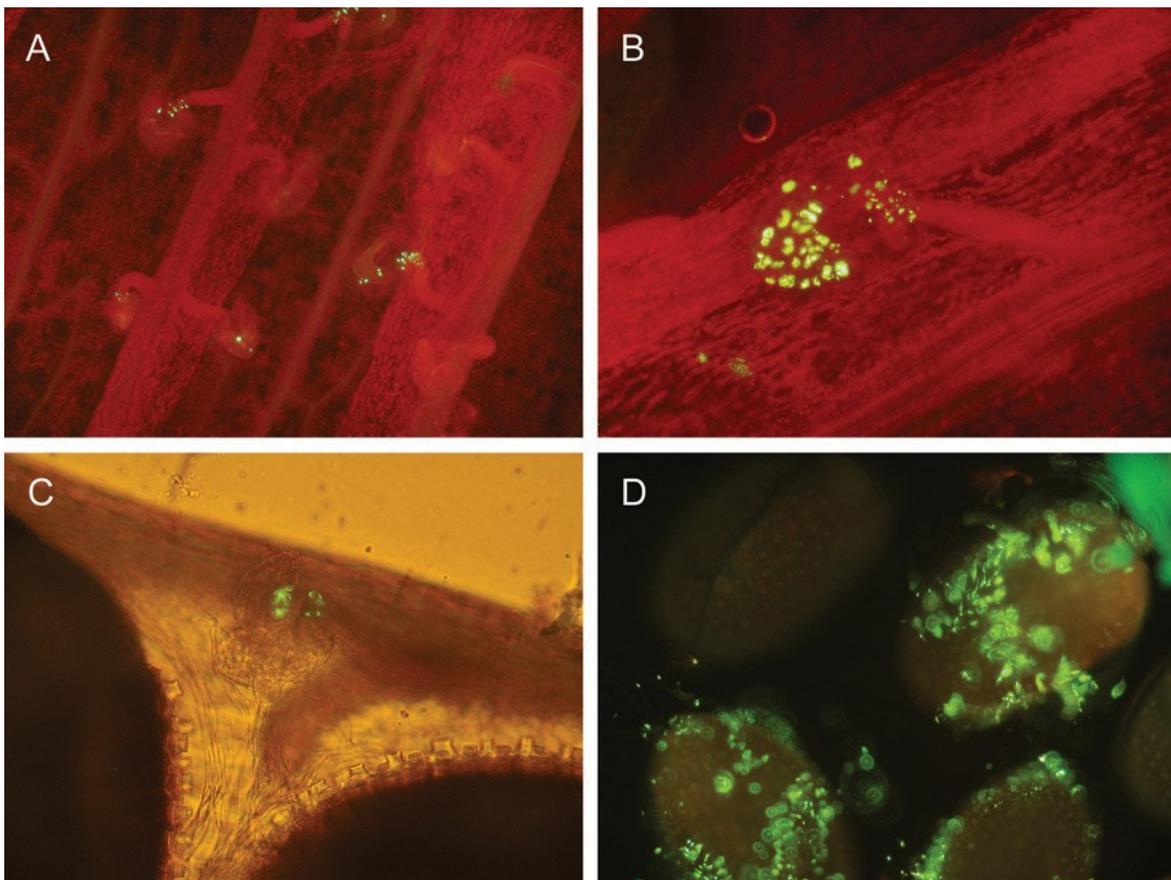


Abbildung 5.7: Details der Histochemischen Lokalisation der GUS-Expression in *PCEP1-GUS*-Schoten.

A: Zahlreiche absterbende Samenanlagen (SA) in grünen Schoten des Stadiums 17. **B:** Detailansicht einer absterbenden SA von (A). **C:** Überrest einer absterbenden Samenanlage neben intakten entwickelten Samen in einer gelben Schote des Stadiums 18. **D:** GUS-Expression in den, der Samenschale, aufliegenden Zellen des sich auflösenden äußeren Integuments. [Nomenklatur der Stadien der Blütenentwicklung nach Müller (1961); GUS-Substrat ELF97-Gluc; Fluoreszenz-Filtersatz Ex 365nm/Em LP 520nm; 100x (D), 200x (A), 400x (B und C).]

In reifenden *Arabidopsis*-Samen wird das transient angelegte nucleäre Endosperm weitgehend aufgebraucht (Costa *et al.*, 2004). Der reife Samen besitzt, der Samenschale innen anliegend, eine Lage peripherer dünnwandiger Aleuron-artiger Zellen. Die Versorgungsfunktion für den keimenden Embryo wird von den Kotyledonen übernommen (Olsen, 2004). Die nach erfolgter Keimung innerhalb der Samenschale verbliebenen Zellen wiesen GUS-Expression auf (Abbildung 5.8A und B). Es könnte sich hierbei um die absterbenden Zellen der sich in der Peripherie befindenden Aleuronzellen handeln.

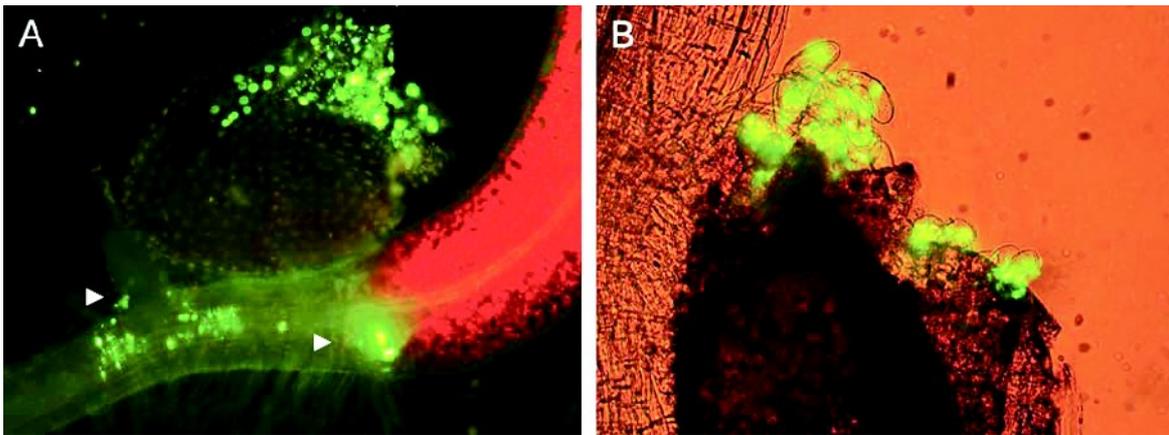


Abbildung 5.8: Details der Histochemischen Lokalisation der GUS-Aktivität bei *PCEP1-GUS* im Endospermrest nach erfolgter Keimung.

A: Übergang Hypokotyl-Wurzel mit anliegender Samenschale: GUS-Expression des Endospermrestes in der Samenschale und innerhalb der Wurzel an zwei Orten der Seitenwurzelbildung (Pfeile; zum Vergleich siehe Abbildung 5.3). **B:** Detailansicht von Samenschale und Endospermrest. [GUS-Substrat ELF97-Gluc; Fluoreszenz-Filtersatz Ex 365 nm / Em LP 520 nm; 100x (A), 200x (B).]

5.1.1.2 Expression unter der Kontrolle des *AtCEP2*-Promoters

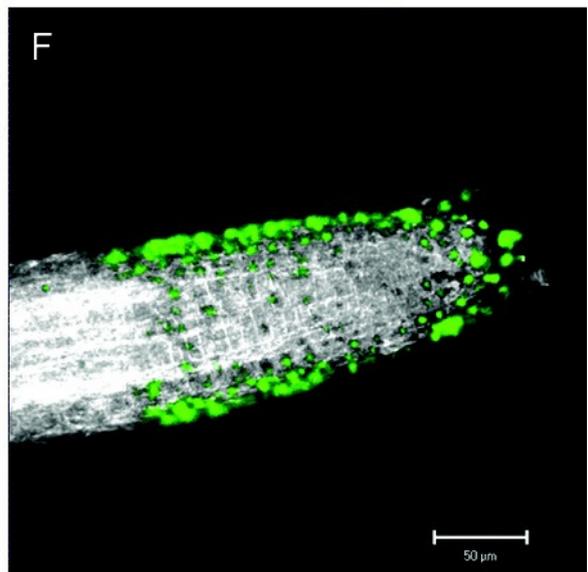
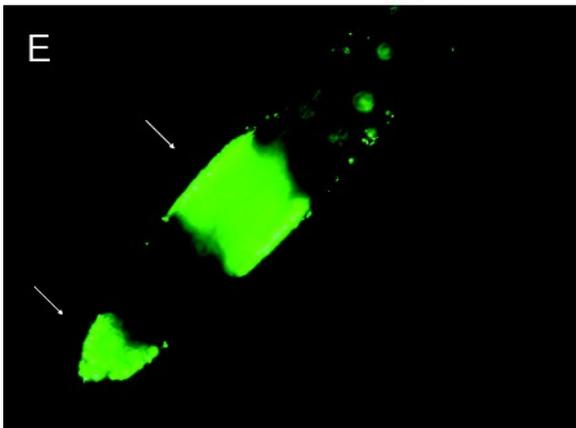
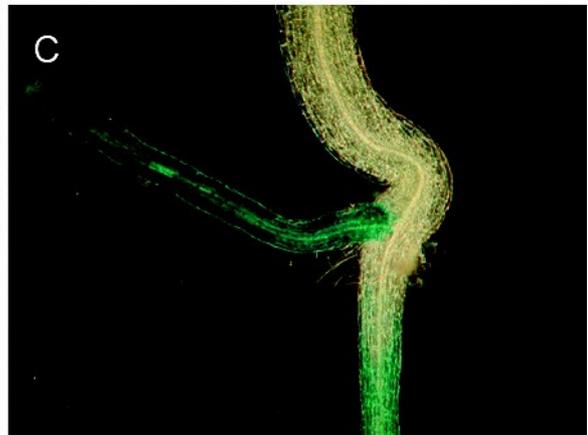
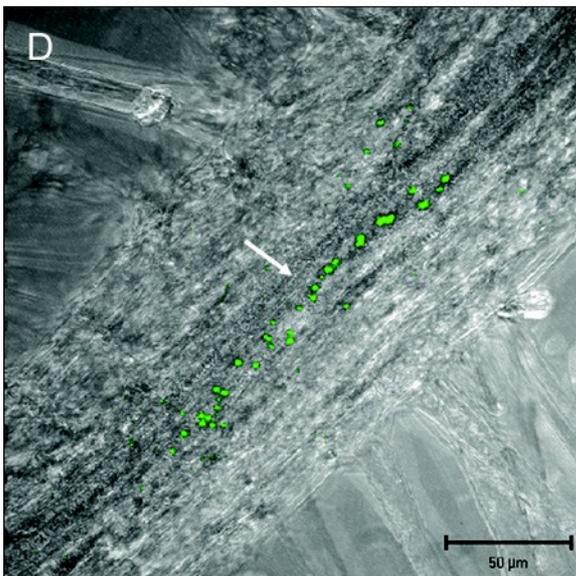
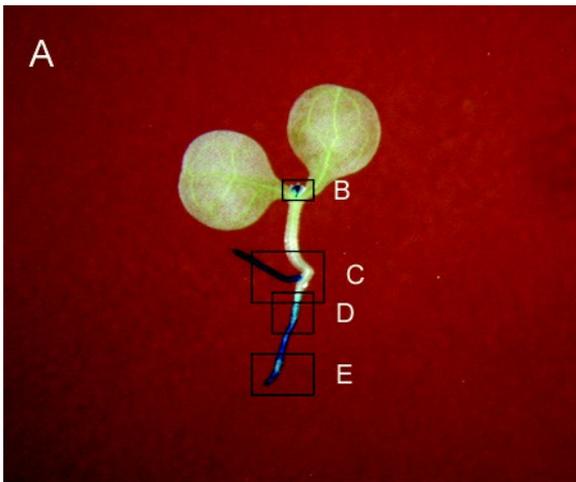
In *PCEP2-GUS*-Pflanzen konnte nur bei Keimlingen GUS-Expression festgestellt werden, nicht jedoch im generativen Bereich (exemplarisch hierfür ist Abbildung 5.14D). In *PCEP2-GUS*-Keimlingen war die Promotor-Aktivität besonders auffällig in der Wurzel. Die Aktivität fand sich im Leitbündelbereich unterhalb des Überganges vom Hypokotyl zur Wurzel (Abbildung 5.9C und D) und besonders stark in den Seitenwurzeln (Abbildung 5.9C und 5.10). Seitenwurzelprimordien zeigten keine GUS-Expression (Abbildung 5.10A). In etwas späteren Stadien war starke GUS-Expression (Abbildung 5.10B und C) zu beobachten. Mit weiterem Wurzelwachstum verlagerte sich die GUS-Aktivität in der Hauptwurzel weiter nach unten, blieb in den jungen Seitenwurzeln aber noch stark (Abbildung 5.10C). Am konfokalen Mikroskop wurde die Empfindlichkeit soweit gedrückt, daß nur der Bereich der höchsten Signalintensität lokalisiert werden konnte, er befand sich im Wurzelinneren, innerhalb der Endodermis. Charakteristisch ist das Aktivitätsmuster in der Wurzelspitze von *PCEP2-GUS*-Keimlingen (Abbildung 5.9E). Die Aktivität trat in zwei getrennten Zonen auf: Zum einen direkt an der Wurzelspitze, zum anderen als „Banderole“ etwas weiter von der Wurzelspitze entfernt (Abbildung 5.9E). Die Aufnahme mit dem Konfokalen Mikroskop zeigt, daß sich die Aktivität auf den Randbereich der Wurzel beschränkte und nicht im Inneren lag (Abbildung 5.9F). An der Wurzelspitze dürf-

te es sich um die Wurzelhaube (Kalyptra), weiter oben um den Abschluss der seitlichen Wurzelhaube handeln. Im Bereich der aktiven Teilungszone der Wurzel war keine GUS-Expression zu beobachten. Der bei der Auflösung der Zellen gebildete Schleimfilm gibt der wachsenden Wurzel ein Gleitlager und dient der Bakterienflora in der Rhizosphäre möglicherweise als Nahrung. Im oberirdischen Bereich wurde Promotor-Aktivität nur am Vegetationspunkt in ganz jungen Primärblättern beobachtet (Abbildung 5.9B).

Nächste Seite:

Abbildung 5.9: Überblick und Details der Histochemischen Lokalisation der GUS-Aktivität in *PCEP2-GUS*-Keimlingen.

A: 4d Keimling: Bereiche der GUS-Expression sind im weiteren detailliert abgebildet. **B:** Vegetationspunkt mit jungen Primärblättern. **C:** Haupt- und Seitenwurzel. **D:** Am konfokalen Mikroskop wurde die Empfindlichkeit soweit gedrückt, daß der Bereich der höchsten Signalintensität im Wurzelinneren (Pfeil) lokalisiert werden konnte. **E:** Wurzelspitze mit dem für *PCEP2-GUS*-Keimlinge charakteristischen Expressionsmuster in zwei distinkten Zonen (Pfeile). **F:** Die GUS-Expression in der Wurzelspitze ist auf den Randbereich beschränkt. [Objekte waren 4 Tage alte Keimlinge; GUS-Substrat X-Gluc (A, B und C) bzw. ELF97-Gluc (D, E und F); Fluoreszenz-Filtersatz Ex 365nm / Em HQ 535 (D, E und F); 100x (C), 200x (E), 400x (D und F); Konfokale Mikroskopie: Überlagerung von Fluoreszenz und Phasenkontrast (D und F).]



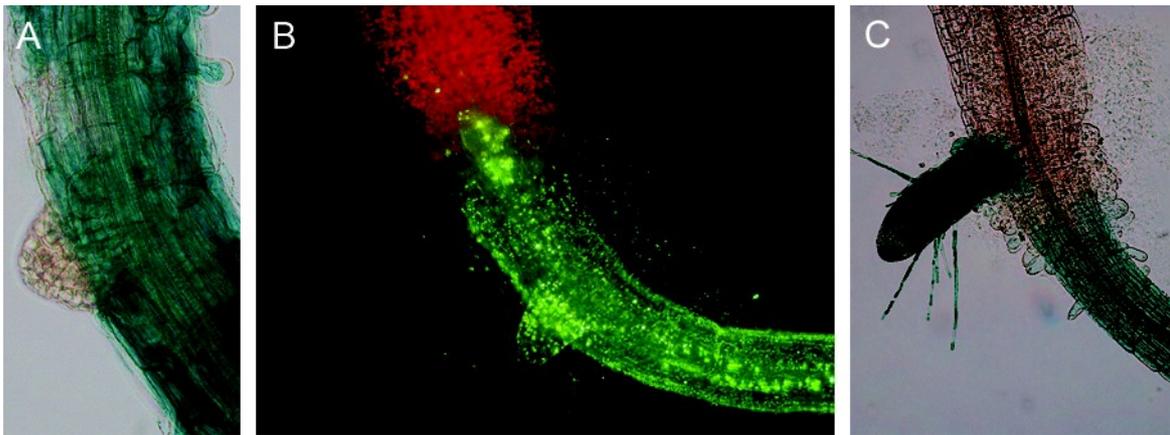


Abbildung 5.10: Details der Histochemischen Lokalisation der GUS-Aktivität in den Wurzeln von *PCEP2-GUS*-Keimlingen.

A: Hauptwurzel mit und Seitenwurzelprimordium. **B:** Am Übergang vom Hypokotyl (rote Chl-Autofluoreszenz) zur Wurzel befinden sich 2 junge Seitenwurzeln mit GUS-Expression. **C:** GUS-Expression in der Seitenwurzel sehr stark, in der Hauptwurzel im Vergleich zu (B) nach unten verlagert. [Objekte waren 4 Tage alte Keimlinge; GUS-Substrat X-Gluc (A und C) bzw. ELF97-Gluc (B); Fluoreszenz-Filtersatz Ex 365 nm / Em LP 520 nm (B); DIC (A und B), 100x (B und C), 200x (A).]

5.1.1.3 GUS-Expression unter der Kontrolle des *AtCEP3*-Promoters

Die Aktivität des *AtCEP3*-Promoters war im vegetativen und generativen Bereich nachzuweisen. Abbildung 5.11A zeigt im Überblick die Aktivität in Kotyledonen und Primärblättern von *PCEP3-GUS*-Keimlingen. Kotyledonen wiesen GUS-Aktivität in Blattgefäßen im Bereich der Blattbasis (Abbildung 5.11C) und in den Schließzellen der Stomata auf (Abbildung 5.11D). In Primärblättern fand sich GUS-Expression ausschließlich in den Trichomen (Abbildung 5.11B). Des Weiteren war Promotor-Aktivität im Bereich des Hypokotyl-Wurzel-Überganges (Abbildung 5.12A und C), sowie im Leitbündelbereich unterhalb des Wurzelhalses (Abbildung 5.12) vorhanden. Die im Inneren der Hauptwurzel zu beobachtende Aktivität befand sich innerhalb der Endodermis. In der Wurzelspitze war in keinem Fall GUS-Expression feststellbar (Abbildung 5.12B). Im generativen Bereich trat GUS-Aktivität in den Karpellen von Blüten und Schoten, sowie in den Blüten- bzw. Schotenstielen (Pedikel) auf. Die GUS-Expression war in Blüten des Stadiums 14 am stärksten und wurde im weiteren Verlauf der Schotenentwicklung schwächer. Die Aktivität beschränkte sich auf Pedikel und Karpelle; Abscissionszone, Nektarien, Staubblätter, Petalen, Sepalen und Narbe wiesen keine Aktivität auf.

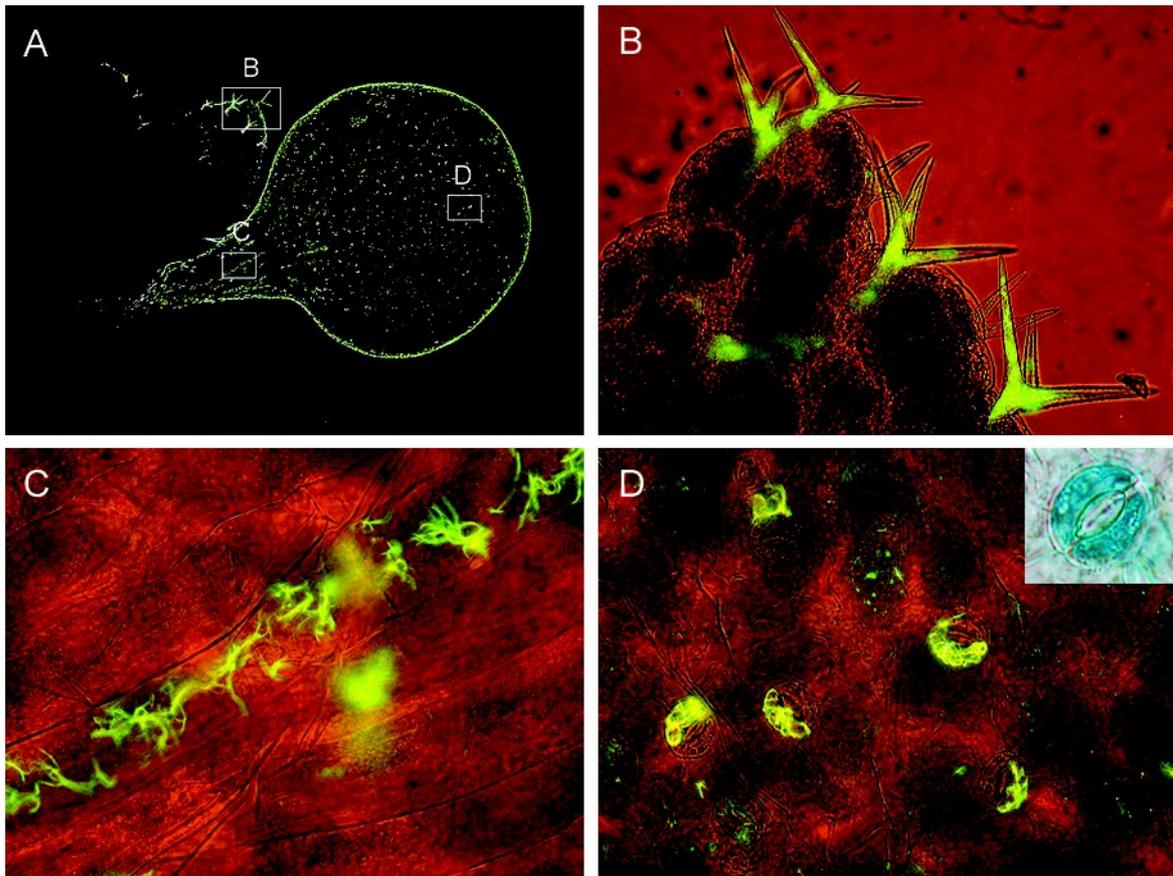


Abbildung 5.11: Überblick und Details der Histochemischen Lokalisation der GUS-Aktivität in Kotyledonen und Primärblättern von *PCEP3-GUS*-Keimlingen.

A: GUS-Aktivität in Kotyledonen und Primärblättern im Überblick. Die hervorgehobenen Bereiche sind vergrößert abgebildet. B: In Primärblättern findet sich GUS-Expression ausschließlich in den Trichomen. C: Gefäß im Bereich der Blattbasis. D: GUS-Expression in den Schließzellen der Stomata. Das Inset zeigt ein Stoma in Vergrößerung.

[Objekte waren 4 Tage alte Keimlinge; GUS-Substrat ELF97-Gluc; Fluoreszenz-Filtersatz Ex 365 nm / Em LP 520 nm; 40x (A), 200x (B), 400x (C und D).]

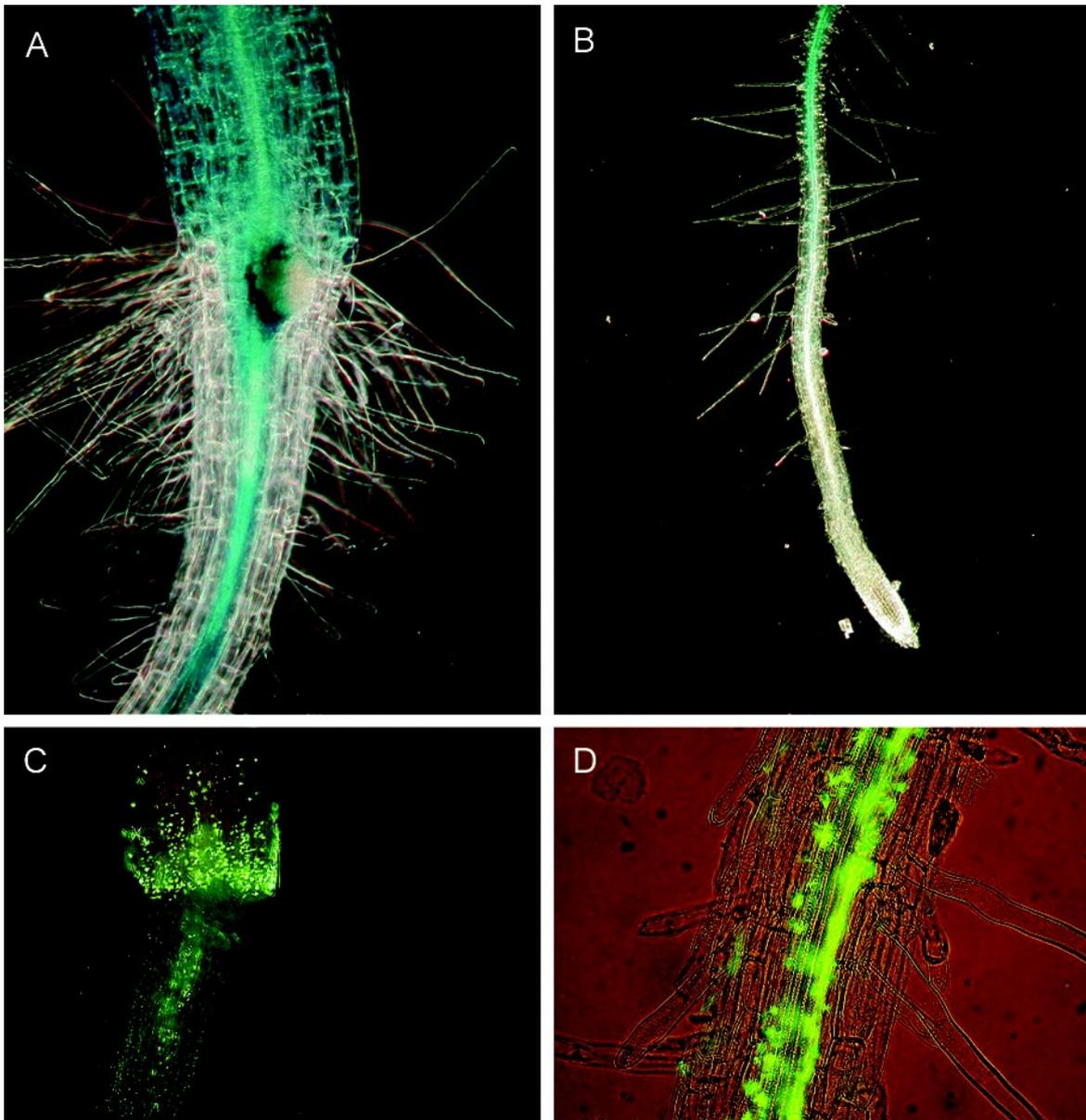


Abbildung 5.12: Details der Histochemischen Lokalisation der GUS-Aktivität in Hypokotyl und Wurzel von *PCEP3-GUS*-Keimlingen.

A und C: Übergang Hypokotyl-Wurzel. B und D: GUS- Expression im Inneren der Hauptwurzel.

[Objekte waren 4 Tage alte Keimlinge; GUS-Substrat X-Gluc (A und B) bzw. ELF97-Gluc (C und D); Fluoreszenz-Filtersatz Ex 365 nm / Em LP 520 nm (C und D); DIC (A und B), 40x (B), 100x (A und C), 200x (D).]

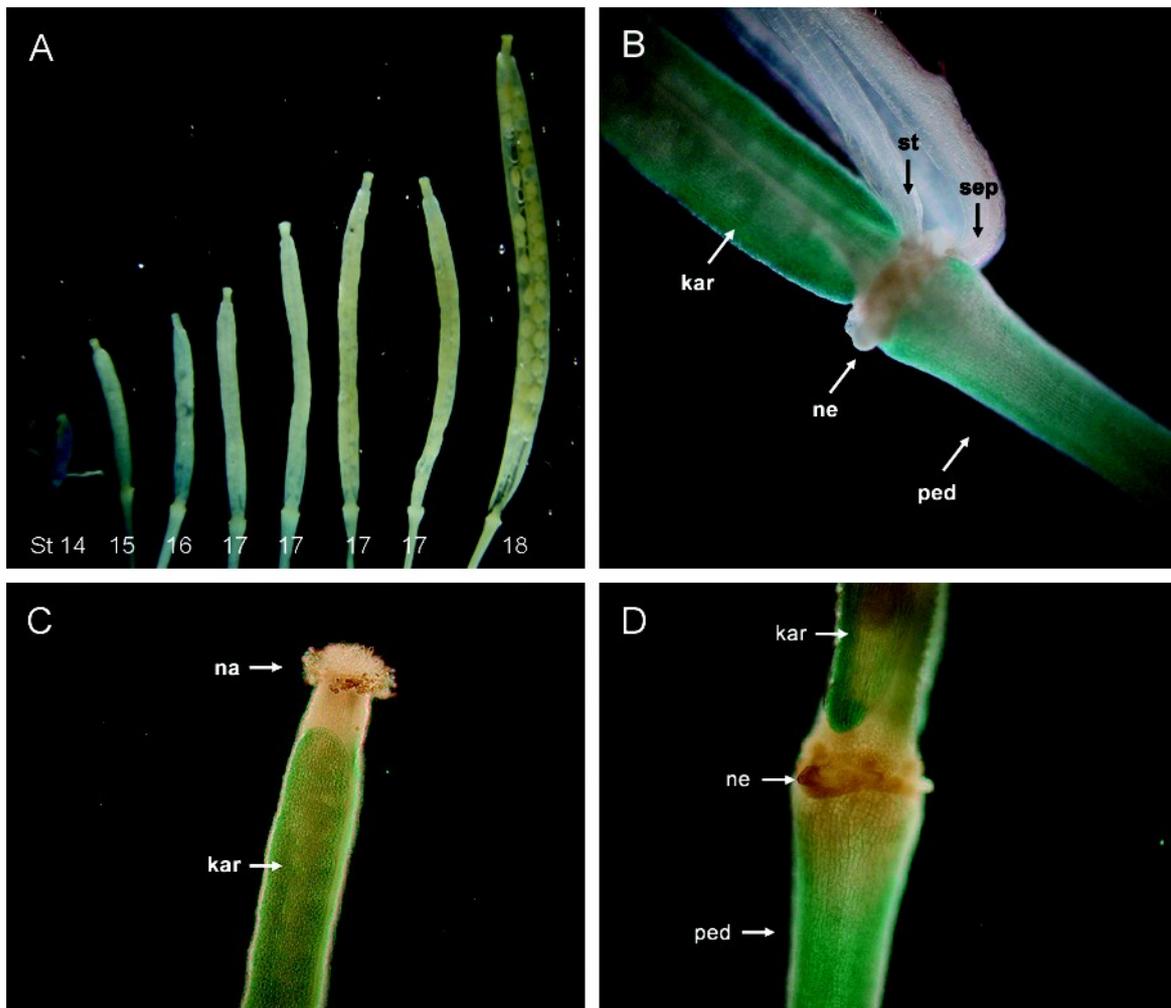


Abbildung 5.13: Details der Histochemischen Lokalisation der GUS-Expression in *PCEP3-GUS*-Blüten und -Schoten.

A: GUS-Aktivität in Blüten und Schoten verschiedener Entwicklungsstadien. Die GUS-Aktivität ist in der Blüte des Stadiums 14 am stärksten und wird im weiteren Verlauf der Schotenentwicklung schwächer. **B, C und D:** Blüten im Stadium 15. Die GUS-Expression beschränkt sich auf Pedikel und Karpelle. kar, Karpell; na, Narbe; ne, Nektarium; ped, Pedikel; st, Stamen; sep, Sepale.

[Nomenklatur der Stadien der Blütenentwicklung nach Müller (1961); GUS-Substrat X-Gluc; 10x (A), 100x (B, C und D).]

Zusammenfassend ist in Abbildung 5.14 im Überblick nochmal die Reporteraktivität in Keimlingen und Infloreszenzen gezeigt; an letzteren befinden sich Blüten und reife Schoten verschiedener Entwicklungsstadien. *PCEP1-GUS*-Keimlinge zeigten im Überblick keine auffällige Aktivität (Abbildung 5.14A), bei genauer Analyse zeigte sich jedoch GUS-Expression im Rahmen der Seitenwurzelbildung und an der Wurzelspitze. Das Seitenwurzelprimordium verdrängt und durchwächst auf seinem Weg nach außen Cortex und Epidermis. Nur die dabei in direkter Nachbarschaft zum Primordium gelegenen Zellen, de-

ren Zellwände sich auflösen, zeigten GUS-Expression. Die *PCEP1-GUS*-Aktivität fand sich auffallenderweise besonders an generativen Organen wie Antheren, Narben, Samenanlagen, Endosperm und reifenden Schoten in Stadien der Rückbildung bzw. des Absterbens und der Reifung (Abbildung 5.14B). Bei *PCEP2-GUS*-Keimlingen war die Reporteraktivität in Haupt- und Seitenwurzeln charakteristisch, sowie am Vegetationspunkt (Abbildung 5.14C). Im generativen Bereich war keine GUS-Expression feststellbar (Abbildung 5.14D). An der Wurzelspitze sterben die außen gelegenen Zellen ständig ab, lösen sich auf und verschleimen. Dabei zeigen genau diese Bereiche starke GUS-Aktivität. Auch die GUS-Expression im Zentralzylinder geht wahrscheinlich auf die Auflösung verdrängter Parenchymzellen im Rahmen der Ausbildung des Leitgewebes zurück. Gleiches könnte für *PCEP3-GUS*-Aktivität im zentralen Bereich der Hauptwurzel gelten. Des weiteren zeigten *PCEP3-GUS*-Pflanzen im vegetativen Bereich, nämlich Keimblätter, Primärblätter und Hypokotyl GUS-Aktivität (Abbildung 5.14E). Im Blütenbereich war bei *PCEP3-GUS* die Reporteraktivität in Schotenwänden und -stengeln nachzuweisen (Abbildung 5.14F), also in Geweben, die bei der Reifung eintrocknen.

Nächste Seite:

Abbildung 5.14: Histochemische Lokalisation der GUS-Aktivität in transgenen *CEP1*-, *CEP2*- und *CEP3*-Promotor-*GUS*-Linien. Gezeigt sind jeweils 5 Tage alte Keimlinge (A, C und E) bzw. Infloreszenzen (B, D und F) von *PCEP1-GUS* (A und B), *PCEP2-GUS* (C und D) und *PCEP3-GUS* (E und F). *PCEP1-GUS*-Keimlinge (A) zeigen mit bloßem Auge keine Färbung, wogegen bei *PCEP2-GUS* (C) Haupt- und Seitenwurzeln, sowie der Vegetationspunkt und bei *PCEP3-GUS* (E) Hypokotyl und Keimblätter GUS-Expression aufweisen. Im generativen Bereich sind bei *PCEP1-GUS* (B) Samenanlagen und Narben, bei *PCEP3-GUS* (F) Schotenwände und -stengel, sowie Blütenstiele im apikalen Bereich gefärbt. An *PCEP2-GUS*-Infloreszenzen (D) erkennt man keine Färbung.



5.1.2 Nachweis der drei KDEL-Peptidasen in Gewebeextrakten von *Arabidopsis thaliana* durch spezifische Antikörper

Die durch eingehende Analyse der GUS-Aktivität bei transgenen Promotor-Reporter-Linien gewonnenen Daten sollten durch den Nachweis der KDEL-Peptidasen mit Antikörpern in Geweben von *Arabidopsis* abgesichert werden, da bei Promotor-GUS-Fusionen gelegentlich von tatsächlicher Lokalisation eines Proteins abweichende GUS-Expression auftreten können (Übersichtsartikel zu Artefakten bei Lokalisation von GUS-Expression von Guivarc'h *et al.*, 1996).

Zunächst gelang es, die KDEL-Peptidasen mit dem anti-*Ricinus* CysEP-Antikörper in *Arabidopsis* nachzuweisen (siehe Abbildung 5.15). Ein schwaches Signal auf Höhe der reifen Form der KDEL-Peptidasen wurden bei 7 Tage alten Keimlingen gefunden. Nach Fraktionierung der Keimlinge in (1) Kotyledonen und Primärblätter, (2) Übergang vom Hypokotyl zur Wurzel und (3) Wurzel, wurde das Signal nur in den Blättern gefunden. Im generativen Bereich wurde ein Signal für die reife Form der KDEL-Peptidasen in allen untersuchten Geweben gefunden.

Um ein differenzierteres Bild auf Proteinebene analog dem mit den Promotor-GUS-Linien erhaltenen Expressionsmuster zu erhalten, wurden bei Eurogentec (Belgien) Antikörper gegen synthetische Peptide, die nichtkonservierte Regionen von *AtCep1*, *AtCep2* bzw. *AtCep3* repräsentieren (siehe Abbildung 5.16 und Tabelle 5.2), erzeugt. Um die Chance auf eine Immunantwort zu erhöhen, wurden für jede KDEL-Peptidase zwei Kaninchen immunisiert. Jedem Kaninchen wurden zwei Peptide gespritzt. Die für die Peptide ausgewählten Epitope wiesen eine Länge von 14 bis 16 Aminosäureresten auf. Von allen drei Peptidasen wurde der C-terminale Bereich nach Faltblatt $\beta 7$ (siehe hierzu die Abbildungen 5.33 und 5.34A zur CysEP-Struktur) und vor dem KDEL-Terminus ausgewählt (Abbildung 5.16, doppelt unterstrichen). Wie der Sequenzvergleich zeigt, ist hier die Homologie innerhalb des gesamten Moleküls am geringsten. Als weiteres *AtCep1*-Epitop wurde ein neun Aminosäuren weiter Richtung N-Terminus gelegener Bereich von 14 Aminosäuren Länge ausgesucht, der sich von den beiden anderen Isoenzymen in 50% der Reste unterscheidet. Beginnend mit Faltblatt $\beta 6$ wird der Oberflächen-*Loop* vor Faltblatt $\beta 7$ umfaßt. Die zweite *AtCep2*-Peptid-Sequenz, ein Oberflächen-*Loop* von Helix $\alpha 3$ bis zur Disulfidbrücke kurz vor Helix $\alpha 4$ (siehe hierzu die Abbildungen 5.33 und 5.34A zur CysEP-Struktur).

tur) unterscheidet sich jeweils in neun von 16 Aminosäureresten von den beiden anderen Sequenzen. Das zweite *AtCep3*-Peptid liegt innerhalb des N-terminalen Propeptids kurz vor der Spaltstelle und unterscheidet sich von *AtCep1* und *AtCep2* in acht bzw. fünf von 15 Positionen (Abbildung 5.16).

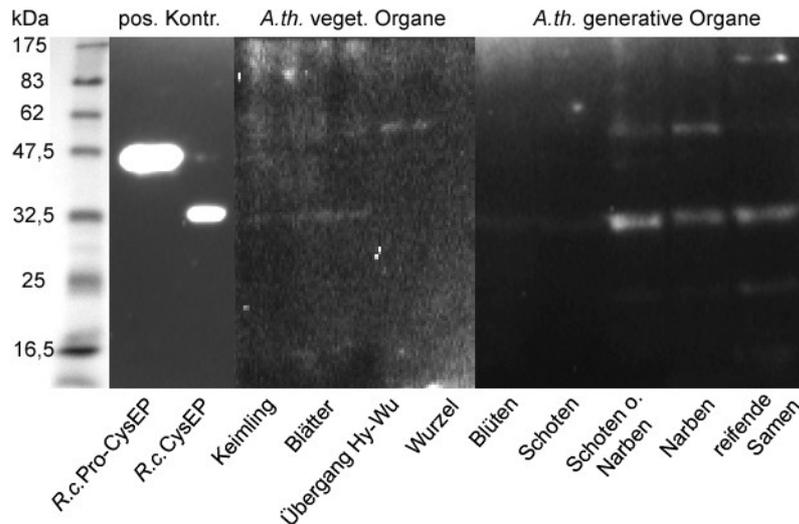


Abbildung 5.15: *Western-Blot*-Analyse vegetativer und generativer Gewebe von *Arabidopsis* mit dem anti-*Ricinus* CysEP-Antikörper.

Protein-Extrakte von 7 Tage alten Keimlingen und Pflanzenteilen, sowie Blüten (St.14), grünen Schoten (St.16), davon Schoten ohne Narben, und Narben und reifenden grünen Samen (St.17) wurden mit 12,5%-SDS-PAGE aufgetrennt und mit anti-*Ricinus* CysEP als Primärantikörper, anti-*Rabbit*-HRP als Sekundärantikörper und Immunochemoluminiszenz detektiert. *Ricinus* ProCysEP und CysEP waren positive Kontrollen. Ein Signal für die reife Form einer KDEL-Peptidase war, wenn auch nur schwach, in Keimlingen und allen untersuchten generativen Pflanzenteilen nachweisbar.

Nächste Seite:

Abbildung 5.16: Sequenzvergleich der *Ricinus* CysEP inclusive N- und C-terminalen Propeptiden mit den drei hochhomologen KDEL-Peptidasen Cep1, Cep2 und Cep3 aus *Arabidopsis*.

Hochkonservierte Bereiche sind rot, mäßigkonservierte orange bis gelb unterlegt. Übereinstimmungen sind in der Zeile „Cons“ wiedergegeben. Die Spaltstellen, an denen bei der Prozessierung der *Ricinus*-CysEP die N- und C-terminalen Propeptide abgespalten werden, sind durch Pfeile markiert. Gegen die, bei den drei Cystein-Peptidasen aus *Arabidopsis* unterstrichenen Bereiche (einfach: anti-Cep1-, 2- und 3-I; doppelt: Cep1-, 2- und 3-II), wurden anti-Peptid-Antikörper in *Rabbit* erzeugt. [Der Sequenzvergleich wurde mit T-COFFEE erstellt (Notredame *et al.*, 2000).]

Tabelle 5.2: Synthetische Peptide für die Erzeugung von anti-*AtCep*-Peptid-Antikörpern aus *Rabbit*. In den Spalten sind der Reihe nach aufgelistet: (1) das Peptid, (2) die Position innerhalb der Primärstruktur, (3) die Sequenz und (4) der errechnete pI.

Peptid	Position	Sequenz	errechneter pI
Cep1-I	319 - 332	Ac-IRMQRGIRHKEGLC-CONH ₂	10,8
Cep1-II	342 -356	NH ₂ -CLKNSNTNPSRSLD- CONH ₂	8,23
Cep2-I	208 - 224	Ac-KTEETYPYDSSDVQFC- CONH ₂	3,69
Cep2-II	343 - 357	NH ₂ -CTKLSSTPSTHESVVP- CONH ₂	8,24
Cep3-I	108 - 123	NH ₂ -CQGPKRGSKQFMYDHE- CONH ₂	8,22
Cep3-II	343 - 357	NH ₂ -CIKKSSSNPTPKGDV- CONH ₂	6,05

Tabelle 5.3: Anti-Cep-Antikörper aus *Rabbit*. Aufgetragen sind in den Spalten von links nach rechts (1) die Nummern der Kaninchen, (2) die den Kaninchen zur Immunisierung gespritzten Antigene und (3) die durch Affinitätsreinigung gewonnenen Antikörper.

Kaninchen	Antigene	<i>Antikörper</i> nach Affinitätsreinigung	
14	Cep1-I und Cep1-II	<i>anti-Cep1-A:</i> Antiseren 14 und 15 gegen Cep1-I	<i>anti-Cep1-B:</i> Antiseren 14 und 15 gegen Cep1-II
15	Cep1-I und Cep1-II		
16	Cep2-I und Cep2-II	<i>anti-Cep2-A:</i> Antiseren 16 und 17 gegen Cep2-I	<i>anti-Cep2-B:</i> Antiseren 16 und 17 gegen Cep2-II
17	Cep2-I und Cep2-II		
18	Cep3-I und Cep3-II	<i>anti-Cep3-A:</i> Antiseren 18 und 19 gegen Cep3-I	<i>anti-Cep3-B:</i> Antiseren 18 und 19 gegen Cep3-II
19	Cep3-I und Cep3-II		

Für jede der drei Peptidasen wurden jeweils zwei Kaninchen mit den zwei entsprechenden Peptiden als Antigen gespritzt (siehe Tabelle 5.3). Vor der Immunisierung wurde den Kaninchen als negative Kontrolle Blut entnommen (*Prebleeding*). Aliquots der *final-bleedings* (Antiseren) zweier Parallel-Kaninchen wurden gegen jeweils ein entsprechendes Peptid Affinitäts-gereinigt. Mittels *Dot-blot*-Versuch wurde zunächst untersucht, ob die Affinitäts-gereinigten Antikörper einwandfrei das Peptid erkennen, gegen das gereinigt wurde. Wie Abbildung 5.17 eindrucksvoll belegt, traf dies zu, jeder Antikörper erkannte eindeutig das Peptid, gegen das Affinitäts-gereinigt wurde. Lediglich der Antikörper anti-Cep2-B erkennt außer dem Peptid Cep2-II auch in geringem Maße das Peptid Cep2-I.

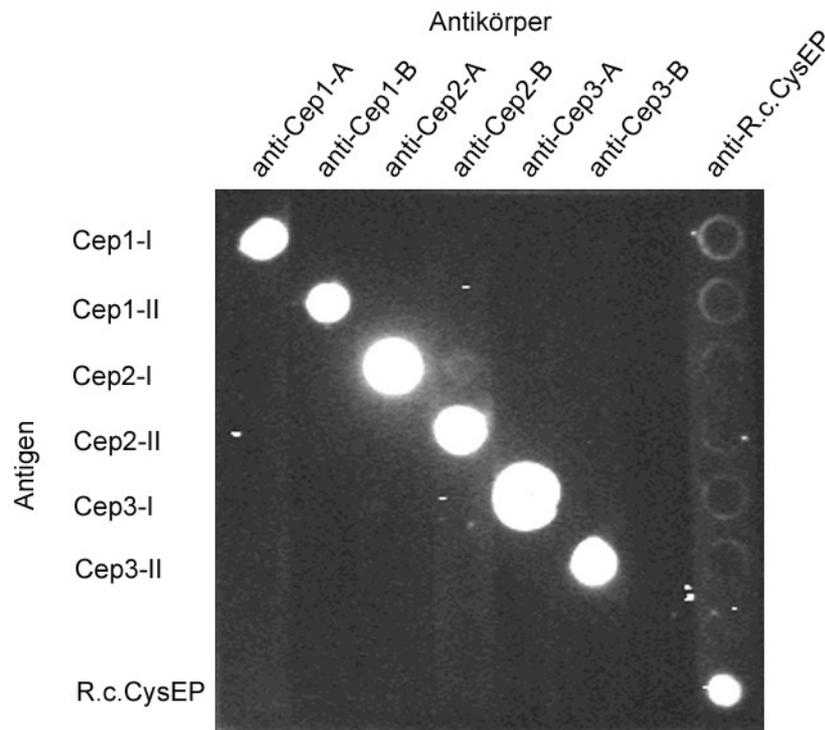


Abbildung 5.17: Dot-blot-Analyse der anti-Cep-Peptid-Antikörper.

In den horizontalen Reihen wurden wie beschriftet Spots von je 0,5 µg Peptid und an unterster Stelle Ricinosomen mit *Ricinus* CysEP aufgetragen. Nach dem Blocken mit Magermilchpulver wurde der Blot in 8 Spalten unterteilt. Jede Spalte wurde mit dem angegebenen Affinitäts-gereinigten Antikörper aus *Rabbit* und die letzte Spalte mit dem anti-*Ricinus* CysEP-Antikörper dekoriert. Als sekundärer Antikörper fungierte anti-*Rabbit*-HRP und die abschließende Detektion erfolgte über Chemilumineszenz. Die Beschriftung erfolgte analog zu den in Tabelle 5.3 verwendeten Bezeichnungen.

Die *Western-blot*-Analyse von *Arabidopsis*-Gewebe ergab nicht in allen Fällen Signale (siehe Abbildung 5.18). Die anti-Cep1-A- und anti-Cep1-B-Antikörper detektieren kein Protein. Der anti-Cep2-A-Antikörper erkannte eine Doppelbande von der Größe der Pro-Form (etwa 47,5 kDa) der *AtCep2* in Keimlingen (4 d), Wurzeln (10 d), Blüten (St.14) und grünen Schoten (St.16). Im Vergleich dazu wurden bei *PCEP2-GUS*-Pflanzen ausschließlich Aktivitäten im vegetativen Bereich gefunden, hier vor allem in den Wurzeln. Der anti-Cep2-B-Antikörper lieferte dagegen kein Signal. Der anti-Cep3-A- und der anti-Cep3-B-Antikörper erkannten eine Bande von der Größe der reifen Form (32,5 kDa) sowie Spuren der Pro-Form (47,5 kDa) der *AtCep3*, beides Mal in reifenden Samen. Die *PCEP3-GUS*-Aktivität war vor allem in Keimlingen und im vegetativen Bereich nur in

den Wänden grüner Schoten zu finden, nie aber in reifenden, grünen Samen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Ergebnisse unbefriedigend waren und den finanziellen Aufwand in keiner Weise gerechtfertigt haben. Der anti-Cep2-A-Antikörper wurde zur Dekoration von Wurzelschnitten (Technovit-Einbettung) eingesetzt, lieferte in der Fluoreszenz-Mikroskopie jedoch nicht die Signale, wie man sie entsprechend der Lokalisation der *PCEP2-GUS*-Aktivität (siehe Abbildung 5.9, S.118) erwartet hätte.

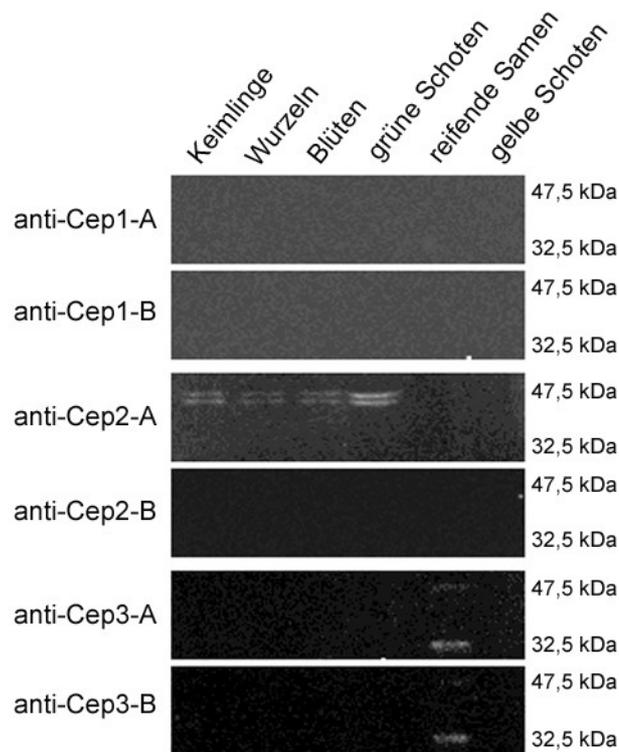


Abbildung 5.18: *Western-blot*-Analyse von Proteinextrakten aus Geweben von *Arabidopsis* mit Affinitäts-gereinigten anti-Cep-Antikörpern.

Untersucht wurden Keimlinge (4 d), Wurzeln (10 d), Blüten (St.14), grüne Schoten (St.16), reife grüne Samen (St.17), gelb-werdende Schoten (St.18). Protein-Extrakte wurden mit 12,5%-SDS-PAGE aufgetrennt und mit den anti-Cep-Antikörpern als Primärantikörper, anti-*Rabbit*-HRP als Sekundärantikörper und Immunochemolumineszenz detektiert. Die Stadien der Blütenentwicklung (siehe auch Tabelle 5.1) entsprechen der Nomenklatur von Müller (1961).

5.2 Die *Ricinus* CysEP unterstützt auch in reifenden Samen den Zelltod kollabierender Gewebe

Die *Ricinus* CysEP unterstützt in keimenden Samen den Kollaps und Zelltod der Endospermzellen nach vollzogener Speichermobilisierung. In *Vigna mungo* wird der KDEL-Peptidase in den Ricinosomen-ähnlichen KV-Vesikeln eine Rolle in der Speicherproteinmobilisierung zugeschrieben (Toyooka *et al.*, 2000). Um die Frage zu klären, ob dies auch bei *Ricinus* zutrifft, wurden reifende Samen untersucht, bei denen eine Speicherproteinmobilisierung ausgeschlossen werden kann. Reifende *Ricinus*-Samen der Stadien 10, 15 und 20 DAP (*days after pollination*; Abbildung 5.19, Einteilung nach Greenwood *et al.*, 1982) wurden durch *Western-blot*-Analyse der Proteinextrakte der jeweils in Caruncula, Samenschale, Nucellus und Endosperm fraktionierten Entwicklungsstadien (siehe Abbildung 5.20) untersucht.

Die reife, bei 32,5 kDa laufende CysEP und ihre Proform bei 47,5 kDa fand sich bei den drei untersuchten Entwicklungsstadien in Nucellus und Endosperm. Die Samenschale zeigt nach 10 DAP kein Signal, nach 15 Tagen ein schwaches bei 32,5 kDa, wobei nicht

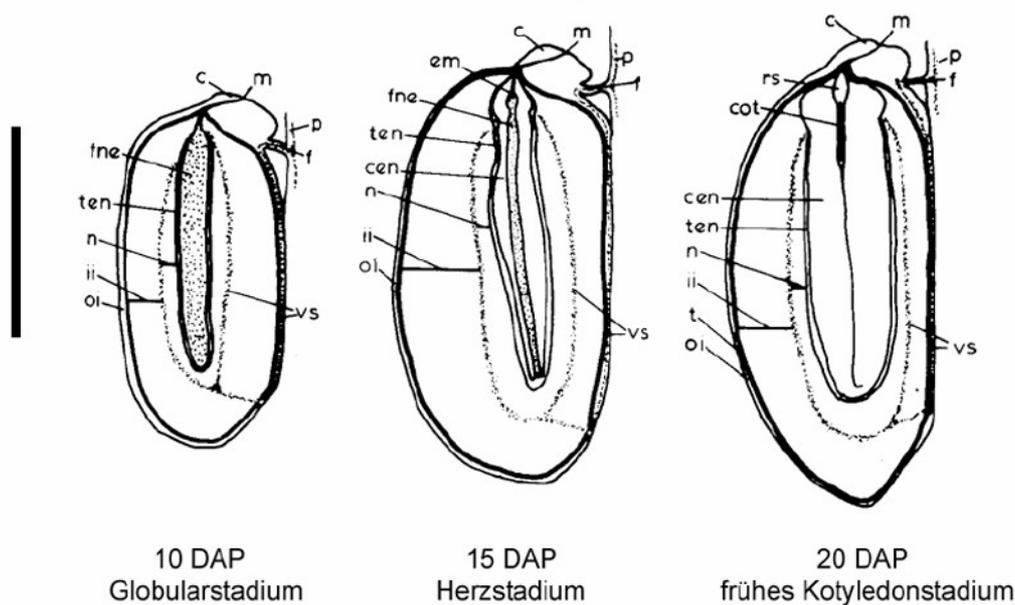


Abbildung 5.19: Stadien der Samenentwicklung bei *Ricinus communis* L. cv. Hale.

c, Karunkula; m, Mikropyle; fne, freies nukleäres Endosperm; n, Nucellus; ii, inneres Integument; oi, äußeres Integument; vs, Gefäßversorgung; f, Funikulus; p, Placenta; em, Embryo; ten, durchscheinendes zelluläres Endosperm; cen, zelluläres Endosperm; rs, Wurzel-Sproß-Achse; cot, Kotyledon; t, verholzter Teil der Testa. [Meßbalken 5 mm; Abbildung aus Greenwood *et al.* (1982); © 1982 National Research Council of Canada.]

ganz auszuschließen ist, daß es sich hierbei um eine bei der Präparation erfolgte Kontamination handelt. Die Verholzung der Samenschale ist nach 20 DAP bereits soweit fortgeschritten, daß eine Extraktion nicht mehr möglich war. In der Carunkula war zu keinem Zeitpunkt reife CysEP oder dessen Proform detektierbar (siehe Abbildung 5.20).

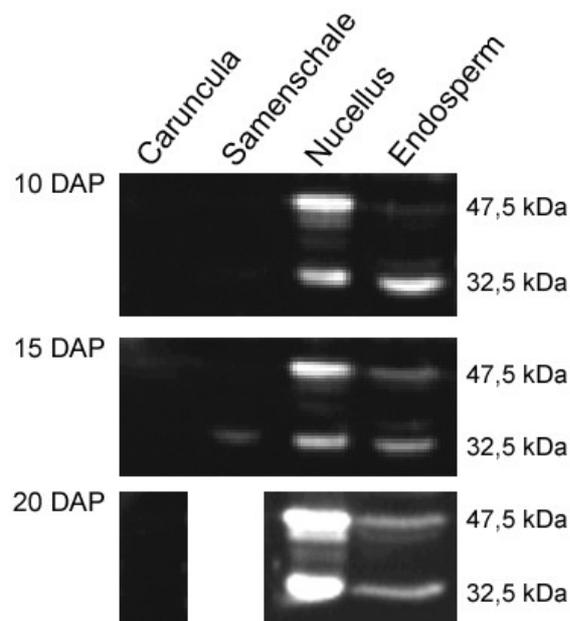


Abbildung 5.20: *Western-Blot*-Analyse von *Ricinus* ProCysEP und reifer *Ricinus* CysEP während der Samenreifung bei 10, 15 und 20 DAP in Karunkula, Samenschale, Nucellus und Endosperm. Eine Analyse der Samenschale nach 20 DAP war wegen der fortgeschrittenen Verholzung nicht möglich.

Analog zur *Western-blot*-Analyse konnte im Bereich des Nucellus, der unmittelbar an das Endosperm angrenzt, durch Immunfluoreszenz mit anti-*Ricinus* CysEP-Antikörpern zahlreiche CysEP enthaltende Ricinosomen gefunden werden (Abbildung 5.21B). Die Nucelluszellen dieses Entwicklungsstadiums sind im Vergleich zu den kleinen Zellen des rasch wachsenden Endosperms großlumig. Während Zelltod und Zellkollaps ist die Fluoreszenz in den Nucelluszellen und damit auch die CysEP diffus über das Cytosol verteilt (Abbildung 5.21D). Die *DIC*-Mikroskopie der Endospermzellen in Abbildung 5.21A zeigt in unmittelbarer Nachbarschaft zur kollabierten Zellschicht der vormaligen Nucelluszellen eine helle Schicht von fingerartigen Fortsätzen, die aus der Primärwand hervorgehen und die ausschließlich auf diese Zellwandbereiche der Endospermzellen beschränkt sind. Diese Transferzellen wurden durch Elektronenmikroskopie detaillierter untersucht. Das Cytoplasma verschwindet nach dem Kollaps der Zelle und das sich ausdehnende Endosperm drückt

die, von den abgestorbenen Zellen übrigbleibenden Primärwände zusammen (Abbildung 5.21E). Durch TUNEL-Assay konnte gezeigt werden, daß in den Nucelluszellen, die dem Endosperm benachbart sind, eine Fragmentierung der Kern-DNA, einem wichtigen Merkmal im Rahmen des PCD, vorliegt (Abbildung 5.22C).

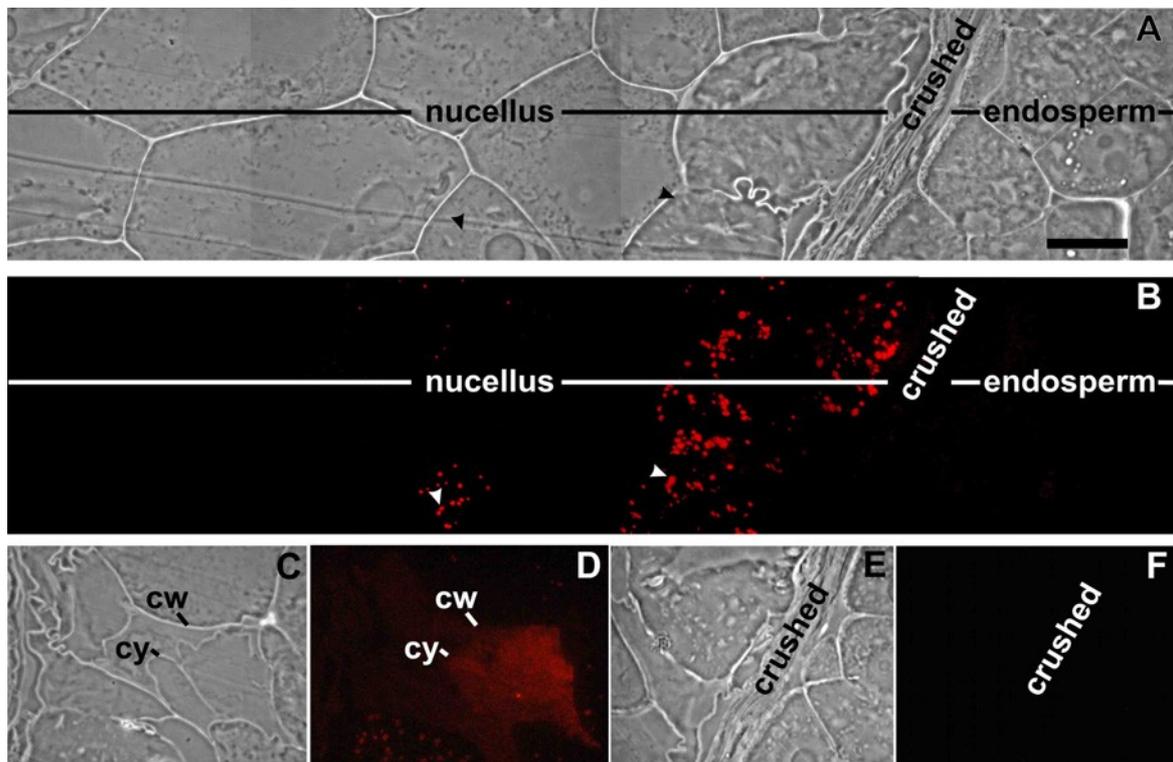


Abbildung 5.21: Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit direkt-markierten anti-*Ricinus* CysEP-Antikörpern: Lokalisation der CysEP im Nucellus von reifenden *Ricinus*-Samen 20 DAP.

A und B: CysEP ist in Ricinosomen innerhalb von Nucelluszellen, die den Programmieren Zelltod durchlaufen, lokalisiert. C und D: Die CysEP ist während Zelltod und Zellkollaps diffus über das Cytoplasma verteilt. cw, Zellwand; cy, Cytoplasma. E und F: Negative Kontrolle. [A, C und E: DIC; B, D und F: Fluoreszenz; Maßbalken in (A) 50 µm; Abbildung aus Greenwood *et al.* (2005); © 2005 The National Academy of Sciences of the U.S.A..]

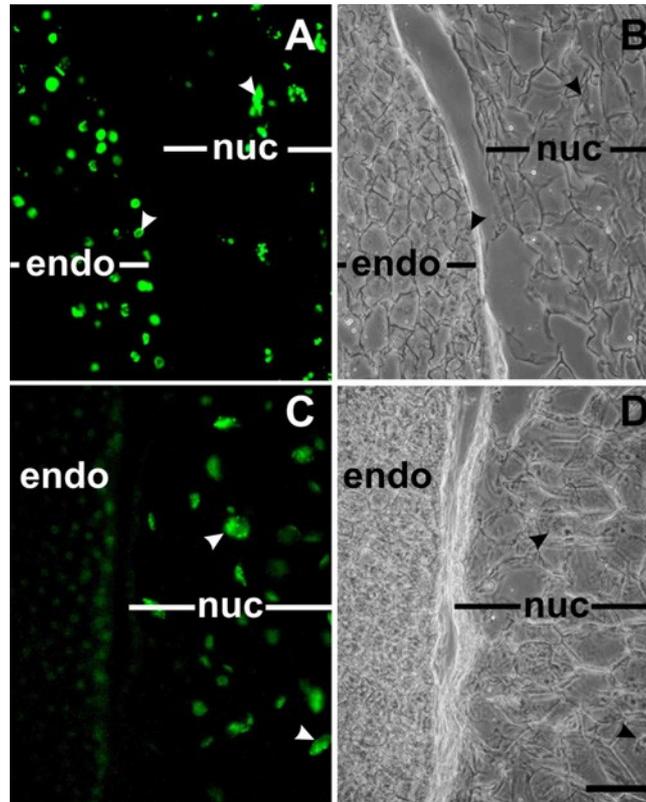


Abbildung 5.22: TUNEL-Assay in den dem Endosperm benachbarten Nucelluszellen zeigt Fragmentierung der Kern-DNA.

A und B: Positive Kontrolle, vor dem TUNEL-Assay mit DNase behandelt. **C und D:** TUNEL-Assay. Die Kerne in den dem expandierenden Endosperm benachbarten Nucelluszellen sind TUNEL-positiv, die Kerne der Endospermzellen sind TUNEL-negativ. endo, Endosperm; nuc, Nucellus.

[A und C: Fluoreszenz Filtersatz: Ex 450-490 nm / Em LP 520 nm; B und D: DIC identischer Bereiche; die Pfeilspitzen markieren identische Kerne in Fluoreszenz- und DIC-Bildern; Maßbalken in (D) 50 μ m; Abbildung aus Greenwood *et al.* (2005); © 2005 The National Academy of Sciences of the U.S.A..]

Die Vorgänge und Verhältnisse im Verlauf des Zelltodes in Nucellus und Endosperm im Rahmen der Samenreifung bei *Ricinus* konnten durch Elektronenmikroskopie (Abbildungen 5.23, 5.24 und 5.25) noch detaillierter dokumentiert werden. Vor Eintritt in den programmierten Zelltod haben die Nucelluszellen eine große Zentralvacuole, einen großen Kern und eine typische Ausstattung an Organellen, wie Proplastiden, Mitochondrien, ER und Golgi-Komplexen (Abbildung 5.23A). Mit fortschreitendem PCD nimmt die Elektrodichte des Tonoplasten zu und es kommt zur Vesikelbildung (Abbildung 5.23B) und Kernfragmentierung (Abbildung 5.23C). Im fortgeschrittenen Stadium wird das Cytoplasma von der Zellwand weggezogen und Mitochondrien und Proplastiden schwellen an (Abbildung 5.23C).

Die Rolle der Ricinosomen im Verlauf der Samenreifung bzw. im programmierten Zelltod des Nucellusgewebes wurde durch Immunelektronenmikroskopie untersucht (Abbildung 5.24). Die Ricinosomen - CysEP-haltige Organellen - leiten sich vom ER ab (Abbildung 5.24A und B) und sind erkennbar an einem relativ elektronendichten Zentrum und einer weniger dichten äußeren Region, die der umgebenden Membran anliegt. Die Immunmarkierung mit anti-CysEP-Antikörpern zeigt, daß sich die CysEP im elektronendichteren Bereich befindet (Abbildung 5.24B–E). Im planaren Schnitt zeigen anheftende Ribosomen die für Polyribosomen typische helikale Anordnung (Abbildung 5.24A). Im 10 DAP-Stadium bieten die Ricinosomen der Nucelluszellen ein unregelmäßiges Erscheinungsbild: sie sind ungewöhnlich groß (Durchmesser $> 1 \mu\text{m}$), weisen eine unregelmäßige traubenartige Form auf („Traubenricinosomen“; sehr eindrücklich in Abbildung 5.24C) und enthalten Proteinablagerungen. Eine biochemische Analyse der Proteinzusammensetzung dieser Ricinosomen ist in Abbildung 5.26 wiedergegeben. Diese Ricinosomen enthalten, verglichen mit denen aus keimendem Samen, weniger ProCysEP und mehr andere Proteine (Abbildung 5.26A und B). Die Ricinosomen in reifenden Samen des 20 DAP-Stadiums bieten bezüglich Größe und Form (Durchmesser ca. $0,5 \mu\text{m}$; Abbildung 5.24F-I) ein einheitliches Bild.

Während des Zellokollapses ist die CysEP in Profilen anzutreffen, die möglicherweise aus der Fusion der Ricinosomen mit zahlreichen Vesikeln vor dem Kollaps resultieren. Plastiden, mittlerweile zu Gerontoplasten geworden, und Mitochondrien sind angeschwollen und das Cytoplasma löst sich von der Zellwand ab (Abbildung 5.24J und K). Das Cytoplasma verschwindet nach dem Kollaps der Zelle und das sich ausdehnende Endosperm drückt die, von den abgestorbenen Nucelluszellen übrigbleibenden, Primärwände zusammen (Abbildung 5.25A).

Die Endospermzellen stehen untereinander durch Plasmodesmata in Verbindung (Abbildung 5.25B). In Nachbarschaft zum Bereich der kollabierten Zellwände zeigen die Endospermzellen regelmäßig geformte Einwüchse von Zellwandmaterial ins Cytosol, die die Kontaktfläche zwischen Cytosol und der extrazellulären Umgebung vergrößern. Im abgebildeten Bereich der Endospermzellwand (Abbildung 5.25C, zum Vergleich siehe die lichtmikroskopische Aufnahme in Abbildung 5.21A) gibt es einen direkten Kontakt der primären Zellwand mit dem apoplastischen Überrest einer Nucelluszelle.

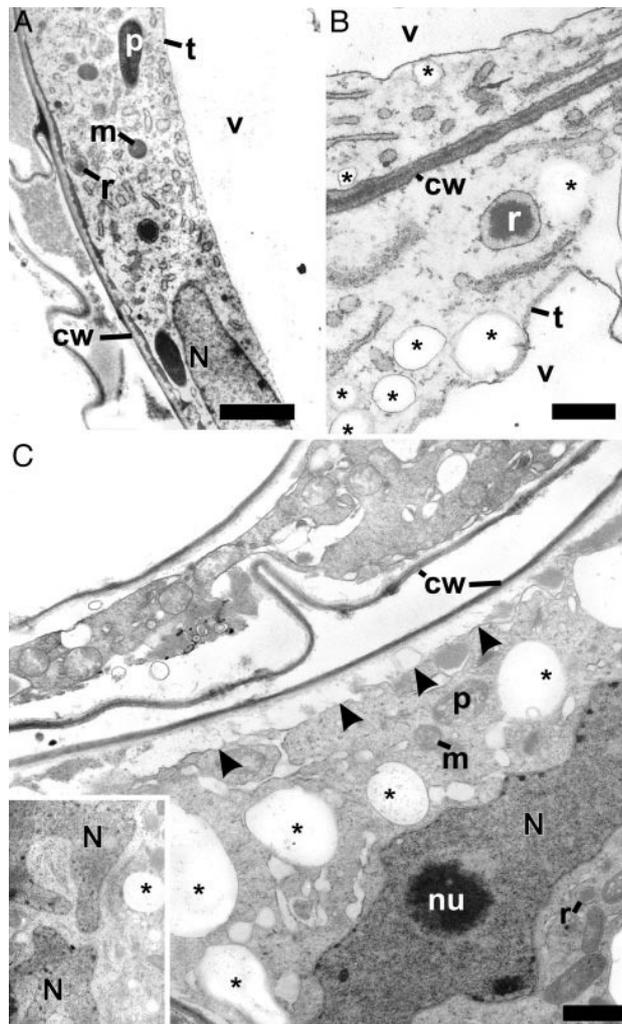
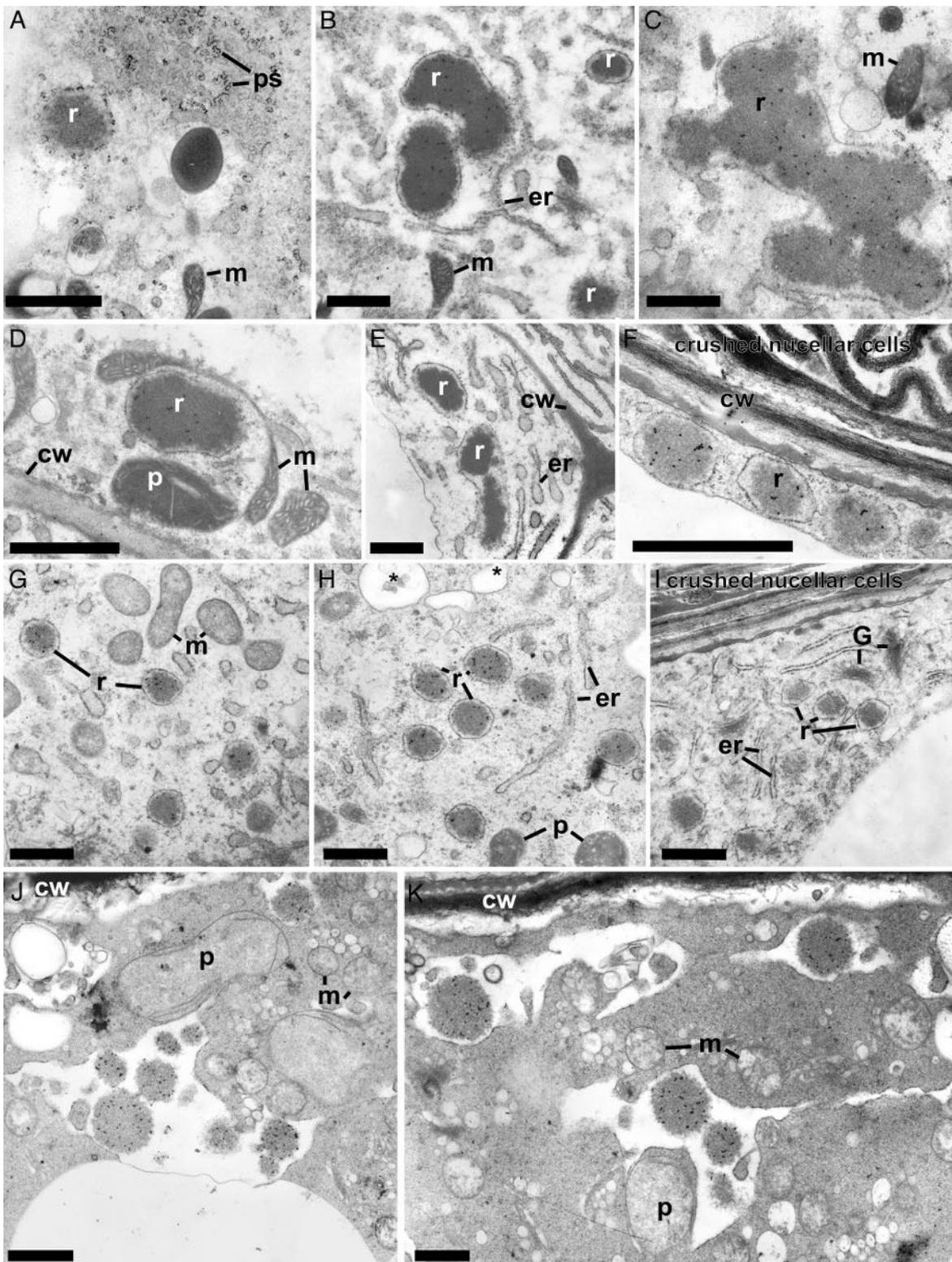


Abbildung 5.23: Elektronenmikroskopie von dem Endosperm benachbarten Nucelluszellen mit für PCD typischen Merkmalen.

A: In einem frühen Stadium des PCD besitzen Nucelluszellen eine große Zentralvacuole, intakte Kerne und die typische Ausstattung an Organellen. B und C: Mit fortschreitendem PCD wird der Tonoplast elektronendichter (B) und Vesikulation (markiert durch Sternchen) setzt ein. Die Kerne bekommen eine unregelmäßige Form (C und Nebenbild), das Cytoplasma zieht sich von der Zellwand zurück (Pfeile in C) und das ER und die Organellen schwellen an (untere und obere Zelle in C). cw, Zellwand; m, Mitochondrium; N, Kern; nu, Nucleolus; p, Proplastid; r, Ricinosom; t, Tonoplast; v, Vakuole; *, Vesikel. [Messbalken in (A) 5 μm , in (B) und (C) 1 μm ; Abbildung aus Greenwood *et al.* (2005); © 2005 The National Academy of Sciences of the U.S.A..]

Nächste Seite:

Abbildung 5.24: Elektronenmikroskopie von Nucelluszellen, die den PCD durchlaufen und *Immungoldlabeling* der in Ricinosomen lokalisierten CysEP. A-E: 10 DAP. F-I: 20 DAP. J-K: Während des Zellkollapses. A: Ricinosomen in den Nucelluszellen werden vom ER abgegliedert. B-D, F-H, J und K: Ricinosomen in Nucelluszellen, die den PCD durchmachen. A, E und I: Negative Kontrolle mit Präimmunserum. er, Endoplasmatisches Retikulum; G, Golgi-Komplex; ps, Polysomen; alle anderen Bezeichnungen wie in Abbildung 5.23. [Messbalken 1 μm ; Abbildung aus Greenwood *et al.* (2005); © 2005 The National Academy of Sciences of the U.S.A..]



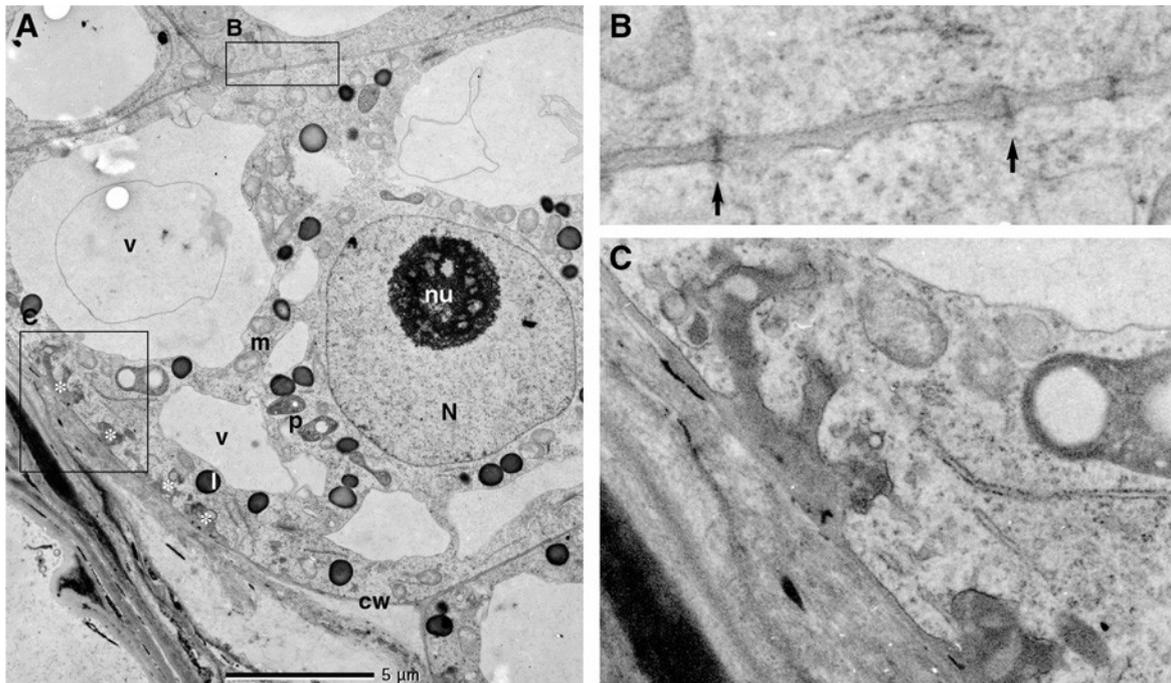


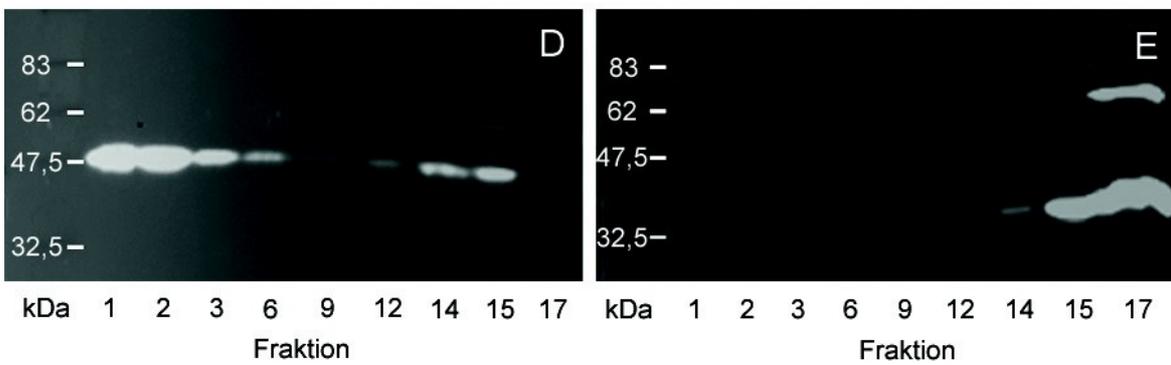
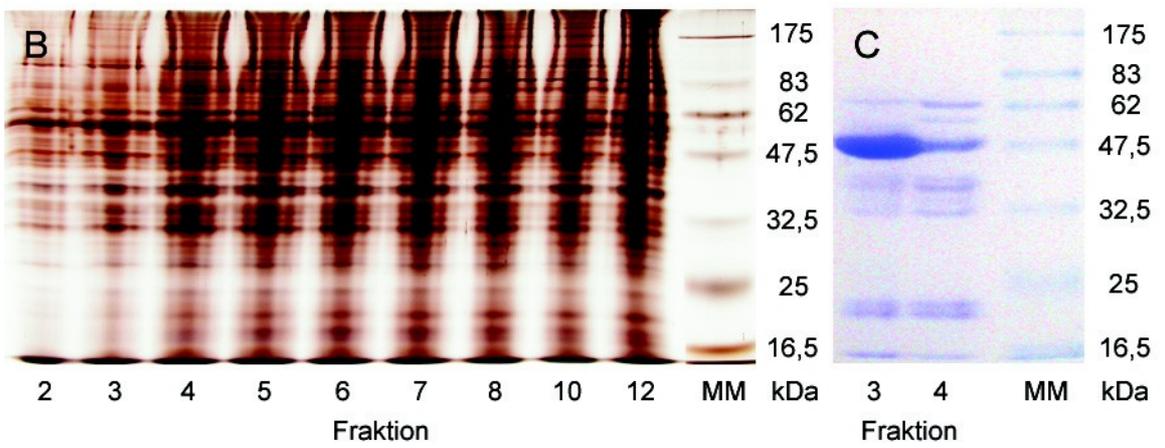
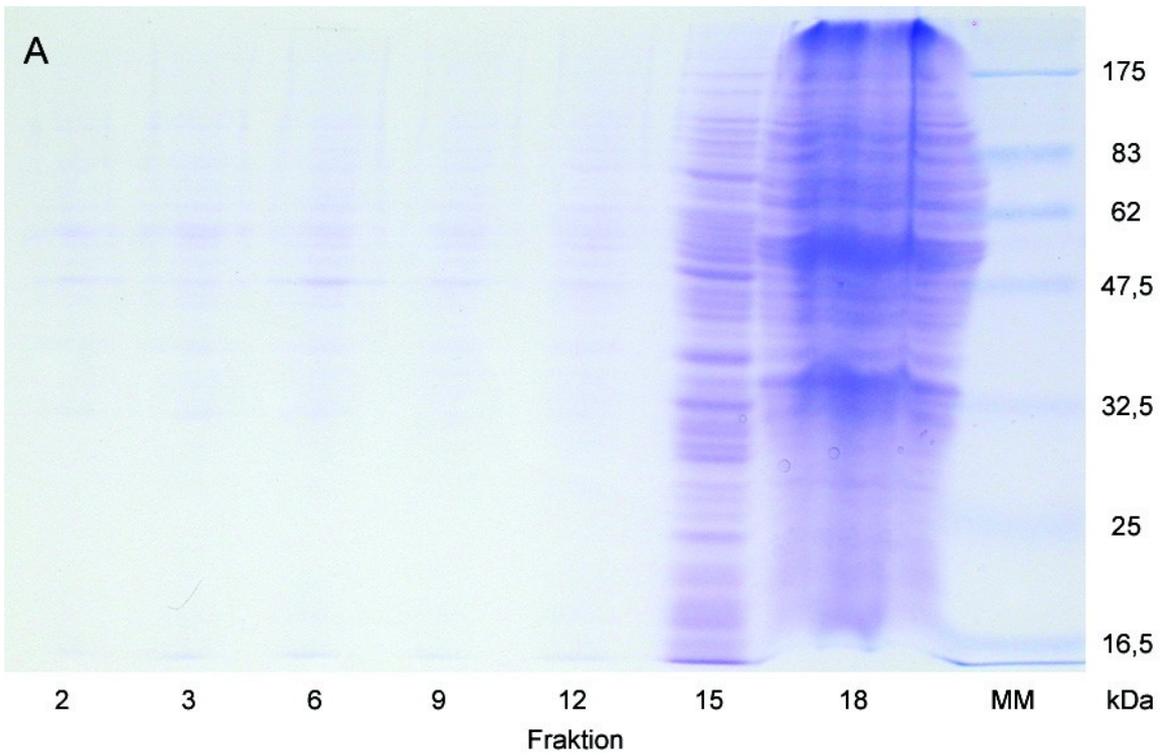
Abbildung 5.25: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer, zu den kollabierten Nucelluszellen benachbarten Endospermzelle.

Vergrößerungen der in (A) eingerahmten Regionen sind in (B) und (C) gezeigt. B: Zellwandbereiche mit Plasmodesmata. C: Zellwandbereiche mit Einstülpungen der Zellwand (in (A) markiert durch Sternchen). N, Zellkern; nu, Nucleolus; m, Mitochondrium; p, Plastid; v, Vakuole; l, Lipidkörper; cw, Zellwand; *, Zellwandeinstülpungen. [Meßbalken in (A) 5 µm; Abbildung aus Greenwood *et al.* (2005); © 2005 The National Academy of Sciences of the U.S.A..]

Nächste Seite:

Abbildung 5.26: Ricinosomen in seneszierenden Nucelluszellen sind bei 10 DAP größer und in der Zusammensetzung komplexer als in seneszierenden Nucelluszellen bei 20 DAP und im Endosperm keimender Samen (Schmid *et al.*, 1998).

Ricinosomen wurden aus seneszierenden Nucelluszellen 10 DAP im 44–65% Saccharose-Dichtegradienten isoliert. Es wurden 24 Fraktionen zu 1,25 mL geerntet (Fraktion 1, unterer Bereich, Fraktion 24, oberer Bereich des Gradienten) und durch SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung (A), Silberfärbung (B) oder *Western-Blot*-Analyse mit den Primäantikörpern anti-*Ricinus* CysEP (D) und anti-glyoxysomale Malatdehydrogenase (E) analysiert. MM, Molekülmassenstandard. Die Primäantikörper wurden mit HRP-gekoppelten anti-*Rabbit*-Antikörpern aus Ziege dekoriert und die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz. *Western-Blot*-Analyse (D und E) zeigte, daß die untersten Fraktionen (Fraktionen 1–6) die für die Ricinosomen typische 45 kDa ProCysEP (D) enthielten und gut getrennt waren von anderen Organellen wie Glyoxysomen (E; Fraktionen 14–17). Coomassie-Färbung des Acrylamidgels (A) und SDS-PAGE-Analyse mit Silberfärbung (B) zeigten eine komplexe Proteinzusammensetzung der Ricinosomen aus reifenden Samen (10 DAP). In den Ricinosomen keimender Samen (C) ist die 45 kDa ProCysEP das Hauptmatrixenzym (Schmid *et al.*, 2001).



5.3 Die 2.0 Å Kristallstruktur und Substratspezifität der nativen CysEP aus Ricinosomen von *Ricinus communis*

Das Auftreten von Ricinosomen mit ihrem Leitenzym, einer Papain-artigen Cystein-Endopeptidase, in der Endphase des programmierten Zelltodes bei Pflanzen ist gut belegt (Übersichtsartikel von Gietl und Schmid, 2001). Hierbei ist auffallend, daß in erster Linie Gewebe betroffen sind, deren Zellen kollabieren bzw. sich auflösen. Um die spezifischen Eigenschaften der hierbei beteiligten Papain-artigen Cystein-Peptidasen mit KDEL-Terminus aufzuklären und näheren Aufschluß über die Substratspezifität der *Ricinus* CysEP im speziellen Fall zu erhalten, wurde zum einen deren Kristallstruktur mit einem kovalent gebundenem Inhibitor gelöst und zum anderen die Substratspezifität in zwei unabhängigen Ansätzen eingehend untersucht.



Abbildung 5.27: Keimlinge von *Ricinus communis*. *Ricinus*-Samen (links) wurden 24 h gewässert und in autoklaviertem Vermiculit bei 30°C im Dunkeln gekeimt. Abgebildet sind ein vier (Mitte) und fünf Tage alter Keimling (rechts).

5.3.1 Vorhersage der Spaltspezifität der *Ricinus* CysEP auf der Grundlage der Hydrolyse von synthetischen Peptiden

In einem ersten Ansatz wurden im Rahmen der von Dr. David Simpson (Carlsberg-Institut, Kopenhagen) durchgeführten Experimente zwei Serien von synthetischen fluorogenen Peptiden für die Untersuchung der *Ricinus* CysEP verwendet. Die fluorogenen Peptide wurden für die Untersuchung zweier, der *Ricinus* CysEP sehr ähnlichen (Gietl *et al.*, 2000), Cystein-Endopeptidasen aus *Hordeum vulgare*, EP-A und EP-B, generiert (Davy *et al.*, 2000). Eine Serie bildet Substrate mit der allgemeinen Sequenz Abz-Xaa-Arg-↓-Gln-Gln-Tyr(NO₂)-Asp mit 19 verschiedenen Aminosäureresten an der P2-Position. Als Referenz diente die gut charakterisierte pflanzliche Cystein-Peptidase Papain (Davy *et al.*, 2000). Die Peptidspaltung wurde bei drei Substratkonzentrationen unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung ($[S] \ll K_m$) durchgeführt und die Konzentration an aktivem Enzym wurde durch Titration mit E64 bestimmt. Der Assay wurde bei pH 5,5 durchgeführt, weil die Inkubation isolierter Ricinosomen bei diesem pH *in-vitro* zur Reifung der CysEP führen, es erfolgt die Abspaltung des N-terminalen Propeptids und des C-terminalen KDEL-Signals. Die Konstanten k_{cat}/K_m der Kinetik zweiter Ordnung sind in Tabelle 5.4 gezeigt.

Die Rangfolge der an P2 bevorzugten Aminosäurereste war ähnlich wie bei Papain. Ungeladene Aminosäurereste mit großen aliphatischen und unpolaren (Leu, Val, Ile und Met) oder aromatischen Seitenketten (Phe, Tyr und Trp) führten zu den höchsten k_{cat}/K_m -Werten. Substrate mit kleinen, polaren oder geladenen Seitenketten an P2 hatten die niedrigsten k_{cat}/K_m -Werte. Während die Substratpräferenz der *Ricinus* CysEP bezüglich P2 sich der von Papain sehr ähnlich zeigte, war der Wertebereich für k_{cat}/K_m bei Papain signifikant kleiner als bei der *Ricinus* CysEP. Die Präferenz von Papain für Phe oder Tyr an P2 war wesentlich größer als für andere aromatische oder unpolare Reste, wogegen *Ricinus* CysEP eine stärkere Präferenz für Leu zeigte. Es war nicht möglich Prolin an der P2-Position zu testen, da die Abz-Fluoreszenz in unmittelbarer Nachbarschaft gequencht wird (Ito *et al.*, 1998).

Der anderen Serie von Substraten mit 20 verschiedenen Aminosäureresten an der P1-Position lag die allgemeine Sequenz Abz-Leu-Xaa-↓-Gln-Pro-Tyr (NO₂)-Asp zugrunde. Basierend auf der Annahme, daß die Spaltung unwahrscheinlich mit Pro an P1' erfolgt,

wurde Gln an P2' durch Pro ersetzt, um die Spaltung zwischen Xaa und Gln zu dirigieren. Die $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Werte dieser verschiedenen Substrate der *Ricinus* CysEP wurden mit einer Ausnahme nicht so stark vom Rest an P1 beeinflusst. Das Peptid mit Pro an P1 wurde am langsamsten umgesetzt (Tabelle 5.5). Die besten Substrate für die *Ricinus* CysEP enthielten geladene oder unpolare Reste an P1 (His, Arg, Lys, Phe, Leu, Tyr, Met, Thr, Trp), wogegen solche mit kleinen Seitenketten (Ala, Ser, Cys) geringfügig schwächer umgesetzt wurden und Asn, Val, Ile und Asp die niedrigsten $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Werte ergab. Der Hauptunterschied zwischen der *Ricinus* CysEP und Papain war eine sehr starke Präferenz für His an P1 und eine etwas schwächere Präferenz für Cys an P2. Wenn man die $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Werte für die *Ricinus* CysEP mit den korrespondierenden Werten für Papain in Relation setzt, dann waren Peptide mit Tyr, Trp und Asp an P1 signifikant bessere Substrate für die *Ricinus* CysEP (Tabelle 5.5). Substrate mit Leu an P2 wurden von der *Ricinus* CysEP durchgängig schneller umgesetzt (Tabelle 5.4).

Auf der Grundlage der für die Position P2 gefundene Substrat-Präferenz wurden drei kovalente Chloromethylketon-Inhibitoren mit einem basischen Rest an P1 und einem hydrophoben Rest an P2, nämlich N-*p*-tosyl-Lys-CMK (N-1155; Bachem), H-D-Pro-Phe-Arg-CMK (N-1210; Bachem) und H-D-Val-Leu-Lys-CMK (N-1385; Bachem) für die irreversible Hemmung der *Ricinus* CysEP im Rahmen der Reinigung für die Kristallisation ausgewählt. Die Inhibitoren wurden im Fluoreszenz-Assay mit der Ricinosomen-CysEP jeweils in vier Verdünnungsstufen (200, 100, 10 und 1 nM im 1000 μl -Assay) getestet. Die Reaktionskinetiken wurden aufgezeichnet und die 1. Ableitung (= Steigung) ermittelt. Für die Kontrolle ohne Inhibitor betrug die 1. Ableitung 0,4. Alle drei Inhibitoren bewirkten bei 10 nM eine totale Hemmung der proteolytischen Aktivität (1. Ableitung = 0). Bei einer Inhibitorkonzentration von 1 nM hemmte H-D-Pro-Phe-Arg-CMK die Reaktion völlig (1. Ableitung = 0), die entsprechenden Werte für H-D-Val-Leu-Lys-CMK und N-*p*-tosyl-Lys-CMK waren 0,002 und 0,03. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde der Inhibitor H-D-Val-Leu-Lys-CMK für die irreversible kovalente Inhibierung der *Ricinus* CysEP im Rahmen der Reinigung ausgewählt.

Tabelle 5.4: Kinetische Konstanten (k_{cat}/K_m) für die Hydrolyse der Substrate mit Substitution an der P2-Position durch *Ricinus* CysEP und Papain. [Tabelle aus Than *et al.* (2004); © 2004 Elsevier Science Ltd..]

P2 – P1 ↓ P1' – P2' ^a Xaa – Arg ↓ Gln – Gln	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	
	Cys-EP	Papain ^b
Leu	1645	45
Phe	1365	294
Tyr	1221	303
Val	484	50
Trp	378	28
Ile	342	53
Met	251	126
Arg	79	1,45
His	37,7	4,52
Lys	11,0	0,96
Cys	10,6	51,6
Glu	6,37	0,70
Thr	4,88	9,57
Ala	3,67	12,7
Asn	3,26	1,08
Gln	2,49	5,44
Gly	1,39	0,21
Asp	1,26	0,20
Ser	0,67	3,90

^a Der abwärts gerichtete Pfeil (↓) zeigt die Spaltstelle an.

^b Werte aus Davy *et al.* (2000).

Tabelle 5.5: Kinetische Konstanten (k_{cat}/K_m) für die Hydrolyse der Substrate mit Substitution an der P1-Position durch *Ricinus* CysEP und Papain. [Tabelle aus Than *et al.* (2004); © 2004 Elsevier Science Ltd..]

P2 – P1 ↓ P1' – P2' ^a Leu – Xaa ↓ Gln – Pro	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	
	Cys-EP	Papain ^b
His	3872	17,3
Arg	2752	124
Lys	2707	80,5
Phe	1445	66,3
Leu	1328	62,6
Tyr	1244	14,3
Met	1102	152
Thr	903	54,5
Trp	796	18,2
Gly	732	232
Gln	569	64,6
Ala	399	79,3
Ser	339	39
Glu	166	6,86
Cys	149	128
Asn	136	16,1
Val	76,5	3,51
Ile	63,6	2,64
Asp	20,6	0,50
Pro	0,88	2,9

^a Der abwärts gerichtete Pfeil (↓) zeigt die Spaltstelle an.
^b Werte aus Davy *et al.* (2000)

5.3.2 Analyse der Spaltmotive des proteolytischen β -Casein-Verdaus durch Ricinosomen-CysEP aus *Ricinus*

Für die Analyse der von der *Ricinus* CysEP generierten Proteolyse-Produkte wurde ein Substrat benötigt, das über die gesamte Struktur gut zugänglich ist und nicht durch organisierte Bereiche mit α -Helices oder β -Faltblättern den Zugang für die Protease erschwert und dadurch die Daten verfälscht. Die geforderten Eigenschaften besitzt das amorphe Substrat β -Casein (Sigma) aus Rindermilch.

β -Casein wurde mit *Ricinus* CysEP aus isolierten Ricinosomen verdaut. Der durch die 17,5%-SDS-PAGE dokumentierte zeitliche Verlauf des Abbaus ist in Abbildung 5.28 gezeigt. Das Verschwinden der Bande für unverdautes β -Casein (Bahn 0 ganz links in Abbildung 5.28A und B) im Verlauf des Verdaus geht einher mit dem Auftauchen der niedermolekularen Abbauprodukte. Die fünfmal höhere Menge an proteolytisch aktivem Enzym bei einer Ricinosomen-Verdünnung von 1:10 (Abbildung 5.28B) im Vergleich zur stärkeren 1:50-Verdünnung (Abbildung 5.28A), wird durch die etwa gleichen Bandenmuster nach 2 min bzw. 10 min wiedergegeben. Für die genauere Analyse der generierten Peptide wurde ein früher Zeitpunkt im Abbau gewählt, wo der überwiegende Teil des β -Caseins noch unverdaut war (1 min Verdau mit Ricinosomen in einer Verdünnung von 1:50) sowie ein späterer Zeitpunkt, wo der größte Teil des β -Caseins und größere Spaltprodukte auf dem 17,5%-SDS-Polyacrylamidgel nicht mehr sichtbar waren (8 min Verdau mit Ricinosomen in einer Verdünnung von 1:10).

Die Analyse des β -Casein-Verdaus wurde von der Arbeitsgruppe für Proteomanalytik am MPI Martinsried unter Prof. F. Lottspeich durchgeführt. Die Peptide wurden durch *Reversed-phase* HPLC getrennt, anschließend N-terminal sequenziert und über MALDI-TOF analysiert. Die Sequenzen der 36 identifizierten Peptide zeigen 34 verschiedene Spaltstellen (Tabelle 5.6). Zusätzlich wurden drei Spaltstellen allein über N-terminale Sequenzierung identifiziert (QTPV, WMHQ, AQTQS). Für beide Zeitpunkte wurden die Peptide von der vollständigen β -Casein-Polypeptidkette abgeleitet, was auf einen zufallsverteilten Verlauf des Verdaus hindeutet. In Tabelle 5.7 sind die identifizierten Spaltstellen der β -Casein-Sequenz mit Pfeilen markiert.

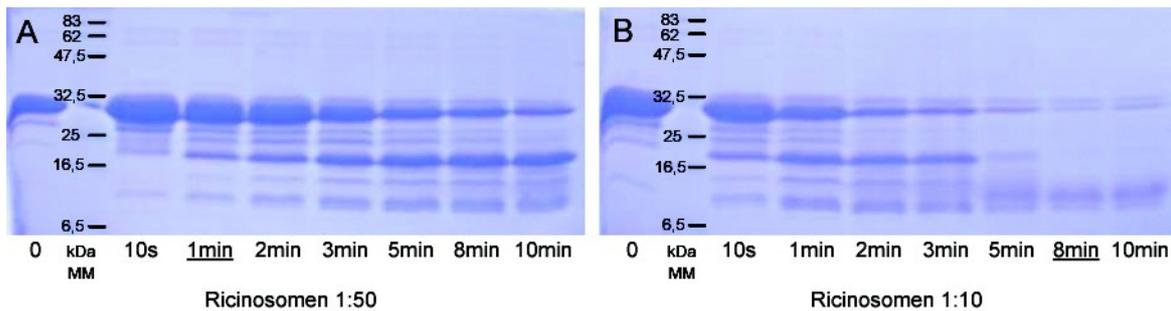


Abbildung 5.28: SDS-PAGE-Analyse des β -Casein-Verdau durch Ricinosomen-CysEP.

Im 200 μ L-*in-vitro*-Assay wurden 0,2% β -Casein durch 1:50 (A) bzw. 1:10 (B) Ricinosomen in 50 mM MES pH 5,5 / 10 mM DTT bei RT verdaut. Der Verdau wurde im Rahmen einer Zeitreihe nach 10 s, 1 min, 2 min, 3 min, 5 min, 8 min und 10 min durch Schockfrieren abgebrochen. 40 μ L-Aliquots wurden durch 17,5%-SDS-PAGE analysiert. Die im Verdau generierten Peptide wurden zu einem frühen Zeitpunkt nach 1 min in (A) und zu einem späten Zeitpunkt nach 8 min in (B) näher analysiert.

Neutrale Aminosäurereste mit großen aliphatischen und unpolaren (acht Leu, sechs Val, ein Ile und drei Met) oder aromatische (drei Phe) Seitenketten wurden bevorzugt an der P2-Position der generierten Spaltstellen gefunden und machen 57% der P2-Positionen aus. Spaltstellen mit kleinen, polaren oder geladenen Seitenketten in der P2-Position (fünf Gln, drei Lys, ein Ser und ein Arg) waren mit 27% unterrepräsentiert. Prolin alleine nimmt sechs mal die P2-Position, was 16% entspricht. Tabelle 5.9 zeigt, daß 20 der 37 Spaltungen mit Val, Leu, Phe und Met an P2 erfolgen; bei gleichmäßiger Verteilung würde man nur zehn Spaltstellen mit diesen Resten erwarten. Die Anzahl der Spaltstellen mit Met, Pro, Lys und Gln an P2 war höher, als es von den kinetischen Werten der synthetischen Peptidsubstrate (siehe Abschnitt 3.3.1) anzunehmen war. Dagegen war die Anzahl der Spaltstellen mit Phe und Tyr an P2 niedriger, als vom Verdau der synthetischen Peptide zu erwarten war. Der Grund hierfür könnte sein, daß sich förderliche oder unförderliche Reste in Nachbarschaft zur Spaltstelle befinden.

Die Analyse der Spaltmotive der *Ricinus* CysEP im β -Casein-Verdau zeigte eine eindeutige Präferenz für neutrale Aminosäurereste mit großen aliphatischen und unpolaren Seitenketten wie Leu, Val und Met in der P2-Position.

Eine klare Präferenz für die P1-Position war nicht zu erkennen (Tabelle 5.8 und 5.9). Unter den 37 verschiedenen Spaltstellen wurden fünf Leu, zwei Val, ein Ile, zwei Met, zwei Phe, zwei Tyr, ein Arg, zwei Lys, ein His, sechs Ser, drei Thr, ein Ala, ein Asp, fünf Gln und zwei Pro an der P1-Position gefunden. Ser, Thr, Met und Tyr machten 13 der 37 Spaltstellen an P1 aus, gegenüber sieben erwarteten bei zufälliger Verteilung (Tabelle 5.9).

Bemerkenswert ist die unerwartet hohe Anzahl an Spaltungen nach Pro, Ser und Gln verglichen mit den kinetischen Daten von der Spaltung der fluorogenen Peptide.

Von besonderem Interesse ist die Spaltung nach Pro (Pro an P1) an zwei Stellen und vor Pro (Pro an P1') an drei Stellen (Tabelle 5.8, unterstrichen). Die Gegenwart von Pro in Nachbarschaft zum ersten oder letzten Rest eines Proteins dient als Schutz gegen den Verdau durch zelluläre Exopeptidasen und erfordert Prolin-spezifische Proteasen. Sogar die Cystein-Endoproteasen, die in Pro-reichen Getreiden Prolamine abbauen, sind nicht in der Lage neben Prolin zu spalten (Simpson, 2001). Die Spaltung von Xaa-Pro- oder Pro-Xaa-Bindungen durch die CysEP könnte mit ihrer Funktion im Proteinabbau während des programmierten Zelltodes zusammenhängen.

Tabelle 5.6: Durch Verdau mit *Ricinus* CysEP aus Ricinosomen erzeugte β -Casein-Peptide. [Tabelle aus Than *et al.* (2004); © 2004 Elsevier Science Ltd..]

Aminosäure-Position in β -Casein-Sequenz	Peptid-Sequenz
62 - 72	ELQ DKL...TQS LVY
62 - 74	ELQ DKL...SLV YPF
69 - 87	PFA QTQ...LPQ NIP
73 - 82	TQS LVY...PIH NSL
73 - 87	TQS LVY...LPQ NIP
75 - 87	SLV YPF...LPQ NIP
109 - 135	EVM GVS...PFT ESQ
112 - 135	GVS KVK...PFT ESQ
115 - 135	KVK EAM...PFT ESQ
115 - 125	KVK EAM...EMP FPK
115 - 129	KVK EAM...PKY PVE
115 - 134	KVK EAM...EPF TES
115 - 156	KVK EAM...LLQ SWM
161 - 171	WMH QPH...TVM FPP
161 - 178	WMH QPH...SVL SLS
161 - 179	WMH QPH...VLS LSQ
161 - 180	WMH QPH...LSL SQS
161 - 181	WMH QPH...SLS QSK
161 - 186	WMH QPH...KVL PVP
161 - 190	WMH QPH...VPQ KAV
170 - 185	PPT VMF...SKV LPV
170 - 186	PPT VMF...KVL PVP

Aminosäure-Position in β -Casein-Sequenz	Peptid-Sequenz
170 - 190	PPT VMF...VPQ KAV
170 – 201	PPT VMF...DMP IQA
180 – 203	VLS LSQ...PIQ AFL
182 – 199	SLS QSK...QRD MPI
182 – 203	SLS QSK...PIQ AFL
184 – 201	SQS KVL...DMP IQA
184 – 202	SQS KVL...MPI QAF
192 – 203	PQK AVP...PIQ AFL
192 – 206	PQK AVP...AFL LYQ
192 – 207	PQK AVP...FLL YQE
192 – 208	PQK AVP...LLY QEP
192 – 210	PQK AVP...YQE PVL
208 – 217	FLL YQE...PVR GPF
208 – 224 C-Terminus	FLL YQE...PIIV-Terminus

Tabelle 5.7: Prä-Sequenz (Aminosäurereste 1 – 15) und reifes β -Casein (Aminosäurereste 16– 224) mit den durch Pfeile markierten Spaltstellen. Valin- und Leucin-Reste sind fettgedruckt; Prolin-Reste **rot. [Tabelle aus Than *et al.* (2004); © 2004 Elsevier Science Ltd..]**

MKVLILACLVALALA
 RELEELNVPGEIVESLSSEESITRINKKIEKFQSEEQQQTEDELQ↓DK
 IHPF↓A↓QTQS↓LV↓YPPGPIPNSLPQ↓NI
 PPLT↓QT↓P↓VV↓PPFLQPEVM↓GVS↓KVK↓EAMAPKQ
 KEMP↓FPKY↓PVEPF↓T↓ESQSLTLTDVENLHLPL
 PLLQ↓S↓WMH↓QPHQP
 LPPT↓VM↓FPP
 QSVL↓S↓L↓S↓QS↓KV↓L↓PVPQ↓K↓AVPY
 PQRD↓MP↓I↓Q↓AFL↓L↓Y↓QE↓PVL
 GPVR↓GPFPIIV

Tabelle 5.8: Durch Aminosäure-Sequenzierung (allein oder in Kombination mit MALDI-TOF) der Spaltfragmente identifizierte Spaltstellen in β -Casein. Schwarze Reste entsprechen der Primärsequenz, **rote Reste wurden ergänzt, um den Bereich von P4 bis P4' abzudecken. [Tabelle aus Than *et al.* (2004); © 2004 Elsevier Science Ltd..]**

RELEELNVPGEIVESLSSEESITRINKKIEKFQSEEQQQTE
 DELQ↓DK**I**H
 IHPF↓AQ**T**Q

HPFA↓QTQS
QTQS↓LVYP
QSLV↓YFPFGPIP
SLPQ↓NIPP
PPLT↓QTPVVVPPFLQ
PEVM↓GVSK
MGVS↓KVKE
SKVK↓EAMAPKQ
KEMP↓FPKY
FPKY↓PVEPF
VEPF↓TESQ
EPFT↓ESQSLTLTDVENLHLPL
PLLQ↓SWMH
LLQS↓WMHS
SWMH↓QPHQP
LPPT↓VMFP
PTVM↓FPPQ
QSVL↓SLSQ
SVLS↓LSQS
VLSL↓SQSK
LSLS↓QSKV
LSQS↓KVLP
QSKV↓LPVP
SKVL↓PVPQ
PVPQ↓KAVP
VPQK↓AVPY
PQRD↓MPIQ
RDMP↓IQAF
DMPI↓QAFL
MPIQ↓AFL
QAFL↓LYQE
AFL↓YQEP
FLLY↓QEPV
LYQE↓PVLG
GPVR↓GPFPIIV

Tabelle 5.9: Gegenüberstellung der im reifen β -Casein (209 Aminosäurereste) vorhandenen Aminosäurereste mit den nach Verdau durch die *Ricinus* CysEP erhaltenen 37 Spaltnativen. Die theoretisch erwartete Häufigkeit der Spaltung entspricht der relativen Häufigkeit der entsprechenden Aminosäure in β -Casein ($n/209$), multipliziert mit 37 (der Anzahl der beobachteten Spaltstellen in Position P2 bzw. P1). [Tabelle aus Than *et al.* (2004); © 2004 Elsevier Science Ltd..]

Aminosäure	β -Casein	P2	P1	erwartete Häufigkeit
Ala	5	0	1	0,89
Arg	4	1	1	0,71
Asn	5	0	0	0,89
Asp	4	0	1	0,71
Cys	0	0	0	0
Gln	20	5	5	3,54
Glu	19	0	1	3,36
Gly	5	0	0	0,89
His	5	0	1	0,89
Ile	10	1	1	1,77
Leu	22	8	5	3,89
Lys	11	3	2	1,95
Met	6	3	2	1,06
Phe	9	3	2	1,59
Pro	35	6	2	6,20
Ser	16	1	6	2,83
Thr	9	0	3	1,59
Trp	1	0	0	0,18
Tyr	4	0	2	0,71
Val	19	6	2	3,36

5.3.3 Reinigung der reifen *Ricinus* CysEP mit dem kovalent gebundenen Inhibitor H-D-Val-Leu-Lys-Chloromethylketon und die Bestimmung von N- und C-Terminus

Die *Ricinus* CysEP wurde aus isolierten Ricinosomen bis zur Homogenität gereinigt. Da Ricinosomen die Pro-CysEP enthalten, wurde dessen Prozessierung *in-vitro* durch Ansäuerung erreicht. Dabei wurden das N-terminale Propeptid und das C-terminale KDEL-Motiv abgespalten (Schmid *et al.*, 2001). Der N-Terminus der reifen CysEP besitzt die Sequenz TVPASV... (90% der reifen CysEP) oder VPASV... (10% der reifen CysEP), was mit früheren Ergebnissen übereinstimmt (Schmid *et al.*, 1998). Durch LC-MS wurde die Masse der gereinigten CysEP inklusive dem gebundenen Inhibitor H-D-Val-Leu-Lys-CMK bestimmt, sie beträgt 24926 ($\pm 2,0$) Da. Der kovalent gebundene Inhibitor besitzt eine Masse von 354 Da, wobei HCl bei der Bindungsknüpfung eliminiert wird. Die reife CysEP hatte dem zufolge nach Abspaltung von N- und C-terminalem Propeptid eine Masse von 24572 Da ohne Reduktion der Disulfidbrücken. Der ursprüngliche C-Terminus ...YPIKKSSNNPSGIKSSPKDEL wird durch Entfernung der letzten sieben Aminosäurereste inklusive der KDEL-Sequenz auf ...YPIKKSSNNPSGIK verkürzt. Dies stimmt mit der von Schmid *et al.* (2001) gemachten Beobachtung überein, daß isolierte Ricinosomen 80-90% Pro-CysEP mit dem C-terminalen KDEL und 10-20% Moleküle mit dem reifen C-Terminus ...YPIKKSSNNPSGIK enthalten.

5.3.4 Die Kristallstruktur und das aktive Zentrum

5.3.4.1 Kristallisation und Datensammlung

Das gereinigte Protein erwies sich in den initialen Kristallisationsversuchen über den „*in-House*“-Screen mit 96 unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen als sehr „kristallisierfreudig“. Neben einigen anderen Bedingungen lieferte der Ansatz mit 29% PEG 4000 / 190 mM Li_2SO_4 / 100 mM Na-Citrat pH 5,9 vielversprechende Kristalle. Bei der weiteren systematischen Verfeinerung der initialen Kristallisationsbedingungen wurden jeweils zwei der drei Parameter um einen Wert herum variiert. Letztendlich wurden auf diese Weise ausgezeichnet streuende Kristalle aus 31% PEG 4000 / 200 mM Li_2SO_4 / 100 mM Na-Citrat pH 5,04 erhalten. Die Kristalle neigten zur Bildung von „Büscheln“, so

daß für die Vermessung dieser Kristalle mit der Röntgenkamera einzelne, gut gewachsene Kristalle aus den Kristallbüscheln herauspräpariert wurden (Abbildung 5.29). Die Kristalle gehören zur Raumgruppe $P2_12_12_1$ mit Zellkonstanten von $a = 36,448 \text{ \AA}$, $b = 68,162 \text{ \AA}$, $c = 163,780 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Dies entspricht bei 2 Molekülen in der asymmetrischen Einheit einem Solvensgehalt von 41% (Matthews Parameter $2.07 \text{ \AA}^3/\text{Da}$). Trotz einer relativ hohen Mosaizität von $0,7^\circ$ liegt die Streuleistung dieser Kristalle unter Verwendung einer „In-House“-Röntgenquelle deutlich unter $1,8 \text{ \AA}$ (Tabelle 5.10).

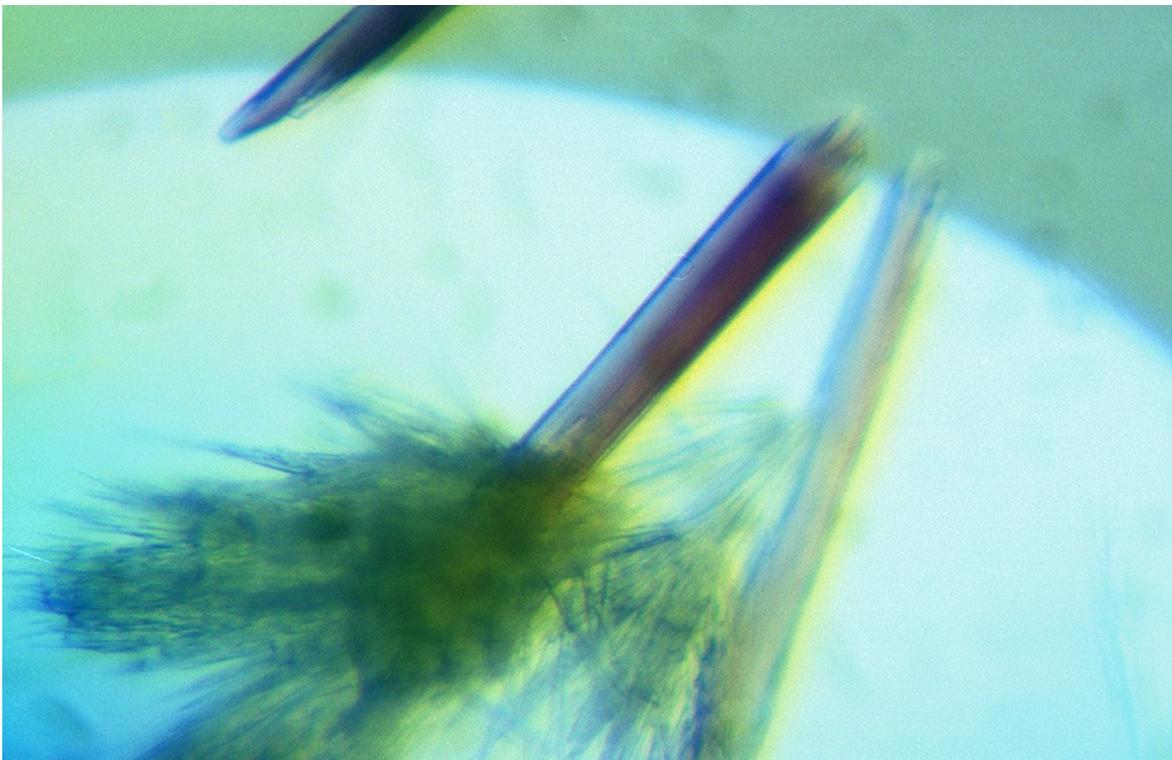


Abbildung 5.29: Mikroskopische Aufnahme von Kristallen der *Ricinus CysEP*. Die Kristalle sind im *sitting-drop*-Verfahren aus $2 \mu\text{l}$ Proteinlösung und $2 \mu\text{l}$ Reservoir-Puffer (31% PEG 4000 / 100mM Na-Citrat pH 5,04 / 200 mM Li_2SO_4) bei 20°C gewachsen. Für die Vermessung dieser Kristalle wurden einzelne, gut gewachsene Kristalle aus den Kristallbüscheln herauspräpariert.

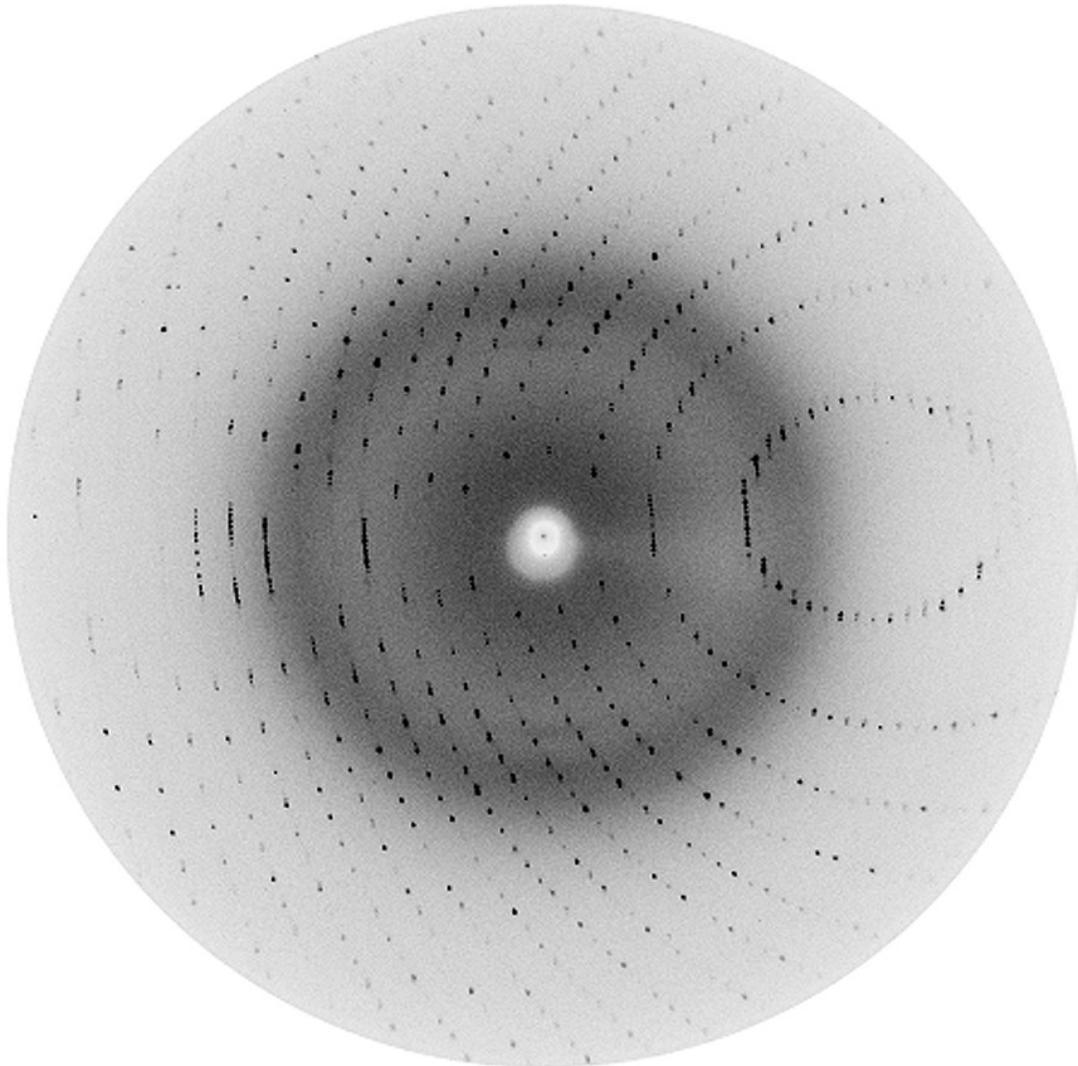
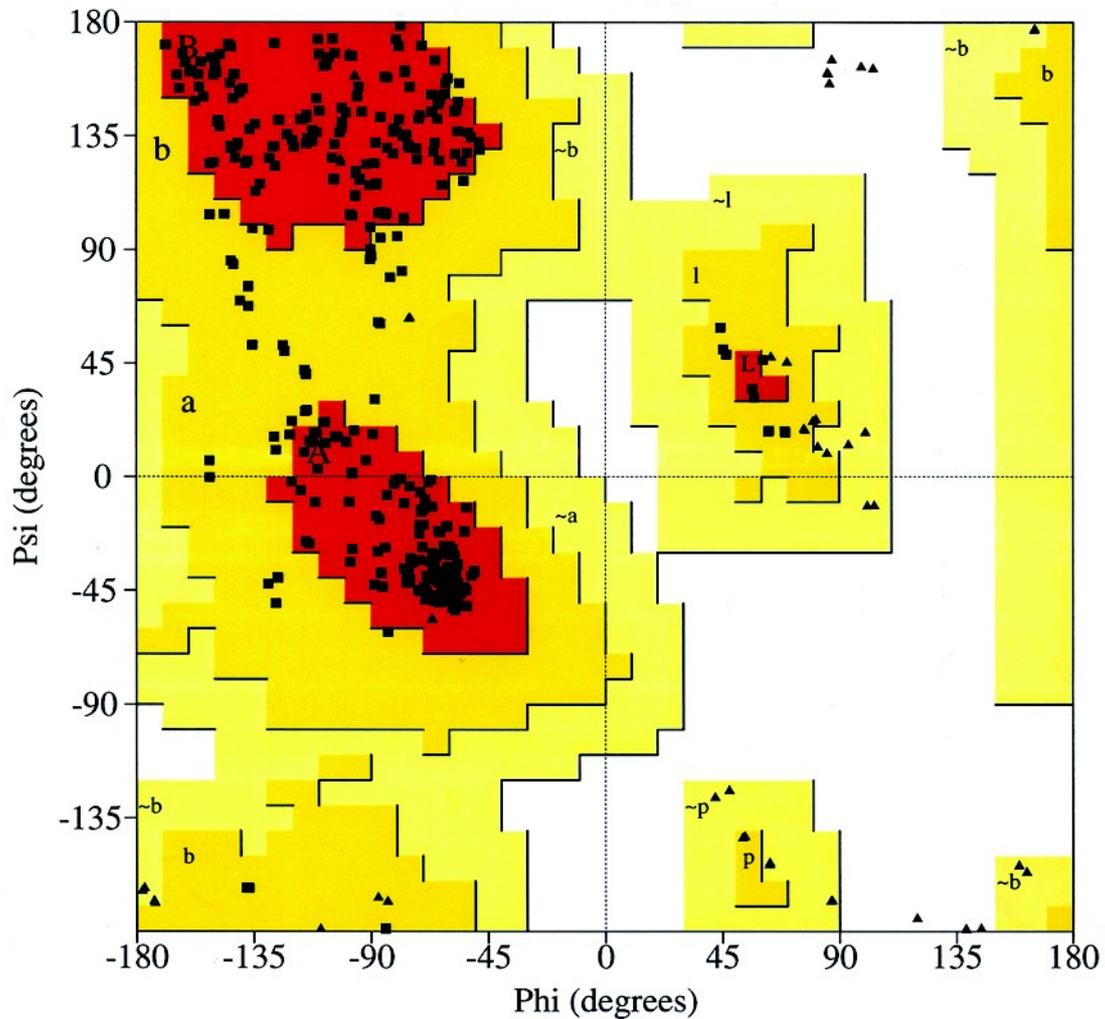


Abbildung 5.30: Streubild der orthorhombischen CysEP-Kristalle. Gemessen wurde unter einem Drehwinkel von 0,2 Grad mit einem 345 mm Mar-Image-Plate Detektor und Cu-K α -Röntgenstrahlung. Der Rand liegt bei 2,0 Å Auflösung.

Nächste Seite:

Abbildung 5.31: Ramachandran-Plot der finalen Verfeinerung der *Ricinus* CysEP. Rot unterlegt sind die bevorzugt erlaubten, intensiv gelb die zusätzlich erlaubten, hell-gelb die großzügig erlaubten und weiß die nicht erlaubten Bereiche. Reste außer Prolin und Glycin sind als Quadrate, Proline als Dreiecke dargestellt. Die Reste außer Prolin und Glycin in den großzügig erlaubten Bereichen sind durch rote Quadrate repräsentiert.

PROCHECK



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	329	86.8%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	50	13.2%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	379	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	358	
Number of glycine residues (shown as triangles)	52	
Number of proline residues	15	

Total number of residues	804	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

Tabelle 5.10: Zusammenfassung der Kristallographischen Analyse [Tabelle aus Than *et al.* (2004); © 2004 Elsevier Science Ltd..]

Messung	Wert
<i>A. Datensammlung</i>	
Auflösungsbereich (Å)	24,4-2,0
gemessene Reflexe	179209
unabhängige Reflexe	28159
Vollständigkeit der Daten (%)	98,5 (89,3)
$R_{\text{symm}}^{\text{a,b}}$ (%)	6,6 (13,7)
<i>B. Verfeinerung</i>	
Auflösungsbereich (Å)	24,3-2,0
Anzahl der Proteinatome (nicht H-Atome)	3393
Anzahl der Solvens-Moleküle	347
Anzahl der Inhibitor-Atome	50
$R_{\text{cryst}}^{\text{d,e}}$ (%)	18,1 (17,6)
$R_{\text{free}}^{\text{e,f}}$ (%)	22,6 (21,2)
gemittelter B-Faktor $^{\text{g}}$ (Å ²)	16,6 (18,4)
rms-Abweichung der Bindungslängen (Å)	0,008
rms-Abweichung (Å ²)	1,469

^a Die Werte der letzten Auflösungsschale von 2,07 Å bis 2,0 Å sind in Klammern angegeben.

^b $R_{\text{symm}} = \frac{\sum |I_{hi} - \langle I_h \rangle|}{\sum \langle I_h \rangle}$.

^c Dieser Wert enthält die fünf Atome des einen Sulfat-Ions.

^d Die Werte in Klammern entsprechen der letzten Auflösungsschale von 2,13 Å bis 2,0 Å.

^e $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum |F_{oh} - F_{ch}|}{\sum F_{oh}}$, wobei F_{oh} und F_{ch} den beobachteten bzw. errechneten Strukturfaktor-Amplituden des Reflexes h entsprechen.

^f R_{free} berechnet mit 5% Reflektionen, die nicht in die Verfeinerung einbezogen wurden. Für die Auswahl der Reflektionen wurden solche auf dünnen Schalen den zufällig ausgewählten vorgezogen, um die durch die NCS verursachte Korrelation von R_{free} und den Reflektionen der Verfeinerung niedrig zu halten.

^g Wilson plot B-Faktoren in Klammern.

5.3.4.2 Kristallisation und Gesamtstruktur

Die reife papainartige Cystein-Peptidase CysEP aus *Ricinus communis* wurde in Gegenwart des substratähnlichen Inhibitors H-D-Val-Leu-Lys-CMK kristallisiert und die dreidimensionale Struktur wurde mit *Patterson*-Suchtechnik unter der Verwendung der Koordinaten der Prolin-spezifischen Protease aus *Zingiber officinale* (Choi *et al.*, 1999) als Suchmodell bestimmt. Das endgültige Modell umfaßt zwei fast identische Proteinmoleküle mit kovalent gebundenen Inhibitor H-D-Val-Leu-Lys-CMK, 342 Wassermoleküle und ein kristallographisch definiertes Sulfat-Ion mit gut definierter Stereochemie (Tabelle 5.10). Die Struktur wurde bis zum kristallographischen R-Faktor von 18,1% ($R_{\text{free}} = 22,6\%$) verfeinert. Für eine Auflösung von 2,0 Å, ist die $2 F_{\text{obs}} - 2 F_{\text{calc}}$ Elektronendichte von außergewöhnlicher Qualität (Abbildung 5.34D), wahrscheinlich aufgrund der ausgezeichneten Diffraktions-Daten (Tabelle 5.10). Tatsächlich wurde die Auflösung während der Datensammlung auf 2,0 Å begrenzt, um eine durch die starke Streuung und die großen Zellkonstanten bedingte Überlappung von Spots zu verhindern. Für die benutzte CuK_α -Strahlung mit der Wellenlänge von $\lambda = 1,542 \text{ \AA}$ lag die beobachtete Streuung für die gemessenen kleinen Kristalle unter 1,7 Å.

Die zwei Moleküle der asymmetrischen Einheit - MOLA und MOLB - sind in der Elektronendichte ab dem zweiten und ersten Aminosäurerest (Val2 und Thr1) bis Asn224 und Ser226 definiert (die Nummerierung bezieht sich auf die reife CysEP; siehe Abbildung 5.32). Ab Ala4 sind die zwei Moleküle sehr ähnlich (rms-Werte von 0,72 Å und 0,21 Å für alle Atome und die C^α -Atome der 219 äquivalenten Aminosäurereste), was darauf hindeutet, daß die ersten drei Aminosäurereste, sowie die auf Asn224 folgenden im Solvens beweglich sind. Die folgende Beschreibung und Diskussion basiert auf dem etwas besser definierten Molekül MolB.

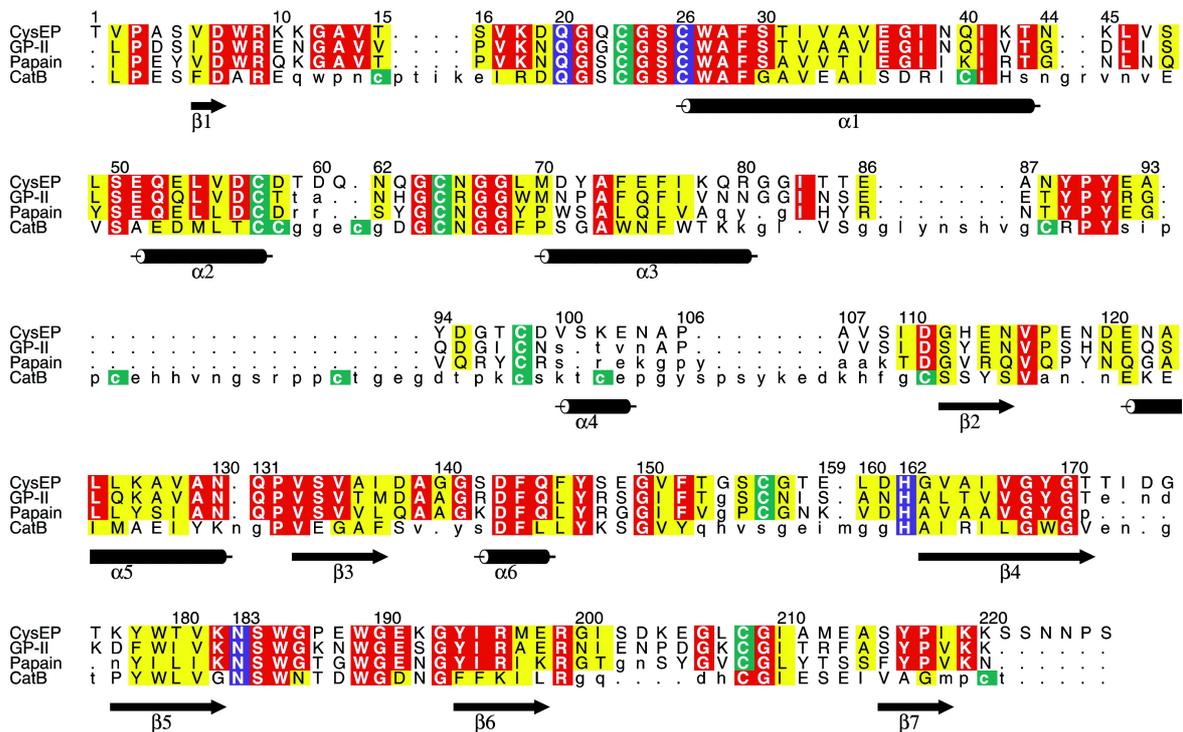
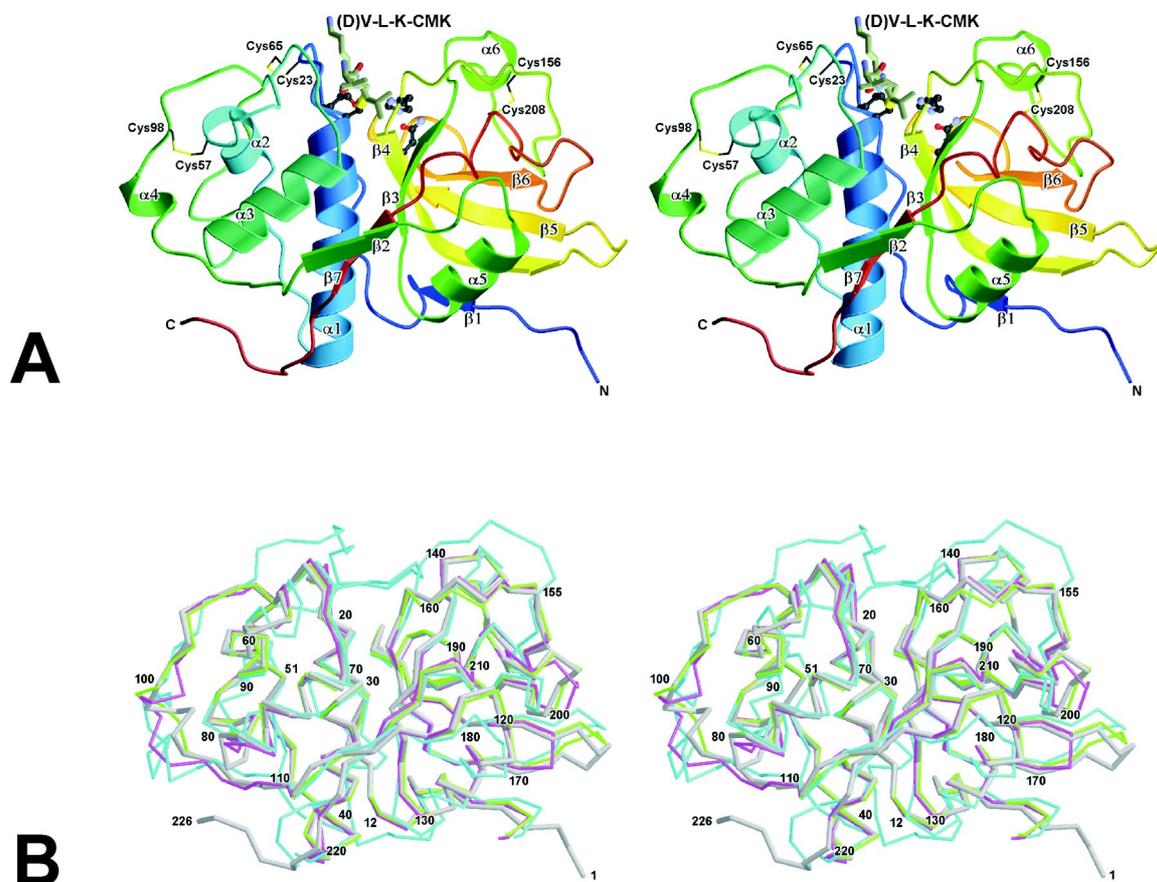


Abbildung 5.32: Struktur-basierter Sequenzvergleich der *Ricinus* CysEP mit den drei Cystein-Proteasen Prolin-spezifischen Cystein-Endoproteinase aus *Z. officinale* (GP-II; Choi *et al.*, 1999), Papain (Stubbs *et al.*, 1990) und Cathepsin B (CatB; Turk *et al.*, 1995). Identische Aminosäurereste sind rot, chemisch ähnliche gelb unterlegt. Alle Reste, deren räumliche Position von der der CysEP abweichen, sind in Kleinbuchstaben gedruckt. Die hochkonservierten Reste des aktiven Zentrums sind blau und die Disulfidbrücken-Cysteine grün unterlegt. Die Sekundärstrukturelemente (α -Helices bzw. β -Faltblätter) der CysEP befinden sich unterhalb des Sequenzvergleichs, nummeriert von $\alpha 1$ bis $\alpha 6$, sowie $\beta 1$ bis $\beta 7$. [Die Abbildung wurde mit ALSCRIPT (Barton, 1993) erstellt. Abbildung aus Than *et al.* (2004); © 2004 Elsevier Science Ltd..]

Die Gesamtstruktur der *Ricinus* CysEP (Abbildung 5.33) zeigt eine verdreht ellipsoide Molekülform mit einer klar definierten Substratbindungsrinne auf der Oberseite. Wie für papainartige Cystein-Proteasen typisch (Barrett *et al.*, 1998; Turk *et al.*, 1998; Barrett und Rawlings, 2001; Turk und Guncar, 2003), ist die Polypeptidkette zu zwei Domänen von ungefähr gleicher Größe gefaltet, getrennt durch die Substratbindungsfurche und das aktive Zentrum. Die linke (L-) Domäne (Aminosäurereste 22-113 und 217-226) ist überwiegend α -helikal ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 4$) verbunden durch ungeordnete Bereiche (*random coil*). Die rechte (R-) Domäne (Aminosäurereste 1-21 und 114-218) besteht aus dem großen, verdrehten antiparallelen β -Faltblatt ($\beta 6$, $\beta 5$, $\beta 4$, $\beta 3$, $\beta 7$ und $\beta 2$), das am C-terminalen Bereich von $\beta 4$ erweitert wird, den flankierenden Helices $\alpha 5$ und $\alpha 6$, sowie verbindenden Segmenten. Beide Domänen interagieren, ohne daß eine strukturell definierte Verbindung

vorliegt. Zusätzlich gehören ungefähr 20 N-terminale Reste zur L-Domäne und 10 C-terminale Reste zur R-Domäne. $\beta 2$ und $\beta 7$ gehören partiell zur L-Domäne. Die Faltung der CysEP ist im weiteren von drei Disulfidbrücken stabilisiert, die den *Loop* vor $\alpha 1$ mit dem *Loop* zwischen $\alpha 2$ und $\alpha 3$ (Cys23-Cys65), den C-Terminus von $\alpha 2$ mit dem N-Terminus von $\alpha 4$ (Cys57-Cys98) und die langen ungeordneten Bereiche von $\alpha 6$ bis $\beta 4$ und von $\beta 6$ bis $\beta 7$ (Cys156-Cys208) miteinander verbinden.

Das ER-Rückhaltesignal am C-Terminus (KDEL), das der reifen Protease fehlt, befindet sich an der unteren linken Ecke des Moleküls, ungefähr acht Aminosäurereste hinter dem strukturell sichtbaren C-Terminus (siehe Abbildung 5.33A). Damit wäre es ideal lokalisiert, um die Proform der CysEP via Interaktion mit irgendeinem Protein im ER zurückzuhalten. Dieser acht Aminosäuren lange *Linker* sollte lang genug sein, um eine derart zurückgehaltene ProCysEP flexibel genug an die Membran zu binden, daß das aktive Zentrum von der Membran abgewandt ins Lumen zeigt.



Vorherige Seite:**Abbildung 5.33: Gesamtstruktur der *Ricinus* CysEP.**

A: Bänder-Darstellung der CysEP mit dem kovalent an das aktive Zentrum gebundenen H-D-Val-Leu-Lys-CMK-Inhibitor auf der Oberseite des Moleküls (Richardson-Diagramm). Die Kodierung in Spektralfarben entspricht dem Sequenzverlauf von dunkelblau (N-Terminus) nach rot (C-Terminus). Die beiden Termini, die Disulfidbrücken-Cysteine und die Sekundärstrukturelemente sind beschriftet. **B:** C^α-Plot von CysEP (grau), GP-II (grün; PDB-ID: 1CQD; Choi *et al.*, 1999), Papain (rosa; PDB-ID: 1STF; Stubbs *et al.*, 1990) und Cathepsin B (blau; PDB-ID: 1CSB; Turk *et al.*, 1995). Einige Reste der CysEP sind zur Orientierung nummeriert. Der begrenzende *Loop* von Cathepsin B (blau), der in der Substratbindungsrinne den Zutritt für Substrate limitiert, ist auf der Oberseite des Moleküls eindeutig zu erkennen. Der Inhibitor wurde weggelassen. [Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) und RASTER3D (Meritt und Bacon, 1997) erstellt. Abbildung aus Than *et al.* (2004); © 2004 Elsevier Science Ltd..]

Interessanterweise zeigen die biochemischen Daten, daß die N- und C-terminalen Propeptide, bestehend aus 105 bzw. 7 Aminosäureresten, während der Reifung abgespalten werden (Schmid *et al.*, 1998; Schmid *et al.*, 2001). In Analogie zu verschiedenen anderen Cystein-Peptidasen (für einen Übersichtsartikel siehe z.B. Turk und Guncar, 2003) sollte nur das N-terminale Propeptid das aktive Zentrum blockieren und damit die proteolytische Aktivität unterbinden. Da das C-terminale Propeptid wahrscheinlich vom Protein wegzeigt, sollte es die Rückhaltung der Proprotease im Lumen des ER und der Ricinisomen vermitteln, jedoch nicht die Inhibierung. Demzufolge sollte die Abspaltung des N-terminalen Propeptids hinreichend sein, ein Intermediat zu liefern, das das C-terminale ER-Rückhaltungssignal noch enthält.

Wie aufgrund der Sequenzhomologie zu erwarten, ist die Gesamtstruktur der CysEP sehr ähnlich der prolinspezifischen Cystein-Protease aus *Z. officinale* (Choi *et al.*, 1999), wie eine niedrige rms-Abweichung von 0,59 Å für 216 äquivalente C^α-Atome belegt. Darüberhinaus kann die CysEP mit Papain (PDB-ID: 1STF (Stubbs *et al.*, 1990)) und mit dem entfernter verwandten Cathepsin B (PDB-ID: 1CSB (Turk *et al.*, 1995)) strukturell verglichen werden, was zu rms-Abweichungen von 0,67 Å und 1,26 Å für die C^α-Atome von 199 bzw. 175 äquivalenten Aminosäureresten führt (Abbildungen 5.33 und 5.34B). Die strukturellen Voraussetzungen für die ungewöhnlich breite Sequenzspezifität der CysEP sind unten beschrieben.

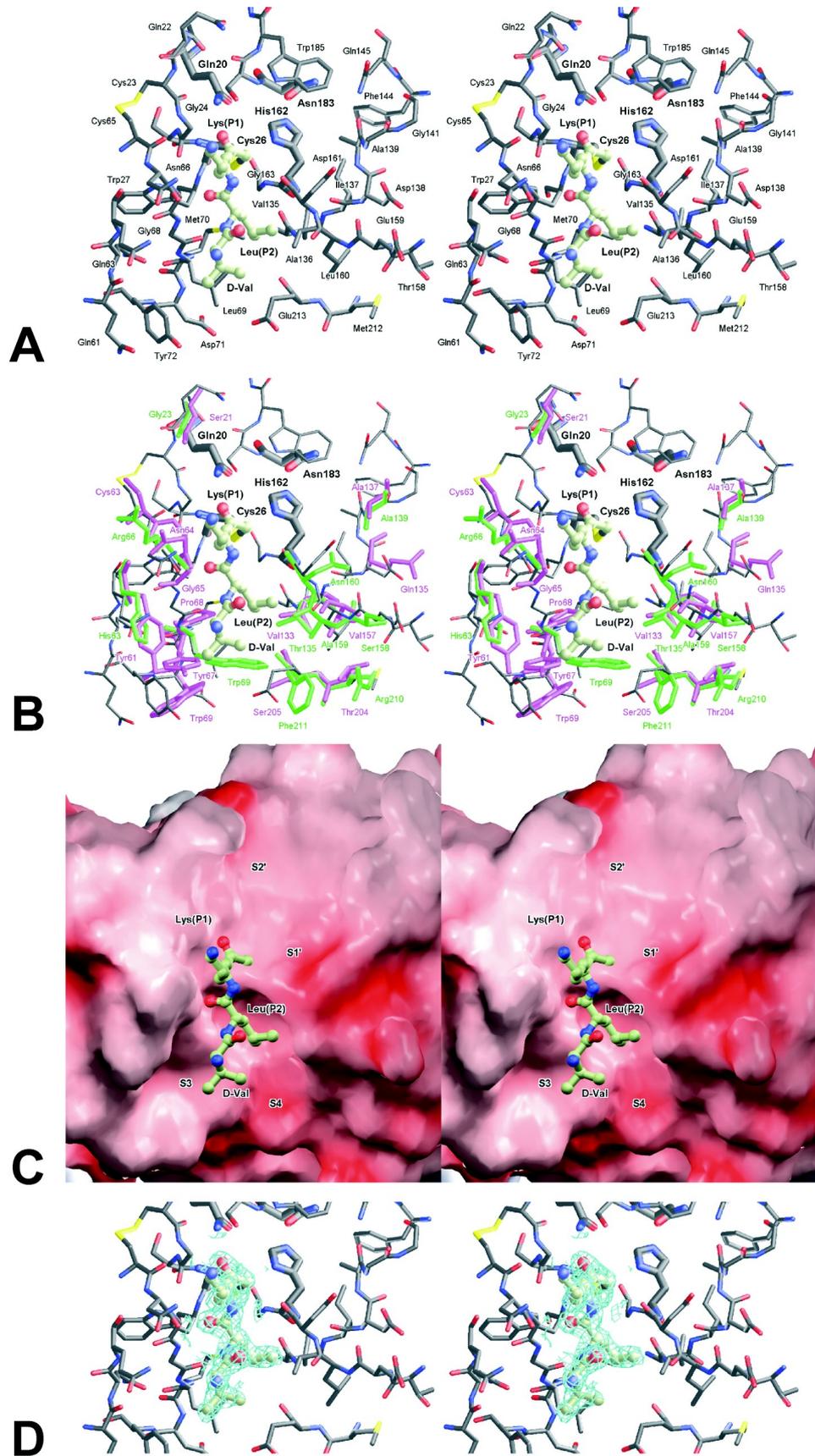
Die größten Unterschiede zwischen den vier verglichenen Strukturen betreffen die L-Domäne in den Segmenten Val55-Gly64 und Tyr94-Pro106, die Disulfid-Brücke Cys57-Cys98 eingeschlossen. Obwohl diese Regionen nicht Bestandteil des aktiven Zentrums sind, könnten sie zu Unterschieden, wie sie im Cys65-Gly67 Segment, das die linke Seite

des aktiven Zentrums und einen Teil der S1-Bindungstasche bildet, führen (siehe unten). Der verschließende *Loop*, der die Exopeptidase-Eigenschaften von Cathepsin B bedingt (Musil *et al.*, 1991), entspricht dem Segment Glu92-Gly96 der CysEP (Abbildungen 5.33 und 5.34). Weitere Abschnitte mit signifikant unterschiedlichen C^α-Positionen umfassen den von den Resten Gly170 bis Thr176 geformten Oberflächen-*Loop* und das im aktiven Zentrum sitzende Segment Gly157-His162.

5.3.4.3 Die Substratsbindungsfurche

Das aktive Zentrum der CysEP (in Abbildung 5.33A und B oben und in Abbildung 5.34A-D zum Betrachter hin orientiert) befindet sich in einer Längsrinne, die breiter als bei der *Zingiber*-Protease und bei Papain ist (Abbildung 5.34B). Der Inhibitor H-D-Val-Leu-Lys-CMK ist kovalent an das Cys26 im aktiven Zentrums gebunden und legt sich mit seinen P1- und P2-Seitenketten substratartig in die Bindungstaschen der CysEP (P1, P2,... und P1', P2',... bezeichnen die Substratrete N-/C-terminal von der zu spaltenden Peptidbindung, entsprechend den Enzymtaschen S1, S2,... und S1', S2') und definiert dadurch strukturelle Details für die Substraterkennung *in-vitro*.

Die Peptidylhälfte des Inhibitors befindet sich auf dem Grund der Substratbindungsfurche angrenzend an das Gly-Gly68-Leu-Segment und bildet ein kurzes, verdrehtes antiparalleles β-Faltblatt mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Gly68-N,O und LeuP2-O,N (Abbildung 5.34A). Die gestreckte Konformation des Inhibitors ist im weiteren durch eine schwächere Wasserstoffbrückenbindung zwischen LysP1-N und Asp161-O stabilisiert, was die die CMK-Hälfte des Inhibitors (und im Falle eines gebundenen Substrates, die zu spaltende Peptid-Bindung) zum nucleophilen Cys26 hin orientiert; letzteres wird durch His162 und Asn183 aktiviert und bildet mit diesen die katalytische Triade. Während des Katalysezyklus wird die negative Ladung des LysP1-O durch seine feste Interaktion mit Gln20-N^{e2} stabilisiert und bildet zusammen mit dem Hauptketten-Stickstoffatomen von Ser25 und Cys26 die Oxyaniontasche.



Vorherige Seite:

Abbildung 5.34: Struktur der *Ricinus* CysEP: Interaktionen zwischen dem Inhibitor und der Substratbindungsrinne.

Stereoansicht der Region des aktiven Zentrums der CysEP und des H-D-Val-Leu-Lys-CMK-Inhibitors von unten (N-Terminus) nach oben (C-Terminus, zu spaltende Peptidbindung) durch die vertikal ausgerichtete Substratbindungsrinne (Abbildung 5.33 um 90° zum Betrachter hin gedreht). **A:** Stäbchen-Modell der Reste (dunkelgrün, Kohlenstoff; blau, Stickstoff; rot, Sauerstoff; gelb, Schwefelatome) in Umgebung des Inhibitors (Ball-und-Stäbchen-Modell). Die Inhibitorseitenketten, die Reste im aktiven Zentrum, sowie weitere relevante Reste sind für die Orientierung beschriftet. **B:** Stäbchen-Modell ähnlich A, aber mit den Resten von GP-II (Choi *et al.*, 1999; in grün) und Papain (Stubbs *et al.*, 1990; in rosa), die sich von den äquivalenten Resten der CysEP unterscheiden. Insbesondere der Bereich der Substratbindungsrinne unterhalb des Cys26 ist bei der CysEP deutlich weiter angelegt. **C:** Der Inhibitor (Ball-und-Stäbchen-Modell) vor der festen Oberfläche der katalytischen Tasche; die Farbe gibt das errechnete negative (rot, $-30\text{e}/\text{kT}$) und positive (blau, $30\text{e}/\text{kT}$) elektrostatische Oberflächenpotential wieder. Die vorhergesagten Subdomänen für die Bindung eines gestreckten Substrats sind gekennzeichnet. **D:** Stäbchen-Modell ähnlich (A), jedoch mit der endgültigen $2 F_{\text{obs}} - 2 F_{\text{calc}}$ Elektrodendichte für den Inhibitor (blau) bei 1σ konturiert. Um den Vergleich zu erleichtern, werden alle Bilder in der gleichen Orientierung gezeigt. [Die Abbildung wurde mit MOLSCRIPT (Kraulis, 1991), BOBSCRIPT (Esnouf, 1999), GRASP (Nicholls *et al.*, 1993) und RASTER3D (Meritt und Bacon, 1997) angefertigt. Abbildung aus Than *et al.* (2004); © 2004 Elsevier Science Ltd..]

5.3.4.4 Spezifitäts-Subdomänen

An der S1-Subdomäne, einer (ähnlich, wie bei anderen papainartigen Cystein-Proteasen) flachen, zur linken Seite der Substratbindungsfurche hin orientierten Vertiefung, interagiert die LysP1-Seitenkette sehr schwach über ihre 1-Ammoniumgruppe mit Asn66, während das proximale Kohlenstoffatom eine hydrophobe Region, von Gly24 und Gly67 geformt, berührt. Folglich sollte das Enzym an der S1-Subdomäne kurze hydrophobe und größere polare Reste, möglicherweise auch Ser und Thr zulassen, aber eine eindeutig definierte Spezifität ist nicht zu erwarten. Bemerkenswerterweise zeigt das Segment Cys65-Asn66-Gly67, obwohl in der Sequenz identisch zur entsprechenden Region bei Papain, eine ganz unterschiedliche Konformation (Abbildung 5.34B). Diese Änderung, vielleicht hervorgerufen durch die Gegenwart von Gln63 statt Tyr61 in Papain, trägt zu der allgemein breiter angelegten Substratbindungsfurche der CysEP bei.

Die S2-Bindungstasche, die Hauptdeterminante für die Spezifität der meisten Cystein-Proteasen (Bode und Huber, 2000), wird überwiegend durch Leu69, Ala136, sowie durch den *Loop* Leu160-Gly163 und teilweise von Met70 definiert. Sie ist weiter, als bei der hoch homologen prolinspezifischen *Zingiber*-Protease oder vielen anderen papainartigen Cystein-Proteasen, hauptsächlich aufgrund von Leu69 (anstelle von Trp in der *Zingiber*-Protease oder Tyr in Papain) und die unterschiedliche Konformation des Segments Thr158-Asp161 (Abbildung 5.34A und B). LeuP2 paßt hier sehr gut, aber jede hydrophobe Seitenkette, die großen Aminosäurereste Phenylalanin oder Tryptophan eingeschlossen,

sollten ausreichend gut binden. Glu213 (anstelle von Phe bei der Ingwer-Protease) befindet sich an der S2-Bindungstasche und könnte, wie in Cathepsin B (Musil *et al.*, 1991), ebenso die Bindung von langen, positiv geladenen oder polaren, nicht jedoch sauren Resten begünstigen.

Der Strukturvergleich der CysEP mit Inhibitor-Komplexen anderer papainartiger Cystein-Proteasen (Drenth *et al.*, 1976; Stubbs *et al.*, 1990) impliziert eine verlängerte Konformation für die P3- und P4-Reste, aber die entsprechenden Subdomänen sind sehr flach und ergeben keine zwingende Spezifität oder exakt definierte Bindungsgeometrie (Abbildung 5.34C). Dies ist in guter Übereinstimmung mit der allgemeinen Beobachtung, daß die Subdomänen jenseits von S2 gewöhnlicherweise kaum zur Spezifität der Cystein-Proteasen beitragen und daß die Substrat- bzw. Inhibitorreste jenseits von P3 bereits in verschiedenen Konformationen binden (Turk *et al.*, 1998).

Die auf die Spaltstelle folgende Subdomäne scheint eindeutiger definiert zu sein. Die Substrathauptkette sollte sich über den von His162 und Trp185 gebildeten Oberflächenbereich fortsetzen, während die P1'-Seitenkette sich von hier aus zur rechten Seite der Substratbindungsfurche ausdehnen sollte, interagierend mit Ala139, Gln145 und Asp161. Die P2'-Seitenkette, die nur noch einen limitierten Beitrag zur Spezifität von Cystein-Proteasen leistet (Turk *et al.*, 1998), sollte zur L-Domäne orientiert sein und teilweise mit Gln20 interagieren, aber hauptsächlich mit dem Gly-Gln22-Cys-Gly-Segment. Da hydrophobe und polare Reste in enger Nachbarschaft die zwei letztgenannten Subdomänen einsäumen, sollte eine Anpassung an unterschiedlichste Seitenketten bei nur leichter Änderung der Bindungsgeometrie möglich sein.

5.4 Die Reinigung und Charakterisierung der Glyoxysomalen Processing Peptidase aus dunkel gewachsenen Kotyledonen von *Citrullus vulgaris*

Die im vorherigen Kapitel behandelte *Ricinus* CysEP wurde zunächst für die Glyoxysomale Processing Peptidase (GPP) gehalten (Gietl *et al.*, 1997), erwies sich jedoch im weiteren als eine in einem anderen Organell, den Ricinosomen, lokalisierte (Schmid *et al.*, 1998) und während des PCD der Pflanze tätige Protease. Sie wurde in der Folge eingehend erforscht (eine Zusammenfassung findet sich bei Gietl und Schmid, 2001) und war auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit (siehe Abschnitte 5.2 und 5.3).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun ein erneuter Anlauf unternommen, die GPP zu reinigen und zu charakterisieren. Für das Projekt wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Arnold vom Laboratorium für Molekulare Biologie am Genzentrum der Ludwig-Maximilian-Universität München spezifische fluorogene Peptide mit den Spaltstellen der glyoxysomalen Matrixproteine gCS, gMDH und Thiolase, sowie ein Kontrollpeptid für den Funktionsnachweis und die Detektion der GPP synthetisiert. Diese Peptide eigneten sich wegen der geringen Fluoreszenz-Ausbeute jedoch nicht für das geplante *Screening* verdünnter Peptidase-haltiger Fraktionen aus dem Reinigungsverlauf, sondern lieferten nur signifikante Signale in angereinigten und konzentrierten GPP-Proben.

Frühere unveröffentlichte Untersuchungen der Arbeitsgruppe Gietl (vorrangig von Dipl. Biol. M. Schmid) in Zusammenarbeit mit Dr. F. Kaloucek von der Yale-University (New Haven, USA) erbrachten in Glyoxysomen vier, die prä-gMDH prozessierende Aktivitäten im 120 mM NaCl Stufeneluat einer DEAE-Anionenaustausch-Säule. Die weitere Differenzierung des DEAE-Eluats erfolgte über Benzamidin-, Heparin- und Phenylbutylamin-Säule. Die Detektion der Aktivitäten erfolgte in den früheren Experimenten über radioaktiv-markierte prä-gMDH als Substrat. Die *in-vitro*-Ansätze wurden über SDS-PAGE analysiert, die Gele getrocknet und die Signale mit Röntgenfilm detektiert.

Mit dem bereits für die Detektion der proteolytischen Aktivität der *Ricinus* CysEP verwendeten fluorogenen Peptid Cbz-FR-AMC, einem Substrat für Plasma-Kallikrein und viele Serin- und Cystein-Peptidasen, ließ sich die proteolytische Aktivität im DEAE-Eluat ebenfalls nachweisen. Die mit diesem Substrat gefundene Aktivität wurde dann über einen Reinigungsgang mit drei weiteren Säulen (Superdex75-Gelfiltration, Hydroxyapatit- und MonoQ-Anionenaustausch-Chromatographie) angereichert (siehe Abschnitt 5.4.1). Der

Aktivitätsverlust im Reinigungsverlauf war allerdings so hoch (siehe Tabelle 5.11), daß dieser Ansatz letztendlich aufgegeben wurde und in Kooperation mit Dipl.Biol. Carsten Lück vom Fachgebiet für Proteomik unter Frau Prof. Dr. A. Görg eine deutlich weniger verlustbehaftete Reinigung über DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie, präparative native Sephadex-IEF (Görg *et al.*, 2003) und 2-D-Elektrophorese etabliert wurde (Abschnitt 5.4.3).

Im Verlaufe der Reinigungsarbeiten stellte sich heraus, daß die von der GPP vollzogene Proteolyse von einem Aktivator abhängt (Abschnitt 5.4.2). Die anfängliche Vorstellung von einer definierten Einzelsubstanz wurde im Zuge der zur Charakterisierung unternommenen Experimente verworfen, da die Peptidase-Aktivität ebenfalls durch eine Reihe gängiger Testproteine gesteigert wurde (Abschnitt 5.4.4.5).

Es ließ sich eine Korrelation von im Fluoreszenz-Aktivitätsgel-Assay gefundener Bande und dem mittels anti-*AtDeg15*-Peptid-Antikörper erhaltenen Signal feststellen (Abschnitt 5.4.3). Der hierfür verwendete anti-*AtDeg15*-Peptid-Antikörper gegen das Peptid mit der Sequenz ETAAVHPGGSGGAV wurde großzügig von Frau Prof. Dr. I. Adamska zur Verfügung gestellt. Für die Bestimmung von Masse und pI-Wert wurde das Antikörpersignal auf 2-D-*Western-Blot* mit einem Spot auf dem 2-D-Gel korreliert (Abschnitt 5.4.3.2). Die Analyse der Reinigungsverläufe durch Gelatine-Aktivitätsgele bei verschiedenen Inkubations-Temperaturen erbrachte wichtige Erkenntnisse. Allerdings waren die am Ende in den Proteinbanden im Sequenzigel angereicherten Mengen an GPP nicht ausreichend für Sequenzinformationen. Die im Anschluß an die Reinigung durchgeführten Sequenziersuche wurden von der Arbeitsgruppe für Proteinforschung unter der Leitung von Prof. Dr. F. Lottspeich am MPI in Martinsried durchgeführt.

Um die GPP/Deg15 zu charakterisieren und einen Vergleich mit anderen Proteasen vorzunehmen, wurde die Spaltspezifität anhand spezifischer Peptide (bereits oben erwähnt, siehe Tabelle 5.12 und 5.13, S.193), die Temperatur- und pH-Abhängigkeit, das Verhalten gegenüber Protease-Inhibitoren und der Einfluß ausgewählter Cofaktoren und Proteine untersucht (Abschnitt 5.4.4).

Eine grobe Zusammenfassung der komplexen experimentellen Vorgehensweise findet sich in Abbildung 5.35.

Flußdiagramm für die Reinigung und Charakterisierung der Glyoxysomalen Processing Peptidase

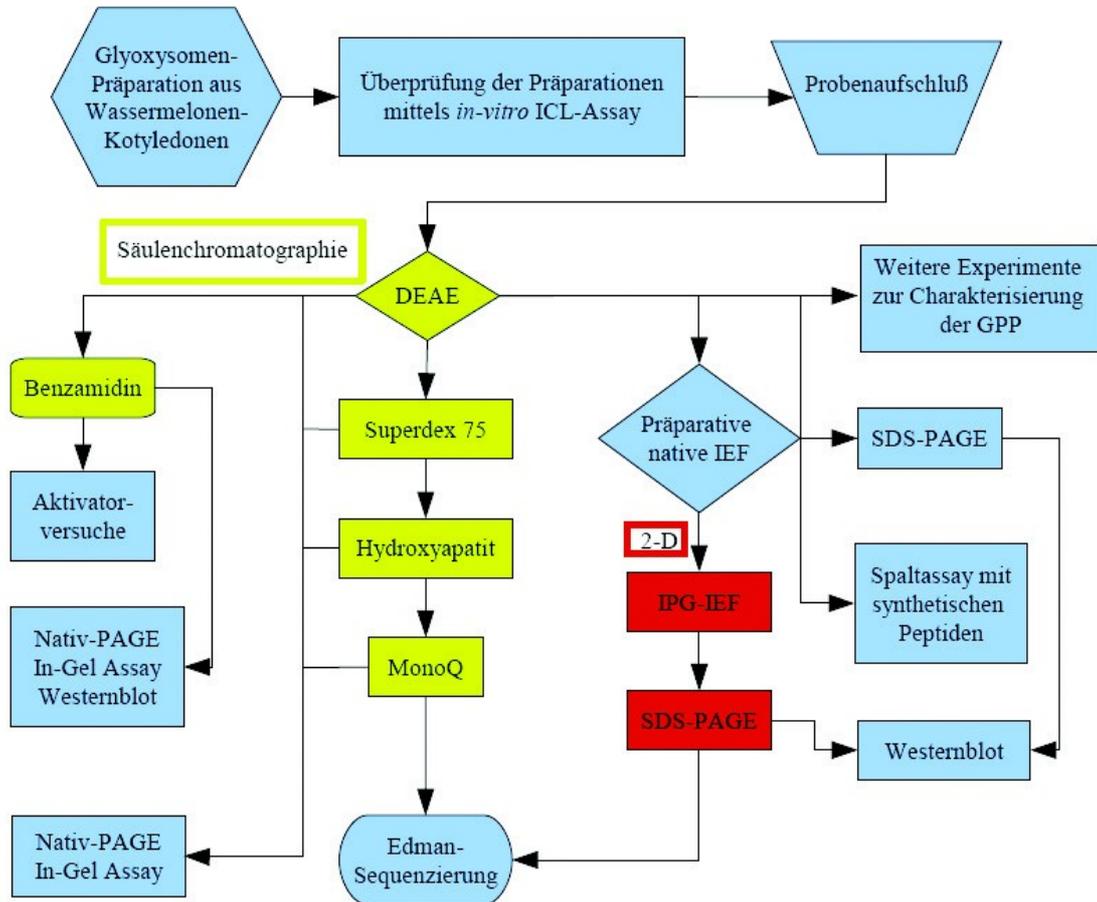


Abbildung 5.35: Überblick der im Rahmen der Reinigung der Glyoxysomalen Processing Peptidase durchgeführten Experimente.

5.4.1 Reinigung der Glyoxysomalen Processing Peptidase über Säulenchromatographie

Glyoxysomen wurden aus Kotyledonen drei Tage alter Wassermelone-Keimlinge isoliert (siehe Abbildung 5.36A). Die Samen wurden in Vermiculit bei 30°C im Dunkeln gekeimt. Das Gewebe wurde in Saccharose-Medium schonend homogenisiert, das Filtrat zur Gewinnung des Organellenpellets einer fraktionierten Zentrifugation unterworfen und die Organellen-Suspension zur Isolierung der Glyoxysomen über Ultrazentrifugation auf diskontinuierliche Saccharose-Dichtegradienten geladen. Die durch Abziehen mit Kanüle erhaltenen reinen Glyoxysomen-Fractionen und die mit Plastiden verunreinigten Fractionen wiesen im Mittel ICL-Werte von 0,14 bzw. 0,20 U/mL auf; die mit Plastiden verunreinigte Fraction enthielt somit etwa 50% mehr Glyoxysomen. Für die weitere Reinigung wurden die Glyoxysomen-Fractionen 10-fach verdünnt, sonifiziert, die Membranen durch Zentrifugation abgetrennt und die Probe vor Beladung der DEAE-Säule sterilfiltriert.



Abbildung 5.36: Keimlinge von *Citrullus vulgaris*. **A:** Wassermelonen-Samen (links) wurden in feuchtem Vermiculit im Dunkeln bei 30°C zur Keimung gebracht. Abgebildet sind 2, 2,5, 3 und 3,5 Tage alte Keimlinge. Glyoxysomen wurden aus den Kotyledonen etwa 3 Tage alter Keimlinge isoliert. **B:** 10 Tage alte Keimlinge. Die Keimblätter sind ergrünt und betreiben Photosynthese.

Die Arbeitsgruppe Gietl in erarbeitete Zusammenarbeit mit Dr. F. Kaloucek von der Yale-University (New Haven, USA), daß sich in Glyoxysomen vier, die prä-gMDH prozessierende Aktivitäten im 80-120 mM-NaCl-Stufeneluat einer DEAE-Anionenaustausch-Säule befinden. Um eine effiziente Vorreinigung der GPP zu erreichen, wurde dieser Befund übernommen und eine DEAE-Säule an den Beginn der Reinigung gestellt.

Im folgenden ist ein repräsentativer Reinigungsgang der GPP für abschließende Edman-Sequenzierung wiedergegeben. Die Elutionsprofile und die Aktivitätsprofile für die vier Säulen DEAE, Gelfiltration, Hydroxyapatit und MonoQ finden sich auf den nächsten Seiten und die wichtigsten Daten des Reinigungsganges sind in Tabelle 5.11 auf S.177 zusammengefaßt.

5.4.1.1 DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie

Von etwa 230 mg Gesamtprotein in den isolierten Glyoxysomen waren nach der Probenaufbereitung bestehend aus 10-facher Verdünnung, Sonifizieren, Abzentrifugieren der Membranen und Sterilfiltrieren noch 190 mg (~83%) vorhanden. Durch die Verdünnung der Glyoxysomen-Präparation wurden die Organellen einerseits zum Platzen gebracht, zum anderen aber auch die Viskosität soweit herabgesetzt, daß sich die Probe mit einem Druck von <0,3 MPa mit 5 mL/min auf die DEAE-Säule laden ließ. Von den 190 mg Protein in der Probe wurden 140 mg (~74%) auf der Säule gebunden, 50 mg (~26%) fanden sich im Durchlauf wieder. Die Hauptaktivität der DEAE-Elution wurde vereinigt, wobei 61 Mio. RFU (97% von 63 Mio. RFU) in 15 mg Protein wiedergefunden wurden, was einem Anreicherungsfaktor von 12,3 entsprach. Der Reinigungsfaktor wurde dadurch verbessert, daß mit einsetzendem Aktivitätspeak der Salzgradient bei 40% Puffer B gehalten wurde, bis die proteolytische Aktivität eluiert war. Damit konnte verhindert werden, daß die Aktivität in den nächsten Protein-Peak hinein verschleppt wurde (Abbildung 5.37A und B).

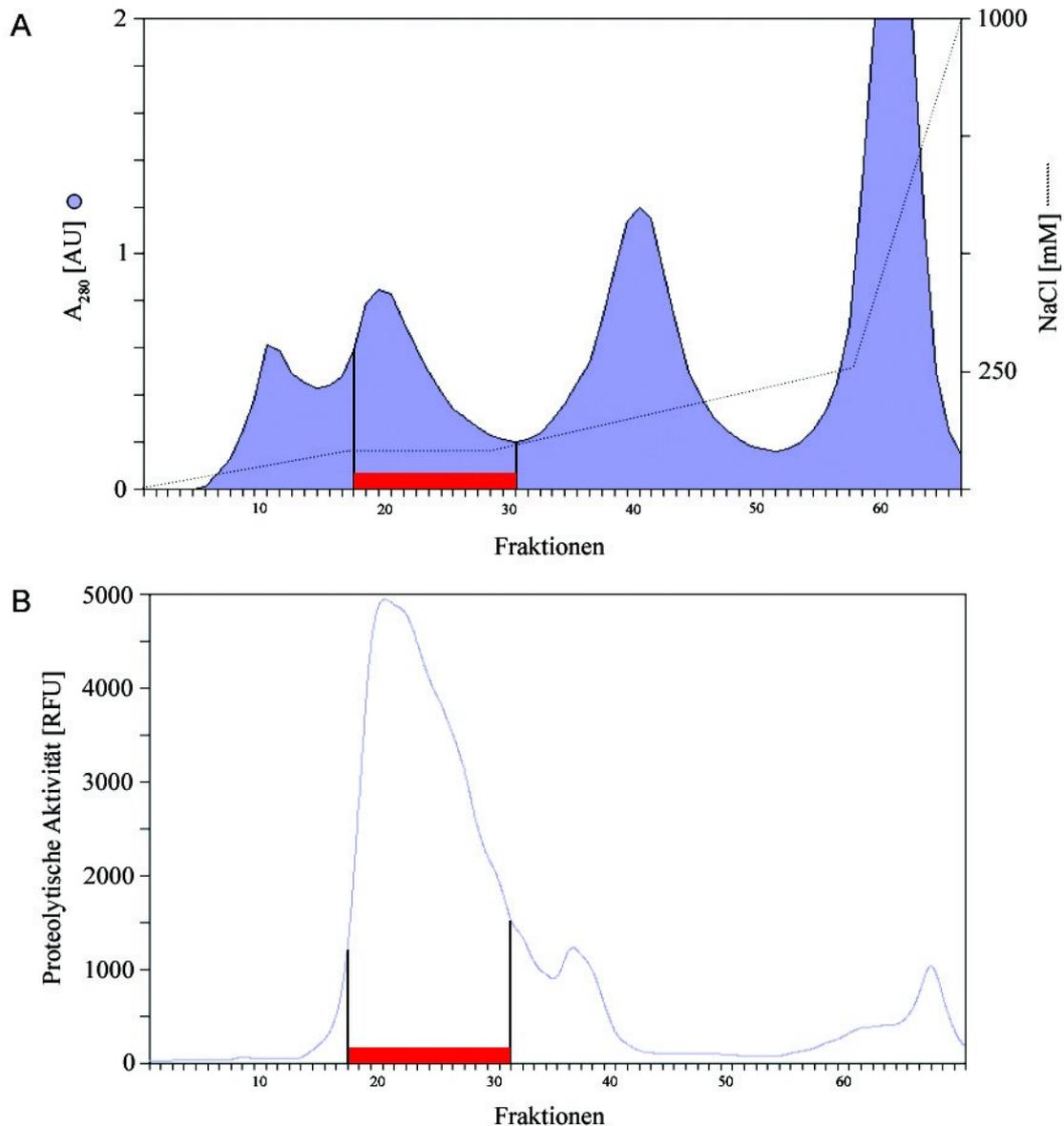


Abbildung 5.37: Reinigung der Glyoxysomalen Processing Peptidase: DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie.

Die Glyoxysomen-Probe wurde auf DEAE-Säule geladen und mit einem zweistufigen linearen Gradienten von (1) 0-250 mM NaCl über 250 mL und (2) 250 mM-1 M NaCl über 50 mL eluiert. Der Gradient wurde bei 80 mM NaCl (Fr. 17) bis zur vollständigen Elution des zweiten Peaks für 12 Fraktionen gehalten. **A:** A_{280} -Profil der Elution (linke Ordinate) und Verlauf des Gradienten (rechte Ordinate). **B:** Aktivitätsprofil der DEAE-Elution. Aliquots der gesammelten Fraktionen wurden auf Protease-Aktivität gegen das fluorogene Peptid Cbz-FR-AMC analysiert. Die vereinigten Fraktionen 18-31 (**rot markierter Bereich**) enthielten 97% der geladenen Aktivität.

5.4.1.2 Gelfiltrations-Chromatographie

Um eine Auftrennung der Proteine nach Molekülgröße zu erreichen, wurde die einkonzentrierte Probe über eine Superdex75-Säule in Proteine des Größenbereichs 3 bis 70 kDa aufgetrennt. Die Proben-Proteine eluierten in drei Hauptpeaks, wobei sich mehr als die Hälfte des Gesamtproteins im dritten und größten Peak mit einer Molekülmasse $< \sim 40$ kDa befand. Der relativ scharfe und symmetrische Aktivitäts-Peak entspricht einer Molekülmasse von ~ 50 kDa. Wie die SDS-PAGE-Analyse in Abbildung 5.41A auf S.178 anschaulich belegt, wurden vom im DEAE-Pool vorhandenen Molekülmassen-Spektrum die kleinen und großen Proteine abgetrennt. Es wurden von 61 Mio. RFU nach der Gelfiltration noch 37 Mio. RFU (61% der geladenen Aktivität) wiedergefunden. Trotz des Aktivitätsverlustes von 39% wurde mit der Gelfiltration noch ein Reinigungsfaktor von ~ 9 erzielt.

Ungewöhnlicherweise zeigte das Gelatine-Aktivitätsgel im Gelfiltrations-Pool eine proteolytische Aktivität bei ~ 100 kDa (GF in Abbildung 5.41B), obwohl Proteine dieses Massenbereichs eigentlich im Ausschlußvolumen laufen und auch auf dem entsprechenden Coomassie-Gel (GF in Abbildung 5.41A) nicht mehr vorhanden waren. Zwei mögliche Erklärungen sind, daß die 100 kDa-Protease eine so langgestreckte Form besitzt, daß sie wie 50 kDa durch die Gelfiltration läuft oder daß die 100 kDa-Protease nach der Gelfiltration neugebildet wurde, also mit einer monomeren Form im Gleichgewicht steht. Für letzteres spricht die Tatsache, daß jeweils Proben mit etwa gleicher Aktivität gegen das fluorogene Substrat (100.000 RFU) auf das Gelatine-Aktivitätsgel geladen wurden und die Verdauungshöfe bei 100 kDa nach den drei Säulen ähnliche Intensitäten haben (DEAE, GF und HAP in Abbildung 5.41B). Das deutet darauf hin, daß die beiden Aktivitäten, die das fluorogene Peptid spaltende und die Gelatinespaltende, korreliert sind. Es muß an dieser Stelle noch angefügt werden, daß im Vorlauf, der die nicht in die Matrix eingewanderten großen Moleküle mit einer Masse > 70 kDa enthält, keine proteolytische Aktivität gegen das fluorogene Peptid nachweisbar war. Das bedeutet aber, daß die 100 kDa-Form über den Assay mit dem fluorogenen Peptid nicht erfaßt und daher verloren wurde.

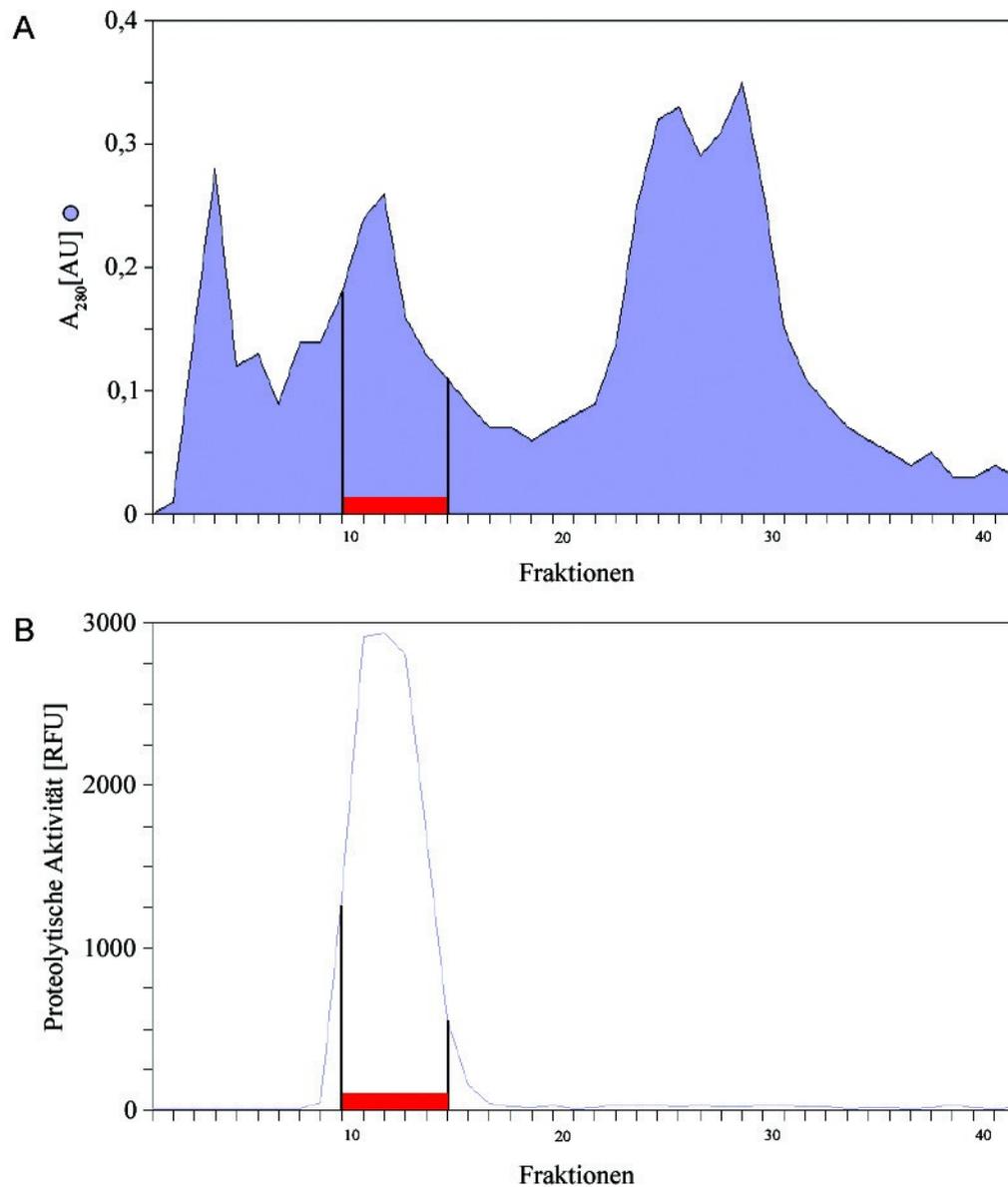


Abbildung 5.38: Reinigung der Glyoxysomalen Processing Peptidase: Gelfiltrations-Chromatographie mit Superdex 75.
 Der DEAE-Pool wurde auf das Injektionsvolumen von 2 mL einkonzentriert. Nach 40 mL Ausschlußvolumen wurde in 80 mL eluiert und Aliquots der gesammelten 2 mL-Fractionen auf proteolytische Aktivität gegen das fluorogene Substrat Cbz-FR-AMC analysiert. **A:** A_{280} -Profil der Gelfiltration. **B:** Aktivitätsprofil der Gelfiltration. Die vereinigten Fraktionen 10-14 (**rot markierter Bereich**) enthielten 61% der Ausgangsaktivität.

5.4.1.3 Hydroxyapatit-Chromatographie

Bei der Hydroxyapatit-Chromatographie erfolgt eine Auftrennung über verschiedene ionische Wechselwirkungen mit den unterschiedlichen Bestandteilen (Ca^{2+} -, Phosphat- und Hydroxid-Ionen) des keramischen Hydroxyapatit. Wie der Vergleich von Elutions- und Aktivitätsprofil in Abbildung 5.39 zeigt, hatte etwa 1/4 des Probenproteins nicht auf der Säule gebunden und befand sich mit der proteolytische Aktivität in Durchlauf und *Wash*, die anderen $\frac{3}{4}$ des Proteins wurden gebunden und im Verlauf des Gradienten eluiert. Während sich die Säule in den Vorversuchen mit ~85% wiedergewonnener Aktivität als brauchbar erwies, wurden im Reinigungsgang für die Sequenzierung nur ~19% (7 von 37 Mio. RFU) wiedergefunden. Dadurch verschlechterten sich Ausbeute (11%) und Anreicherungsfaktor (69,3%) dramatisch (siehe Tabelle 5.11, S.177). Die Nativgel-Analyse zeigt im Hydroxyapatit-Pool (HAP) im Vergleich mit dem Gelfiltrations-Pool (GF) eine deutlich reduzierte Gesamtproteinmenge (Abbildung 5.41A auf S.178, jeweils 100.000 RFU aufgetragene Aktivität in GF und HAP). Auf dem Gelatine-Aktivitätsgel zeigt sich wie schon in DEAE- und Gelfiltrations-Pool eine proteolytische Aktivität bei ~100 kDa (HAP in Abbildung 5.41B). Die über Analyse des HAP-Pools mittels Fluoreszenz-Aktivitätsgel detektierte Bande bei ~50 kDa (HAP, Abbildung 5.41C) ist mit der gereinigten Aktivität identisch. Eine der Gelatinespaltenden Aktivität entsprechende Bande bei 100 kDa war auf dem Fluoreszenz-Aktivitätsgel nicht zu erkennen. Dies bestätigt die bei Analyse der Gelfiltration gemachte Beobachtung, daß sich die 100 kDa-Form mit dem fluorogenen Substrat nicht detektieren läßt. Wenn es sich bei der 100 kDa-Form um das Dimer der bei 50 kDa detektierten Protease handelt, dann besitzt diese, wie das Fluoreszenz-Aktivitätsgel (siehe Abbildung 5.41C) zeigt, offenbar eine andere Substratspezifität als das Monomer.

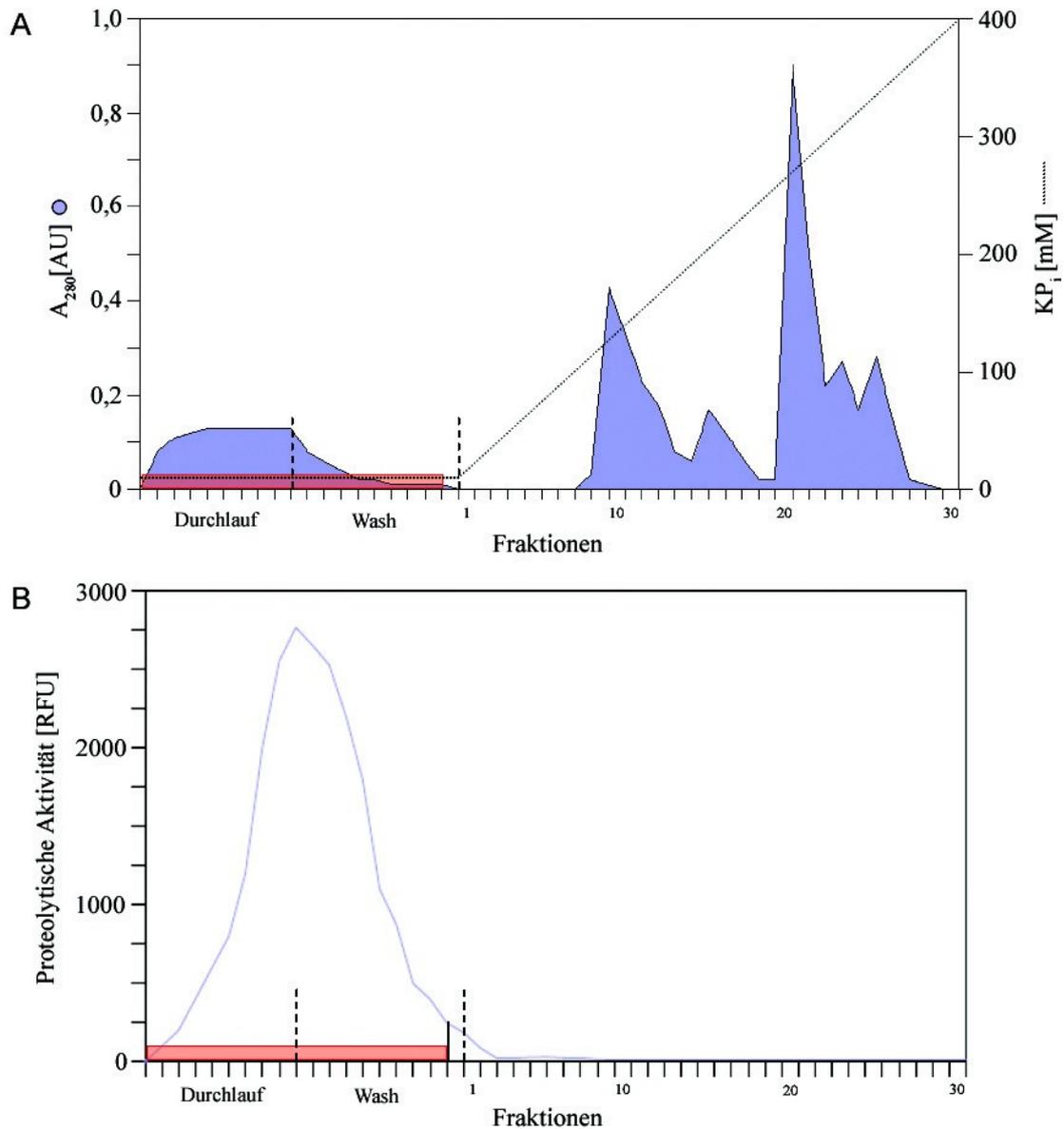


Abbildung 5.39: Reinigung der Glyoxysomalen Processing Peptidase: Hydroxyapatit-Chromatographie.

Der Gelfiltrations-Pool wurde entsalzt und auf den Startpuffer eingestellt. Die Probe wurde auf Hydroxyapatit-Säule geladen, bis zur Basislinie gewaschen und in 50 mL mit einem linearen Gradienten von 10-400 mM KP_i eluiert. Aliquots der Fraktionen wurden auf proteolytische Aktivität gegen das fluorogene Substrat Cbz-FR-AMC analysiert. **A:** A_{280} -Profil der Elution und Gradientenverlauf. **B:** Aktivitätsprofil der Hydroxyapatit-Chromatographie. Durchlauf und Wash (rot markierter Bereich) enthielten 11% der Ausgangsaktivität und wurden vereinigt.

5.4.1.4 MonoQ-Anionenaustausch-Chromatographie

Im Vergleich zu der zu Beginn verwendeten DEAE-Chromatographie, bindet das verwendete quarternäre Ammonium-Ion wegen der höheren Ladungsdichte Anionen etwas stärker. Zusätzlich ist bei der MonoQ-Säule durch Verwendung von 3 µm-Partikeln das Auflösungsvermögen erheblich verbessert. Proteine, die bei der DEAE-Chromatographie in einem Peak eluiert wurden (Abbildung 5.37A), lieferten bei der MonoQ-Elution ein komplexes Elutionsprofil (Abbildung 5.40A). Das entsprechende Aktivitätsprofil zeigt einen scharfen und symmetrischen Peak (Abbildung 5.40B). Nach der MonoQ-Säule wurden 43% (3 von 7 Mio. RFU) der eingesetzten Aktivität wiedergefunden. Die letztendliche Ausbeute über alle vier Säulen betrug 4,8% bei einem Anreicherungsfaktor von 300 (siehe Tabelle 5.11).

Die Analyse der MonoQ-Elution im Gelatine-Aktivitätsgel zeigte Aktivitätsbanden bei ~100 kDa in allen untersuchten Proben, allerdings in Fraktion 14 eine stärkere als in den Fraktionen 15-17 (Fraktionen wurden vereinigt) und 18 (Abbildung 5.40D). Die Gelatine-spaltende Aktivität koeluierte mit der proteolytischen Aktivität gegen das fluorogene Substrat Cbz-FR-AMC, allerdings war der Peak der Gelatine-spaltenden Protease geringfügig verschoben und lag bei Fraktion 14 (vgl. hierzu Abbildung 5.40B und 5.41D). Bei genauem Hinsehen war auf dem die MonoQ-Elution analysierenden Gelatine-Aktivitätsgel zusätzlich ein schwacher Verdauungshof bei ~50 kDa zu erkennen. Unter den Versuchsbedingungen des Gelatine-Aktivitätsgels mit den Proben von DEAE-, Gelfiltrations- und Hydroxyapatit-Pool wurden diese Verdauungshöfe nicht ausgebildet (siehe Abbildung 5.41B). Demzufolge zeigen Monomer und Dimer Gelatine-spaltende Aktivität, aber nur das Monomer proteolytische Aktivität gegen das fluorogene Substrat Cbz-FR-AMC. Die 50 kDa-Gelatine-spaltende Aktivität entspricht der Aktivität gegen das fluorogene Substrat. Abbildung 5.41C zeigt den im 8%-Nativ-Gel aufgetrennten MonoQ-Pool mit den beiden Peptidasen bei ~50 kDa und ~100 kDa, wobei die 100 kDa-Bande auf der Abbildung kaum zu erkennen ist, auf dem Gel jedoch als schwache scharfe Bande vorhanden war. Die auf dem Sequenziergel vorhandenen Proteinbanden mit einer Molekülmasse <30 kDa sind entweder durch das Ankonzentrieren wieder sichtbar geworden oder durch proteolytischen Verdau in der Probe entstanden.

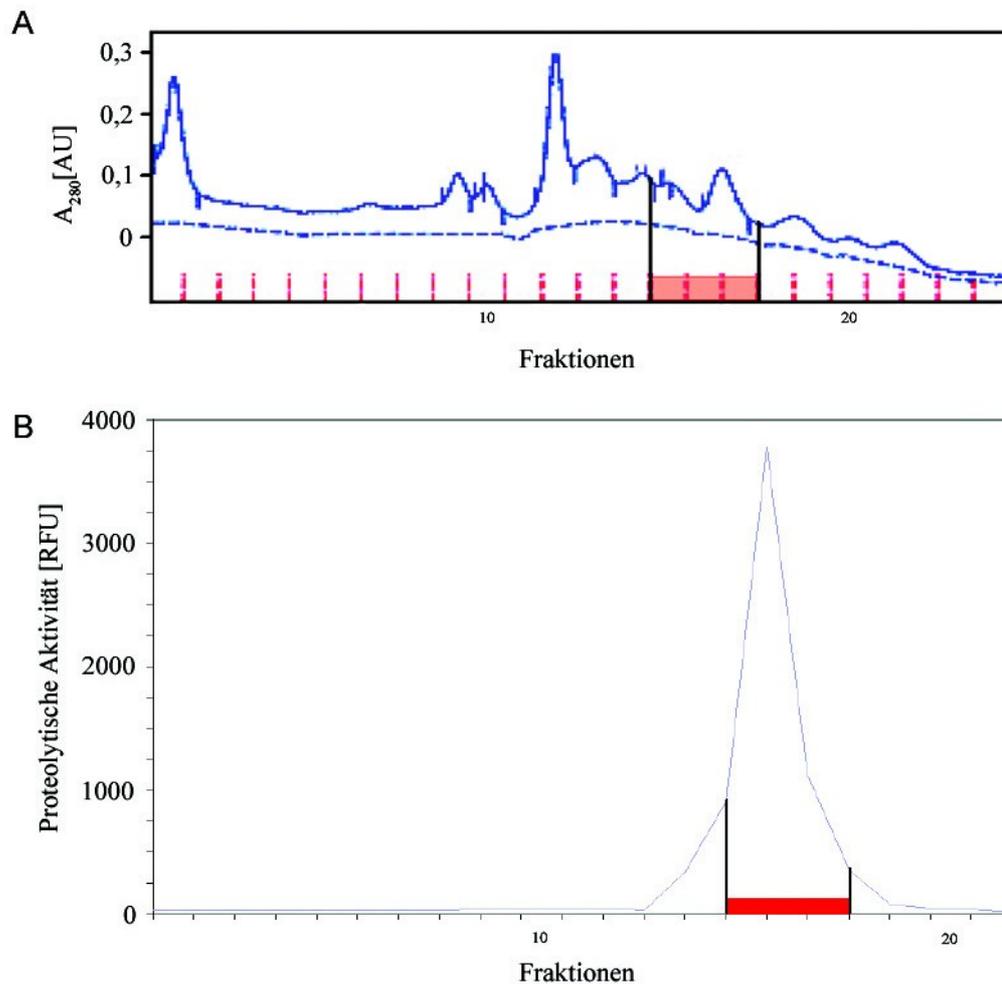


Abbildung 5.40: Reinigung der Glyoxysomalen Processing Peptidase: MonoQ-Anionenaustausch-Chromatographie.

Der Hydroxyapatit-Pool wurde auf den Startpuffer eingestellt und auf das Injektionsvolumen von 2 mL einkonzentriert. Die Probe wurde auf eine MonoQ-Säule geladen und mit einem linearen Gradienten von 20-250 mM NaCl in 25 mL eluiert. Aliquots der 1 mL-Fraktion wurden auf proteolytische Aktivität gegen das fluorogene Substrat Cbz-FR-AMC analysiert. A: A_{280} -Profil der Elution. B: Aktivitätsprofil der MonoQ-Elution. Die vereinigteten Fraktionen 15-17 (rot markierter Bereich) enthielten 4,8% der Ausgangsaktivität.

Für Edman-Sequenzierung wurden die betreffenden Banden ausgeschnitten, jedoch lieferte die eingesetzte Menge keine Sequenz-Informationen.

Die Reinigung über Säulenchromatographie mit den für eine Protein-Reinigung relevanten Parametern „spezifische Aktivität“, „Ausbeute“ und „Anreicherungsfaktor“ ist in Tabelle 5.11 zusammengefasst.

Tabelle 5.11: Bilanzierung der Reinigung der Glyoxysomalen Processing Peptidase über Säulenchromatographie. Der Proteingehalt wurde mit Bradford-Assay und die Protease-Aktivität mittels Fluoreszenz-Assay mit dem fluorogenen Substrat Cbz-FR-AMC bestimmt. Die Ausbeute bezieht sich auf die Gesamtaktivität, der Anreicherungsfaktor auf die spezifische Aktivität.

Reinigungs- schritt	Gesamt- aktivität	Gesamt- protein	Spezifische Aktivität	Ausbeute	Anreicherungs- faktor
Probe	RFU	mg	RFU/mg	%	
nach Sonifizieren	75 Mio.	230	326000		
nach Zentrifugation	63 Mio.	200	315000		
Pellet	10 Mio.	30	333000		
nach Filtration	63 Mio.	190	332000	100	1
DEAE-Durchlauf		50			
DEAE-Pool	61 Mio.	15	4,1 Mio.	97	12,3
Gelfiltrations-Pool	37 Mio.	1	37 Mio.	59	111,5
Hydroxyapatit-Pool	7 Mio.	0,3	23 Mio.	11	69,3
MonoQ-Pool	3 Mio.	0,03	100 Mio.	4,8	301,2

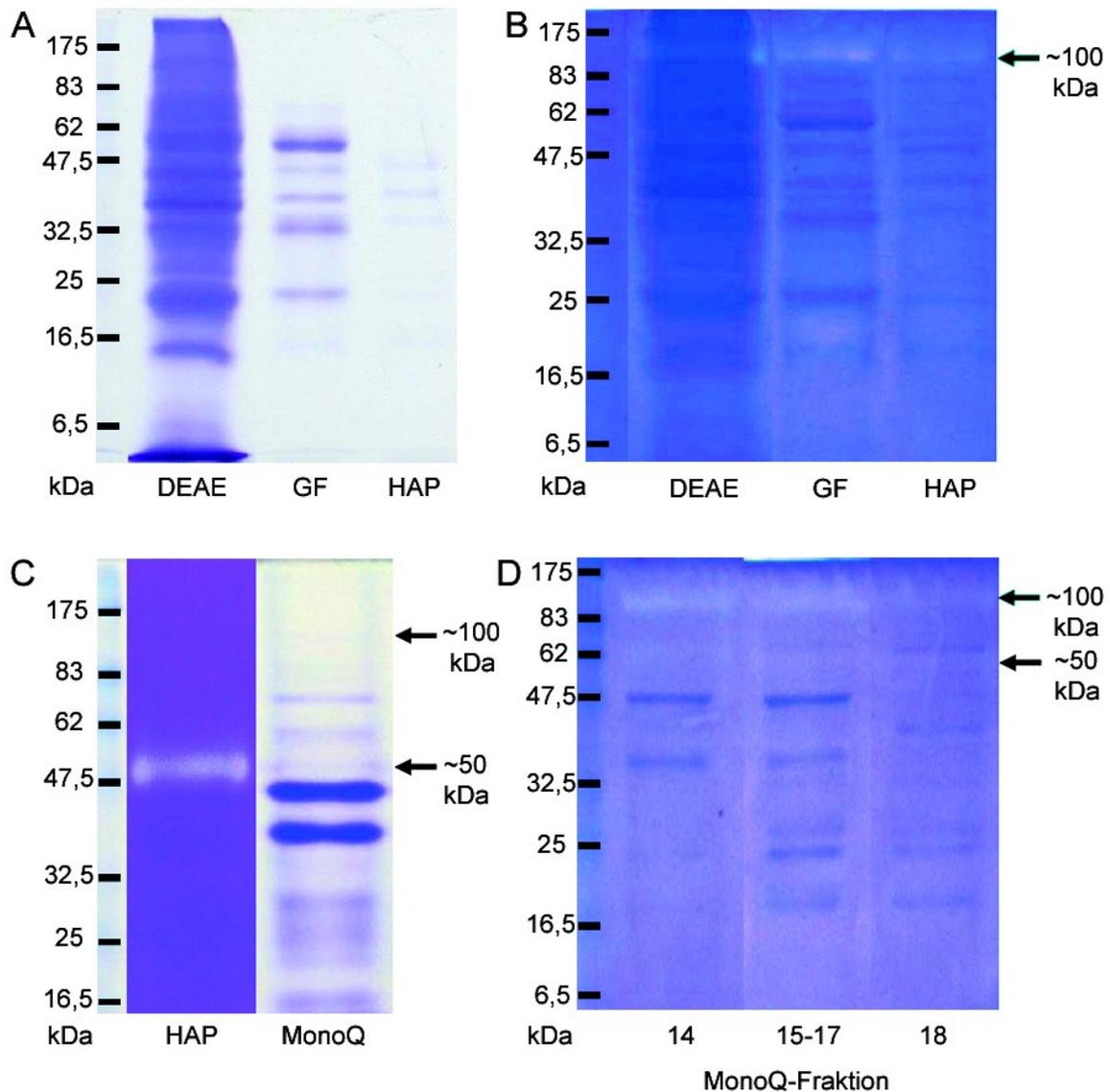


Abbildung 5.41: Reinigung der Glyoxysomalen Processing Peptidase: Nativ-PAGE-Analyse und Lokalisation der proteolytischen Aktivität durch Aktivitätsgel-Assays.

In A, B, C und D wurden 8%-Polyacrylamidgele ohne SDS verwendet; die Gele B und D enthielten zusätzlich 0,05% Gelatine als Protease-Substrat und wurden zur Ausbildung der Verdauungshöfe 24 h bei 30°C inkubiert. A und B: Von DEAE-, Gelfiltrations- (GF) und Hydroxyapatit-Pool (HAP) wurden Proben mit etwa 100.000 RFU geladen. C: Es wurden 630.000 RFU (HAP-Pool) bzw. 2,6 Mio. RFU (MonoQ-Pool) geladen. D: Vom MonoQ-Pool (Fr. 15-17) wurden 400.000 RFU geladen. Die Fr. 14 und 18 wurden einkonzentriert und aufgetragen. A: Die Abnahme der Proteinmengen im Reinigungsverlauf dokumentiert den Anstieg der spezifischen Aktivität. B: Alle 3 Proben zeigen Gelatinespaltende Aktivität bei ~100 kDa. C und D: Die den proteolytischen Aktivitäten entsprechenden Banden bei ~50 bzw. ~100 kDa sind markiert. C: Proteolytische Aktivität gegen das fluorogene Substrat Cbz-FR-AMC im HAP-Pool (HAP) und Nativ-PAGE des MonoQ-Pools für die Edman-Sequenzierung (MonoQ). D: Die MonoQ-Fractionen zeigen Gelatine-spaltende Aktivitäten bei ~50 kDa (schwach) und ~100 kDa (stark). Fraktion 14 der MonoQ-Elution zeigt eine stärkere Gelatine-spaltende Aktivität bei 100 kDa als der MonoQ-Pool (Fr. 15-17) und Fr. 18. Die angegebenen RFU beziehen sich auf die proteolytische Aktivität gegen das fluorogene Substrat Cbz-FR-AMC.

5.4.2 Im Durchlauf der Amicon-Ultrafiltration ist ein Aktivator nachweisbar

Im Rahmen der Experimente mit unterschiedlichen Säulenmaterialien zeigte sich, daß unter Hochsalzbedingungen auf der Benzamidin-Säule dramatische Aktivitätsverluste auftraten. Dieser zunächst unerklärliche Befund, denn Benzamidin-Sepharose gilt als Säulenmatrix mit Affinität zu vielen Serin- und Cystein-Peptidasen, war der Anlaß für weitergehende Untersuchungen.

Zunächst lag es nahe, zu untersuchen, ob der Aktivitätsverlust durch das Abtrennen eines beteiligten unbekanntes Faktors verursacht wurde. Hierzu wurden Glyoxysomen-Präparationen in der beschriebenen Weise aufbereitet (Abschnitt 4.2.2.3) und die Probe anschließend zunächst über DEAE-Säule angereinigt, dann nach dem Vereinigen der Hauptaktivität, Ankonzentrieren und einstellen auf 500 mM NaCl auf die Benzamidin-Affinitätssäule geladen und im Salzgradienten bis 2 M NaCl eluiert (siehe Abbildung 5.42). In den vereinigten Fraktionen der Benzamidin-Elution ließ sich nur noch 10% (238.000 RFU) der auf die Säule geladenen Aktivität (2.370.000 RFU) nachweisen (Abbildung 5.43: Säulen 1 und 2 im Vergleich). Nach Entsalzung der Probe über NAP25-Säule war die Gesamtaktivität jedoch wieder um den Faktor 3,8 erhöht (910.200 RFU), also bei 38% der geladenen Aktivität (Abbildung 5.43, Säule 3). Nach Zugabe des Amicon-Durchlaufs aus der Ankonzentrierung des DEAE-Pools erhöhte sich die Aktivität nochmals um den Faktor 2,3 (2.130.000 RFU), was 90% der Ausgangsaktivität entsprach (Abbildung 5.43, Säule 4a). NaCl in hoher Konzentration hat in diesem Fall offensichtlich zwei Effekte, zum einen hemmt es die Proteolyse, was durch den Anstieg der Aktivität nach Entsalzung gezeigt wurde. Andererseits bewirkt es das Abdissoziieren des Aktivators von der Protease. Es ist allgemein bekannt, daß Salz Protein-Interaktionen verhindert. Dieses Prinzip findet z.B. Anwendung beim Waschen von *Western-Blots* oder beim Einsatz im Gelfiltrationspuffer, um Wechselwirkungen mit der Säulenmatrix zu unterbinden. Da die Probe für Benzamidin-Säule zum Beladen auf einen Salzgehalt von 500 mM eingestellt wurde, könnte unter diesen Bedingungen der Wascheffekt eingetreten und der Aktivator von der Protease weg ins Solvens abdissoziiert sein. Möglicherweise handelt es sich bei dem Aktivator um ein oder mehrere Proteine, die an eine Protein-Interaktions-Domäne der Protease binden und dadurch die Aktivität der Protease steigern oder überhaupt erst ermöglichen. Auch die Zugabe von DEAE- und Benzamidin-Durchlauf zur entsalzten Probe bewirkte

eine Aktivitätserhöhung um den Faktor 1,47 bzw. 1,24 (Abbildung 5.43, Säulen 4b bzw. 4c). Folglich muß sich der Aktivator oder die Aktivatoren auch unter den glyoxysomalen Matrixproteinen des DEAE-Durchlaufs (Tabelle 5.11, ~25% des Gesamtproteins) befinden.

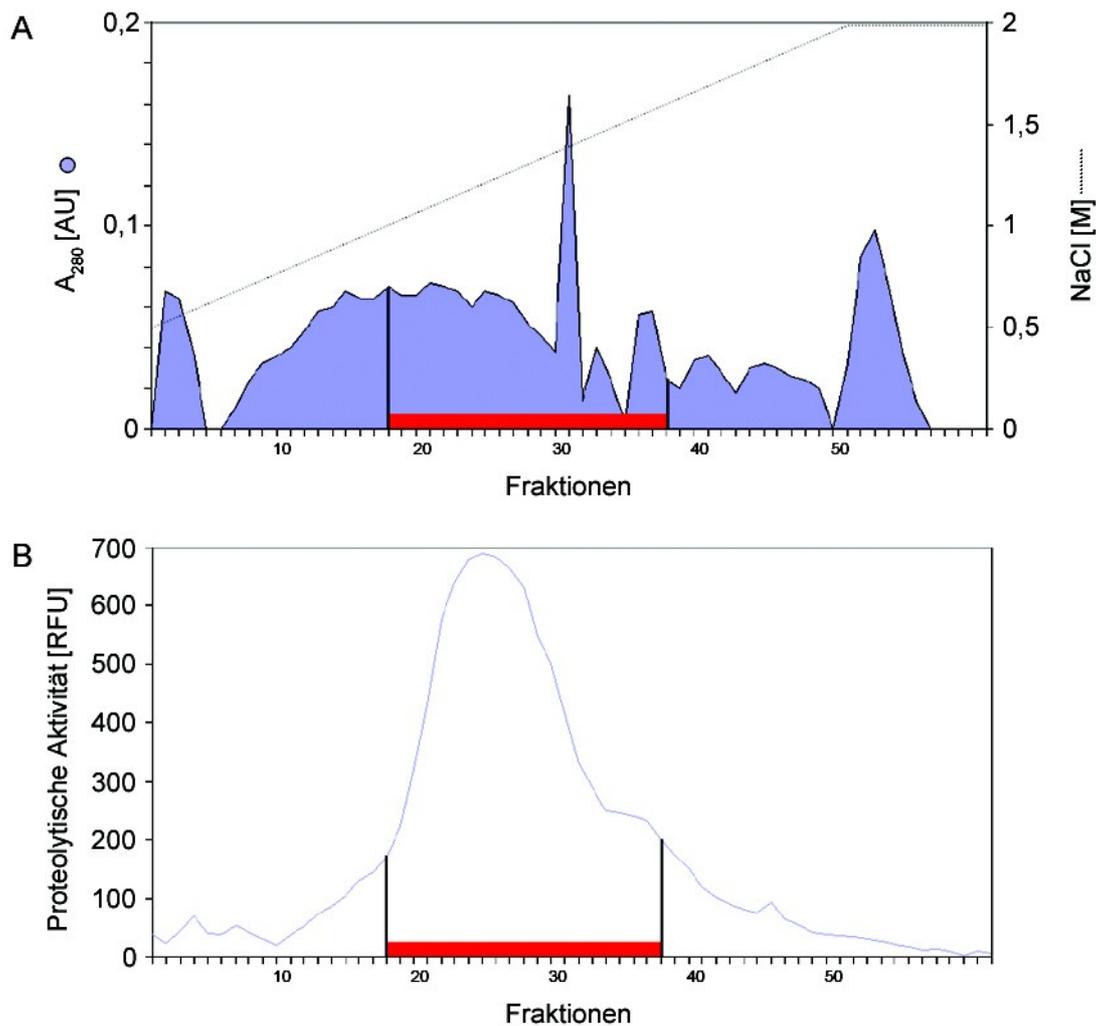


Abbildung 5.42: Reinigung der Glyoxysomalen Processing Peptidase: Benzamidin-Affinitätschromatographie.

Die Glyoxysomen-Probe wurde über DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie gereinigt, die vereinigte Aktivität einkonzentriert, mit Puffer A auf 500 mM NaCl eingestellt, auf die Benzamidinsäule geladen und bis zum Erreichen der Basislinie gewaschen. Die Elution erfolgte im linearen Gradienten von 500 mM–2 M NaCl über 50 mL, die gesammelten 1 mL-Fraktionen wurden auf proteolytische Aktivität gegen das fluorogene Peptid Cbz-FR-AMC analysiert. A: A_{280} -Profil der Elution und Verlauf des NaCl-Gradienten. B: Aktivitätsprofil der Benzamidin-Elution. Die Hauptaktivität (Fr. 18-37) wurde vereinigt (**rot markierter Bereich**).

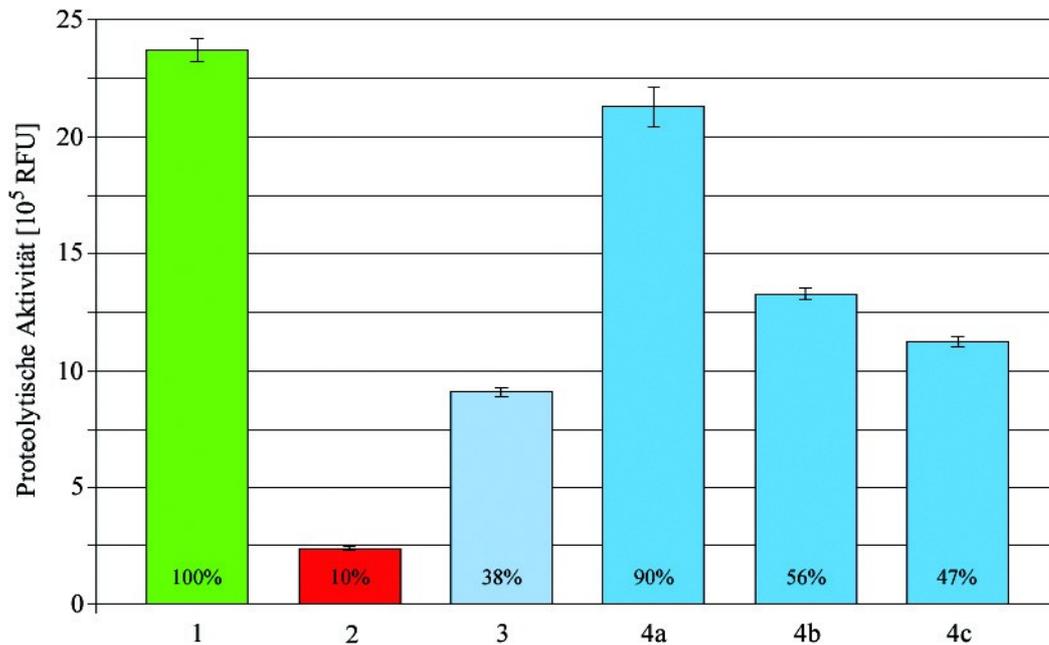


Abbildung 5.43: Wiederherstellung der durch Benzamidin-Säule verlorenen proteolytischen Aktivität durch Entsalzung und Zugabe eines Aktivators.

Die Säulen repräsentieren die Aktivitäten: (1) vor Beladung der Benzamidin-Säule (2.370.000 RFU), (2) nach Benzamidin-Elution (238.000 RFU), (3) nach Entsalzung von (2) (910.200 RFU), (4a) nach Zugabe des Amicon-Durchlaufs der Aufkonzentrierung des DEAE-Pools zu (3) (2.130.000 RFU), (4b) nach Zugabe von DEAE-Ladedurchlauf zu (3) (1.327.375 RFU) und (4c) nach Zugabe von Benzamidin-Ladedurchlauf zu (3) (1.122.375 RFU). Die Meßwerte wurden dreifach bestimmt und die Standardabweichungen eingezeichnet. Die angegebenen RFU beziehen sich auf die proteolytischer Aktivität gegen das fluorogene Substrat Cbz-FR-AMC.

5.4.2.1 Beständigkeit des Aktivators

Um näheren Aufschluß über die Beschaffenheit des Aktivators zu erhalten, wurde der Amicon-Durchlauf (AD) von der Ankonzentrierung des DEAE-Pools unterschiedlichen Behandlungen unterzogen, nämlich (1) in der Speedvac fünffach ankonzentriert, (2) 20min gekocht sowie (3) 2h bei pH 2 hydrolysiert und anschließend als Additiv im *in-vitro*-Protease-Assay mit dem Konzentrat des DEAE-Pools als GPP-haltige Probe getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.44 zusammengefaßt. Die Zugabe von AD steigert die Aktivität der GPP um 31% (Abbildung 5.44, Säulen 1 und 2 im Vergleich). Daß die Zugabe des 5-fach konzentrierten AD die Aktivität der Protease um 49% anhebt (Abbildung 5.44, Säule 3), läßt vermuten, daß die verfügbaren Protein-Interaktionsbereiche durch den unkonzentrierten AD nicht abgesättigt waren. Der Aktivator im AD zeigte sich widerstands-

fähig gegen Erhitzung unter neutralen Bedingungen (10 mM Tris pH 7,4), denn die Aktivität der GPP war etwas geringer als mit unerhitzten AD, wurde aber immer noch um 23% angehoben (Abbildung 5.44, Säule 4). Durch zweistündiges Kochen der mit Phosphorsäure auf pH 2 angesäuerten Probe wurde der Aktivator unwirksam und hydrolysiert. Interessanterweise zeigte sich nach Zugabe des hydrolysierten Ansatzes im Assay ein negativer Effekt auf die proteolytische Aktivität: die Aktivität fiel auf 82% der ursprünglichen Aktivität (Abbildung 5.44, Säule 5). Dieser Befund wurde durch dreimalige Wiederholung des Experiments bestätigt, kann aber nicht erklärt werden.

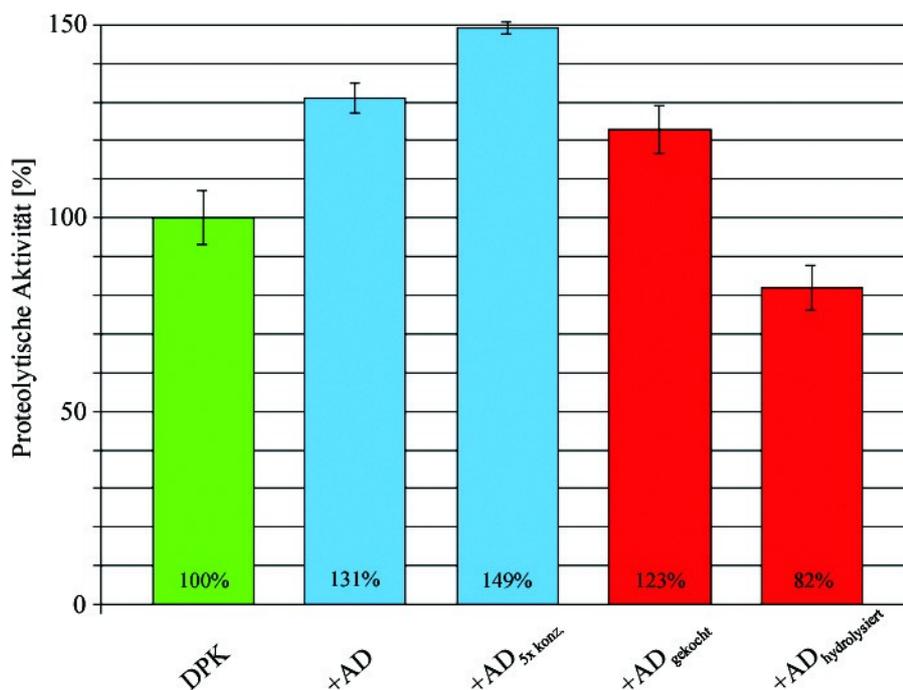


Abbildung 5.44: Beständigkeit des Aktivators der Glyoxysomalen Processing Peptidase.

Der den Aktivator enthaltende Amicon-Durchlauf (AD) von der Ankonzentrierung des DEAE-Pools (DPK) wurde in der Speedvac eingetrocknet, dann mit 1/5 des ursprünglichen Volumens wieder aufgenommen, also 5-fach konzentriert (AD_{5xkonz.}), 20 min bei 95°C erhitzt (AD_{gekocht}) und 2 h in H₃PO₄ im kochenden Wasserbad hydrolysiert (AD_{hydrolysiert}). Anschließend wurden die Ansätze als Additive mit dem Konzentrat des DEAE-Pools (DPK) im *in-vitro* Protease-Assay mit dem fluorogenen Substrat Cbz-FR-AMC getestet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es sich bei dem „Aktivator“ wahrscheinlich um kleine Proteine handelt, da (1) der AD durch Ultrafiltration mit 10 kDa-Membran gewonnen wurde und (2) der Effekt nach Hydrolyse verschwindet. Da der „Aktivator“ stabil

gegen Erhitzung ist, ist es wahrscheinlich, daß es sich beim „Aktivator“ um denaturierte Proteine handelt, die die proteolytische Aktivität der GPP stimulieren. Unter *in-vitro*-Bedingungen können denaturierte Proteine durch Oxidation entstehen.

5.4.2.2 Die Korrelation von Fluoreszenz-Aktivitätsgel-Assay und *Western-Blot* mit anti-*At*Deg15-Peptid-Antikörper identifiziert die Glyoxysomale Processing Peptidase als Deg15-Peptidase

Im *Arabidopsis*-Genom wurden Sequenzen für drei peroxisomale Peptidasen gefunden (Reumann *et al.*, 2004): (1) eine Lon-Protease, (2) eine Zn-Metallopeptidase vom Pitrilysin-Typ und (3) eine Deg-Peptidase. Nachdem eine prozessierende Funktion für höhermolekulare Vorstufen von peroxisomalen Matrix-Proteinen für die Lon-Protease (de Walque *et al.*, 2002) und die Metallopeptidase (Authier *et al.*, 1995) ausgeschlossen werden konnte, kam von den drei zur Disposition stehenden Peptidasen in Peroxisomen nur noch die Deg-Peptidase als Glyoxysomale Processing Peptidase in Frage. Glücklicherweise wurde uns von Prof. Dr. I. Adamska von der Universität Konstanz, die mit ihrer Arbeitsgruppe Deg-Peptidasen in *Arabidopsis* bearbeitet, ein anti-*At*Deg15-Peptid-Antikörper, der gegen das 15 Aminosäuren lange Fragment ETTEAAVHPGGSSGAV aus dem Sequenzbereich um das katalytische Serin gerichtet ist, zur Verfügung gestellt.

Die durch Benzamidin-Elution erhaltene Probe wurde nach Entsalzen und Einkonzentrieren auf ein natives Polyacrylamidgel geladen und über Fluoreszenz-Aktivitätsgel-Assay (Abbildung 5.45, Bahn 2) und nachfolgendem *Western-blot* mit dem anti-*At*Deg15-Peptid-Antikörper analysiert (Abbildung 5.45, Bahn 3). Das Aktivitätsgel zeigt eine fluoreszierende Bande bei ~50 kDa. Eine dem 100 kDa-Dimer (siehe Abschnitt 5.4.1, Abbildung 5.41, S.178) entsprechende Bande konnte auf dem Fluoreszenz-Aktivitätsgel nicht detektiert werden. Die Aktivitätsbande ist identisch mit dem vom anti-*At*Deg15-Peptid-Antikörper erkannten Protein, wodurch belegt wurde, daß es sich bei der GPP um die zur glyoxysomalen Deg15-Peptidase in *Arabidopsis*-Glyoxysomen homologe Deg15-Protease aus Wassermelonen-Glyoxysomen handelt. Ein dem 100 kDa-Dimer entsprechendes Antikörpersignal konnte auf dem *Western-blot* nicht detektiert werden, was jedoch an einer für die Detektion zu geringen Menge gelegen haben könnte (Abbildung 5.41 , Bahn 3).

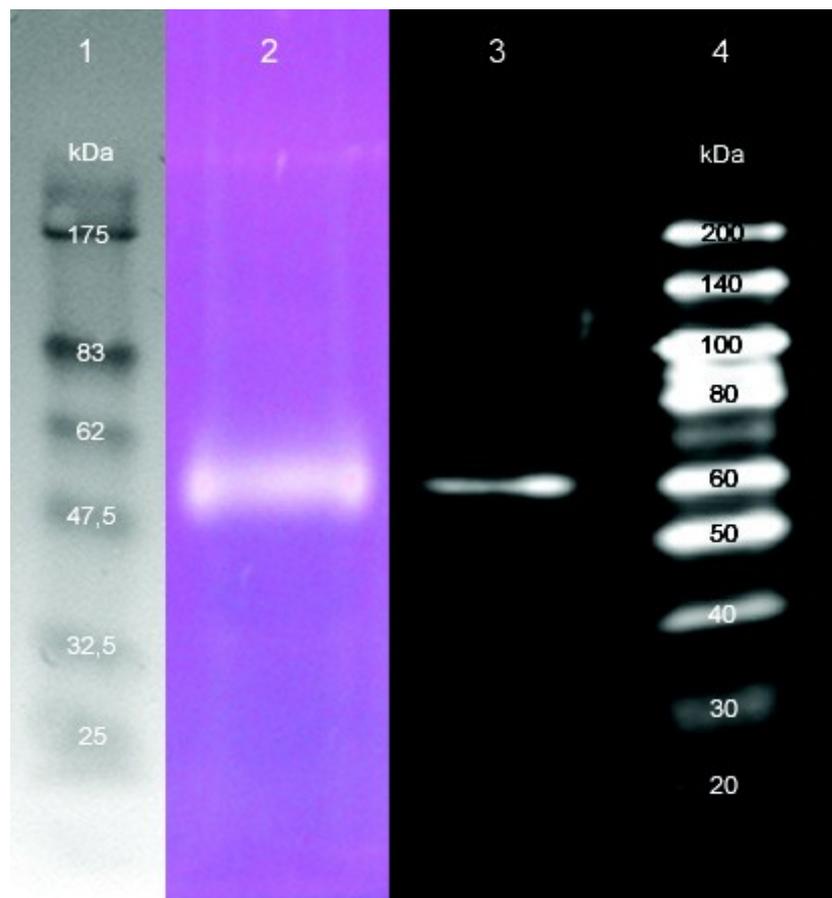


Abbildung 5.45: Reinigung der Glyoxysomalen Processing Peptidase: Aktivitätsgel-Assay mit dem Protease-Substrat Cbz-FR-AMC und *Western-blot*-Analyse mit dem anti-*AtDeg15*-Antikörper. Die Glyoxysomen-Probe wurde über DEAE-Anionenaustausch- und Benzamidin-Affinity-Chromatographie gereinigt, entsalzt und ankonzentriert. Es wurden 360.000 RFU geladen und über native 8%-PAGE aufgetrennt. Die Glyoxysomale Processing Peptidase wurde mittels Aktivitätsgel-Assay mit dem fluorogenen Protease-Substrat Cbz-FR-AMC (2) und nachfolgenden *Western-blot* mit dem anti-*AtDeg15*-Antikörper, anti-*Rabbit*-HRP-Sekundärantikörper und Immunochemolumineszenz detektiert (3). (1): Molekülmassenstandard. (2) und (3): Die im Aktivitätsgel-Assay detektierte proteolytische Aktivität liegt bei 50 kDa (2) und entspricht dem mit dem anti-*AtDeg15*-Peptid-Antikörper detektierten Signal (3). (4): Mit anti-Biotin-HRP-Antikörper detektierter biotinylierter Molekülmassenstandard. Unter gleichen Bedingungen zeigten die beiden verwendeten Protein-Größenstandards (1) und (4) geringfügige Laufunterschiede.

5.4.3 Reinigung der Glyoxysomalen Processing Peptidase über DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie, präparative native Sephadex-IEF und 2-D-PAGE

Aufgrund der hohen Aktivitätsverluste bei der Reinigung der Glyoxysomalen Processing Peptidase über Säulenchromatographie (Abschnitt 5.4.1, siehe Tabelle 5.11) erschien es notwendig, einen alternativen Ansatz zur Reinigung der GPP/Deg15 zu erarbeiten. Der erste Schritt, die Anreicherung über DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie war effizient und wurde beibehalten. Aufgrund der geringen Aktivitätsverluste kann man davon ausgehen, daß 50 kDa- und 100 kDa-Form über die Anionenaustausch-Säule koeluieren und dadurch gleichermaßen gewonnen werden.

In Zusammenarbeit mit Dipl.-Biologe Carsten Lück vom Fachgebiet für Proteomik unter Leitung von Frau Prof. Dr. A. Görg wurde eine Reinigung über präparative native isoelektrische Fokussierung im Sephadex-Flachbett und 2-D-Elektrophorese etabliert. Die von Görg und Mitarbeitern beschriebene präparative Sephadex-Flachbett-Fokussierung unter denaturierenden Bedingungen (Görg *et al.*, 2002) wurde, um die Wiederfindung der Aktivität zu gewährleisten, entsprechend den Erfordernissen modifiziert und ohne Einsatz von Detergenzien durchgeführt. In Vorversuchen zeigte sich, daß in Gegenwart von Detergenzien keine proteolytische Aktivität detektierbar ist. Der Träger aus Plastikfolie und aufgeklebten Isolierstreifen (Görg *et al.*, 2002) lieferte unbefriedigende Fokussierungsergebnisse und wurde durch eine selbstentworfene Trägerkonstruktion ersetzt. Der Träger wurde vom Feinmechanikermeister Josef Reischenbeck aus der Werkstatt des Lehrstuhls für Botanik aus dem solvensbeständigen und elastischen Material Polycarbonat gefräbt (Abbildung 5.46).

Für die präparative native isoelektrische Fokussierung im Sephadex-Flachbett (Sephadex-IEF) wurde die über DEAE-Säule vorgereinigte Probe entsalzt, einkonzentriert und mit der Sephadex-Matrix, den Immobilinen und den farbigen pI-Markern (Šlais und Friedl, 1995; Štastná *et al.*, 2005) vermischt im Flachbett aufgetragen und im elektrischen Feld aufgetrennt. Die Elution der ausgehobenen Fraktionen lieferte einen Aktivitätspeak im pI-Bereich von 4,7 bis 5,2. Weitere Aktivitätspeaks waren im untersuchten pH-Bereich von 3-10 nicht nachweisbar (Abbildung 5.47).

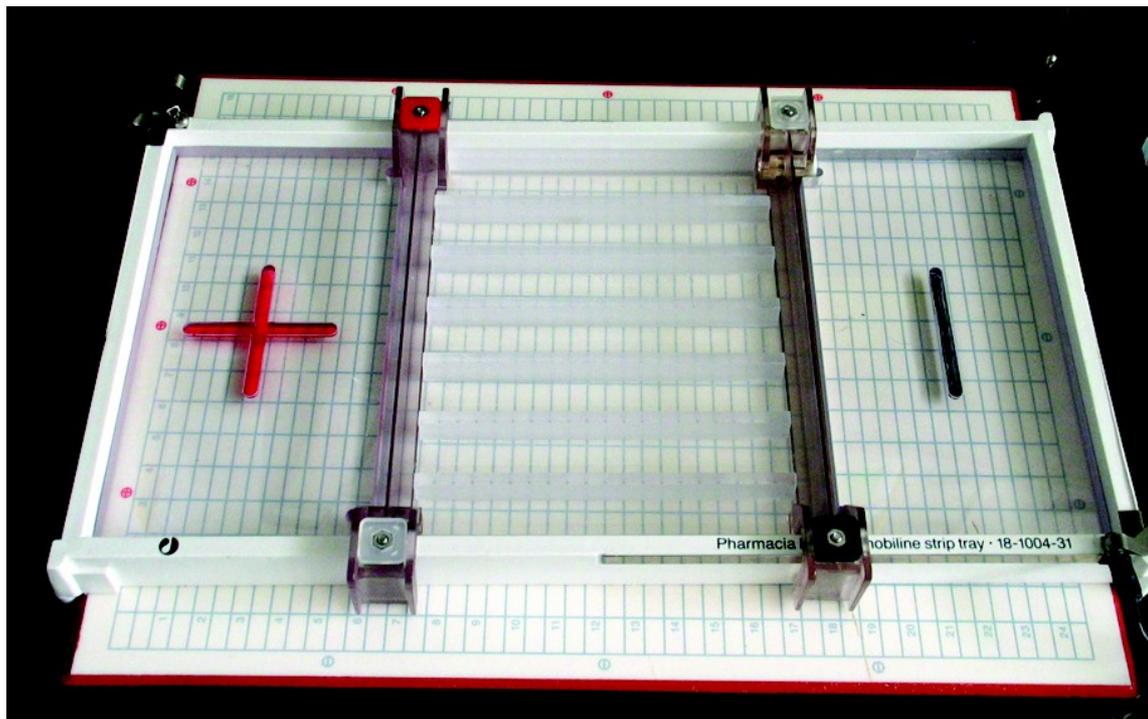


Abbildung 5.46: Apparatur für die präparative native isoelektrische Fokussierung im Sephadex-Flachbett. Abgebildet ist der Träger für fünf Sephadex-Bahnen mit der Aufnahme für Anode und Kathode mit Rahmen auf der temperierbaren Keramik-Platte.

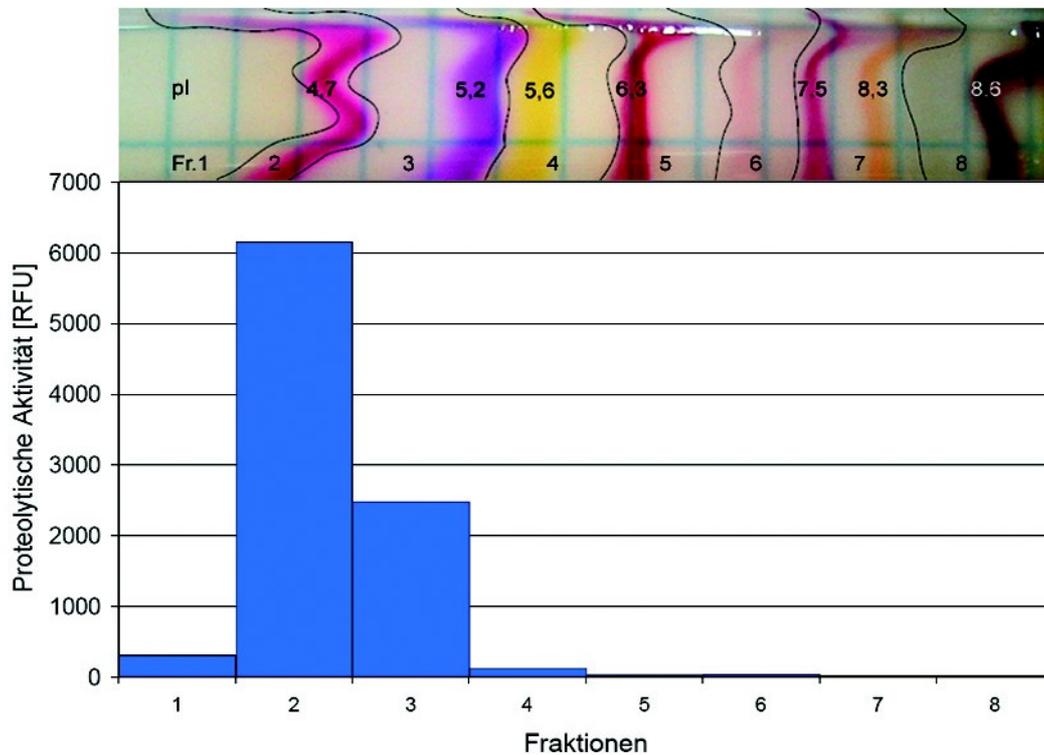


Abbildung 5.47: Reinigung der Glyoxysomalen Processing Peptidase: Bestimmung des pI-Wertes nach präparativer nativer Sephadex-IEF.

Die Glyoxysomen-Probe wurde über DEAE-Säule vorgereinigt und der ankonzentrierte DEAE-Pool mit der Sephadex-Matrix vermischt. Im Anschluß an die Fokussierung wurde das Sephadex-Bett durch Ausheben der eingezeichneten Bereiche fraktioniert. Die Fraktionen wurden eluiert und auf proteolytische Aktivität gegen das fluorogene Substrat Cbz-FR-AMC analysiert. Der pI der Peptidase lag unter nativen Bedingungen zwischen 4,7 und 5,2.

5.4.3.1 Analyse des Reinigungsverlaufs der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15 mittels Gelatine-Aktivitätsgel

Wie schon im Rahmen der Säulenchromatographie wurden zur Dokumentation des Reinigungsverlaufes die wichtigen Reinigungsstufen mittels Gelatine-Aktivitätsgel analysiert. In erster Linie sollte geklärt werden, ob die mit der 50 kDa-GPP/Deg15 koeluiierende Aktivität bei 100 kDa, das vermutliche Dimer der 50 kDa-Peptidase, auch hier nachzuweisen ist. Es wurden Glyoxysomen-Probe, DEAE-Pool und Sephadex-IEF-Eluat untersucht. Im Unterschied zu den Gelatine-Aktivitätsgelen, die im Rahmen der Reinigung über Säulenchromatographie angefertigt wurden (siehe Abbildung 5.41A und B) wurde das Gel in Abbildung 5.48 zur Ausbildung der Verdauungshöfe bei 45°C, dem Temperatur-Optimum der GPP/Deg15-Peptidase (siehe Abschnitt 5.4.4.4), inkubiert.

Während bei den im Rahmen der Säulenchromatographie angefertigten Gelatine-Aktivitätsgelen mit Inkubation bei 30°C der 100 kDa-Verdauungshof deutlich stärker ausgeprägt war als derjenige bei 50 kDa (siehe Abbildung 5.41D), haben sich bei diesem Experiment die Verhältnisse umgekehrt. Die bei 50 kDa detektierte Aktivität ist deutlich stärker als die bei 100 kDa. Hierbei kann es sich um einen durch Unterschiede bei der Präparation bedingten Effekt oder um einen Temperatureffekt handeln. Die Glyoxysomen-Probe und der DEAE-Pool zeigen beide eine starke Verdauungsbande bei 50 kDa und eine schwache bei 100 kDa. Für die zwei folgenden Proben wurde ein Teil des DEAE-Pools mit einer 100 kDa-Ultrafiltrationseinheit in eine Fraktion >100 kDa und in eine Fraktion <100 kDa aufgetrennt. Beide Fraktionen wurden sofort mit dem fluorogenen Substrat Cbz-FR-AMC auf Aktivität kontrolliert und die Aktivität befand sich vollständig in der Fraktion „DEAE <100 kDa“; in der Fraktion „DEAE >100 kDa“ war dagegen im sensitiven Fluoreszenz-Assay keine Aktivität zu messen. Interessanterweise zeigt die Fraktion „DEAE <100 kDa“ auf dem Gelatine-Aktivitätsgel jedoch wieder das gleiche Muster wie die zwei ersten Proben, eine schwache Bande bei 100 kDa und eine deutlich stärkere bei 50 kDa. Das stimmt mit dem Befund aus Abschnitt 5.4.1 (siehe Abbildung 5.41, S.178) überein, daß beide Formen miteinander im Gleichgewicht stehen und daß sich die dimere 100 kDa-Form aus der monomeren 50 kDa-Form nachbildet (Abbildung 5.48, „DEAE <100 kDa“). Untermauert wird das eben beschriebene durch die Fraktion „DEAE >100 kDa“; auch hier taucht die eigentlich über Ultrafiltration abgetrennte 50 kDa-Form wieder auf und ist deutlich stärker ausgeprägt als die 100 kDa-Bande. Letztere war nur sehr schwach und ist auf der Abbildung kaum zu erkennen (Abbildung 5.48, „DEAE >100 kDa“). Im Sephadex-IEF-Eluat sind auch wieder beide Verdauungshöfe bei 50 kDa und 100 kDa mit dem Intensitätsverhältnis wie bei den vorderen drei Proben deutlich zu erkennen (Abbildung 5.48, „Seph“).

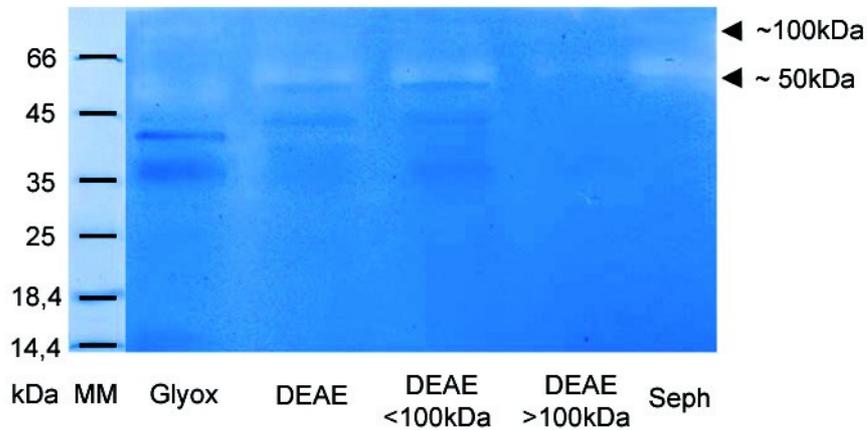


Abbildung 5.48: Reinigung der Glyoxysomalen Processing Peptidase: Lokalisation der proteolytischen Aktivität im Gelatine-Aktivitätsgel.

Glyoxysomen wurden mittels DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie und präparativer nativer Sephadex-IEF gereinigt. Mit einem 8%-Polyacrylamidgel ohne SDS und mit 0,05% einpolymerisierter Gelatine als Protease-Substrat wurden (1) Glyoxysomen (Glyox) (2) DEAE-Pool-Konzentrat (DEAE), mit 100 kDa-Ultrafiltrationseinheit in eine Fraktion (3) <100 kDa und (4) >100 kDa aufgetrenntes DEAE-Pool-Konzentrat und (5) Sephadex-IEF-Eluat (Seph) analysiert. Die in (3) und (4) fraktionierte Probe enthielt die gleiche Aktivität gegen das fluorogene Substrat wie (2). Nach dem Rückfalten der Proteine wurde das Gel 30 h bei 45°C inkubiert und anschließend zum Sichtbarmachen der Verdauungshöfe mit Coomassie gefärbt. Die Positionen der Verdauungshöfe bei 50 kDa und 100 kDa sind markiert.

5.4.3.2 Durch die Korrelation von 2-D-Gel und 2-D-Western-Blot mit anti-*At*Deg15-Peptid-Antikörper konnten Molekülmasse und pI der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15 bestimmt werden.

Durch die Korrelation des GPP-Spots auf dem 2-D-Gel mit einem 2-D-Western-Blot mit anti-*At*Deg15-Peptid-Antikörper sollte die bereits in Abschnitt 5.4.2.2 nachgewiesene Identität von GPP und Deg15 untermauert werden und zusätzlich Molekülmasse und pI unter denaturierenden Bedingungen exakt bestimmt werden. Dies ist vor allem für die spätere Auffindung der Peptidase auf einem zweidimensionalen Sequenziergel notwendig, da durch Kenntnis dieser beiden Parameter die Lage des Spots auf dem 2-D-Gel eindeutig festgelegt ist. Bei der bisher verwendeten eindimensionalen Polyacrylamid-Elektrophorese unter semi-nativen Bedingungen entfalten Proteine nur unvollständig und laufen demzufolge schneller, was eine geringere Molekülmasse zur Folge hat. Der pI der aktiven GPP/Deg15 wurde bereits durch präparative native Sephadex-IEF näherungsweise zu etwa 4,7-5,2 bestimmt (siehe Abbildung 5.47, S.187). Nach vollständiger Entfaltung des Prote-

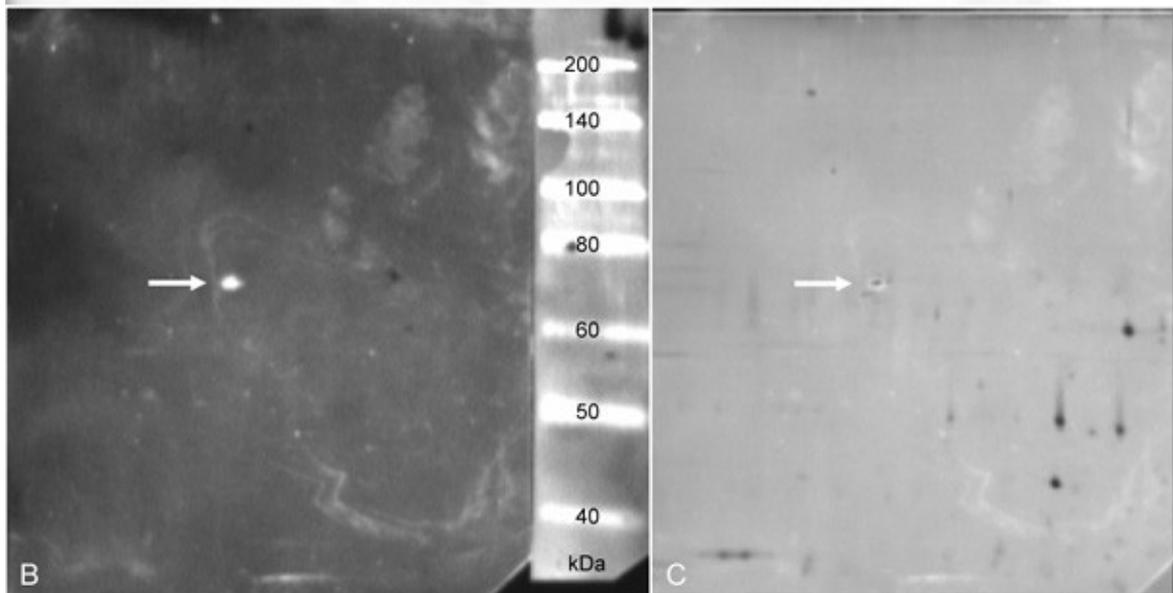
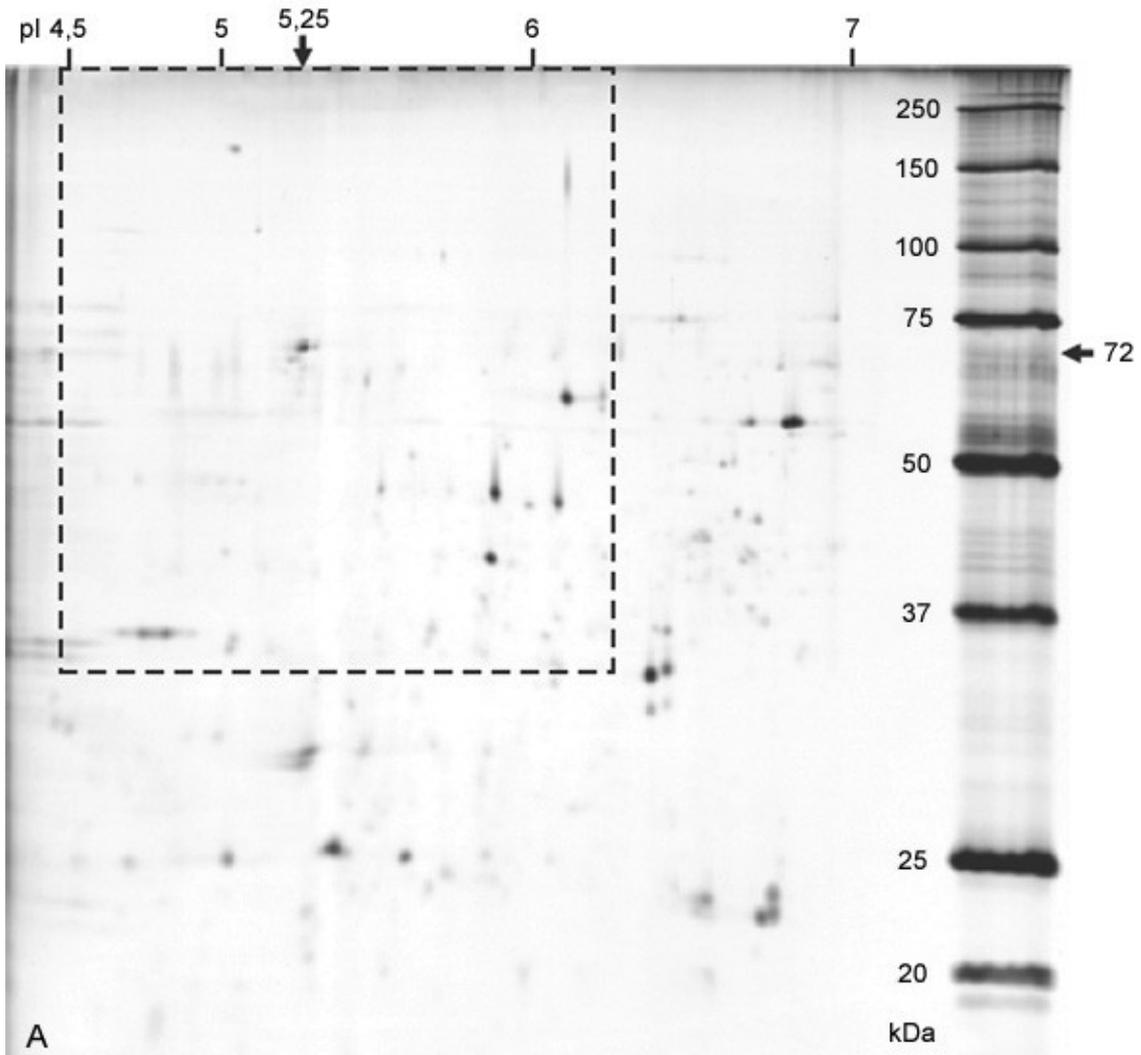
ins werden allerdings alle Ladungen exponiert, was in der Regel zu einem pI-Shift führt.

Die durch präparative native Sephadex-IEF gewonnene Probe wurde einkonzentriert, mit Detergens vermischt, in zwei Aliquots aufgeteilt und die Proteine jeweils über isoelektrische Fokussierung im immobilisierten pH-Gradienten 4-7 (IPG-IEF) nach pI aufgetrennt. Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach Molekülmasse wurden die IPG-Streifen auf 13%-SDS-Polyacrylamidgele montiert. Ein Gel wurde mit Silbernitrat gefärbt (Abbildung 5.49A), vom anderen der pH-Bereich 4,5–6,25 ausgeschnitten (eingerahmter Bereich in Abbildung 5.49A) und über 2-D-*Western-Blot* mit dem anti-*AtDeg15*-Peptid-Antikörper analysiert (Abbildung 5.49B). Die 2-D-*Western-Blot*-Analyse lieferte im untersuchten Bereich nur ein Signal. Durch Überlagerung von 2-D-Gel und 2-D-*Western-Blot* (Abbildung 5.49C) konnte der detektierten Deg15 eindeutig der entsprechende Spot auf dem Silbergel zugeordnet werden. In der näheren Umgebung befanden sich keine weiteren Spots mit vergleichbarer Form und Intensität. Die Deg15 aus Wassermelonen-Glyoxysomen besitzt somit einen pI von 5,25 und unter reduzierenden Bedingungen eine tatsächliche Molekülmasse von ~72 kDa. Die gefundene Molekülmasse entspricht in etwa dem für die glyoxysomale Deg15-Peptidase in *Arabidopsis* (At1g28320) anhand der Aminosäure-Sequenz errechneten Wert von 76 kDa (Reumann *et al.*, 2004). Daß die Deg15 auf den nativen Gelen mit ~50 kDa lief (siehe Abbildung 5.41C und 5.45), hatte seine Ursache in der unvollständigen Entfaltung der nicht aufgekochten Probe.

Nächste Seite:

Abbildung 5.49: Reinigung der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15: 2-D-PAGE- und 2-D-*Western-blot*-Analyse mit dem anti-*AtDeg15*-Peptid-Antikörper.

Die Glyoxysomen-Probe wurde über DEAE-Säule angereinigt, der DEAE-Pool konzentriert und über präparative native Sephadex-IEF (Görg *et al.*, 2002) und 2-D mit IPG-IEF pH 4-7 und 13%-SDS-PAGE gereinigt. Der 2-D-*Western-blot* erfolgte mit anti-*AtDeg15*-Peptid-Antikörper, anti-*Rabbit*-HRP-Sekundärantikörper und Immunochemoluminiszenz. A: 2-D-PAGE und Silberfärbung. B: 2-D-*Western-blot*-Analyse des in (A) markierten Bereichs von pH 4,5 bis 6,25. C: Überlagerung von (A) und (B): Identifizierung des Deg15-Spots durch Korrelation von 2-D-PAGE und 2-D-*Western-Blot* (erstellt mit Photoshop 7.0). Das Signal in (B) und (C) ist jeweils durch einen Pfeil hervorgehoben. Der der GPP/Deg15 zuzuordnende Spot entspricht einer Masse von ~72 kDa und einem pI von 5,25.



Als Zusammenfassung der beiden dargestellten Reinigungskonzepte kann festgestellt werden, daß die identischen 50 kDa-Banden auf dem Nativ- und Fluoreszenz-Aktivitätsgel der 72 kDa-GPP/Deg15 entsprechen. Dies konnte (1) durch Vergleich von MonoQ-Elution und Fluoreszenz-Aktivitätsgel (Abbildung 5.41C), sowie Fluoreszenz-Aktivitätsgel und *Western-Blot*-Analyse mit dem anti-*At*Deg15-Peptid-Antikörper (Abbildung 5.45) und (2) durch Überlagerung von 2-D-*Western-blot* mit dem anti-*At*Deg15-Peptid-Antikörper und 2-D-Gel (Abbildung 5.49) gezeigt werden. Durch die Fraktionierung der GPP-haltigen Probe mittels Ultrafiltration konnte belegt werden, daß die 50 kDa-Form mit der 100 kDa-Form im Gleichgewicht steht (Abbildung 5.48); bei den beiden Formen handelt es sich um Monomer und Dimer desselben Proteins, der GPP/Deg15. Da die tatsächliche Molekülmasse unter reduzierenden Bedingungen auf dem 2-D-Gel auf etwa 72 kDa bestimmt wurde (Abbildung 5.49), resultiert daraus für das Dimer eine tatsächliche Masse von 144 kDa. Da das Dimer der GPP/Deg15 mit dem fluorogenen Substrat Cbz-FR-AMC nicht detektiert werden konnte, ist eine unterschiedliche Substratspezifität der beiden Formen wahrscheinlich.

5.4.4 Charakterisierung der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15

5.4.4.1 Die Untersuchung der Spaltspezifität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15 mit synthetischen Peptiden erbrachte eine Spezifität für Substrate mit Cys an P1 oder P2

Peptidasen zeigen oft eine charakteristische Spezifität hinsichtlich der von ihnen verdauten Substrate. Die bekannten glyoxysomalen Matrixproteine mit einem PTS2 im abzuspaltenden N-terminalen Propeptid besitzen ein Cystein an P1 und P2 relativ zur Spaltstelle (siehe Tabelle 3.1, S.41). Um den Funktionsnachweis für die Spaltspezifität der gereinigten GPP/Deg15 zu erbringen, wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Arnold vom Laboratorium für Molekulare Biologie am Genzentrum der LMU fluorogene Peptide synthetisiert, die vorhergesagte Spaltstellen von bekannten, glyoxysomal prozessierten Proteinen enthalten. Ausgewählt wurden hierfür die drei folgenden Enzyme: Glyoxysomale Citrat-Synthase, Glyoxysomale Malatdehydrogenase und Thiolase. In Anlehnung an die von Nishimura und Mitarbeitern bei der höhermolekularen Vorstufe der glyoxysomalen Citrat-Synthase aus *Cucurbita* gemachten Beobachtung, daß ein Cystein in Nachbarschaft zur Spaltstelle

für die Prozessierung essentiell ist (Kato *et al.*, 1996), wurde ein Kontrollpeptid ähnlich der Thiolase synthetisiert, bei dem das Cys an P1 durch Glycin ersetzt wurde (T-C/G; siehe Tabelle 5.12). Für die Untersuchung der Spaltspezifität wurde die Probe über DEAE-Säule und Sephadex-IEF gereinigt und mittels 5 kDa-Ultrafiltration von Peptiden befreit. Für den *in-vitro*-Assay wurden die synthetischen Peptide mit der GPP/Deg15-haltigen Probe inkubiert.

Tabelle 5.12: Fluorogene Peptide für den Funktionsnachweis der GPP/Deg15.
Die drei peroxisomalen Enzyme werden cytosolisch mit N-terminalem Propeptid synthetisiert und in den Glyoxysomen zu den reifen Enzymen prozessiert. Die Peptide decken den Bereich um die vorhergesagte Spaltstelle ab (↓) und enthalten den *in-vivo* gefundenen N-Terminus des reifen Proteins.

fluorogenes Peptid	Sequenz	M _r [Da]
gCS-Peptid	Abz-EAHCV↓SAQTM-(NO ₂)Y-D	1518,6
gMDH-Peptid	Abz-RANCR↓AKGGA-(NO ₂)Y-D	1445,5
T-Peptid	Abz-SASVC↓AAGDS-(NO ₂)Y-D	1309,3
T-C/G-Peptid (neg. Kontr.)	Abz-SASVG↓AAGDS-(NO ₂)Y-D	1263,2

Tabelle 5.13: Spaltung von synthetischen Peptiden mit vorhergesagten Spaltstellen von glyoxysomal prozessierten Proteinen durch die GPP/Deg15.

Im 200 µL-Ansatz wurde jeweils 10 nmol Peptid mit GPP/Deg15-haltiger Probe (67.000 RFU) 3 h bei 24°C inkubiert. Die authentische Spaltstelle ist mit einem schwarzen Pfeil (↓) markiert. Durch Edman-Sequenzierung der Spaltprodukte wurden die im Assay generierten Peptide analysiert und die ermittelten Spaltstellen im Peptid durch rote Doppelstriche (||) markiert. Die negative Kontrolle T-C/G-Peptid wurde nicht gespalten. In allen Ansätzen wurde das Peptid EgHAFEEXdn (X) gefunden. In Kontrollansätzen ohne Enzym waren keine Spaltprodukte nachweisbar. gCS, glyoxysomale Citrat-Synthase; gMDH, glyoxysomale Malatdehydrogenase; T, Thiolase; T-C/G, Kontrollpeptid für Thiolase; Abz = Amino-Benzoyl, Donor-Gruppe; Y* = Nitro-Tyrosin, Akzeptor-Gruppe.

Peptid	Sequenz	Spaltprodukte
gCS	Abz-EAHCV↓SAQ TMY*D	Abz-EAH... + TMY*D + X
gMDH	Abz-R ANCR↓ AK G GAY*D	Abz-RANCR + ANCR + AKG + GGAY*D + GAY*D + X
T	Abz-SASVC↓ AA GDSY*D	Abz-SASV. + AAGDS + GDSY*D + X
T-C/G	Abz-SASVGAAGDSY*D	X
Furin-Substrat	Abz-RVKR GLAY*D	GLAY*D + X

Die Analyse der Spaltprodukte erfolgte durch Edman-Sequenzierung und nachfolgende Massenspektroskopie. Das gCS-Peptid wurde in Nachbarschaft zum Cys gespalten, jedoch nicht an der authentischen Spaltstelle mit Cys an P2, sondern zwischen Gln (P1) und Thr (P1'). Dieses Spaltungsmuster könnte auf die *in-vitro*-Bedingungen zurückzuführen sein. Das gMDH-Peptid wurde an vier Positionen gespalten, darunter auch an der vorhergesagten Stelle hinter Arg (P1) und Cys (P2). Ein weiteres Spaltprodukt wies ebenfalls Arg an P1 auf, besaß jedoch an P2 kein Cys, sondern die Abz-Gruppe. Die anderen zwei Spaltstellen lagen zwischen dem ebenfalls basischen Rest Lys (P1) und Gly (P1') bzw. Gly (P1) und Gly (P1'). Das Thiolase-Peptid wurde an zwei Positionen gespalten, darunter auch an der vorhergesagten Position hinter Cys (P1) und Val (P2). Die andere Spaltstelle liegt hinter zwei Ala (P1 und P2). Das gT-C/G-Kontrollpeptid wurde nicht gespalten, bemerkenswerterweise auch nicht hinter Ala. Das Peptid Abz-RVKRGLAY*D, ein Substrat für die Proprotein-Convertase Furin, die die Spaltspezifität (R/K)-X_n-(R/K) (mit n = 0; 2) besitzt, wurde hinter Arg (P1) und Lys (P2) gespalten.

Die GPP/Deg15 zeigte auch die für Trypsin-artige Serin-Peptidasen beschriebene Spaltspezifität mit Arg an P1 (Barrett *et al.*, 2004). Im Zusammenhang mit den nicht-authentischen Spaltungen ist zu beachten, daß es sich bei der GPP/Deg15-Probe um ein Gemisch von Monomer und Dimer handelt, wobei beide Formen wahrscheinlich unterschiedliche Substratspezifität besitzen. Da nur das Monomer mit dem fluorogenen Substrat Cbz-FR-AMC detektierbar ist, könnten die nicht-authentischen Spaltungen auf das Monomer, die authentischen Spaltungen in Nachbarschaft zum Cys dagegen auf das Dimer zurückzuführen sein. Des Weiteren muß in Erwägung gezogen werden, daß neben der Peptidsequenz fünf Reste N- und C-terminal von der Spaltstelle weiter entfernt gelegene Bereiche eines Substrates Einfluß auf die Prozessierung haben.

5.4.4.2 Das pH-Optimum der proteolytischen Aktivität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15 liegt im basischen Bereich

Die pH-Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität erlaubt möglicherweise Rückschlüsse auf das natürliche Milieu einer Protease. So ist für Proteasen in lysosomalen Kompartimenten, wie z.B. die im Rahmen dieser Arbeit bearbeitete *Ricinus* CysEP in Ricinosomen oder die Cathepsine in Säuger-Lysosomen, ein pH-Optimum im sauren Bereich typisch (Barrett *et al.*, 2004), wohingegen cytosolische Proteasen ihr pH-Optimum in der Regel im neutra-

len pH-Bereich haben. Über das Milieu in den Glyoxysomen liegen keine eindeutigen Befunde vor. Was das glyoxysomale/peroxisomale Milieu vom Cytoplasma deutlich unterscheidet, ist die potentielle oxidative Belastung durch H_2O_2 und andere reaktive Sauerstoffspezies, die im Normalfall allerdings schnell durch Enzyme wie Katalase und Superoxid-Dismutase entgiftet werden.

Die pH-Abhängigkeit der GPP/Deg15 im konzentrierten DEAE-Pool wurde mit drei unterschiedlichen Puffern im pH-Bereich von 4,5 bis 9,0 untersucht, nämlich mit Acetat-Puffer von pH 4,5 bis 5,5, MES-Puffer von pH 5,5 bis 6,5 und Tris-Puffer von pH 7,0 bis 9,0. Im diesem Bereich zeigt die Aktivität einen linearen Verlauf mit niedriger Aktivität im sauren Bereich und hoher Aktivität im basischen Bereich. Die mit den drei verschiedenen Puffern ermittelten Aktivitäten liegen auf einer Geraden, sodaß man davon ausgehen kann, daß keine Puffer-Effekte vorliegen (Abbildung 5.50). Um den intrinsischen Zerfall des Substrates im untersuchten pH-Bereich zu ermitteln, wurde als Kontrolle bei jedem gemessenen pH-Wert der Blindwert mit 90 μ L Substrat im Puffer mit 10 μ L DEAE-Puffer A bestimmt und vom erhaltenen Bruttowert subtrahiert. Allerdings war die intrinsische Fluoreszenz über den Bereich pH 4,5 bis 9 gleichbleibend niedrig (Daten nicht gezeigt).

Bei Verwendung von Phosphat-Puffer zeigt die pH-Abhängigkeit der GPP/Deg15 einen leicht sigmoiden Verlauf mit niedriger Aktivität im sauren Bereich, einem nahezu linearen Anstieg von pH 5,5 bis pH 7,5 und einem Plateau-artigen Optimum von pH 8 bis pH 9. Die beiden Meßreihen mit DEAE-Pool und Sephadex-IEF-Eluat zeigen den gleichen Kurvenverlauf, was ein Indiz dafür ist, daß über den Assay nur eine Peptidase erfaßt wird (Abbildung 5.51).

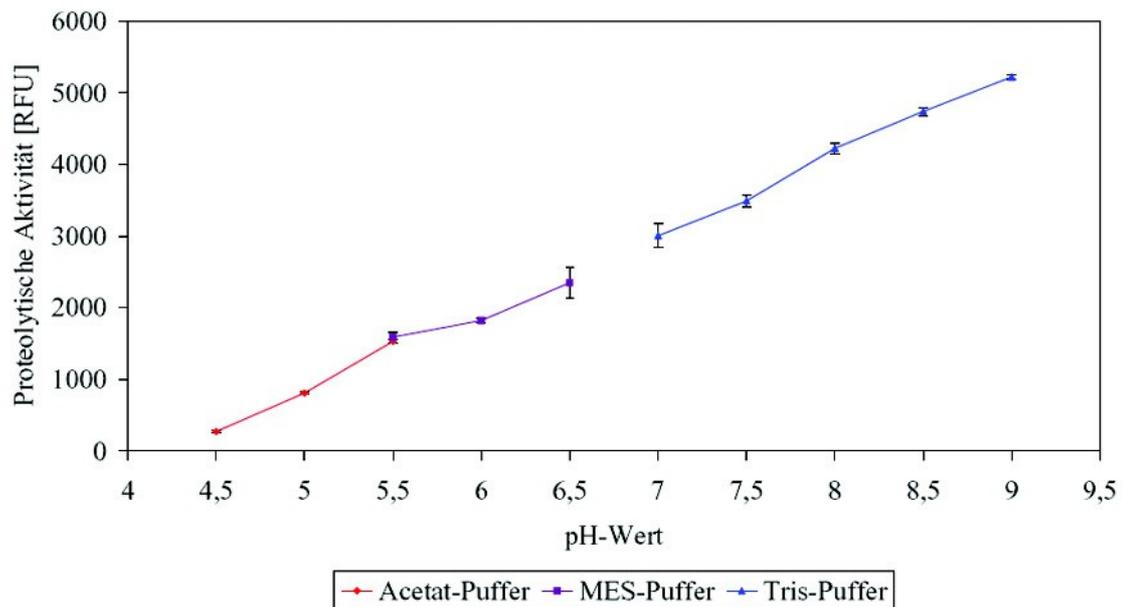


Abbildung 5.50: pH-Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15 in Acetat-, MES- und Tris-Puffer.

10 μL Protease-haltige Probe (DEAE-Pool-Konzentrat) wurde zum Start der Reaktion mit 1,6 nmol des fluorogenen Substrates Cbz-FR-AMC in 90 μL 500 mM Acetat-Puffer (pH 4,5; 5,0; 5,5), 250 mM MES-Puffer (pH 5,5; 6,0; 6,5) und 500 mM-Tris-Puffer (pH 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0) versetzt und bei RT inkubiert. Nach 30 min wurde die akkumulierte Fluoreszenz gemessen. Als Kontrolle wurde bei jedem pH-Wert der Blindwert mit 90 μL Substrat im Puffer mit 10 μL DEAE-Puffer A bestimmt und vom erhaltenen Bruttowert subtrahiert. Die Meßwerte wurden vierfach bestimmt und die Standardabweichungen eingezeichnet.

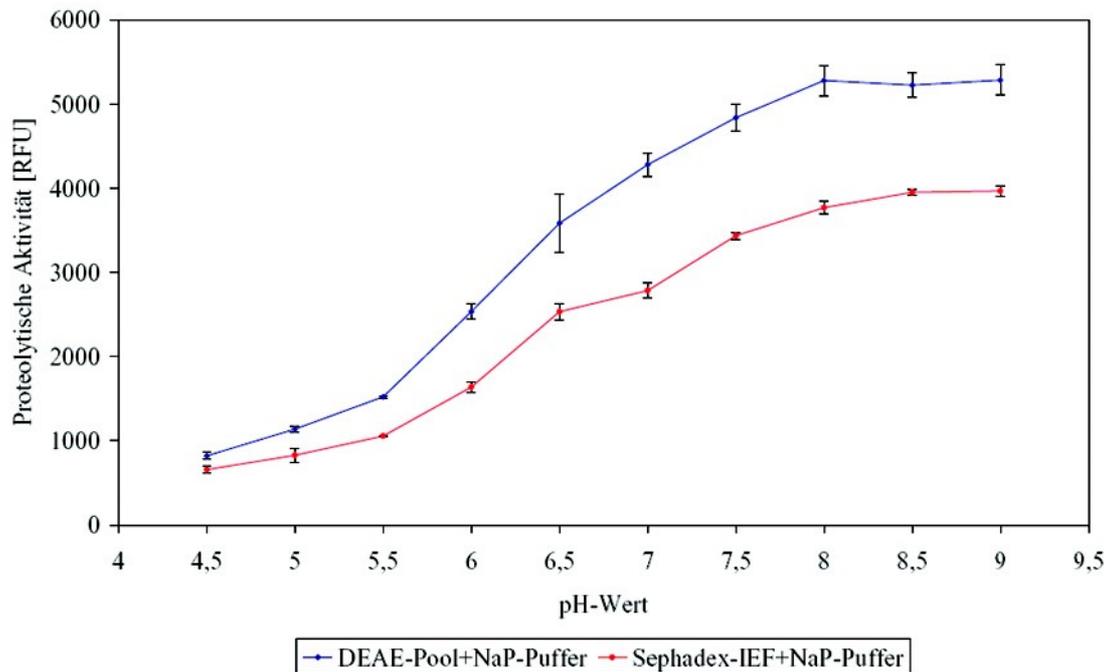


Abbildung 5.51: pH-Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15 in Phosphat-Puffer.

Für den Assay wurden 10 μ L Protease-haltige Probe (**DEAE-Pool-Konzentrat** bzw. **Sephadex-IEF-Eluat**) mit 1,6 nmol des fluorogenen Substrates Cbz-FR-AMC in 90 μ L 50 mM NaP_i -Puffer des entsprechenden pH-Wertes (von pH 4,5 bis 9,0 in 0,5 pH-Schritten) versetzt und bei RT inkubiert. Nach 30 min wurde die akkumulierte Fluoreszenz gemessen. Die Kontrolle wurde wie im vorherigen Versuch (siehe Abbildung 5.50) bestimmt. Die Meßwerte wurden vierfach bestimmt und die Standardabweichungen eingezeichnet.

5.4.4.3 Phosphat-Puffer erhöhte die proteolytische Aktivität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15

Im vorherigen Abschnitt wurde mit verschiedenen Puffern gezeigt, daß die GPP/Deg15 niedrige Aktivität im sauren Bereich, ihr Aktivitäts-Optimum dagegen im basischen Bereich besitzt. Bei einem direkten Vergleich der mit Tris-Puffer einerseits und NaP_i -Puffer andererseits gemessenen Aktivitäten stellte sich heraus, daß Aktivitäten im Tris-Puffer durchgängig nur etwa halb so hoch waren, wie die im NaP_i -Puffer. Abbildung 5.52 zeigt exemplarisch die mit NaP_i -Puffer und Tris-Puffer bei pH 8,5 bestimmte proteolytische Aktivität im Vergleich. Der durch Phosphat-Puffer hervorgerufene Effekt ist höchstwahrscheinlich auf die Ausfällung von Ca-Ionen zu unlöslichem $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ zurückzuführen. Diese Annahme wird durch den Befund erhärtet, daß der Chelatbildner EDTA ebenfalls einen aktivierenden Effekt ausübt (siehe Abbildung 5.56, S.205): EDTA erhöhte die proteolytische Aktivität des DEAE-Pools um das 2,5-fache und die des Sephadex-IEF-Eluats um das 1,6-fache. Die Ursache liegt in der Eigenschaft des EDTA, als Chelator zweiwertige Metall-Ionen zu binden. Während EDTA eine ganze Reihe von zweiwertigen Metallionen zu komplexieren vermag, beschränkt sich der Effekt der Phosphat-Ionen allein auf Ca^{2+} -Ionen, die aufgrund des niedrigen Löslichkeitsproduktes des $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ dem Ansatz entzogen und ausgefällt werden. Intrazellulär ist Ca^{2+} ein wichtiger sekundärer Botenstoff, sowie funktioneller Bestandteil der Calmoduline, das sind Ca^{2+} -abhängige regulatorische Proteine (Yang und Poovaiah, 2003). Calmodulin wurde auch in Glyoxysomen nachgewiesen (Yang und Poovaiah, 2002) und könnte ebenfalls für die Funktion und Regulation der GPP relevant sein. Eine weitere Gruppe von Processing Peptidasen, die Proprotein-Convertasen, enthält Ca^{2+} -Ionen als essentiellen Bestandteil (siehe Abschnitt 3.5.1). Da die GPP/Deg15 als Gemisch von Monomer und Dimer im Gleichgewicht vorliegt (Abschnitt 5.4.3.1, Abbildung 5.48, S.189), könnte unter dem Einfluß der beiden Ca^{2+} -entziehenden Agenzien EDTA und Phosphat eine Verlagerung des Gleichgewichtes zum Monomer hin erfolgen.

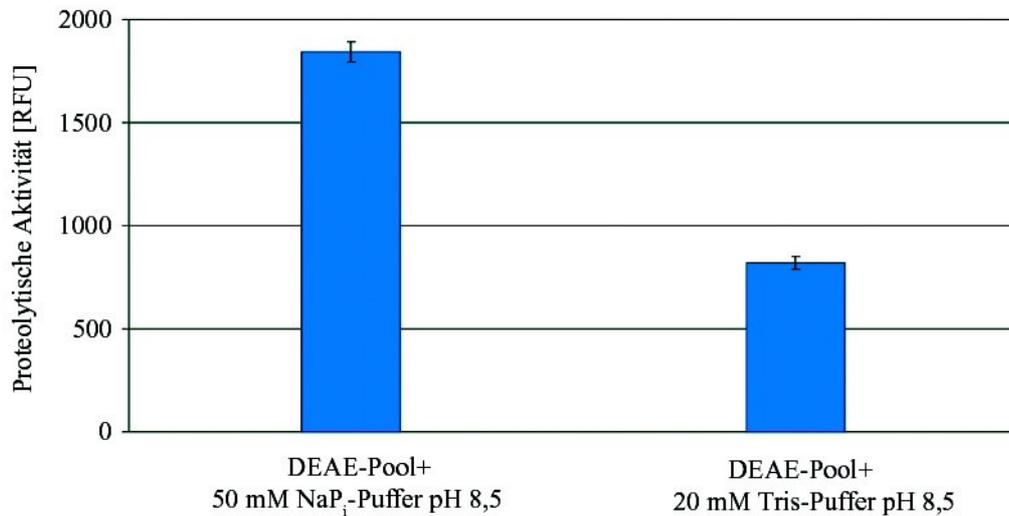


Abbildung 5.52: Einfluß von Phosphat- und Tris-Puffer auf die proteolytische Aktivität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15.

Für den Assay wurden 10 µL Protease-haltige Probe (DEAE-Pool) mit 1,6 nmol des fluorogenen Substrates Cbz-FR-AMC in 90 µL 50 mM NaP_i- bzw. 20 mM Tris-Puffer pH 8,5 versetzt und bei RT inkubiert. Nach 30 min wurde die akkumulierte Fluoreszenz gemessen. Die Meßwerte wurden dreifach bestimmt und die Standardabweichungen eingezeichnet.

5.4.4.4 Das Temperatur-Optimum der proteolytischen Aktivität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15 liegt bei 45°C

Die Temperatur bei der eine Protease bevorzugt aktiv ist, erlaubt u.U. Rückschlüsse auf die biologische Funktion. So findet man unter den Deg-Peptidasen sehr viele Hitzeschockproteine, wie z.B. *E. coli* DegP (Lipinska *et al.*, 1990). Die GPP/Deg15 zeigt für eukaryontische Enzyme eine ungewöhnliche Temperaturabhängigkeit der proteolytischen Aktivität. Sie besitzt ein Temperatur-Optimum bei einer unphysiologisch hohen Temperatur von 45°C (Abbildung 5.53). Die Temperatur-Abhängigkeit steigt von 25°C bis 45°C weitgehend linear an. Das Temperatur-Optimum reicht von 40°C bis 50°C. Darüber hinaus fällt die proteolytische Aktivität bis 60°C steil ab. Bei noch höheren Temperaturen ist keine Proteolyse mehr nachzuweisen. Auch nach Wiederabkühlen auf Raumtemperatur stellte sich innerhalb von 2 h keine proteolytische Aktivität mehr ein (die Ergebnisse sind nicht gezeigt), so daß man von einer irreversiblen Schädigung ab 60°C ausgehen muß.

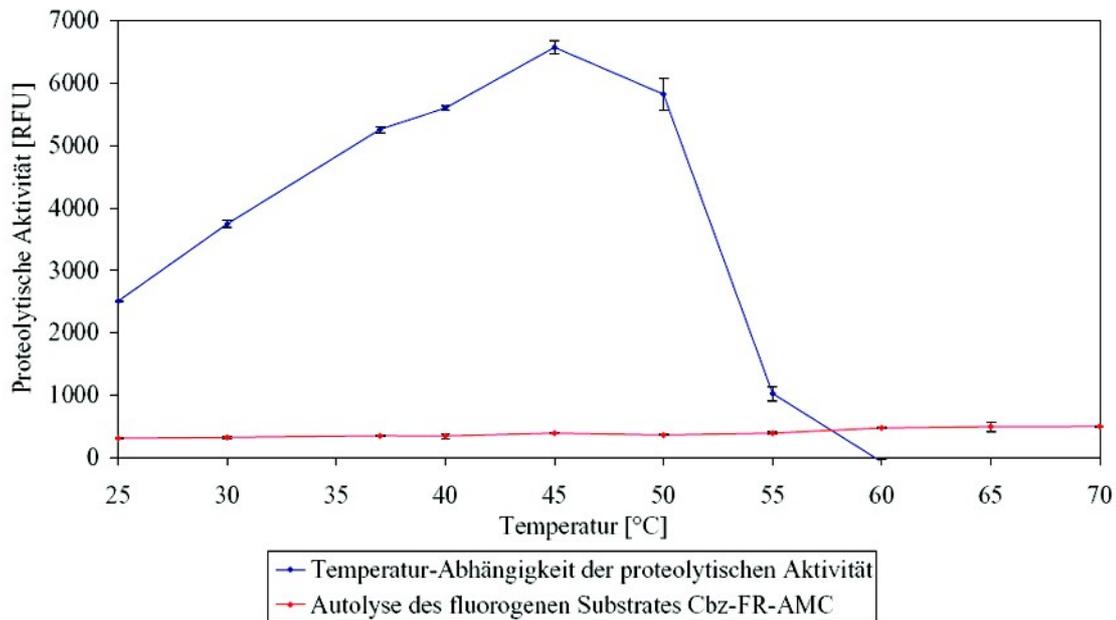


Abbildung 5.53: Temperatur-Abhängigkeit der proteolytischen Aktivität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15.

20 μL Protease-haltige Probe (DEAE-Pool-Konzentrat) wurde 30 min bei der entsprechenden Temperatur vorinkubiert, zum Start der Reaktion mit 1,6nmol des fluorogenen Substrates Cbz-FR-AMC in 80 μL 50 mM NaPi-Puffer pH 7,4 versetzt und weiterinkubiert. Nach 30 min wurde die akkumulierte Fluoreszenz gemessen. Als Kontrolle wurde bei jeder Temperaturstufe der intrinsische **temperaturbedingte Zerfall** des Substrates bestimmt (**rote Linie**) und vom erhaltenen Bruttowert der Proteolyse subtrahiert, sodaß die **blaue Linie** den **bereinigten Temperaturverlauf** der Proteolyse wiedergibt. Die Meßwerte wurden vierfach bestimmt und die Standardabweichungen eingezeichnet.

Interessanterweise wurde nach Inkubationen bei erhöhten Temperaturen beobachtet, daß die proteolytische Aktivität nach dem Wiederabkühlen auf Raumtemperatur gegenüber dem 30°C-Ansatz stark verringert war. Dies könnte auf konkurrierende Substrate wie hitzedenaturierte Proteine zurückzuführen sein, die das fluorogene Substrat verdrängen.

5.4.4.5 Einige ausgewählte Proteine zeigen einen aktivierenden Einfluß auf die proteolytische Aktivität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15

Da im erhitzten Amicon-Durchlauf und auch im DEAE-Durchlauf, der eine Vielzahl von glyoxysomalen Matrixproteinen enthält, eine Aktivatorfunktion nachgewiesen wurde (siehe Abbildung 5.43), ist es wahrscheinlich, daß denaturierte Proteine, wie sie unter *in-vitro*-Bedingungen immer auftreten, diesen Effekt ausüben. Ein Aktivator könnte seinen Einfluß über Bindung an eine Protein-Interaktionsdomäne der GPP/Deg15 entfalten.

Für den Versuch wurden die Standardproteine β -Casein, Magermilchpulver und BSA

neben dem schon bekannten Amicon-Durchlauf als Additive im Protease-Assay mit dem fluorogenen Peptid Cbz-FR-AMC getestet. Da das Temperatur-Optimum der GPP bei 45°C liegt, wurde das Experiment bei 30°C und 45°C durchgeführt. Zudem erfolgt bei 45°C eine weitere Denaturierung der Testproteine.

Alle drei Testproteine waren in der Lage, die proteolytische Aktivität der GPP/Deg15 zu steigern und zwar bei 45°C mehr als doppelt so stark wie bei 30°C. Bei 30°C hatten Magermilchpulver (+90%) und β -Casein (+79%) hatten einen stärkeren Effekt als der natürliche Aktivator (+53%), BSA wirkte etwas schwächer (+32%) (Abbildung 5.54).

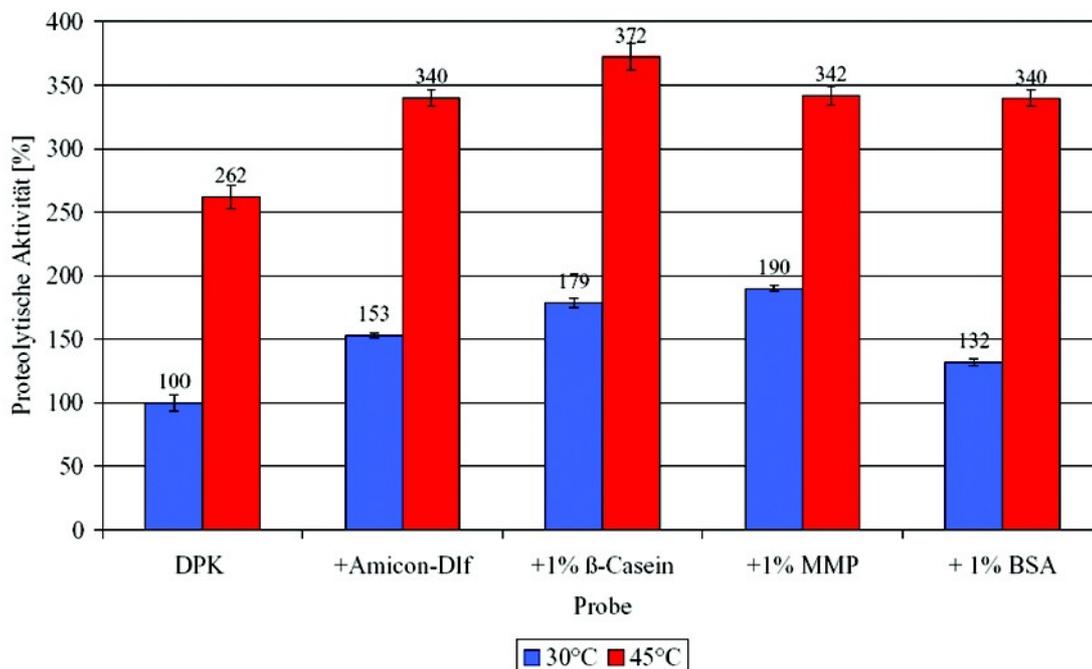


Abbildung 5.54: Einfluß verschiedener Proteinlösungen auf die proteolytische Aktivität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15.

Für den Assay wurden 10 μ L Protease-haltiger Lösung (DEAE-Pool-Konzentrat) mit 10 μ L Amicon-Durchlauf bzw. den Proteinen β -Casein, Magermilchpulver und Rinderserum-Albumin (BSA) in jeweils 1%iger Lösung 5 min bei 30°C und 45°C inkubiert, zum Start der Reaktion mit 1,6 nmol des fluorogenen Substrates Cbz-FR-AMC in 80 μ L 50 mM NaPi-Puffer pH 7,4 versetzt und weiter inkubiert. Nach 30 min wurde die akkumulierte Fluoreszenz gemessen. Die Meßwerte wurden vierfach bestimmt und die Standardabweichungen eingezeichnet.

5.4.4.6 Einige ausgewählte Cofaktoren zeigen keinen Einfluß auf die proteolytische Aktivität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15

Einige Gruppen von Peptidasen sind von Cofaktoren abhängig. Die Metallopeptidasen besitzen ein Zink-Bindungsmotiv, mit dem das Metallatom komplexiert wird, das für die enzymatische Reaktion essentiell ist. In vielen Fällen kann das Zink-Ion durch andere zweiwertige Metall-Ionen funktionell ersetzt werden. Bei einer weiteren Gruppe von Peptidasen, der z.B. auch die Lon-Protease angehört, ist die Funktion von der ATP-Spaltung abhängig. Bei diesen Vorgängen ist die Freisetzung des ADP in der Regel der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, weshalb die Zugabe von ADP unter Umständen hemmend wirken kann (Botos *et al.*, 2004a). ATP ist funktionell immer mit dem Mg^{2+} -Ion gekoppelt.

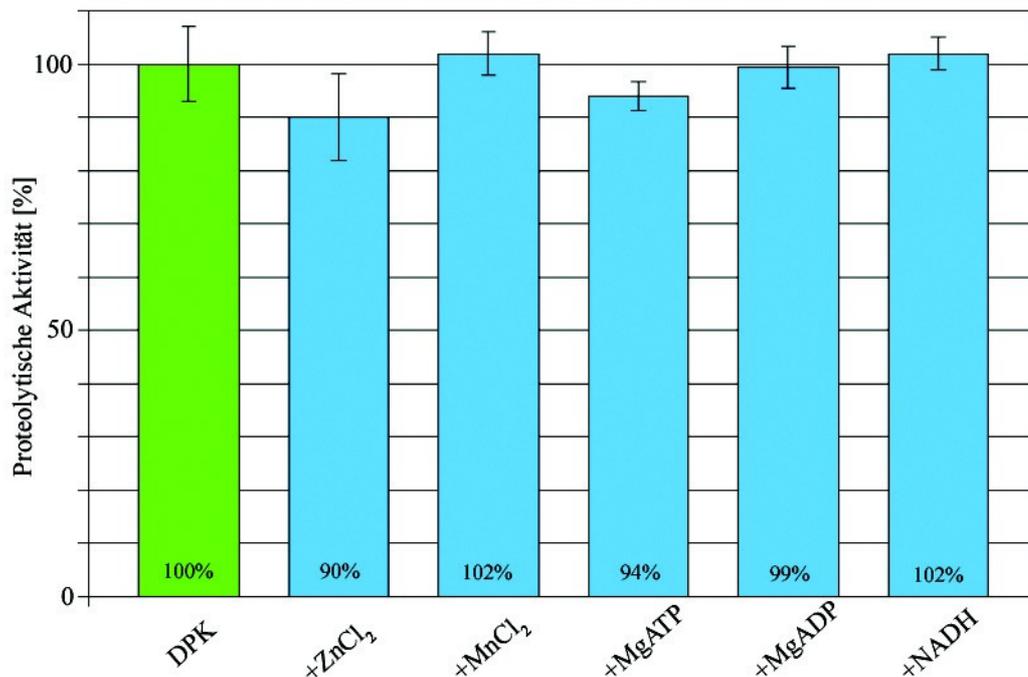


Abbildung 5.55: Einfluß von Cofaktoren auf die proteolytische Aktivität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15.

Gezeigt ist der Einfluß von $ZnCl_2$ und $MnCl_2$ (jeweils 100 nM), sowie $Mg^{2+}+ATP$, $Mg^{2+}+ADP$ und $NADH$ (jeweils 100 μM) auf die Protease-Aktivität gegen das fluorogene Substrat Cbz-FR-AMC. Die Meßwerte wurden dreifach bestimmt und die Standardabweichungen eingezeichnet.

Aus diesem Grunde wurden die genannten Cofaktoren, sowie das verbreitete Reduktionsäquivalent NADH auf ihren möglichen Einfluß auf die proteolytische Aktivität untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.55 zusammengefaßt. Die sechs untersuchten Faktoren Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , ATP, ADP und NADH hatten im *in-vitro*-Assay keinen signifikanten Effekt auf die Aktivität. Der fehlende Einfluß von ATP und Zn^{2+} bestätigt die Befunde, daß es sich bei der ATP-abhängigen Lon-Protease (de Walque *et al.*, 2002) bzw. der Zn-Metallopeptidase (Authier *et al.*, 1995) nicht um die Glyoxysomale Processing Peptidase handelt.

5.4.4.7 Der Einfluß von Inhibitoren auf die proteolytische Aktivität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15

Die Klassifikation einer Protease wird durch den Einsatz von gruppenspezifischen Inhibitoren ermöglicht (Barrett *et al.*, 2004). PMSF gilt als gruppenspezifisches Reagenz für das katalytische Serin von Serin-Proteasen. Die bakteriellen Peptidaldehyde Antipain, Leupeptin und Chymostatin wurden zur kovalenten Hemmung vieler Serin- und Cystein-Peptidasen eingesetzt. Es handelt sich um Analoga des Übergangszustandes für Serin- und Cystein-Peptidasen, die Aldehydgruppen bilden extrem stabile Hemiacetale mit dem reaktiven Nucleophil (Thompson, 1973). Die Chloromethylketone, die kovalent mit dem katalytischen Histidin bzw. Cystein reagieren, sind kovalente Hemmer vieler Serin- und Cystein-Peptidasen. Benzamidin und dessen Derivat p-Amino-Benzamidin hemmen ebenfalls viele Serin- und Cystein-Peptidasen, allerdings kompetitiv, weshalb sie auch, an eine Matrix gekoppelt, bei der Affinitätsreinigung eingesetzt werden. Aspartat-Proteasen werden spezifisch durch den bakteriellen Inhibitor Pepstatin A gehemmt. Die Cystatine sind Polypeptide und hemmen Cystein-Peptidasen; sie kommen natürlicherweise in vielen Organismen vor. Das am besten bekannte Cystatin ist das aus Hühner-Eiweiß mit einer Polypeptidkette von 108 Aminosäuren und einer charakteristischen Struktur aus einem fünfsträngigen β -Faltblatt und einer α -Helix (Dieckmann *et al.*, 1993). Metallopeptidasen werden durch Chelatoren wie EDTA gehemmt, die der Protease das für die Funktion essentielle zweiwertige Kation entziehen. Die genannten Inhibitoren wurden auf ihre mögliche Hemmwirkung auf die über DEAE-Säule und präparative native Sephadex-IEF angereicherte GPP/Deg15-Probe untersucht (Abbildung 5.56).

Bei fast allen verwendeten Inhibitoren bieten DEAE-Pool und Sephadex-IEF-Eluat ein qualitativ ähnliches Bild. Antipain ([1-Carboxy-2-Phenylethyl]-Carbamoyl-L-Arg-L-Val-Argininal), ein Inhibitor der Cystein-Peptidase Papain und der Serin-Peptidase Trypsin hemmte die GPP vollständig. Annähernd gleich gute Hemmwirkung zeigte der Chloromethylketon (CMK)-Inhibitor TLCK (Tosyl-Lys-CMK). Geringfügig schwächer (95% Hemmung) war die inhibitorische Wirkung des Peptidaldehyds Leupeptin (Propionyl-L-Leu-L-Leu-Argininal) und des CMK-Inhibitors H-D-Pro-Phe-Arg-CMK. Der CMK-Inhibitor H-D-Val-Leu-Lys-CMK zeigte noch eine gute Hemmwirkung (80%), wogegen TPCK (Tosyl-Phe-Chloromethylketon) eine schlechte Hemmwirkung (etwa 25%) aufwies. Die gemeinsamen Merkmale der gegenüber der GPP/Deg15 effizienten Inhibitoren sind ein basischer Rest an P1 und ein hydrophober oder unpolarer Rest an P2: Φ -R/K↓ (Φ steht für hydrophobe und unpolare Reste). Durch Austausch von Lys an P1 (TLCK) durch Phe (TPCK) sinkt die inhibitorische Wirkung von 95% auf ~20% .

Die kompetitiven Inhibitoren Benzamidin und p-Amino-Benzamidin hemmten beide nur mäßig (etwa 50%). Der gegen Aminopeptidasen wirkende Inhibitor Bestatin (3-Amino-2-Hydroxy-4-Phenylbutanoyl-L-Leu) zeigte eine mäßig hemmende Wirkung auf den DEAE-Pool, keine dagegen im Sephadex-Eluat. Chymostatin (N-{[1-Carboxy-2-Phenylethyl]-Carbamoyl}- α -[2-Iminohexahydro-4-Pyrimidyl]-L-Gly-L-Leu-Phenylalaninal, daß die Serin-Peptidase Chymotrypsin inhibiert, hatte keinen Effekt auf die proteolytische Aktivität. Ebenfalls keine inhibitorische Wirkung hatte Pepstatin A (Isovaleryl-L-Val-L-Val-AHMHA-L-Ala-AHMHA, AHMHA = 4-Amino-3-Hydroxy-6-Methylheptanoic Acid). Bemerkenswerterweise hatte der gängige Serin-Peptidasen- und Papain-Inhibitor PMSF (Phenylmethylsulphonylfluorid) keinerlei hemmende Wirkung.

Ungewöhnlich sind die aktivierenden Einflüsse von EDTA und Cystatin. Bei dem Inhibitor Cystatin aus Hühner-Eiweiß handelt es sich um ein 12 kDa-Protein, daß ebenso wie die Proteine im Amicon-Durchlauf oder BSA, Magermichpulver und β -Casein (siehe Abbildung 5.54) einen aktivierenden Einfluß ausüben könnte. Auf den aktivitätssteigernden Effekt des EDTA, der in Verbindung mit dem zweiwertigen Metallion Ca^{2+} steht, wurde bereits in Abschnitt 5.4.3.3 eingegangen.

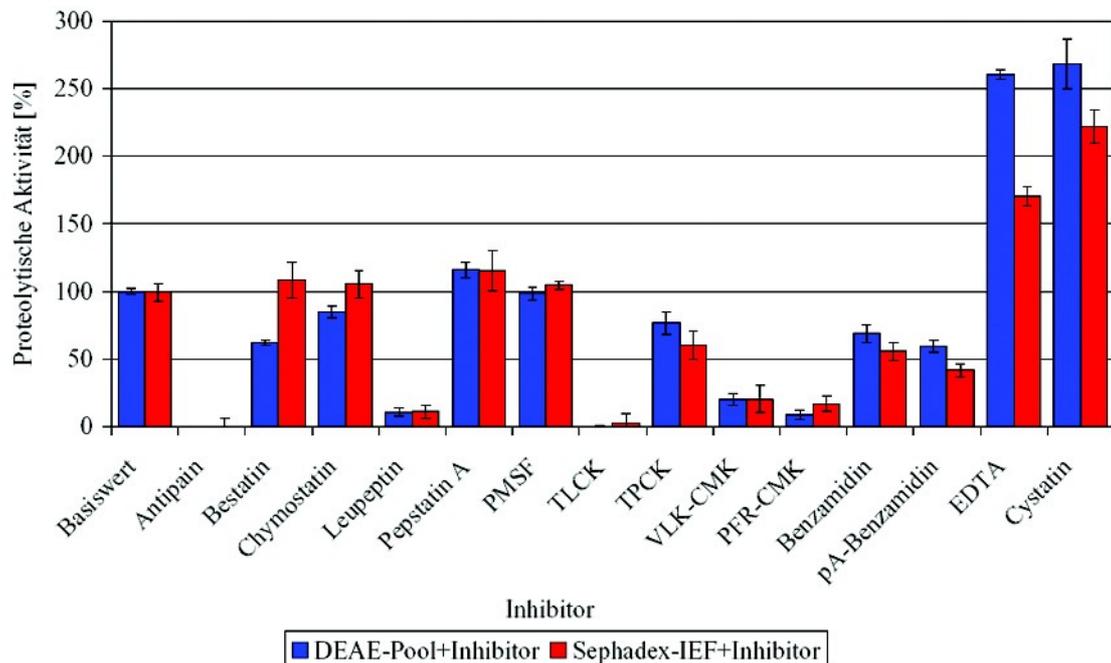


Abbildung 5.56: Einfluß von Protease-Inhibitoren auf die proteolytische Aktivität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15.

Die über DEAE-Anionenaustausch-Chromatographie (DEAE-Pool) und **native präparative Sephadex-IEF** gereinigte proteolytische Aktivität (Basiswert; siehe Abschnitt 3.4.4) gegen das fluorogene Substrat Cbz-FR-AMC wurde mit den Inhibitor-belasteten Proben verglichen. Die Inhibitoren (für Details siehe Tabelle 4.3, S. 107) wurden vor der Messung 1 h mit der Probe inkubiert. 30 min nach Substratzugabe wurde die akkumulierte Fluoreszenz gemessen. Die Meßwerte wurden vierfach bestimmt und die Standardabweichungen eingezeichnet.

5.4.4.8 Die Glyoxysomale Processing Peptidase/Deg15 zeigt *in-vitro* bei 45°C starke proteolytische Aktivität gegenüber glyoxysomalen Matrix-Proteinen

Da sich die GPP/Deg15 mit dem fluorogenen Peptid Cbz-FR-AMC, einem Substrat für viele Serin- und Cystein-Peptidasen mit Spezifität für Arg an P1 detektieren läßt, lag es nahe, zu untersuchen, ob von der GPP/Deg15 auch glyoxysomale Matrixproteine degradiert werden. Da im DEAE-Pool der angereinigten Protease noch reichlich Matrixproteine enthalten sind, mußte dieser lediglich inkubiert und anschließend über SDS-PAGE analysiert werden. Für den Versuch wurden Proben bei 30°C, sowie beim Temperatur-Optimum von 45°C inkubiert und für die SDS-PAGE-Analyse bei Reaktionsbeginn, nach 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h Aliquots entnommen.

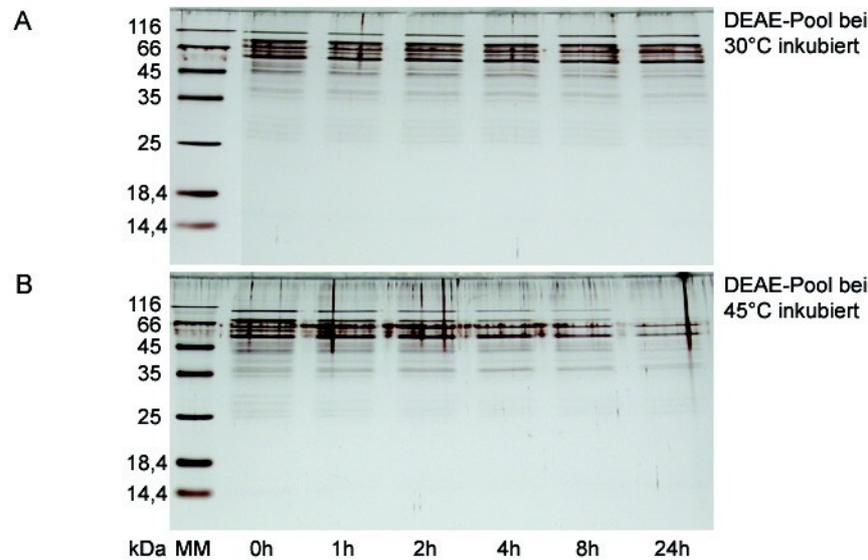


Abbildung 5.57: SDS-PAGE-Analyse des Verdauens von glyoxysomalen Matrixproteinen durch die Glyoxysomale Processing Peptidase/Deg15 bei 30°C und 45°C im Vergleich. DEAE-Pool wurde bei (A) 30°C und (B) 45°C inkubiert. Bei Reaktionsbeginn sowie nach 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h wurden 30 μ L Aliquots entnommen, mit SDS-Probenpuffer aufgekocht und mit 17,5%-SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert.

Wie die zwei SDS-Gele in Abbildung 5.57 zeigen, erfolgte *in-vitro* bei 30°C nur ein schwacher Abbau der glyoxysomalen Matrix-Proteine, bei 45°C, einer Temperatur, bei der eukaryotische Proteine in der Regel denaturieren, dagegen eine massive Degradation der Proteine. Diese Affinität der GPP/Deg15 zu einer Vielzahl von glyoxysomalen Matrixproteinen und deren Abbau zu kleinen Spaltprodukten steht im Widerspruch zu der im Rahmen der Prozessierung von höhermolekularen Vorstufen erforderlichen limitierten Endoproteolyse, die mit den spezifischen fluorogenen Peptiden für die GPP/Deg15 (siehe Abschnitt 5.4.3.1) nachgewiesen wurde. Dieser Befund stützt die Annahme, daß die beiden miteinander im Gleichgewicht stehenden Formen der GPP/Deg15 - das 72 kDa-Monomer und das 144 kDa-Dimer - unterschiedliche Funktionen und Substratspezifitäten haben. Dem 72 kDa-Monomer mit der Affinität für das fluorogene Substrat Cbz-FR-AMC kommt eindeutig eine degradierende Funktion für denaturierte Proteine mit der Spaltspezifität Φ -R/K \downarrow (Φ steht für hydrophobe und unpolare Reste); damit muß es sich um eine „*Degrading*-Peptidase“ handeln. Die für das Gemisch beider Formen im Sephadex-Eluat (siehe Abbildung 5.48) mit spezifischen fluorogenen Peptiden nachgewiesene Spaltspezifität mit Cys an P1 oder P2 (X-C \downarrow bzw. C-X \downarrow ; siehe Tabelle 5.13), die der limitierten Endoproteolyse durch die Glyoxysomale Processing Peptidase

entspricht, geht sehr wahrscheinlich auf das 144 kDa-Dimer zurück, da nur schwer vorstellbar ist, daß ein und dieselbe Protease beide sehr unterschiedlichen Substratspezifitäten und Eigenschaften in sich vereint.

Die anfänglich gehegte Vorstellung, die Inkubation bei 45°C in eine Reinigungsstrategie einzubinden, wurde verworfen, nachdem sich herausstellte, daß die nach 24h noch nachweisbare Aktivität gegen das fluorogene Peptid Cbz-FR-AMC bei 30°C 35% und bei 45°C nur noch 12% der ursprünglichen Aktivität betrug.

5.4.4.9 Die Dimerisierung der Glyoxysomale Processing Peptidase/Deg15 ist von Ca²⁺-Ionen abhängig

Es wurde mehrfach gezeigt, daß die GPP/Deg15 in zwei Formen vorliegt, einem Monomer und einem Dimer, die *in-vitro* miteinander im Gleichgewicht stehen. Es gibt Hinweise das es sich beim Monomer mit der Substratspezifität Φ -R/K↓ um eine „*Degrading*-Peptidase“ und beim Dimer um die Glyoxysomale Processing Peptidase mit der Substratspezifität X-C↓/C-X↓ handelt. Da nur das Monomer proteolytische Aktivität gegen das fluorogene Substrat Cbz-FR-AMC zeigt, könnten über das normale Maß hinausgehende Aktivitätsverluste im Verlauf der Reinigung auf eine Veränderung der Gleichgewichtslage hin zum nicht detektierten Dimer zurückgehen. Da ein signifikanter Aktivitätsanstieg durch EDTA und Phosphat-Ionen als Additiv im *in-vitro*-Assay erfolgte (siehe Abschnitte 5.4.3.3 und 5.4.3.7), aber nach der Hydroxyapatitsäule gravierende Aktivitätsverluste beobachtet wurden (siehe Abschnitt 5.4.3.1 und Tabelle 5.11), liegt der Schluß nahe, daß die Dimerisierung der Deg15 in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen erfolgt. Aus diesem Grunde wurde der Einfluß von Ca²⁺-Ionen auf die proteolytische Aktivität des Monomers untersucht. Die GPP/Deg15-haltige Probe war der über Ultrafiltration ankonzentrierte DEAE-Pool. EDTA führte, wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, zu einer signifikanten Aktivitätserhöhung (siehe Abbildung 5.56, S.205), die unter den gegebenen Versuchsbedingungen 36% betrug (Abbildung 5.58, Säule 2). Durch Zugabe von Ca²⁺-Ionen in Form von gelöstem CaCl₂ zur Probe war kein wesentlicher Aktivitätsabfall zu beobachten (93%; Säule 3). Die Situation änderte sich allerdings dramatisch, als die Probe zunächst wie vorher 10 min mit EDTA und anschließend 10 min mit Ca²⁺-Ionen im vierfachen Überschuß inkubiert wurde: Die Aktivität fiel auf 22% ab (Abbildung 5.58, Säule 4).

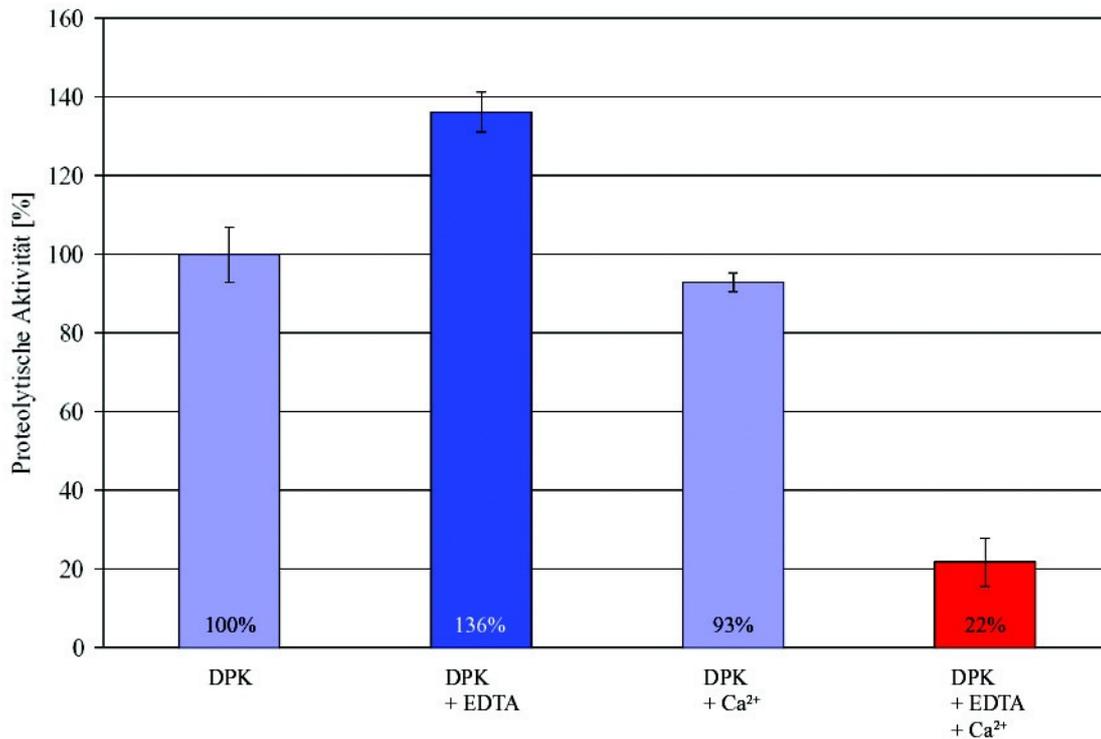


Abbildung 5.58: Einfluß von EDTA und Ca²⁺-Ionen auf die proteolytische Aktivität der Glyoxysomalen Processing Peptidase/Deg15.

Die über DEAE-Säule gereinigte und über Ultrafiltration ankonzentrierte proteolytische Aktivität (DPK; 100%) wurde (1) 10 min mit 6,25 mM EDTA, (2) 10 min mit 25 mM Ca²⁺ und (3) 10 min mit 6,25 mM EDTA und anschließend 10 min mit 25 mM Ca²⁺ inkubiert. 30 min nach Zugabe des fluorogenen Substrats Cbz-FR-AMC wurde die akkumulierte Fluoreszenz gemessen. Die Meßwerte wurden dreifach bestimmt und die Standardabweichungen eingezeichnet.

Damit ist gezeigt, daß die Dimerisierung tatsächlich Ca²⁺-abhängig ist, jedoch hatten Ca²⁺-Ionen möglicherweise erst nach Konditionierung durch vorübergehende Bindung an das chelatbildende EDTA die Fähigkeit zur Dimerisierung. Eine andere denkbare Erklärung, wäre eine Besetzung der für die Dimerisierung notwendigen Positionen am Monomer durch andere divalente Kationen als Ca²⁺. Diese müßten für die Ca²⁺-abhängige Dimerisierung zuerst durch EDTA vom Monomer extrahiert werden.

Abschließend dürfte damit auch der nach Hydroxyapatit-Säule beobachtete Aktivitätsverlust (siehe Abschnitt 5.4.1.3 und Tabelle 5.11, S.177) geklärt sein. Von diesem Ca²⁺-haltigen Säulenmaterial ist bekannt, daß es je nach Pufferbedingungen mehr oder weniger Ca²⁺-Ionen freisetzt und daß Chelatbildner wie EDTA der Säulenmatrix Ca²⁺-Ionen entziehen (Tiselius *et al.*, 1956). Auf der Hydroxyapatit-Säule war demnach ~80% (30 Mio. von

37 Mio. RFU) der auf die Säule geladenen GPP/Deg15 unter Ca^{2+} -Einfluß dimerisiert und mit dem fluorogenen Substrat Cbz-FR-AMC nicht mehr nachweisbar. Unbekannt ist, wie sich durch die Dimerisierung die Affinität der GPP/Deg15 zur Säulenmatrix ändert; möglicherweise bindet ein Ca^{2+} -haltiges Dimer an die Matrix und wird dadurch vom Monomer abgetrennt.

6. Diskussion

6.1 Peptidasen mit C-terminalem KDEL

Die keimenden Samen von *Ricinus communis* waren ab den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts häufiges Objekt für die Untersuchung der Fettmobilisierung und den daran beteiligten Glyoxysomen (Beevers, 1979). In diesem Zusammenhang hatte bereits Vigil (1970) darauf hingewiesen, daß bei der Isolation von Organellen durch Ultrazentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten zusammen mit den Glyoxysomen eine weitere Organellenspezies gleicher Größe angereichert wird, die aus dem ER hervorgeht. Da diese "*Dilated cisternae*" bis dato nur in keimenden *Ricinus*-Samen gefunden worden waren, bezeichneten Mollenhauer und Totten (1970) sie als Ricinosomen. Ricinosomen ließen sich seinerzeit biochemisch mangels Markerenzym nicht charakterisieren und gerieten deshalb in Vergessenheit, bis sie von Gietl und Mitarbeitern wiederentdeckt wurden (Schmid *et al.*, 1998). Die untersuchte Proform Cystein-Endopeptidase aus *Ricinus* mit KDEL-Terminus wurde als Markerenzym für Ricinosomen identifiziert. Ursprünglich wurde die *Ricinus*-CysEP für eine Glyoxysomale Processing Peptidase gehalten, da sie die Proform der glyoxysomalen Malatdehydrogenase zur reifen Form prozessierte (Gietl *et al.*, 1997). Durch Spreizung des Saccharose-Dichtegradienten gelang es, Ricinosomen, die sich zwischen 57 und 65% Saccharose anreichern, und Glyoxysomen, die sich zwischen 52 und 57% Saccharose anreichern, präparativ voneinander zu trennen und damit deren Zusammensetzung biochemisch zu analysieren. Die Ricinosomen mit der darin enthaltenen Proform der CysEP wurden als ein für den programmierten Zelltod bedeutsames lytisches Kompartiment erkannt (Schmid *et al.*, 1998). Ricinosomen sind nicht nur im absterbenden *Ricinus*-Endosperm nach Abschluß der Mobilisierung des Speicherproteins und Speicherfetts vorhanden; sie wurden auch in reifenden *Ricinus*-Samen und in seneszierenden Petalen von *Hemerocallis* über Immunolokalisation mit dem *Ricinus* CysEP-Antikörper gefunden (Schmid *et al.*, 1999). Beim Nucellus des reifenden *Ricinus*-Samens, beim Endosperm des *Ricinus*-Keimlings und den welkenden *Hemerocallis*-Petalen (Panavas *et al.*, 1998) handelt es sich zweifelsfrei um sich auflösende und kollabierende Gewebe. Die Frage war nun, ob Ricinosomen - da deren Auftreten offenbar nicht auf *Ricinus* beschränkt ist - ubiquitäre Organellen in den PCD durchlaufenden Pflanzenzellen sind.

Über Datenbankrecherche wurden weitere zur *Ricinus* CysEP hochhomologe Papain-artige Cystein-Endopeptidasen mit KDEL-Terminus in Pflanzen, jedoch nicht bei Tieren und Hefen gefunden (Gietl und Schmid, 2001; siehe Abbildung 6.1). Die Kotyledonen der epigäisch keimenden *Vigna mungo* ergrünen nicht und fallen nach der Speichermobilisierung ab, sind also ein seneszierendes Gewebe. Allerdings wird die darin vorkommende Cystein-Endopeptidase (SH-EP) mit C-terminalem KDEL-Signal als transiente Proform vom ER unter Umgehung des Golgi-Apparates in Transportvesikeln (KV) zu den Proteinspeichervakuolen (PSV) transportiert und ist dort nach Reifung als 33 kDa SH-EP an der Mobilisierung von Speicherproteinen beteiligt. Eine Beteiligung am PCD wurde nicht berichtet (Akasofu *et al.*, 1989; Toyooka *et al.*, 2000; Okamoto *et al.*, 2001). Eine Cystein-Endopeptidase (EP-C1) wurde in Schoten von *Phaseolus vulgaris* gefunden. Die Schoten speichern zunächst Protein, das dann im weiteren Verlauf der Samenreifung wieder mobilisiert wird; die freigesetzten Aminosäuren werden in die reifenden Samen transferiert und die Schotenwand verholzt und stirbt ab (Tanaka *et al.*, 1993). Im äußeren Integument der sich entwickelnden Samen der Orchidee *Phalaenopsis* wird eine Cystein-Endopeptidase (O141) mit RDEL-Terminus exprimiert (Nadeau *et al.*, 1996) und in unbefruchteten Ovarien von *Pisum sativum* wird im Verlaufe der Seneszenz eine KDEL-Peptidase (TPE4A) induziert (Cercos *et al.*, 1999). In Kotyledonen von *Vicia sativa* wurde die Papain-artige Proteinase A erst am Tag sechs nach der Keimung gefunden, wenn der größte Teil der Speicherglobuline bereits abgebaut ist, aber nicht zu Beginn der Speicherprotein-Mobilisierung. Hier besteht eine Analogie zur *Ricinus* CysEP, die als Proform in den Ricinosomen der seneszierenden Kotyledonen ab Tag fünf nachweisbar war (Schmid *et al.*, 1999). Die Cystein-Endopeptidase EP-A aus Gerste ist bei der Keimung an der Mobilisierung der Hordeine in den Aleuron-Zellen beteiligt (Davy *et al.*; 1998). Bei Gymnospermen wurde im Rahmen der Keimung von Samen von *Picea glauca* eine während des PCD des Megagametophyten tätige Cystein-Endopeptidase mit KDEL-Terminus gefunden, die mit dem anti-*Ricinus* CysEP-Antikörper der Arbeitsgruppe Gietl detektiert werden konnte (He und Kermode, 2003). Die 48 kDa-Proform der Peptidase war in einem fortgeschrittenen Stadium der Keimung in sphärischen Organellen von etwa 2 µm Durchmesser lokalisiert, die von den Autoren mit den Ricinosomen bei *Ricinus* verglichen wurden. In einem späten Stadium war die reife und proteolytisch aktive 38 kDa-Form ohne N-terminales Propeptid und C-terminales KDEL-Signal nachweisbar. Für die in den welkenden Tepalen von *San-*

dersonia exprimimierte KDEL-Peptidase (PRT5) ist eine Funktion im Rahmen des PCD ebenfalls anzunehmen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß für einen Teil der genannten Papain-artigen KDEL-Peptidasen die Beteiligung am PCD (*Ricinus*, *Hemerocallis*, *Phaseolus*, *Phalaenopsis*, *Pisum*, *Vicia*, *Picea*, *Sandersonia*) belegt ist, einige scheinen dagegen eine Funktion bei der Mobilisierung von Speicherproteinen (*Vigna*, *Hordeum*) zu erfüllen; die Lokalisation der Peptidase in Vesikeln oder Ricinosomen ist in vier Fällen (*Hemerocallis*, *Ricinus*, *Picea*, *Vigna*) belegt.

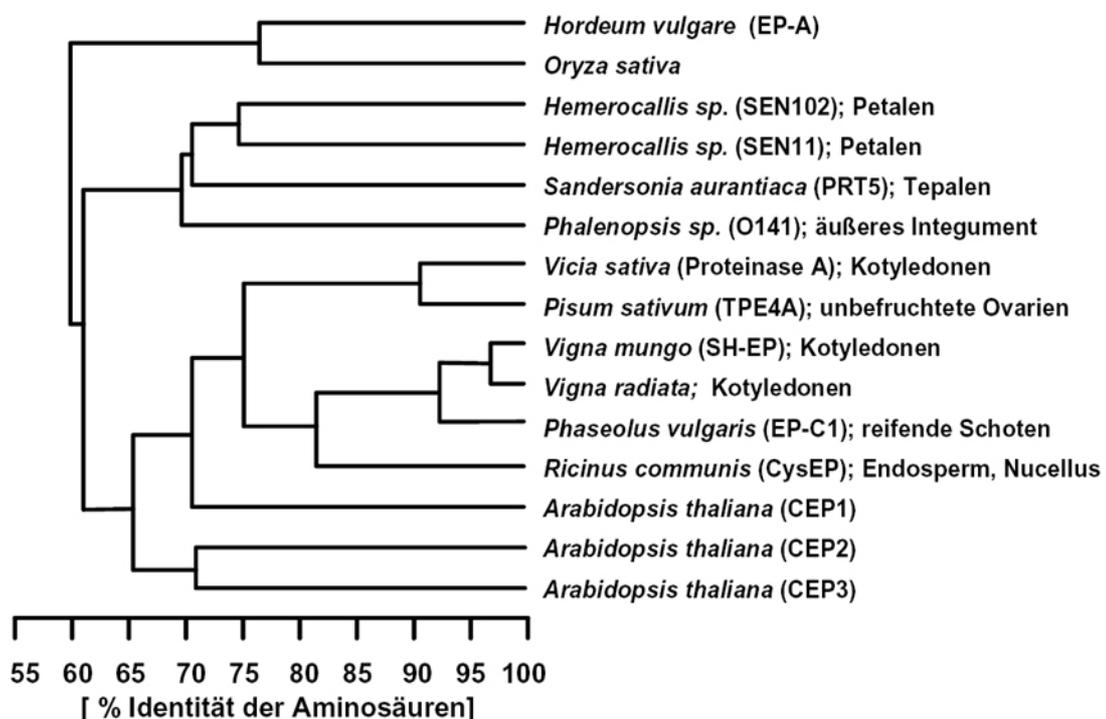


Abbildung 6.1: Dendrogramm von hochhomologen KDEL-Peptidasen aus pflanzlichen Geweben. [Modifiziert nach Gietl und Schmid (2001); © 2001 Springer-Verlag.]

Die in Verbindung mit Seneszenz und PCD beschriebenen gewebsspezifischen Lokalisationen wurden größtenteils auch bei den transgenen *PCEP-GUS*-Linien für die Promotoren der drei KDEL-Peptidasen Cep1, Cep2 und Cep3 bei *Arabidopsis* gefunden. Analog zu den bei *Phalaenopsis* (äußeres Integument) vorliegenden Verhältnissen wurden in *PCEP1-GUS*-Schoten des Stadiums 18 auf der deutlich konturierten Samenschale GUS-Aktivität zeigende Überreste des äußeren Integuments gefunden (siehe Abbildung 5.7D, S.116). Auf dem Weg zur Ausbildung der Samenschale durchlaufen die Zellen des Integuments den PCD und verholzen schließlich. Bei der gefundenen Reporteraktivität ist zu beachten, daß die Glucuronidase sehr persistent ist und u. U. noch nachgewiesen werden kann, wenn das eigentliche Protein längst nicht mehr vorhanden ist (Jefferson *et al.*, 1987). Nachdem die Samenschale bereits fertig ausgebildet ist, trifft das in diesem Fall höchstwahrscheinlich zu. Wie bei *Pisum* (unbefruchtete Ovarien) fanden sich in *PCEP1-GUS*-Schoten regelmäßig unbefruchtete Ovarien mit dem Megagametophyten, die mit fortschreitender Schotenreifung immer kleiner wurden und dabei bis zuletzt GUS-Expression aufwiesen (siehe Abbildung 5.7A-C, S.116). Das nach der Keimung von *Ricinus*-, *Vicia*- und *Picea*-Samen und bei der Mobilisierung der Speicherproteine aus dem Nährgewebe dokumentierte Auftreten einer KDEL-Peptidase in Zusammenhang mit dem PCD wurde analog auch bei *PCEP1-GUS*-Keimlingen gefunden; der in der Samenschale verbliebene Rest des Endosperms zeigte Reporteragen-Aktivität (siehe Abbildung 5.8, S.117). Allerdings sind die Verhältnisse bei *Arabidopsis* so, daß das transient angelegte Endosperm im Verlaufe der Samenreifung bis auf die einlagige periphere Aleuron-artige Schicht wieder aufgebraucht wird und die Ernährung des Keimlings durch die Kotyledonen erfolgt. Die Funktion dieser Aleuronschicht, die aus dünnwandigen Zellen besteht und verglichen mit den Aleuronzellen bei Cerealien wenig Speichersubstanzen enthält, ist nicht bekannt (Olsen, 2004). Wie bei *Phaseolus* (reifende Schoten), wurde in den Karpellen der grünen *PCEP3-GUS*-Schoten des Stadiums 15 (siehe Abbildung 5.13, S.123) GUS-Expression gefunden, die dann im weiteren Verlauf der Samenreifung schwächer wurde und bei den gelben Schoten im Stadiums 18 (zur Nomenklatur der Entwicklungsstadien der Blütenentwicklung bei *Arabidopsis* nach Müller (1961) siehe Tabelle 5.1, S.109) verschwunden war. Im Rahmen der Samenentwicklung dienen die Fruchtblätter als transients Proteinspeicher, der bei fortschreitender Samenreifung wieder mobilisiert wird; im Anschluß daran werden die Karpelle zu seneszierenden Geweben (Tanaka *et al.*, 1993), die schließlich

verholzen und über Turgeszenzbewegungen aufplatzen und die reifen Samen freigeben. Wie die Kotyledonen bei *Vicia*, dienen die Kotyledonen bei *Arabidopsis* der Ernährung des Keimlings (Olsen, 2004). Nach erfolgter Keimung werden die von *Vicia* zum seneszierenden Gewebe, wogegen die von *Arabidopsis* ergrünen und dem zufolge keine Seneszenzerscheinungen zeigen. Bemerkenswerterweise wurde jedoch in den Kotyledonen von *PCEP3-GUS*-Keimlingen GUS-Aktivität in Leitungsbahnen nahe der Blattbasis und in den Schließzellen gefunden (siehe Abbildung 5.11, S.121).

In Abbildung 6.2 sind Vorgänge in reifenden *Ricinus*-Samen zusammengefasst. In dem Maße, wie sich das zelluläre Endosperm ausdehnt, vollzieht sich in den am nächsten gelegenen Nucelluszellen eine Fragmentation der Kern-DNA. Dies deutet darauf hin, daß die Zellen dem PCD unterworfen sind (Wang, H. *et al.*, 1996; Wang, M. *et al.*, 1996), wenngleich dies noch kein hinreichendes Kriterium für apoptotischen Zelltod ist. Weiterhin wurden jedoch in den Nucelluszellen für den PCD charakteristische morphologische und ultrastrukturelle Kennzeichen gefunden (Gunawardena *et al.*, 2001). Dabei handelt es sich um Veränderungen der Tonoplastendichte, Vesikulation des Cytoplasmas, Deformation und Kondensation des Kernchromatins, Kollaps und Kondensation des Cytoplasmas und schließlich Zellkollaps. Programmierter Zelltod bei der Auflösung von Nucellus und Integumentgewebe im Rahmen der Samenentwicklung wurde in einer Reihe weiterer Systeme nachgewiesen (Chen und Foolad, 1997; Xu und Chye, 1999; Dominguez *et al.*, 2001; Hiratsuka *et al.*, 2002; Wan *et al.*, 2002).

Der Proliferation von CysEP-haltigen Ricinosomen folgt die Desintegration der Zellen. Zurück verbleiben dabei im apoplastischen Raum kollabierte und gefaltete Zellwandreste. Im Gegensatz zu den Ricinosomen, die bei der Keimung von *Ricinus*-Samen mit dem PCD der Endospermzellen erst nach erfolgter Mobilisierung der Reservestoffe und dem Transfer zu den sich entwickelnden Kotyledonen erscheinen, sind die Ricinosomen in den seneszierenden Nucelluszellen im frühen Stadium 10 DAP größer und strukturell uneinheitlich (siehe Abbildung 5.24, S.137). Die Proteinzusammensetzung weist neben der CysEP zusätzliche Enzyme auf. Im Vergleich dazu bestehen die Ricinosomen zu ~95% aus ProCysEP (siehe Abbildung 5.26, S.139).

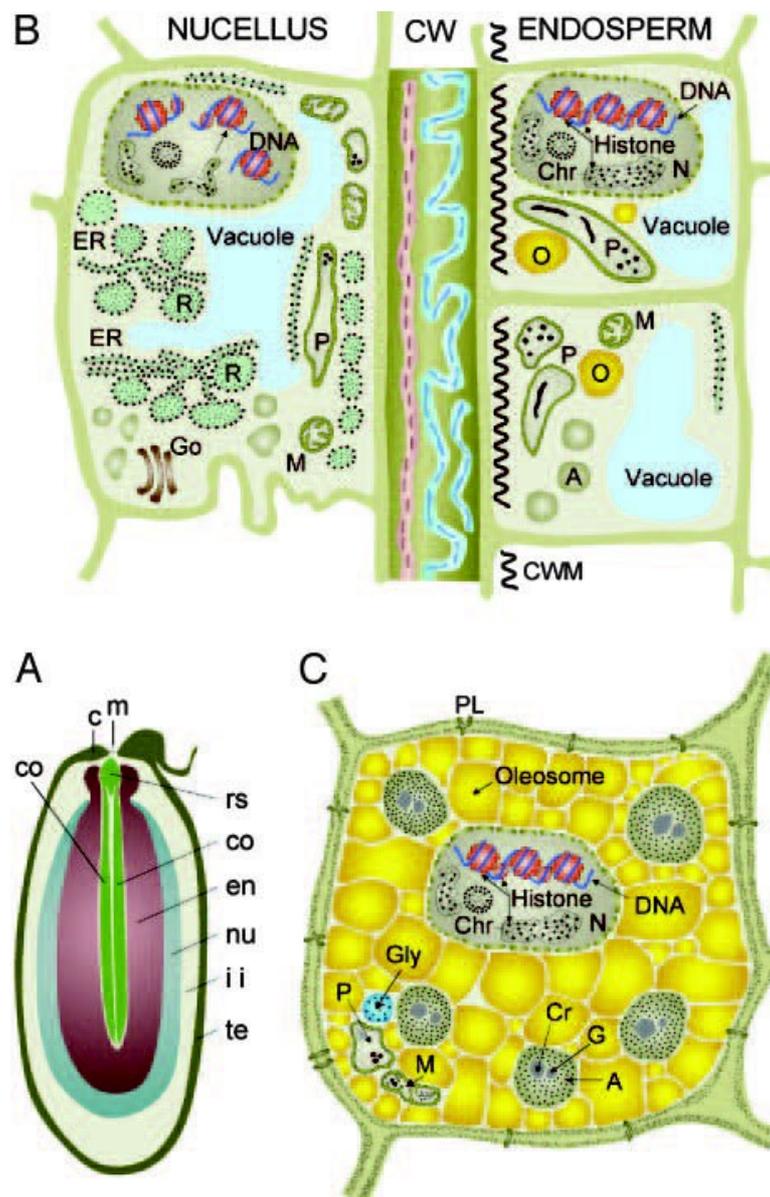


Abbildung 6.2: Seneszenz und PCD des Nucellus im sich entwickelnden *Ricinus*-Samen. A: Entwicklungsstadium 20 DAP. co, expandierende Kotyledonen; rs, Wurzel-Sproß-Achse; en, expandierendes Endosperm; nu, absterbender Nucellus; ii, inneres Integument (in dem Maße zurückgehend, in dem das Endosperm expandiert, um den Samen auszufüllen); te, Testa (Samenschale); c, Karunkula; m, Mikropyle. B: Der Übergang vom absterbenden, den PCD durchlaufenden Nucellus zum angrenzenden expandierenden Endosperm. Im Nucellus sind die DNA-Fragmentierung und eine große Menge Ricinosomen des Stadiums 10 DAP dargestellt. Im Endosperm sind Zellen mit entstehenden Oleosomen und Aleuron-Speichervakuolen gezeigt. CW, Zellwandüberreste eliminerter Nucelluszellen; CWM, Zellwandmaterial. C: Reife Endospermzelle nach Eliminierung des inneren Integuments. A, Aleuron-Körner; Chr, Chromatin; Cr, Crystalloid; G, Globoid; Go, Golgi-Apparat; M, Mitochondrien; N, Nucleus; O, Oleosom; P, Plastid; R, Ricinosom. [Abbildung aus Greenwood *et al.* (2005); © 2005 The National Academy of Sciences of the U.S.A..]

Während das Endosperm wächst, entwickelt die äußerste, an die kollabierten Nucelluszellwandreste im Apoplasten angrenzende Schicht von Endospermzellen fingerförmige Einwachsungen der äußeren periklinen Zellwände (Abbildung 5.25, S.139). Dabei handelt es sich um eine Modifikation, die konsistent mit der Transferzellmorphologie ist (Gunning *et al.*, 1974; Greenwood *et al.*, 1984) und die die aktive Plasmamembranoberfläche bis auf das 20-fache vergrößert (Thompson *et al.*, 2001). Transferzellen sind an der raschen Aufnahme und Weitergabe von Amino-Verbindungen und Photosyntheseprodukten vom Apoplasten zu den, zu versorgenden Zellen beteiligt. Die Aufnahme von Aminosäuren, Saccharose und Monosacchariden durch H⁺-gekoppelte Symporter ist für Leguminosen und Cerealien belegt (Weber *et al.*, 1997; Tegeder *et al.*, 2000). Die sich vergrößernden Endospermzellen sind noch nicht in die Hauptphase der Speicherprotein- und Ölsynthese eingetreten und kleiner als die reifen Endospermzellen (Abbildung 5.22C). Im Fall des reifen *Ricinus*-Samens sind die Einwachsungen auf den Teil der Endospermzellwand begrenzt, der der kollabierten Nucellusschicht anliegt, wogegen die anderen Zellwandbereiche, wie auch die sich weiter innen befindenden Endospermzellen über Plasmodesmata Kontakt zu den Nachbarzellen haben, um so den symplastischen Transport von Stoffen zu gewährleisten (Gunning und Overall, 1983). Damit scheinen Plasmodesmata der primäre und einzige Weg für den Salz- und Nährstofftransport zwischen den sich entwickelnden Endospermzellen von *Ricinus*-Samen zu sein.

Die *Ricinus*-Endospermtransferzellen sind unzweifelhaft in die Aufnahme von Abbauprodukten aus dem Nucellus- und Integumentzelltod während der ersten Stadien des Endospermwachstums involviert, aber sie spielen höchstwahrscheinlich eine noch wichtigere Rolle in einem späteren Stadium der Entwicklung. Die *Ricinus*-Eizelle und der reife Samen besitzen eine extensive Gefäßversorgung, die am chalazalen Ende des Samens eintritt und sich im mütterlichen Gewebe verzweigt (siehe auch Abbildung 5.19), um den Embryosack und das sich entwickelnde Endosperm zu umschließen. Die Gefäßversorgung bleibt auch nach der Zerstörung von Nucellus und innerem Integument aktiv. Über diese Gefäße werden die Metaboliten transportiert, die es ermöglichen, daß nach der Nucelluszerstörung das Endosperm in den letzten zwei Dritteln der Entwicklung eine 25-fache Erhöhung des Trockengewichts (Speicherproteine und Öle) erfährt. Die Endospermtransferzellen mit ihren Einstülpungen haben sich in diesem Stadium zu Zellen mit hochentwickelten Einwachsungen entwickelt (Greenwood, J. S.; unveröffentlichte Daten) und sind

wahrscheinlich in die Aufnahme dieser Metaboliten involviert. Es wäre von Interesse, detailliert zu untersuchen, ob im Zuge der Seneszenzvorgänge in Nucellus und innerem Integument niedermolekulare Metaboliten für Endospermzellwachstum und –vergrößerung über die beschriebenen Strukturen bereitgestellt werden.

Die reife Cystein-Endopeptidase wird in den letzten Stadien des programmierten Zelltodes aus den Ricinosomen im Endosperm der keimenden *Ricinus*-Samen freigesetzt. Dies geht einher mit der Fragmentation der chromosomalen DNA, der Degradation des Cytoplasmas, einem Weichwerden und Verschleimen der Zellwände und dem endgültigen Kollaps. Mit der Strukturuntersuchung (siehe Abschnitt 3.3, S.124ff) sollte geklärt werden, ob es sich bei dem Enzym tatsächlich um eine Endopeptidase handelt; darüberhinaus sollten zusätzliche Informationen über die mögliche Substratspezifität erhalten werden.

Der Vergleich der Primär-, Sekundär- und Tertiärstrukturen von *Ricinus* CysEP, der Prolin-spezifischen Protease aus Ingwer (GPII), Papain und Cathepsin B (CatB) (Abbildung 5.32 und Abbildung 5.33B) verdeutlicht die Konservierung der sechs α -Helices, sieben β -Faltblätter, der katalytische Triade (Cys-26, His-162 und Asn-183) und, mit Ausnahme von CatB, der Position der drei Disulfidbrücken. Ein *Loop*, der wie bei CatB, das aktive Zentrum dieser Protease an der C-terminalen Seite der Spaltstelle bedeckt und sie damit zu einer Exopeptidase macht (Musil *et al.*, 1991), fehlt bei der CysEP. Das erklärt warum es sich bei letztgenannter um eine Endopeptidase handelt. Die bis zu einem R-Faktor von 18,1% verfeinerte Kristallstruktur der CysEP mit kovalent gebundenem Inhibitor H-D-Val-Leu-Lys-CMK ermöglicht die Lokalisation der Substratbindungspositionen S4, S3, S2 und S1, sowie S1' und S2' innerhalb der katalytischen Tasche. Wie in GPII, Papain und CatB (Barrett und Rawlings, 2001; Turk und Guncar, 2003) befindet sich diese zwischen den zwei Domänen des Enzyms (Abbildung 5.33). Die rechte R-Domäne ist charakterisiert durch großes verdrehtes β -Faltblatt, während die linke L-Domäne vier auffällige α -Helices besitzt.

Die Analyse der von der *Ricinus* CysEP bevorzugten Substrate bzw. Spaltstellen anhand der Kinetik der Hydrolyse von synthetischen fluorogenen Peptiden erbrachte eine Präferenz an P1 für His, Arg, Lys, Phe, Leu, Tyr, Met, Thr und Trp, während hohe k_{cat}/K_m -Werte an der P2-Substratposition mit Leu, Val, Ile, Met und auch mit den aromatischen Seitenketten Phe, Tyr, Trp beobachtet wurden. Aus diesem Grunde ist die Einbringung des Inhibitors H-D-Val-Leu-Lys-CMK in die katalytische Tasche der CysEP und der

Vergleich mit den modellierten und experimentell definierten Positionen von Substrat-analoga in GPII (Choi *et al.*, 1999) beziehungsweise Papain (Stubbs *et al.*, 1990) relevant. Wie in Abbildung 5.34A gezeigt, ist der Inhibitor kovalent an das Cys-26 im aktiven Zentrum gebunden und seine zwei L-Aminosäuren bilden ein erweitertes antiparalleles β -Faltblatt mit den zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Leu-P2 und Gly-68 und einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen Lys-P1 und Asp-161. Diese Anordnung orientiert die Spaltstelle eines gebundenen Substrates zum, durch His-162 und Asn-183 aktivierten, nucleophilen Cys-26 hin. Die im Katalysezyklus entstehende negative Ladung des Sauerstoffatoms von Lys-P1 befindet sich in Nähe zu den Stickstoffatomen der Seitenkette von Gln-20 und den Hauptketten von Ser-25 und Cys-26, die zusammen die Oxyaniontasche formen (Abbildung 5.34A in Abschnitt 3.3.4).

Die Lys-P1-Seitenkette interagiert über seine ϵ -Aminogruppe mit Asn-66, während die proximalen Kohlenstoffatome in Kontakt zu einer hydrophoben Region, gebildet von Gly-24 und Gly-67 (Abbildung 5.34A), stehen. Diese Art S1-Subdomäne mit ihrer flachen Vertiefung der Oberfläche läßt eine ganze Reihe von Resten zu. Das stimmt auch mit der von Dr. D. Simpson experimentell gefundenen relativ geringen Spezifität von P1 gegenüber den synthetischen Substraten überein (siehe Tabelle 5.5 in Abschnitt 3.3.1).

Die S2-Bindungstasche der CysEP wird von den Aminosäureresten Leu-69, Met-70, Ala-136 und der Peptidkette Leu-160-Gly-163 definiert. Der Strukturvergleich mit den entsprechenden Subdomänen der *Zingiber*- und Papain-Cystein-Endopeptidase (Abbildung 5.34B) zeigt eine deutliche Tasche bei der *Ricinus* CysEP. Die geräumig angelegte Bindungstasche der *Ricinus* CysEP erklärt, warum eine breite Palette an Aminosäureresten akzeptiert wird. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß die S2-Bindungstasche die Hauptdeterminante für die Spezifität der Cystein-Endopeptidasen ist (Bode und Huber, 2000).

Aus der Analyse der Spaltprodukte des β -Caseinverdaus ergibt sich, daß die *Ricinus*-CysEP Prolin an P1 oder P1' akzeptiert und deshalb sowohl am N-, als auch am C-Terminus dieser Aminosäure spalten kann (siehe Tabelle 5.8 in Abschnitt 3.3.2). Dies ist eine sehr ungewöhnliche Spaltspezifität (Cunningham und O'Connor, 1997; Simpson, 2001). Allerdings steht dieser Befund im Widerspruch zu den Versuchen mit den synthetischen Peptiden; hier rangierte das Peptid mit Prolin an P1 deutlich an letzter Position (siehe Tabelle 5.5 in Abschnitt 3.3.1). Im allgemeinen ist es so, daß viele Proteine durch ein Prolin

in Nachbarschaft zum ersten oder letzten Aminosäurerest gegen proteolytischen Abbau geschützt sind.

Ausgehend von der gegenwärtigen CysEP-Struktur und dem Vergleich mit anderen Pappain-artigen Cystein-Peptidasen ist es schwierig, strukturelle Determinanten für diese Prolinspezifität im Detail zu erkennen. Die allgemein etwas weitere Substratbindungsfurche sollte, was die Konformation der gebundenen Substratkette betrifft, eine größere Freiheit gewähren. Das würde vielleicht auch die, aus einem gebundenem P1-Prolin resultierenden veränderten P2- und P1'-Konformationen einschließen. In gleicher Weise gilt dies natürlich für ein gebundenes Substrat mit Prolin in P1' und die daraus resultierenden atypischen P2-, P1-, P2'-Konformationen. Prolin bewirkt innerhalb der Polypeptidkette einen Knick, man findet es regelmäßig am Übergang von der Helix zum *Loop*.

Für ein besseres Verständnis dieser ungewöhnlichen Spaltspezifität sind weitere biochemische und kristallographische Analysen dieser Substratspezifität notwendig. Die Spaltung Prolin-haltiger Peptidbindungen ist im Rahmen des programmierten Zelltodes für den Abbau der Zellwandproteine, die erhebliche Mengen an glykosylierten Prolin- und Hydroxyprolinresten enthalten (Buchanan *et al.*, 2000), von Bedeutung. Die Bindung von Prolin in die S1- oder S1'-Tasche ermöglicht der *Ricinus* CysEP, während des programmierten Zelltodes eine größere Bandbreite an Proteinen zu spalten.

Das relative Verhältnis der zwei beobachteten N-Termini der *Ricinus* CysEP nach Selbstaktivierung (90% ...EKVD↓TVPA...; 10% ...KVDT↓VPAS...) verdeutlicht die vorrangige Bedeutung der S2-Tasche von Cystein-Endopeptidasen und der korrespondierenden P2-Position eines Substrates für dessen Affinität und damit die Umsatzrate. Von den zwei beobachteten N-Termini der reifen *Ricinus* CysEP (siehe Abschnitt 3.3.3) tritt derjenige zu 90% bevorzugt auf, der Val in der P2-Position der zu spaltenden Proform anbietet. Das stimmt sowohl mit den kinetischen Daten (Tabelle 5.4, S.144), als auch mit den Ergebnissen des β -Casein-Verdaus überein (Tabelle 5.9, S.151). Dagegen zeigte Asp in P2-Position in beiden Experimenten eine geringe Affinität zum Enzym. Thr in Position P1 besitzt zwar nach den Ergebnissen mit den synthetischen Peptiden eine im Gegensatz zu Asp höhere Affinität zur S1-Tasche der CysEP, jedoch erfährt dies in der Summe eine geringere Gewichtung, weil die S2-Bindungstasche die Hauptdeterminante für die Spezifität der Cystein-Endopeptidasen ist (Bode und Huber, 2000).

Informationen über die N-Termini der drei Cystein-Endopeptidasen mit KDEL-Motiv aus *Arabidopsis* liegen nicht vor. Es wäre denkbar, daß die Stabilität der drei KDEL-Peptidasen sich unterscheidet und entsprechend der von Varshavsky und Mitarbeitern entdeckten „*N-end-rule*“ über die N-terminale Aminosäure gesteuert wird (Bachmair *et al.* 1986). Die *Ricinus* CysEP wird entsprechend der Beobachtung, daß für die meisten Cystein-Peptidasen die S2-Bindungstasche die Hauptdeterminante der Spezifität darstellt (Bode und Huber 2000), bevorzugt in Nachbarschaft zu einem hydrophoben Rest an P2 abgespalten. Legt man für die Prozessierung der drei KDEL-Peptidasen in *Arabidopsis* gleiches zugrunde, dann wäre *AtCep1* (Val an P2) mit einem N-terminalen Thr stabil, *AtCep2* (Val an P2) mit Arg und *AtCep3* (Leu an P2) mit Lys am N-Terminus dagegen instabil, was eine kurze biologische Halbwertszeit zur Folge hätte (siehe Sequenz-Vergleich der KDEL-Peptidasen Abbildung 5.16, S.127). Jedoch handelt es sich hierbei um rein theoretische Erwägungen, denen keine biochemischen Befunde zugrunde liegen.

6.2 Peroxisomale Peptidasen

Vor der Wiederentdeckung der von Vigil (1970) und Mollenhauer und Totten (1970) erstbeschriebenen Ricinosomen in *Ricinus* durch Gietl und Mitarbeiter (Schmid *et al.*, 1998) wurde die im Rahmen dieser Arbeit bearbeitete *Ricinus* CysEP aufgrund ihrer Eigenschaft, die prä-gMDH zur reifen Form zu spalten, für die Glyoxysomale Processing Peptidase (GPP) gehalten (Gietl *et al.*, 1997). Die CysEP wurde in der Folge jedoch als Leitenzym der Ricinosomen erkannt (Schmidt *et al.*, 1998).

Eine *in-silico* Analyse des *Arabidopsis*-Genoms (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) auf mögliche peroxisomale Proteine erbrachte anhand des C-terminalen PTS1, SKL bzw. PKL drei Peptidase-Sequenzen (www.araperox.uni-goettingen.de; Reumann *et al.*, 2004):

- At5g47040 kodiert für ein Protein mit 888 Aminosäuren, SKL-Terminus und einem Molekulgewicht von 97,9 kDa. Bei dem zur *E. coli* Lon-Protease homologen Protein handelt es sich um eine Serin-Protease (Clan SF, Familie S16; Barrett *et al.*, 2001b) mit Serin als Nucleophil in der katalytischen Tasche und der charakteristischen katalytischen Diade Ser-Lys (Besche und Zwickl, 2004).
- At2g41790 kodiert für ein Protein mit 970 Resten, PKL-Terminus und einer Molekülmasse von 111 kDa. Bei dem zur Insulinase (*Insulin-degrading enzyme*, IDE) aus Maus homologen Protein handelt es sich um eine Zn-Metallopeptidase mit dem für die Pitriylisin-Familie (Clan MB, Familie M16; Rawlings *et al.*, 2001b) typischen, inversen HXXEH-Zinkbindungsmotiv (Roth, 2004).
- At1g28320 kodiert für ein Protein mit 709 Aminosäuren, SKL-Terminus und einer Molekülmasse von 76,1 kDa. Bei dem Protein handelt es sich um eine Trypsin-artige Serin-Protease vom Typ der Deg-Peptidasen mit der katalytischen Triade His-Asp-Ser (Chung und Goldberg, 2004).

Die drei Protease-Typen wurden in der Einführung besprochen. Durch die vorliegenden Befunde anderer Arbeitsgruppen, die unten kurz skizziert werden, ließen sich die peroxisomale Lon-Protease und die Pitriylisin-artige peroxisomale Zn-Metallopeptidase als mögliche Glyoxysomale Processing Peptidase weitgehend ausschliessen.

Peroxisomale Lon Protease

Van Veldhoven und Mitarbeiter haben die humane Peroxisomale Lon-Protease kloniert und charakterisiert (de Walque *et al.*, 2002). Die peroxisomale Lon-Protease ist wie die mitochondriale Lon-Protease in den Umsatz von Matrixproteinen involviert und degradiert wahrscheinlich solche mit oxidativen Schäden. Die ATP-abhängige Chaperonfunktion könnte die Zerlegung von Proteinkomplexen und die Entfaltung von Proteinen bewerkstelligen. In diesem Zusammenhang ist noch erwähnenswert, dass Veldhoven und Mitarbeiter ursprünglich auf der Suche nach der Peroxisomalen Processing Peptidase waren.

Zn-Metallopeptidasen vom Pitrilysin-Typ

Ein Homologes von Insulysin ist die peroxisomale Zn-Metallopeptidase in *Arabidopsis*, eine Peptidase vom Pitrilysin-Typ (At2g41790) mit 970 Aminosäuren, C-terminalem PTS1 SKL und einer Molekülmasse von 111 kDa (Reumann *et al.*, 2004). Sie könnte analog dem von Authier *et al.* (1996) in Peroxisomen des Leberparenchyms der Ratte beschriebenen Insulysin die Peptide, die beim Prozessieren der höhermolekularen Vorstufen entstanden sind, abbauen. Das für Insulysin diskutierte native Substrat, das Polypeptid Insulin liegt mit 51 Aminosäuren im Größenbereich der Signalsequenzen von Pflanzenmitochondrien bzw. Chloroplastentransitpeptiden, die im Durchschnitt etwa 20-60 bzw. 30-80 Aminosäuren lang sind (Zhang und Glaser, 2002).

Glaser und Mitarbeiter haben die entsprechende mitochondriale Metallopeptidase (*Presequence Peptidase*, PreP) aus *Solanum tuberosum* isoliert und charakterisiert. Die PreP baut die beim mitochondrialen Proteinimport von der Mitochondrialen Processing Peptidase (MPP) bei der Prozessierung der importierten höhermolekularen Vorstufen generierten N-terminalen Signalpeptide zu kleineren Peptiden ab (Stähl *et al.*, 2002; Moberg *et al.*, 2003). Im *Arabidopsis*-Genom wurden zwei homologe Peptidasen in Mitochondrien (*AtPrePI*) und Chloroplasten (*AtPrePII*) identifiziert (Stähl *et al.*, 2005). Es handelt sich bei beiden um Metallopeptidasen aus der Pitrilysin-Subfamilie M16A (Barrett *et al.*, 2001). Signalpeptide bilden, wenn man den Import von jeweils etwa 800 kernkodierten Proteinspezies in die beiden Organellen-Typen zugrunde legt (Zhang und Glaser, 2002), ein enormes Aminosäurereservoir. Allerdings wurde für Mitochondrien gezeigt, daß sich Signalpeptide schädigend auf das Membranpotential auswirken und deshalb rasch degradiert werden müssen (Wieprecht *et al.*, 2000).

Nachdem innerhalb der Arbeitsgruppe Gietl zwischenzeitlich noch mehrmals versucht wurde, die GPP zu identifizieren, wurde in einem erneuten Anlauf im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Glyoxysomale Processing Peptidase aus drei Tage alten und nicht ergrünten Kotyledonen von *Citrullus* als Deg15 identifiziert, charakterisiert und gereinigt. Die Identifikation der Deg15 als GPP erfolgte durch den von Prof. Dr. I. Adamska von der Universität Konstanz zur Verfügung gestellten anti-*At*Deg15-Peptid-Antikörper, der gegen die 15 Aminosäuren lange Sequenz ETAAVHPGGSSGAV aus dem Bereich um das katalytische Serin gerichtet ist. Die über Ultrazentrifugation am Saccharose-Dichtegradienten angereicherten Glyoxysomen wurden für die Reinigung verdünnt, sonifiziert, zentrifugiert und filtriert. Im ersten Reinigungsschritt wurde die mit dem fluorogenen Protease-Substrat Cbz-Phe-Arg-AMC detektierte Aktivität über DEAE-Säule angereichert. Zunächst wurde versucht, die GPP/Deg15 über die drei weiteren Säulen Gelfiltration, Hydroxyapatit und MonoQ zu reinigen. Aufgrund der gravierenden Aktivitätsverluste wurde ein alternativer Reinigungsgang über präparative native Sephadex-IEF (Görg *et al.*, 2002) und 2-D etabliert.

Bei der Suche nach der Glyoxysomalen Processing Peptidase wurde von der prozessierenden Funktion des Enzyms ausgegangen. Die meisten peroxisomalen Matrixproteine werden entweder mit einem C-terminalen PTS1 oder einem N-terminalen PTS2 an freien Ribosomen des Cytoplasmas synthetisiert. Die Proteine mit PTS-Sequenzen werden von entsprechenden cytosolischen Importrezeptoren erkannt, zum Importapparat befördert und ins Peroxisom transferiert (Übersichtsartikel von Subramani *et al.*, 2000). Nach Eintritt in die peroxisomale Matrix wird das N-terminale Propeptid der höhermolekularen Vorstufe mit der Spaltspezifität C-X↓/X-C↓ von der Processing Peptidase abgespalten (Biermann und van den Bosch, 1999). Für das Enzym Citrat-Synthase aus *Cucurbita* wurde von Nishimura und Mitarbeitern gezeigt, daß ein Cys in Nachbarschaft zur Spaltstelle für die Prozessierung, nicht jedoch für die Funktion des Enzyms essentiell ist, denn auch unprozessierte Citrat-Synthase war enzymatisch aktiv (Kato *et al.*, 1996). Mit synthetischen fluoreszenzgequenchten Peptiden, die die authentischen Spaltstellen der drei glyoxysomal prozessierten Enzyme Citrat-Synthase (gCS), Malatdehydrogenase (gMDH) und Thiolase repräsentieren, gelang es, die ungewöhnliche Präferenz der GPP für Cys nachzuweisen. Denn alle drei verwendeten Peptide wurden in Nachbarschaft zum Cys gespalten; das gMDH-Peptid und das Thiolase-Peptid an der authentischen Spaltstelle mit Cys an P2 bzw. an P1

und das gCS-Peptid an einer nicht-authentischen Position drei Reste weiter C-terminal. Der Grund für die unkorrekte Prozessierung könnte sein, daß die höhermolekulare Vorstufe eines glyoxysomalen Proteins noch weitere für die korrekte limitierte Endoproteolyse wichtige Determinanten besitzt, die von den zehn Aminosäureresten der fluorogenen Peptide nicht abgedeckt werden.

Die verwandte Protease DegP aus *E. coli* degradiert *in-vitro* zwar unstrukturierte Substrate wie β -Casein, dagegen werden Proteine in nativer Konformation und synthetische Peptide nicht gespalten (Skorko-Glonek *et al.*, 1995). DegP bevorzugt an P1 die unpolaren verzweigten Reste Val und Ile; zusätzlich sollen weitere strukturelle Determinanten Einfluß auf die Spaltspezifität haben (Kolmar *et al.*, 1996).

Die Identifikation der Deg15-Peptidase aus Glyoxysomen von *Citrullus* erfolgte zunächst in der über DEAE- und Benzamidin-Chromatographie gereinigten Probe im *Western-blot* mit dem anti-*At*Deg15-Peptid-Antikörper. Das Signal war identisch mit der über Aktivitätsgel-Assay mit dem fluorogenen Substrat Cbz-FR-AMC detektierten Aktivität (Abschnitt 5.4.2.2, Abbildung 5.45, S.184). Im Rahmen der Arbeit wurde ein alternativer Reinigungsgang über (1) DEAE-Säule, (2) präparative native Sephadex-IEF und (3) 2-D-Elektrophorese etabliert. Durch Korrelation von 2-D-PAGE und 2-D-*Western-blot* konnten die Molekülmasse und der pI der Deg15 zu 72 kDa bzw. 5,25 bestimmt werden (Abschnitt 5.4.3.2, Abbildung 5.49, S.190). Die peroxisomale Deg15 aus *Arabidopsis* (Reumann *et al.*, 2004) ist im Vergleich dazu ein Protein mit 709 Aminosäuren und einer Molekülmasse von 76 kDa, sowie einem rechnerisch ermittelten pI von 8,0.

Der Name "Deg15" hat systematischen Bezug und geht auf die Verwandtschaft zum Prototypen der Deg-Peptidasen, der *E. coli* DegP zurück (Huesgen *et al.*, 2005). Der Terminus „Glyoxysomale Processing Peptidase“ bezieht sich dagegen auf die Funktion der limitierten Endoproteolyse gegenüber höhermolekularen Vorstufen von peroxisomalen Matrixproteinen. Die Bezeichnungen GPP und Deg15 wurden im Rahmen dieser Arbeit synonym verwendet. Im weiteren Verlauf der Experimente konnte mit Ultrafiltration und Gelatine-Aktivitätsgelen belegt werden, daß die Deg15/GPP in zwei Formen vorliegt, einem Monomer und einem Dimer, die *in-vitro* miteinander im Gleichgewicht stehen und deshalb möglicherweise nur schwer zu isolieren sind. Wie mit dem Substrat Cbz-FR-AMC im Fluoreszenz-Aktivitätsgel gezeigt wurde, unterschied sich das Monomer vom Dimer durch eine Substratspezifität für Arg/Lys an P1 und hydrophobe und unpolare Reste an

P2 ($\Phi R/K\downarrow$). Weil aber andererseits für das über DEAE-Säule und präparative native Sephadex-IEF gereinigte Gemisch beider Formen die prozessierende Spezifität mit Cys an P1 oder P2 ($X-C\downarrow/C-X\downarrow$) nachgewiesen wurde, ist davon auszugehen, daß die prozessierende Aktivität dem Dimer zukommt. Diese Spaltspezifität für Proteasen ist nach Aussage von Fachleuten sehr ungewöhnlich und es ist nur schwer vorstellbar, daß eine Spezifität $\Phi R/K\downarrow$ mit einer Spezifität $X-C\downarrow/C-X\downarrow$ funktionell vereinbar ist.

Aus diesem Grund beschreiben die Ergebnisse, die im Rahmen der Charakterisierung der GPP/Deg15 mit dem fluorogenen Substrat Cbz-FR-AMC gemacht wurden, die Eigenschaften der monomeren Form mit degradierender Funktion. In den Versuchen mit den Klassen-spezifischen Inhibitoren verhielt sich die Deg15 als Serin-Peptidase (Abschnitt 5.4.4.7, Abbildung 5.56, S.205). Die Peptidaldehyde Antipain und Leupeptin, sowie die Chloromethylketon-Inhibitoren TLCK und H-D-Val-Leu-Lys-CMK, alles kovalente Inhibitoren, hemmten die Deg15 effizient. Peptidaldehyde sind Analoga des Übergangszustandes für Serin und Cystein-Peptidasen, deren Aldehydgruppen extrem stabile Hemiacetale mit dem reaktiven Nucleophil der Peptidase bilden (Thompson, 1973). Die vier genannten Inhibitoren tragen alle einen basischen Rest an P1 und einen hydrophoben Rest an P2. Bemerkenswerterweise zeigt der Serin-Peptidasen-Inhibitor PMSF keinerlei Wirkung gegenüber der Deg15. Gleiches wurde auch für die *E. coli* DegP berichtet (Lipinska *et al.*, 1990).

Die GPP/Deg15 besitzt für ein eukaryontisches Enzym ein ungewöhnlich hohes Temperaturoptimum bei 45°C (Abschnitt 5.4.4.4, Abbildung 5.53, S.200). Über 50°C nahm die Aktivität bis 55°C steil ab und über 60°C erfolgte eine irreversible Schädigung. Mit SDS-PAGE-Analyse konnte gezeigt werden, daß die glyoxysomale Deg15 bei 45°C, dem Temperatur-Optimum der proteolytischen Aktivität, *in-vitro* innerhalb von 24 h eine massive Degradation der glyoxysomalen Matrixproteine herbeiführt. Bei dieser unphysiologischen Temperatur dürfte bereits ein Großteil der Proteine geschädigt sein. Im Vergleich dazu war bei 30°C kaum eine Proteolyse zu beobachten.

Die von del Rio und Mitarbeitern in Peroxisomen von seneszierenden Blättern von *Pisum* beschriebene 76 kDa-Serin-Peptidase EP3 ist ebenfalls bei 50°C noch aktiv, wie mit Gelatine-Aktivitätsgel gezeigt wurde. Im weiteren haben Del Rio und Mitarbeiter gezeigt, daß EP3 und EP4, letztere ist eine Serin-Peptidase mit 64 kDa, zusammen 70% und damit die Hauptaktivität der degradierenden proteolytischen Aktivität in Peroxisomen seneszierender Blätter bilden (Distefano *et al.*, 1997). In einer weiteren Arbeit (Distefano *et al.*,

1999) wurde die Rolle dieser Endopeptidasen im allgemeinen Proteinabbau im Rahmen der Blattseneszenz beschrieben. In diesem Zusammenhang wurde von einem starkem Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies zur Einleitung des Programmierten Zelltodes in seneszierenden Blättern berichtet (del Rio *et al.*, 1998). Der möglicherweise zur Deg15 in *Citrullus vulgaris* homologen Peptidase in *Pisum* schreiben die Autoren also innerhalb der Peroxisomen eine degradierende Funktion im Rahmen des PCD in seneszierenden Blättern zu. In jungen Blättern wurde die EP3-Aktivität nicht nachgewiesen. Das ist auch plausibel, denn es handelt sich bei jungen Blättern um wachsendes Gewebe, in dem die anabolen Vorgänge überwiegen. Bis dato wurden von del Rio und Mitarbeitern jedoch keine der beschriebenen Peptidasen *in-situ* lokalisiert oder sequenziert.

Bei anderen Deg-Peptidasen wurde ein ähnlich ungewöhnliches Temperaturverhalten beobachtet. Die *E. coli* DegP wurde von Georgopoulos und Mitarbeitern als Hitzeschockprotein identifiziert (Lipinska *et al.*, 1990). DegP wechselt dabei in temperaturabhängiger Weise zwischen Chaperon- und Peptidaseaktivität; bei 28°C war DegP in der Lage, chemisch denaturierte Thiolase und Malat-Synthase zurückzufalten (Spiess *et al.*, 1999). Im Temperaturbereich zwischen 37°C und 55°C stieg die proteolytische Aktivität an und fiel bis 60°C steil ab; bei höheren Temperaturen erfolgte die Denaturierung der Protease (Skorko-Glonek *et al.*, 1995). Chassin *et al.* (2002) beschreiben für die *Arabidopsis* Deg1-Peptidase aus Chloroplasten einen Anstieg der proteolytischen Aktivität von 15°C bis 42°C und selbst nach fünfminütigem Kochen zeigte die DegP1 noch Restaktivität.

Bei erhöhten Temperaturen verändern Proteine ihre Konformation und beginnen zu denaturieren. Dabei werden sonst im Molekülinneren verborgene hydrophobe und verzweigt-kettige Reste ins Solvens exponiert (Kolmar *et al.*, 1996). *E. coli* DegP ist in der Lage, durch Hitzeeinwirkung mißgefaltete und denaturierte Proteine zu degradieren, nicht jedoch native Konformationen (Lipinska *et al.*, 1990; Skorko-Glonek *et al.*, 1995). In diesem Zusammenhang wird noch zu untersuchen sein, ob auch die GPP/Deg15 die für *E. coli* DegP beschriebene Chaperonaktivität besitzt. Interessanterweise wurde bei GPP/Deg15 nach Inkubationen bei erhöhten Temperaturen beobachtet, daß die proteolytische Aktivität nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur stark verringert war (Daten nicht gezeigt). Dies könnte zum einen auf, das fluorogene Substrat verdrängende konkurrierende Substrate, nämlich hitzedenaturierte Proteine oder zum anderen auf eine

Verlagerung in Richtung Rückfaltungsaktivität bei gleichzeitiger Einschränkung der proteolytischen Aktivität zurückzuführen sein. Lipinska und Mitarbeiter haben beobachtet, daß DegP auch für die Toleranz gegenüber oxidativem Streß notwendig ist (Skorko-Glanek *et al.*, 1999). Die verwandten Deg-Proteasen bei *E. coli*, DegP und DegQ dienen ebenfalls der Kompensation von Faktoren wie erhöhter Temperatur oder oxidativem Stress (Waller und Sauer, 1996; Pallen und Wren, 1997). DegQ (HhoA) zeigt ähnliche Eigenschaften und hat die gleiche Lokalisation wie DegP (Kolmar *et al.*, 1996). Dieser Befund dürfte noch mehr für die Peroxisomen mit ständiger oxidativer Belastung von Relevanz sein.

Die pH-Abhängigkeit der GPP/Deg15 stieg von pH 4,5 bis pH 9 auf mehr als das fünf-fache an (Abschnitt 5.4.4.2, Abbildung 5.51, S.197). Die anderen bekannten Deg-Peptidasen weichen dem gegenüber in ihrem Verhalten völlig ab. Die Aktivität der Deg1 aus Chloroplasten hatte bei pH 6 ein Maximum und fiel bis pH 9 steil ab (Chassin *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu war die Aktivität der *E. coli* DegP in einem Bereich von pH 4,8-10 unabhängig vom pH-Wert (Lipinska *et al.*, 1990). Die Abweichungen des pH-Verhaltens der charakterisierten Deg-Peptidasen stehen offenbar im Zusammenhang mit dem umgebenden Milieu. Adam und Mitarbeiter sehen das pH-Verhalten der Deg1 in Verbindung zum leicht sauren pH im Thylakoidlumen (Chassin *et al.*, 2002). Für Peroxisomen liegen keine eindeutigen Informationen über den pH vor.

Die GPP/Deg15 zeigte im Fluoreszenz-Assay mit Phosphat-Puffer im Vergleich zu Tris-, MES- und Acetatpuffer eine etwa doppelt so hohe proteolytische Aktivität (Abschnitt 5.4.4.3, Abbildung 5.52, S.199). Der durch Phosphat-Puffer hervorgerufene Effekt könnte auf die Ausfällung von Ca^{2+} -Ionen zu unlöslichem $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ zurückzuführen sein. Diese Annahme wird durch den Befund erhärtet, daß der Chelatbildner EDTA ebenfalls einen stark aktivierenden Effekt ausübt (siehe Abbildung 5.56, S.205). Da die GPP/Deg15 als Gemisch von miteinander im Gleichgewicht stehendem Monomer und Dimer vorliegt (Abschnitt 5.4.3.1, Abbildung 5.48, S.189), ist wahrscheinlich unter dem Einfluß der beiden Ca^{2+} -entziehenden Agenzien EDTA und Phosphat eine Verlagerung des Gleichgewichtes zum Monomer hin erfolgt. Wenn Monomer und Dimer miteinander im Gleichgewicht stehen, dann müßte sich dieses auch zum Dimer hin verschieben lassen. Das war tatsächlich der Fall und konnte, da nur das Monomer aufgrund der Spaltspezifität $\Phi\text{-R/K}\downarrow$ durch das fluorogene Substrat Cbz-FR-

AMC detektiert wird, auch belegt werden. Im Verlauf der Reinigung über die Hydroxyapatit-Säule kam es zu hohen Aktivitätsverlusten von bis zu 80%. Als funktionelle Bestandteile enthält das Säulenmaterial Hydroxyapatit Ca^{2+} -, Phosphat- und Hydroxid-Ionen (Tiselius *et al.*, 1956). In Verbindung mit Ca^{2+} -bindenden Agenzien oder unter sauren Pufferbedingungen werden aus der Säulenmatrix Ca^{2+} -Ionen freigesetzt. Im vorliegenden Fall könnte durch die Ca^{2+} -Ionen die Dimerisierung des Monomers erfolgt sein. Im *in-vitro*-Assay wurde diese Wirkung von Ca^{2+} -Ionen auf die GPP/Deg15 bestätigt (Abschnitt 5.4.4.9, Abbildung 5.58, S.208). Allerdings hatten Ca^{2+} -Ionen in Form von gelöstem CaCl_2 diesen Effekt nur nach Vorbehandlung der Probe mit EDTA; danach fiel die Aktivität unter Ca^{2+} -Einfluß auf 22% ab. Denkbar ist (1) hierbei eine bislang unbekannte Konditionierung der Ca^{2+} -Ionen oder (2) eine durch EDTA aufgehobene Besetzung der für die Dimerisierung notwendigen Ca^{2+} -Positionen am Monomer durch andere divalente Metallionen, wie z.B. Mn^{2+} . Distefano *et al.* (1996) haben für die 76 kDa-Serin-Peptidase EP3 in Peroxisomen aus seneszierenden Blätter von *Pisum sativum* ebenfalls beobachtet, daß die Aktivität durch EDTA auf 170% des Ausgangswertes gesteigert wurde. Dies erhärtet die oben formulierte Annahme, daß es sich bei dieser degradierenden Peptidase um das Homologe der monomeren glyoxysomalen *Citrullus* Deg15 und auch der *Arabidopsis* Deg15 (At1g28320) handelt.

Intrazellulär ist Ca^{2+} einerseits ein wichtiger sekundärer Botenstoff, andererseits auch funktioneller Bestandteil der Calmoduline, das sind Ca^{2+} -abhängige regulatorische Proteine (Yang und Poovaiah, 2003). Calmodulin wurde auch in Glyoxysomen nachgewiesen (Yang und Poovaiah, 2002) und könnte für die Funktion und Regulation der GPP relevant sein. Interessanterweise enthält eine weitere Gruppe von Processing Peptidasen, die Proprotein-Convertasen, Ca^{2+} als essentiellen Bestandteil (Seidah *et al.*, 1997). Bemerkenswert ist, daß auch der Proteinimport in die Chloroplasten vom sekundären Botenstoff Ca^{2+} -Ionen reguliert wird. Der Import von Proteinen ohne Transitpeptid ist dagegen unabhängig von Ca^{2+} -Ionen (Chigri *et al.*, 2003).

Bei Reinigung der GPP/Deg15 über Benzamidin-Säule unter Hochsalzbedingungen zeigten sich Aktivitätsverluste von bis zu 90% (Abschnitt 5.4.2, Abbildung 5.43, S.181). Durch (1) Entsalzung und (2) Zugabe eines durch Ultrafiltration mit 10 kDa-MWCO-Membran beim Ankonzentrieren des DEAE-Pools abgetrennten Durchlaufs mit kleinen glyoxysomalen Matrixproteinen konnten die ursprüngliche Aktivität in zwei Stufen zu

90% wiederhergestellt werden. Da für erhitzten Amicon-Durchlauf, β -Casein, Magermilchpulver und BSA gleiche aktivitätssteigernde Effekte beobachtet wurden, ist davon auszugehen, daß die Deg15 durch denaturierte Proteine stimuliert wird. Der Salz-Effekt deutet dabei auf einen Einfluß durch Proteininteraktion hin, denn hohe Salzkonzentrationen unterbinden eine solche Wechselwirkung.

Als Proteininteraktionsdomänen von Deg-Peptidasen wurden PDZ-Domänen identifiziert (Kim und Kim, 2005). Durch Sequenzvergleiche wurden Homologe zu PDZ-Domänen auch bei Pflanzen identifiziert (Pointing, 1997; Chory und Wu, 2001; Lam und Blumwald, 2002; Ishikawa *et al.*, 2005), wengleich diese bislang weitgehend unerforscht sind. Die primäre Funktion von PDZ-Domänen besteht in der Erkennung eines ~ 5 -Reste-Motivs, das sich in der Regel, jedoch nicht zwingend am C-Terminus des Interaktionspartners befindet. Es sind auch interne Sequenzen beschrieben, die den Terminus strukturell imitieren (Harris und Lim, 2001). PDZ-Domänen bestehen aus einer ~ 90 -Aminosäuren-Polypeptidkette mit sechs β -Strängen und zwei α -Helices in einer kompakten globulären Faltung mit N- und C-Terminus in enger Nachbarschaft. Peptid-Liganden binden in einer ausgedehnten Tasche zwischen dem β -Strang B und der α -Helix B als β -Strang- und Faltblatt-Erweiterung (Harrison, 1996). Die Nomenklatur innerhalb des PDZ-Bindungsmotivs ist vom C-Terminus ausgehend P_0 , P_{-1} , P_{-2} , P_{-3} , usw., wobei die Positionen P_0 und P_{-2} die Hauptdeterminanten der Peptidbindung darstellen. Am Ende der Peptid-Bindungstasche befindet sich der Carboxylat-Bindungs-Loop mit dem konservierten R/K-X-X-X-G-L-G-F-Motiv und daran anschließend der β -Strang B, der mit dem Peptid-Strang ein β -Faltblatt bildet. Die Struktur der PDZ-Domäne ändert sich im Rahmen der Liganden-Bindung nur unwesentlich (Doyle *et al.*, 1996). Bei *E. coli* DegP wurde im genannten Loop ein dem GLGF-Motiv entsprechendes ELGI-Motiv gefunden (Krojer *et al.*, 2002). Die Deletion der PDZ-Domänen hat starke Auswirkung auf die Funktion der Protease (Spiess *et al.*, 1999). Die PDZ-Domäne der regulatorischen *E. coli* DegS ist ein periplasmatischer Streßsensor, der nach Interaktion mit fehlgefalteten OMP's (*outer membrane porines*) eine proteolytische Kaskade einleitet, die in die cytoplasmatische Neusynthese von Chaperonen und Peptidasen, sowie in die Zellwandbiosynthese mündet (Walsh *et al.*, 2003; Wilken *et al.*, 2004; Zeth, 2004). Diese Reaktionskaskade konnte auch durch synthetische Peptide mit dem OMP-C-Terminus „-YXF“ *in-vitro* initiiert werden (Walsh *et al.*, 2003). Bei der mitochondrialen Peptidase HtrA2/Omi in Säugern, der eine Funktion

innerhalb des apoptotischen Geschehens zugeschrieben wird, liegt die Peptidbindungstasche der PDZ-Domäne zwischen Peptidase- und PDZ-Domäne eingeschlossen. Aber nach Bindung des Effektor-Peptids klappt die PDZ-Domäne um und gibt das aktive Zentrum für die Proteolyse frei (Li *et al.*, 2002). Die PDZ-Domäne von Maus HtrA1 interagiert mit den C-Termini der Consensus-Sequenz Φ -X- Φ -V/L/F/A (Φ ist ein hydrophober oder unpolarer Rest), der auch beim physiologischen Regulator ProcollagenC-Propeptid vorhanden ist. Auf HtrA2/Omi hat dieser C-Terminus allerdings keine Wirkung (Murwantoko *et al.*, 2004).

Die bekannten Deg-Peptidasen zeigen alle einen modularen Aufbau mit der N-terminalen Serin-Protease-Domäne und den sich C-terminal anschließenden PDZ-Domänen. DegS und human HtrA besitzen eine PDZ-Domäne, die beiden Peptidasen DegP und DegQ dagegen zwei PDZ-Domänen (Kim und Kim, 2005). Die *Arabidopsis* Deg15 (At5g28320) weicht in ihrem Bau deutlich ab, zum einen ist das Protein mit 709 Aminosäuren deutlich größer als die genannten Deg-Peptidasen, wobei sich die Protease-Domäne mit 240 Aminosäuren an Position 375-614 innerhalb der Sequenz befindet. Die bis zum C-Terminus verbleibende Polypeptidkette von 94 Aminosäureresten scheint für eine PDZ-Domäne der bekannten Art nicht auszureichen. In der langen N-terminalen Sequenz konnten im Rahmen von initialen Sequenzvergleichen ebenfalls keine, von den anderen gut untersuchten Deg-Peptidasen DegP, DegQ und DegS bekannte Domänen gefunden werden. In diesem Zusammenhang muß nochmals darauf hingewiesen werden, daß bei Pflanzen zwar über Sequenzvergleiche Homologien zu den bekannten PDZ-Domänen in Metazoen gefunden wurden (Pointing, 1997), darüber hinausgehende substantielle Informationen über pflanzliche PDZ-Domänen liegen jedoch nicht vor. Um zu klären, welche alternative(n) Protein-Interaktionsdomäne(n) *Arabidopsis* Deg15 besitzt und wie der aktivierende Einfluß der die Proteolyse stimulierenden Proteine zustande kommt, sind Strukturuntersuchungen notwendig.

Wie der Sequenzvergleich der proteolytischen Domänen der drei *E. coli* Deg-Peptidasen DegP, DegQ und DegS, sowie der zwei Deg-Peptidasen in *Arabidopsis*, Deg2 und Deg15 (At1g28320) zeigt, weicht die Deg15-Peptidase in ihrer Aminosäuresequenz von den anderen Vertretern ab (Abbildung 6.4). Kurz hinter dem katalytischen Histidin, das sich bei DegP (Krojer *et al.*, 2002) in einer kurzen Helix befindet (Helix B in Abbildung 6.5), folgt ein langer *Loop* von 67 Aminosäuren (siehe Abbildung 6.3: grün unterlegter Be-

reich und Abbildung 6.4). Bei DegP verläuft die Struktur dagegen weiter im β -Strang 4 (siehe Abbildung 6.5). Da sich der *Loop* in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum befindet, könnte er für die Zugänglichkeit der katalytischen Tasche der Deg15 von Bedeutung sein. Auffallend ist, (1) daß am Ende der das katalytische His tragenden kurzen Helix B ein Prolin sitzt, das innerhalb der Tertiärstruktur einen Knick in der Polypeptidkette bewirkt und (2) das der *Loop* auffallend viele polare und geladene Reste enthält, was ihn für elektrostatische Wechselwirkungen prädestiniert.

Die GPP/Deg15 aus *Citrullus* trat in zwei Formen auf, als 72 kDa-Monomer und als 144 kDa-Dimer, wobei beide Formen miteinander im Gleichgewicht standen. *In-vitro* ließ sich die Gleichgewichtslage durch Ca^{2+} -Entzug in Richtung Monomer und durch Ca^{2+} -Zugabe in Richtung Dimer verschieben. Bei den bislang bekannten Deg-Peptidasen wurde ein solches Verhalten und ein Dimer bislang nicht beschrieben. Die bakteriellen Deg-Proteasen DegP, DegQ und DegS (Krojer *et al.*, 2002; Wilken *et al.*, 2004; Zeth, 2004), die bekannten plastidären Vertreter aus *Arabidopsis* AtDeg1 und AtDeg2 (Chassin *et al.*, 2002; Haußühl *et al.*, 2001), sowie das humane HtrA2 (Li *et al.*, 2002) bilden Tri- oder Hexamere. Die von Krojer *et al.* (2002) kristallisierte *E. coli* Deg-Protease liegt als funktionelles sandwichförmiges ~300 kDa-Hexamere zweier stabiler Trimere vor und die von Wilken *et al.* (2004) kristallisierte *E. coli* DegS-Protease liegt als Trimer vor. Die mitochondriale Säuger-Deg-Protease HtrA2/Omi assembliert zu pyramidenförmigen Trimeren, die über die Serin-Peptidase-Domäne untereinander in Verbindung stehen (Li *et al.*, 2003). Die von Chassin *et al.* (2002) über Gelfiltration gereinigte rekombinante AtDeg1 aus Chloroplasten mit starker Homologie zu *E. coli* DegP eluierte als ein Gemisch von Monomeren und Hexameren. Bei *E. coli* DegP (Krojer *et al.*, 2002), DegS (Wilken *et al.*, 2004; Zeth, 2004) und der Säuger-HtrA2/Omi (Li *et al.*, 2002) kommt es aufgrund der Oligomerisierung zu kooperativen Effekten. Die Monomere von HtrA2/Omi haben nur schwache proteolytische Aktivität und sind nicht in der Lage ihre Funktion in der Apoptose auszuführen (Li *et al.*, 2002).

```

001 MDVSKVVVFSRNFAVLVKVEGPDPKGLKMRKHAFHQYHSGNATLSASGIL
051 LPRDIFLSGEVAAKVLFEAGQDMALVLTVASVVEPFLTLGHRTSSSISQD
101 PVKLIPGAMIEIMVEGQLKSEKEAPFWVPAQLLSLVDVPVSSAALQSLIE
151 ASSGSKDSGWDIGWSLVSAANGSQPSINIEHYKPLMQLDEPHNANFMAK
201 SATRMAILGVPLSLLGQPSMNFASSSKGDTLVALGSPFGILSPVNFNS
251 VSTGSIANSYPSGSLKKSMLIADVRCPLPGMEGAPVFAKNGHLIGILIRPL
301 RQKNSGVEIQLVVPWGAIITACSHLLLEEPSVEGKASQWGWSEVLSVKSDA
351 SIPAQVAIEKAMESVCLITVNDGVWASGIILNEHGLILTNAHLLPWRYG
401 KGGVYGEGFKPYVLGAEFFSSTGSKFWEQKSQTLPRKAPRNHYSSVGENI
451 REYKHNFLQTGHRDIRVRLCHLDSWTWCPANVVYICKEQLDIALLQLEYV
501 PGKLQPITANFSSPPLGTTAHVVGHGLFGPRCGLSPSICSGVVAKVVHAK
551 RRLNTQISISQEVAEFPAMLETTAAVHPGGSGGAVLNSSGHMIGLVTSNAR
601 HGAGTVIPHLNFSIPCAVLAPIFKFAEDMQNTTILQTLQDQPSEELSSIWA
651 LMPQLSPKTEQSLPNLPKLLKDGNNKQTKGSQFAKFAETQDMFVKPTKL
701 SRDVIPSKL

```

Abbildung 6.3: Aminosäure-Sequenz der glyoxysomalen Deg15 aus *Arabidopsis* (At1g28320) mit 709 Aminosäuren. Die Nummerierung links bezeichnet die Position innerhalb der Sequenz. Die 240 Aminosäuren-Protease-Domäne ist fettgedruckt. Rot unterlegt sind die Reste der **katalytischen Triade His-Asp-Ser**; grün unterlegt ist der **67-Aminosäuren-Loop** nach dem katalytischen His; blau unterlegt ist das **C-terminale PTS1 SKL**.

```

E.coli DegP  GSGVIIDADK GYVVTNNHVV DNATV.....
E.coli DegQ  GSGVIINASK GYVLTNNHVI NQAQK.....
E.coli DegS  GSGVIMD.QR GYIITNKHVI NDADQ.....
AtDeg2      GSGVVWD.GQ GYIVTNYHVI GNALS.....
AtDeg15     ASGIILN.EH GLILTNAHLL EPWRYGKGGV YGEGFKPYVL GAEEFSSSTGS

E.coli DegP  ..... ..IKVQLSDG
E.coli DegQ  ..... ..ISIQLNDG
E.coli DegS  ..... ..IIVALQDG
AtDeg2      ..... RNPSPGD.VV GRVNILASDG
AtDeg15     KFEWEQKSQTL PRKAPRNHYS SVGENIREYK HNFLQTGHRD IRVRLCHLDS

E.coli DegP  ..RKFDAKMV GKDPERSDIAL IQIQNPKNLT A.IKMADSDA LRVGDYTVAI
E.coli DegQ  ..REFDAKLI GSDDQSDIAL LQIQNPSKLT Q.IAIADSDK LRVGDFAVAV
E.coli DegS  ..RVFEALLV GSDSLTDLAV LKINATGGLP T.IPINARRV PHIGDVVLAI
AtDeg2      VQKNFEGKLV GADRAKDLAV LKVDAPETLL KPIKVGQSNS LKVGQQCLAI
AtDeg15     WTWCPANVVY ICKEQLDIAL LQLEYVPGKL QPIT.ANFSS PPLGTTAHVV

E.coli DegP  GNP.....G LGETVTSGIV SAL..GRSGL NAEN.....Y E..NFIQTDA
E.coli DegQ  GNP.....G LGQTATSGIV SAL..GRSGL NLEG.....L E..NFIQTDA
E.coli DegS  GNPY.....N LGQTITQGII SAT..GRIGL NPTG.....R Q..NFLQTDA
AtDeg2      GNP.....G FDHTLTVGVI SGL..NRDIF SQTG.....V TIGGGIQTDA
AtDeg15     GHGLEGPRCG LSPSICSGVV AKVVHAKRRL NTQISISQEVA EFPAMLETTA

E.coli DegP  AINRGNSSGA LVNLNGELIG INTAILAPDG ...GNI..GI GFAIP
E.coli DegQ  SINRGNSSGA LLNLNGELIG INTAILAPGG ...GSV..GI GFAIP
E.coli DegS  SINHGNSGGA LVNSLGELMG INTLSFDKSN DGETPE..GI GFAIP
AtDeg2      AINPGNSSGP LLDSKGNLIG INTAIFTQTG ...TSA..GV GFAIP
AtDeg15     AVHPGSSGGA VLNSSGHMIG LVTSNARHGA ...GTVIPHL NFSIP

```

Abbildung 6.4: Sequenzvergleich der Serin-Protease-Domänen der drei Deg-Peptidasen in *E. coli*, DegP, DegQ und DegS, sowie der zwei Deg-Peptidasen in *Arabidopsis*, der Deg2 in Chloroplasten und der Deg15 in Peroxisomen. Die Reste der katalytischen Triade His-Asp-Ser sind rot unterlegt. [Der Sequenzvergleich wurde mit T-COFFEE erstellt (Notredame *et al.*, 2000).]

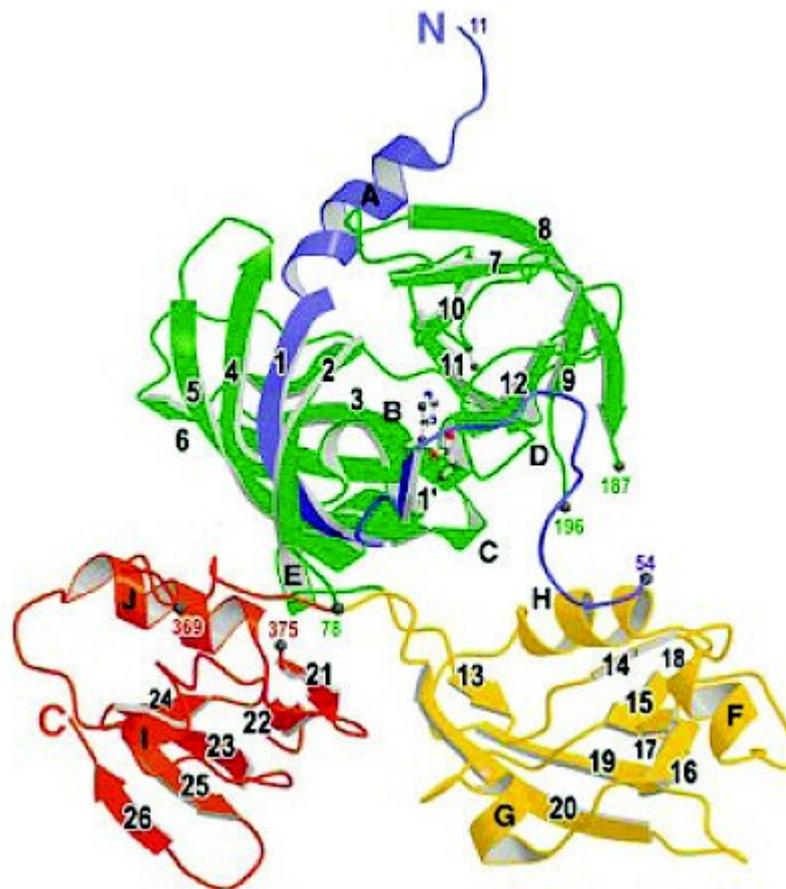


Abbildung 6.5: Kristallstruktur der *E. coli* DegP (Krojer *et al.*, 2002). Bändermodell des Monomers aus Molekül B mit unterschiedlich farbigen Domänen. N-Terminus, blau; Protease, grün; PDZ1, gelb; PDZ2, rot. Die Reste der katalytischen Triade sind als Ball-Stäbchen-Modell wiedergegeben. Die Sekundärstrukturelemente (α -Helices durch Buchstaben, β -Stränge durch Zahlen), die Termini des Proteins und die nicht durch Elektronendichte definierten Regionen sind gekennzeichnet. [Abbildung aus Krojer *et al.* (2002); © 2002 Macmillan Publishers Ltd..]

Im Rahmen seiner Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Gietl am Lehrstuhl für Botanik am Wissenschaftszentrum Weihenstephan der Technischen Universität München hat G. Hierl unlängst durch Analyse einer homozygoten *Arabidopsis* *DEG15*-Insertionslinie mit anti-gMDH-Antikörpern nachgewiesen, daß die prä-gMDH nicht zur reifen Form prozessiert wird und in den Peroxisomen als unprozessierte höhermolekulare Vorstufe vorliegt. Im Phänotyp zeigten die Pflanzen allerdings keine Auffälligkeit (G. Hierl, 2006). Hiermit wurde ein stichhaltiger *in-situ* Befund für die Funktion der Deg15 als Glyoxysomale Processing Peptidase erbracht.

6.3 Ausblick

Ricinus CysEP

Im Rahmen der Untersuchung der Substratspezifität der *Ricinus* CysEP war ursprünglich geplant, die CysEP ein weiteres Mal zu kristallisieren und zwar mit einem möglichen nativen Substrat, einem Zellwandprotein. Als notwendige Vorarbeit untersuchte G. Hierl (2006) unlängst im Rahmen seiner Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Gietl am Lehrstuhls für Botanik der Technischen Universität München den Verdau von verschiedenen Zellwandproteinen, den Tabak-Extensinen, durch die *Ricinus* CysEP. Da wegen der breiten Substratspezifität der CysEP die verwendeten Extensine eher an anderen Positionen gespalten wurden als in Nachbarschaft zu Prolin und Hydroxyprolin, sind weitere Kristallisationsexperimente mit der CysEP nicht mehr von Interesse.

Processing Peptidasen

Nachdem es nicht gelungen war, über konventionelle Säulenchromatographie die für die Edman-Sequenzierung erforderlichen Proteinmengen anzureichern, wurde eine weniger verlustbehaftete Strategie mit Säulenchromatographie, präparativer nativer Sephadex-IEF und 2-D-PAGE entwickelt. Mit dieser Methode soll in naher Zukunft eine Reinigung der GPP aus Glyoxysomen für Edman-Sequenzierung durchgeführt werden.

Für die GPP/Deg15 aus *Citrullus* wurden zwei Formen nachgewiesen, ein 72 kDa-Monomer und ein 144 kDa-Dimer. Beide Formen stehen miteinander im Gleichgewicht und die Gleichgewichtslage ließ sich durch Ca^{2+} -Ionen beeinflussen: Ca^{2+} -Entzug führte zur Bildung des Monomers, Ca^{2+} -Zufuhr zur Dimerisierung. Dieser Befund ist physiologisch äußerst bedeutsam, da Ca^{2+} intrazellulär als sekundärer Botenstoff fungiert (Yang und Poovaiah, 2003) und *in-vivo* das GPP/Deg15-Gleichgewicht entsprechend den Erfordernissen regulieren könnte.

Es gibt noch eine andere Gruppe von eukaryontischen Processing Peptidasen, deren Funktion von Ca^{2+} -Ionen abhängig ist, die Proprotein-Convertasen. Bemerkenswerterweise prozessieren die Proprotein-Convertasen wie die GPP nur eine relativ geringe Anzahl von Proproteinen. Dem gegenüber wird die limitierte Endoproteolyse von jeweils etwa 800 höhermolekularen Vorstufen in den Chloroplasten und Mitochondrien vollständig von wenigen Peptidasen abgedeckt (Zhang und Glaser, 2002); bei der SPP und der MPP handelt es sich um Zn-Metallopeptidasen. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, zu untersu-

chen, ob das stark eingeeengte Substratspektrum der Ca^{2+} -abhängigen Processing Peptidasen auf einen spezifischen Einfluß des Calciums zurückzuführen ist.

Da keinerlei Strukturinformationen über pflanzliche PDZ-Domänen vorliegen, ist es notwendig, durch Strukturuntersuchungen zu klären, welche alternative(n) Proteininteraktionsdomäne(n) Deg15 besitzt. In diesem Zusammenhang ist auch von Interesse, auf welche Weise denaturierte Proteine die Proteolyse stimulieren.

Das ungewöhnliche Verhalten der GPP/Deg15 konnte erst in der Zusammenschau zahlreicher experimenteller Befunde entschlüsselt werden. Das Auftreten von zwei funktionell unterschiedlichen Formen einer Protease, einem Monomer mit degradierender Funktion und einem experimentell schwer zugänglichen Dimer mit prozessierender Funktion, wird rückwirkend als Hauptursache dafür angesehen, daß die Glyoxysomale Processing Peptidase in Pflanzen lange Zeit nicht gefunden werden konnte. Interessanterweise bereitet die Identifizierung der Peroxisomalen Processing Peptidase in Säugern, die seit Anfang der 1990er Jahre von einigen mit dem Peroxisomalen Proteinimport befaßten Gruppen gesucht wird, ebenfalls große Probleme. Biermann und Bosch (1999) berichten, daß es sich bei der Peroxisomalen Processing Peptidase in Meerschweinchen um eine Cystein-Endopeptidase mit einem pH-Optimum von 6,5 handelt. In diesem Zusammenhang sei daran erinnert, daß Gietl und Mitarbeiter die *Ricinus* CysEP aus Ricinosomen aufgrund ihrer Eigenschaft, die prä-gMDH zur reifen Form zu spalten, für die Glyoxysomale Processing Peptidase (GPP) gehalten hatten (Gietl *et al.*, 1997). Von den vier bekannten humanen Deg-Peptidasen sind lediglich HtrA1 und HtrA2 erforscht (Übersichtsartikel von Dingwall und Holbrook, 2004). Es bleibt zu untersuchen, ob eine der beiden anderen zwei Deg-Proteasen HtrA3 und HtrA4 peroxisomale Lokalisation aufweist. Wenn dies der Fall ist, könnten für die Peroxisomale Processing Peptidase in Säugern ähnliche Verhältnisse wie bei der beschriebenen GPP/Deg15 in *Citrullus* vorliegen.

7. Referenzen

- Abe, Y. und Kohda, D. (2000) Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell* 100: 551-560.
- Adam, Z., Adamska, I., Nakabayashi, K., Ostersetzer, O., Haussuhl, K., Manuell, A., Zheng, B., Vallon, O., Rodermeil, S. R., Shinozaki, K. und Clarke, A. K. (2001) Chloroplast and mitochondrial proteases in Arabidopsis. A proposed nomenclature. *Plant Physiol* 125: 1912-1918.
- Adam, Z. und Clarke, A. K. (2002) Cutting edge of chloroplast proteolysis. *Trends Plant Sci* 7: 451-456.
- Affolter, J. A., Fried, V. A. und Roth, R. A. (1988) Human insulin-degrading enzyme shares structural and functional homologies with *E. coli* protease III. *Science* 242: 1415-1418.
- Akasofu, H., Yamauchi, D., Mitsuhashi, W. und Minamikawa, T. (1989) Nucleotide sequence of cDNA for sulfhydryl-endopeptidase (SH-EP) from cotyledons of germinating *Vigna mungo*. *Nucleic Acids Res.* 17: 6733.
- Albertini, M., Rehling, P., Erdmann, R., Girzalsky, W., Kiel, J. A. K. W., Veenhuis, M. und Kunau, W. H. (1997) Pex14p, a peroxisomal membrane protein binding both receptors of the two PTS-dependent import pathways. *Cell* 89: 83-92.
- Anastasi, J. A., Knight, C. G. und Barrett, A. J. (1993) Characterization of the bacterial metalloendopeptidase pitrilysin by use of a continuous fluorescence assay. *Biochem. J.* 290: 601-607.
- Angliker, H., Neumann, U., Molloy, S. S. und Thomas, G. (1995) Internally quenched fluorogenic substrate for furin. *Anal. Biochem.* 224: 409-412.
- Arabidopsis* Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Authier, F., Rachubinski, R. A., Posner, B. I. und Bergeron, J. J. M. (1994) Endosomal proteolysis of insulin by an acidic thiol metalloprotease unrelated to insulin degrading enzyme. *J. Biol. Chem.* 269: 3010-3016.
- Authier, F., Bergeron, J. J. M., Ou, W. J., Rachubinski, R. A., Posner, B. I. und Walton, P. A. (1995) Degradation of the cleaved leader peptide of thiolase by a peroxisomal proteinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 3859-3863.
- Azim, M. K., Goehring, W., Song, H. K., Ramachandran, R., Bochtler, M. und Goettig, P. (2005) Characterization of the HslU chaperone affinity for HslV protease. *Protein Sci.* 14: 1357-62.
- Bachmair, A., Finley, D. und Varshavsky, A. (1986) In-vivo half life of a protein is a function of its aminoterminal residue. *Science* 234: 179-186.
- Bailey, S. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D* 50: 760-763.

- Balów, R. M., Tomkinson, B., Ragnarsson, U. und Zetterqvist, Ö. (1986) Purification, substrate specificity, and classification of tripeptidyl peptidase II. *J. Biol. Chem.* *261*: 2409-2417.
- Barrett, A. J. und Rawlings, N. D. (2001a) Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Biol. Chem.* *382*: 727-733.
- Barrett, A. J., Rawlings, N. D. und O'Brien, E. A. (2001b) The MEROPS database as a protease information system. *J. Struct. Biol.* *134*: 95-102.
- Barrett, A. J., Rawlings, N. D. und Woessner, J. F. (2004) *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2.Aufl. San Diego, Academic press.
- Barton, G. J. (1993) ALSCRIPT: a tool to format multiple sequence alignments. *Protein Eng.* *6*: 37-40.
- Baudhuin, P., Beaufay, A. und De Duve, C. (1965) Combined biochemical and morphological study of particulate fractions from rat liver: Analysis of preparations enriched in lysosomes or in particles containing urate oxidase, D-amino acid oxidase, and catalase. *J. Cell Biol.* *26*: 219-243.
- Becker, A. B. und Roth, R. A. (1992) An unusual active site identified in a family of zinc metallopeptidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *89*: 3835-3839.
- Becker, A. B., Ding, L. und Roth, R. A. (1996) Insulin degradation. In: *Diabetes mellitus: A fundamental and clinical text*. LeRoith, D., Olefsky, J. M. und Taylor, S. (Eds.). Philadelphia New York, Lippincott-Raven, 242-247.
- Becker, C., Senyuk, V. I., Shutov, A. D., Nong, V. H., Fischer, J., Horstmann, C. und Müntz, K. (1997) Proteinase A, a storage-globulin-degrading endopeptidase of vetch (*Vicia sativa* L.) seeds, is not involved in early steps of storage-protein mobilization. *Eur. J. Biochem.* *248*: 304-312.
- Beers, E. P., Woffenden, B. J. und Zhao, C. (2000) Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Mol. Biol.* *44*: 399-415.
- Beers, E. P., Jones, A. M. und Dickerman, A. W. (2004) The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*. *Phytochemistry* *65*: 43-58.
- Beevers, H. (1979) Microbodies in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* *30*: 159-193.
- Besche, H. und Zwickl, P. (2004) The *Thermoplasma acidophilum* Lon protease has a Ser-Lys dyad active site. *Eur. J. Biochem.* *271*: 4361-4365.
- Bewley, J. D. und Black, M. (1994) *Seeds: physiology of development and germination*. New York, Plenum.
- Bieglmayer, C., Nahler, G. und Ruis, H. (1974) Membranen von Glyoxysomen aus Rizinus-Endosperm. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* *355*: 1121-1128.
- Biermann, J. und van den Bosch, H. (1999) In vitro processing of the human alkyl-dihydroxyacetonphosphate synthase precursor. *Arch. Biochem. Biophys.* *368*: 139-146.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* *8*: 93-99.

- Bode, W. und Huber, R. (2000) Structural basis of the endoprotease-protein inhibitor interaction. *Biochim. Biophys. Acta* 1477: 241-252.
- Böhni, P., Gasser, S., Leaver, C. und Schatz, G. (1980) A matrix-localized mitochondrial protease processing cytoplasmatically-made precursors to mitochondrial proteins. *The Organisation and Expression of the Mitochondrial Genome*. Kroon, A. M. und Saccone, C. Amsterdam, Elsevier Science, 423-433.
- Botos, I., Melnikov, E. E. und Cherry, S. (2004a) The catalytic domain of *Escherichia coli* Lon protease has a unique fold and a Ser-Lys dyad in the active site. *J. Biol. Chem.* 279: 8140-8148.
- Botos, I., Melnikov, E. E., Cherry, S., Khalatova, A. G., Rasulova, F. S., Tropea, J. E., Maurizi, M. R., Rotanova, T. V., Gustchina, A. und Wlodawer, A. (2004b) Crystal structure of the AAA⁺ domain of *E. coli* Lon protease at 1.9Å resolution. *J. Struct. Biol.* 146: 113-122.
- Bowman, J. L. (1993) *Arabidopsis: an atlas of morphology and development*. New York, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Braun, H. P. und Schmitz, U. K. (1995) Are the 'core' proteins of the mitochondrial bcl complex evolutionary relicts of a processing protease? *Trends Biochem. Sci.* 20: 171-175.
- Braverman, N., Dodt, G., Gould, S. J. und Valle, D. (1998) An isoform of Pex5p, the human PTS1 receptor, is required for the import of PTS2 proteins into peroxisomes. *Hum. Mol. Genet.* 7: 1195-1205.
- Breidenbach, R. W. und Beevers, H. (1967) Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27: 462-469.
- Breidenbach, R. W., Kahn, A. und Beevers, H. (1968) Characterization of glyoxysomes from castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 43: 705-713.
- Brink, S., Flügge, U. I., Chaumont, F., Boutry, M., Emmermann, M., Schmitz, U. K., Becker, K. und Pfanner, N. (1994) Preproteins of chloroplast envelope inner membrane contain targeting information for receptor-dependent import into fungal mitochondria. *J. Biol. Chem.* 269: 16478-16485.
- Brown, L. A. und Baker, A. (2003) Peroxisome biogenesis and the role of protein import. *J. Cell. Mol. Med.* 7: 388-400.
- Bruce, B. D. (2001) The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1541: 2-21.
- Brunger, A. T. (1992) Free R-Value - a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* 355: 472-475.

- Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. und Warren, G. L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D* 54: 905-921.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W. und Jones, R. L. (2000) Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville, MD, American Society of Plant Physiology.
- Buchanan-Wollaston, V. (1997) The molecular biology of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 48: 181-199.
- Bunkelmann, J. R. und Trelease, R. N. (1996) Ascorbate peroxidase. A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiol.* 110: 589-598.
- Canvin, D. T. und Beevers, H. (1961) Sucrose synthesis from acetate in the germinating castor bean: kinetics and pathway. *J. Biol. Chem.* 236: 988-995.
- Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, A., Sandberg, G. und Bennett M. J. (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci.* 8: 165-171.
- Cercos, M., Santamaria, S. und Carbonell, J. S. O. (1999) Cloning and characterization of TPE4A, a thiol-protease gene induced during ovary senescence and seed germination in pea. *Plant Physiol.* 119: 1341-1348.
- Chang, C. C., Warren, D. S., Sacksteder, K. A. und Gould, S. J. (1999) PEX12 interacts with PEX5 and PEX10 and acts downstream of receptor docking in peroxisomal matrix protein import. *J. Cell Biol.* 147: 761-773.
- Chassin, Y., Kapri-Pardes, E., Sinvany, G., Arad, T. und Adam, Z. (2002) Expression and characterization of the thylakoid lumen protease DegP1 from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 130: 857-864.
- Chen, F. und Foolad, M. R. (1997) Molecular organization of a gene in barley which encodes a protein similar to aspartic protease and its specific expression in nucellar cells during degeneration. *Plant Mol. Biol.* 35: 821-831.
- Cheng, Y. S. E. und Zipser, D. (1979) Purification and characterization of protease III from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 254: 4698-4706.
- Chigri, F., Soll, J. und Vothknecht, U. C. (2005) Calcium regulation of chloroplast protein import. *Plant J.* 42: 821-831.
- Choi, K. H., Laursen, R. A. und Allen, K. N. (1999) The 2.1 Å structure of a cysteine protease with proline specificity from ginger rhizome, *Zingiber officinale*. *Biochemistry* 38: 11624-11633.
- Chory, J., und Wu, D. (2001) Weaving the complex web of signal transduction. *Plant Physiol.* 125: 77-80.
- Chreighton, A. M., Bassham, D. und Robinson, C. (1993) The stromal processing peptidase activities from *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pisum sativum*: unexpected similarities in reaction specificity. *Plant Mol. Biol.* 23: 1291-1296.

- Chung, C. H. und Goldberg, A. L. (2004) Endopeptidase La. Handbook of proteolytic enzymes, 2. Aufl.. Barrett, A. J., Rawlings, N. D. und Woessner, J. F. (Eds.). London, Elsevier, 1998-2002.
- Claros, M. G., Brunak, S. und von Heijne, G. (1997) Prediction of N-terminal protein sorting signals. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 394-398.
- Collins, C. S., Kalish, J. E., Morrell, J. C., McCaffery, J. M. und Gould, S. J. (2000) The peroxisome biogenesis factors Pex4p, Pex22p, Pex1p, and Pex6p act in the terminal steps of peroxisomal matrix protein import. *Mol. Cell Biol.* 20: 7516-7526.
- Cooper, T. G. und Beevers, H. (1969a) Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm. Enzyme constituents and catalytic capacity. *J. Biol. Chem.* 244: 3507-3513.
- Cooper, T. G. und Beevers, H. (1969b) β -oxidation in glyoxysomes from castor bean endosperm. *J. Biol. Chem.* 244: 3514-3520.
- Cornista, J., Ikeuchi, S., Haruki, M., Kohara, A., Takano, K., Morikawa, M. und Kanaya, S. (2004) Cleavage of various peptides with pitrilysin from *Escherichia coli*: kinetic analyses using β -endorphin and its derivatives. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68: 2128-2137.
- Corpas, F. J., de la Colina, C., Sanchez-Rasero, F. und del Rio, L. A. (1997) A role for leaf peroxisomes in the catabolism of purines. *J. Plant Physiol.* 151: 246-250.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B. und del Rio, L. A. (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci.* 6: 145-150.
- Costa, L. M., Gutierrez-Marcos, J. F. und Dickinson, H. G. (2004) More than a yolk: the short life and complex times of the plant endosperm. *Trends Plant Sci.* 9: 507-514.
- Costa-Rodrigues, J., Carvalho, A. F., Fransen, M., Hambruch, E., Schliebs, W., Sa-Miranda, C. und Azevedo, J. E. (2005) Pex5p, the peroxisomal cycling receptor, is a monomeric non-globular protein. *J. Biol. Chem.* 280: 24404-24411.
- Cuervo, A. M. und Dice, J. F. (1997) Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperons, and proteases. *J. Mol. Med.* 76: 6-12.
- Cuervo, A. M. (2004) Autophagy: many paths to the same end. *Mol. Cell. Biochem.* 263: 55-72.
- Cunningham, D. F. und O'Connor, B. (1997) Proline specific peptidases. *Biochim. Biophys. Acta* 1343: 160-186.
- Dammai, V. und Subramani, S. (2001) The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell* 105: 187-196.
- Dando, P. M. und Barrett, A. J. (2004) Aminopeptidase PS. In: Handbook of Proteolytic Enzymes. Barrett, A. J., Rawlings, N. D. und Woessner, J. F. (Eds.). San Diego, Academic press.

- Davy, A., Svendsen, I., Sorensen, S. O., Blom Sorensen, M., Rouster, J., Meldal, M., Simpson, D. J. und Cameron-Mills, V. (1998) Substrate specificity of barley cysteine endoproteases EP-A and EP-B. *Plant. Physiol.* *117*: 255-261.
- Davy, A., MB, S. L., Svendsen, I., Cameron-Mills, V. und Simpson, D. J. (2000) Prediction of protein cleavage sites by the barley cysteine endoproteases EP-A and EP-B based on the kinetics of synthetic peptide hydrolysis. *Plant Physiol.* *122*: 137-146.
- De Duve, C. und Baudhuin, P. (1966) Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* *46*: 323-357.
- del Rio, L. A., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Bueno, P. und Corpas, F. J. (1992) Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radical Biol. & Med.* *13*: 557-580.
- del Rio, L. A., Pastori, G. M., Palma, J. M., Sandalio, L. M., Sevilla, F., Corpas, F. J., Jimenez, A., Lopez-Huertas, E. und Hernandez, J. A. (1998) The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiol.* *116*: 1195-1200.
- del Rio, L. A. e. a. (2000) Cadmium toxicity in leaf peroxisomes from pea plants: effect on the activated oxygen metabolism and proteolytic activity. In: Proceedings of the NATO advanced research workshop on plant tolerance to abiotic stresses in agriculture: role of genetic engineering. Cherry, C. H., Locy, R. D. und Rychter, A. (Eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. *83*, 315-328.
- Desautels, M. und Goldberg, A. L. (1982) Demonstration of an ATP-dependent, Vanadate-sensitive endoprotease in the matrix of rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* *257*: 11673-11679.
- de Walque, S., Fransen, M., Mannaerts, G. P. und Van Veldhoven, P. P. (2002) Cloning and characterization of a peroxisomal Lon protease homologue. Posterpräsentation auf dem Internationalen Symposium „Peroxisomal disorders and regulation of genes“; Ghent, 23-25 September 2002.
- Dick, T. P., Nussbaum, A. K., Deeg, M., Heinemeyer, W., Groll, M., Schirle, M., Keilholz, W., Stevanovic, S., Wolf, D. H. und Huber, R. (1998) Contribution of proteasomal b-subunits to the cleavage of peptide-substrates analyzed with yeast mutants. *J. Biol. Chem.* *273*: 25637-25646.
- Ding, L., Becker, A. B., Suzuki, A. und Roth, R. A. (1992) Comparison of the enzymatic and biochemical properties of human insulin-degrading enzyme and *Escherichia coli* Protease III. *J. Biol. Chem.* *267*: 2414-2420.
- Dingwall, C. und Holbrook, J. D. (2004) Human HtrA proteases. In: Handbook of proteolytic enzymes, 2. Aufl.. Barrett, J., Rawlings, N. D. und Woessner, J. F. (Eds.). San Diego, Academic press.
- Distefano, S., Palma, J. M., Gomez, M. und del Rio, L. A. (1997) Characterization of endoproteases from plant peroxisomes. *Biochem. J.* *327*: 399-405.
- Distefano, S., Palma, J. M., McCarthy, I. und del Rio, L. A. (1999) Proteolytic cleavage of plant proteins by peroxisomal endoproteases from senescent leaves. *Planta* *209*: 308-313.

- Dobberstein, B., Blobel, G. und Chua, N. H. (1977) In vitro synthesis and processing of a putative precursor for the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase of *Clamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 1082-1085.
- Dobson, C. M. (1999) Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem. Sci.* 24: 329-332.
- Dotz, G. und Gould, S. J. (1996) Multiple PEX genes are required for proper subcellular distribution and stability of Pex5p, the PTS1 receptor: evidence that PTS1 protein import is mediated by a cycling receptor. *J. Cell Biol.* 135: 1763-1774.
- Doelling, J. H. (2002) The APG8/12-activating enzyme AGP7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277: 33105-33114.
- Dominguez, F., Moreno, J. und Cejudo, F. J. (2001) The nucellus degenerates by a process of programmed cell death during the early stages of wheat grain development. *Planta* 213: 352-360.
- Dougan, D. A., Reid, B. G., Horwich, A. L. und Bukau, B. (2002) ClpS, a substrate modulator of the ClpAP machine. *Mol. Cell* 9: 673-683.
- Doyle, D., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M. und MacKinnon, R. (1996) Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 85: 1067-1076.
- Drenth, J., Kalk, K. H. und Swen, H. M. (1976) Binding of chloromethyl ketone substrate analogues to crystalline papain. *Biochemistry* 15: 3731-3738.
- Duckworth, W. C., Bennett, R. G. und Hamel, F. G. (1994) A direct inhibitory effect of insulin on a cytosolic proteolytic complex containing insulin-degrading enzyme and multicatalytic proteinase. *J. Biol. Chem.* 269: 24575-24580.
- Duckworth, W. C., Bennett, R. G. und Hamel, F. G. (1998) Insulin degradation: progress and potential. *Endocr. Rev.* 19: 608-624.
- Dunn, W. A. (1994) Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.* 4: 139-143.
- Dykstra, C., Prasher, D. und Kushner, S. (1984) Physical and biochemical analysis of the cloned recB and recC genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 157: 21-27.
- Eastmond, P. J., Hooks, M. und Graham, I. A. (2000) The *Arabidopsis* acyl-CoA oxidase gene family. *Biochem. Soc. Trans.* 28: 755-757.
- Eastmond, P. J. und Graham, I. A. (2001) Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends Plant Sci.* 6: 72-78.
- Einwächter, H., Sowinski, S., Kunau, W. H. und Schliebs, W. (2001) *Yarrowia lipolytica* Pex20p, *Saccharomyces cerevisiae* Pex18p/Pex21p and mammalian Pex5pL fulfil a common function in the early steps of the peroxisomal PTS2 import pathway. *EMBO Rep.* 2: 1035-1039.
- Emanuelsson, O. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300: 1005-1016.

- Emmermann, M. und Schmitz, U. K. (1993) The cytochrome c reductase integrated processing peptidase from potato mitochondria belongs to a new class of metalloproteases. *Plant Physiol.* *103*: 615-620.
- Engh, R. A. und Huber, R. (1991) Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure and refinement. *Acta Crystallogr. A* *47*: 392-400.
- Erdmann, R. und Schliebs, W. (2005) Peroxisomal matrix protein import: the transient pore model. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*: 738-742.
- Esnouf, R. M. (1999) Further additions to MolScript version 1.4, including reading and contouring of electron-density maps. *Acta Crystallogr. D* *55*: 938-940.
- Estelle, M. (2001) Proteases and cellular regulation in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* *4*: 254-260.
- Fang, T. K., Donaldson, R. P. und Vigil, E. L. (1987) Electron transport in purified glyoxysomal membranes from castor bean endosperm. *Planta* *172*: 1-13.
- Feussner, I. und Wasternack, C. (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* *53*: 275-297.
- Fischer, H. und Glockshuber, R. (1993) ATP hydrolysis is not stoichiometrically linked with proteolysis in the ATP-dependent protease La from *E. coli*. *J. Biol. Chem.* *268*: 22502-22506.
- Frick, L. und Wolfenden, R. (1985) Mechanistic implications of the inhibition of peptidases by amino aldehyds and bestatin. *Biochim. Biophys. Acta* *829*: 311-318.
- Fu, G. K. und Markovitz, D. M. (1998) The human Lon protease binds to mitochondrial promoters in a single-stranded, site-specific, strand-specific-manner. *Biochemistry* *37*: 1905-1909.
- Fülöp, V., Böcskei, Z. und Polgar, L. (1998) Prolyl oligopeptidase: an unusual β -propeller domain regulates proteolysis. *Cell* *94*: 161-170.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. und Ojima, K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* *79*: 151-158.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. und Ben-Sasson, S. A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* *119*: 493-501.
- Geier, E., Pfeifer, G., Wilm, M., Lucchiari-Hartz, M., Baumeister, W., Eichmann, K. und Niedermann, G. (1999) A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science* *283*: 978-981.
- Gershkovich, A. A. und Kholodovych, V. V. (1996) Fluorogenic substrates for proteases based on intramolecular fluorescence energy transfer (IFETS). *J. Biochem. Biophys. Methods* *33*: 135-162.
- Gietl, C. und Hock, B. (1984) Import of *in-vitro*-synthesized glyoxysomal malate dehydrogenase into isolated watermelon glyoxysomes. *Planta* *162*: 261-267.
- Gietl, C. und Hock, B. (1986) Import of glyoxysomal malate dehydrogenase precursor into glyoxysomes: A heterologous *in-vitro* system. *Planta* *167*: 87-93.

- Gietl, C. (1992) Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. *Biochim. Biophys. Acta 1100*: 217–234.
- Gietl, C., Wimmer, B., Adamec, J. und Kalousek, F. (1997) A cysteine endopeptidase isolated from castor bean endosperm microbodies processes the glyoxysomal malate dehydrogenase precursor protein. *Plant Physiol. 113*: 863-871.
- Gietl, C., Schmid, M. und Simpson, D. (2000) Ricinosomes and aleurain-containing vacuoles (ACV): protease-storing organelles. In: *Vacuolar compartments*. Robinson, D. G. und Rogers, J. C. (Eds.). Sheffield, Academic Press. 5, 90-111.
- Gietl, C. und Schmid, M. (2001) Ricinosomes: an organelle for developmentally regulated programmed cell death in senescing plant tissues. *Naturwissenschaften 88*: 49-58.
- Glaser, E. und Dessi, P. (1999) Integration of the mitochondrial processing peptidase into the cytochrome bc₁ complex in plants. *J. Bioenerg. Biomembranes 31*: 259-274.
- Glickmann, M. H., Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V. A. und Finley, D. (1998) A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell 94*: 615-623.
- Goff, S. A. und Goldberg, A. L. (1985) Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of lon and other heat shock genes. *Cell 41*: 587-595.
- Goldberg, A. L., Menon, A. S., Goff, S. und Chin, D. T. (1987) The mechanism and regulation of the ATP-dependent protease La from *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans. 15*: 809-811.
- Görg, A., Postel, W. und Günther, S. (1988) Two-dimensional electrophoresis. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis 9*: 531-546.
- Görg, A., Boguth, G., Köpf, A., Reil, G., Parlar, H. und Weiss, W. (2002) Sample prefractionation with Sephadex isoelectric focusing prior to narrow pH range two-dimensional gels. *Proteomics 2*: 1652-1657.
- Görg, A., Boguth, G., Drews, O., Köpf, A., Lück, C., Reil, G. und Weiss, W. (2003) Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis: a laboratory manual. Freising-Weihenstephan.
- Gottesman, S., Maurizi, M. R. und Wickner, S. (1997) Regulatory subunits of energy-dependant proteases. *Cell 91*: 435-438.
- Gottesmann, S. (2003) Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 19*: 565-587.
- Gould, S. J., Keller, G. A., Hosken, N., Wilkinson, J. und Subramani, S. (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J. Cell Biol. 108*: 1657-1664.
- Graham, I. A. und Eastmond, P. J. (2002) Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants. *Prog. Lipid Res. 41*: 156-181.
- Gray, R. W., Arsenis, C. und Jeffay, H. (1970) Neutral protease activity associated with the rat liver peroxisomal fraction. *Biochim. Biophys. Acta 222*: 627-636.

- Greenwood, J. S. und Bewley, J. D. (1982) Seed development in *Ricinus communis* (castor bean). I. Descriptive morphology. *Can. J. Bot.* 60: 1751-1760.
- Greenwood, J. S., Gifford, D. J. und Bewley, J. D. (1984) Seed development in *Ricinus communis* cv. Hale (castor bean). II. Accumulation of phytic acid in the developing endosperm and embryo in relation to the deposition of lipid, protein, and phosphorus. *Can. J. Bot.* 62: 255-261.
- Greenwood, J. S., Helm, M. und Gietl, C. (2005) Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 2238-2243.
- Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D. und Huber, R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2,4 Å resolution. *Nature* 386: 463-471.
- Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., Glickmann, M. H. und Finley, D. (2000) A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* 7: 1062-1067.
- Groll, M., Bochtler, M., Brandstetter, H., Clausen, T. und Huber, R. (2005) Molecular machines for protein degradation. *Chem. Biochem.* 6: 222-256.
- Gronostajski, R. M., Pardee, A. B. und Goldberg, A. L. (1985) The ATP dependence of the degradation of short- and long-lived proteins in growing fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 260: 3344-3349.
- Groover, A. und Jones, A. M. (1999) Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell wall synthesis. *Plant Physiol.* 119: 375-384.
- Guex, N., Diemand, A. und Peitsch M. C. (1999) Protein modelling for all. *Trends Biochem. Sci.* 24: 364-367.
- Guivarc'h, A., Caissard, J. C., Azmi, A., Elmayan, T., Chriqui, D. und Tepfer, M. (1996) In situ detection of expression of the GUS reporter gene in transgenic plants: ten years of blue genes. *Transgenic Research* 5: 281-288.
- Gunawardena, A. H., Pearce, D. M., Jackson, M. B., Hawes, C. R. und Evans, D. E. (2001) Characterisation of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). *Planta* 212: 205-214.
- Gunning, B. E., Pate, J. S., Minchin, F. R. und Marks, I. (1974) Quantitative aspects of transfer cell structure in relation to vein loading in leaves and solute transport in legume nodules. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 28: 87-126.
- Gunning, B. E. und Overall, R. L. (1983) Plasmodesmata and cell-to-cell transport in plants. *Bioscience* 33: 260-265.
- Hadfield, K. A. und Bennett, A. B. (1997) Programmed senescence of plant organs. *Cell Death Differ.* 4: 662-670.
- Hageman, J., Robinson, C., Smeekens, S. und Weisbeek, P. (1986) A thylakoid processing protease is required for complete maturation of the lumen protein plastocyanin. *Nature* 324: 567-569.

- Harris, B. Z. und Lim, W. A. (2001) Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J. Cell Sci.* 114: 3219-3231.
- Harrison, S. C. (1996) Peptide-surface association: the case of PDZ and PTB domains. *Cell* 86: 341-343.
- Hartl, F. U. und Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperons in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852-1858.
- Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurter, D., Buchner, J. (2005) Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12: 842-846.
- Hattendorf, D. A. und Lindquist, S. L. (2002) Analysis of the AAA sensor-2 motif in the C-terminal ATPase domain of Hsp104 with a site-specific fluorescent probe of nucleotide binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 2732-2737.
- Hausuhl, K., Andersson, B. und Adamska, I. (2001) A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *EMBO J.* 20: 713-722.
- Hawltschek, G. H., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschuk, M., Hartl, F. U. und Neupert, W. (1988) Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell* 53: 795-806.
- Hayashi, M., Aoki, M., Kato, A., Kondo, M. und Nishimura, M. (1996) Transport of chimeric proteins that contain a carboxy-terminal targeting signal into plant microbodies. *Plant J.* 10: 225-234.
- Hayashi, M., Toriyama, K., Kondo, M., Kato, A., Mano, S., De Bellis, L., Hayashi-Ishimaru, Y., Yamaguchi, K., Hayashi, H. und Nishimura, M. (2000) Functional transformation of plant peroxisomes. *Cell Biochem. Biophys.* 32: 295-304.
- Hayashi, M., Yagi, M., Nito, K., Kamada, T. und Nishimura, M. (2005) Differential contribution of two peroxisomal protein receptors to the maintenance of peroxisomal functions in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 280: 14829-14835.
- He, X. und Kermodé, A. R. (2003) Proteases associated with programmed cell death of megagametophyte cells after germination of white spruce (*Picea glauca*) seeds. *Plant Mol. Biol.* 52: 729-744.
- Heath, M. C. (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* 44: 321-334.
- Hendrick, J. P., Hodges, P. E. und Rosenberg, L. E. (1989) Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three-amino acid motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 4056-4060.
- Hengge, R. und Bukau, B. (2003) Proteolysis in prokaryotes: protein quality control and regulatory principles. *Mol. Microbiol.* 49: 1451-1462.
- Henrich, S., Lindberg, I., Bode, W. und Than, M. E. (2005) Proprotein convertase models based on the crystal structures of furin and kexin: explanation of their specificity. *J. Mol. Biol.* 345: 211-227.

- Heussen, C. und Dowdle, E. B. (1980) Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* *102*: 196-202.
- Hierl, G. (2006) Proteasen in pflanzlichen Organellen: Analyse von potentiellen „Processing Peptidasen“ sowie Verdau von Zellwandproteinen in der Endphase des programmierten Zelltodes. Diplomarbeit. Technische Universität München.
- Hiller, M. M., Finger, A., Schweiger, M. und Wolf, D. H. (1996) ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* *273*: 1725-1728.
- Hilliard, J. J., Simon, L. D., Van Melderren, L. und Maurizi, M. R. (1998) PinA inhibits ATP hydrolysis and energy-dependent protein degradation by Lon Protease. *J. Biol. Chem.* *273*: 524-527.
- Hiratsuka, R., Yamada, Y. und Terasaka, O. (2002) Programmed cell death of *Pinus* nucellus in response to pollen tube penetration. *J. Plant Res.* *115*: 141-148.
- Hochstrasser, M. (1996) Ubiquitin-dependant protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* *30*: 405-439.
- Hock, B. (1973) Compartmentation and properties of the MDH isoenzymes from watermelon cotyledons. *Planta* *112*: 137-148.
- Hu, J., Aguirre, M., Peto, C., Alonso, J., Ecker, J. und Chory, J. (2002) A role for peroxisomes in photomorphogenesis and development in *Arabidopsis*. *Science* *297*: 405-409.
- Huang, A. H. C., Trelease, R. N. und Moore, T. S. (1983) Plant peroxisomes. New York, Academic Press.
- Huang, A. H. C. (1992) Oil bodies and oleosins in seeds. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* *43*: 177-200.
- Huang, A. H. C. (1996) Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol.* *110*: 1055-1061.
- Huesgen, P. F., Schuhmann, H. und Adamska, I. (2005) The family of Deg proteases in cyanobacteria and chloroplasts of higher plants. *Physiol. Plant.* *123*: 413-420.
- Hunt, T. (1997) Extinction forever. *Trends Biochem. Sci.* *22*: 371.
- Ingvarsdn, C. und Veierskov, B. (2001) Ubiquitin- and proteasome-dependant proteolysis in plants. *Physiol. Plant.* *112*: 451-459.
- Ishikawa, A., Tanaka, H., Kato, C., Iwasaki, Y. und Asahi, T. (2005) Molecular characterization of the *ZKT* gene encoding a protein with PDZ, K-Box, and TPR motifs in *Arabidopsis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *69*: 972-978.
- Ito, A. (1999) Mitochondrial processing peptidase: multiple-site recognition of precursor proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *265*: 611-616.
- Ito, A. S., Turchiello, R. D., Hirata, I. Y., Cezari, M. H., Meldal, M. und Juliano, L. (1998) Fluorescent properties of amino acids labeled with ortho-aminobenzoic acid. *Biospectroscopy* *4*: 395-402.

- Ito, J., Fukuda, H. (2002) ZEN1 is a key enzyme in the degradation of nuclear DNA during programmed cell death of tracheary elements. *Plant Cell* 14: 201-211.
- Ito, K., Kitazono, A. A. und Yoshimoto, T. (2004) Prolyl oligopeptidase. In: Handbook of Proteolytic Enzymes. Barrett, A. J., Rawlings, N. D. und Woessner, J. F. (Eds.) San Diego, Academic press.
- Itzhaki, H., Naveh, L., Lindahl, M., Cook, M. und Adam, Z. (1998) Identification and characterization of DegP, a serin protease associated with the luminal side of the thylakoid membrane. *J. Biol. Chem.* 273: 7094-7098.
- Jackson, S. E., Queitsch, C. und Toft, D. (2004) Hsp90: from structure to phenotype. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 1152-1155.
- Jancarik, J. und Kim, S. H. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystallog.* 24: 409-411.
- Jean, F., Boudreault, A., Basak, A., Seidah, N. G. und Lazure, C. (1995) Fluorescent peptidyl substrates as an aid in studying the substrate specificity of human prohormone convertase PC1 and human furin and designing a potent irreversible inhibitor. *J. Biol. Chem.* 270: 19225-19231.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. und Bevan, M. W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- Jimenez, A., Hernandez, J. A., del Rio, L. A. und Sevilla, F. (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea-leaves. *Plant Physiol.* 114: 275-284.
- Kalousek, F., Hendrick, J. P. und Rosenberg, L. E. (1988) Two mitochondrial matrix proteases act sequentially in the processing of mammalian matrix enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 7536-7540.
- Kalousek, F., Isaya, G. und Rosenberg, L. E. (1992) Rat liver mitochondrial intermediate peptidase (MIP): purification and initial characterization. *EMBO J.* 11: 2803-2809.
- Karata, K., Inagawa, T., Wilkinson, A. J., Tatsuta, T. und Ogura, T. (1999) Dissecting the role of a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases. Site-directed mutagenesis of the ATP-dependant protease FtsH. *J. Biol. Chem.* 274: 26225-26232.
- Kato, A., Hayashi, M., Kondo, M. und Nishimura, M. (1996) Targeting and processing of a chimeric protein with the N-terminal presequence of the precursor to glyoxysomal citrate synthase. *Plant Cell* 8: 1601-1611.
- Kato, A., Takeda-Yoshikawa, Y., Hayashi, M., Kondo, M., Hara-Nishimura, I. und Nishimura, M. (1998) Glyoxysomal malate dehydrogenase in pumpkin: cloning of a cDNA and functional analysis of its presequence. *Plant Cell Physiol.* 39: 186-195.
- Kato, A., Hayashi, M., Kondo, M. und Nishimura, M. (2000) Transport of peroxisomal proteins synthesized as large precursors in plants. *Cell Biochem. Biophys.* 32: 269-275.

- Keegstra, K. und Cline, K. (1999) Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell* 11: 557-570.
- Keller, G. A., Gould, S. J., De Luca, M. und Subramani, S. (1987) Firefly luciferase is targeted to peroxisomes in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 3264-3268.
- Kim, D. Y. und Kim, K. K. (2005) Structure and function of HtrA family proteins, the key players in proteins quality control. *J. Biochem. Mol. Biol* 38: 266-274.
- Kirschner, R. J. und Goldberg, A. L. (1983) A high molecular weight metalloendoprotease from the cytosol of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 258: 967-976.
- Kitada, S., Yamasaki, E., Kojima, K. und Ito, A. (2003) Determination of the cleavage site of the presequence by mitochondrial processing peptidase on the substrate binding scaffold and the multiple subsites inside the molecular cavity. *J Biol. Chem.* 278: 1879-1885.
- Kolmar, H., Waller, P. R. und Sauer, R. T. (1996) The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation. *J. Bacteriol.* 178: 5925-5929.
- Komov, V. P., Strelkova, M. A. und Makeeva, A. L. (1988) Neutral proteinase in peroxisomes from rat liver cells. *Biokhimiia* 53: 1532-1538.
- Kornberg, H. L. und Krebs, H. A. (1957) The glyoxylate cycle as a stage in the conversion of fat to carbohydrate in castor beans. *Nature* 179: 988-991.
- Kragler, F., Lametschwandtner, G., Christmann, J., Hartig, A. und Harada, J. J. (1998) Identification and analysis of the plant peroxisomal targeting signal 1 receptor NtPEX5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 13336-13341.
- Kraulis, P. J. (1991) Molscript: a programm to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallog.* 24: 946-950.
- Krojer, T., Garrido-Franco, M., Huber, R., Ehrmann, M. und Clausen, T. (2002) Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature* 416: 455-459.
- Kutejova, E., Durcova, G., Surovkova, E. und Kuzela, S. (1993) Yeast mitochondrial ATP-dependent protease: purification and comparison with the homologous rat enzyme and the bacterial ATP-dependent protease La. *FEBS Lett.* 329: 47-50.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lam, B. C. H. und Blumwald, E. (2002) Domains as functional building blocks of plant proteins. *Trends Plant Sci.* 7: 544-549.
- Lam, E., Pontier, D. und del Pozo, O. (1999) Die and let live: programmed cell death in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 502-507.
- Lam, E. und del Pozo, O. (2000a) Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol. Biol.* 44: 417-428.
- Lam, E. und Greenberg, J. (2000b) Cell death: the 'Yin' path in the balancing act of the life cycle. *Plant Mol. Biol.* 44: vii-viii.

- Lange, P. R., Eastmond, P. J., Madagan, K. und Graham, I. A. (2004) An Arabidopsis mutant disrupted in valine catabolism is also compromised in peroxisomal fatty acid β -oxidation. *FEBS Lett.* 571: 147-153.
- Lee, D. H. und Goldberg, A. L. (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 8: 397-403.
- Lee, G. J., Roseman, A. M., Saibil, H. R. und Vierling, E. (1997) A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J.* 16: 659-671.
- Lehmann, K., Hause, B., Altmann, D. und Margret, K. (2001) Tomato Ribonuclease LX with the functional endoplasmatic reticulum retention mitif HDEF is expressed during programmed cell death processes, including Xylem differentiation, germination, and senescence. *Plant Physiol.* 127: 436-449.
- Lenzen, C. U., Steinmann, D., Whiteheart, S. W. und Weis, W. I. (1998) Crystal structure of the hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Cell* 94: 525-536.
- Levchenko, I., Smith, C., Walsh, N., Sauer, R. und Baker, T. (1997) PDZ-like domains mediate binding specificity in the Clp/Hsp100 family of chaperons and protease regulatory subunits. *Cell* 91: 939-947.
- Levy, J. R. und Olefsky, J. M. (1990) Receptor-mediated internalization and turnover. In: *Handbook of experimental pharmacology: insulin*. Cuatrecasas, P. und Jacobs, S. (Eds.). Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 237-266.
- Li, W., Srinivasula, S. M., Chai, J., Li, P., Wu, J. W., Zhang, Z., Alnemri, E. S. und Shi, Y. (2002) Structural insight into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi. *Nat. Struct. Biol.* 9: 436-441.
- Lindahl, M., Spetea, C., Hundal, T., Oppenheim, A., Adam, Z. und Andersson, B. (2000) The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell* 12: 419-431.
- Lipinska, B., Zylicz, M. und Georgopoulos, C. (1990) The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase. *J. Bacteriol.* 172: 1791-1797.
- Liz, M. A. und Sousa, M. M. (2005) Deciphering cryptic proteases. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 989-1002.
- Lopez-Huertas, E., Charlton, W. L., Johnson, B., Graham, I. A. und Baker, A. (2000) Stress induces peroxisome biogenesis genes. *EMBO J.* 19: 6770-6777.
- Lu, G. (1996) A WWW service system for automatic comparison of protein structures. *Protein Data Bank Quart. Newsletter* 78: 10-11.
- Luciano, P. und Geli, V. (1996) The mitochondrial processing peptidase: function and specificity. *Experientia* 52: 1077-1082.
- Lupas, A., Flanagan, J. M., Tamura, T. und Baumeister, W. (1997) Self-compartmentalizing proteases. *Trends Biochem. Sci.* 22: 399-404.
- Lupas, A. und Martin, J. (2002) AAA proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 746-753.

- Lusson, J., Benjannet, S., Hamelin, J., Savaria, D., Lazure, C., Chretien, M. und Seidah, N. G. (1997) Implication of the RRGD sequence of the proprotein convertase PC1 in zymogen processing and cellular trafficking. *Biochem. J.* 326: 737-744.
- Ma, L., Gao, Y., Qu, Z., Chen, J., Li, J., Zhao, H. und Deng, X. W. (2002) Genomic evidence for COP1 as a repressor of light-regulated gene expression and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 2383-2398.
- Maes, M.B., Lambeir, A.M., Gilany, K., Senten, K., Van der Veken, P., Leiting, B., Augustyns, K., Scharpe, S. und De Meester, I. (2005) Kinetic investigation of human dipeptidyl peptidase II (DPPII)-mediated hydrolysis of dipeptide derivatives and its identification as quiescent cell proline dipeptidase (QPP)/dipeptidyl peptidase 7 (DPP7). *Biochem. J.* 386: 315-324.
- Malek, L., Bogorad, L., Ayers, R. und Goldberg, A. L. (1984) Newly synthesized proteins are degraded by an ATP-stimulated proteolytic process in isolated pea chloroplasts. *FEBS Lett.* 166: 253-257.
- Martinez-Garcia, J. F., Monte, E. und Quail, P. H. (1999) A simple, rapid and quantitative method for preparing *Arabidopsis* protein extracts for immunoblot analysis. *Plant J.* 20: 251-257.
- Maskos, K., Jozic, D. und Fernandez-Catalan, C. (2003) Crystal structure of pitrilysin.
- Matsumura, T., Otera, H. und Fujiki, Y. (2000) Disruption of the interaction of the longer isoform of Pex5p, Pex5pL, with Pex7p abolishes peroxisome targeting signal type 2 protein import in mammals. Study with a novel Pex5-impaired Chinese hamster ovary cell mutant. *J. Biol. Chem.* 275: 21715–21721.
- Maurizi, M. R. (1987) Degradation in vitro of bacteriophage lambda N protein by Lon protease from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262: 2696-2703.
- Maurizi, M. R. und Li, C. C. (2001) AAA proteins: in search of a common molecular basis. *EMBO Rep.* 2: 980-985.
- Maurizi, M. R. (2002) Love it or leave it: Tough choices in protein quality control. *Nat. Struct. Biol.* 9: 410-412.
- McClung, C. R. (1997) Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free Radical Biology & Medicine* 23: 489-496.
- Medda, R., Padiglia, A. und Floris, G. (1995) Plant copper-amine oxidases. *Phytochemistry* 39: 1-9.
- Menon, A. S. und Goldberg, A. L. (1987) Binding of nucleotides to the ATP-dependent protease La from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262: 14921-14928.
- Meritt, E. A. und Bacon, D. J. (1997) Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Methods Enzymol.* 277: 505-524.
- Miller, C. G. (2004) Oligopeptidase A. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Barrett, A. J., Rawlings, N. D. und Woessner, J. F. (Eds.). San Diego, Academic press.
- Mirsky, I. A. und Broh-Kahn, R. H. (1949) The inactivation of insulin by tissue extracts. I. The distribution and properties of insulin inactivating extracts (insulinase). *Arch. Biochem. Biophys.* 20: 1-9.

- Mizusawa, N., Tomo, T., Satoh, K. und Miyao, M. (2003) Degradation of the D1 protein of photosystem II under illumination *in vivo*: two different pathways involving cleavage or intramolecular cross-linking. *Biochemistry* 42: 10034-10044.
- Moberg, P., Ståhl, A., Bhushan, S., Wright, S. J., Eriksson, A., Bruce, B. D. und Glaser, E. (2003) Characterization of a novel zinc metalloprotease involved in degrading targeting peptides in mitochondria and chloroplasts. *Plant J.* 36: 616-628.
- Mollenhauer, H. H. und Totten, C. (1970) Studies on seeds: V. Microbodies, glyoxysomes, and ricinosomes of castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 46: 794-799.
- Morita, T., Kato, H., Iwanaga, S., Takada, K. und Kimura, T. (1977) New fluorogenic substrates for alpha-thrombin, factor Xa, kallikreins, and urokinase. *J. Biochem.* 82: 1495-1498.
- Morty, R. E., Lonsdale-Eccles, J. D., Morehead, J., Caler, E. V., Mentele, R., Auerswald, E. A., Coetzer, T. H. T., Andrews, N. W. und Burleigh, B. A. (1999) Oligopeptidase B from *Trypanosoma brucei*: a new member of an emerging subgroup of serine oligopeptidases. *J. Biol. Chem.* 274: 26149-26156.
- Morty, R. E. und Burleigh, B. A. (2004) Oligopeptidase B. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Barrett, A. J., Rawlings, N. D. und Woessner, J. F. (Eds.). San Diego, Academic press.
- Murashige, T. und Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Mukhopadhyay, A., Hammen, P., Waltner-Law, M., Weiner, H. (2002) Timing and structural consideration for the processing of mitochondrial matrix space proteins by the mitochondrial processing peptidase (MPP). *Protein Sci.* 11: 1026-1035.
- Murwantoko, Yano, M., Ueta, Y., Murasaki, A., Kanda, H., Oka, C. und Kawaichi, M. (2004) Binding of proteins to the PDZ domain regulates proteolytic activity of HtrA1 serine protease. *Biochem. J.* 381: 895-904.
- Musil, D., Zucic, D., Turk, D., Engh, R. A., Mayr, I., Huber, R., Popovic, T., Turk, V., Towatari, T. und Katunuma, N. (1991) The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J.* 10: 2321-2330.
- Nadeau, J. A., Zhang, X. S., Li, J. und O'Neill, S. D. (1996) Ovule development: identification of stage-specific and tissue-specific cDNAs. *Plant Cell* 8: 213-239.
- Nagao, Y. und Ito, A. (2000) Glycine-rich region of mitochondrial processing peptidase alpha-subunit is essential for binding and cleavage of the precursor proteins. *J. Biol. Chem.* 275: 34552-34556.
- Nakamura, T., Yokota, S., Muramoto, Y., Tsutsui, K., Oguri, Y., Fukui, K. und Takabe, T. (1997) Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *Plant J.* 11: 1115-1120.
- Navaza, J. (1994) AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr. D* 50: 157-163.

- Neuberger, G., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., Hartig, A. und Eisenhaber, F. (2003) Motif refinement of the peroxisomal targeting signal 1 and evaluation of taxon-specific differences. *J. Mol. Biol.* 328: 567-579.
- Neupert, W. (1997) Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 863-917.
- Neurath, H. (1989) Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem. Sci.* 14: 268-271.
- Nicholls, A., Bharadwaj, R. und Honig, B. (1993) Grasp: graphical representation and analysis of surface properties. *Biophys. J.* 64: A166.
- Nishii, W., Maruyama, T., Matsuoka, R., Muramatsu, T. und Takahashi, K. (2002) The unique sites in Sula protein preferentially cleaved by ATP-dependent Lon protease from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 269: 451-457.
- Notredame, C., Higgins, D. G. und Heringa J. (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* 302: 205-217.
- Novikoff, A. B., Beaufay, A. und De Duve, C. (1956) Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat-liver. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2: 179.
- Nunnari, J., Fox, T. D. und Walter, P. (1993) A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. *Science* 262: 1997-2004.
- Nussbaum, A. K., Dick, T. P., Keilholz, W., Schirle, M., Stevanovic, S., Dietz, K., Heinemeyer, W., Groll, M., Wolf, D. H., Huber, R., Rammensee, H. G. und Schild, H. (1998) Cleavage motifs of the yeast 20S proteasom b subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 12504-12509.
- Oblong, J. E. und Lamppa, G. K. (1992) Identification of two structurally related proteins involved in proteolytic processing of precursors targeted to the chloroplast. *EMBO J.* 11: 4401-4409.
- O'Donoghue, E. M., Somerfield, S. D. und Heyes, J. A. (2002) Organization of cell walls in *Sandersonia aurantiaca* floral tissue. *J. Exp. Bot.* 53: 513-523.
- Ogishima, T., Niidome, T., Shimokata, K., Kitada, S. und Ito, A. (1995) Analysis of elements in the substrate required for processing by mitochondrial processing peptidase. *J. Biol. Chem.* 270: 30322-30326.
- Ogura, T. und Wilkinson, A. J. (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure-diverse function. *Genes Cells* 6: 575-597.
- Okamoto, T., Toyooka, K. und Minamikawa, T. (2001) Identification of a membrane-associated cystein protease with possible dual role in the endoplasmatic reticulum and protein storage vacuole. *J Biol. Chem.* 276: 742-751.
- Olsen, O. A. (2004) Nuclear endosperm development in cereals and *arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16: S214-S227.
- Otwinowski, Z. und Minor, W. (1993) DENZO: A film-processing program for macromolecular crystallography. New Haven, CT, Yale Univ. Press.
- Otwinowski, Z. und Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillations mode. *Methods Enzymol.* 276: 628-640.

- Ou, W. J., Ito, A., Okazaki, H. und Omura, T. (1989) Purification and characterization of a processing protease from rat liver mitochondria. *EMBO J.* 8: 2605-2612.
- Pallen, M. J. und Wren, B. W. (1997) The HtrA family of serine proteases. *Mol. Microbiol.* 26: 209-221.
- Panavas, T., Reid, P. D. und Rubinstein, B. (1998) Programmed cell death of daylily petals: Activities of well-based enzymes and effects of heat shock. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 379-388.
- Peltier, J. B., Emanuelsson, O., Kalume, D. E., Ytterberg, J., Friso, G., Rudella, A., Liberles, D. A., Soderberg, L., P., R., von Heijne, G. und van Wijk, K. J. (2002) Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell* 14: 211-236.
- Petriv, O. I., Tang, L., Titorenko, V. I. und Rachubinski, R. A. (2004) A new definition for the consensus sequence of the peroxisome targeting signal type 2. *J. Mol. Biol.* 341: 119-134.
- Platta, H. W., Girzalsky, W. und Erdmann, R. (2004) Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p. *Biochem. J.* 384: 37-45.
- Platta, H. W., Grunau, S., Rosenkranz, K., Girzalsky, W. und Erdmann, R. (2005) Functional role of the AAA peroxins in dislocation of the cycling PTS1 receptor back to the cytosol. *Nat. Cell Biol.* 7: 817-823.
- Pointing, C. P. (1997) Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast and plants. *Protein Science* 6: 464-468.
- Polgar, L. (1994) Prolyl oligopeptidases. In: *Meth. Enzymol.* Barrett, A. J. (Ed.). New York, Academic press. 244, 188-200.
- Potuschak, T., Stary, S., Schlögelhofer, P., Becker, F., Nizhynska, V. und Bachmair, A. (1998) *PRT1* of *Arabidopsis thaliana* encodes a component of the plant N-end rule pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 7904-7908.
- Purdue, P. E., Yang, X. und Lazarow, P. B. (1998) Pex18p and Pex21p, a novel pair of related peroxins essential for peroxisomal targeting by the PTS2 pathway. *J. Cell. Biol.* 143: 1859-1869.
- Rabilloud, T. (1990) Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis* 11: 785-794.
- Rasulova, F. S., Dergousova, N. I., Starkova, N. N., Melnikov, E. E., Rumsh, L. D., Ginodman, L. M. und Rotanova, T. V. (1998) The isolated proteolytic domain of *Escherichia coli* ATP-dependent protease Lon exhibits the peptidase activity. *FEBS Lett.* 432: 179-181.
- Rawlings, N. D. und Barrett, A. J. (1994) Families of serine peptidases. *Methods Enzymol.* 244: 19-61.
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P. und Barrett, A. J. (2004) *MEROPS*: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 32: D160-164.

- Rep, M. und Grivell, L. A. (1996) The role of protein degradation in mitochondrial function and biogenesis. *Curr. Genet.* 30: 367-380.
- Reumann, S. (2000) The structural properties of plant peroxisomes and their metabolic significance. *Biol. Chem.* 381: 639-648.
- Reumann, S. (2004) Specification of the peroxisome targeting signals type 1 and type 2 of plant peroxisomes by bioinformatics analyses. *Plant Physiol.* 135: 783-800.
- Reumann, S., Ma, C., Lemke, S. und Babujee, L. (2004) AraPeroX. A database of putative *Arabidopsis* proteins from plant peroxisomes. *Plant Physiol.* 136: 2587-2608.
- Richter, S. und Lamppa, G. K. (1998) A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 7463-7468.
- Richter, S. und Lamppa, G. K. (1999) Stromal processing peptidase binds transit peptides and initiates their ATP-dependent turnover in chloroplasts. *J. Cell Biol.* 147: 33-44.
- Roberts, L. R., Adjei, P. N. und Gores, G. J. (1999) Cathepsins as effector proteases in hepatocyte apoptosis. *Cell Biochem. Biophys.* 30: 71-88.
- Robinson, C. und Ellis, R. J. (1984) Transport of proteins into chloroplasts. Partial purification of a chloroplast protease involved in the processing of imported precursor polypeptides. *Eur. J. Biochem.* 142: 337-342.
- Rodrigues-Pousada, R. A., De Rycke, R., Dedonder, A., Van Caeneghem, W., Engler, G., Van Montagu, M. und Van der Straeten, D. (1993) The *Arabidopsis* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene 1 is expressed during early development. *Plant Cell* 5: 897-911.
- Roise, D., Horvath, S. J., Tomich, J. M., Richards, J. H. und Schatz, G. (1986) A chemically synthesized presequence of an imported mitochondrial protein can form an amphiphilic helix and perturb natural and artificial phospholipid layers. *EMBO J.* 5: 1327-1334.
- Roth, R. A. (2004) Insulysin. In: *The handbook of proteolytic enzymes*. Barrett, A. J., Rawlings, N. D. und Woessner, J. F. (Eds.). London, Elsevier, 871-876.
- Roudiak, S. G. und Shrader, T. E. (1998) Functional role of the N-terminal region of the Lon-protease. *Biochemistry* 37: 11255-11263.
- Rüdiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J. und Bukau, B. (1997) Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J.* 16: 1501-1507.
- Ruepp, A. (2000) The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature* 407: 508-513.
- Salvesen, G. S. und Boatright, K. M. (2004) Caspase-8. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Barrett, A. J., Rawlings, N. D. und Woessner, J. F. San Diego, Academic press.
- Sarria, R., Lyznik, A., Vallejos, C. E. und Mackenzie, S. A. (1998) A cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial peptide in common bean is post-translationally regulated. *Plant Cell* 10: 1217-1228.

- Sauer, R. T., Bolon, D. N., Burton, B. M., Burton, R. E., Flynn, J. M., Grant, R. A., Hersch, G. L., Joshi, S. A., Kenniston, J. A., Levchenko, I., Neher, S. B., Oakes, E. S. C., Siddiqui, S. M., Wah, D. A. und Baker, T. A. (2004) Sculpting the proteome with AAA⁺ proteases and disassembly machines. *Cell* 119: 9-18.
- Sautter, C., Bartscherer, H. C. und Hock, B. (1981) Separation of plant cell organelles by zonal centrifugation in reorienting density gradients. *Anal. Biochem.* 113: 179-184.
- Sautter, C. und Hock, B. (1982) Fluorescence immunohistochemical localization of malate dehydrogenase isoenzymes in watermelon cotyledons. *Plant Physiol.* 70: 1162-1168.
- Sautter, C. (1986) Microbody transition in greening watermelon cotyledons. Double immunocytochemical labeling of isocitrate lyase and hydroxypyruvate reductase. *Planta* 167: 491-503.
- Schechter, J. und Berger, A. (1967) On size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27: 157-162.
- Schmid, M., Simpson, D., Kalousek, F. und Gietl, C. (1998) A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome, a putative lytic compartment. *Planta* 206: 466-475.
- Schmid, M., Simpson, D. und Gietl, C. (1999) Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 14159-14164.
- Schmid, M., Simpson, D. J., Sarioglu, H., Lottspeich, F. und Gietl, C. (2001) The ricinosomes of senescing plant tissue bud from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 5353-5358.
- Schneider, A., Oppliger, W. und Jenö, P. (1994) Purified inner membrane protease I of yeast mitochondria is a heterodimer. *J. Biol. Chem.* 269: 8635-8638.
- Schubert, K. R. (1986) Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 539-574.
- Schubert, M. (2002) Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277: 8354-8365.
- Schulte, U., Arretz, M., Schneider, H., Tropschuk, M., Wachter, E. und Neupert, W. (1989) A family of mitochondrial proteins involved in bioenergetics and biogenesis. *Nature* 339: 147-149.
- Schultz, J., Hoffmüller, U., Krause, G., Ashurst, J., Macias, M. J., Schmieder, P., Schneider-Mergener, J. und Oschkinat, H. (1998) Specific interactions between the syntrophin PDZ domain and voltage-gated sodium channels. *Nat. Struct. Biol.* 5: 19-24.

- Seidah, N. G. und Chretien, M. (1997) Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 602-607.
- Seidah, N. G., Mowla, S. J., Hamelin, J., Mamarbachi, A. M., Benjannet, S., Toure, B. B., Basak, A., Munzer, J. S., Marcinkiewicz, J., Zhong, M., Barale, J. C., Lazure, C., Murphy, R. A., Chretien, M. und Marcinkiewicz, M. (1999) Mammalian subtilisin/kexin isoenzyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 1321-1326.
- Seidah, N. G. und Chretien, M. (2004) Proprotein convertase SKI-1/S1P. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Barrett, A. J., Rawlings, N. D. und Woessner, J. F. (Eds.). San Diego, Academic press.
- Shevchenko, A., Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Boucherie, H. und Mann, M. (1996a) Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 14440-14445.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. und Mann, M. (1996b) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68: 850-858.
- Shii, K., Yokono, K., Baba, S. und Roth, R. A. (1986) Purification and characterization of an insulin-degrading enzyme. *Diabetes* 35: 675-683.
- Shirasu, K. und Schulze-Lefert, P. (2000) Regulators of cell death in disease resistance. *Plant Mol. Biol.* 44: 371-85.
- Simcox, P. D., Garland, W., DeLuca, V., Canvin, D. T. und Dennis, D. T. (1979) Respiratory pathways and fat synthesis in the developing castor oil seed. *Can. J. Bot.*: 1008-1014.
- Simpson, D. J. (2001) Proteolytic degradation of cereal prolamins - the problem with proline. *Plant Sci.* 161: 825-838.
- Sinvany-Villalobo, G., Davydov, O., Ben-Ari, G., Zaltsman, A., Raskind, A. und Adam, Z. (2004) Expression in multigene families. Analysis of chloroplast and mitochondrial proteases. *Plant Physiol.* 135: 1336-1345.
- Skorko-Glonek, J., Krzewski, K., Lipinska, B., Bertoli, E. und Tanfani, F. (1995) Comparison of the structure of wild-type HtrA heat shock protease and mutant HtrA proteins. *J. Biol. Chem.* 270: 1140-1146.
- Šlais, K. und Friedl, Z. (1995) Ampholytic dyes for spectroscopic determination of pH in electrofocusing. *J. Chromatogr. A* 695: 113-122.
- Smith, J. J. und Rachubinski, R. A. (2001) A role for the peroxin Pex8p in Pex20p-dependent thiolase import into peroxisomes of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Biol. Chem.* 276: 1618-1625.
- Smith, S. M. und Ellis, R. J. (1979) Processing of small subunit precursor of ribulose biphosphate carboxylase and its assembly into whole enzyme are stromal events. *Nature* 278: 662-664.

- Smyth, D. R., Bowman, J. L. und Meyerowitz, E. M. (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2: 755-767.
- Song, M. C., Shimokata, K., Kitada, S., Ogishima, T. und Ito, A. (1996) Role of basic amino acids in the cleavage of synthetic peptide substrates by mitochondrial processing peptidase. *J. Biol. Chem.* 120: 1163-1166.
- Song, M. C., Ogishima, T. und Ito, A. (1998) Importance of residues carboxyl terminal relative to the cleavage site in substrates of mitochondrial processing peptidase for their specific recognition and cleavage. *J. Biochem.* 124: 1045-1049.
- Songyang, Z., Fanning, A. S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S. M., Chishti, A., Crompton, A., Chan, A. C., Anderson, J. M. und Cantley, L. C. (1997) Recognition of unique carboxy-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275: 73-77.
- Spiess, C., Beil, A. und Ehrmann, M. (1999) A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 97: 339-347.
- Ståhl, A., Moberg, P., Ytterberg, J., Panfilov, O., Brockenhuus von Löwenhielm, H., Nielsson, F. und Glaser, E. (2002) Isolation and identification of a novel mitochondrial metalloprotease (PreP) that degrades targeting presequences in plants. *J. Biol. Chem.* 277: 41931-41939.
- Ståhl, A., Nilsson, S., Lundberg, P., Bhushan, S., Biverstahl, H., Moberg, P., Morisset, M., Vener, A., Mäler, L., Langel, U. und Glaser, E. (2005) Two novel targeting peptide degrading proteases, PrePs, in mitochondria and chloroplasts, so similar and still different. *J. Mol. Biol.* 349: 847-860.
- Stahlberg, H., Kutejova, E., Suda, K., Wolpensinger, B., Lustig, A., Schatz, G., Engel, A. und Suzuki, C. K. (1999) Mitochondrial Lon of *Saccharomyces cerevisiae* is a ring-shaped protease with seven flexible subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 6787-6790.
- Stary, S., Yin, X. J., Potuschak, T., Schlögelhofer, P., Nizhynska, V. und Bachmair, A. (2003) PRT1 of *Arabidopsis* is a ubiquitin protein ligase of the plant N-end rule pathway with specificity for aromatic amino-terminal residues. *Plant Physiol.* 133: 1360-1366.
- Štastná, M., Trávníček, M. und Šlais, K. (2005) New azo dyes as colored isoelectric point markers for isoelectric focusing in acidic pH region. *Electrophoresis* 26: 53-59.
- Stein, K., Schell-Steven, A., Erdmann, R. und Rottensteiner, H. (2002) Interactions of Pex7p and Pex18p/Pex21p with the peroxisomal docking machinery: implications for the first steps in PTS2 protein import. *Mol. Cell. Biol.* 22: 6056-6069.
- Steiner, D. F., Cunningham, D., Spiegelman, L. und Aten, B. (1967) Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science* 157: 697-699.
- Stintzi, A. und Browse, J. (2000) The *Arabidopsis* male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 10625-10630.
- Stoltze, L. (2000) Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat. Immunol.* 1: 413-418.

- Strauch, K. L., Johnson, K. und Beckwith, J. (1989) Characterization of *deg P*, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperatures. *J. Bacteriol.* *171*: 2689-2696.
- Stubbs, M. T., Laber, B., Bode, W., Huber, R., Jerala, R., Lenarcic, B. und Turk, V. (1990) The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. *EMBO J.* *9*: 1939-1947.
- Su, Q. und Boschetti, A. (1993) Partial purification and properties of enzymes involved in the processing of a chloroplast import protein from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* *217*: 662-664.
- Subramani, S., Koller, A. und Snyder, W. B. (2000) Import of peroxisomal matrix and membrane proteins. *Annu. Rev. Biochem.* *69*: 399-418.
- Suzuki, C. K., Suda, K., Wang, N. und Schatz, G. (1994) Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration. *Science* *264*: 273-276.
- Swamy, K. H. und Goldberg, A. L. (1981) *E. coli* contains eight soluble proteolytic activities, one being ATP dependent. *Nature* *292*: 652-654.
- Swamy, K. H. und Goldberg, A. L. (1982) Subcellular distribution of various proteases in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *149*: 1027-1033.
- Swinkels, B. W., Gould, S. J., Bodnar, A. G., Rachubinski, R. A. und Subramani, S. (1991) A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J.* *10*: 3255-3262.
- Tamura, N., Lottspeich, F., Baumeister, W. und Tamura, T. (1998) The role of tricorn protease and its aminopeptidase-interacting factors in cellular protein degradation. *Cell* *95*: 637-648.
- Tanaka, T., Yamauchi, D. und Minamikawa, T. (1991) Nucleotide sequence of cDNA for an endopeptidase (EP-C1) from pods of maturing *Phaseolus vulgaris* fruits. *Plant Mol. Biol.* *16*: 1083-1084.
- Taylor, A. B., Smith, B. S., Kitada, S., Kojima, K., Miyaura, H., Otwinowski, Z., Ito, A. und Deisenhofer, J. (2001) Crystal structure of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences. *Structure* *9*: 615-625.
- Tegeder, M., Offler, C. E., Frommer, W. B. und Patrick, J. W. (2000) Amino acid transporters are localized to transfer cells of developing pea seeds. *Plant Physiol.* *122*: 319-325.
- Teter, S. A., Houry, W. A., Ang, D., Tradler, T., Rockabrand, D., Fischer, G., Blum, P., Georgopoulos, C. und Hartl, F. U. (1999) Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. *Cell* *97*: 755-765.
- Thompson, R. C. (1973) Use of peptide aldehydes to generate transition-state analogs of elastase. *Biochemistry* *12*: 47-51.

- Thornberry, N. A., Rosen, A. und Nicholson, D. W. (1997) Control of apoptosis by proteases. *Adv. Pharm.* *41*: 155-177.
- Tiselius, A., Hjerten, S. und Levin, O. (1956) Protein chromatography on calcium phosphate columns. *Arch. Biochem. Biophys.* *65*: 132-155.
- Titorenko, V. I., Smith, J. J., Szilard, R. K. und Rachubinski, R. A. (1998) Pex20p of the yeast *Yarrowia lipolytica* is required for the oligomerization of thiolase in the cytosol and for its targeting to the peroxisome. *J. Cell Biol.* *142*: 403-420.
- Titorenko, V. I. und Rachubinski, R. A. (2004) The peroxisome: orchestrating important developmental decisions from inside the cell. *J. Cell Biol.* *164*: 641-645.
- Titus, D. E. und Becker, W. E. (1985) Investigation of the glyoxysome peroxisome transition in germinating cucumber cotyledons using double-label immunoelectron microscopy. *J. Cell Biol.* *101*: 1288-1299.
- Tolbert, N. E., Oeser, A., Kisaki, K., Hageman, R. H. und Yamazaki, R. K. (1968) Peroxisomes from spinach leaves containing enzymes related to glycolate metabolism. *J. Biol. Chem.* *243*: 5179-5184.
- Tolbert, N. E. (1971) Microbodies-peroxisomes and glyoxysomes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* *22*: 45-74.
- Tomkinson, B. (1999) Tripeptidyl peptidases: enzymes that count. *Trends Biochem. Sci.* *24*: 355-359.
- Tomkinson, B. (2004) Tripeptidyl-peptidase II. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Barrett, A. J., Rawlings, N. D. und Woessner, J. F. San Diego, Academic press.
- Tong, L. A. und Rossmann, M. G. (1990) The locked rotation function. *Acta Crystallogr A* *46 (Pt 10)*: 783-792.
- Toyooka, K., Okamoto, T. und Minamikawa, T. (2000) Mass transport of proform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. *J. Cell Biol.* *148*: 453-464.
- Trelease, R. N., Becker, W. M., Gruber, P. J. und Newcomb, E. H. (1971) Microbodies (glyoxysomes and peroxisomes) in cucumber cotyledons. Correlative biochemical and ultrastructural study in light and dark grown seedlings. *Plant Physiol.* *48*: 461-475.
- Turk, D. (1992) Weiterentwicklung eines Programmes für Molekülgrafik und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklärungen. Germany, Technische Universität München.
- Turk, D., Guncar, G., Podobnik, M. und Turk, B. (1998) Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol. Chem.* *379*: 137-147.
- Turk, D. und Guncar, G. (2003) Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *59*: 203-213.
- Turner, G. C., Du, F. und Varshavsky, A. (2000) Peptides accelerate their uptake by activating a ubiquitin-dependant proteolytic pathway. *Nature* *405*: 579-583.

- Valpuesta, V., Lange, N. E., Guerrero, C. und Reid, M. S. (1995) Up-regulation of a cysteine protease accompanies the ethylene-insensitive senescence of daylily (*Hemerocallis*) flowers. *Plant Mol. Biol.* 28: 575-582.
- Van den Bosch, H., Schutgens, R. B. H., Wanders, R. J. A. und Tager, J. M. (1992) Biochemistry of peroxisomes. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 157-197.
- Van Dijl, J. M., Kutejova, E., Suda, K., Perecko, D., Schatz, G. und Suzuki, C. K. (1998) The ATPase and protease domains of yeast mitochondrial Lon: roles in proteolysis and respiration-dependent growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 10584-10589.
- Van Melder, L. und Gottesman, S. (1999) Substrate sequestration by a proteolytically inactive Lon mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 6064-6071.
- Varshavsky, A. (1996) The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 12142-12149.
- Varshavsky, A. (1997) The ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci.* 22: 383-387.
- Vicentini, F. und Matile, F. (1993) Gerontosomes, a multifunctional type of peroxisomes in senescent leaves. *J. Plant Physiol.* 142: 50-56.
- Viestra, R. D. (2003) The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci.* 8: 135-142.
- Vigil, E. L. (1970) Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of castor bean endosperm. *J. Cell Biol.* 46: 435-454.
- Vines, D. und Warburton, M.J. (1998) Purification and characterisation of a tripeptidyl aminopeptidase I from rat spleen. *Biochim. Biophys. Acta.* 1384: 233-242.
- Vines, D. J. und Warburton, M. J. (1999) Classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis fibroblasts are deficient in lysosomal peptidase I. *FEBS Lett.* 443: 131-135.
- von Heijne, G. und Nishikawa, K. (1991) Chloroplast transit peptides. The perfect random coil? *FEBS Lett.* 278: 1-3.
- Vothknecht, U. C. und Soll, J. (2003) Protein import into chloroplasts: a single tune or variations on a common theme. *Plastids*. Möller, S. G. Oxford, Blackwell Publishing, 149-158.
- Wagner, I., Van Dyck, L., Savel'ev, A., Neupert, W. und Langer, T. (1997) Autocatalytic processing of the ATP-dependent PIM1 protease: crucial function of a pro-region for sorting to mitochondria. *EMBO J.* 16: 7317-7325.
- Waller, P. R. und Sauer, R. T. (1996) Characterization of *deg Q* and *deg S*, *Escherichia coli* genes encoding homologs of the DegP protease. *J. Bacteriol.* 178: 1146-1153.
- Walsh, N. P., Alba, B. M., Bose, B., Gross, C. A. und Sauer, R. T. (2003) OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell* 113: 61-71.
- Wan, L., Xia, Q., Qiu, X. und Selvaraj, G. (2002) Early stages of seed development in *Brassica napus*: a seed coat-specific cysteine proteinase associated with programmed cell death of the inner integument. *Plant J.* 30: 1-10.

- Wang, H., Li, J., Bostock, R. M. und Gilchrist, D. G. (1996) Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell* 8: 375-391.
- Wang, J., Hartling, J. A. und Flanagan, J. M. (1997) The structure of Clp at 2,3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* 91: 447-456.
- Wang, M., Oppedijk, B. J., Lu, X., Van Duijn, B. und Schilperoort, R. A. (1996) Apoptosis in barley aleurone during germination and its inhibition by abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* 32: 1125-1134.
- Waxman, L. und Goldberg, A. L. (1982) Protease La from *Escherichia coli* hydrolyses ATP proteins in a linked fashion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 4883-4887.
- Waxman, L. und Goldberg, A. L. (1985) Protease La, the lon gene product, cleaves specific fluorogenic peptides in an ATP-dependent reaction. *J. Biol. Chem.* 260: 12022-12028.
- Weber, H., Borisjuk, L., Heim, U., Sauer, N. und Wobus, U. (1997) A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell* 9: 895-908.
- Wegele, H., Haslbeck, M., Reinstein, J. und Buchner, J. (2003) Sti1 Is a novel activator of the Ssa proteins. *J. Biol. Chem.* 278: 25970-25976.
- Weibezahn, J., Tessarz, P., Schlieker, C., Zahn, R., Maglica, Z., Lee, S., Zentgraf, H., Weber-Ban, E. U., Dougan, D. A., Tsai, F. T. F., Mogk, A. und Bukau, B. (2004) Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB. *Cell* 119: 653-665.
- Wickner, S., Maurizi, M. R. und Gottesmann, S. (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 286: 1888-1893.
- Wieprecht, T., Apostolov, O., Beyermann, M. und Seelig, J. (2000) Interaction of a mitochondrial presequence with lipid membranes: role of helix formation for membrane binding and perturbation. *Biochemistry* 19: 15297-15305.
- Wiertz, E. J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A. und Ploegh, H. L. (1996) Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 384: 432-438.
- Wilken, C., Kitzing, K., Kurzbauer, R., Ehrmann, M. und Clausen, T. (2004) Crystal structure of the DegS stress sensor: how a PDZ domain recognizes misfolded protein and activates a protease. *Cell* 117: 483-494.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inze, M. und Van Camp, W. (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defense in C3 plants. *EMBO J.* 16: 4806-4816.
- Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T. und Mann, M. (1996) Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* 379: 466-469.
- Woodward, A. W. und Bartel, B. (2005) The *Arabidopsis* peroxisomal targeting signal type 2 receptor Pex7 is necessary for peroxisome function and dependent on Pex5. *Mol. Biol. Cell* 16: 573-583.

- Worley, C. K., Ling, R. und Callis, J. (1998) Engineering *in-vivo* instability of firefly luciferase and *Escherichia coli* β -glucuronidase in higher plants using recognition elements from the ubiquitin pathway. *Plant Mol. Biol.* 37: 337-347.
- Xu, F. X. und Chye, M. L. (1999) Expression of cysteine proteinase during developmental events associated with programmed cell death in brinjal. *Plant J.* 17: 321-327.
- Yang, T. und Poovaiah, B. W. (2002) Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 4097-4102.
- Yang, T. und Poovaiah, B. W. (2003) Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends Plant Sci.* 8: 505-512.
- Yen, C., Green, L. und Miller, C. G. (1980) Degradation of intracellular protein in *Salmonella typhimurium* peptidase mutants. *J. Mol. Biol.* 143: 21-33.
- Yoshida, S., Ito, M., Callis, J., Nishida, I. und Watanabe, A. (2002) A delayed leaf senescence mutant is defective in arginyl-tRNA:protein arginyltransferase, a component of the N-end rule pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.* 32: 129-137.
- Young, J. C., Barral, J. M. und Hartl F. U. (2003) More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends Biochem. Sci.* 28: 541-547.
- Zeth, K., Ravelli, R. B., Paal, K., Cusack, S., Bukau, B. und Deuerling, E. (2002) Structural analysis of the adaptor protein ClpS in complex with the N-terminal domain of ClpA. *Nat. Struct. Biol.* 9: 906-911.
- Zeth, K. (2004) Structural analysis of DegS, a stress sensor of the bacterial periplasm. *FEBS Lett.* 569: 351-358.
- Zhang, X. P., Sjöling, S., Tanudji, M., Somogyi, L., Andreu, D., Eriksson, L. E. G., Gräslund, A., Whelan, J. und Glaser, E. (2001) Mutagenesis and computer modeling approach to study determinants for recognition of signal peptides by the mitochondrial processing peptidase. *Plant J.* 27: 427-438.
- Zhang, X. P. und Glaser, E. (2002) Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperon. *Trends Plant Sci.* 7: 14-21.
- Zhou, M., Upson, R. H., Diwu, Z. und Haugland, R. P. (1996) A fluorogenic substrate for β -glucuronidase: applications in fluorometric, polyacrylamide gel and histochemical assays. *J. Biochem. Biophys. Methods* 33: 197-205.
- Zolman, B. K., Monroe-Augustus, M., Thompson, B., Hawes, J. W., Krukenberg, K. A., Matsuda, S. P. und Bartel, B. (2001) *chy1*, an *Arabidopsis* mutant with impaired β -oxidation, is defective in a peroxisomal β -hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase. *J. Biol. Chem.* 276: 31037-31046.
- Zwickl, P., Baumeister, W. und Steven, A. (2000) Dis-assembly lines: the proteasome and related ATPase-assisted proteases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 242-250.

Folgende Abbildungen und Tabellen wurden mit freundlicher Genehmigung verwendet:

Abb.3.1, S.24: Vierstra, R. D. (2003) The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. Trends Plant Sci. 8: 135-142. Fig.3, S.139. © 2003 Elsevier Science Ltd..

Abb.3.2, S.33: Gietl, C.(1992) Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. Biochim. Biophys. Acta 1100: 214-234. Fig.1, S.219. © 1992 Elsevier Science Ltd..

Abb.3.3, S.35: Gietl, C.(1992) Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. Biochim. Biophys. Acta 1100: 214-234. Fig.3, S.224. © 1992 Elsevier Science Ltd..

Abb.3.4, S.45: Botos, I., Melnikov, E. E. und Cherry, S. (2004) The catalytic domain of *Escherichia coli* Lon protease has a unique fold and a Ser-Lys dyad in the active site. J. Biol. Chem. 279: 8140-8148. Fig.2, S.8144. © 2004 American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

Abb.3.5A, S.48: Taylor, A. B., Smith, B. S., Kitada, S., Kojima, K., Miyaura, H., Otwinowski, Z., Ito, A. und Deisenhofer, J. (2001) Crystal structure of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences. Structure 9: 615-625. Fig.5b, S.620. © 2001 Elsevier Science Ltd..

Abb.3.6, S.50: Krojer, T., Garrido-Franco, M., Huber, R., Ehrmann, M. und Clausen, T. (2002) Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. Nature 416: 455-495. Fig.1, S.456. © 2002 Macmillan Publishers Ltd..

Abb.3.7, S.51: Kim, D. Y. und Kim, K. K. (2005) Structure and function of HtrA family proteins, the key players in proteins quality control. J. Biochem. Mol. Biol 38: 266-274. Fig.6, S.270. © 2005 Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology.

Abb.5.1, S.109: Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, A., Sandberg, G. und Bennett M. J. (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. Trends Plant Sci. 8: 165-171. Fig.1, S.166. © 2003 Elsevier Science Ltd..

Abb.5.5, S.112: Bowman, J. L. (1993) *Arabidopsis*: an atlas of morphology and development. New York, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag. Fig.3.13A, S.173. © 1994 Springer-Verlag.

Abb.5.19, S.131: Greenwood, J. S. und Bewley, J. D. (1982) Seed development in *Ricinus communis* (castor bean). I. Descriptive morphology. Can. J. Bot. 60: 1751-1760. Fig.3, S.1754. © 1982 National Research Council of Canada.

Abb.5.21, S.133: Greenwood, J. S., Helm, M. und Gietl, C. (2005) Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102: 2238-2243. Fig.4, S.2240. © 2005 The National Academy of Sciences of the U.S.A..

Abb.5.22, S.134: Greenwood, J. S., Helm, M. und Gietl, C. (2005) Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102: 2238-2243. Fig.2, S.2239. © 2005 The National Academy of Sciences of the U.S.A..

Abb.5.23, S.136: Greenwood, J. S., Helm, M. und Gietl, C. (2005) Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102: 2238-2243. Fig.5, S.2241. © 2005 The National Academy of Sciences of the U.S.A..

Abb.5.24, S.137: Greenwood, J. S., Helm, M. und Gietl, C. (2005) Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102: 2238-2243. Fig.6, S.2242. © 2005 The National Academy of Sciences of the U.S.A..

Abb.5.25, S.138: Greenwood, J. S., Helm, M. und Gietl, C. (2005) Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102: 2238-2243. Fig.7, S.2243. © 2005 The National Academy of Sciences of the U.S.A..

Abb.5.32, S.157: Than, M. E., Helm, M., Simpson, D. J., Lottspeich, F., Huber, R. und Gietl, C. (2004) The 2.0 Å crystal structure and substrate specificity of the KDEL-tailed cysteine endopeptidase functioning in programmed cell death of *Ricinus communis* endosperm. J. Mol. Biol. 336: 1103-1116. Fig.1, S.1109. © 2004 Elsevier Science Ltd..

Abb.5.33, S.158: Than, M. E., Helm, M., Simpson, D. J., Lottspeich, F., Huber, R. und Gietl, C. (2004) The 2.0 Å crystal structure and substrate specificity of the KDEL-tailed cysteine endopeptidase functioning in programmed cell death of *Ricinus communis* endosperm. J. Mol. Biol. 336: 1103-1116. Fig.2, S.1110. © 2004 Elsevier Science Ltd..

Abb.5.34, S.161: Than, M. E., Helm, M., Simpson, D. J., Lottspeich, F., Huber, R. und Gietl, C. (2004) The 2.0 Å crystal structure and substrate specificity of the KDEL-tailed cysteine endopeptidase functioning in programmed cell death of *Ricinus communis* endosperm. J. Mol. Biol. 336: 1103-1116. Fig.3, S.1111. © 2004 Elsevier Science Ltd..

Abb.6.1, S.211: Gietl, C. und Schmid, M. (2001) Ricinosomes: an organelle for developmentally regulated programmed cell death in senescing plant tissues. Naturwissenschaften 88: 49-58. Fig.7, S.55. © 2001 Springer-Verlag.

Abb.6.2, S.214: Greenwood, J. S., Helm, M. und Gietl, C. (2005) Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102: 2238-2243. Fig.1, S.2239. © 2005 The National Academy of Sciences of the U.S.A..

Abb.6.5, S.233: Krojer, T., Garrido-Franco, M., Huber, R., Ehrmann, M. und Clausen, T. (2002) Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. Nature 416: 455-459. Fig.1, S.456. © 2002 Macmillan Publishers Ltd..

Tab.5.4, S.143; Tab.5.5, S.144; Tab.5.6, S.147; Tab.5.7, S.148; Tab.5.8, S. 148; Tab.5.9, S.149; Tab.5.10; S.155: Than, M. E., Helm, M., Simpson, D. J., Lottspeich, F., Huber, R. und Gietl, C. (2004) The 2.0 Å crystal structure and substrate specificity of the KDEL-tailed cysteine endopeptidase functioning in programmed cell death of *Ricinus communis* endosperm. J. Mol. Biol. 336: 1103-1116. © 2004 Elsevier Science Ltd..