

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. A. Hasilik

**Auf der Suche nach der nierenspezifischen
Funktion der Aminoacylase I**

**Rekombinante Expression, subzelluläre Lokalisation, Substrat-
Analytik und Identifizierung konservierter Reste**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Holger Lindner

aus Marburg

Marburg 1999

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 23.12.1999

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereich

Dekan: Prof. Dr. H.F. Kern

Referent: Prof. Dr. K.-H. Röhm

Koreferent: HD Dr. E. Maser

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Acylasefamilie (Peptidase-Familie M20A /M20B)	1
1.1.1	Die Mitglieder der Acylasefamilie	4
1.1.1.1	Die Aminoacylase 1	4
1.1.1.2	Die vacuoläre Carboxypeptidase S	8
1.1.1.3	Die Peptidase V	8
1.1.1.4	Die Carboxypeptidase G2	9
1.1.1.5	Die Peptidase T	10
1.1.1.6	Die <i>N</i> -Acetylornithinase	11
1.1.1.7	Die Succinyl-Diaminopimelat-Desuccinylase	12
1.2	Struktur und enzymatische Aktivität der Acylasen	13
1.2.1	Metallbindung	13
1.2.2	Chemische Modifizierung reaktiver Reste	14
1.2.2.1	pkAcy1	15
1.2.2.2	<i>Pseudomonas</i> -CPG2	17
1.2.3	PWW-Motive und Domänenstruktur der Acylase 1	18
1.2.4	Die Katalyse	19
1.2.4.1	Nachweis von Acylase1-Aktivität	19
1.2.4.2	Hemmstoffe der pkAcy1	20
1.2.4.3	Der Katalysemechanismus	20
1.2.4.4	Das Reaktionsgleichgewicht	21
1.3	Spezies-, Gewebe- und Genlokalisierung der Acylase 1	22
1.3.1	Speziesunterschiede und Gewebeverteilung	22
1.3.2	Zelluläre Lokalisation	23
1.3.3	Genlokalisierung	24
1.4	Funktionen der Acylase 1	25
1.4.1	Die allgemeine Funktion	25
1.4.2	Die nierenspezifische Giftung von <i>S</i> -substituierten <i>N</i> -Acetyl-L-cysteinkonjugaten (Mercaptursäuren)	27
1.4.3	Auf der Suche nach der nierenspezifische Funktion der Acylase	28
1.4.3.1	Aminosäure-’Salvage’	29

1.4.3.2 Hippursäuresynthese	29
1.5 Zielsetzung	30
2 Material	31
2.1 Geräte und Software	31
2.2 Verbrauchsmaterialien	32
2.3 Chemikalien	32
2.4 Kits	34
2.5 Viren, Plasmide und Oligonukleotide	34
2.6 Zellen und Gewebe	35
2.7 Puffer	35
2.8 Nährmedien	36
3 Methoden	37
3.1 Enzymexpression der Acylase 1 mit dem Baculovirus-Expressions-Vektor-System (BEVS)	37
3.1.1 Das Baculovirus-Expressions-Vektor-System (BEVS) im Überblick	37
3.1.1.1 Der Lebenszyklus des Baculovirus	37
3.1.1.2 Das Expressions-System	38
3.1.2 Molekularbiologie	40
3.1.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	40
3.1.2.2 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen	40
3.1.2.3 Plasmid-DNA-Präparation und dsDNA-Bestimmung	41
3.1.2.4 Agarose-Horizontal-Gelelektrophorese	41
3.1.2.5 Aufbereitung von Oligonukleotiden	42
3.1.2.6 DNA-Fällung	42
3.1.2.7 Ortsspezifische Mutagenese	42
3.1.3 Insektenzellkultur	43
3.1.3.1 Kultivierung von SF21-Zellen	43
3.1.3.2 Co-Transfektion	44
3.1.3.3 Plaquetest	44
3.1.3.4 Virusvermehrung	46
3.1.3.5 Expressionskultur	46

3.1.4	Proteinchemie	47
3.1.4.1	Proteinbestimmung	47
3.1.4.2	Bestimmung der Acylase 1-Aktivität mit dem TNBS-Test	47
3.1.4.3	Enzymreinigung von hkAcy1 und pkAcy1 aus SF21-Zellen	48
3.1.4.4	SDS-PAGE-Vertikal-Gelelektrophorese	48
3.2	Zellfraktionierung	50
3.2.1	Mikrosomenpräparation aus Schweinenieren-Rinde	50
3.2.2	Enzymsolubilisierung	50
3.2.3	Dichtegradienten-Zentrifugation	51
3.2.4	Bestimmung von Markerenzymaktivitäten	51
3.2.4.1	Laktat-Dehydrogenase (LDH)	51
3.2.4.2	Alkalische Phosphatase	52
3.2.4.3	α -Galactosidase	52
3.2.4.4	Fumarase	52
3.3	Säugerzellkultur	52
3.3.1	Die allgemeinen Eigenschaften der LLC-PK ₁ -Zellen	52
3.3.2	Kulturbedingungen	53
3.3.2.1	Passagieren	53
3.3.2.2	Kryo-Konservierung	54
3.3.2.3	Auftauen von kryo-konservierten Zellen	54
3.3.3	Zell-Viabilität	54
3.3.3.1	MTT-Test, modifiziert nach Mertens <i>et al.</i> (1995)	54
3.3.3.2	Zelluläre Proteinmasse	55
3.3.4	Zytoplasma-Extrakte für die Enzymbestimmung	55
3.3.5	<i>N</i> -Acetylaminosäure-Transport-Studien	56
3.3.5.1	Inkubation mit dem Substrat	56
3.3.5.2	Extrakte für die PITC- und ADAM-HPLC-Analyse	56
3.3.5.3	Bestimmung des zellulären Gesamtproteins	56
3.3.5.4	Hemmung des Transports	57
3.4	HPLC-Analytik	57
3.4.1	Aminosäureanalyse mit der PITC-HPLC-Methode	58
3.4.2	<i>N</i> -Acetylaminosäureanalyse mit der 9-Anthryldiazomethan (ADAM)-HPLC-Methode	59

3.5 Multiple Sequenz-Alignments	62
4 Ergebnisse	63
4.1 Expression der Wildtyp-hkAcy1 und zweier Mutanten mit dem BEVS	63
4.1.1 Ortsspezifische Mutagenese der PWW-Motive	63
4.1.2 Enzymexpression	63
4.1.3 Enzymreinigung	64
4.2 Charakterisierung der rekombinanten Enzyme	65
4.2.1 Kinetische Eigenschaften	65
4.2.1.1 Kinetiken der hkAcy1 und pkAcy1 mit <i>N</i> -Formylmethionin (NFM) und <i>N</i> -Acetylmethionin (NAM)	66
4.2.1.2 Kinetik der PWW2-Mutante mit <i>N</i> -Acetylmethionin (NAM)	67
4.2.2 Acyl-Hydrolyse von NAM in Gegenwart von Dithiothreitol (DTT)	68
4.3 Subzelluläre Verteilung der Acy1 in der Schweinenierenrinde	69
4.3.1 Mikrosomenpräparation	69
4.3.2 Solubilisierung von Laktatdehydrogenase (LDH)- und Acy1-Aktivität aus der mikrosomalen Fraktion mit nichtionischen Detergenzien	70
4.3.3 Saccharose-Dichtgradienten-Zentrifugation I	71
4.4 Acylase 1-Aktivität in LLC-PK₁-Zellen	73
4.4.1 Enzymanreicherung aus Kulturzellen und Identität mit der pkAcy1	74
4.5 Viabilität von LLC-PK₁-Zellen in serumfreien, modifizierten Medien	75
4.5.1 Acylaseaktivität in fetalem Kälberserum (FCS)	76
4.5.2 Verwertung von <i>N</i> -Acetylmethionin (NAM) und <i>N</i> -Acetylleucin (NAL)	76
4.5.3 Verwertung von <i>N</i> -Acetylmethionin (NAM) in Gegenwart von Dithiothreitol (DTT)	78
4.6 Acylaseaktivität in Extrakten von LLC-PK₁-Zellen	80
4.6.1 Einfluss essenzieller Mediumkomponenten auf die spezifische Aktivität unter serumfreien Bedingungen	80
4.6.2 Einfluss von fetalem Kälberserum (FCS), Insulin und Albumin auf die spezifische Acy1-Aktivität	81

4.7 Analyse von <i>N</i>-Acetylaminosäuren mit der 9-Anthryldiazomethan-HPLC-Methode	83
4.7.1 <i>N</i> -Acetylaminosäuren im Blutplasma	83
4.7.2 <i>N</i> -Acetylaminosäure-Transport-Studien an LLC-PK ₁ -Zellen	85
4.7.2.1 Aminosäure-Analyse von Zellextrakten und Inkubationslösungen	85
4.7.2.2 Optimierung der Versuchsbedingungen für die ADAM-HPLC-Analytik	85
4.7.2.3 Transport-Kinetik	86
4.7.2.4 Hemmung des Transports	87
4.8 Multiple Sequenz-Alignments	88
5 Diskussion	94
5.1 Rekombinante Expression der Säugeracylasen mit dem BEVS	94
5.1.1 Enzymreinigung	94
5.1.2 Haben die PWW-Motive der Säugeracylasen strukturgebende Funktion?	94
5.1.3 Die PWW→PWR-Mutation im PWW1-Motiv der Acylase 1 in einer Tumorzelllinie	98
5.2 Bindet die Acy1 spezifisch an Membranen?	99
5.3 Sind <i>N</i>-Acetylaminosäuren aus dem intrazellulären Proteinabbau die bevorzugten Substrate der Nierenacylase?	101
5.4 <i>N</i>-Formylmethionin (NFM) als Acylasesubstrat	103
5.5 Spielt die Nierenacylase eine Rolle bei der Hippursäuresynthese?	106
5.6 Die Acylase 1 ist nicht die einzige Nierenacylase	109
5.7 LLC-PK₁-Zellen als Modell für das Nierentubulusepithel	111
5.7.1 Exprimieren LLC-PK ₁ -Zellen funktionelle Acylase 1?	111
5.7.2 Ist die pkAcy1-Aktivität in LLC-PK ₁ -Zellen reguliert?	115
5.8 Die 9-Anthryldiazomethan (ADAM)-HPLC-Methode zur Analyse von <i>N</i>-Acetylaminosäuren	119
5.8.1 Lassen sich mit der ADAM-HPLC-Methode <i>N</i> -Acetylaminosäuren in humanem Blutplasma nachweisen?	121
5.8.2 Eignet sich die ADAM-HPLC-Methode zur Analyse eines Transports von <i>N</i> -Acetylaminosäuren in LLC-PK ₁ -Zellen?	123

5.9	<i>N</i>-Acetylaminosäure-Transport in LLC-PK₁-Zellen	124
5.10	Multiple Alignments der Acylasefamilie	128
5.11	Perspektiven	130
6	Zusammenfassung	132
7	Literaturverzeichnis	134
8	Abkürzungen	163

1 Einleitung

Seit Otto Schmiedeberg 1881 die Aminoacylase I (Acylase 1) erstmals in wässrigen Extrakten der Schweineniere nachwies, blieb es immer ein Rätsel, warum gerade dieses Organ eine so reiche Quelle dieses Enzyms darstellt. Mengenmäßig gehört die Acylase 1 zu den weitaus prominentesten Enzymen in der Niere, ohne dass bis heute der Zweck dieser Gewebeverteilung bekannt ist.

Inzwischen ist klar, dass die Acylase 1 der Säuger neben einer Reihe von weiteren eu- und prokaryotischen Acylasen, aber auch Di- und Tripeptidasen, zu einer stetig wachsenden Enzymfamilie gehört. Da sie mit ihren Verwandten funktionelle und strukturelle Merkmale gemeinsam hat, wird zunächst eine Übersicht dieser Familie gegeben.

1.1 Die Acylasefamilie (Peptidase-Familie M20A /M20B)

Manchmal sind Zwischenprodukte des Intermediärstoffwechsels durch *N*-Acylierung stabilisiert, um unerwünschte Nebenreaktionen zu verhindern. Während der Arginin-Biosynthese einiger Bakterien zum Beispiel verhindert auf diese Weise die *N*-Acetylgruppe im Ornithin-Vorläufermolekül *N*-Acetylglutamatsemialdehyd eine Zyklisierung vor der Transaminierung der freien Aldehydgruppe (s. Abb. 1-1 a). Aus dem gleichen Grund wird bei der Diaminopimelat (DAP)-Synthese über den Succinylasepathway (s. 1.1.1.7) die α -Aminogruppe des azyklischen Tetrahydrodipicolinats succinyliert. Die freie Ketogruppe steht nun zur Transaminierung und damit Bildung von *N*-Succinyl-L,L-diaminopimelat (SDAP) zur Verfügung (Abb. 1-1 b, Kindler und Gilvarg, 1960; Scapin und Blanchard, 1998). DAP ist zudem ein Zwischenprodukt der bakteriellen Lysin-Biosynthese.

Weiterhin sind 50-80% aller zytosolischen und Kernproteine der eukaryotischen Zelle *N*-terminal acetyliert (Driessen *et al.*, 1985; Bradshaw *et al.*, 1998). Beim Abbau dieser Proteine werden die durch die Acetylgruppe *N*-terminal blockierten Aminosäuren frei (Kobayashi und Smith, 1987; Raphel *et al.*, 1993). Für den weiteren Metabolismus der acylierten Intermediate des bakteriellen Aminosäure-Anabolismus und des eukaryotischen Proteinabbaus müssen diese wieder deacetyliert werden. *N*-Acetylornithin wird durch die *N*-Acetylornithinase (NAO) und SDAP durch die SDAP-Desuccinylase

hydrolysiert (s. Abb. 1-1 a und b, Boyen *et al.*, 1992). In der Säugerzelle spaltet die Acylase 1 (Acy1) N^α -blockierte Aminosäuren in die freie Aminosäure und die Acetatgruppe (s. Abb. 1 c, Greenstein und Winitz, 1961; Bruns und Schulze, 1962; Löffler *et al.*, 1986; Gade und Brown, 1981; Pittelkow *et al.*, 1998; Giardina *et al.*, 1997).

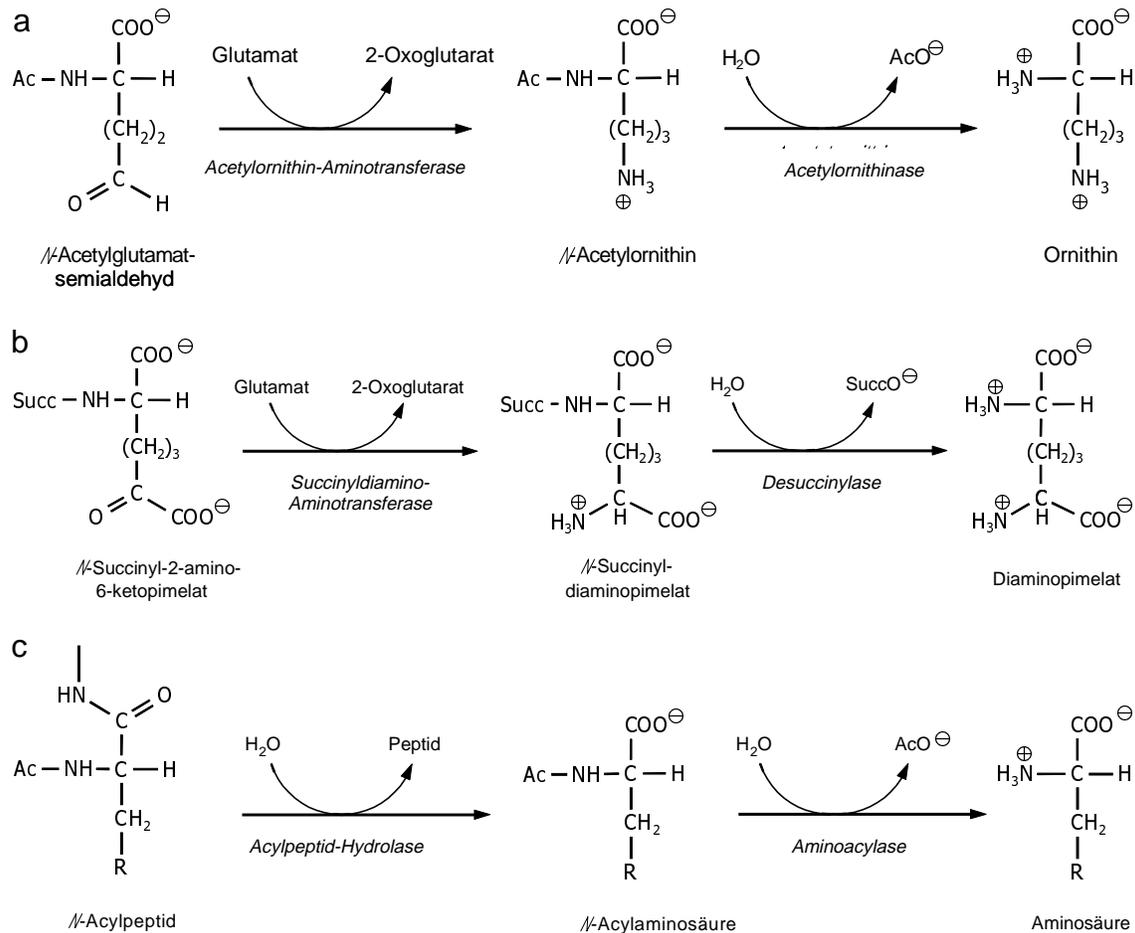


Abb. 1-1 Metabolische Rolle von Acylasesubstraten. a) Transaminierung und Deacetylierung der Ornithinvorläufer *N*-Acetylglutamatsemialdehyd und *N*-Acetylmithin. b) Transaminierung und Desuccinylierung der L,L-Diaminopimelatvorläufer *N*-Succinyl-L-2-amino-6-ketopimelat und *N*-Succinyl-L,L-diaminopimelat. c) Freisetzung der *N*-terminalen Aminosäure aus *N*-acetylierten Peptiden.

Über diese funktionelle Analogie hinaus ordneten Boyen *et al.* der NAO und Desuccinylase aus *E. coli* sowie der Carboxypeptidase G2 (CPG2) aus *Pseudomonas* nach einem Sequenzvergleich eine evolutionäre Verwandtschaft zu (Boyen *et al.*, 1992). Inzwischen werden insgesamt 36 Proteinsequenzen zur Acylasefamilie gezählt, die als Metallopeptidasefamilie M20 kategorisiert wurde (Rawlings und Barret, 1995). Neben den oben genannten Enzymen gehören dazu die Acy1 der Säugetiere, die

D. discoideum- und *A. fulgidue*-NAO sowie eine 'Putative NAO' aus *S. pombe*, eine Reihe von bakteriellen Desuccinylasen und Aminotripeptidasen, die *L. delbrueckii*-, *L. lactis*- und *L. helveticus*-Carnosinase (PepV), die *S. cerevisiae*-Carboxypeptidase S, eine 'Putative Deacetylase' aus *E. coli*, ein 'Dipeptidase Homolog' aus *M. hominis*, das U1756G-Protein aus *M. leprae*, das 'Hypothetical Protein MJ0457' aus *M. Janaschii*, das '455 AA long Hypothetical Protein' und das '354 AA long Hypothetical Protein' aus *P. horikoshi*.

Die strukturellen und funktionellen Eigenschaften dieser Enzyme sind bisher kaum verstanden. Lediglich die Acyl1 und die CPG2 sind im Detail untersucht worden. Die Säugerniere ist, wie erwähnt, eine besonders reiche Quelle für die Acyl1 (s.1.2.2.3). Es verwundert also nicht, dass die Nierenacylase 1 des Schweins das erste „Ferment“ war, welchem eindeutig eine zytosolische Lokalisation zugeschrieben wurde (Schmiedeberg, 1881)¹. Seither ist das Enzym aus der Schweineniere intensiv charakterisiert worden (s. 1.1.1.1). Die CPG2 bietet eine Reihe von Anwendungsmöglichkeiten in der Tumorthherapie (s. 1.2.1). Daher besteht ein besonders anwendungsbezogenes Interesse an der Untersuchung dieses Enzyms. Erst kürzlich bestimmten Rowsell *et al.* die atomare Struktur der *Pseudomonas*-CPG2 (s. Abb. 1-2, Rowsell *et al.*, 1997).

Abb. 1-2 Kristallstruktur der dimeren Carboxypeptidase G2 aus *Pseudomonas*. α -Helices sind rot und β -Faltblätter grün gezeichnet. Die Metallionen im dinukleären Zinkzentrum sind blau dargestellt und aus dieser Perspektive nur in der rechten katalytischen Domänen zu erkennen. Die Dimerisierung wird durch β -Faltblatt-Wechselwirkungen und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen α -Helices der Zwischendomänen vermittelt.

¹ Zwar zeigte L. Pasteur (1864), dass Fermentationsvorgänge ursächlich mit der lebenden Zelle verknüpft sind, jedoch war nicht klar, wo an oder in der Zelle die Fermente zu suchen seien.

Die Enzyme der Acylase-Familie bilden generell Homodimere. Das Monomer enthält ein mono- oder dinukleäres Zinkzentrum. Die zinkbindende, katalytische Domäne wird von je einem Teil der *N*- und der *C*-terminalen Region aufgebaut, während eine Zwischendomäne die Dimerisierung vermittelt (Palm und Röhm, 1995; Rowsell *et al.*, 1997). Doch obwohl die CPG2-Struktur verfügbar ist, konnten die für die Substratbindung und Katalyse verantwortlichen Reste noch nicht identifiziert werden. Selbst die Rolle des Metallions ist immer noch strittig. Hierzu existieren zwei grundlegend unterschiedliche Auffassungen: Nach Heese *et al.* ist die Funktion des Zinkions bei der Schweineacylase eine rein strukturelle (s. 1.2.1, Heese *et al.*, 1990). Dementgegen nahmen Rowsell *et al.* sowie Blanchard und Mitarbeiter eine direkte Beteiligung des Metallzentrums der CPG2 (Rowsell *et al.*, 1997), der Desuccinylase (Born *et al.*, 1998) aber auch der Acylasen allgemein (Scapin und Blanchard, 1998) an der Katalyse an (s. 1.2.4).

1.1.1 Die Mitglieder der Acylasefamilie

Informationen über proteinchemische Eigenschaften sowie Aktivatoren und Inhibitoren der Enzyme sind in Tabelle 1-1 zusammengefasst.

1.1.1.1 Die Aminoacylase 1 (Acylase 1, Histozyim, Hippurikase, *N*-Acylaminosäure Amidohydrolase, *Acy1*, EC 3.5.1.14)

Enzyme aus *Sus scrofa* und *Homo sapiens*

Nach der Erstbeschreibung der Acylase 1 der Schweineiniere (pkAcy1) als Hippurikase oder Gewebsferment (Histozyim) durch Schmiedeberg (Schmiedeberg, 1881) prägte Smorodinzew den Begriff der Acylase. Er zeigte, dass das Histozyim neben Hippursäure auch Benzoylleucin und Benzoylalanin hydrolysiert. Auch wies er das Vorkommen des „Ferments“ in den Nieren von Hund, Kalb, Ochse und Pferd sowie der Milz, den Lungen, dem Herz und der Skelettmuskulatur des Hundes nach, fand in der Hundeleber aber kaum Aktivität (Smorodinzew, 1922).

Bis vor ca. 50 Jahren bestand in der chemischen Physiologie die Vorstellung, das Vorkommen von Histozyim in einem Gewebe würde die proteinanabole Aktivität in diesem Gewebe widerspiegeln. Seine Aufgabe wurde weniger in der Hydrolyse von Hippursäure als in ihrer Synthese gesehen:

Enzym	EC	Mr [kDa] ^f	Quartärstruktur, Zn ²⁺ / α	Aktivatoren ^b	Inhibitoren ^b	Referenzen
Aminocyclase I, <i>sus sero</i> ^g	3.5.1.14	45	α2 1 Zn ²⁺ /α	Co ²⁺	N-Hydroxy-α-amino-säuren, Butylmagnat, DTT, 1,10-Phenanthrolin, s. 1.2.4.2 und 1.2.2.1	Löffler <i>et al.</i> , 1986; Löffler und Schneider, 1987; Heese <i>et al.</i> , 1990; Jakob <i>et al.</i> , 1992; Anders und Dekant, 1994; Pittelkow <i>et al.</i> , 1998
<i>homo sapiens</i>		46	α2 1 Zn ²⁺ /α	n.d.	n.d.	Kroll, 1986; Cook <i>et al.</i> , 1993; Lindner, 1996; Pittelkow <i>et al.</i> , 1998; Berens, 1999
Carboxypeptidase S1, <i>S. cerevisiae</i>	3.4.17.9	77 / 74	n.d.	n.d.	n.d.	Wolf und Ehmam, 1978; Bordallo <i>et al.</i> , 1991; Spormann <i>et al.</i> , 1991/92;
Peptidase V, <i>L. delbrueckii</i>	3.4.13.3	52	n.d.	n.d.	1,10-Phenanthrolin, EDTA	Vongerichten <i>et al.</i> , 1994
<i>L. Lactis</i>		52	n.d.	n.d.	EDTA	Hellendoorn <i>et al.</i> , 1997
Carboxypeptidase G2, <i>Pseudomonas</i>	3.4.22.12	41	α2, 2 Zn ²⁺ /α	Zn ²⁺	1,10-Phenanthrolin	Minton <i>et al.</i> , 1983/84; Sherwood <i>et al.</i> , 1985; Rowsell <i>et al.</i> , 1997
Peptidase T, <i>B. subtilis</i>	3.4.11.-	46	n.d.	n.d.	n.d.	Schrögel <i>et al.</i> , 1996
<i>E. coli</i> ^c		45	n.d.	n.d.	divalent Kationen, 1,10-Phenanthrolin, EDTA	Sussman und Gilvarg, 1970; Simmonds <i>et al.</i> , 1976; Hermsdorf, 1978
<i>H. influenzae</i>		46	n.d.	n.d.	n.d.	Bosman <i>et al.</i> , 1990; Bacon <i>et al.</i> , 1993; Mierau <i>et al.</i> , 1994
<i>L. lactis</i>		46	α2	Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ , p-Chloromercuribenzoat, p-Chloromercuribenzolsulfonat, Mersalyl	EDTA, DTT, β-Mercaptoethanol	
<i>S. typhimurium</i>		45	n.d.	Zn ²⁺	EDTA	Müller und Mackinnon, 1974; Strauch und Miller, 1983; Strauch <i>et al.</i> , 1985; Miller <i>et al.</i> , 1991
Acetylmorphinase, <i>E. coli</i>	3.5.1.16	42	α2 1 Zn ²⁺ /α	Glutathion, DTT, Co ²⁺	Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺ , 1,10-Phenanthrolin, 8-Hydroxychinolin, EDTA	Vogel und Bonner, 1956; Vogel und McLellan, 1971; Charlier, 1985; Meimel <i>et al.</i> , 1992; Boyen <i>et al.</i> , 1992; Pittelkow, 1996
<i>D. discoideum</i>		49	n.d.	n.d.	n.d.	
SDAP-Desuccinylase, <i>E. coli</i>	3.5.1.18	41	α2	Co ²⁺ >> Mn ²⁺ >> Zn ²⁺ > Fe ³⁺ > Ni ²⁺ > Mg ²⁺ > Al ³⁺	1,10-Phenanthrolin	Kindler und Gilvarg, 1960; Scapin und Blanchard, 1998; Lin <i>et al.</i> , 1988; Bouvier <i>et al.</i> , 1992
<i>C. glutamicum</i>		40	n.d.	n.d.	n.d.	Wehrmann <i>et al.</i> , 1994
<i>H. influenzae</i>		41	n.d.	Co ²⁺ , Zn ²⁺	L,L-DAP, D,L-DAP	Born <i>et al.</i> , 1998; Scapin und Blanchard, 1998

Tab. 1-1 Proteinchemische Daten von Mitgliedern der Acylasefamilie.

- a*: aus der Primärsequenz berechnet
- b*: Der Einfluss wurde mit angereicherten oder homogenen Enzympreparationen bestimmt.
- c*: Es ist nicht sicher, ob die von Sussman und Gilvarg (1970) beschriebene Homolysin-Tripeptidase und die von Simmonds *et al.* (1976) und Hermsdorf (1978) beschriebene Tripeptidase TP mit der Peptidase T identisch sind. Funktionelle Analogien legen diesen Schluss nahe.

„*Es* (das Histozytm) *katalysiert die Bildung von Hippursäure aus Benzoesäure und Glykokoll (Glycin) und einige weitere Reaktionen ähnlicher Art.*“ (Lehnartz, 1943)

Schachter und Taggart wiesen jedoch bald darauf das ATP-abhängige Benzoyl-CoA-Synthetase / Benzoyl-CoA : Glycin *N*-Acyltransferase-System zur Hippursäurebildung in der Leber nach (Schachter und Taggart, 1953; Schachter und Taggart, 1954). Mit den Untersuchungen von Greenstein und Mitarbeitern zur Stereoselektivität und Substratspezifität der *pkAcy1* seit 1949 verlagerte sich das Interesse an der Aktivität des Enzyms von der Synthese (s. 1.3) auf die Hydrolyse (Greenstein und Winitz, 1961).

Die Substratspezifität der *Acy1* ist, sowohl was den Aminosäure- als auch den Acylrest angeht, gering (Chenault *et al.*, 1989). Das Enzym bevorzugt als Substratkomponenten unverzweigte aliphatische Aminosäuren, vor allen Methionin, und kurze Acylreste wie die von Propionat, Acetat oder Formiat (Birnbaum *et al.*, 1952; Fu und Birnbaum, 1953). Durch die Charakterisierung von diastereomeren *N*-Acylaminosäuren mit einem chiralen Zentrum im Acylrest wiesen Telegdi *et al.* auch eine Stereoselektivität für diese Substratkomponente nach (Telegdi *et al.*, 1990).

1962 reinigten Bruns und Schulze die *pkAcy1* erstmals zur Homogenität und wiesen ihre Identität mit dem Histozytm nach (Bruns und Schulze, 1962). Die Autoren bestimmten für die Hydrolyse von *N*-Acetylmethionin (NAM) und Hippurat Michaeliskonstanten von 2 mM und 2.4 mM.

Seit 1975 wurden von Schneider und Mitarbeitern umfangreiche Arbeiten zur Aufklärung des Katalysemechanismus und der physiologischen Funktion der *pkAcy1* durchgeführt (Löffler *et al.*, 1986). Es wurde gezeigt, dass das Enzym als Dimer vorliegt und ein Zinkion pro Untereinheit bindet (Kördel, 1977a). Weitere Erkenntnisse aus diesen Arbeiten werden in den Abschnitten 1.2.2 und 1.2.4 vorgestellt. Kroll reinigte erstmals humane Nierenacylase (*hkAcy1*), deren proteinchemische Eigenschaften im Wesentlichen mit denen der *pkAcy1* übereinstimmen (Kroll, 1986; Lindner, 1996). 1992 und 1993 wurden die Sequenzen der *pkAcy1* (Mitta *et al.*, 1992; Jakob *et al.*, 1992) und

der hkAcy1 (Mitta *et al.*, 1993; Cook *et al.*, 1993) veröffentlicht (s. Abb. 4-25). Beide sind zu 88% identisch und ihre Ähnlichkeit beträgt 93% (Palm, 1994).

Die von Puigserver und Mitarbeitern aus der Darmmukosa des Schweins isolierte und charakterisierte Acylase ist wahrscheinlich mit der pkAcy1 identisch (Giardina *et al.*, 1997).

Als weiteres Säugerenzym wurde die Acy1 aus der Rinderleber gereinigt und charakterisiert (Gade und Brown, 1981). Das Enzym ist ein Dimer mit einer molaren Masse von 80 kDa. Es erwies sich, wie erwartet, als zinkabhängig, denn nach einer Inaktivierung mit *o*-Phenanthrolin war Zn^{2+} das einzige zweiwertige Kation, welches das Enzym reaktivieren konnte. Auch die allgemeine Substratspezifität des Enzyms aus der Rinderleber stimmte mit der der Schweineacylase aus Niere (Greenstein und Winitz, 1961) und Darmmukosa (Giardina *et al.*, 1997) sowie der der hkAcy1 (Lindner, 1996) überein: NAM war das beste Substrat. Lediglich mit den *N*-Acetylderivaten von Aspartat, den basischen sowie aromatischen Aminosäuren waren keine oder nur geringe Restaktivitäten nachweisbar.

Nach einer elektrophoretischen Auftrennung von Gewebextrakten auf Celluloseacetat-Membranen wiesen Csaikl *et al.* die Hydrolyse von NAM in folgenden Organen sowohl der Ratte als auch des Meerschweinchens nach: Leber, Niere, Nebenniere, Lunge, Gehirn, Herz, Skelettmuskulatur, Hoden, Pankreas und Milz. Aufgrund der Substratspezifität und der ähnlichen elektrophoretischen Mobilität der gefundenen Banden schlossen die Autoren auf eine Identität mit der Acy1. Auf die gleiche Weise ließ sich eine Acylaseaktivität in einer Reihe von weiteren Vertebraten- aber auch Evertrebraten-Zelllinien nachweisen (Csaikl *et al.*, 1986).

Uttamsinh *et al.* reinigten die Acy1 aus der Rattenniere und untersuchten ihre Spezifität gegenüber verschiedenen *S*-substituierten *N*-Acetyl-L-Cysteinkonjugaten (s. 1.4.2; Uttamsingh *et al.*, 1998).

Miko bestimmte und reinigte die Acy1 aus den Nieren und Lebern elf verschiedener Säugerspezies (1.3.1). Alle Enzyme wiesen das gleich Reinigungsverhalten auf, zeigten nach SDS-PAGE molare Massen um 45 kDa und waren zinkabhängig (Miko, 1993).

1.1.1.2 Die vacuoläre Carboxypeptidase S (Carboxypeptidase yscS, CPS1 EC 3.4.17.4)

Enzyme aus *Saccharomyces cerevisiae*

Über die frühen Stadien des sekretorischen Weges erreicht die CPS1 der Hefe als glykosyliertes, über eine N-terminale hydrophobe Domäne membranverankertes Proenzym die Vakuole. Die reife, durch die Endoproteinase yscB solubilisierete CPS1 ist hier am Proteinabbau beteiligt (Spormann *et al.*, 1992).

1.1.1.3 Die Peptidase V (Xaa-His Dipeptidase, Carnosinase, PepV, EC 3.4.13.3)

Enzyme aus *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *lactis* DSM 7290

L. delbrueckii dient als Starterbakterium bei der Käseherstellung. Da die Konzentrationen der freien Aminosäuren in der Milch gering sind, hängt das Bakterienwachstum von ihrer Freisetzung aus dem Milchprotein Casein oder ihrem exogenen Zusatz ab. Die zytosolische Dipeptidase PepV bevorzugt Derivate der Aminosäuren Alanin, Leucin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin und Valin in unterschiedlicher Folge. β -Alanyl-Peptide wie Carnosin (β -Ala-His) und einige Tripeptide werden ebenfalls gespalten (Vongerichten *et al.*, 1994).

Enzyme aus *Lactococcus lactis* Subsp. *cremoris* MG1363

Wie *L. delbrueckii*, dient *L. lactis* als Starterbakterium bei der Käseherstellung und verfügt über ein komplexes, proteolytisches System zur Freisetzung von Aminosäuren aus Casein. Nach Klonierung und rekombinanter Expression in *E. coli* durch Hellendoorn *et al.*, zeigte die *L. lactis*-Pep V eine ähnlich Substratspezifität wie das Enzym aus *L. delbrueckii*. Eine Behandlung des Zellextrakts mit EDTA (0.25 mM) inhibierte die enzymatische Aktivität komplett. Das Wachstum einer Pep V-negativen *L. lactis* Mutante in Milch war im Vergleich zum Wildtyp deutlich verlangsamt. Es wurde aber die gleiche Zelldichte erreicht. Offenbar übernahmen andere Enzyme den Abbau der Dipeptidasesubstrate, allerdings weniger effizient als das fehlende Enzym selbst (Hellendoorn *et al.*, 1997).

1.1.1.4 Die Carboxypeptidase G2 (Folathydrolase G2, CPG2, EC 3.4.17.11)

Enzym aus *Pseudomonas* Sp. Stamm RS-16U

Die periplasmatische CPG2 (Minton *et al.*, 1983) ist in der Lage, den C-terminalen Glutamatrest von reduzierten und nicht reduzierten Folaten abzuspalten (s. Abb. 1-3, Sherwood *et al.*, 1985).

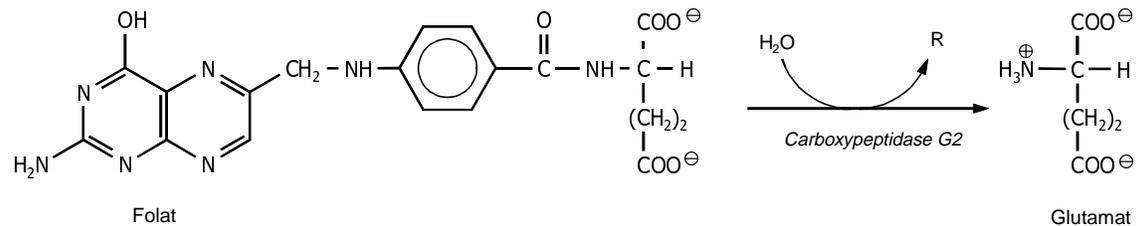


Abb. 1-3 Abspaltung des C-terminalen Glutamats von Folat durch die *Pseudomonas*-Carboxypeptidase G2.

Die Kristallstruktur der CPG2 (Rowell *et al.*, 1997) ist in Abbildung 1-2 dargestellt.

Die CPG2 in der Tumorthherapie

Die CPG2 wird seit Langem in der Tumorthherapie eingesetzt (Kalghatgi und Bertino, 1981). Sich rasch teilende Tumorzellen weisen eine hohe Nukleinsäure-Syntheserate auf, die von reduziertem Folat als Coenzym abhängt. Mit der CPG2 kann der Folat-Spiegel im Blutplasma direkt gesenkt werden. Auch das klinisch bedeutsame Chemotherapeutikum Methotrexat (MTX, ein Dihydrofolat-Reduktase-Hemmer) kann bei toxischer Überdosierung auf diese Weise durch Spaltung inaktiviert werden (Kalghatgi und Bertino, 1981; Adamson *et al.*, 1991; Adamson *et al.*, 1992; Widemann *et al.*, 1995; Widemann *et al.*, 1997).

Die CPG2-Hydrolyse folgt einer Michaelis-Menten-Kinetik mit K_m -Werten von 4 μM für Folat, 8 μM für Methotrexat und 34 μM für 5-Methyltetrahydrofolat, der im Blutplasma vorherrschenden Form des reduzierten Folats (Sherwood *et al.*, 1985).

Melton und Sherwood beschrieben den Einsatz der CPG2 in der 'Antibody-directed enzyme prodrug therapy' (ADEPT, Melton und Sherwood, 1996). Im Xenotransplantat-Nacktmausmodell wurde gezeigt, dass ein tumorspezifischer Antikörper die an ihn gekoppelte CPG2 im Tumorgewebe anreichert (Melton und Sherwood, 1996; Stribbling *et al.*, 1997). Hier konnte das Enzym nun durch Abspalten eines Glutamatrestes hochtoxische Alkylantien aus Benzoesäure-, Phenol- oder Anilin-Senfgas-Prodrugs

freisetzen (Melton und Sherwood, 1996; Niculescu *et al.*, 1998). Eine Weiterentwicklung in der tumorgewebsspezifischen Aktivierung von Prodrugs stellt die ‘Gene-directed enzyme prodrug therapy’ (GDEPT) dar. CPG2 wurde als funktionelles Ektoenzym in verschiedenen Tumor-Zelllinien exprimiert und war in der Lage, eine Reihe von Prodrugs dort zu aktivieren (Marais *et al.*, 1997; Niculescu *et al.*, 1998; Niculescu *et al.*, 1999). Durch Xenotransplantate transfizierter Mammakarzinom-Zellen, die membranständige CPG2 exprimierten, wurden in Mäusen Tumore erzeugt. Nach systemischer Gabe von 4-[2-Chloroethyl)(2-mesyloxyethyl)amino]benzoyl-L-glutamat (CMDA) zeigten diese Tumore Regression oder Heilung (Marais *et al.*, 1997). Martin *et al.* beschrieben die Freisetzung von CMDA durch die antikörpergekoppelte CPG2 im Tumorgewebe in einer klinischen Studie der Phase 1 (Martin *et al.*, 1997). Inzwischen wurden durch das ‘Centre for Applied Microbiology & Research’ (Porton Down, Salisbury, UK) Lizenzen für die Anwendung der CPG2 in klinischen Studien mit der ‘Direct enzyme prodrug therapy’ (DEPT) zur Tumorthherapie vergeben.

1.1.1.5 Die Peptidase T (Aminotripetidase, EC 3.4.11.-)

Die bakterielle Peptidase T spaltet bevorzugt aminoternale Aminosäuren aus Tripeptiden ab. Die zytoplasmatischen Enzyme verschiedener Bakterienspezies werden von den meisten Autoren als Teil des proteolytischen Systems des jeweiligen Organismus betrachtet (mit der *S. typhimurium*-Peptidase T als möglicher Ausnahme).

Enzym aus *Bacillus subtilis*

In *B. subtilis* wurde die Peptidase T-Expression hauptsächlich zu Beginn der stationären Wachstumsphase aktiviert. Eine Inaktivierung erzeugte keinen offensichtlichen Phänotyp (Schrögel *et al.*, 1996).

Enzym aus *Escherichia coli*

Es ist nicht sicher nachgewiesen, ob die durch mehrere Autoren beschriebene Tripeptidase TP aus *E. coli* mit der klonierten 45 kDa Tripeptidase T identisch ist (s. Tab. 1-1). Sussman und Gilvarg beschrieben erstmals distinkte Homolysinpeptidasen aus *E. coli* K-12, darunter eine EDTA-sensitive Peptidase, die für Trilysin spezifisch war (Sussman und Gilvarg, 1970). Simmonds *et al.* schrieben diese Aktivität der Tripeptidase (TP) zu (Simmonds *et al.*, 1976). Das Enzym spaltete bevorzugt *N*-

terminales Leucin, Lysin, Methionin und Phenylalanin aus Tripeptiden ab (Hermsdorf, 1978).

Enzym aus *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

Wie *L. delbrueckii* dient *L. lactis* als Starterbakterium bei der Käseherstellung und verfügt über ein komplexes proteolytisches System zur Freisetzung von Aminosäuren aus Casein. Die Peptidase T wurde aus Subsp. *cremoris* Wg2 (Bosman *et al.*, 1990) und *cremoris* AM2 (Bacon *et al.*, 1993) gereinigt. Eine pepT-negative *L. lactis*-Mutante zeigte keinen Phänotyp (Mierau *et al.*, 1994).

Enzym aus *Salmonella typhimurium*

Peptidaseaktivitäten in *S. typhimurium* zeigten stark überlappende Spezifitäten (Miller und Mackinnon, 1974). Die Peptidase T wurde bei der Untersuchung von mehrfach Peptidase-defizienten Stämmen identifiziert (Strauch und Miller, 1983). Tripeptide mit N-terminalem Methionin, Leucin oder Phenylalanin waren gute Substrate (Strauch und Miller, 1983). Die Enzymexpression wird unter anaeroben Bedingungen induziert (Strauch *et al.*, 1985). Die Peptidase T aus *Salmonella typhimurium* wurde 1991 von Miller *et al.* kloniert (Miller *et al.*, 1991).

1.1.1.6 Die N-Acetylornithinase (NAO, EC 3.5.1.16)

NAO-Aktivität wurde in einer Reihe von *Enterobacteriaceae* (*Aerobacter*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Serratia*, *Proteus*, *Salmonella* und *Shigella*) nachgewiesen (Vogel und Bonner, 1956). Das Enzym katalysiert in diesen Organismen den fünften Schritt der Argininosynthese (Abb. 1-1 a) aus Glutamat.

Enzym aus *Escherichia coli*

Das NAO-Gen *argE* ist durch Arginin reprimiert (Urm *et al.*, 1973; Cunin *et al.*, 1986). Das Enzym wurde aus verschiedenen *E. coli*-Stämmen gereinigt und charakterisiert, sowohl einem normalen als auch einem ornithinabhängigen (Vogel und Bonner, 1956), einem genetisch dereprimierten (Vogel und McLellan, 1971) und einem überproduzierendem *E. coli*-Stamm (Charlier, 1985). Die Charakterisierungen lieferten übereinstimmende Ergebnisse (s. Tab. 1-1). Neben N-Acetylornithin (Abb. 1-1 a) wurden die

N-Acetylderivate von L-Arginin, Glutamat- γ -semialdehyd und Methionin aber auch *N*-Formylmethionin durch die NAO deacyliert (Vogel und McLellan, 1971). Meinel *et al.* beschrieben die Klonierung, rekombinante Expression und Reinigung des Enzyms in *E. coli*. (Meinel *et al.*, 1992). Pittelkow zeigte, dass das Enzym ein mononukleäres Zinkzentrum enthält (Pittelkow, 1996). Ferner konnte die Autorin zinkbindende Reste durch ortsspezifische Mutagenese und Vergleich mit der kristallisierten CPG2 identifizieren (s. 1.2.1).

1.1.1.7 Die Succinyl-Diaminopimelat-Desuccinylase (Desuccinylase, EC 3.5.1.18)

In Bakterien, den meisten Algen und höheren Pflanzen existieren drei Varianten des Diaminopimelat (DAP)-Pathways zur Lysinbiosynthese (s. Formelschema Abb. 1-1 b), die in verschiedenen Organismen unterschiedlich aktiv sind: der Succinylase-, der Dehydrogenase und der Acetylase-Pathway. Die Desuccinylase ist Teil des Succinylase-Pathways (Scapin und Blanchard, 1998). Das Enzym katalysiert stereospezifisch die Hydrolyse von L,L-*N*-Succinyl-2,6-diaminopimelat (SDAP) in Succinat und DAP (Abb. 1-1 b), welches für manche Bakterien ein essenzieller Bestandteil der Zellwand ist. Das Enzym ist daher ein potentiell Ziel für antibakterielle Agentien, wenn zur DAP-Synthese der Succinylase-Pathway gegenüber dem Acetylase- und Dehydrogenase-Pathway vorherrscht, wie zum Beispiel in *H. pylori* (Karita *et al.*, 1997). Unter Kulturbedingungen konnte das Wachstum Desuccinylase-defizienter *H. pylori*- und *E. coli*-Stämmen durch Zugabe von exogenem DAP aufrechterhalten werden (Wehrmann *et al.*, 1994; Bouvier *et al.*, 1992; Karita *et al.*, 1997).

Enzym aus *Escherichia coli*

Kindler und Gilvarg beschrieben zuerst das Vorkommen einer bakteriellen Desuccinylase-Aktivität in *E. coli* (Kindler und Gilvarg, 1960). Lin *et al.* präparierten erstmals homogenes Enzym (Lin *et al.*, 1988), und Bouvier *et al.* beschrieben nach Klonierung und Sequenzierung die Reinigung rekombinanter *E. coli*-Desuccinylase (Bouvier *et al.*, 1992).

Enzym aus *Haemophilus influenzae*

Born *et al.* berichteten erst kürzlich von der Überexpression und Reinigung der *H. influenzae*-Desuccinylase. Zur Untersuchung des Katalysemechanismus führten die Autoren kinetische Untersuchungen zu pH-Abhängigkeit, Metallaktivierung und Lösungsmittel-Isotopeneffekten durch (s. 1.2.4.3, Born *et al.*, 1998).

Von allen übrigen bekannten Mitgliedern der Acylasefamilie sind lediglich die Primärsequenzen veröffentlicht.

1.2 Struktur und enzymatische Aktivität der Acylasen

1.2.1 Metallbindung

Die vorliegenden Hinweise auf eine Metallabhängigkeit der Acylasen sind in den meisten Fällen nur indirekter Natur (s. Tab. 1-1). Direkte Metallbestimmungen wurden bisher lediglich bei der pkAcy1 (Kördel, 1977; Heese, 1990), der *E. coli*-NAO (Pittelkow, 1996), der *Pseudomonas*-CPG2 (Rowell *et al.*, 1997), der *H. influenzae*-Desuccinylase (Born *et al.*, 1998) und der hkAcy1 (Berens, 1999) durchgeführt. Mit Ausnahme der CPG2 fand man immer ein Zinkion pro Monomer. Die Kristallstruktur der CPG2 hingegen zeigt ein dinukleäres Zinkzentrum (s. Abb. 1-2) mit einem verbrückenden Aspartatrest und einem verbrückenden Wassermolekül. Im Alignment in Abbildung 4-25 sind für die CPG2 die Liganden der Zinkionen 1 und 2 angegeben (Rowell *et al.*, 1997). Pittelkow identifizierte durch Mutagenesen und anschließende kinetische und Zinkbindungsanalysen Reste, die an der Bildung des mononukleären Zinkzentrums der *E. coli*-NAO beteiligt sind. Dabei erwies sich das in der CPG2 entsprechend verbrückende Asp112² als funktionslos, während His80 und Glu145 essenziell waren. Pittelkow vermutete, dass neben His80 und Glu145 auch der Rest H355 an der Zinkbindung beteiligt ist. Eine Funktion von E169 bei der Zinkbindung anstelle von H355 konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden (Pittelkow, 1996). Für die pkAcy1 wurde durch kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) nachgewiesen, dass die vierte Koordinationsstelle des mononukleären Metallzentrums durch ein Wassermolekül besetzt ist (Heese, 1990).

² NAO-Zählung

Das Metallzentrum der pkAcy1 ist in der Lage, statt Zink- auch Cobalt-, Nickel-, Mangan- oder Cadmiumionen zu binden. Alle metallsubstituierten Enzyme waren aktiv und hydrolysierten von allen getesteten Substraten NAM am effektivsten. Das Cobalt-enzym spaltete *N*-Acetylleucin, -valin,- und -phenylalanin sogar noch effektiver als das Zinkenzym (Gilles *et al.*, 1984; Löffler *et al.*, 1986).

Heese nutzte die paramagnetischen Eigenschaften des Mangans, um im Manganenzym der pkAcy1 mittels $^1\text{H-NMR}$ die Spinrelaxationszeiten von Ligandenprotonen in langlebigen Komplexen des Enzyms mit kompetitiven Inhibitoren zu bestimmen. Aus den Daten ließen sich die Metall-Protonen-Abstände berechnen. In allen Fällen lag der Abstand über 1 nm. Da sich das Manganenzym kinetisch und in seiner pH-Abhängigkeit genauso wie das Zinkenzym verhielt, lassen sich die Ergebnisse der NMR-Messungen wahrscheinlich auf das Zinkenzym übertragen. Demnach scheidet aufgrund seines großen Abstandes zur Substratbindungsstelle eine katalytische Funktion des Metallzentrums aus (Heese, 1989; Heese *et al.*, 1990). CD-spektroskopisch wurde eine deutliche Abnahme des Anteils an definierten Sekundärstrukturen im Apoenzym nachgewiesen (Ou *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1994).

Zink im Überschuss inaktiviert die pkAcy1, vermutlich durch Blockierung von SH-Gruppen (s. 1.2.2.1, Kördel und Schneider, 1977a) oder durch die Besetzung multipler, unspezifischer Zinkbindungsstellen (Wu und Tsou, 1993).

Palm fand im trypsinresistenten Fragment der pkAcy1 (s. 1.2.3) bis zu 2.3 Zinkionen. Während sich das spezifisch gebundene Zink nur im Säuren aus dem intakten Enzym lösen lässt, zum Beispiel durch Dialyse gegen 1 mM EDTA bei pH 5.8, ließ sich ein Zinkion aus dem trypsinresistenten Fragment durch Dialyse gegen 30 μM EDTA bei pH 8.0 entfernen (Palm, 1994).

1.2.2 Chemische Modifizierung reaktiver Reste

Im Arbeitskreis von F. Schneider wurden umfangreiche Untersuchungen zur Identifizierung reaktiver Aminosäurereste der pkAcy1 durchgeführt. Sie hatten das Verständnis vom Aufbau des katalytischen Zentrums zum Ziel. Im Folgenden sind die wichtigsten Ergebnisse und Folgerungen dieser Untersuchungen zusammengestellt. Dabei beziehen sich alle Angaben auf das Monomer.

1.2.2.1 pkAcy1

Lysin

Zur Bindung des Substrates durch die pkAcy1 ist eine freie Substratcarboxylatgruppe essenziell. Schneider und Mitarbeiter schlossen nach Modifizierungsexperimenten mit substratanalogen Halomethylketonen auf die Existenz eines Lysinrestes, dessen ϵ -Aminogruppe an einer ionischen Wechselwirkung mit der Carboxylatgruppe beteiligt ist (Frey *et al.*, 1977). Pittelkow tauschte in der *E. coli*-N-Acetylornithinase den Lysinrest an Position 114 durch ortsspezifische Mutagenese gegen einen Isoleucinrest aus. Die Mutante wies für NAM eine signifikant höhere Michaeliskonstante als der Wildtyp auf. Die Autorin vermutete, dass es sich bei K114 um den mit der freien Carboxylatgruppe des Substrates wechselwirkenden Rest handelt (Pittelkow, 1996).

Cystein

Die pkAcy1 ist durch SH-blockierende Reagenzien inaktivierbar. Der Einfluss von Inhibitoren auf Modifizierungsraten ließ darauf schließen, dass sich eine der reaktiven SH-Gruppen sehr dicht an der Substratbindungsstelle befindet (Kördel und Schneider, 1976a), ohne selbst direkt an der Substratbindung oder der Katalyse beteiligt zu sein (Szajáni *et al.*, 1979; Wang *et al.*, 1995). Der pK_s -Wert dieser SH-Gruppe wurde mit 8.0-8.5 bestimmt (Kördel und Schneider, 1976a; Henseling und Röhm, 1988). Henseling und Röhm vermuteten, dass die Deprotonierung dieses Cysteinrestes den beobachteten Anstieg der Michaeliskonstante beim Umsatz von N-Acetylglutamat verursachte (Henseling und Röhm, 1988).

Bemerkenswert ist, dass im Apoenzym zwar die SH-Gruppen-Reaktivität gegenüber dem Ellman's Reagenz (Kördel und Schneider, 1977a) anstieg, sich in Gegenwart des kompetitiven Inhibitors Norleucin aber wie im intakten Enzym verhielt. Die Autoren vermuteten, dass das intakte Metallzentrum zur Inhibitorbindung nicht notwendig ist (Kördel und Schneider, 1977a).

Heese und Röhm fanden eine gegenüber 4-Hydroxymercuribenzoat besonders reaktive SH-Gruppe im Apoenzym, aber nicht gegenüber dem Ellman's Reagenz. Im modifizierten Zustand war diese SH-Gruppe die einzige, deren Blockierung die Enzymaktivität beeinträchtigte. Die Reaktionsraten einer SH-Gruppenalkylierung durch N-Ethylmaleinimid (NEM) ergaben ferner pH-Profile, die mit der pH-Abhängigkeit der K_m -Werte von aromatischen und sauren Acylaminosäure-Substraten übereinstimmten.

Diese Versuche wiesen ebenfalls auf eine der Substratbindungsstelle nahen SH-Gruppe hin (Heese und Röhm, 1989).

Des Weiteren erhöhte der Acyl-Hemmstoff *N*-Hydroxy-2-aminobutyrat im Gegensatz zu Norleucin (Kördel und Schneider, 1977a) sowohl im Apo- als auch im Zinkenzym die Reaktivität einer SH-Gruppe gegenüber dem Ellman's Reagenz. Das inaktive Apoenzym war nach einer Alkylierung mit NEM nach wie vor in der Lage, Zink zu binden. Wie zuvor Kördel und Schneider (Kördel und Schneider, 1977a) vermuteten die Autoren, dass das Metall zur Inhibitor- und wahrscheinlich auch der Substratbindung nicht essenziell ist (Heese und Röhm, 1989).

Reduktionsmittel mit freien SH-Gruppen, vor allem Dithiothreitol (DTT), inaktivierten die pkAcy1 (Kördel und Schneider, 1976a) und die vermutliche Acy 1 der Rinderleber (Gade und Brown, 1981), wahrscheinlich durch Reduktion einer Disulfidbrücke.

Nach weiteren umfangreichen Modifizierungsversuchen der pkAcy1 und ihres trypsinresistenten Fragments (s. 1.2.3), und inzwischen in Kenntnis der Primärsequenz (s. Abb. 4-25), skizzierte Palm folgendes Bild von Zustand und Lage der fünf Cysteine in der pkAcy1: C48 und C341 haben strukturelle Bedeutung. Bei C115 handelt es sich vermutlich um den dem aktiven Zentrum nahen Cysteinrest. C270 und C292 bilden eine Disulfidbrücke innerhalb der trypsinempfindlichen Domäne aus. Bei der humanen Acyl (hkAcy1) befinden sich statt Cysteinresten an Position 270 ein Serinrest und an Position 341 ein Methioninrest. Hingegen befindet sich an Position 328 statt eines Phenylalanins ein Cystein.

Tryptophan

Die Modifizierung der pkAcy1 mit den tryptophanspezifischen Reagenzien 1*H*-Diazotetrazol und *N*-Bromsuccinimid (NBS) wies auf zwei besonders reaktive Reste hin. Kördel und Schneider vermuteten, dass diese Reste hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Substrat (s. 1.1.1.7) eingehen (Kördel und Schneider, 1976b).

Vom Bruch und Röhm wiesen durch Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz die Existenz einer Funktion mit einem pK_s von 7.1 im Enzym nach. Offenbar ist einem der Tryptophanreste ein Histidinrest mit einem pK_s von 7.1 benachbart. Die Fluoreszenz dieses Tryptophans sollte entweder direkt durch die Ionisierung des Histidins oder indirekt durch eine dadurch verursachte, lokale Konformationsänderung gequencht werden (vom Bruch und Röhm, 1988).

Chen *et al.* modifizierten vier Tryptophanreste pro Monomer, von denen sie ebenfalls einen im aktiven Zentrum vermuteten (Chen *et al.*, 1997).

Histidin

Kördel und Schneider wiesen in Gegenwart von Methylenblau die Photooxidation von vier Histidinresten nach. Das Enzym wurde dabei komplett inaktiviert. Sowohl die initiale Oxidationsrate als auch die Inaktivierung waren im Apoenzym verstärkt. Entsprechend war die Histidinalkylierung durch Diethylpyrocarbonat im Zinkenzym geringer als im Apoenzym. Die Autoren gingen von der Photooxidation eventuell zinkbindender Histidinreste aus (Kördel und Schneider, 1977b).

Saure Reste

Löffler und Schneider wiesen mittels Modifizierung mit 2-Ethoxy-1-(ethoxycarbonyl)-1,2-dihydrochinolin einen essenziellen Carboxylatrest mit einem relativ hohen pK_s von 6.6 nach (Löffler und Schneider, 1987). Kompetitive Inhibitoren schützten das Enzym. Die Autoren vermuteten, dass der saure Rest nahe am oder im aktiven Zentrum als Base fungiert.

1.2.2.2 *Pseudomonas*-CPG2

Die CPG2 ist durch verschiedene Dichlortriazinyl-Farbstoffe hemmbar. Als Methotrexatanaloga binden diese Farbstoffe an die Substratbindungsstelle. Hughes *et al.* erreichten mit dem Farbstoff Procion Red MX-8B eine stöchiometrische Affinitätsmarkierung der CPG2. Substrat (s. Abb. 1-3) sowie kompetitive Inhibitoren schützten das Enzym vor dieser Markierung. Nach Proteolyse wurde das durch die Markierung modifizierte Fragment mittels RP-HPLC identifiziert und sequenziert. Das Threonin an Position 279 wurde als der modifizierte Aminosäurerest identifiziert. Neben Zink erhöhten auch Mangan, Cobalt, Nickel und Kupfer die Affinität der Triazinyl-Farbstoffe zum Enzym. Daher und aufgrund spektroskopischer Untersuchungen von Enzym-Farbstoffkomplexen schlossen die Autoren auf die Bildung eines ternären Komplexes zwischen Enzym, Metall und dem Farbstoff an der vermeintlichen Substratbindungsstelle. Sie vermuteten den modifizierten Rest in der Nähe des aktiven Zentrums (Hughes *et al.*, 1984).

Bei Betrachtung der CPG2-Sequenz (Abb. 4-25, Minton *et al.*, 1984) fällt jedoch auf, dass die Autoren bei ihrer Zählung die von *E. coli* benutzte Singalsequenz der

Pseudomonas-CPG2 von 22 Aminosäuren berücksichtigt haben. Mit der in der Arbeit von Hughes *et al.* angegebenen Sequenz des markierten Peptids lässt sich die Modifikation dem Threonin an Position 301 zuordnen. Dieser Rest befindet sich allerdings in der Dimerisierungsdomäne (s. Abb. 1-2).

1.2.3 PWW-Motive und Domänenstruktur der Acylase 1

In der hkAcy1 und der pkAcy1 finden sich je zwei für die Säugerenzyme charakteristische Sequenzabschnitte mit je einem PWW-Motiv:

hkAcy1 178 N P T D A F T V F Y S E R S P W W V R V T S T G R P **202**

pkAcy1 178 S P T D A F T V F Y S E R S P W W L R V T S T G K P **202**

hkAcy1 307 K W M H P Q V T P T D D S N P W W A A F S R V C K D **332**

pkAcy1 306 K W M E T Q V T S T D D S D P W W A A F S G V F K D **331**

PWW-ähnliche Motive der allgemeinen Form (P,G)(F,W)(F,W) finden sich in fast allen bisher kristallisierten, integralen Membranproteinen, zum Beispiel dem Photosynthesereaktionszentrum aus *Rhodospseudomonas viridis* (Deisenhofer und Michel, 1991) und der Cytochrom c-Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* (Iwata *et al.*, 1995). Die Motive liegen am Ende von Transmembranhelices und tauchen dabei mit den Ringebenen der Aromaten senkrecht in den unpolaren Kohlenwasserstoffketten-Anteil der Membran ein. Studien zur Orientierung von Tryptophananaloga an Modellmembranen machten deutlich, dass sich, wie in Membranproteinen, der Indolring spontan 14-15 Å vom Zentrum des Bilayers entfernt in die Membran einlagert, und dabei eine Wasserstoffbrückenbindung mit einer polaren Kopfgruppe eingeht (Kachel *et al.*, 1995). Weitere PWW-ähnliche Motive finden sich an den Enden von Transmembranhelices zum Beispiel des Gramicidins, des Porins, der Prostaglandin H-Synthetase sowie in den vermutlichen Transmembransegmenten einer Reihe von Ionenkanälen (Palm und Röhm, 1995; Marsh, 1996). Der Sinn dieser Motive wird in einer transversalen Verankerung der integralen Membranproteine in der Membran gesehen (Cowan und Rosenbusch, 1994; Kachel *et al.*, 1995).

Röhm und Mitarbeiter stellten die Hypothese auf, dass auch eine periphere Membranverankerung durch PWW-Motive zu Stande kommen kann (Jakob, 1992; Palm und Röhm, 1995). Obwohl die Acy1 als zytosolisches Enzym betrachtet wird, zeigten die Schweineenzyme aus der Niere (Heese *et al.*, 1988; Greenhough und Turner, 1991)

sowie der Darmmukosa (Giardina *et al.*, 1997) während der Differentialzentrifugation eine ausgeprägte Tendenz zur Assoziation mit Membranvesikeln. Greenhough und Turner schrieben dies einem Präparationsartefakt zu (Greenhough und Turner, 1991). Trotzdem konnte ein spezifischer, peripherer Kontakt des Enzyms zur zytosolischen Seite von Membranen bisher nicht ausgeschlossen werden.

Palm identifizierte nach partieller Hydrolyse der pkAcy1 eine trypsinresistente Domäne, die sich aus einem *N*-terminalen (E6-R196) und einem *C*-terminalen (W307-S406) Anteil des Enzyms zusammensetzte. Die PWW-Motive waren damit im trypsinresistenten Fragment nahe den beiden Schnittstellen am jeweiligen Übergang zur Zwischendomäne lokalisiert (s. Abb. 4-25, Palm, 1994). Unter der Annahme, dass die Motive sich in Oberflächenloops befinden, sollten sie der Hypothese nach einen peripheren Membrankontakt vermitteln können. Angesichts der Rolle, die PWW-ähnliche Motive in Membranproteinen spielen, ist eine solche Interaktion gut vorstellbar und wird auch für andere Proteine mit peripherem Membrankontakt postuliert (Michel, 1998). Die von Palm aufgeklärte Domänenstruktur der pkAcy1 (Palm, 1994) wurde durch die Kristallstruktur der CPG2 im Prinzip bestätigt (s. Abb. 1-2).

1.2.4 Die Katalyse

1.2.4.1 Nachweis von Acylase1-Aktivität

Zum Nachweis von Acylaseaktivität wurden eine Reihe von direkten und gekoppelten Tests beschrieben. Der Nachweis des „Histozyms“ erfolgte durch Kristallisation und Wägen der bei der Spaltung von Hippursäure freiwerdenden Benzoesäure (Schmiedeberg, 1881; Smorodinzew, 1922). Die Spaltung der Acylamidbindung kann direkt UV-spektrometrisch verfolgt werden (Mitz und Schlueter, 1958). Löffler *et al.* führten Furyl-acryloyl-, Thienyl-acryloyl- und Zimtsäurederivate von Aminosäuren als Substrate zur spektrometrischen Detektion der Hydrolyse ein (Löffler *et al.*, 1988). In gekoppelten Tests wurde die freie Aminosäure entweder mittels Oxidation durch eine Aminosäuredehydrogenase (Röhm und van Etten, 1986; Cho *et al.*, 1987) oder durch den Nachweis ihres freien *N*-Terminus bestimmt. Für Letzteres eignete sich zum Beispiel die Ninhydrin-CO₂-Methode (Greenstein und Winitz, 1961), die Derivatisierung mit 2,4,6-Trinitro-benzolsulfonsäure (TNBS) in Mikrotiterplatten (s. 3.1.4.2, Weiß, 1994) oder *o*-Phtalaldehyd und β -Mercaptoethanol in einer ‘Flow Injection’-

Analyse (FIA, Keller, 1984; Henseling und Röhm, 1988). Lorentz *et al.* nutzten die Bildung eines roten Charge-Transfer-Komplexes des freien Methionins mit *p*-Benzochinon zum Aktivitätsnachweis (Lorentz *et al.*, 1975). Der direkte Nachweis der freien Aminosäure mittels Aminosäureanalyse ist die aufwendigste Art, die Acylaseaktivität zu bestimmen (Bruns und Schulze, 1962; Greenhough und Turner 1991).

1.2.4.2 Hemmstoffe der pkAcyl

Die Inhibitor konstanten (K_i) von kompetitiv wirkenden *N*-substituierten Aminosäuren für die pkAcyl liegen, ähnlich wie die K_m -Werte der strukturverwandten Substrate, im millimolaren Bereich (Birnbaum *et al.*, 1952; Fones und Lee, 1953; Löffler und Schneider, 1987). Auch hydrophobe Aminosäuren hemmen im deprotonierten Zustand das Enzym (Kördel und Schneider, 1975). *N*-Hydroxy- α -aminosäuren (Löffler und Schneider, 1987) und Boc-substituierte Aminosäuren (Heese *et al.*, 1990) sind kompetitive Inhibitoren mit K_i -Werten im submillimolaren Bereich. Röhm zeigte, dass Butylmalonat als 'Slow-binding Inhibitor' mit einem K_i -Wert von etwa 100 μ M funktioniert. Nach einer 'in silico'-Energie minimierung nahm der Inhibitor eine Konformation ein, welche dem späten Übergangszustand von *N*-Acetylnorleucin während eines nukleophilen Angriffs durch ein Wassermolekül ähnelt (Röhm, 1989).

Von physiologischer Bedeutung ist möglicherweise die kompetitive Inhibition der Acyl durch *N*-acetylierte Peptide sowie die der Acylpeptid-Hydrolase durch *N*-Acetylaminosäuren (s. 1.3). Die Substrate des jeweils anderen Enzyms werden fest gebunden, ohne hydrolysiert zu werden (Jones *et al.*, 1991).

1.2.4.3 Der Katalysemechanismus

Unter Berücksichtigung der in 1.2.2. geschilderten Erkenntnisse über essenzielle Reste haben schon mehrere Autoren über die Konfiguration des aktiven Zentrums der pkAcyl hypothetische Modelle aufgestellt (Kördel *et al.*, 1983; Röhm und van Etten, 1986; Henseling und Röhm, 1988; Palm, 1994). Galaev und Švedas schlossen auf der Grundlage von kinetischen, Röhm und van Etten auf der Grundlage von NMR-Untersuchungen die Bildung eines Acylenzyms bei der Hydrolyse aus (Galaev und Švedas, 1982; Röhm und van Etten, 1986). Henseling und Röhm beobachteten bei der

Hydrolyse einen inversen Isotopeneffekt (Henseling und Röhm, 1987), der von Palm als durch eine Carboxylat-Dyade verursacht interpretiert wurde (Palm, 1994). Löffler und Schneider hatten bereits die Hypothese eines Aspartat-Peptidase-Mechanismus aufgestellt (Löffler und Schneider, 1987).

Auch für die Hydrolyse von L,L-Succinyldiaminopimelat durch die *H. influenzae*-Desuccinylase wurde ein inverser Isotopeneffekt gemessen. Dieser wurde, wie auch die pH-Abhängigkeit der kinetischen Parameter des Cobalt- und des Zinkenzym, einer Beteiligung eines durch das Zinkion koordinierten Wassermoleküls an der Katalyse zugeschrieben. Die Autoren vermuteten, dass im nativen Enzym wie in der CPG2 ein dinukleäres Zinkzentrum vorliegt, und dass das beobachtete mononukleäre Zentrum ein Präparationsartefakt war (Born *et al.*, 1998).

Für die CPG2 vermuteten Rowsell *et al.* entsprechend eine katalytische Funktion des Metalls. Aus ihren Kristallstrukturdaten leiteten die Autoren Strukturhomologien zu anderen Exopeptidasen ab, für die ebenfalls eine katalytische Funktion ihres jeweiligen Metallzentrums angenommen wird. Vor allem die katalytische Domäne der *Aeromonas proteolytica*-Leucinaminopeptidase (AMP) wies eine hohe Strukturhomologie zur katalytischen Domäne der CPG2 auf: 56% der α -Kohlenstoffatome dieser Domänen in den Kristallstrukturen beider Enzyme ließen sich gut übereinanderlegen. Auch die Zinkbindungsmotive beider Enzyme unterschieden sich lediglich durch den Austausch von E200 (s. Abb. 4-25) gegen ein Aspartat. Glu175 der CPG2 wurde als der einzige weitere in der Acylasefamilie konservierte und gleichzeitig in der AMP-Struktur konservierte Rest (Glu151) identifiziert. Diesem Glutamatrest ordneten die Autoren die Rolle einer generellen Base bei der Katalyse zu (Rowsell *et al.*, 1997; Born *et al.*, 1998).

1.2.4.4 Das Reaktionsgleichgewicht

Die Methoden der organischen Synthese von Aminosäuren liefern optisch inaktive Gemische von L- und D-Isomeren. Die Acyl1 wurde erfolgreich zur enantioselektiven Spaltung solcher racemischen Gemische eingesetzt (Chibata *et al.*, 1976). Jedoch liegen im Gleichgewicht der Amidbildung/-hydrolyse nicht unwesentliche Mengen des Amids vor, zum Beispiel 0.01% *N*-Acetylalanin oder 5% Benzoyltyrosylglycin (Röhm, 1999). Die Gleichgewichtskonstanten der Hydrolyse/Synthese solcher Komponenten liegen zwischen 5 und 10 (Röhm und van Etten, 1986; Galaev und Švedas, 1982). Folglich lässt sich die *pkAcy1* auch zur Synthese von *N*-Acylaminosäuren einsetzen. Die

Bildung einer Reihe von *N*-Acetylamino-säuren wurde mit der Acylkomponente im Überschuss erreicht. Dabei betrug die Ausbeute für NAM bis zu 48% (Spirichev *et al.*, 1958; Orekhovich *et al.*, 1959). Galaev und Švedas wiesen nach, dass sich das Reaktionsgleichgewicht bei physiologischem pH zur Synthese verlagerte. Die Autoren vermuteten, dass in verdünnter, wässriger Lösung hauptsächlich wegen der Ionisierung sowohl der Edukte als auch des Reaktionsprodukts keine Acylamidbindung zwischen einer Aminosäure und einem Acetatrest hergestellt wird (Galaev und Švedas, 1982). Verschiedene Gleichgewichtskonstanten der Reaktion mit 1 mg/ml pkAcy1 wurden sowohl auf dem Weg der Hydrolyse als auch der Synthese in Gegenwart hoher Acetat- und Aminosäurekonzentrationen bestimmt (Švedas *et al.*, 1980; Galaev und Švedas, 1982). Yokoigawa *et al.* entwickelten eine Methode zur Synthese von *N*-Acetyl-L-Methionin mit Hilfe der pkAcy1 in einem organischen Lösungsmittel. Die Autoren erreichten eine Ausbeute von etwa 90% (Yokoigawa *et al.*, 1994).

1.3 Spezies-, Gewebe- und Genlokalisierung der Acylase 1

1.3.1 Speziesunterschiede und Gewebeverteilung

Miko untersuchte den Acyl1-Gehalt in Nieren und Lebern elf verschiedener Säugerspezies (s. 1.1.1.1). In Rohhomogenaten der Gewebe von Herbivoren wie Schaf und Rind sowie den Omnivoren Mensch und Schwein bestimmte er die höchsten spezifischen Enzymaktivitäten. Dabei waren die Leberaktivitäten wesentlich geringer als die Nierenaktivitäten. In Nagern und der carnivoren Katze waren die Aktivitäten am niedrigsten. In den Lebern von Hunden fünf verschiedener Rassen ließ sich keine Aktivität nachweisen, während die Aktivität in der Hundeniere fast so hoch war wie bei den Omnivoren (Miko, 1993).

Schneider berichtete von einer immunologischen Quantifizierung der Acyl1 in Organen des Schweins. Die größte Enzymmenge wurde mit 1.5 mg pro g Frischgewebe in der Nierenrinde bestimmt, gefolgt von der Leber mit 1 mg/g. Geringe Mengen ließen sich auch in der Skelett- und Herzmuskulatur sowie der Lunge nachweisen (Schneider, 1984). Cook *et al.* fanden für den Menschen das gleiche Verteilungsmuster auf der mRNA-Ebene (Cook *et al.*, 1993). Marks *et al.* wiesen Acylaseaktivitäten in 7 verschiedenen Hirnregionen der Ratte nach. Die Hirnaktivitäten waren alle um etwa den

Faktor 20 niedriger als die Nierenaktivität (Marks *et al.*, 1983), welche auch in der Ratte die mit Abstand höchste Gewebeaktivität der Acylase war (s. Tab. 5-2, Endo, 1980).

1.3.2 Zelluläre Lokalisation

Immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation der pkAcy1 lieferten widersprüchliche Ergebnisse. Eine Studie von Löffler *et al.*, die an Kryoschnitten durchgeführt wurde, wies das Enzym dem distalen Tubulus zu (Löffler *et al.*, 1982). Potthoff hingegen fand die Acy1 in Schnitten von paraffineingebettetem Gewebe hauptsächlich im proximalen Tubulus (Potthoff, 1996). Zeitgleich zur vorliegenden Arbeit untersuchte Höpfner die Lokalisation der mRNA der pkAcy1 mittels *in situ*-Hybridisierung. Das Transkript der pkAcy1 wurde dabei in allen Segmenten des tubulären Systems nachgewiesen, das heißt sowohl im proximalen und distalen Tubulus als auch in der Henle-Schleife sowie dem Sammelrohr. Auch im Glomerulus fand sich eine geringe Reaktion, während die interstitielle und die Blutgefäßkomponente des Gewebes von Färbung frei war (s. Abb. 1-4, Höpfner, 1999; Lindner *et al.*, 1999). Die Kenntnisse von der subzellulären Lokalisation der Acy1 wurden bereits in Abschnitt 1.2.3 im Zusammenhang mit den PWW-Motiven und der Domänenstruktur der pkAcy1 vorgestellt.

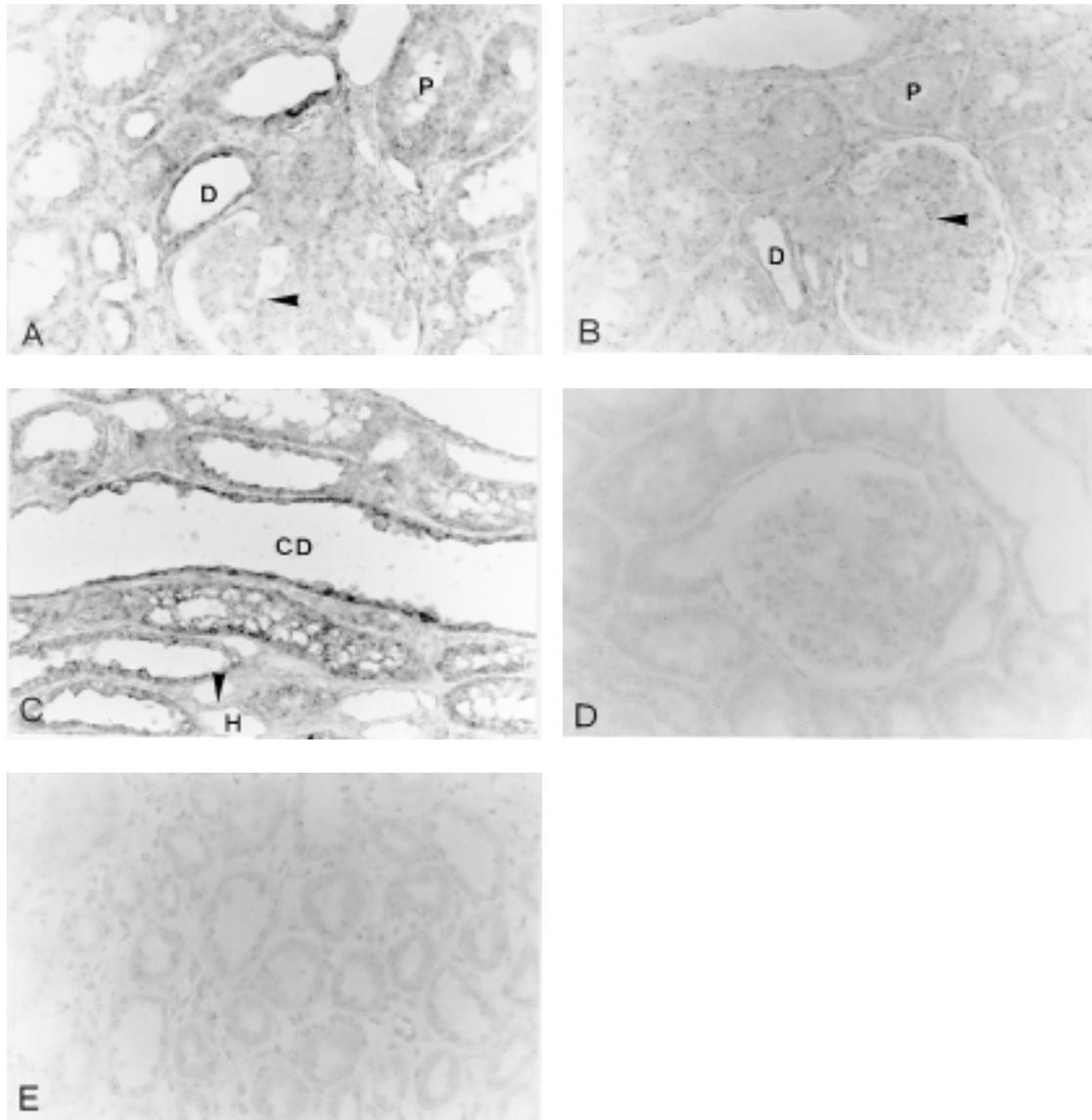


Abb. 1-4 In situ-Hybridisierung der Acy1-mRNA in Paraffinschnitten der Schweineniere mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden, Höpfner (1999). Abbildung A, B, und D, zeigen Rinden- C und E Markbereiche, die entweder mit Formaldehyd (A, C, D) oder Paraformaldehyd (B, E) fixiert wurden. Die Schnitte in A-C wurden mit der Antisense-, die Kontrollen in C und E mit der Sense-Sonde hybridisiert. In der Rinde (A, B) wurde im proximalen (P) und distalen (D) Tubulus Expression nachgewiesen. Etwas Färbung wurde auch in den Glomeruli detektiert (Pfeilköpfe). Im Mark wurde Acy1-Expression in der Henle-Schleife (H, Pfeilköpfe) und dem Sammelrohr (CD) gefunden. Die vaskuläre Komponente war in allen Fällen frei von Färbung. Alle Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt.

1.3.3 Genlokalisierung

Naylor *et al.* ordneten das Acy1-Gen dem kurzen Arm von Chromosom 3, genauer 3p21.3, zu (Naylor *et al.*, 1982). Diese Region ist bei einer Reihe von Neoplasmen vom Verlust der Heterogenizität betroffen (Naylor *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1989a). In fast

allen Fällen von kleinzelligem Bronchialkarzinom (SCLC, Johnson *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 1989b, Scaloni *et al.*, 1992) und häufig auch beim Nierenzellkarzinom (Zhar *et al.*, 1989) wurde hier eine Deletion des Genlokus D3F15S2 gefunden, der vor allem in der Niere stark exprimiert wird (Erlandson *et al.*, 1991). In diesem Genlokus ist das Acylpeptid-Hydrolase-Gen dem Acy1-Gen benachbart (Jones *et al.*, 1991) und von der Deletion ebenfalls betroffen (Scaloni *et al.*, 1992). Zwei Möglichkeiten eines Zusammenhangs zwischen einer unkontrollierten Zellproliferation und der Acy1 sowie der Acylpeptid-Hydrolase werden seither diskutiert: Entweder befinden sich die Gene der beiden Enzyme in unmittelbarer Nachbarschaft eines oder mehrerer, bisher nicht identifizierter Tumorsuppressorgene (TSG), oder sie haben selber TSG-Eigenschaften, da die Enzyme am Abbau von biologisch aktiven Peptiden beteiligt sind (Tsunasawa, 1992; Cook *et al.*, 1998).

1.4 Funktionen der Acylase 1

1.4.1 Die allgemeine Funktion

Allgemein wird der Acy1 die Funktion zugeschrieben, die beim Abbau *N*-acetylierter Proteine und Peptide anfallenden *N*-Acetylaminosäuren zu hydrolysieren (s. 1.1 und Abb. 1-1 c, Endo, 1980; Gade und Brown, 1981). Betrachtet man die Spezifität der *N*-Acetyltransferasen (Bradshaw *et al.*, 1998) und der *N*-Acylpeptid-Hydrolasen (Kobayashi und Smith, 1987; Raphael *et al.*, 1993), so scheint die Acy1 eine hierfür gut geeignete Substratspezifität zu haben (Driessen *et al.*, 1985; Tsunasawa und Sakiyama, 1993). 35-50% aller eukaryotischen, *N*-terminal acetylierten Proteine enthalten älteren Daten zufolge 35-50% *N*^α-Acetylserin, 27-33% -alanin, 5-8% -glycin, 5-6% methionin, 5-6% -threonin, 1-3% -aspartat und 2-3% -valin (Aitken, 1990). An diesen Zahlen hat sich bis dato im Wesentlichen nichts geändert. In der Hefe gehören die häufig *N*-acetylierten Reste gemäß der 'N-end rule', die Teil des Ubiquitinsystems zum Abbau cytosolischer Protein ist, zu den proteinstabilisierenden Resten (s. 5.3, Varshavsky, 1997). Die Funktion der *N*-terminalen Proteinacetylierung wird vornehmlich in einem Schutz vor frühzeitigem Proteinabbau gesehen (Brown, 1978; Bachmair *et al.*, 1986; Bradshaw, 1989). In Abbildung 1-5 werden die Einflüsse *N*-terminaler Aminosäuren auf die Proteinstabilität in *E. coli.*, *S. cerevisiae* und Kaninchen-Retikulocyten verglichen. Durch die Expression und Analyse von Mutanten verschiedener Proteine wurde gezeigt,

dass die sieben Aminosäuren mit den kleinsten Gyrationenradien, Prolin, Valin, Cystein, Glycin, Alanin, Serin und Threonin an Position 2, in der Hefe für die cotranslationale Abspaltung des Initiator-methionins sorgen. *N*-terminale Glycin-, Alanin-, Serin- und Threoninreste sind anschließend Substrate einer *N*-Acetyltransferase. Ein nicht abgespaltenes Initiator-methionin wird jedoch nur mit Glutamat, Aspartat und Asparagin als vorletztem Rest acetyliert (Huang *et al.*, 1987; Moerschell *et al.*, 1990). Genau diese Aminosäuren können in der Hefe als *N*-terminale Reste durch eine weitere *N*-Acetyltransferase selber acetyliert werden (Bradshaw *et al.*, 1998). Die Methionin-Amino-peptidasen und *N*-Acetyltransferasen höherer Pflanzen und Säugerzellen unterscheiden sich in ihren Spezifitäten nicht wesentlich von denen der Hefe (Boissel *et al.*, 1988). Jedoch ist die Aussagekraft der Art des *N*-Terminus offenbar differenzierter. Die am häufigsten acetylierten Serin- und Alaninreste gelten in der Säugerzelle als destabilisierend (s. Abb. 1-5). Die Beurteilung dieser Daten wird dadurch erschwert, dass bei der wachsenden Zahl der Proteinsequenzen die Art der *in vivo*-Prozessierung des *N*-Terminus meist unklar bleibt. Das Signal, welches die Modifizierung veranlasst, ist noch immer unbekannt.

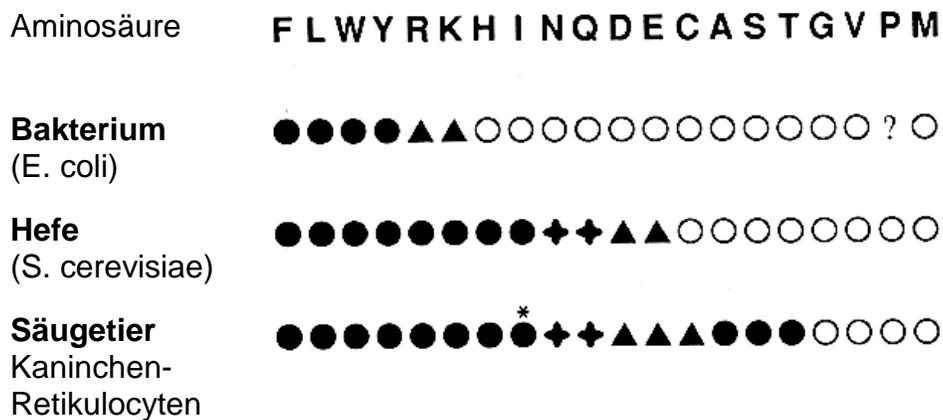


Abb. 1-5 Vergleich der eu- und prokaryotischen ‘N-end rule’. Offene Kreise bezeichnen stabilisierende, volle Kreise, Dreiecke und Kreuze primär, sekundär beziehungsweise tertiär destabilisierende Reste, nach Varshavsky (1992).

Die Proteinstabilisierung ist allerdings nicht die einzige Funktion der *N*-Acetylierung. Es gibt auch Proteine, bei denen sich die Eliminierung der *N*-terminalen positiven Ladung direkt funktionell auswirkt, zum Beispiel auf den kooperativen Effekt bei der Katalyse durch die Glycin-*N*-Methyltransferase der Ratte (Ogawa *et al.*, 1997) oder bei der Sauerstoffbindung durch Hämoglobin (Ohba *et al.*, 1997) sowie auf die biologische

Aktivität von Peptidhormonen wie dem α -Melanocytenstimulierenden Hormon und dem β -Endorphin (Evans *et al.*, 1994). Bei den zwei letztgenannten Beispielen wird sogar eine regulierte *N*-Acetylierung vermutet.

Dennoch erscheint die hohe Effektivität der Hydrolyse von *N*-Acetylmethionin (NAM) aber auch *N*-Acetylleucin (NAL) durch die Acyl1 paradox. Während Methionin verglichen mit Serin und Alanin nur einen geringen Teil der *N*-terminal blockierenden Aminosäuren ausmacht, ist NAM das weitaus beste Acyl1-Substrat. Leucin wurde überhaupt noch nicht als *N*-blockierende Aminosäure beschrieben (Meyer, 1998). Allerdings fanden Yamada und Bradshaw in der Rattenleber eine polysomale N^α -Acetyltransferase, die in künstlichen Peptiden neben *N*-terminalem Serin und Methionin bevorzugt auch Leucin acetylierte (Yamada und Bradshaw, 1991).

Einige Autoren vermuteten, die Acyl1 sei ebenso für den Abbau *N*-formylierter Aminosäuren aus den Mitochondrien zuständig (Grisolia *et al.*, 1977; Quavi und Kit, 1980). In der Regel wird das *N*-formylierte Initiator-methionin mitochondrial translatierter Proteine nicht abgespalten (Holt und Jacobs, 1994). Jedoch ist über den Abbau der mitochondrialen Proteine oder gar das Schicksal ihres *N*-Terminus wenig bekannt (Löffler, 1999).

1.4.2 Die nierenspezifische Giftung von *S*-substituierten *N*-Acetyl-L-cysteinkonjugaten (Mercaptursäuren)

Polyhalogenierte Alkene und Alkine werden durch renale Ausscheidung als *S*-Alkyl-*N*-acetyl-L-cysteinkonjugate (Mercaptursäuren) entgiftet. Die Acylasen (s. Tab. 5-2) spielen bei der Bioaktivierung dieser Säuren zu nephrotoxischen Intermediaten eine wichtige Rolle (Anders und Dekant, 1994).

Zunächst werden die Fremdstoffe in der Leber zu Glutathion-*S*-konjugaten biotransformiert. Der Abbau zu den entsprechenden *S*-Cysteinkonjugaten (*S*-Alkyl-L-cysteinen) geschieht im Gallengang, im Darm oder, nach der Reabsorption durch das Darmepithel, in der Niere mittels endothelialer Peptidasen. Ein Teil der Cysteinkonjugate erreicht die Leber und wird hier *N*-acetyliert. Als Mercaptursäuren gelangen die Konjugate daraufhin zur Niere und werden, wie die noch nicht acetylierten Konjugate, über die basolaterale Membran der proximalen Tubuluszellen aufgenommen (Lash und Anders, 1989). Hier werden auch die restlichen Konjugate, bevor sie

ausgeschieden werden können, durch *N*-Acetylierung zu Mercaptursäuren. In der Schweineniere ist die spezifische Aktivität der mikrosomalen *S*-Cysteinonjugat-*N*-Acetyltransferase, deren physiologisches Substrat wahrscheinlich Leukotrien E₄ ist, 30mal höher als in der Leber (Aigner *et al.*, 1996).

Trotzdem haben polyhalogenierte Alkene eine spezifisch nephrotoxische Wirkung, von der in erster Linie die proximalen Tubuluszellen betroffen sind. Die *S*-Cysteinonjugat-*N*-Acetyltransferase hat in diesen Zellen einen Gegenspieler: die Acyl1. Das Enzym stand schon lange im Verdacht, Mercaptursäuren wieder zu deacetylieren. Auf die Deacetylierung folgt eine Freisetzung von reaktiven Alkylantien aus den *S*-Cysteinonjugaten durch die β -Lyase (s. Abb. 1-6, Anders und Dekant, 1994). Uttamsingh *et al.* konnten vor kurzem für die Ratte nachweisen, dass die Acyl1 nicht nur *N*-Acetylcystein spaltet (Lindner, 1996; Pittelkow *et al.*, 1998), sondern in der Tat auch für die Bioaktivierung von Mercaptursäuren verantwortlich ist (Uttamsingh *et al.*, 1998).

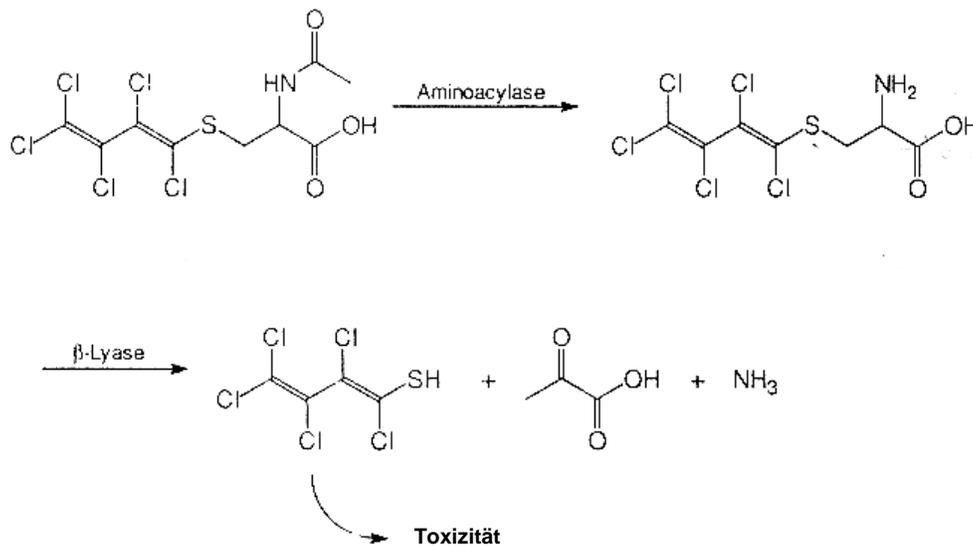


Abb. 1-6 Acyl1- und β -Lyase-abhängige Bioaktivierung von *S*-Alkyl-*N*-acetyl-L-cystein (Mercaptursäuren) mit *N*-Acetyl-*S*-(pentachlorobutadienyl)-L-cystein als Beispiel, nach Anders und Dekant (1994).

1.4.3 Auf der Suche nach der nierenspezifische Funktion der Acylase

Eine wie unter 1.4.1 beschriebene, „konventionelle“ Funktion der Acyl1 beim Proteinabbau scheint als alleiniger Grund für die große Menge des Enzyms in der Nierenrinde (s. 1.3.1) schwer vorstellbar. Allgemein wird von der Existenz einer

nierenspezifischen Funktion ausgegangen. Da keiner der nachfolgenden Vorschläge bisher überprüft wurde, sind beide als spekulativ zu bezeichnen.

1.4.3.1 Aminosäure-‘Salvage’

Angenommen, *N*-Acetylaminosäuren sind in der Tat die physiologischen Substrate der Acyl in der Nierenrinde, so stellt sich die Frage, ob die Substrate in den Zellen selbst anfallen oder aufgenommen werden. Pittelkow *et al.* vermuteten, dass der *N*-Acetylaminosäureabbau in der Peripherie unvollständig ist, und dass die restlichen *N*-terminal blockierten Aminosäuren in der Niere ‘gepoolt’ werden. Die Acyl könnte an ihrem ‘Salvage’ nach der Resorption aus dem Ultrafiltrat beteiligt sein (Pittelkow *et al.*, 1998). Die Tubuluszellen müssten dann in der Lage sein, *N*-Acetylaminosäuren aktiv zu resorbieren, doch ein solcher Transportmechanismus ist noch nicht beschrieben worden. Die unspezifische Lokalisation der Acyl im Nierenepithel (s. 1.3.2) passt weniger gut zu dieser Hypothese. Von einem Enzym, welches eine spezifische Funktion bei der Modifikation des Ultrafiltrates hat, würde man eine Beschränkung auf einen bestimmten Tubulusabschnitt erwarten (Lindner *et al.*, 1999).

1.4.3.2 Hippursäuresynthese

Auf den katalytischen Eigenschaften der Acyl und thermodynamischen Überlegungen (s. 1.2.4.4) basierend, schlugen Löffler *et al.* vor, dass die Acyl *in vivo* statt der Hydrolyse die Synthese von Hippursäure aus Benzoat und Glycin veranlassen könnte (Löffler *et al.*, 1982). Benzoat entsteht als Detoxifikationsprodukt von Pflanzenphenolen und aromatischen Aminosäuren durch die Darmflora. Miko griff diese Idee wieder auf und zeigte, dass mit Herbi- und Omnivoren die Acyl gerade in den Nieren der Spezies höchste Aktivitäten erreicht, die einer hohen Benzoessäurebelastung ausgesetzt sind (Miko, 1993).

1.5 Zielsetzung

Die Klärung der Frage nach der nierenspezifischen Funktion der Acylase 1 war das übergeordnete Ziel dieser Arbeit.

- Zunächst sollte eine geeignete Methode zur quantitativen Analyse der allgemeinen Substrate des Enzyms, den *N*-Acetylaminosäuren, gefunden werden. Mit dieser Methode war zu prüfen, ob *N*-Acetylaminosäuren als potentielle Substrate der Nierenacylase in humanem Blut vorkommen. Dies würde auf eine ‘Salvage’-Funktion des Enzyms im Nierenepithel hinweisen.
- Im Folgenden sollte getestet werden, ob im Nierenepithel ein Transportmechanismus zur Resorption von *N*-Acetylaminosäuren vorhanden ist. Zu diesem Zweck war es erforderlich, eine Säugerzelllinie zu finden, die als Modell für das Nierenepithel dient und Acylase 1 exprimiert.
- Weiterhin sollte im Zellkultursystem die spezifische Aktivität des Enzyms unter variierenden Kulturbedingungen bestimmt werden. Eine mögliche Regulation der Aktivität sollte Rückschlüsse auf ihre Funktion erlauben.
- Obwohl die Acylase 1 ein zytosolisches Enzym ist, zeigt sie während der Zellfraktionierung eine starke Tendenz zur Membranassoziation. Eine mögliche Funktion der für die Acylase 1 der Säuger charakteristischen PWW-Motive besteht darin, diese Assoziation zu vermitteln. Mit dem Baculovirus-Expressions-Vektor-System (BEVS) sollten PAA-Mutanten der PWW-Motive exprimiert werden. Anhand einer proteinchemischen Charakterisierung der Mutanten sollten die Eigenschaften dieser Motive untersucht werden. Gleichzeitig sollte die Spezifität der Membranbindung durch Zellfraktionierungs-Experimente überprüft werden. Die rekombinanten Wildtypenzyme von Mensch und Schwein sollten zu Vergleichszwecken ebenfalls mittels des BEVS exprimiert und gereinigt werden.
- Während dieser Arbeit wurden zahlreiche Sequenzen von Mitgliedern der Acylasefamilie veröffentlicht. Hinzu kam die Aufklärung der Kristallstruktur der homologen CPG2 und damit die Kenntnis von der Identität metallbindender Reste. Beides eröffnete die Möglichkeit, durch Sequenzvergleiche konservierte Reste zu identifizieren.

2 Material

2.1 Geräte und Software

Neben der üblichen Laborausstattung wurden folgende Geräte benutzt:

Acht-Kanal-Pipette, Response 4850	Eppendorf, Hamburg
Airfuge	Beckman, München
Begasungsbrutschrank BB6060	Heraeus, Osterode
Dialign 2.0 (Multiple Sequence Alignment Software)	Bielefeld University Bioinformatics Server ³
Distriman	Gilson, Villiers-le-Bel
DNA Thermal Cycler	Perkin-Elmer, Langen
Fleischwolf, 5145	Braun AG, Frankfurt/M.
HPLC E605 mit Steuerungssoftware BASELINE	Waters, Eschborn
HPLC-UV-Detektor	Knauer, Berlin
Inkubationsschüttler G25	New Brunswick, USA
Invertoskop, Diavert	Leitz, Wetzlar
Kühlbrutschrank, Kelvitron K	Heraeus, Osterode
Mikrotiterplatten-Heizblock	Biorad, München
Mikrotiterplatten-Lesegerät Reader 3550 UV mit Steuerungssoftware Kinetic Collector	Biorad, München
Multalin version 5.3.3 (Multiple Sequence Alignment Software)	© I.N.R.A. France ⁴
Peak Fit Tm , Peak-Analyse / -Integration	SPSS science, Chicago
Peristaltische Pumpe	Pharmacia, Freiburg
Säulenchromatographiestand, LKB GP-10	Pharmacia, Freiburg
Schüttler, 4010	Köttermann, Hänigsen
Sigma Plot 2.01, Grafik / Tabellenkalkulation	Jandel, San Rafael
Spektrofluorometrischer Detektor, RF-551	Shimadzu, Kyoto
Speed Vac Concentrator, Savant	Bachofer, Reutlingen
Spektrophotometer U200	Hitachi, Tokio

³ URL: <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/dialign/>

⁴ URL: <http://W3.toulouse.inra.fr/multalin/html>

Sterilwerkbank, Gelaere HF 72	Flow Laboratories, Meckenheim
Suprafuge 22	Heraeus, Osterode
Ultraschall-Desintegrator, Sonoplus GM70	Bandelin, Berlin
Ultrazentrifuge	Sorvall, Bad Homburg

2.2 Verbrauchsmaterialien

LiChrosphere [®] 60 RP-Select B, 5 µm, 0.45 · 25 cm	Merck, Darmstadt
Microlance 3, 0.9 mm · 40 mm sterile Kanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
Mikrotiterplatten, 82 · 127 mm F-Form	Greiner, Nürtingen
PD-10 [®] -Säulen	Pharmacia, Freiburg
S-Monovette [®] 9NC Blutentnahme-System	Sarstedt, Nümbrecht

Sterile Kulturgefäße, Zentrifugenröhrchen und Zellschaber für die Gewebekultur wurden von der Firma Greiner (Nürtingen) bezogen.

Glaspipetten für die Gewebekultur wurden 3 h bei 180 °C sterilisiert. Das übrige Glasmaterial wurde Hitzedampf-sterilisiert.

2.3 Chemikalien

Alle gängigen Chemikalien wurden in *p.a.*-Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (München) und Serva (Heidelberg) bezogen.

Für wässrige Lösungen wurde bidestilliertes Wasser eingesetzt. Prozentangaben in den Rezepturen bezeichnen bei Feststoffen Gewicht pro Volumen (w/v) und bei Flüssigkeiten Volumen pro Volumen (v/v). Folgende Spezialchemikalien wurden verwandt:

Säulenchromatographie:

Phenylsepharose CL-4B [®]	Pharmacia, Freiburg
Q-Sepharose Fast Flow [®]	Pharmacia, Freiburg

Enzymtests:

2,4,6-Trinitro-benzolsulfonsäure (TNBS)	aus Laborbeständen
<i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid	Sigma, München
<i>p</i> -Nitrophenylphosphat	Sigma, München

Zellkultur:

Thiazolylblau Tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma, München
Albumin, bovine, Fraction V Powder, Fatty acid free, low endotoxin	Sigma, München
α -Ketoisocaproat, Natriumsalz	Sigma, München
BaculoGold™DNA	Pharmingen, San Diego
Baculovirus-Agarose	Invitrogen, San Diego
Cycloheximid	Sigma, München
Fetales Kälberserum (FCS)	c.c.pro, Neustadt/W.
Gentamycin (10mg/ml)	Gibco BRL, Karlsruhe
Insulin, bovine, Zinksalz	c.c.pro, Neustadt/W.
Lipofectin	Gibco BRL, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin 'Mixture' (5000 Units/ml Penicillin und 5000 μ g/ml Streptomycin)	Serva, Heidelberg
Pluronic F68	Sigma, München
Trypsin (2.5% in Hank's BSS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})	Serva, Heidelberg
Trypsin-Versene 'Mixture' (0.05% Trypsin und 0.02% EDTA in Hank's BSS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})	Serva, Heidelberg
Tunicamycin	Fluka, Neu-Ulm

Bis auf *N*-Acetylmethionin (NAM) und *N*-Acetylleucin (NAL, Bachem, Heidelberg) waren alle in der Zellkultur eingesetzten Chemikalien vom Hersteller als 'cell culture tested' ausgewiesen.

HPLC-Analytik:

9-Anthryldiazomethan, research grade	Serva, Heidelberg
Aminosäurestandard	Sigma, München
<i>N</i> -Acetyl-Aminosäuren	Bachem, Heidelberg
Phenylisothiocyanat (PITC)	Sigma, München

Lösungsmittel 'für die Flüssigkeitschromatographie' wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

2.4 Kits

Qiagen Plasmid-Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep-spin Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg

2.5 Viren, Plasmide und Oligonukleotide

Rekombinante Baculovirus-Stocks zur Expression der hkAcy1 (Lindner, 1996) und der pkAcy1 (Pittelkow, 1996) mit dem BEVS standen im Labor zur Verfügung.

Das dem Ersten zugrundeliegende Baculotransfervektor-Konstrukt pVL1393-hkAcy1 (s. Abb. 2-1) wurde zur ortsspezifischen Mutagenese und der anschließenden Erzeugung rekombinanter Baculoviren eingesetzt (s. 3.1).

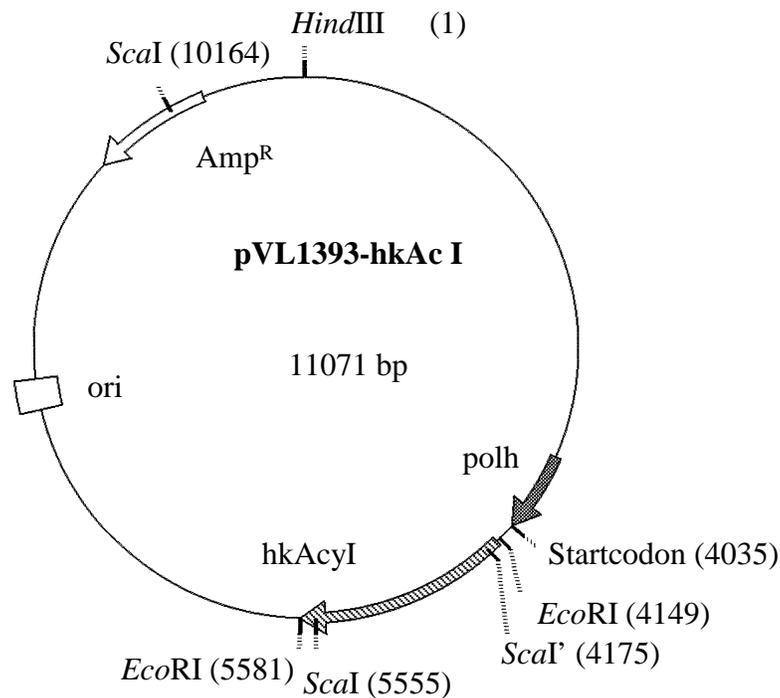


Abb. 2-1 Plasmidkarte des Baculotransfervektor-Konstrukts pVL1393-hkAcy1. Die cDNA der hkAcy1 wurde in die *EcoRI* site (4149) der MCS kloniert. Amp^R: β -Laktamasegen; ori: origin of replication; polh: Polyhedrinpromotor (Lindner, 1996)

Folgende Oligonukleotide für die Mutagenese wurden von Herrn Dr. M. Krause (Oligonukleotid-Syntheselabor, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung) synthetisiert:

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
PWW1sens	GAGCGGAGTCCCGCGGGCGGTGCGGGTTACCAGC
PWW1anti	GCTGGTAACCCGCACCCGCCGCGGGACTCCGCTC
PWW2sens	CCTACTGATGACTCAAACCCTGCGGGCGGCAGCTTTTAGCCGGG
PWW2anti	CCCGGCTAAAAGCTGCCGCCGCAGGGTTTGAGTCATCAGTAGG

Der folgende Sequenzierprimer wurde durch die Firma TOPLAB (München) synthetisiert:

hkAcy-seq TAGCCAATCCCCTGATGCC

2.6 Zellen und Gewebe

Bakterienstämme:

<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene, Heidelberg
Epicurian Coli [®] XL1-Blue supercompetent cells	Stratagene, Heidelberg

Insektenzelllinie:

SF21 (Ovar, <i>Spodoptera frugiperda</i>)	Deutsche Sammlung für Mikrobiologie, GBF, Braunschweig
--	--

Säugerzelllinien:

NRK-49F (Fibroblasten, Rattenniere), MDCK I und MDCK II (Sammelrohr, Hundeniere)	zur Verfügung gestellt durch: Prof. Dr. G. Herler, Marburg
LLC-PK ₁ (proximaler Tubulus, Schweineniere)	Prof. Dr. F. Fahrenholz, Frankfurt/M.

Die Schweinenieren wurden direkt nach der Schlachtung am Schlachthof Marburg/Wehrda entnommen.

2.7 Puffer

EBSS, glukosefrei:	1.8 mM CaCl ₂ , 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO ₄ , 116 mM NaCl, 26 mM NaHCO ₃ , 1 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7.4, sterilfiltriert
PBS ⁺⁺ :	150 mM NaCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ , 1 mM MgCl ₂ , 1.2 mM CaCl ₂ , pH 7.4, sterilfiltriert
PBS:	wie PBS ⁺⁺ , ohne MgCl ₂ und CaCl ₂ , autoklaviert
TAE:	40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA
TE:	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, autoklaviert
Isolationsmedium:	250 mM Saccharose und 0.1 mM EDTA in KP ₅₀ 7.4

2.8 Nährmedien

Alle Lösungen wurden, wenn nicht schon steril geliefert oder anders angegeben, sterilfiltriert.

Bakterienkultur:

LB-Medium: 25 g/l Luria-Broth Base (Gibco BRL, Karlsruhe), pH 7.2, autoklaviert

LBA-Medium: LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin

LBA-Platten: LB-Medium mit 15 g/l Agar Agar, autoklaviert, Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin

2xYT-Medium: 16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7.0, autoklaviert

Insektenzellkultur:

SF 900-Medium Pulver (Gibco BRL, Karlsruhe) wurde gemäß den Angaben des Herstellers gelöst. FCS wurde 30 min bei 57 °C inaktiviert. Vor Gebrauch wurde das Medium zu 10% mit FCS, mit 1/100 Volumen 10% Pluronic F68 und 1/10 000 Volumen Gentamycin versetzt.

Säugerzellkultur:

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit GlutaMAXTM I (Glycyl-glutamin) und 0.1% D-Glukose Gibco BRL, Karlsruhe

DMEM mit GlutaMAXTM I und 0.45% D-Glukose Gibco BRL, Karlsruhe

DMEM mit L-Glutamin und ohne Glukose Gibco BRL, Karlsruhe

DMEM Basalmedium ohne L-Arginin, L-Cystin, Glukose, i-Inositol, L-Leucin, L-Methionin und Natriumphosphat Gibco BRL, Karlsruhe

100X Supplemente für DMEM Gibco BRL, Karlsruhe

Minimum Essential Medium (MEM) mit Earle's Salzen, 25 mM HEPES und GlutaMAXTM I Gibco BRL, Karlsruhe

Alle DMEM-Medien enthielten 15 mg/l und alle MEM-Medien 10 mg/l Phenolrot. Gegebenenfalls wurden vor Gebrauch FCS und Antibiotika zugesetzt. L-Lysin, L-Isoleucin, *N*-Acetylmethionin (NAM) und *N*-Acetylleucin (NAL) wurde als 100X Supplement (pH 7.4) in PBS angesetzt. Albumin und Insulin wurden als Stammlösung (0.1 g/l und 1mg/ml) in DMEM mit GlutaMAXTM I und 0.1% D-Glukose (pH 7.4) angesetzt.

3 Methoden

Alle Arbeitsschritte ohne Temperaturangaben wurden bei Umgebungstemperatur durchgeführt. Die Geschwindigkeitsangabe rpm bezieht sich auf das Zentrifugieren von Eppendorf-Reaktionsgefäßen in Tischzentrifugen dieses Typs.

Alle Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen wurden gemäß dem Gentechnikgesetz (GenTG) vom 20.05.1990 durchgeführt und fielen unter die Sicherheitsstufe S1. Dabei anfallende, kontaminierte Materialien wurden getrennt gesammelt und hitzesterilisiert.

3.1 Expression der Acylase 1 mit dem Baculovirus-Expressions-Vektor-System (BEVS, Gruenwald *et al.*, 1993)

Die Expression der Schweineacylase 1 (pkAcy1) in *E. coli* hatte sich als ungeeignet erwiesen (Pittelkow, 1996). Daher wurde die WT-Acyase 1 von Mensch und Schwein sowie Mutanten des humanen Enzyms in Insektenzellen mit Hilfe des Baculovirus-Expressions-Vektor-Systems (BEVS) exprimiert. Im Labor stand zur Expression der pkAcy1 ein Virusstock zur Verfügung (s. 2.5, Pittelkow, 1996).

3.1.1 Das Baculovirus-Expressions-Vektor-System (BEVS) im Überblick (O'Reilly *et al.*, 1992; King und Possee, 1992; Richardson, 1995)

3.1.1.1 Der Lebenszyklus des Baculovirus

Die 'Nuclear polyhedrosis viruses' (NPV) bilden einen Stamm innerhalb der Familie der arthropodenspezifischen Baculoviren. Mit bestimmten Pocken- und Reoviren gehören sie zu einer Gruppe von Insektenpathogenen, welche unabhängig voneinander die Bildung von Einschlusspartikeln ('Occluded particles') als umweltresistente Dauerform entwickelt haben (Bissard *et al.* 1990). Schmetterlingslarven (Lepidoptera) nehmen die viralen Occlusionen von kontaminierten Blättern auf (s. Abb. 3-1). Im alkalischen Milieu ihres Mitteldarms lösen sich diese Partikel auf und verursachen die

Primärinfektion. In der frühen Virusreplikationsphase (6 h.p.i.) kommt es zur Produktion von extrazellulären Viren ('Budded virus particles') durch Knospung von der basolateralen Membran der Darmepithelzellen. Diese sorgen dann für eine systemische Infektion. In der späten Phase (20 h.p.i.) der Virusreplikation wird unter der Kontrolle eines sehr potenten Transkriptionspromotors das 29 kDa große Protein Polyhedrin synthetisiert, welches durch Bildung einer homogenen Matrix im Zellkern Virionen in großer Zahl einschließt. Die dabei entstehenden Einschlusspartikel werden erst nach dem Tod des Tieres frei und sorgen für die horizontale Transmission.

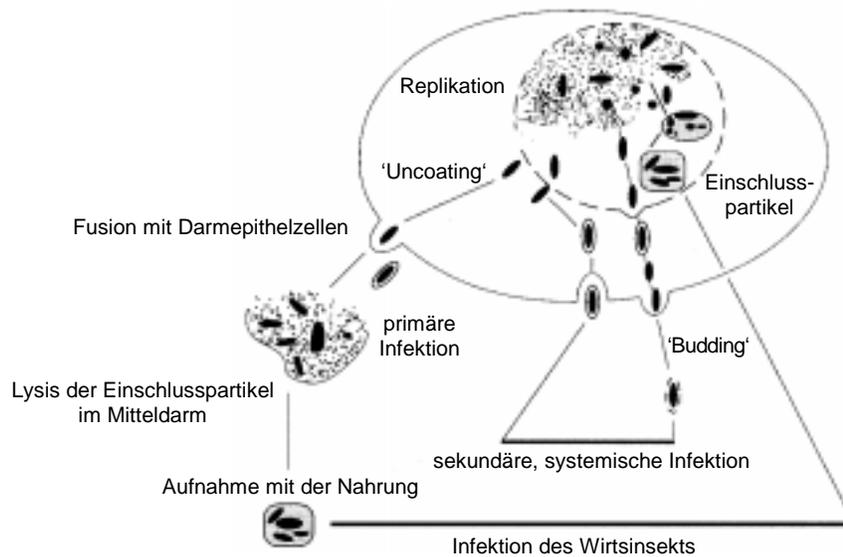


Abb. 3-1 Der Lebenszyklus des Baculovirus. Die Viren existieren in zwei Formen: einer einfachen 'budded' Form im Wirtsinsekt und einer 'occluded', proteinumschlossenen und damit umweltresistenten Dauerform, weitere Erläuterungen siehe Text; nach Ausubel *et al.* (1997).

In Zellkultur sind die Einschlusspartikel im Gegensatz zur extrazellulären Form des Virus nicht infektiös. Das Polyhedrin ist zur Bildung der infektiösen 'Budded virus particles' nicht essenziell. Stattdessen werden unter Kontrolle seines Promotors auch Fremdproteine sehr effizient produziert.

3.1.1.2 Das Expressions-System

Das Baculovirus-Expressions-Vektor-System (BEVS) wurde in den Laboratorien von Summers und Miller entwickelt (Summers und Smith, 1987; Smith *et al.*, 1983; Miller, 1981). Die wirtseigene Proteinproduktion wird zugunsten der viralen gestoppt, so dass das Produkt 50% der Proteinmasse ausmachen kann. Darüberhinaus sind die Eigenschaften der heterolog exprimierten Proteine meist mit denen der Originale

identische (Sridhar *et al.*, 1994). Die Insektenzellen sind in der Lage, die Proteine korrekt zu prozessieren (proteolytische Spaltung), zu modifizieren (Phosphorylierung, Acylierung), zu assemblieren (Oligomerisierung) und zu lokalisieren (Miamato *et al.*, 1985; O'Reilly und Miller, 1988; Klenk, 1996). Die Glycosylierung weicht jedoch von der in Vertebratenzellen ab. Zwar wurden *N*- und *O*-Glykosylierung nachgewiesen, doch werden kaum komplexe *N*-Glykane gebildet (Klenk, 1996), sondern vorwiegend Zuckerstrukturen vom high-Mannose-Typ (Kuroda *et al.*, 1990).

Das oder die zu exprimierenden Gene können nicht direkt vor einen Viruspromotor (z.B. den Polyhedrin- oder p10-Promotor) kloniert werden, sondern gelangen durch *in vitro*-Rekombination bei der Virusreplikation an diese Stelle. Hierzu werden die Zellen mit Virus-DNA und einem Baculotransfervektor mit den klonierten Genen co-transfiziert. Flankierende Sequenzen markieren die Orte der doppelt homologen Rekombination für die zu exprimierenden Sequenzen z.B. im Polyhedrin- oder p10-Locus. Die Rekombinationsrate beträgt jedoch nur 0.1-1%. Zur Selektionierung der rekombinanten Viren wird daher statt der Wildtypvirus-DNA meist ein modifiziertes Virusgenom zur Co-Transfektion eingesetzt. Dieses enthält eine letale Deletion, die bei der Rekombination mit dem Transfervektor komplementiert wird (Kitts *et al.*, 1993). Der Anteil der rekombinanten Viren nach der Co-Transfektion steigt so auf über 95%, denn nur diese sind lebensfähig. Eine entsprechend manipulierte Form des Genoms von 'Autographa californica nuclear polyhedrosis virus' (AcNPV) wird standardmäßig eingesetzt. Diese DNA ist heute mit einer Vielzahl von Transfervektoren für multiple Expression, spezielles 'Protein targeting' und andere Anwendungen kommerziell erhältlich.

Das rekombinante Virus aus dem Mediumüberstand co-transfizierter Zellen wird durch mehrfache Infektionszyklen amplifiziert. Zur Isolierung eines monoklonalen Inokulums oder zur Titerbestimmung einer Virusstock-Lösung werden Plaquetests (Hink und Vail, 1973) vorgenommen. Die Baculoviren sind extrem lichtempfindlich und müssen daher dunkel gelagert werden (Jarvis und Garcia, 1994).

Neben der Anwendung in der Proteinexpression besteht ein großes Interesse an Baculoviren bei der Entwicklung von biologischen Pestiziden (Yearian und Young, 1982; Bishop, 1989).

3.1.2 Molekularbiologie

Mit den Kits gelieferte Lösungen waren in den beiliegenden Protokollen mit den Rezepten aufgeführt. Wo nicht anders vermerkt, wurde auf die Protokolle von Sambrook *et al.* (1982) zurückgegriffen.

Zur Erzeugung von Mutanten der humanen Acylase 1 (hkAcy1) wurde die QuikChange Site-Directed Mutagenesis Methode (Stratagene) direkt auf Miniprep-DNA des Baculotransfervektor-Konstrukts pVL1393-hkAcy1 angewandt. Dieses Plasmid enthielt alle für die Vermehrung in einem *E.coli*-Wirtsstamm nötigen Merkmale (s. Abb. 2-1).

3.1.2.1 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

Zur langfristigen Lagerung wurden 600 µl einer Bakterien-Kultur in der stationären Wachstumsphase mit 400 µl 87%igem Glycerin gemischt und bei -80 °C aufbewahrt.

Zum Anziehen von *E. coli*-Stämmen wurden 3 ml LB-Medium mit 50 µl einer stationären Kultur oder eines Glycerinstocks angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Mit Plasmid transformierte Zellen wurden zur Selektion in LBA-Medium kultiviert. Mit einer Übernachtskultur konnte eine Flüssigkeitskultur von 100-200 ml angeimpft oder eine Plasmid-Minipräparation vorgenommen werden (s. 3.1.2.3).

3.1.2.2 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen (Hanahan, 1985)

Transformationspuffer 1 (TFB 1): 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM KAc, 10 mM CaCl₂, 5% Glycerin, pH 5.8 (Essigsäure)

Transformationspuffer 2 (TFB 2): 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% Glycerin, pH 7.0, beide sterilfiltriert und eisgekühlt

100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer Bakterien-Übernachtskultur (*E. coli* XL1-Blue) angeimpft. Bei einer OD₅₅₀ von 0.5 wurden die Zellen bei 4 °C / 3000 x g 10 min pelletiert, in 15 ml TFB1 resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Darauf wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, in 2 ml TFB2 aufgenommen und sofort zur Transformation eingesetzt oder bei -80 °C gelagert und vor Gebrauch auf Eis aufgetaut.

Das Plasmid pVL1393-hkAcy1 lag in TE mit einer Konzentration von 100 ng DNA pro µl vor. Die Lösung wurde zu einem auf Eis aufgetauten 150 µl-Aliquot kompetenter

Zellen gegeben. Nach 30 min auf Eis erfolgte für 90 s ein Hitzeschock bei 42 °C. Darauf wurde der Ansatz mit 800 µl LB-Medium versetzt und 30 min bei 37 °C im Schüttler vorinkubiert. Dann wurde das Volumen komplett mit einem Drigalskispatel auf einer LBA-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit sterilen Zahnstochern wurden Einzellklone von der Platte gepickt. Mit diesen wurden zur Plasmid-DNA-Präparation 3 ml Übernachtskulturen angeimpft.

3.1.2.3 Plasmid-DNA-Präparation und dsDNA-Bestimmung

Die Minipräparation von Plasmid-DNA (1-5 µg) aus 3 ml Übernachtskulturen wurde gemäß den Angaben des Herstellers mit dem QIAprep-spin Plasmid Kit durchgeführt. Für die Präparation von Plasmid-DNA (bis zu 100 µg) aus einer 100 ml Übernachtskultur für die Co-Transfektion (s. 3.1.3.2) wurde das Qiagen Plasmid-Midi Kit eingesetzt.

Zur dsDNA-Bestimmung nach der Präparation wurde die Extinktion der verdünnten DNA-Lösung bei 260 nm gegen den gleichen Puffer gemessen. Eine OD von 1 entsprach einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Ferner wurde zur Kontrolle der Präparation eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

3.1.2.4 Agarose-Horizontal-Gelelektrophorese

Gellösung:	1% Agarose in TAE, 0.01% Ethidiumbromid
6x Auftragepuffer:	0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylencyanol, 30% Glycerin
Elektrophoresepuffer:	TAE

Die Gellösung wurde gekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Erst nach Abkühlung auf etwa 50 °C wurde die entsprechende Menge Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben. Nach dem Erstarren des Gels in der Elektrophoresekammer wurde es mit TAE überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen Auftragepuffer versetzt und bei einer Spannung von 8 V/cm etwa 1 h lang aufgetrennt. Anhand eines mitgeführten Größenmarkers (λ -DNA *EcoRI/HindIII*, Sigma) konnten Größe und Menge der DNA-Banden bei Betrachtung auf einem UV-Transluminator (254 nm) abgeschätzt werden.

3.1.2.5 Aufbereitung von Oligonukleotiden

Die Mutagenese-Oligonukleotide PWW1sens, PWW1anti, PWW2sens und PWW2anti (s. 2.5) lagen nach der Synthese in ammoniakalischer Lösung vor. Sie wurden in der Speed Vac zur Trockne eingengt, in 200 µl a. bidest. aufgenommen und mit Ethanol gefällt (s. 3.1.2.6). Das DNA-Pellet wurde in 40 µl a. bidest. aufgenommen und die DNA-Konzentration nach folgender Formel bestimmt:

$$\mu\text{g DNA} = E_{260} \cdot 33 \cdot \text{Gesamt volumen (ml)} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.1.2.6 DNA-Fällung

Die DNA-Lösung wurde mit dem zweieinhalbfachen Volumen an 0.6 M LiCl in Ethanol versetzt, 30 min bei -20 °C inkubiert und 30 min bei 4 °C / 13 000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 100 µl 80% Ethanol gewaschen, 15 min wie oben zentrifugiert und bei 37 °C luftgetrocknet.

3.1.2.7 Ortsspezifische Mutagenese

Die Mutagenese wurde mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) gemäß dem beiliegenden Protokoll durchgeführt.

Das Plasmid mit dem Wildtyp-Gen (pVL1393-hkAcy1) wurde mit einem untereinander und zur Zielsequenz komplementären Primerpaar, welches die Mutation trug, in einer PCR eingesetzt. Auf die im Protokoll empfohlene Reinigung der Oligonukleotide wurde verzichtet.

Folgende Mutanten der hkAcy1 sollten erzeugt werden:

WW193,194AA,	im Folgenden	PWW1 abgekürzt, und
WW332,333AA,	kurz	PWW2 und eine Kombination beider,
		PWW1/2.

Für eine Mutagenese wurden unterschiedliche Mengen (5-50 ng) des Baculotransfervektors pVL1393-hkAcy1 mit je 125 ng der einzelnen Mutagenese-Oligonukleotide des Paares PWW1sens und PWW1anti sowie des Paares PWW2sens und PWW2anti (s. 2.5) eingesetzt. Die Amplifizierung erfolgte im Reaktionspuffer mit dNTPs und *Pfu*-DNA-Polymerase nach folgenden Zyklus-Bedingungen:

Denaturierung:	95 °C, 30 s
Hybridisierung:	55 °C, 1 min
Elongation:	68 °C, 22 min
Zykluszahl:	18

Aufgrund ihrer *dam*-Methylierung konnte anschließend parentalstranghaltige DNA mit der Endonuklease *Dpn* I (Zielsequenz: 5'-G^{m6}ATC-3' sowohl in methylierter als auch in hemimethylierter DNA) abgebaut werden. Mit dem übrigen, 'Nicks'-enthaltenden, aber mutierten Plasmid wurden 'Epicurian Coli[®] XL1-Blue supercompetent cells' transformiert. Diese Zellen konnten die 'Nicks' reparieren. Nach der Transformation wurde der Ansatz mit 500 µl auf 42 °C temperiertem 2xYT-Medium (vergl. 3.1.2.2) versetzt und 1h bei 37 °C geschüttelt. Darauf wurde der gesamte Ansatz auf LBA-Platten ausplattiert. Pro Mutagenese wurden vier Klone gepickt, 3 ml Übernachtskulturen angeimpft und Plasmid-Minipräparationen (s. 3.1.2.3) durchgeführt.

Mit der Sequenzierung der Plasmide zur Erfolgskontrolle der Mutagenese wurde die Firma TOPLAB (München) beauftragt. Die PWW1/2 Mutante wurde durch die Mutagenese des Klons mit der PWW1-Mutation und dem Primerpaar PWW2sens und PWW2anti wie beschrieben hergestellt.

Mit je einem positiven Klon wurde letztendlich eine 100 ml Übernachtskultur (s. 3.1.2.1) angeimpft, und mit dem Qiagen Plasmid-Midi Kit der Baculotransfervektor für eine Co-Transfektion präpariert (s. 3.1.2.3).

3.1.3 Insektenzellkultur

3.1.3.1 Kultivierung von SF21-Zellen

Die Zellen wurden bei 27 °C in SF 900-Medium mit FCS und Gentamycin inkubiert. Für alle Kultivierungsarbeiten wurde sterile Einmalware verwendet. Alle Zentrifugationen mit den Zellen erfolgten bei 1000 x g für 10 min.

Konfluente Monolayer-Kulturen in 25 cm²/75 cm²-Kulturflaschen mit einem Medium-Volumen von 4 ml/10 ml Kultur wurden alle 3d 1:10 subkultiviert: Der Zellrasen wurde mit einem 'Cell Scraper' gelöst, die Zellen im gleichen Medium resuspendiert, und 1/8 Volumen wurde in einer frischen Flasche ausgesät. Die Zellen waren innerhalb 1 h nach Aussaat adhärent.

Zur Vermehrung in Rührerkulturen (50-200 ml Kulturvolumen in Erlenmeyerkolben mit Rührfisch) mit 50-75 Upm wurden die Zellen bei einer Dichte von $0.8 \cdot 10^6$ Zellen/ml ausgesät und zweimal wöchentlich passagiert.

Zur Kryo-Konservierung wurden SF21 Zellen zu einer Dichte von $1 \cdot 10^7$ /ml in 90% FCS und 10% DMSO resuspendiert. 1 ml Aliquots wurden in Kryo-Röhrchen 1 h bei -20 °C und über Nacht bei -80 °C eingefroren, bevor sie in Flüssigstickstoff überführt wurden.

Zur erneuten Kultivierung wurde ein Aliquot rasch bei 27 °C aufgetaut und mit 10 ml SF 900 Medium mit FCS abzentrifugiert. Die Zellen wurden wie oben beschrieben auf eine 75 cm²-Kulturflaschen gegeben. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. Die Zellzahl wurde mit der Thoma-Zählkammer bestimmt.

3.1.3.2 Co-Transfektion

In einer 8.7 cm²-Petrischale wurden $1.4 \cdot 10^6$ Zellen in serumhaltigen Medium ausgesät und 1 h inkubiert. 0.5 µg BaculoGold DNA plus 3.5 µg Plasmid-DNA des Transfervektors und 30 µL Lipofectin wurden in einem 15 ml Röhrchen (kein Eppendorf Reaktionsgefäß) mit serumfreien Medium auf 100 µl aufgefüllt und 15 min inkubiert. Das Medium wurde von den Zellen entfernt und durch 2.5 ml serumfreies Medium ersetzt. Die Liposomen-Lösung mit der BaculoGold DNA und der Transfervektor-DNA wurde zugeträufelt. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und 2.5 ml serumhaltiges Medium zugegeben. Nach weiteren 5 d wurde durch Zentrifugation der Transfektionsüberstand gewonnen.

Alle nachfolgenden Infektionsüberstände wurden beginnend mit 1 durchnummeriert und wie der Transfektionsüberstand bei 4 °C gelagert. 1 ml-Aliquots der Überstände wurden bei -80 °C gelagert.

3.1.3.3 Plaquetest (Lee und Miller, 1978)

Alle Plaquetests wurden als Doppelbestimmung angesetzt.

Stechen eines Plaques

Um den Erfolg der Co-Transfektion zu überprüfen und einen einzelnen, rekombinanten Virusklon zu erhalten, wurde mit dem Transfektionsüberstand ein Plaquetest angesetzt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Rekombinationsrate nahezu 100% betrug

(Angabe von Pharmingen) und somit auf einen Selektionsmarker verzichtet werden konnte.

Top-Agar: Frisch autoklavierte 3% Baculovirus Agarose sowie ein Volumen serumhaltiges Medium wurden im Wasserbad bei 50 °C bereitgehalten und zum Überschichten miteinander gemischt.

Färbelösung: 0.04% Neutralrot

Je $1 \cdot 10^6$ Zellen in serumhaltigem Medium wurden in 8.7 cm²-Petrischalen ausgesät. Nach 1 h wurden 100 µl pro Schale des in serumfreien Medium 10^{-5} - 10^{-9} fach verdünnten Transfektionsüberstandes zugeträufelt. Serumfreies Medium diente als Negativkontrolle. Nach einstündiger Inokulation im Inkubator wurde der Überstand verworfen, und die Zellen wurden mit 1 ml Top-Agar pro Schale überschichtet.

Nach Erstarren der Agarose wurde jede Schale mit 1 ml serumhaltigem Medium überschichtet und 5 d inkubiert. Zum Sichtbarmachen der Plaques wurde das Medium abgenommen und für 1 h mit Färbelösung überschichtet. Nach Inkubation über Nacht wurden mit sterilen Pasteurpipetten pro Co-Transfektion vier Plaques (Virusklone) gestochen, und die Gelstücke in je 1 ml serumfreies Medium gebracht. Bei 4 °C über Nacht diffundierten die Viren aus dem Gel. Die Lösung wurde zur Virusvermehrung (s. 3.1.3.4) eingesetzt.

Titerbestimmung

Nach der Virusvermehrung (s. 3.1.3.4) wurde zur Titerbestimmung ein Plaquetest durchgeführt, der weitgehend wie oben beschrieben aufgebaut war. In 21 cm²-Petrischalen wurden je $4 \cdot 10^6$ Zellen in serumhaltigem Medium ausgesät. Nach 1 h wurde das Medium bis auf 2 ml abgenommen und mit je 1 ml Virus-Verdünnung eine weitere Stunde inokuliert. Das Inokulum wurde verworfen, die Zellen mit 4 ml Top-Agar und 2 ml serumhaltigem Medium überschichtet, 5 d wie oben inkubiert und anschließend gefärbt.

Durch Auszählen der Plaques wurde der Virustiter in Plaque forming units (PFU) pro ml bestimmt.

$$\text{Titer (PFU/ml)} = \text{Plaquezahl} \cdot \text{Verdünnung}^{-1} \cdot \text{Volumen des Inokulums}^{-1}$$

3.1.3.4 Virusvermehrung

Zur Amplifizierung eines Virusklons aus einem Plaque wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen in einer 8.7 cm^2 -Petrischale mit dem 1 ml der Lösung des gestochenen Plaques (s. 3.1.3.3) infiziert. 1 h später wurde der Überstand gegen 2 ml serumfreies Medium ausgetauscht und 7 d inkubiert. Der erste Infektionüberstand wurde erneut komplett zur Infektion von je $8 \cdot 10^6$ Zellen in 25 cm^2 -Flaschen verwandt. Wie oben wurde das Medium ersetzt und der Gesamtansatz nach 7 d durch Zentrifugation in Zellen und zweiten Infektionsüberstand getrennt.

Von nun an war in Ganzzellextrakten der geernteten Zellen Enzymaktivität nachweisbar, und das überexprimierte Protein auch im SDS-PAGE sichtbar. Pro Mutante wurden drei von vier Überständen eingefroren und nur einer weiteramplifiziert. Der nächste Vermehrungsschritt erfolgte in einer Rührerkultur. Mit 1.3 ml des zweiten Infektionsüberstandes wurden $200 \cdot 10^6$ Zellen in 100 ml serumfreiem Medium infiziert. Am neunten Tag wurde der dritte Überstand zur Titerbestimmung (s. 3.1.3.3) eingesetzt. Der Titer betrug je etwa $12 \cdot 10^6$ PFU/ml. Dieser Überstand wurde zu allen weiteren Infektionen verwandt.

3.1.3.5 Expressionskultur

Um den optimalen Zeitpunkt zur Zellernte für die Enzymreinigung zu ermitteln, wurde die spezifische Enzymaktivität in Ganzzellextrakten nach der Infektion 6 d lang verfolgt.

Waschpuffer: PBS, eisgekühlt

$200 \cdot 10^6$ Zellen in 90 ml serumfreiem Medium wurde mit einer 'Multiplicity of Infection' (MOI) von 0.6 infiziert. Die MOI gibt die PFU pro Zelle in der Kultur an. Alle 24 h wurden 4 ml entnommen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml PBS gewaschen, wieder abzentrifugiert und bis zum zum Aufschluss (s. 3.1.4.3) bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Die Expressionskultur wurde entsprechend angesetzt. Nach der Ernte wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und sofort aufgeschlossen (s. 3.1.4.3).

Die pkAcy1 wurde entsprechend exprimiert.

3.1.4 Proteinchemie

3.1.4.1 Proteinbestimmung (Bradford, 1976)

Der Test wurde als Vierfachbestimmung auf der 96-Well-Mikrotiterplatte durchgeführt. Als Proteinstandard diente BSA.

Bradford A: 100 mg Coomassie Blue G-250, 50 ml Ethanol, 100 ml 85% H_3PO_4

Bradford B: 3 ml Bradford A ad 20 ml

Bradford A wurde bei 4°C gelagert und Bradford B frisch angesetzt. 10 μl Probe (maximal 150 $\mu\text{g/ml}$) wurden mit 200 μl Bradford B versetzt. Nach 25 min bei RT wurde die E_{595} bestimmt.

3.1.4.2 Bestimmung der Acylase 1-Aktivität mit dem TNBS-Test (Weiß, 1994)

Der diskontinuierliche Test wurde mit der Acht-Kanal-Pipette als Vierfachbestimmung auf Mikrotiterplatten durchgeführt.

Substratpuffer: 30 mM Natriumacetat, 30 mM H_3BO_3 , 30 mM NaH_2PO_4 , pH 7.0

Stopplösung: 0.2 M Trichloressigsäure

100 μl Substratlösung (*N*-Acylaminosäure in Substratpuffer, pH 7.0) wurden zum Reaktionsstart auf die vorgelegte Probe (10-20 μl) gegeben. Eine 20 mM *N*-Acetyl-Methionin (NAM)-Lösung diente als Standardsubstrat. Nach wenigen Sekunden bis zu einer Stunde wurde der Reaktionsansatz mit 50 μl Stopplösung versetzt.

Nachweis freier Aminogruppen (Okuyama und Satake 1960; Satake *et al.* 1960)

Nach der eigentlichen Enzymreaktion wurden in der zweiten Reaktion die NH_2 -Gruppen der freien Aminosäuren nachgewiesen.

Boratlösung: 2.5 g di-Natiumtetraborat-Decahydrat ad 65 ml, pH 9.7 (NaOH)

TNBS-Lösung: 0.2%

Durch Zugabe von 100 μl Boratlösung wurde der Ansatz alkalisiert, und mit 20 μl TNBS-Lösung entwickelt. Das Entstehen der Trinitrophenyl-Aminogruppen wurde bei 405 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät mit Hilfe der Steuerungssoftware des Herstellers über 30 min aufgezeichnet. Die Daten wurden unter dem Dateiformat *.col gesichert und mit Hilfe des Programms Sigma Plot 2.01 ausgewertet.

Quantifizierbarer Aktivitätstest

Spezifische Aktivitäten in Units wurden bei einer Substratkonzentration von 20 mM NAM im Ansatz bestimmt. Als ein Unit (U) war die Enzymmenge definiert, welche 1 μ mol NAM pro Minute hydrolysiert. Zur Erstellung von Eichkurven wurden an Stelle des Substrats Aminosäurestandards (0.25-4 mM) eingesetzt.

3.1.4.3 Enzymreinigung von hkAcy1 und pkAcy1 aus SF21-Zellen (Pittelkow *et al.*, 1998)

Alle Schritte erfolgten bei 4 °C.

Die Zellen aus einer 100 ml Expressionskultur (s. 3.1.3.5) wurden in 15 ml KP₅₀7.0 resuspendiert, mit dem Ultraschall-Desintegrator aufgeschlossen und bei 20 000 x g 45 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde direkt über Phenylsepharose CL-4B[®] chromatographiert.

Säulenkörpermaße:	3 · 30 cm
Puffer A:	KP ₅₀ 7.0
Puffer B:	70% Ethylenglycol in KP ₂₀₀ 7.0
Gradient:	100 min 100% Puffer A mit 1 ml/min Flussgeschwindigkeit, 800 min linearer Gradient auf 100% Puffer B mit 0.3 ml/min
Fraktionsgröße:	10 min

Die aktivsten Fraktionen wurden gepoolt (ca. 50 ml) und über Q-Sepharose Fast Flow[®] chromatographiert. Die Acylase 1 passierte die mit KP₅₀7.0 äquilibrierte Q-Sepharose Fast Flow, welche anschließend mit einer 500 mM KCl-Lösung in KP₅₀7.0 regeneriert wurde. Das gereinigte Enzym wurde bei -80 °C gelagert.

3.1.4.4 SDS-PAGE-Vertikal-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Probenpuffer:	0.1 M Tris/HCl, 2% SDS, 3% β -Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 0.01% Bromphenolblau
Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris/HCl, 190 mM Glycin, 3.5 mM SDS
Trenngel:	1 ml 87% Glycerin, 1 ml 1% SDS, 1.45 ml a. bidest, 2.5 ml 1.5 M Tris/HCl, pH 8.0, 4 ml 30% Acrylamid / 0.8% Bisacrylamid, 50 μ l 10% APS, Polymerisationsstart durch 25 μ L TEMED

Sammelgel:	0.5 ml 1% SDS, 2.6 ml a. bidest., 1.25 ml 0.5 M Tris/HCl, pH 6.8, 0.65 ml 30% Acrylamid / 0.8% Bisacrylamid, 25 µl 10 % APS Polymerisationsstart durch 10 µl TEMED
Gelmaße:	1 · 145 · 85 mm
Elektrophorese- spannung	20-200 V

7-8 ml Trenngel wurden mit 3.5-4.5 ml Sammelgel überschichtet. Beide Gele waren nach 40 min auspolymerisiert. In das untere Pufferreservoir wurde vor und in das obere nach dem Zusammenbau der Elektrophorese-Apparatur Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Probe wurde in 1/6 Volumen Probenpuffer aufgenommen, 3 min gekocht und aufgetragen. Der Lauf war beendet, sobald die Bromphenolblaufront das Gelende erreicht hatte. Als Molekulargewichts-Marker wurde Dalton Mark VII-L (Sigma) eingesetzt.

Coomassie-Färbung

Färbelösung:	40% Methanol, 10% Essigsäure, 0.1% Coomassie Blue R-250
Entfärbelösung :	5% Ethanol, 7% Essigsäure

Das Gel wurde 15 min bei 50 °C gefärbt und mit etwas Schaumstoff in der Entfärbelösung entfärbt. Beide Lösungen wurden recycelt, wozu Zweitere über Aktivkohle filtriert wurde.

Silberfärbung

Fixierlösung (frisch):	30% Ethanol, 10% Essigsäure
Thiosulfatpuffer:	0.1 M NaAcetat, 30% Ethanol, pH 6.0, vor Gebrauch Zusatz von 1 mg/ml Na ₂ S ₂ O ₃
Silbernitratlösung:	0.1% AgNO ₃ , 10 min vor Gebrauch Zusatz von 25 µl Formaldehydlösung
Entwickler:	2.5% Na ₂ CO ₃ , 10 min vor Gebrauch Zusatz von 25 µl Formaldehydlösung

Das Gel wurde zweimal 15 min fixiert und anschließend 30 min in Thiosulfatpuffer inkubiert. Dann wurde dreimal 10 min mit a. bidest. und einmal 25 min mit Silbernitratlösung gespült. Vor dem Entwickeln wurde das Gel kurz in a. bidest. gespült und dann unter Sichtkontrolle entwickelt. Die Reaktion wurde mit 1 ml Eisessig gestoppt.

3.2 Zellfraktionierung

Zur Untersuchung einer möglichen Membranassoziation und der subzellulären Verteilung der Nierenacylase 1 wurden subzelluläre Fraktionen der Nierenrinde des Schweins hergestellt.

3.2.1 Mikrosomenpräparation aus Schweinenieren-Rinde

Alle Schritte erfolgten bei 4 °C. Aliquots von jeder Fraktionierungsstufe wurden bei -80 °C gelagert.

60 g Cortex wurden zweimal durch den Fleischwolf gedreht, mit 60 ml Isolationsmedium versetzt, über ein Sieb (Maschenweite 1.5 mm) gegeben und mit einem Potter (200 ml, Teflonstempel) homogenisiert. Das Homogenat wurde einer Differentialzentrifugation unterworfen: 10 min bei 1000 x g, 20 min 10 000 x g und 45 min 105 000 x g. Jedes Pellet wurde einmal mit Isolationsmedium gewaschen und die Überstände zur nächsten Zentrifugation vereinigt. Das letzte Pellet wurde in 35 ml Isolationsmedium aufgenommen und in 1 ml Aliquots 30 min bei 10 000 x g zentrifugiert, um dunkelerscheinendes Material zu entfernen. Der pinkfarbene Überstand mit einer Proteinkonzentration von etwa 3 mg/ml wurde als die mikrosomale Fraktion betrachtet und in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2.2 Enzymsolubilisierung

Peripher und unspezifisch an den mikrosomalen Membranvesikeln haftende Proteine sollten durch Behandlung mit nichtionischen Detergenzien solubilisiert werden. 300 µl der mikrosomalen Fraktion wurden mit bis zu 2.3 mM Natrium-Deoxycholat, 0.5% Triton X-100 und 20 mM CHAPS versetzt und 5 min heftig geschüttelt. 130 µl Aliquots wurden in Microfuge-Tubes überführt. Die Membranen wurden 10 min bei 100 000 x g in der Airfuge sedimentiert. Die Pellets wurden nach Resuspendieren in Isolationsmedium wie die Überstände auf Laktat-Dehydrogenase (LDH)- (s. 3.2.4.1) und Acylase 1-Aktivität (s. 3.1.4.2) getestet.

3.2.3 Dichtegradienten-Zentrifugation

Mit den Mikrosomen und dem Überstand der 10 000 x g-Zentrifugation (postmitochondrialer Überstand) wurde eine Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation durchgeführt. Im fraktionierten Gradienten sollte eine mögliche Co-Lokalisation der Acylase 1 mit Plasma- oder lysosomalen Membranvesikeln anhand von Markerenzymen untersucht werden. Alle Schritte erfolgten bei 4 °C.

In einem UZ-Röhrchen für den SW-41 Ausschwingrotor (13 ml Volumen, Beckman) wurde durch Übereinanderschichten von 47-15% Saccharose in 50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, pH 7.5 in 0.5%-Schritten zunächst ein Stufengradient erzeugt. Über Nacht bildete sich ein linearer Gradient aus, der mit 100 µl Probe beladen wurde. Nach Zentrifugation für 1 h bei 288 000 x g wurde der Gradient mit einer von Metz *et al.* (1977) beschriebenen Aparatur fraktioniert. Über ein dünnes Röhrchen (0.2 mm Innendurchmesser), welches bis auf den Boden des UZ-Röhrchens reichte, wurde der Gradient mit einer peristaltischen Pumpe bei einer Flussgeschwindigkeit von 0.4 ml/min ausgepumpt und mit einem Fraktionssammler fraktioniert. Die Fraktionen wurden auf Acylase 1- (s. 3.1.4.2) und Markerenzym-Aktivitäten (s. 3.2.4) getestet.

3.2.4 Bestimmung von Markerenzymaktivitäten (Bergmeyer, 1974)

In colorimetrischen Tests wurden von den Markerenzymen Laktat-Dehydrogenase (Zytosol), alkalische Phosphatase (Plasmamembran), α-Galactosidase (Lysosomen) und Fumarase (mitochondrial) die relativen Aktivitäten vierfach bestimmt. Dabei entsprach die Extinktionsänderung pro Zeit bei der entsprechenden Messwellenlänge immer der Enzymaktivität. Die Tests für die ersten drei der vier Enzyme wurden auf Mikrotiterplatten durchgeführt.

3.2.4.1 Laktat-Dehydrogenase (LDH)

10 µl Probe wurden mit 20 µl 10 mM Pyruvatlösung und 240 µl NaP₅₀7.4 vorgelegt, und die Reaktion mit 30 µl frischem 1 mM NADH gestartet. Die Abnahme von E₃₄₀ wurde über 5 min kontinuierlich registriert. Die Daten wurden, wie unter 3.1.4.2 für die Acylase 1 beschrieben, ausgewertet.

3.2.4.2 Alkalische Phosphatase

10 μ l Probe wurden mit 180 μ l 0.1 M Glycin/KOH, pH 10 (Reaktionspuffer) vorgelegt, und die Reaktion mit 20 μ l 12 mM *p*-Nitrophenylphosphat in Reaktionspuffer gestartet. Die Zunahme von E_{405} wurde über 5 min kontinuierlich registriert und wie oben ausgewertet.

3.2.4.3 α -Galactosidase

Der Test wurde bei 37 °C als Endpunktbestimmung durchgeführt. 20 μ l Probe wurden mit 200 μ l 100 mM Natriumcitrat, 0.2% BSA, 0.2% Triton X-100, 0.04% NaN_3 , pH 8.0 (Reaktionspuffer) vorgelegt, und die Reaktion mit frischen 20 μ l 4 mM *p*-Nitrophenyl- α -D-glucoopyranosid in Reaktionspuffer gestartet. Die Platte wurde mit selbstklebender Folie abgedichtet. Nach 3 h wurde E_{405} bestimmt.

3.2.4.4 Fumarase

10 μ l Probe wurden mit 590 μ l 50 mM L-Malat in $\text{KP}_{1007.4}$ versetzt und E_{240} über 5 min kontinuierlich aufgezeichnet.

3.3 Säugerzellkultur

3.3.1 Die allgemeinen Eigenschaften der LLC-PK₁-Zellen

Die LLC-PK₁-Zellen leiten sich vom proximalen Tubulus der Schweineniere ab. Ihre Morphologie und ihr Stoffwechsel zeigen viele für dieses Epithel charakteristischen Merkmale. Die Zellen haben eine Bürstensaum-Membran, produzieren eine Basallamia-ähnliche extrazelluläre Matrix und sind histochemisch positiv für eine Reihe von für den proximalen Tubulus typischen Enzymen, wie zum Beispiel die γ -Glutamyl-Transpeptidase. Zudem bilden sie 'Tight junctions' (Perantoni und Berman, 1979; Rabito, 1986). Als Zeichen aktiver Transportmechanismen, die bei konfluenten Kulturen ein Potential aufbauen, welches zu einem transepithelialen Wasserstrom führt, kann man die Bildung von Hemizysten oder 'Domes' beobachten (Perantoni und Berman, 1979). Über die Transportleistungen der LLC-PK₁-Zellen existiert umfangreiche Literatur. Als Beispiele sei hier nur der Aminosäuretransport genannt (Rabito und

Karish, 1982; Sepúlveda und Pearson; Rabito und Karish, 1983; Mertens *et al.*, 1990; Kimmich *et al.*, 1994). Die LLC-PK₁-Zellen fanden weiterhin Anwendung in der Erforschung des Nierenstoffwechsels. Zum Beispiel setzt der an ein Wachstum ohne Glukose adaptierte Stamm F⁺ als Antwort auf eine metabolische Azidose apikal vermehrt Ammoniumionen aus der Glutamatdehydrogenase-Reaktion frei (Mu und Welbourne, 1996). Auch für die Untersuchung des Wirkungsmechanismus nephrotoxischer S-Cysteinkonjugate (s. 1.4.2 und 5.6, Stevens *et al.*, 1986; Mertens *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1992; Vamvakas *et al.*, 1996) und der Signaltransduktion (Wolf und Stahl, 1996) haben sich die LLC-PK₁-Zellen als geeignet erwiesen. LLC-PK₁-Zellen sind mit zwischen 36 und 40 Chromosomen aneuploid.

Ein allgemeiner Nachteil von Zellkultursystemen als Modell ist die starke Abhängigkeit des Kulturzustandes von den Inkubationsbedingungen.

3.3.2 Kulturbedingungen

Alle hier kultivierten Zellen wuchsen adhärent. Sie wurden in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO₂ und 95% Umgebungsluft bei 37 °C inkubiert. Für alle Kultivierungsarbeiten wurde sterile Einmalware verwendet. Alle Zentrifugationen mit trypsinierten Zellen erfolgten bei 400 x g für 10 min. Die routinemäßige Passage und Kultivierung der Zellen erfolgte in 4 ml Medium in 21 cm²-Schalen. In 75 cm²-Flaschen wurden die Zellen mit 10 ml Medium inkubiert.

Kulturmedium für LLC-PK₁-Zellen:

DMEM mit GlutaMAXTM I und 0.1% D-Glukose, 10% FCS und 1/100 Volumen Penicillin-Streptomycin 'Mixture'

Kulturmedium für MDCK I und II-Zellen:

MEM mit Earle's Salzen, 25 mM HEPES, GlutaMAXTM I und 10% FCS

Kulturmedium für NRK-49F-Zellen:

DMEM mit GlutaMAXTM I und 0.45% D-Glukose 0.45% D-Glukose, 10% FCS und 1/10 000 Volumen Gentamycin

3.3.2.1 Passagieren

Alle 3 d wurde der konfluente Monolayer zweimal mit 2 ml PBS gewaschen und mit 0.5 ml Trypsin-Versene 'Mixture' inkubiert (LLC-PK₁ 10 min, MDCK I sowie II

25 min und NRK-49F 5 min). Die abgelösten Zellen wurden in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und verdünnt passagiert (LLC-PK₁ 1:10, MDCK I sowie II 1:5 und NRK-49F 1:10).

3.3.2.2 Kryo-Konservierung

Der konfluente Monolayer einer 75 cm²-Flasche wurde zweimal mit 5 ml PBS gewaschen, mit 1 ml Trypsin-Versene 'Mixture' abgelöst, in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Kulturmedium mit 10% Kryo-Protektivum (DMSO für LLC- und Glycerin für MDCK- sowie NRK-49F-Zellen) aufgenommen. Vor der Überführung in Flüssigstickstoff wurden die Zellen 24 h bei -20 °C und 24 h bei -80 °C gelagert.

3.3.2.3 Auftauen von kryo-konservierten Zellen

Ein 1 ml Aliquot wurde bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, zu 10 ml Kulturmedium gegeben und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in einer 75 cm²-Flasche ausgesät und nach 24 h weiter passagiert.

3.3.3 Zell-Viabilität

3.3.3.1 MTT-Test, modifiziert nach Mertens *et al.* (1995)

Dieser Test basiert auf der Reduktion des wasserlöslichen Tetrazolium-Salzes Thiazolyl Tetrazoliumbromid zu einem unlöslichen Formazan-Präzipitat durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen. Der violette Farbstoff wird in einem organischen Lösungsmittel solubilisiert und spektrophotometrisch bestimmt.

Der MTT-Test wird als Multiwell-Assay vom Studium von Zellproliferation und Zellchemosensitivität (Twentyman und Luscombe, 1987) bis zum 'Drug-Screening' mit Tumor-Zelllinien (Alley *et al.*, 1988) alternativ zum ³H-Thymidin-Aufnahme- und anderen Wachstums-Assays eingesetzt.

MTT-Lösung: 0.5 mg/ml MTT in PBS⁺⁺

Waschpuffer: PBS⁺⁺

Der Test wurde als Sechsfachbestimmung auf 96-Well-Mikrotiterplatten (0.32 cm² Wachstumsfläche pro well) durchgeführt. Die Aussaat der Zellen und die Zugabe von

Lösungen erfolgte mit dem Distriman. Von den Zellen wurden Lösungen mit einer Kanüle (Microlance 3) über eine Membranpumpe abgesaugt.

Die Zellen wurden 1:10 oder 1:20 in 100 µl Kulturmedium ausgesät und zum Anwachsen mindestens 24 h inkubiert. Die randständigen Wells wurden mit 100 µl Waschpuffer gefüllt. Vor Zugabe der mit unterschiedlichen Supplementen versetzten Versuchsmedien wurde zweimal mit 125 µl Puffer gewaschen. Zum Test wurden 100 µl MTT-Lösung auf die Zellen gegeben. Nach 1 h im Inkubator wurde die Lösung abgesaugt, der Formazan-Niederschlag mit 100 µl DMSO solubilisiert und die Platte 10 s heftig geschüttelt, bevor E_{490} gemessen wurde.

3.3.3.2 Zelluläre Proteinmasse

Ebenso wie die im MTT-Test gemessene Aktivität mitochondrialer Dehydrogenase korrelierte auch die zelluläre Proteinmasse gut mit der Zellviabilität. Die Bestimmung erfolgte auf 96-Well-Mikrotiterplatten in wässrigen Lysaten. Der Zellrasen wurde mit 50 µl a. bidest. versetzt und 30 min heftig geschüttelt. Mit dem Lysat wurde der Bradford-Test durchgeführt (s. 3.1.4.1).

3.3.4 Zytoplasma-Extrakte für die Enzymbestimmung

Zur Bestimmung der Acyl- und LDH- Aktivitäten wurden die Zellen vierfach auf 21 cm²-Schalen kultiviert. Sie wurden durch Inkubation mit 0.5 ml 2.5% Trypsin (ohne EDTA) abgelöst, jeweils doppelt solange wie mit Trypsin-Versene (s. 3.3.2.1). Die nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4°C oder unter Eis-Kühlung. Die Zellen wurden zu 1 ml PBS gegeben, 5 min bei 13 000 rpm pelletiert, einmal gewaschen und bis zum Aufschluss bei -80 °C gelagert.

Die Zellen wurden per Hand mit einem 5 ml-Glaspotter aufgeschlossen. Das Pellet wurde hierzu in 100 µl KP₅₀7.0 aufgenommen, durch 20 Stöße homogenisiert und zusammen mit weiteren 50 µl KP₅₀7.0 Spüllösung aus dem Potter 30 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Enzymbestimmung (s. 3.1.4.2 und 3.2.4.1) bei -80 °C gelagert.

3.3.5 *N*-Acetylamino­säure-Transport-Studien

LLC-PK₁-Zellen bilden einen Monolayer, dessen transepithelialer Widerstand und Permeabilität für anorganische Ionen denen des proximalen Tubulusepithels entspricht (Rabito, 1986). Bei der Inkubation eines Monolayers in einem einfachen Kulturgefäß ist nur die apikale Plasmamembran organischen Ionen wie zum Beispiel Aminosäuren oder Mercaptursäuren (s. 1.4.2) im Medium zugänglich (Mertens *et al.*, 1990). Im Falle der hier mit konfluenten Kulturen von LLC-PK₁-Zellen durchgeführten Transportstudien mit *N*-Acetylamino­säuren ist ebenso davon auszugehen, dass nur ein Fluss über die apikale Plasmamembran stattfinden konnte.

3.3.5.1 Inkubation mit dem Substrat

Substratlösung: *N*-Acetylamino­säure in EBSS, pH 7.4 (NaOH)

Die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Substrataufnahme sowie Hemmversuche wurden mit konfluent gewachsenen Zellen auf 149 cm²-Kulturschalen durchgeführt, auf denen die Zellen mit 20 ml Kulturmedium angezogen wurden.

Die Zellen wurden dreimal mit 10 ml PBS⁺⁺ gewaschen und 1 min mit 10 ml EBSS, pH 7.4 (NaOH) equilibriert. Nach Zugabe der Substratlösung wurde die Schale unter leichtem Schwenken auf dem Schüttler inkubiert. Unter Standardbedingungen wurden die Zellen 2 min mit Substrat inkubiert. Danach wurde die Lösung rasch abgenommen und der Zellrasen viermal mit 10 ml eisgekühltem, 350 µM Dithithreitol-enthaltendem PBS⁺⁺ gewaschen (weiter s. 3.3.5.2).

3.3.5.2 Extrakte für die PITC- und ADAM-HPLC-Analyse

Die Zellen von einer 149 cm²-Kulturschale wurde mit 3 ml 350 µM Dithiothreitol versetzt und dreimal bei -80 °C eingefroren. Die Kulturschale mit dem so erhaltenen Lysat wurde 30 min bei 4 °C auf einer Wippe inkubiert und dann das Lysat 30 min bei 13 000 rpm zentrifugiert (weiter s. 3.4.1 und 3.4.2).

3.3.5.3 Bestimmung des zellulären Gesamtproteins

Zur Bestimmung des zellulären Gesamtproteins als Bezugsgröße für die Transportraten wurde eine Parallelkultur auf einer 149 cm²-Kulturschale dreimal mit 10 ml PBS⁺⁺

gewaschen, mit 6 ml 1 N NaOH versetzt und über Nacht auf einer Wippe inkubiert. Mit Aliquots des alkalischen Lysats wurde nach einer Zentrifugation bei 13 000 rpm für 30 min der Bradford-Test (s. 3.1.4.1) durchgeführt.

3.3.5.4 Hemmung des Transports

Um zu überprüfen, ob der Transport hemmbar ist, wurden die Zellen vor Durchführung des Transportversuchs folgendermaßen behandelt:

Abhängigkeit des Transports von der Proteinbiosynthese (Burston und McGivan, 1997)

1000x Cycloheximid: 10 mg/ml in serumfreien Kulturmedium

1000x Tunicamycin: 0.1 mg/ml in serumfreien Kulturmedium

Die Zellen wurden 1:10 passagiert, nach 2 d zweimal mit 10 ml PBS⁺⁺ gewaschen und 20 h mit Proteinbiosynthese-Hemmstoffen (0.1 µg/ml Tunicamycin oder 10 µg/ml Cycloheximid in serumfreien Kulturmedium) inkubiert.

Energieabhängigkeit des Transports

Am dritten Tag nach der Aussaat (1:10) wurden die Zellen dreimal mit 10 ml PBS⁺⁺ gewaschen und 30 min mit einem 'Energy Depleting Medium' (serumfreies DMEM ohne Glukose, mit L-Glutamin, 10 mM NaN₃ und 20 mM 2-Deoxy-D-Glukose; Braakman *et al.*, 1992a) inkubiert.

3.4 HPLC-Analytik

Alle Analysen wurden am HPLC E605-Säulenstand mit einer 50 oder 100 µl-Probenschleife, der Steuerungssoftware BASELINE und der RP-HPLC-Kartusche LiChrosphere[®] 60 RP-Select B durchgeführt. Die Chromatogramme wurden mit der BASELINE-Software aufgezeichnet und daraufhin mit dem Programm PeakFit[™] ausgewertet. Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Messungen vierfach ausgeführt.

3.4.1 Aminosäureanalyse mit der PITC-HPLC-Methode

(Mora *et al.*, 1988)

Kopplungspuffer: 35% a. bidest, 30% Acetonitril, 25% Pyridin, 10%

Triethylamin

Puffer A: 50 mM Natriumacetat, 0.275% Triethylamin, pH 6.4 (H₃PO₄)

Puffer B: 50% Puffer A, 40% Acetonitril, 10% Methanol

Probenvorbereitung

Die zu analysierenden Lösungen oder Zellextrakte (s. 3.3.5.2) wurden mit 1/10 Volumen Trifluoressigsäure entproteinisiert und 30 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in der Speed Vac getrocknet.

Derivatisierung

Die trockene Probe wurde in 100 µl Kopplungspuffer aufgenommen, erneut getrocknet, wieder in 100 µl Kopplungspuffer aufgenommen und mit 5 µl PITC versetzt. Nach 30 min wurde die Probe getrocknet und dann in 20 µl Acetonitril und 180 µl Puffer A aufgenommen. Unlösliche Rückstände wurden bei 13 000 rpm abzentrifugiert. 100 µl Aminosäurestandard mit 250 nmol pro Aminosäure wurden gleichbehandelt.

Chromatographie

Bei einer Säulentemperatur von 50 °C wurde mit folgendem Gradienten eines Puffer A Puffer B-Gemisches eluiert:

Zeit (min)	0	1	19	21	34	41	42-50
Flussgeschw. (ml/min)	0	1	1	1	1	1	1
% Puffer B	8	8	17	40	45	65	100

Zur Analyse und Integration des Chromatogramms wurde E₂₅₄ aufgezeichnet.

3.4.2 *N*-Acetylaminosäureanalyse mit der 9-Anthryldiazomethan (ADAM)-HPLC-Methode (Kawakami *et al.*, 1992; Kawakami und Ohmori, 1994)

Derivatisierung von Carbonsäuren

Die Methode der spezifischen Vorsäulenderivatisierung von Carbonsäurefunktionen mit dem 'Fluorescence labeling Agent' 9-Anthryldiazomethan (ADAM) wurde ursprünglich für die quantitative Reversed Phase (RP)-HPLC-Analyse von Fettsäuren aus komplexen Gemischen entwickelt (Nimura und Kinoshita, 1980; Baker *et al.*, 1980). Inzwischen ist die ADAM-HPLC-Methode in Europa und Japan beim Monitoring der saisonalen Anreicherung von Phycotoxinen, vor allem dem Dinoflagellatentoxin Okadainsäure, in Muschelpopulationen weit verbreitet (Edebo *et al.*, 1988; Suzuki *et al.*, 1996; James *et al.*, 1999). In der Grundlagenforschung findet die Methode breite Anwendung bei der Bestimmung von Arachidonsäure-Metaboliten (Fujita *et al.*, 1994; Sakuma *et al.*, 1994; Demin *et al.*, 1995). Darüberhinaus wurde die Methode zur Analyse einer ganzen Reihe von Biomolekülen, Xenobiotika und Pharmaka in biologischen Proben erfolgreich eingesetzt. Auch zum Screening von Herbiziden im Grundwasser wurde die ADAM-HPLC-Methode schon herangezogen (Suzuki und Watanabe, 1991).

Nach einer meist einfachen Extraktion der Analyten aus der Probe mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel erfolgt die Derivatisierung mit ADAM unter milden Bedingungen bei Raumtemperatur (s. Abb. 3-2). Die derivatisierte Probe ist bei -80 °C etwa eine Woche haltbar. Zur Auftrennung der 9-Anthrylester, den Reaktionsprodukten der Derivatisierung, werden meist RP-Materialien auf der Basis von Kieselgelmatrixen eingesetzt. Ein Nachteil der Methode ist ein hoher Hintergrund durch interferierende Peaks bei der Chromatographie, verursacht durch ADAM-Zerfalls- und -Nebenprodukte. Oft empfiehlt sich daher vor der HPLC eine Vorreinigung mittels Festphasenextraktion (Zamir *et al.*, 1991; Lawrence *et al.*, 1996).

Bestimmung von *N*-Acetylaminosäuren

1992 wurde von Kawakami *et al.* erstmals die Anwendung der ADAM-HPLC-Methode bei der quantitativen Analyse von *N*-Acetylaminosäuren beschrieben (Kawakami *et al.*, 1992). Abbildung 3-2 zeigt die Derivatisierung. Den Autoren gelang die Analyse der *N*-

Acetylderivate von Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Glycin, Alanin, Tyrosin, Prolin, Methionin, Valin, Leucin und Isoleucin (s. Abb. 5.-3). Die Substanzen wurden einem Rattenleberhomogenat zugesetzt. Nach Entproteinisierung des 700 x g-Überstandes mit Methanol konnten die *N*-Acetylaminosäuren im Schnitt zu 72% für die HPLC-Analyse wiedergewonnen werden. Die Chromatographie erfolgte mit einer HiberLiChroCART Supersphere 60 RP-8-Säule (Kanto Chemical, Tokyo) bei 60 °C und mit 10 mM Natriumacetat (pH 6.0)-Acetonitril (16:9, v/v) als mobiler Phase.

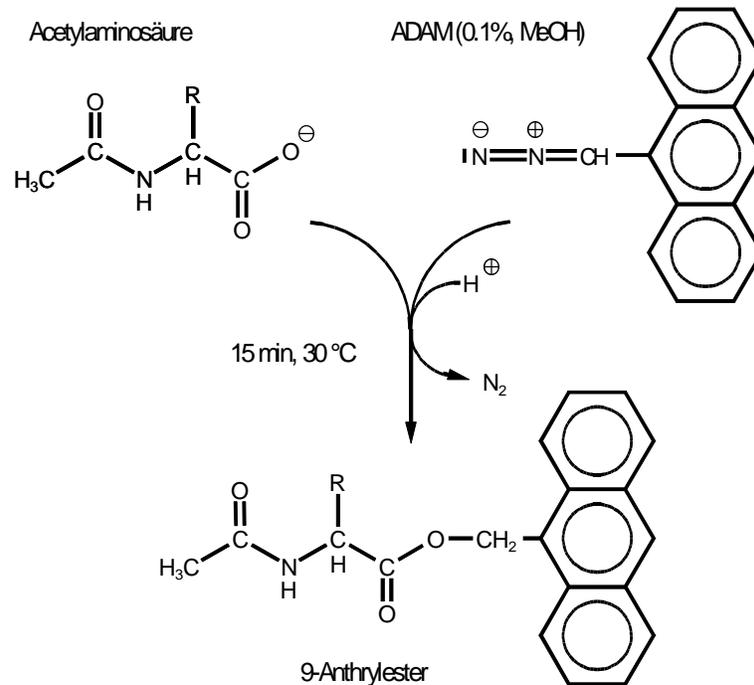


Abb. 3-2 Derivatisierung von *N*-Acetylaminosäuren mit 9-Anthryldiazomethan (ADAM). Bei der Reaktion mit 0.1% ADAM in methanolischer Lösung werden spezifisch Carboxylatgruppen derivatisiert.

Bei der Analyse des unbehandelten Homogenats fanden Kawakami *et al.* Peaks, die mit Glycin und Leucin interferierten. Im 10 000 x g-Überstand eines Bäckerhefe-Aufschlusses wurden in der gleichen Arbeit *N*-Acetylalanin und -tyrosin gefunden. Die Detektionsgrenzen der Methode lagen zwischen 0.1 pmol für *N*-Acetylglutamin und 5.5 pmol für *N*-Acetylisoleucin und -leucin. Die Tatsache, dass in dieser Arbeit Leucin und Isoleucin getrennt wurden, steht im Widerspruch zur darauffolgenden Veröffentlichung der gleichen Autoren, nach der dies nicht mehr der Fall war. Kawakami und Ohmori berichteten zudem von der Mikroidentifizierung von *N*-blockierten Aminosäuren in Proteinen nach Proteaseverdau (Kawakami und Ohmori, 1994). Durch Ansäuern des Ansatzes mit Ameisensäure nach der Derivatisierung konnte der Hintergrund deutlich

reduziert werden, vermutlich durch Zerstörung von restlichem ADAM und Nebenprodukten der Derivatisierung.

Bisher sind keine quantitativen Daten über den Gehalt an *N*-Acetylamino-säuren in Körperflüssigkeiten oder Geweben des Menschen publiziert. Die ansonsten zur Identifizierung gebräuchliche Gaschromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC-MS), ermöglichte lediglich eine grobe Mengenabschätzung von *N*-acetylierten Aminosäuren im Urin (Liebich und Först, 1985; Jellum *et al.*, 1986).

Probenvorbereitung

Das wässrige Zellextrakt aus 3.3.5.2 wurde in 2 Portionen in der Speed Vak auf je 100 µl eingengt. Dann wurde die Probe bei 4 °C mit dem vierfachen Volumen Methanol entproteinisiert, indem sie 10 min heftig geschüttelt und 5 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert wurde. Die Pellets wurden nochmals mit je 100 µl Methanol 5 min im Ultraschallbad extrahiert. Die vier Überstände wurden vereinigt und auf 10-20 µl eingengt (Speed Vac).

Je 7 ml humanes Blutplasma (Citratblut) wurden direkt entproteinisiert und ansonsten gleichbehandelt. Venöses Blut von vier gesunden, erwachsenen Männern wurde 2 h postprandial entnommen. Das Plasma wurde maximal 2 Wochen bei -20 °C gelagert.

Derivatisierung

Die Probe wurde in 200 µl Methanol aufgenommen, 1 min gevortext und 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Parallel wurde eine Lösung von 0.1% ADAM in Methanol angesetzt und 3 min im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 250 µl ADAM-Reagenz versetzt, kurz gevortext und im Dunkeln unter leichtem Schütteln bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Nach 15 min wurden 50 µl 2 mM Ameisensäure in Methanol zugesetzt und weitere 45 min unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die derivatisierte Probe wurde bei -80 °C gelagert und innerhalb von 7 d chromatographiert.

Chromatographie

Puffer A: 64% 5 mM Natriumacetat, pH 6.0, 36% Acetonitril
Puffer B: 50% Acetonitril, 50 % Methanol

Die Chromatographie wurde bei einer Säulentemperatur von 60 °C und einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min durchgeführt. Die Elution erfolgte entweder isokratisch mit 90% Puffer A und 10% Puffer B, oder mit einem Stufengradienten. Dazu wurde nach 12 min auf 80 % Puffer A und 20% Puffer B umgestellt. Zum Equilibrieren wurde die Säule 5 min mit Puffer B und dann 5 min mit 90% Puffer A und 10% Puffer B gespült.

Zur Aufnahme des Chromatogramms wurde die Fluoreszenz bei 365 nm angeregt und bei 412 nm registriert.

3.5 Multiple Sequenz-Alignments

Die Acylase-Familie umfasst derzeit 36 Sequenzen. Mit Aufklärung der Kristallstruktur der Carboxypeptidase G2 wurden alle metallbindenden Reste des Enzyms identifiziert (CPG2, Rowsell *et al.*, 1997). Bei Erstellung der Alignments wurde von einer Konservierung dieser Reste bei allen Mitgliedern der Acylase-Familie ausgegangen. Mit den Programmen Dialign 2.0 (Morgenstern *et al.*, 1996; Morgenstern, 1999) und Multalin 5.3.3 (Corpet, 1988) wurden mit unterschiedlichen Kombinationen der Proteinsequenzen (maximal 17 gleichzeitig) diverse Alignments erstellt. Allerdings konnte die Konservierung der metallbindenden Reste (s. 1.2.1) als absolute Bedingung beim Erstellen der rechnergenerierten Alignments nicht berücksichtigt werden. Daher wurden nach Vorlage dieser Alignments die endgültigen Ergebnisse manuell zusammengesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Expression von Wildtyp-hkAcy1 und zwei Mutanten mit dem BEVS

Zur Klärung der Rolle der PWW-Motive der Acy1 (s. 1.2.3) wurden beide in der hkAcy1 durch Mutagenese manipuliert. Die genauere proteinchemische Charakterisierung der Mutanten wurde von W. Berens im Rahmen seiner Diplomarbeit in diesem Labor vorgenommen (Berens, 1999). Ferner wurde ausreichend Enzym für eine Reihe vergleichender Enzymtests exprimiert und gereinigt.

4.1.1 Ortsspezifische Mutagenese der PWW-Motive

Von dem Baculotransfervektor pVL1393-hkAcy1 wurden zwei Doppelmutanten (PWW1 und PWW2) sowie eine Kombination beider (PWW1/2) hergestellt (s. 3.1.2.7). Die Sequenzierung mit dem Sequenzierprimer hkAcy-seq durch die Firma TOPLAB (München) ergab, dass das hkAcy1-Gen in je zwei von vier Klonen pro Mutagenese die gewünschten Mutationen trug:

Wildtypsequenz	651 • CCCTGGTGG	1038 • CCTTGGTGG
PWW1	• CCCGCGGCG	
PWW2		• CCTGCGGCG
PWW1/2	• CCCGCGGCG	• CCTGCGGCG

Die mutierten Sequenzen kodierten für Pro-Ala-Ala statt Pro-Trp-Trp und damit für die Mutationen WW193,194AA (PWW1) und WW332,333AA (PWW2), sowie für beide gleichzeitig (PWW1/2).

4.1.2 Enzymexpression

Nach der Co-Transfektion (s. 3.1.3.2) und der Einzelklon-Isolierung (s. 3.1.3.3) wurden Aufschlüsse von Zellproben vom vierten Tag des zweiten Virusvermehrungsschritts (s. 3.1.3.4) auf Acylaseaktivität getestet. Beim Wildtyp, der PWW1- und der PWW2-Mutante war Acylaseaktivität nachweisbar und die Überexpression im SDS-PAGE sichtbar. Mit der PWW1/2-Mutante wurde nach Co-Transfektion mit beiden

sequenzierten Klonen, die die Mutationen trugen, zwar ein Virus erhalten, aber rekombinantes Enzym konnte nicht nachgewiesen werden.

Nach der Expressionskinetik (s. 3.1.3.5) wurden Wildtyp und PWW1-Mutante am vierten und die PWW2-Mutante am fünften Tag nach der Infektion geerntet.

4.1.3 Enzymreinigung

Das in 3.1.4.3 beschriebene Protokoll ermöglichte eine einfache Isolierung homogener pkAcy1 und hkAcy1 aus SF21-Zellen in zwei säulenchromatographischen Reinigungsschritten. Die Methode war ohne Modifikationen auch auf beide Mutanten der hkAcy1 anwendbar. Abbildung 4-1 zeigt das Elutionsprofil der hkAcy1 nach Hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) über Phenylsepharose CL-4B®.

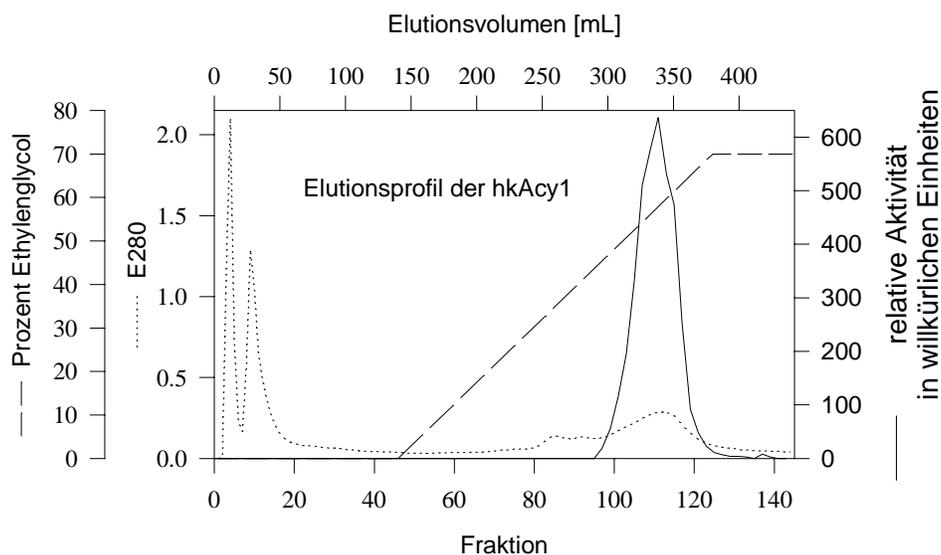


Abb. 4-1 Elutionsdiagramm der hkAcy1 nach Hydrophober Interaktionschromatographie. Die hkAcy1 eluierte bei 60% Ethylenglycol, zur Methodik siehe 3.1.4

Tabelle 4-1 fasst den entsprechenden Reinigungsverlauf zusammen.

Reinigungsschritt	Gesamtvol. [ml]	Protein [mg]	Aktivität [U]	spez. Akt. [U/mg]	Anreicherung	Ausbeute [%Akt.]
Ganzzellextrakt	15	52	3 432	66	1.0	100
Phenylsepharose	57	13	1 560	120	1.8	46
Q-Sepharose	120	3	828	276	4.2	24

Tab. 4-1 Reinigungstabelle der hkAcy1 bezogen auf 100 ml Expressionskultur, zur Methodik siehe 3.1.4.3.

Nach vollständiger Reinigung der Enzyme aus SF21-Zellen wurden unter Standardbedingungen (s. 3.1.4.2) folgende spezifische Aktivitäten gemessen:

pkAcy1	210 U/mg
hkAcy1 (WT)	277 U/mg
PWW1	16 U/mg
PWW2	244 U/mg

Die Mutanten der hkAcy1 verhielten sich während der Reinigung wie der Wildtyp. Abbildung 4-2 zeigt ein silbergefärbtes SDS-PAGE der hkAcy1 aus SF21-Zellen.

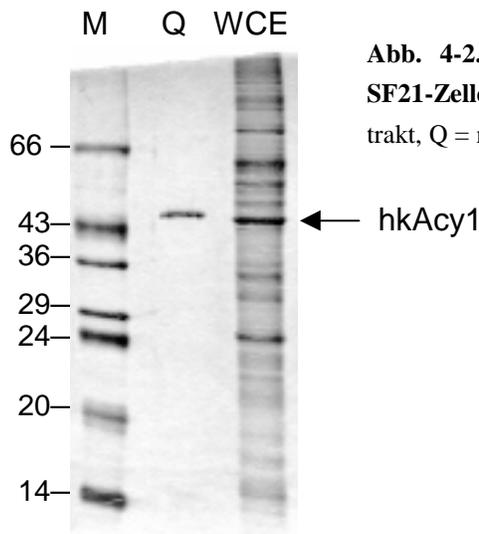


Abb. 4-2. Silbergefärbtes SDS-PAGE der hkAcy1 aus SF21-Zellen. M = Molmassenmarker, WCE = Ganzzell-extrakt, Q = nach Q-Sepharose,

4.2 Charakterisierung der rekombinanten Enzyme

4.2.1 Kinetische Eigenschaften

Die Aktivitäten der gereinigten Enzyme wurde mit dem in Abschnitt 3.1.4.2 beschriebenen TNBS-Test bestimmt. Die Daten wurden mit dem Tabellenkalkulations-Programm Sigma Plot 2.01 ausgewertet. Die Hydrolysen folgten entweder einer Michaelis-Menten- oder einer Hill-Kinetik.

Michaelis-Menten-Gleichung: $F(S) = V \cdot [S] / ([S] + K_m)$

Hill-Gleichung: $F(S) = V \cdot [S]^n / ([S]^n + [S]_{0.5}^n)$

V: Maximalgeschwindigkeit der katalysierten Reaktion unter Versuchsbedingungen

[S]: Substratkonzentration

[S]_{0.5}: Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit

K_m : Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit (Michaelis-Menten-Konstante)

n : Hill-Koeffizient

4.2.1.1 Kinetiken der hkAcy1 und pkAcy1 mit *N*-Formylmethionin (NFM) und *N*-Acetylmethionin (NAM)

Von den physiologischen Acylasesubstraten wird *N*-Acetylmethionin (NAM) am effektivsten umgesetzt (s. 1.1.1.1). *N*-Formylmethionin (NFM) ist möglicherweise ebenfalls *in vivo* ein Substrat der Acy1, ist als solches aber bisher kaum charakterisiert worden.

Während der Umsatz von NFM durch die pkAcy1 einer Michaelis-Menten-Kinetik folgte (s. Abb. 4-3 b), wurden alle übrigen Kinetiken nach der Hill-Gleichung gefittet. Die Kinetiken der Hydrolyse von NFM sowie NAM durch die hkAcy1 und die pkAcy1 sind in Abbildung 4-2 mit Angabe der kinetischen Parameter graphisch dargestellt.

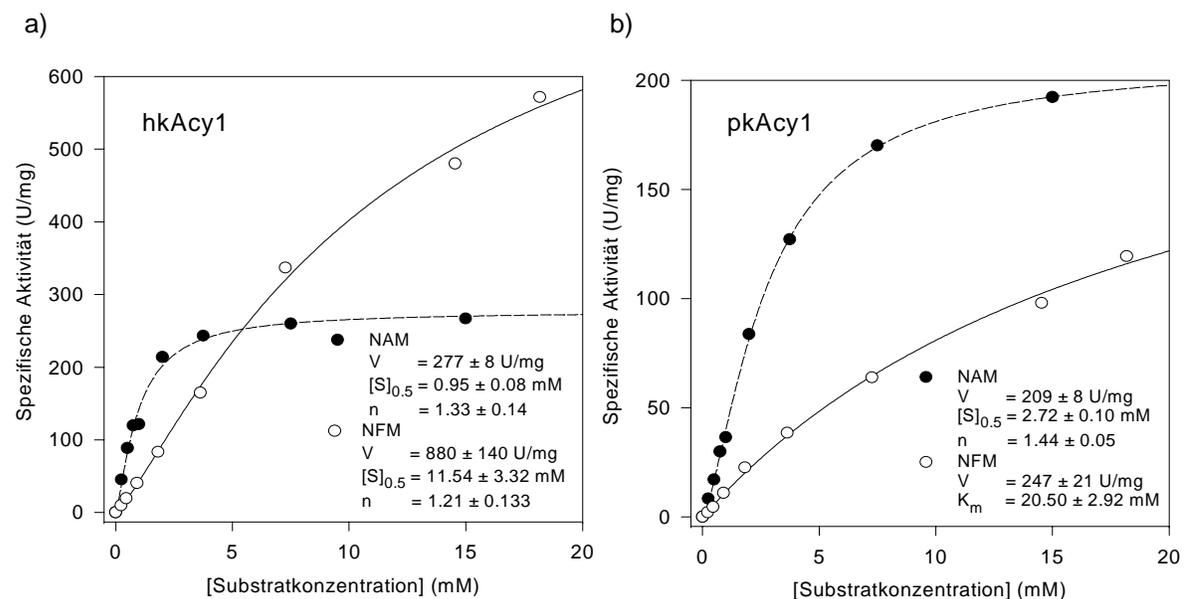


Abb. 4-3. Reaktionskinetiken der hkAcy1 (a) und pkAcy1 (b) mit *N*-Formylmethionin (NFM) und *N*-Acetylmethionin (NAM). Die spezifischen Aktivitäten der aus SF21 gereinigten Wildtyp-Enzyme sind in Abhängigkeit von der Substratkonzentration dargestellt. Die unterbrochene Linie entspricht dem Fit für NAM (●) und die durchgezogene dem für NFM (○).

Besonders die hohe Aktivität der hkAcy1 mit NFM fällt auf: bei 20 mM NFM erreichte das humane Enzym mit fast 600 U/mg bereits mehr als die doppelte Aktivität als mit NAM (280 U/mg). Umgekehrt erreichte das Schweineenzym bei 20 mM NFM gerade 122 U/mg, und damit nur wenig mehr als die Hälfte der Aktivität mit NAM (200 U/mg).

In beiden Fällen wurde mit NFM nicht annähernd eine Sättigung erreicht. Übereinstimmend ergaben für beide Enzyme die Halbsättigungskonzentrationen für NFM ungefähr zehnfach höhere Werte als für NAM: etwa 12 mM gegenüber 1 mM für die hkAcy1 und 21 gegenüber 3 mM für die pkAcy1. Lediglich der Umsatz von NFM durch die pkAcy1 zeigte keinen kooperativen Effekt. Offenbar beeinflusst der Acylrestes die Monomer-Monomer-Wechselwirkung.

4.2.1.2 Kinetik der PWW2-Mutante mit *N*-Acetylmethionin (NAM)

Für beide Mutanten der hkAcy1 sollten die Kinetiken mit NAM bestimmt werden. Die Aktivitätsbestimmung der PWW1-Mutante bei Substratkonzentrationen unter 15 mM war jedoch mit dem TNBS-Test, wie er hier durchgeführt wurde, nicht möglich. Aufgrund der relativ geringen Aktivität der Mutante mussten zur Steigerung der Testempfindlichkeit die Bedingungen modifiziert werden. Diese Arbeit sowie die weitere proteinchemische Charakterisierung der Mutanten wurde von W. Berens durchgeführt (Berens, 1999). Die Kinetik der PWW2-Mutante ist als Beispiel in Abbildung 4-4 dargestellt.

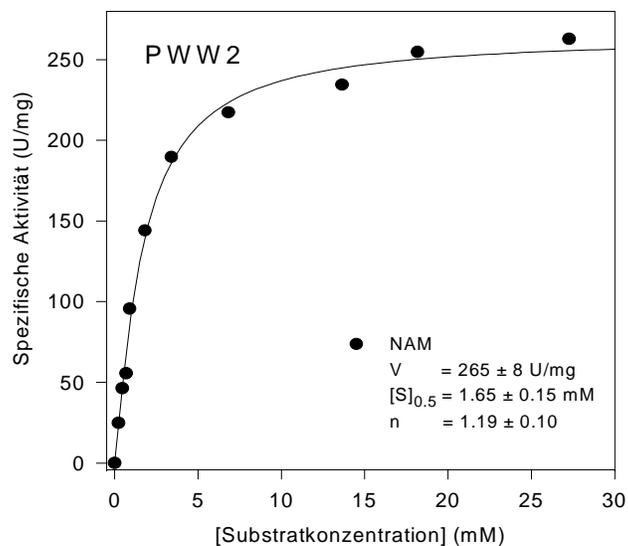


Abb. 4-4 Kinetik der PWW2-Mutante mit *N*-Acetylmethionin (NAM). Die spezifische Aktivität der PWW2-Mutante ist in Abhängigkeit von der NAM-Konzentration dargestellt. Die Hydrolyse folgte einer Hill-Kinetik.

Im Vergleich zum Wildtyp war keiner der kinetischen Parameter der PWW2-Mutante signifikant verändert. Allerdings zeigte die PWW2-Mutante noch 88%, die PWW1-

Mutante dagegen nur 6% der Wildtyp-Aktivität (s. 4.1.3). Dies lässt darauf schließen, dass die beiden PWW-Motive unterschiedliche Funktionen haben.

4.2.2 Acy1-Hydrolyse von NAM in Gegenwart von Dithiothreitol (DTT)

Schon lange ist bekannt, dass sich die pkAcy1 durch Thiole inhibieren lässt (Kördel und Schneider, 1976a), wahrscheinlich durch Reduktion der Disulfidbrücke zwischen C270 und C292 (s. 1.2.2.1). Da sich in der hkAcy1 an Position 270 statt eines Cysteinrestes ein Serinrest befindet, ist hier keine Disulfidbrücke und demnach auch keine Hemmbarkeit durch Dithiothreitol zu erwarten. Abbildung 4-5 vergleicht den Einfluss von DTT auf die Hydrolyse von NAM durch die hkAcy1 und die pkAcy1.

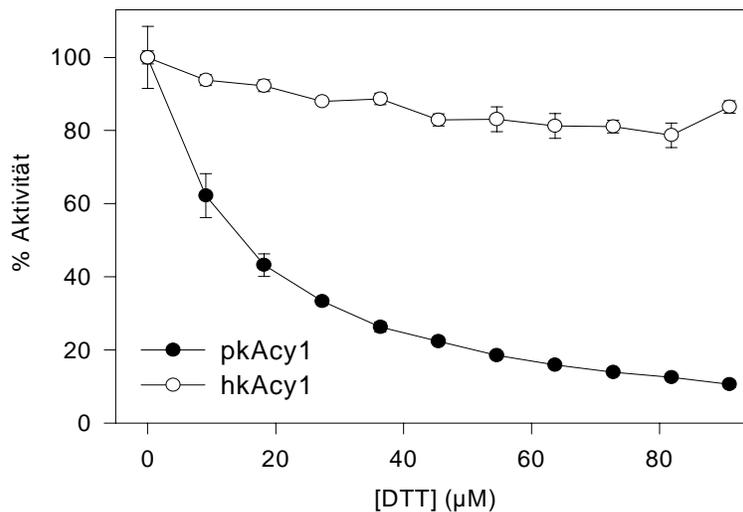


Abb. 4-5 DTT-Einfluss auf die Hydrolyse von *N*-Acetylmethionin durch die hkAcy1 und pkAcy1.

Die relativen Enzymaktivitäten sind als Prozent von der Kontrolle in Abhängigkeit von der DTT-Konzentration im Reaktionsansatz dargestellt. Die Enzymkonzentration im Test betrug für beide Acylasen 7.3 μg/ml.

Während die Aktivität der pkAcy1 bei 90 μM DTT nur noch 10% betrug, war die hkAcy1 zu maximal 20% inhibiert, was auf das Fehlen der Disulfidbrücke in der hkAcy1 hindeutet. In Abschnitt 4.5.3 wird demonstriert, dass DTT auch in kultivierten Schweinezellen die Acy1 hemmt.

4.3 Subzelluläre Verteilung der Acy1 in der Schweinenierenrinde

Frühere Arbeiten deuteten darauf hin, dass die Acy1 zumindest zu einem geringen Teil spezifisch an Membranen gebunden ist (s. 1.2.3). Zur Klärung dieser Frage wurde eine Zellfraktionierung von Schweinenierenrinde durch differenzielle Zentrifugation vorgenommen (s. 3.2.1). Die Aktivität der Acy1 wurde nach Solubilisierungsversuchen und Dichtgradienten-Sedimentation von subzellulären Fraktionen mit den Aktivitäten von definierten, subzellulären Markerenzymen (s. 3.2.4) verglichen.

4.3.1 Mikrosomenpräparation

Zur Erfolgskontrolle der Mikrosomenpräparation (s. 3.2.1) wurden Markerenzymaktivitäten bestimmt (s. Abb. 4-6). Als Membranmarker wurden 10% der ursprünglichen α -Galactosidase- (Lysosomen) und 13% der alkalischen Phosphataseaktivität (Plasmamembran) in den Vesikeln wiedergefunden. Die Präparation war mit 1.5% der mitochondrialen Fumarase und 0.4% der zytosolischen Laktat-Dehydrogenase (LDH) verunreinigt. Die Acy1 verhielt sich mit 0.5% ähnlich wie der zytosolische Marker.

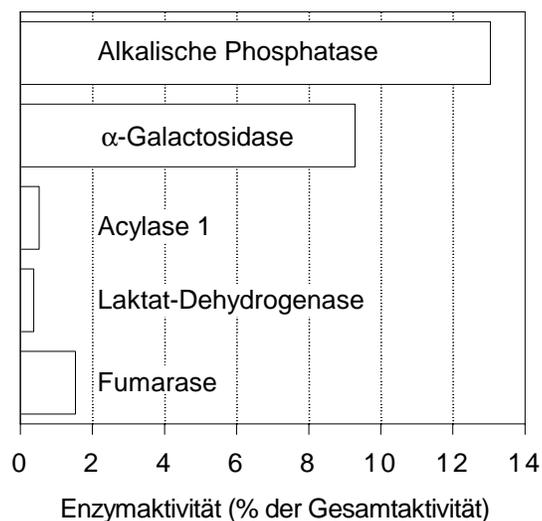


Abb. 4-6 Markerenzymverteilung in der Mikrosomenpräparation. Die in den Membran-Vesikeln bestimmten Enzymaktivitäten sind als Prozentsatz der jeweiligen Gesamtaktivität im Rohhomogenat angegeben, zur Methodik siehe 3.2.1.

4.3.2 Solubilisierung von Laktat-Dehydrogenase (LDH)- und Acy1-Aktivität aus der mikrosomalen Fraktion mit nichtionischen Detergenzien

Nach Behandlung mit nichtionischen Detergenzien und Hochgeschwindigkeits-Sedimentation der Mikrosomen wurden Pellets und Überstände auf Enzymaktivität getestet (s. 3.2.2 und 3.2.3). In Abbildung 4-7 erkennt man, dass bereits nach dem Auftauen der in flüssigem Stickstoff gelagerten Mikrosomen 40% der Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Aktivität nicht mehr vesikelgebunden vorlag. Die LDH-Aktivität konnte mit 10 mM CHAPS nahezu vollständig solubilisiert werden, während 50% der Acy1-Aktivität in der unlöslichen Fraktion blieben. Auf die gleiche Weise wurde die LDH-Aktivität mit niedrigen Konzentrationen von Deoxychololat (2.3 mM) und Triton X-100 (0.5%) zu 100% solubilisiert, während die Acy1 in beiden Fällen zu 10% membrangebunden blieb.

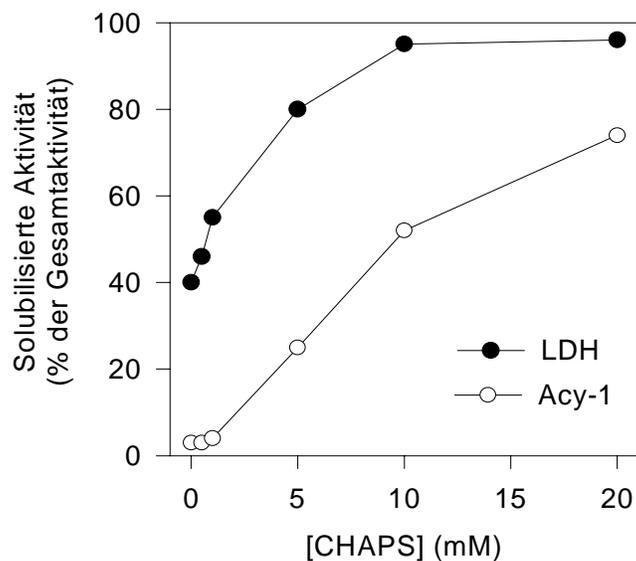


Abb. 4-7 Solubilisierung von Acy1 und Laktat-Dehydrogenase (LDH) aus Mikrosomen. Der prozentuale Anteil der Acy1- und der LDH-Aktivität im Überstand ist in Abhängigkeit von der Detergenzkonzentration dargestellt, zur Methodik siehe 3.2.2.

Die leichte Solubilisierbarkeit der LDH im Gegensatz zur Acy1 deutet auf eine deutlich stärkere Membranassoziation hin.

4.3.3 Saccharose-Dichtgradienten-Zentrifugation

Falls die Acy1 nicht wie die zytosolische LDH unspezifisch mit der mikrosomalen Fraktion angereichert wurde, so ist zu erwarten, dass sie während einer Dichtegradienten-Zentrifugation mit einer bestimmten Membranfraktion sedimentiert. Neben den Mikrosomen wurde der postmitochondriale Überstand mittels Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation analysiert (3.2.3).

In Abbildung 4-8, 4-9 und 4-10 sind die Enzymaktivitäten gegen die Fraktionsnummer aufgetragen. Während die α -Galactosidase mit den Lysosomen und die alkalische Phosphatase mit den Plasmamembran-Vesikeln sedimentierte, blieben die LDH und die Acy1 zu je 99.5% oben auf dem Gradienten der Fraktionen 27-32 (s. Abb. 4-8). Beim logarithmischen Auftrag der relativen Aktivität (s. Abb. 4-9) wird deutlich, dass sich die kleinen Anteile der LDH und der Acy1, die in den Gradienten einwanderten, hier sehr ähnlich verteilten. Beide zeigten Peaks oder Schultern an nahezu den gleichen Positionen. Folglich sedimentierte weder die LDH noch die Acy1 bei dieser hohen Osmolarität (1.38 M Saccharose) mit einer der Membranfraktionen.

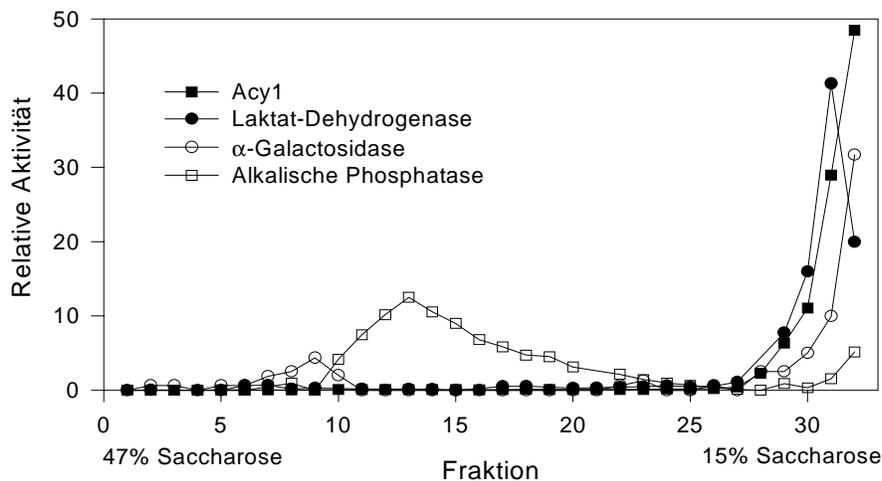


Abb. 4-8 Verteilung der Acy1- und der Markerenzymaktivitäten im Saccharosedichtegradienten nach Hochgeschwindigkeits-Zentrifugation des postmitochondrialen Überstandes. Der Zahlenwert der relativen Aktivität gibt gleichzeitig den Prozentsatz der Aktivität in der jeweiligen Fraktion an, zur Methodik siehe 3.2.3.

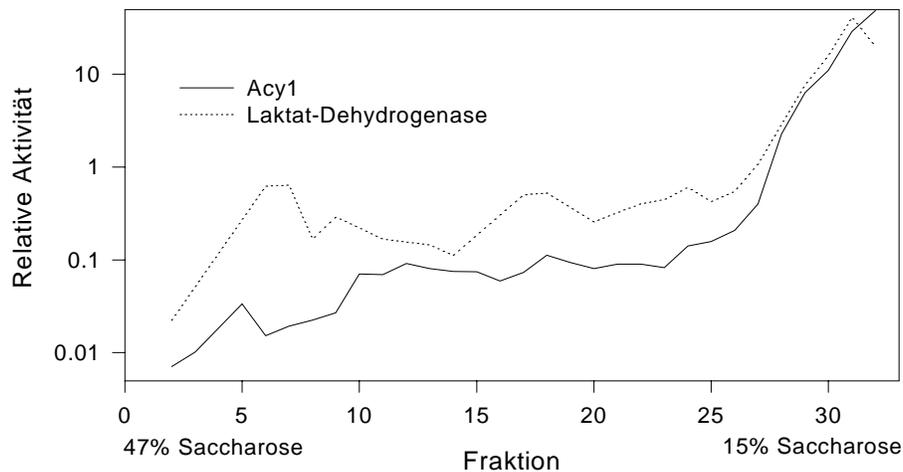


Abb. 4-9 Halblogarithmische Darstellung der Verteilung von Laktat-Dehydrogenase- und der Acy1-Aktivität nach Saccharosedichtegradienten-Ultrazentrifugation des postmitochondrialen Überstandes, gleiches Experiment wie in Abb. 4-8.

Bei einer entsprechenden Analyse der mikrosomalen Fraktion waren keine Vesikelfractionen mehr trennbar (s. Abb 4-10).

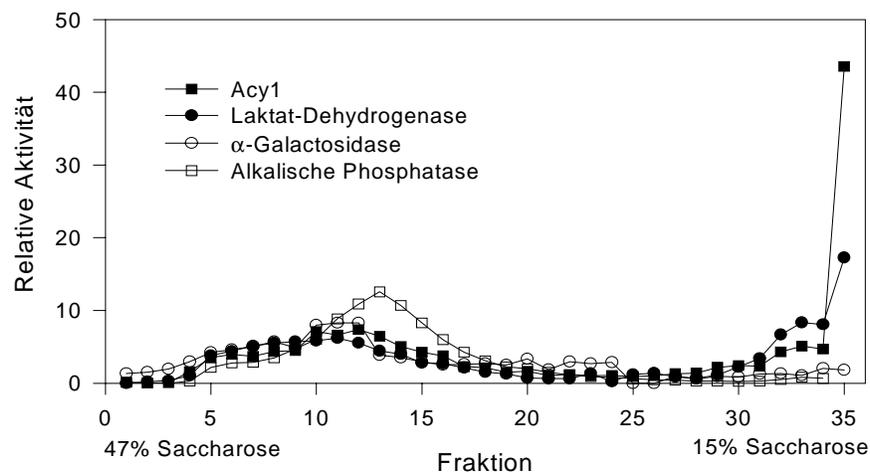


Abb. 4-10 Verteilung der Acy1- und der Markerenzymaktivitäten im Saccharosedichtegradienten nach Hochgeschwindigkeits-Zentrifugation der Mikrosomen. Alle Aktivitäten verteilten sich ähnlich wie die alkalische Phosphatase, die schon bei hoher Dichte ab Fraktion fünf zu finden war.

Während 60% der Acy1 und 44% der LDH-Aktivität in den Fraktionen 31-35 verblieben, wanderte der Rest in den Gradienten ein. Hier sammelten sich praktisch ohne Trennung alle Aktivitäten zwischen den Fraktionen 5 und 20. Selbst die zytosolische LDH, aber auch die Acy1, haften der einzigen erkennbaren, sich über den halben Gradienten verteilenden Vesikelfraktion an.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Anreicherung der Acy1 mit der mikrosomalen Fraktion ebenso unspezifisch ist wie die der LDH, und dass die Assoziation mit der

mikrosomalen Fraktion erst während der Ultrazentrifugation bei der Präparation entsteht.

4.4 Acylase 1-Aktivität in LLC-PK₁-Zellen

Zur Untersuchung der Acyl1 in einem Zellkultursystem sollte eine geeignete Zelllinie gefunden werden. Zu diesem Zeitpunkt war nicht bekannt, welcher Zelltyp des Nierengewebes in erster Linie Acyl1 exprimiert. Aus den Nieren verschiedener Säuger sind eine Reihe gut charakterisierter, permanenter Zelllinien verfügbar. Obwohl die Isolierung von primären Kulturen aus der Schweineniere verhältnismäßig leicht möglich ist (Hull *et al.*, 1976), wurde in dieser Arbeit Zelllinien der Vorzug gegeben.

Verglichen mit Sammelrohrzellen der Hundeniere (MDCK I und II) sowie Fibroblasten der Ratteniene (NRK-Zellen), fand sich in Extrakten von LLC-PK₁-Zellen eine sehr hohe Acylaseaktivität (s. Abb. 4-11). Diese Zellen leiten sich vom proximalen Tubulus der Schweineniere ab (Hull *et al.*, 1976). Höpfner wies kürzlich mittels *in situ*-Hybridisierung große Mengen von mRNA der Acyl1 im gesamten Tubulussystem der Schweineniere nach (Höpfner, 1999).

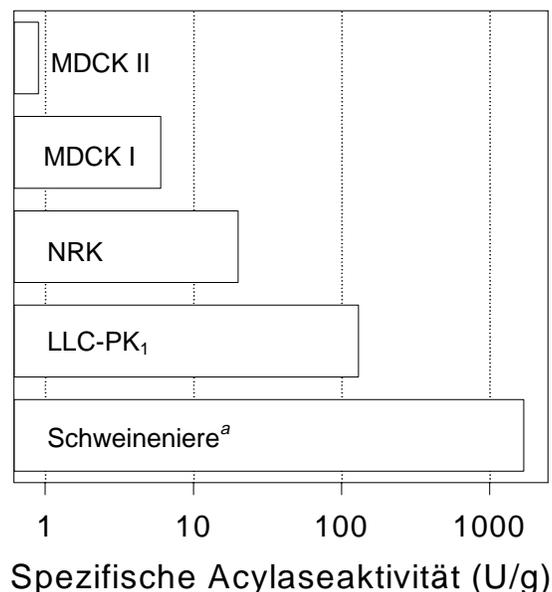


Abb. 4-11 Spezifische Acylaseaktivitäten verschiedener Nierenzelllinien und der Schweineniere mit 20 mM *N*-Acetylmethionin. Die Aktivitäten der Zelllinien wurden in Extrakten von Kulturen, die in Kulturmedien mit fetalem Kälberserum konfluent gewachsen waren (s. 3.3), die der Schweineniere im Rohhomogenat bestimmt. Sie sind logarithmisch aufgetragen. *a*: nach Lindner (1996).

Die in einem Schweinenieren-Rohhomogenat bestimmte, spezifische Acylaseaktivität war etwa zehnmal höher als die in den LLC-PK₁-Zellen bestimmte Aktivität.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Aktivität in den LLC-PK₁-Zellen mit der Acyl des Schweins (pkAcyl) identisch war und sich diese Zelllinie als Modell zur Funktionsanalyse der Acyl1 eignete.

4.4.1 Enzymanreicherung aus Kulturzellen und Identität mit der pkAcyl

LLC-PK₁-Zellen von 40 149 cm² großen, in Kulturmedium mit fetalem Kälberserum (FCS) konfluent gewachsenen Kulturschalen wurden den Angaben in 3.3.4 entsprechend geerntet. Das Extrakt von 6 ml wurde über Phenylsepharose CL-4B[®] chromatographiert (vergl. 3.1.4.3). Abbildung 4-12 zeigt das Elutionsdiagramm.

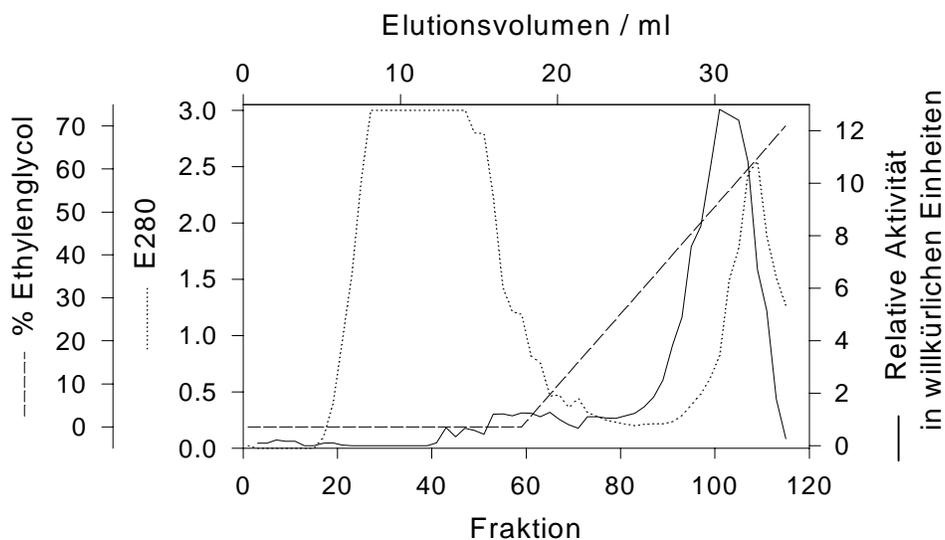


Abb. 4-12 Elutionsdiagramm der Acylaseaktivität aus LLC-PK₁-Zellen nach Hydrophober Interaktionschromatographie. Die Säule hatte einen Durchmesser von 1 cm und war 2 cm hoch gepackt. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 0.3 ml/min wurde mit einem Gradienten von 0-70% Ethylenglycol eluiert. Es wurden 1 min-Fractionen gesammelt. Etwa 90% der Acylaseaktivität eluierten bei 50% Ethylenglycol.

Die Acyl1 konnte durch die Hydrophobe Interaktionschromatographie etwa dreifach angereichert werden. Ausgehend von 5.7 U im Ausgangsextrakt, bei einer spezifischen Aktivität von 130 U/g (s. Abb. 4-11), wurden insgesamt 5.1 U in 4.7 ml wiedergewonnen. Damit wurde nur etwa 10% der Aktivität verloren. Der spezifische

Wert der angereicherten Aktivität betrug jedoch nur 400 U/g, was den geringen Reinigungseffekt (dreifache Anreicherung) widerspiegelt.

Die angereicherte Acylaseaktivität wurde mit verschiedenen Substraten bestimmt und mit der rekombinanten pkAcy1 verglichen (s. 3.1.4.2). Beide „Substrat-Fingerabdrücke“ sind identisch (s. Abb. 4-13). In Gegenwart von 10 μ M Dithiothreitol, einem Hemmstoff der pkAcy1 (s. 4.2.2), war mit den beiden Enzympräparationen keine Aktivität mehr nachweisbar.

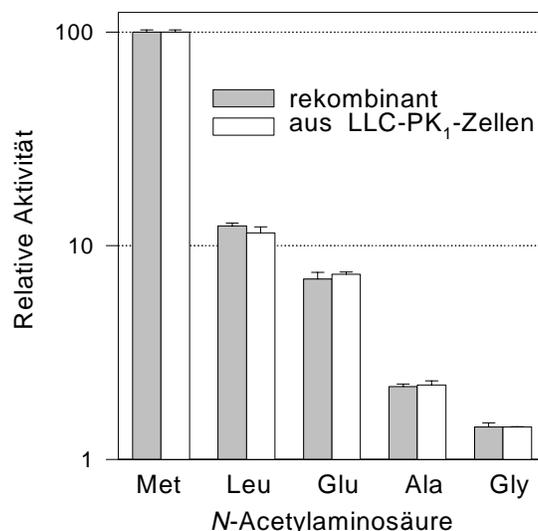


Abb. 4-13 Acylaseaktivität aus LLC-PK₁-Zellen und rekombianter pkAcy1 gegenüber verschiedenen N-Acetylaminosäuren. Die mit N-Acetylmethionin gemessenen Werte wurden 100 gesetzt. Die Aktivitäten sind logarithmisch dargestellt. Zur Methodik siehe 3.1.4.2.

4.5 Viabilität von LLC-PK₁-Zellen in serumfreien, modifizierten Medien

Nach dem Nachweis von Acyl1 in LLC-PK₁-Zellen sollte überprüft werden, ob das Enzym in den Zellen die Verwertung von N-Acetylaminosäuren als Quelle essenzieller Aminosäuren vermitteln kann. Die Problematik, dass möglicherweise schon an der Zelloberfläche eine Exopeptidase mit Acylaseaktivität vorhanden ist, wird in Abschnitt 4.7.2.1 behandelt. Zunächst stellte sich allerdings die Frage, ob fetales Kälberserum (FCS), welches für die LLC-PK₁-Zellen ein zum Wachstum essenzielles Mediumsupplement darstellt, selbst Acylaseaktivität enthält. Eine Adaptation der Zellen an ein chemisch definiertes Medium wie von Hull *et al.* und Chuman *et al.* beschrieben, gelang in dieser Arbeit nicht (Hull *et al.*, 1976; Chuman *et al.*, 1982).

4.5.1 Acylaseaktivität in fetalem Kälberserum (FCS)

FCS wurde unter sterilen Bedingungen mit 20 mM NAM auf Acylaseaktivität getestet. Dazu wurden 0.25% FCS in EBSS angesetzt und im TNBS-Test (s. 3.1.4.2) 1 d, 2 d und 3 d lang bei RT inkubiert. Es wurden drei Kontrollen mitgeführt: Zum einen wurde, wie bei den üblichen Kontrollen, die Reaktion zum Zeitpunkt null gestoppt, und zum anderen wurde einmal auf Substrat und einmal auf fetales Kälberserum (FCS) verzichtet, und dafür jeweils Substratpuffer und EBSS eingesetzt. Während der langen Inkubationsphase wurde unter diesen Bedingungen kein Zerfall von FCS oder Substrat in den Kontrollen beobachtet, während in den Messansätzen eine lineare Zunahme freier Aminogruppen nachgewiesen wurde. Für drei verschiedene FCS-Chargen wurden auf diese Weise Acylase-Volumenaktivitäten von 0.38, 0.22 und 0.20 U/ml ermittelt. Aufgrund dieser FCS-Acylaseaktivität wurden die nachfolgenden Versuche unter FCS-freien Bedingungen durchgeführt.

4.5.2 Verwertung von *N*-Acetylmethionin (NAM) und *N*-Acetylleucin (NAL)

In mit FCS-supplementiertem Kulturmedium waren die LLC-PK₁-Zellen nach einer 1:20-Passage innerhalb von vier Tagen konfluent gewachsen, nach einer 1:10 Passage innerhalb von drei Tagen. Es wurde darauf geachtet, dass zum Zeitpunkt null die Viabilität der Kulturen in allen Versuchen gleich war (s. Abb. 4-14 und 4-15). Die Kulturen in Abbildung 4-14 a und b unterschieden sich jedoch in ihrer Vorbehandlung. In Abbildung 4-14 a wurden die Zellen 1:20 passagiert. 72 h später wurde das Kulturmedium gegen entsprechend modifiziertes Medium ausgewechselt. Für alle anderen dargestellten Versuche (s. Abb. 4-14 b, 4-15) wurden die Zellen 1:10 passagiert, und der Mediumwechsel erfolgte nach 24 h. Die Modifikation des Mediums bestand neben dem Entzug von FCS darin, dass Methionin im Medium äquimolar durch *N*-Acetylmethionin (NAM, 0.2 mM) oder Leucin äquimolar durch *N*-Acetylleucin (NAL, 0.8 mM) ersetzt wurde. Danach wurde das Überleben der LLC-PK₁-Zellen mit dem MTT-Test registriert (s. 3.3.3.1). Bei Inkubation mit serumfreien Medien wird im Folgenden wahlweise vom Überleben oder dem Wachstum der Zellen gesprochen.

In Abbildung 4-15 ist der zu 4-14 b analoge Versuch mit dem Austausch von Leucin gegen NAL dargestellt.

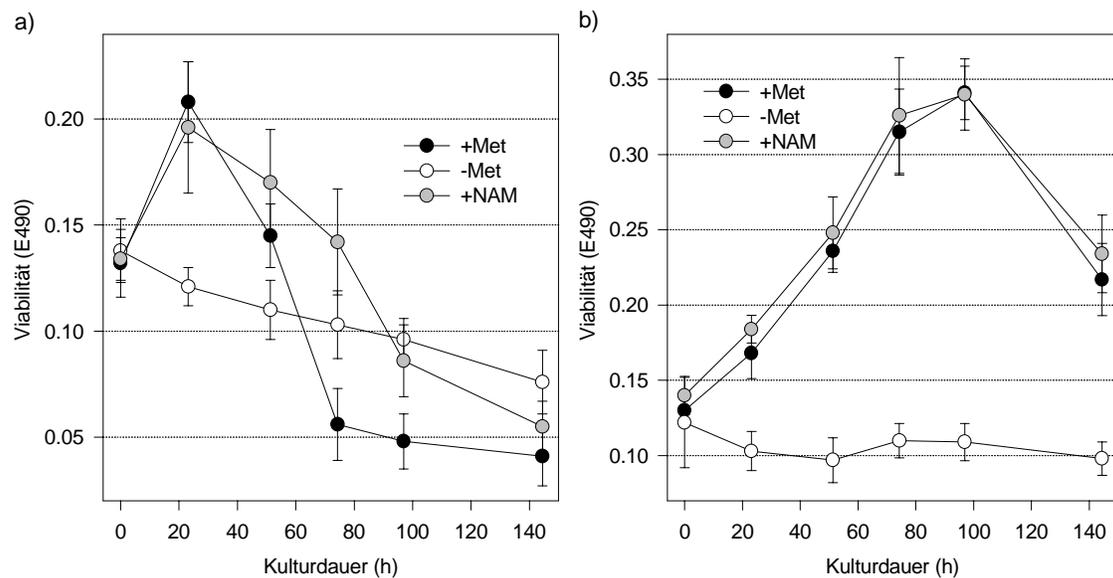


Abb. 4-14 Einfluss von *N*-Acetylmethionin (NAM) auf das Überleben von LLC-PK₁-Zellen in serumfreien Medien. **a)** Der Versuch wurde 72 h nach der 1:20 Passage gestartet, 24 h bevor die Zellen das konfluente Stadium erreichten. **b)** Der Versuch wurde 24 h nach einer 1:10 Passage, das heißt früh in der logarithmischen Wachstumsphase, gestartet. In **a)** und **b)** ist die Zellviabilität in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die Kulturen zeigten zu Versuchsbeginn die gleiche Viabilität, (◐) mit NAM, (●) mit Methionin, (○) ohne Methionin.

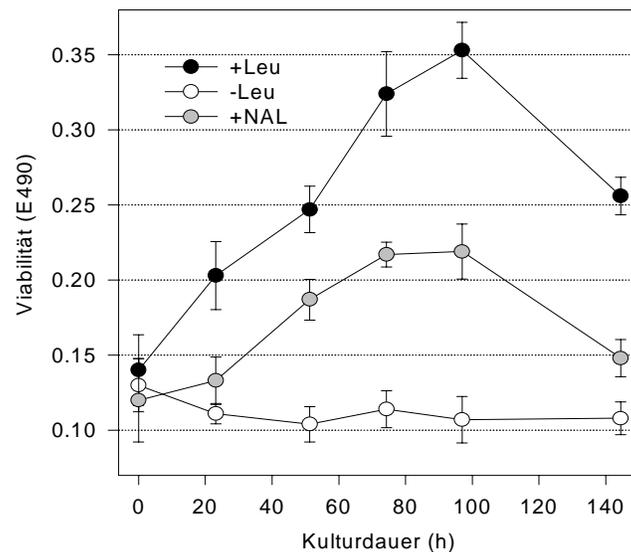


Abb. 4-15 Einfluss von *N*-Acetylleucin auf das Überleben von LLC-PK₁-Zellen in serumfreien Medien. Der Versuch entsprach dem in Abb. 4-14 b, (◐) mit NAM, (●) mit Leucin, (○) ohne Leucin.

Prinzipiell konnten die Zellen sowohl NAM als auch NAL als Aminosäurequellen nutzen. NAM wurde äquivalent verwertet (s. Abb. 4-14 b), während NAL offenbar nur

zur Hälfte verfügbar gemacht werden konnte (s. Abb. 4-15). Wurde der Versuch in der Kulturphase zu einem späten Zeitpunkt gestartet (s. Abb. 4-14 a), hatte NAM zusätzlich einen positiven Effekt auf das Überleben der Zellen. Während die Viabilität in der Methionin-Kontrolle nach drei Tagen beinahe auf das Minimum gefallen war, erreichte die der NAM-behandelten Zellen dieses Niveau erst 65 h später, am Ende der Kultur. Wurde der Versuch wie in Abbildung 4-14 b früh in der Kultur gestartet, nahm die Zellzahl für weitere 96 h zu.

NAL im Austausch gegen Leucin konnte die Viabilität der Zellen ebenfalls 96 h aufrechterhalten. Die Zellzahl stieg aber nur um knapp die Hälfte. In allen Fällen führte der Entzug von Methionin oder Leucin zu einem sofortigen Wachstumsstopp.

4.5.3 Verwertung von *N*-Acetylmethionin (NAM) in Gegenwart von Dithiothreitol (DTT)

Das Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) ist derzeit der einzige wirksame Inhibitor der *pkAyc1*, von dem sicher ist, dass er leicht durch Membranen diffundiert (Lodish *et al.*, 1992).

Nachdem eine geeignete Standard-Konzentration für DTT ausgetestet worden war (s. Abb. 4-16 a und b), ließ sich die Verwertung von NAM durch LLC-PK₁-Zellen in FCS-freiem Medium durch das Reduktionsmittel wirkungsvoll hemmen (Abb. 4-17). Für alle Versuche wurden die Zellen 1:10 subkultiviert und nach 24 h mit den FCS-freien, modifizierten Medien versetzt.

Da der MTT-Test (s. 3.3.3.1) auf der Messung des intrazellulären Reduktionspotentials beruht, war zu erwarten, dass sich der Hintergrundwert in Gegenwart von DTT erhöht. Jedoch wurden mittels Bestimmung der zellulären Proteinmasse (s. 3.3.3.2) für die Zellviabilität die gleichen Ergebnisse erhalten wie mit dem MTT-Test (s. Abb. 4-16 a und b). Unter den gegebenen Bedingungen schien DTT bis 200 μ M die Viabilität leicht zu stimulieren. Über 400 μ M aber nahm sie sowohl mit NAM als auch mit Methionin wieder deutlich ab. Daher wurden 350 μ M DDT als Standard-Konzentration des Reduktionsmittels für die nachfolgenden Versuche, insbesondere für die unter 3.3.5 beschriebenen Transportstudien gewählt.

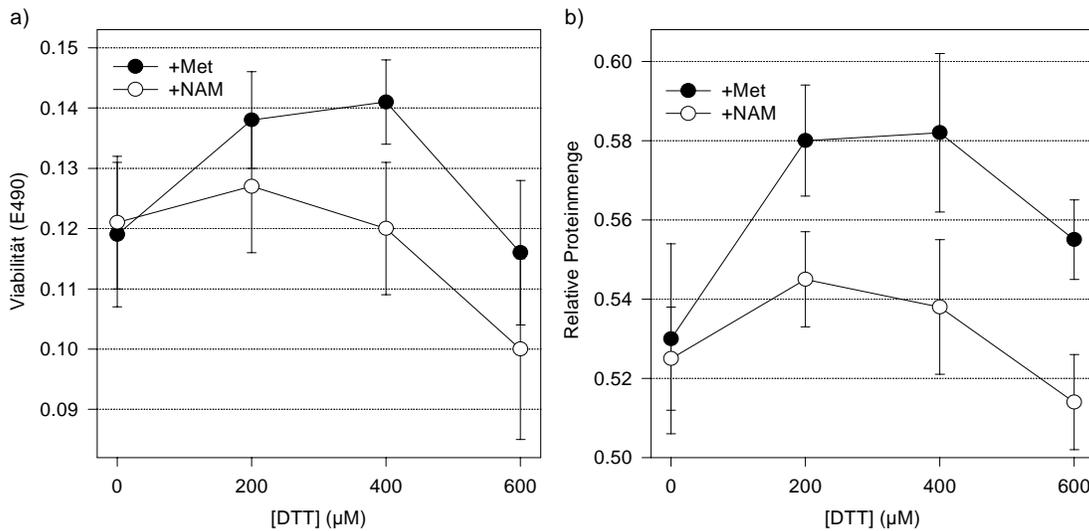


Abb. 4-16 Abhängigkeit der Viabilität von LLC-PK₁-Zellen von der Dithiothreitol (DTT)-Konzentration. 6 h Nach Zugabe der modifizierten Medien wurde mit einer 10 mM DTT-Stammlösung in PBS die DTT-Konzentration im Medium eingestellt. Nach weiteren 16,5 h wurden die Tests durchgeführt. Sowohl nach dem MTT-Test (a) als auch nach der Proteinbestimmung (b) wird deutlich, dass die zelluläre Viabilität bei allen DTT-Konzentrationen mit NAM statt Methionin verringert war. Geringe Mengen DTT wirkten stimulierend, (●) mit Methionin, (○) ohne Methionin.

Abbildung 4-17 zeigt, dass die NAM-Verwertung durch LLC-PK₁-Zellen in Gegenwart von 350 µM DTT für mindestens 8 h gehemmt wurde. NAM und Methionin ohne DTT hingegen konnten unter ansonsten gleichen Versuchsbedingungen das Zellwachstum gleichermaßen aufrecht erhalten (s. 4-14 b).

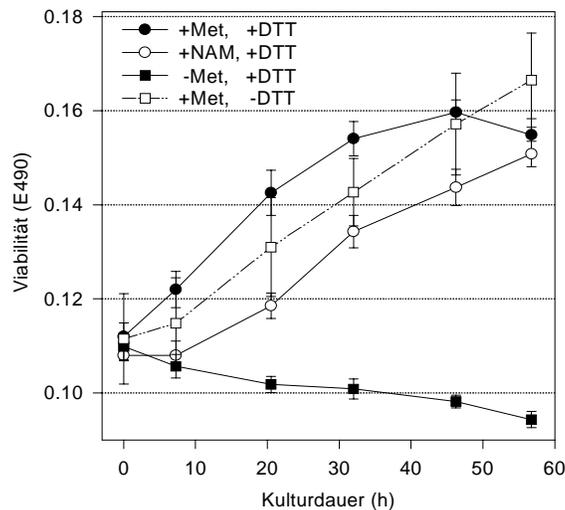


Abb. 4-17 N-Acetylmethionin (NAM)-Verwertung durch LLC-PK₁-Zellen in Gegenwart von Dithiothreitol (DTT). Die Viabilität der Kulturen ist in Abhängigkeit von der Kulturdauer dargestellt. Die Zellen wurden nach einer 1:10 Passage 24 h vorinkubiert. Zu Versuchsbeginn wurden die Kulturen in Gegenwart von 350 µM DTT mit (●) oder ohne (○) Methionin, oder ganz ohne Methioninquelle (■) inkubiert. Zur Verdeutlichung des Messwerthintergrundes wurden die Zellen mit Methionin und ohne DTT (□) inkubiert.

4.6 Acylaseaktivität in Extrakten von LLC-PK₁-Zellen

4.6.1 Einfluss essenzieller Mediumkomponenten auf die spezifische Aktivität unter serumfreien Bedingungen

Die unter 3.3.4 beschriebene Art der Herstellung von Zytoplasmaextrakten für die Enzymbestimmung war mit einem niedrigen Aktivitätsverlust verbunden. Im Gegensatz dazu gingen beim Aufschluss durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen in verschiedenen hypoosmolaren Puffern bis zu 70% der Aktivität verloren. Der Einsatz von Ultraschall führte durch die gleichzeitige Freisetzung von DNA aus dem Zellkern zu einem schlecht zu handhabenden Lysat.

Der Einfluss einer Reihe von Medienkomponenten auf die Acylaseaktivität der LLC-PK₁-Zellen unter FCS-freien Bedingungen wurde getestet. Dazu gehörten der Verzicht auf oder das Verdoppeln der Konzentrationen von L-Arginin, L-Cystin, Glukose, i-Inositol, L-Leucin, L-Methionin, Glycylglutamin oder Natriumphosphat im Standardmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, s. 3.3.2). Zusätzlich wurden die Konzentrationen von L-Lysin, L-Isoleucin oder Glycin verdoppelt, oder Methionin gegen NAM, oder Leucin gegen NAL oder α -Ketoisocaproat ausgetauscht.

Die Zellen wurden 1:10 subkultiviert, nach 24 h mit dem FCS-freien, modifizierten Medium versetzt und nach weiteren 24 h für Aktivitätstests aufgearbeitet (s. 3.3.4). Unter keiner der oben genannten Bedingungen war die spezifische Acylaseaktivität verglichen mit dem Standard und der Lösungsmittelkontrolle signifikant beeinflusst. Lediglich beim Fehlen von Methionin war die Aktivität um 15% verringert.

In Abbildung 4-18 ist dargestellt, wie sich die spezifischen Aktivitäten der LDH und der Acyl in Kulturen mit und ohne Methionin über 4 d verhielten. Die Acylaseaktivität folgte dem Wachstumstrend (vergl. Abb. 4-14 b), während die LDH-Aktivität lediglich am zweiten Tag um 25% anstieg.

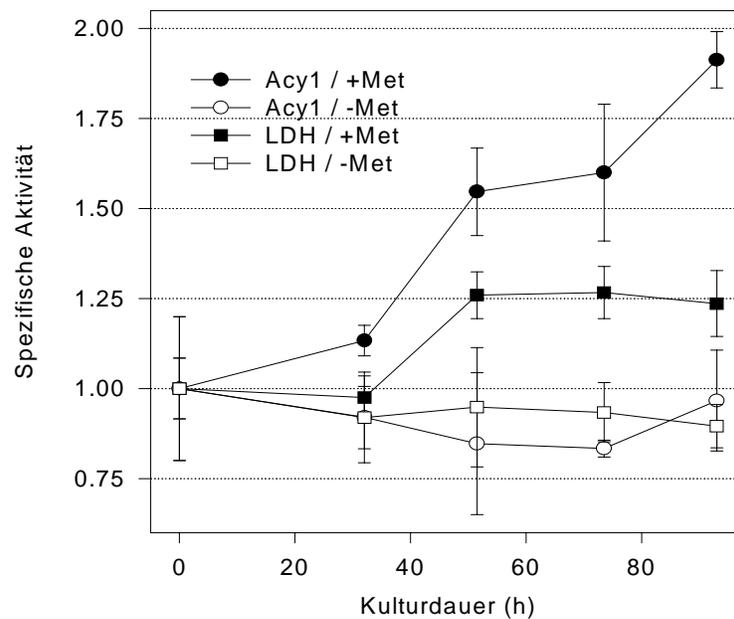


Abb. 4-18 Die spezifischen Aktivitäten der Acy1 und der Laktat-Dehydrogenase (LDH) in LLC-PK₁-Zellen mit und ohne Methionin im Kulturmedium. Die spezifische Aktivität ist in Abhängigkeit von der Kulturdauer dargestellt, (●) Acy1-Aktivität mit Methionin, (○) Acy1-Aktivität ohne Methionin, (■) LDH-Aktivität mit Methionin, (□) LDH-Aktivität ohne Methionin, zur Methodik siehe 3.3.4.

4.6.2 Einfluss von fetalem Kälberserum (FCS), Insulin und Albumin auf die spezifische Acy1-Aktivität

LLC-PK₁-Zellen wurden wie in 4.6.1 ausgesät und nach 24 h mit FCS-freiem, modifiziertem Medium versetzt. Die Versuchsmedien enthielten 10% FCS, 10 µg/ml Insulin oder 2.3 g/l Albumin. Zusätzlich zur spezifischen Acylaseaktivität wurde mit dem MTT-Test (3.3.3.1) die Viabilität über 6 d verfolgt. Die folgenden Abbildungen zeigen den Einfluss von FCS (4-19) sowie Insulin und Albumin (4-20) auf die spezifische Acylaseaktivität (a) und die Viabilität (b) der Zellen.

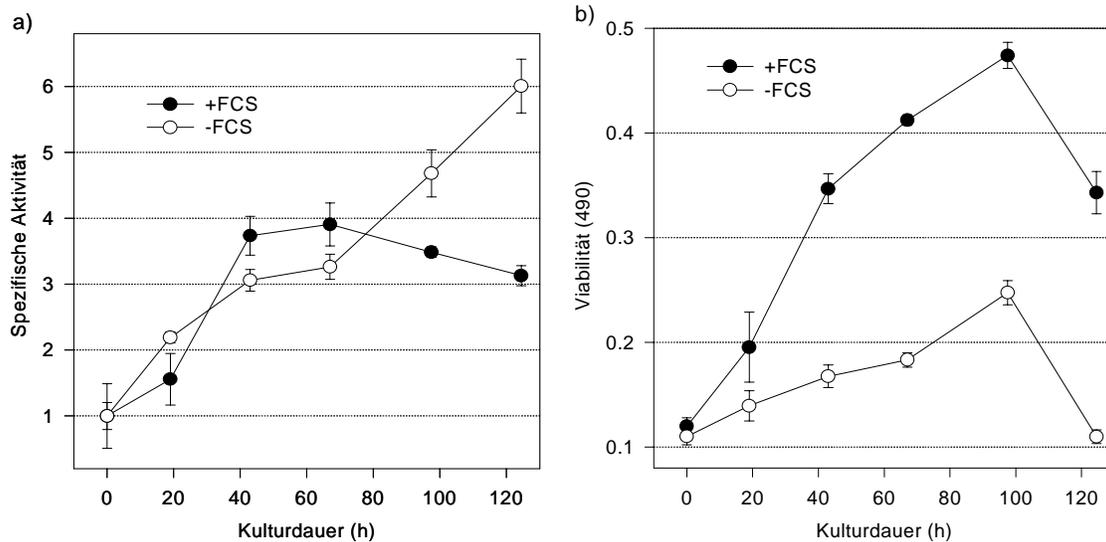


Abb. 4-19 Einfluss von 10 % fetalem Kälberserum (FCS) im Kulturmedium auf die spezifische Acyl1-Aktivität und Viabilität von LLC-PK₁-Zellen. Die spezifische Acyl1-Aktivität, die zum Zeitpunkt null 1 gesetzt wurde (a) und die zelluläre Viabilität (b) sind in Abhängigkeit von der Kulturdauer dargestellt, (●) mit FCS, (○) ohne FCS.

Während die Zellen mit FCS deutlich besser proliferierten, stieg die spezifische Acylaseaktivität unter diesen Bedingungen nach ca. 65 h bis auf das Vierfache an, um dann wieder leicht abzunehmen. Hingegen nahm die Aktivität in der Kultur ohne FCS bis zum Ende zu und erreicht das Sechsfache des Ausgangswertes. Nach 130 h war in dieser Kultur keine Viabilität mehr nachweisbar.

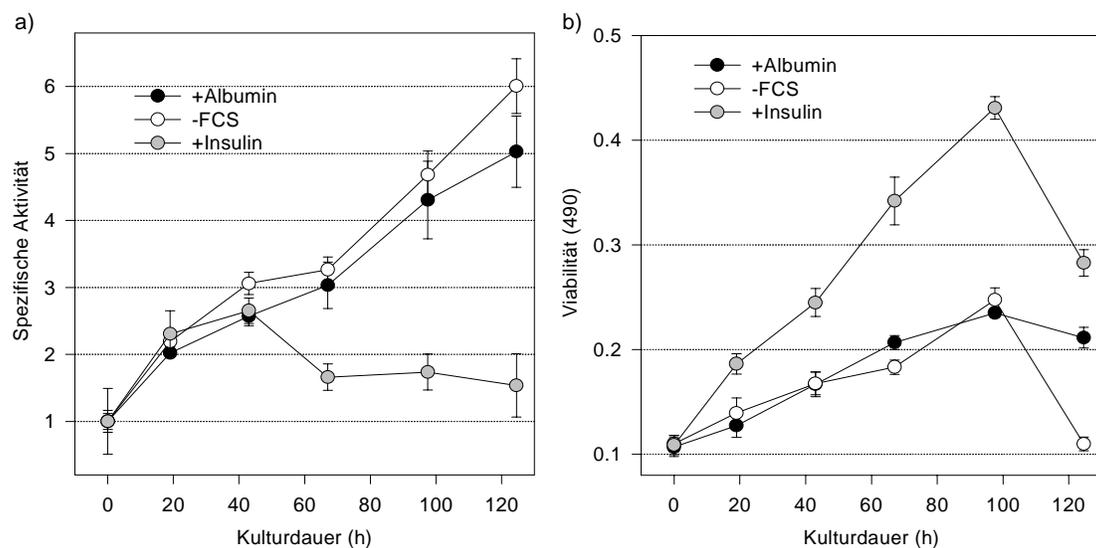


Abb. 4-20 Einfluss von 10 µg/ml Insulin und 2.3 g/l Albumin im Kulturmedium auf die spezifische Acyl1-Aktivität und Viabilität von LLC-PK₁-Zellen. Die spezifische Acyl1-Aktivität, die zum Zeitpunkt null 1 gesetzt wurde (a) und die zelluläre Viabilität (b) sind in Abhängigkeit von der Kulturdauer dargestellt, (●) mit Albumin, (○) ohne FCS, (⊙) mit Insulin.

Nach Zusatz von Albumin verhielten sich Aktivität und Wachstum im Wesentlichen wie ohne FCS. Jedoch starben die Zellen vom vierten zum fünften Tag nicht plötzlich ab. Die spezifische Acylaseaktivität war nur wenig niedriger als ohne FCS. Insulin war deutlich wachstumsstimulierend. Die Acylaseaktivität hingegen blieb mit diesem Hormon am geringsten. Nachdem sie, ähnlich wie unter allen anderen Bedingungen, nach ca. 40 Stunden auf etwa 250% gestiegen war, fiel sie wieder auf 150% ab.

4.7 Analyse von *N*-Acetylaminosäuren mit der 9-Anthryldiazomethan-HPLC-Methode

4.7.1 *N*-Acetylaminosäuren im Blutplasma

Humane Blutplasmaproben wurden wie in 3.4.2 beschrieben vorbereitet, derivatisiert, mit einer 100 µl-Probenschleife aufgetragen und chromatographiert. Eine HPLC-Kartusche konnte für 100 Läufe verwendet werden.

Die Chromatogramme in Abbildung 4-21 zeigen die isokratische Elution der 9-Anthryldiazomethan (ADAM)-Kontrolle (a) und der Plasmaprobe (b).

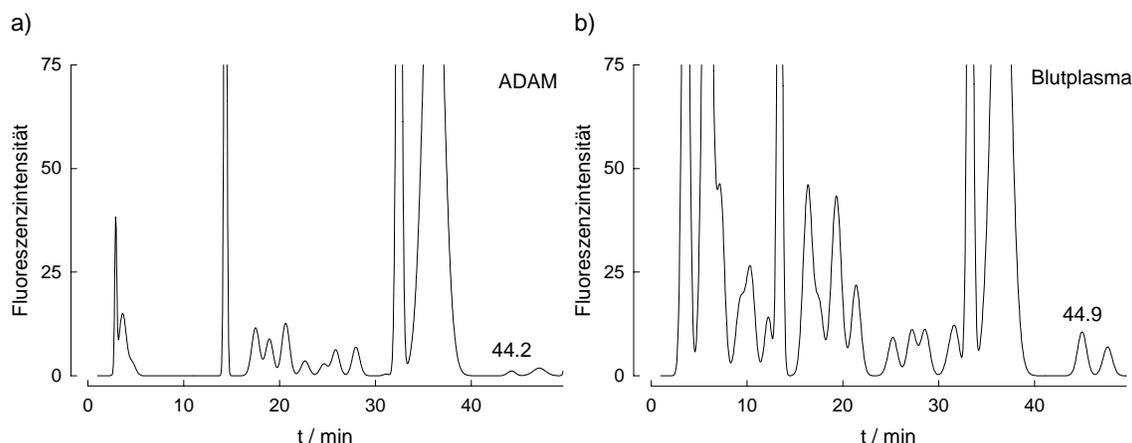


Abb. 4-21. Chromatogramme der 9-Anthryldiazomethan (ADAM)-Kontrolle (a) und der Plasmaprobe (b) nach ADAM-HPLC mit isokratischer Elution, a) ADAM wurde ohne Probe den Derivatisierungsbedingungen unterworfen und aufgetragen. b) 7 ml Blutplasma wurden zur Chromatographie aufgearbeitet. Die Fläche des Peaks bei 44.2 min in a) betrug 2.7% der Fläche des Peaks bei 44.9 min in b).

In der Plasmaprobe wurde ein einziger Peak gefunden, der sich einer *N*-Acetylaminosäure zuordnen ließ. Durch Zusatz von *N*-Acetylleucin (NAL) oder *N*-Acetylisoleucin (NAI) zu Plasmaproben (s. Abb. 4-22 a) wurde ermittelt, dass das

Laufverhalten des Peaks bei 44.9 min dem von NAL und NAI entsprach. Letztere waren mit der ADAM-HPLC-Methode nicht zu trennen und gaben bei gleichen Konzentrationen gleich starke Signale. Der Peak bei 44.2 min in der ADAM-Kontrolle (s. Abb. 4-21 a) interferierte zwar mit dem NAL/NAI Peak, war aber so niedrig, dass er vernachlässigt wurde.

Um die Identität des Peaks in der Probe mit NAL/NAI zu bestätigen, wurden von den Peaks UV- und Fluoreszenzspektren aufgenommen. Hierdurch waren die Peaks von ADAM-HPLC-Chromatogrammen jedoch generell nicht eindeutig zu unterscheiden. Eine Analyse der gesammelten Peaks mittels Massenspektrometrie scheiterte am hohen Salzgehalt der Proben. Ein Abbau von exogenem und möglichem endogenem NAL in Plasmaproben mittels Acyl1-Verdau blieb ebenfalls ohne Erfolg. Weder im Plasma selbst, noch in entproteinisierten und anschließend in Substratpuffer (s. 3.1.4.2) gelösten Proben ließ sich der NAL-Peak durch einen Acyl1-Verdau reduzieren.

Die Variation der Laufmittel-Zusammensetzung während der Elution war schließlich die einzige verbleibende Möglichkeit, die Identität des Plasma-Peaks zu überprüfen. Abbildung 4-22 zeigt Ausschnitte der Chromatogramme der Probe mit und ohne Zusatz von NAL nach isokratischer Elution (a) und mit Stufengradient (b, s. 3.4.2).

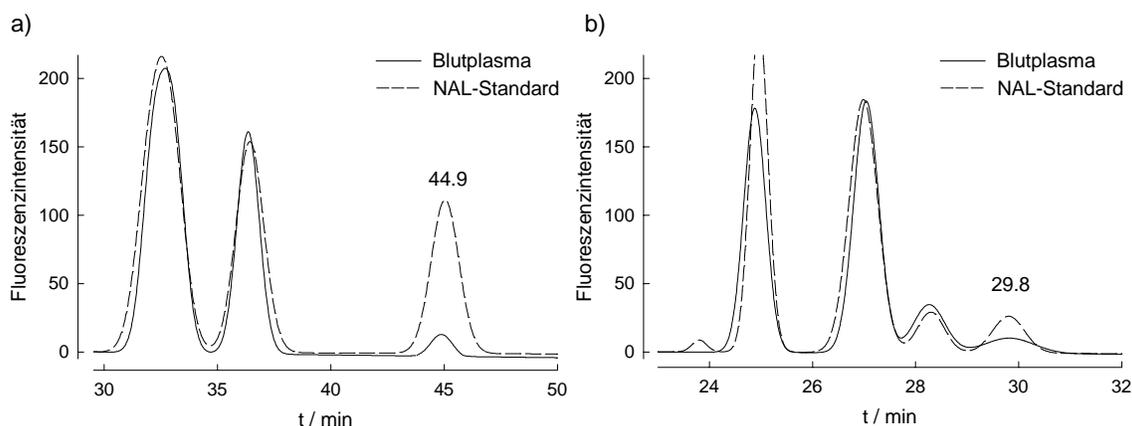


Abb. 4-22. Chromatogramme der Plasmaprobe mit und ohne *N*-Acetylleucin (NAL)-Zusatz nach isokratischer Elution (a) und mit Stufengradient (b). Die Chromatogramme der Plasmaprobe mit und ohne NAL sind jeweils übereinandergelegt. In **a**) wurde die Probe vor der Aufarbeitung zu 100 μ M mit NAL versetzt. Die Detektionsschwelle wurde soweit heraufgesetzt, dass der auf NAL bei 44.9 min folgende Peak nicht mehr erfasst wurde. In **b**) wurde die Probe zu 30 μ M mit NAL versetzt, welches bei 29.8 min eluierte.

Unter den verschiedenen Bedingungen co-eluierte der Plasmapeak jeweils mit NAL, wobei sich die Retentionszeit mit Gradient um ca. 15 min verringerte. Damit ist dieser Peak höchstwahrscheinlich mit NAL oder NAI identisch. Zwischen den beiden

charakteristischen ADAM-Peaks und NAL wurde mit dem Stufengradienten (s. Abb. 4-22 b) ein zusätzlicher Peak registriert.

Zur Quantifizierung von NAL/NAI wurden Plasmaproben ohne und mit Zusatz von NAL-Standards bei Endkonzentrationen von 100, 200 und 300 μM bestimmt. Nach dieser Eichung wurde eine NAL/NAI-Plasmakonzentration von $17 \pm 2 \mu\text{M}$ ermittelt.

4.7.2 *N*-Acetylamino-säure-Transport-Studien an LLC-PK₁-Zellen

4.7.2.1 Aminosäure-Analyse von Zellextrakten und Inkubationslösungen

Zunächst war nicht klar, ob schon während der Inkubation durch eine zelluläre Exopeptidase mit möglicher Acylaseaktivität aus dem Substrat, der *N*-Acetylamino-säure, die Aminosäure freigesetzt und dann als solche in die Zelle transportiert werden kann. Auch wenn eine derartige Aktivität nicht bekannt ist, wurden Zellen und Substratlösungen vor und nach Inkubation von bis zu 5 min auf Aminosäuren untersucht. Zur Analyse der Zellen wurden wässrige Lysate hergestellt (3.3.5.2). Von den Substratlösungen wurden 1 ml-Aliquots analysiert (s. 3.4.1). Die Konzentrationen der intrazellulären Aminosäuren blieben während der Inkubation unverändert. Allerdings wurde in den Substratlösungen registriert, dass ein geringer Anteil (<1%) des eingesetzten *N*-Acetyl-leucin (NAL) und *N*-Acetyl-methionin (NAM) von Anfang an hydrolysiert vorlagen. Die Konzentrationen der freien Aminosäuren in den Substratlösungen erhöhte sich während der Inkubation jedoch nicht.

4.7.2.2 Optimierung der Versuchsbedingungen für die ADAM-HPLC-Analytik

Die Transportstudien mit NAL und NAM wurden gemäß Abschnitt 3.3.5 durchgeführt. Zum Probenauftrag wurde eine 50 μl -Schleife verwendet. Die Elution erfolgte mit dem Stufengradienten (s. 3.4.2). In Vorversuchen wurde ermittelt, dass nach Inkubation von bis zu 5 min mit dem Substrat NAL oder NAM (je 20 mM) mindestens drei Waschschriffe notwendig waren, um Substratreste vollständig vom Zellrasen zu entfernen. Im vierten, komplett aufgearbeiteten Waschpuffer war kein Substrat mehr nachweisbar. Nach Inkubation mit 20 mM NAM oder 20 mM NAL wurde jeweils eine über 2 min lineare Aufnahme-rate beobachtet. Die gleiche Aufnahme-rate wurde beobachtet, wenn der pH der Substralösung von 7.4 statt mit NaOH mit LiOH eingestellt worden war. Daher wurden die Zellen im Folgenden standardmäßig für 2 min

mit Substrat inkubiert. Abbildung 4-23 zeigt die Trennung von NAM und NAL aus einer Kultur im gleichen Lauf.

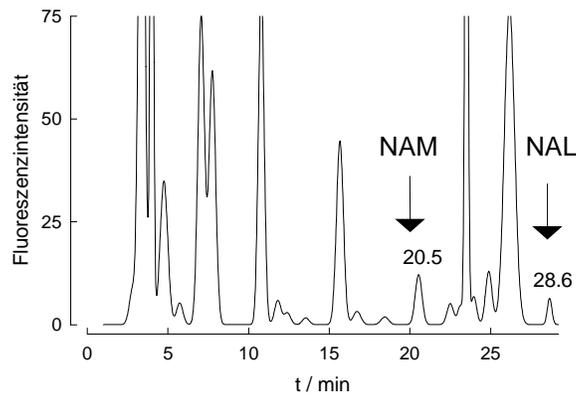


Abb. 4-23 Nachweis von *N*-Acetylmethionin (NAM) und *N*-Acetylleucin (NAL) in einem Extrakt von LLC-PK₁-Zellen. Eine Kultur war mit beiden Substraten (je 20 mM) 2 min inkubiert worden. Während der Chromatographie wurde NAM nach 20.5 min und NAL nach 28.6 min registriert.

4.7.2.3 Transport-Kinetik

Die Aufnahme von NAL durch LLC-PK₁-Zellen zeigte Sättigungsverhalten (s. Abb. 4-24). Aus drei unabhängigen Einzelexperimenten ergaben sich eine spezifische Aufnahme rate V von 0.43 ± 0.05 nmol / (min · mg Zellprotein) und eine Michaelis-Konstante K_m von 9.2 ± 2.1 mM. Das gleiche Ergebnis wurde erhalten, wenn der pH der Substratlösung zuvor mit LiOH statt NaOH eingestellt worden war.

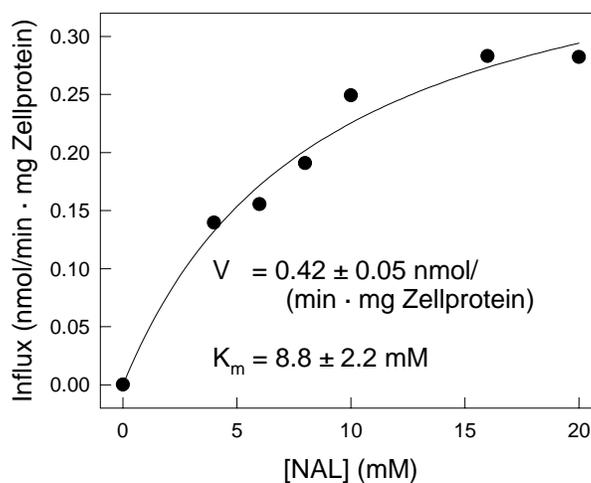


Abb. 4-24 Konzentrationsabhängigkeit der *N*-Acetylleucin (NAL)-Aufnahme durch LLC-PK₁-Zellen. Die Abbildung zeigt eines von drei Einzelexperimenten, in denen die Aufnahme rate bei verschiedenen NAL-Konzentrationen jeweils einfach bestimmt wurde.

Mit NAM konnten keine reproduzierbaren Kinetiken erhalten werden.

4.7.2.4 Hemmung des Transports

Bei allen Hemmversuchen (s. 3.3.5.4) wurden die Werte vierfach bestimmt, und das Ergebnis in drei unabhängigen Experimenten bestätigt. In den Tabellen sind die Resultate jeweils eines Experiments gezeigt. Die spezifischen Transportraten sind in Prozent der Kontrolle angegeben.

Dithiothreitol (DTT)

In Anwesenheit von DTT war die spezifische Aufnahme von NAL unbeeinflusst, während etwa 18% mehr NAM gefunden wurden (s. Tab. 4-2).

	- DTT	+ DTT
NAM -Aufnahme	100 ± 5	118 ± 3
NAL -Aufnahme	100 ± 7	100 ± 6

**Tab. 4-2 Einfluss von 350 µM Dithiothreitol (DTT) auf die spezifischen Aufnahme-
raten von N-Acetyl-leucin (NAL) und N-Acetyl-methionin (NAM) durch LLC-PK₁-Zellen.** Die Zellen wurden in Gegenwart von DTT äquilibriert und mit den Substraten inkubiert.

Proteinbiosynthese-Hemmstoffe

Durch Vorbehandlung mit Cycloheximid wurde die spezifische Aufnahme von NAL nicht verändert. Mit Tunicamycin dagegen verringerte sich die Aufnahme um etwa 28% (s. Tab. 4-3).

	NAL-Aufnahme
Kontrolle	100 ± 5
Cycloheximid	97 ± 7
Tunicamycin	72 ± 10

**Tab. 4-3 Einfluss von 10 µg/ml Cycloheximid und 0.1 µg/ml Tunicamycin auf die spezifischen Aufnahme-
raten von N-Acetyl-leucin (NAL) durch LLC-PK₁-Zellen.** Die Kultur wurde je 20 h mit dem Inhibitor vorinkubiert.

Energieabhängigkeit

Die Vorinkubation mit einem 'Energy Depleting Medium' führte zu einer um etwa 31% reduzierten spezifischen NAL-Aufnahmerate, während die NAM Aufnahme praktisch unverändert blieb (s. Tab. 4-4).

	Kontrolle	- ATP
NAM -Aufnahme	100 ± 7	96 ± 11
NAL -Aufnahme	100 ± 6	69 ± 8

**Tab. 4-4 Einfluss von 10 mM NaN₃ und 20 mM 2-Deoxy-D-Gulose auf die spezifischen Aufnahme-
raten von N-Acetyl-leucin (NAL) und N-Acetyl-methionin (NAM) durch LLC-PK₁-Zellen.** Durch eine 30minütige Vorinkubation wurde der ATP-Spiegel der Zellen gesenkt.

4.8 Multiple Sequenz-Alignments

Zuletzt hatte Palm ein Alignment mehrere Acylasen erstellt. Dazu gehörten neben der hkAcy1 und der pkAcy1 die Carboxypeptidase G2 (CPG2) aus *Pseudomonas*, die Carboxypeptidase S aus *S. cerevisiae*, die N-Acetylmethioninase (NAO) und die Succinyl-Diaminopimelat-Desuccinylase (Desuccinylase) aus *E. coli* (Palm, 1994).

Derzeit umfasst die Acylasefamilie 36 Sequenzen. Zur Erstellung eines Alignments als Grundlage zukünftiger Strukturuntersuchungen wurden zwei über das Internet verfügbare Programme verwendet: Multalin version 5.3.3 und Dialign 2.0. Zunächst wurde für 13 Mitglieder der Acylasefamilie ein komplettes Alignment erstellt (s. Abb. 4-25). Daraufhin wurden die Sequenzen von weiteren 14 Acylasen in sechs hochkonservierten Bereichen ergänzt (s. Abb. 4-26). In Tabelle 4-5 sind die in den Abbildungen 4-25 und 4-26 benutzten Abkürzungen der Organismen und Enzyme zusammengestellt.

Die ersten 127 Reste der NAO aus *Arabidopsis thaliana* (GeneBank Accession # CAB10562, nicht dargestellt) sind in diesem Bereich hoch homolog zur NAO aus *Dictyostelium discoideum*. Die C-terminalen Sequenzen der Desuccinylase aus *Aquifex aeolicus* und dem 'Dipeptidase Homolog' aus *Mycobacterium hominis* sind nicht verfügbar.

Neben den metallbindenden Resten His112, Glu176, Glu200, His385 und dem verbrückenden Asp141 sind nach CPG2-Zählung folgende Aminosäurereste in allen Acylasen konserviert: Asp114, Gly136, Glu175, His229, Asn139 und Glu390. Abgesehen von einer Reihe unpolarer Reste sind folgende Reste hochkonserviert: Glu130, Lys143 und Thr362. Die beiden PWW-Motive sind für die Säugerenzyme hkAcy1 und pkAcy1 einzigartig.

Abb. 4-25 Multiples Alignment der vollständigen Proteinsequenzen von 13 Mitgliedern der Acylasefamilie. Reste, welche in mindestens fünf Enzymen konserviert sind, sind nach Gruppen getrennt, invers und farbig dargestellt: hydrophobe Reste (V, I, L, F, M, Y und W) sind grün, kleine Reste (G, A, S, T, und C) gelb, Serin und Threonin schwarz, Prolin zyanblau, aromatische Reste (W, F, H, Y) purpur, saure Reste (D und E) rot und basische Reste (R, K und H) blau. Reste aus der gleichen Gruppe sind an diesen Positionen ebenfalls entsprechend farbig hervorgehoben. Reste, die diese in kontextabhängiger Weise ersetzen können, sind farbig aber nicht invers gezeigt. Glutamin und Asparagin sind rot und nie invers gedruckt. An Positionen mit konserviertem Prolin ist Glycin ebenfalls zyanblau gefärbt. Ob Tyrosin und Tryptophan als hydrophobe oder aromatische Reste gezeigt sind, und ob Serin und Threonin den kleinen Resten zugerechnet werden oder nicht, wird durch die an der jeweiligen Position dominierende Eigenschaft bestimmt. Die PWW-Motive sind magenta hinterlegt. Die für die Enzyme und Organismen verwendeten Abkürzungen finden sich in Tabelle 4-5. ⌘: tryptische Spaltstelle in der pkAcy1 nach Palm (1994); ↑: Liganden für die Zinkionen der *Pseudomonas*-CPG2 nach Rowsell *et al.* (1997)

Enzyme	Organismen
CPG2 : Carboxypeptidase G2	PSES6 : <i>Pseudomonas</i> sp. strain RS-16U
PEPT : Peptidase T	BACSU : <i>Bacillus subtilis</i>
ACY1 : Acylase 1	ECOLI : <i>Escherichia coli</i>
ARGE : N-Acetylornithinase	HAEIN : <i>Haemophilus influenzae</i>
DAPE : Desuccinylase	LACLC : <i>Lactococcus lactis</i>
CPS1 : Carboxypeptidase S	SALTY : <i>Salmonella typhimurium</i>
PEPV : Peptidase V	HUMAN: <i>Homo sapiens</i>
YGEY : 'Putative Deacetylase'	PIG : <i>Sus scrofa</i>
ORF6 : 'Dipeptidase Homolog'	DICDI : <i>Dictyostelium discoideum</i>
	CORGL : <i>Corynebacterium glutamicum</i>
	HELPHY : <i>Helicobacter pylori</i>
	RICPR : <i>Rickettsia prowazekii</i>
	MYCTU: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	ARCFU : <i>Archaeoglobus fulgidus</i>
	AQUAE: <i>Aquifex aeolicus</i>
	LISMO : <i>Listeria monocytogenes</i>
	METJA : <i>Methanococcus janaschii</i>
	THEMA: <i>Thermogota maritima</i>
	PYRHO : <i>Pyrococcus horikoshii</i>
	YEAST : <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	LACDL : <i>Lactobacillus delbrueckii</i>
	MYCHO: <i>Mycobacterium hominis</i>

Tab. 4-5 Abkürzungen der Enzyme und Organismen in den Alignments (Abb. 4-25 und 4-26).

Abb. 4-26 Multiples Alignment sechs hochkonservierter Bereiche von 27 Mitgliedern der Acylasefamilie. Alle Reste sind den Vorgaben in Abbildung 4-25 entsprechend farbig dargestellt. Am Ende sind die Datenbanken (SwissProt (SP), GeneBank (GB), PIR und PRF) mit den 'Accession Numbers' der Sequenzen angegeben. Die Abkürzungen der Enzyme und Organismen finden sich in Tabelle 4-5.

5 Diskussion

5.1 Rekombinante Expression der Säugeracylasen mit dem BEVS

5.1.1 Enzymreinigung

Die rekombinante Expression der Acylase 1 von Schwein und Mensch in SF21-Zellen liefert in beiden Fällen ein Enzym, das weder chemisch noch funktionell von dem aus der Nierenrinde gereinigten zu unterscheiden ist (Pittelkow *et al.*, 1998).

In dieser Arbeit wurden zwei Mutanten der hkAcy1 zwecks Untersuchung der PWW-Motive (s. 5.1.2) sowie die Wildtyp-Enzyme von Schwein und Mensch zu Vergleichszwecken und zur Charakterisierung von *N*-Formylmethionin als möglichem Acylasesubstrat (s. 5.4) exprimiert und gereinigt. Dabei zeigten die beiden Mutanten der hkAcy1 das gleiche Reinigungsverhalten wie der Wildtyp (s. 4.1.3). Bei der Chromatographie über Phenylsepharose CL-4B[®] wurde die pkAcy1 mit einem Ethylenglycolgradienten typischerweise bei 50% eluiert, während die hkAcy1 wie auch deren PWW1- und die PWW2-Mutante erst bei 60% eluiert wurde. Abbildung 4-2 zeigt am Beispiel der hkAcy1, dass bereits nach zwei säulenchromatographischen Reinigungsschritten ein Enzym erhalten wurde, welches nach Silberfärbung im SDS-PAGE homogen erschien. Die Ausbeute von 2 bis 4 mg pro 100 ml Expressionskultur entsprach etwa der Enzymmenge, die sich aus zwei bis drei Säugernieren gewinnen lässt (Lindner, 1996).

5.1.2 Haben die PWW-Motive der Säugeracylasen strukturgebende Funktion?

Die Hypothese, die beiden PWW-Motive der Säugeracylase könnten eine spezifische Assoziation des Enzyms mit der zytosolischen Seite von Membranen vermitteln (s. 1.2.3), ist mit den Ergebnissen der unter 5.2 diskutierten Zellfraktionierungsversuche nicht vereinbar.

Dennoch wurde vermutet, dass die beiden für die Säugerenzyme charakteristischen Sequenzabschnitten eine spezifische, strukturgebende Funktion haben. Mit dem Ziel,

durch eine proteinchemische Charakterisierung von geeigneten Mutanten diese Funktion aufzuklären, wurden die zwei Tryptophane beider PWW-Motive jeweils gegen Alaninreste ausgetauscht. Die beiden Mutanten PWW1 und PWW2 wurden wie das Wildtyp-Enzym exprimiert und gereinigt (s. 3.1 und 4.1). Die Expression einer Mutante, in der beide Motive gleichzeitig entsprechend manipuliert waren, gelang nicht. Es ist anzunehmen, dass das gleichzeitige Fehlen beider PWW-Motive die korrekte Faltung des Proteins verhinderte. Das instabile Translations-Produkt unterlag möglicherweise einem raschen Abbau oder war zytotoxisch.

Aus ihrem dem Wildtyp entsprechenden Reinigungsverhalten und der vorhandenen Aktivität geht hervor, dass die PWW1- und die PWW2-Mutante allgemein korrekt gefaltet vorlagen. Dies wurde von Berens durch CD-Spektroskopie bestätigt (Berens, 1999). Die Kinetiken des Wildtyps und der PWW2-Mutante mit NAM als Substrat unterschieden sich praktisch nicht (vergl. Abb. 4-3 a und 4-4). Berens bestimmte auch die Kinetik der PWW1-Mutante. Ihre Halbsättigungskonzentration war im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls unbeeinträchtigt. Jedoch war die spezifische Aktivität der PWW1-Mutante im Vergleich zur Wildtypaktivität um den Faktor 18 verringert (s. 4.1.3). Projiziert man auf der Grundlage des Alignments in Abbildung 4-25 die Position des PWW1-Motivs in die Struktur der Carboxypeptidase G2 (CPG2) aus *Pseudomonas*, so fällt auf, dass die Sequenz am Beginn der Dimerisierungsdomäne in einem β -Faltblatt-Abschnitt zu liegen kommt, welches einer Öffnung des katalytischen Zentrums an der Oberfläche der katalytischen Domäne direkt benachbart ist (s. Abb. 5-1). Damit wäre eine Beteiligung dieser Reste an der Bildung des funktionsfähigen katalytischen Zentrums nicht auszuschließen, ohne dass allerdings der Substratbindungsschritt durch die Mutation betroffen wäre. Die Beobachtung, dass die Hydrolyserate der PWW2-Mutante kaum beeinträchtigt war, korreliert gut mit der entsprechenden Projektion dieser Reste in die Helix E am Beginn des *N*-terminalen Anteils der katalytischen Domäne (s. Abb. 5-1). Hier wäre das Motiv dem Lösungsmittel zugewandt und könnte für die beschriebenen hydrophoben Oberflächen des Enzyms (vom Bruch und Röh, 1988) mitverantwortlich sein. Auch die Neigung des Enzyms zur Bildung höherer Oligomere (Heese, 1989) ließe sich durch hydrophobe Wechselwirkungen erklären.

Abb. 5-1 Übertragung der Position der PWW-Motive auf die Struktur *Pseudomonas-Carboxypeptidase G2*. α -Helices sind rot und β -Faltblätter grün gezeichnet. Die Metallionen im dinukleären Zinkzentrum sind hellblau dargestellt. Die dem PWW1-Motiv entsprechenden Reste Ile217, Ala218 und Tyr219 sowie die dem PWW2-Motiv entsprechenden Reste Lys334, Lys335 und Leu336 sind violett hervorgehoben. Ersteres liegt in einem β -Faltblatt der Dimerisierungsdomäne, einer Öffnung des Metallzentrums zur Oberfläche gegenüber. Dagegen liegt die Position des PWW2-Motivs in einer α -Helix der katalytischen Domäne (Helix E), die dem Lösungsmittel zugewandt ist.

Die proteinchemische Charakterisierung der Mutanten durch Berens führte zu den folgenden Resultaten und Folgerungen (Berens, 1999).

1. Eine atomabsorptionsspektroskopische Metallbestimmung ergab, dass beide Mutanten wie der Wildtyp ein Zinkion pro Monomer enthielten. Der große Aktivitätsverlust der PWW1-Mutante war also nicht auf einen Metallverlust zurückzuführen.
2. Nach der Reinigung befand sich die Acyl1 immer noch in ca. 5% Ethylenglycol und konnte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für mindestens 6 Monate ohne Aktivitätsverlust gelagert werden. Berens untersuchte die Stabilität des dimeren Zustandes des Enzyms mittels Gelfiltration nach einer Dialyse gegen wässrigen Puffer und Lagerung bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Während der Wildtyp für mindestens 2 d stabil war, zerfiel die PWW1 Mutante zu etwa 10% in das inaktive Monomer. Offenbar vermittelt das Motiv durch seine Lage nahe am Übergang beider Proteindomänen eine Stabilisierung des Dimers. Unter den gleichen Bedingungen war von der PWW2-Mutante nur noch ein Abbauprodukt von etwa 26 kDa nachweisbar. Die Mutation hatte das Enzym offenbar für verunreinigende

Proteasen angreifbar gemacht. Folglich empfiehlt es sich, künftig die Reinigung von Mutanten in Gegenwart von Proteaseinhibitoren durchzuführen.

Ferner fiel bei der Molmassenabschätzung durch die Gelfiltration die PWW1-Mutante (88 kDa) durch eine um etwa 7 kDa verringerte molare Masse gegenüber dem Wildtyp (95 kDa) auf. Dies weist auf einen veränderten Stokeschen Radius hin und könnte durch eine weniger stark gestreckte Lage der beiden Domänen zueinander verursacht sein. In der Kristallstruktur der CPG2 nehmen die Dimerisierungs- und die katalytische Domäne zueinander eine gestreckte Position ein. Die oben diskutierte vermutliche Position des PWW1-Motivs (s. Abb. 5-1) lässt einen Einfluss auf die relative Lage beider Domänen zueinander gut vorstellbar erscheinen.

3. Die Bestimmung der thermischen Stabilität aller drei Enzyme und der chemischen Stabilität des Wildtyps sowie der PWW2-Mutante gegenüber Guanidin-hydrochlorid weisen auf eine abnehmende Enzymstabilität in der Reihenfolge Wildtyp > PWW1-Mutante > PWW2-Mutante hin. Dabei war die Stabilisierungsenthalpie der PWW2-Mutante um den Faktor vier reduziert, was unter anderem ihren raschen Abbau in wässrigem Puffer erklärt.

4. Schon seit langem ist bekannt, dass in der *pkAcy1* durch Behandlung mit dem tryptophanspezifischen Modifizierungsreagenz *N*-Bromsuccinimid (NBS) zwei Tryptophanreste pro Monomer unter vollständigem Aktivitätsverlust oxidiert werden (Kördel und Schneider, 1976b). Letztlich wurde gezeigt, dass pro Monomer vier der insgesamt acht Tryptophane einer solchen Modifikation zugänglich sind (Chen *et al.*, 1997). Berens konnte durch Fluoreszenz-Quenchversuche mit Kaliumjodid zeigen, dass von den neun Tryptophanen der *hkAcy1* nur die vier Tryptophane der beiden PWW-Motive wesentlich von einem direkten Quenching mit Kaliumiodid betroffen sind, und damit die einzigen oberflächlich gelegenen Tryptophane im Protein darstellen. Dabei befinden sich die in der PWW1-Mutante ausgetauschten Tryptophane in einer deutlich unpolaren Umgebung als die in der PWW2-Mutante. Ihre Mutation verringerte die Fluoreszenzausbeute um 35%.

Die Annahme liegt nahe, dass die exponierten Tryptophanreste der PWW-Motive auch in der *pkAcy1* die vier Reste sind, die am schnellsten mit NBS reagieren. Bei den vier von Chen *et al.* modifizierten Tryptophanen (Chen *et al.*, 1997) handelt es sich also vermutlich um die Reste der beiden PWW-Motive. Der mit der NBS-Modifizierung einhergehende Aktivitätsverlust lässt sich möglicherweise auf einen der Reste des

PWW1-Motivs zurückführen (s. 1.2.2.1, Kördel und Schneider, 1976b; Chen *et al.*, 1997). Auch könnte das nach einem Modell von vom Bruch und Röhm durch die Ionisierung eines Histidinrestes im aktiven Zentrum verstärkte Quenching der Fluoreszenz eines Tryptophans einen Rest des PWW1-Motivs betreffen (s. 1.2.2.1, vom Bruch und Röhm, 1988).

Die proteinchemischen Eigenschaften der Mutanten sprechen schließlich dafür, dass die beiden PWW-Motive eine voneinander unabhängige Rolle für die Struktur der Säugeracylase spielen. Die aus den Ergebnissen von Berens (Berens, 1999) abgeleiteten Annahmen stützen sich auf das Alignment der Sequenzen (s. Abb. 4-25) und setzen eine gewisse Strukturhomologie zwischen der CPG2 und der Acy1 voraus. Da in den fraglichen Sequenzabschnitten jedoch keine Sequenzhomologie vorhanden ist, sind die Projektionen der Motive in die Struktur der CPG2 als kritisch anzusehen. Im Bereich sowohl des PWW1- als auch des PWW2-Motivs muss bei der Acy1 mit einer von der CPG2 deutlich verschiedenen Struktur gerechnet werden.

5.1.3 Die PWW→PWR-Mutation im PWW1-Motiv der Acylase 1 in einer Tumorzelllinie

Miller und Mitarbeiter beschrieben neben anderen das Fehlen von Acylaseaktivität und zum Teil auch von Acylaseantigen bei einer Reihe von Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (SCLC, s. 1.3.3, Miller *et al.*, 1989). In einer dieser Zelllinien, der NCI-H711, wurde kürzlich eine Punktmutation in der isolierten Acy1-mRNA gefunden. Das Codon 195⁵ lautet **GGC** statt **GGT**. Es steht damit für Arginin anstelle von Tryptophan und codiert im PWW1-Motiv für **PWR**. Gleichzeitig konnten keine Wildtyp-Transkripte nachgewiesen werden. Die Autoren schreiben dieser Mutation eine Inaktivierung des Enzyms zu, wiesen das mutierte Enzym in den Zellen selbst aber nicht nach (Cook *et al.*, 1998). Auch zuvor war in dieser Zelllinie der Nachweis von Acylaseantigen mittels ELISA gescheitert (Miller *et al.*, 1989). Es liegt also der Schluss nahe, dass das der mutierten Acy1-mRNA entsprechende Polypeptid in den Zellen nicht gebildet oder sofort wieder abgebaut wird.

⁵ Die Autoren zählen das Initiator-methionin mit.

5.2 Bindet die Acy1 spezifisch an Membranen?

Die Primärstruktur der Acy1 enthält kein bekanntes Motiv, welches theoretisch eine Membranlokalisation oder eine kovalente Modifizierung des Enzyms zwecks einer Membranassoziation veranlassen könnte. Auch mit Hilfe der neuen Version des Programms PSORT, PSORT II⁶, einer Software zur Detektion von 'Sorting Signals' und der Vorhersage der subzellulären Lokalisation eines Proteins aufgrund seiner Aminosäuresequenz (Nakai und Horton, 1999), wurde die Acy1 als lösliches, cytosolisches Protein eingestuft. Dennoch wurde in der Literatur lange Zeit ein möglicher Membrankontakt der pkAcy1 diskutiert (Heese *et al.*, 1988; Palm und Röhm, 1996; Giardina *et al.*, 1997).

Der Nachweis einer potentiellen Membranständigkeit durch Immunfärbung und anschließende Mikroskopie von Acy1-bildenden Zellen ist wenig aussichtsreich, da nur etwa 0.5% der gesamten Enzymmenge nach der Differentialzentrifugation diese Verteilung aufweisen (s. Abb. 4-8, Greenhough und Turner, 1991).

Greenhough und Turner führten Solubilisierungsversuche durch, indem sie eine Membranvesikel-Präparation der Schweineniere mit einer Reihe nichtionischer Detergenzien behandelten, und dann die Acy1-Aktivität und die Aktivitäten verschiedener Enzyme der Bürstensaum-Membran im löslichen und im partikulären Anteil bestimmten (Greenhough und Turner, 1991). Im Gegensatz zur alkalischen Phosphatase und zur renalen Dipeptidase, welche beide über einen GPI-Anker membrangebunden sind, war die Acy1 mit jedem Detergenz zu mindestens 90% solubilisierbar. Allerdings war ihr Solubilisierungsmuster dabei kaum von dem der Endopeptidase-24,11 zu unterscheiden. Die Endopeptidase-24,11 ist über eine hydrophobe Aminosäure-domäne peripher an die Membran gebunden. In einem Phasenseparations-Experiment mit Triton X-114 hingegen verhielt sich die pkAcy1 deutlich anders als die Endopeptidase-24,11. Während die mikrosomale Acy1 in der detergenzarmen Phase verblieb, reicherte sich die Endopeptidase-24,11 vornehmlich in der detergenzreichen Phase an. Die Autoren beurteilten die membrangebundenen Anteile der Acy1 daraufhin als Präparationsartefakt (Greenhough und Turner, 1991).

Greenhough und Turner zeigten durch ihre Experimente, dass die pkAcy1 keinen amphipatischen Charakter hat, wie er für periphere Membranproteine typisch ist. Jedoch

⁶ URL: <http://psort.nibb.ac.jp>

wurde in den Versuchen keine Negativkontrolle, ein zytosolisches Markerenzym, getestet. Es wurde demnach nicht klar, ob es sich bei der Membranbindung der Acyl1 um eine artifizielle Assoziation des Enzyms mit den Vesikeln handelte, wie sie auch für andere zytosolische Proteine nach einer Membranpräparation zu erwarten ist, oder ob die Bindung spezifisch für die Acyl1 ist.

In dieser Arbeit wurden erneut Membranvesikel aus der Schweineiere für Solubilisierungs- und Dichtgradienten-Zentrifugations-Experimente präpariert (s. 3.2). Neben der Acyl1-Aktivität wurde die der Laktat-Dehydrogenase (LDH) als zytosolischer Marker bestimmt. Die alkalische Phosphatase wurde als Plasmamembranmarker und die α -Galactosidase als lysosomaler Marker gewählt. Sollte die Nierenacylase in der Tat, wie in 1.4.3.1 vorgeschlagen, beim Aminosäure-’Salvage’ eine Rolle spielen, so könnte eine Bindung an die Innenseite der Plasmamembran das Enzym in die unmittelbare Nähe von möglichen *N*-Acetylaminosäure-Transportern und damit von ihren Substraten bringen. Die Wahl eines lysosomalen Markers hatte insofern Sinn, als diese Vesikel Kompartimente des Proteinabbaus sind (s. 5.3, Berg *et al.*, 1995) und die Acyl1 hier, ähnlich wie an der Plasmamembran, in der Nähe ihrer Substrate lokalisiert wäre.

Die über 20fach höhere Anreicherung der Membranmarker gegenüber der Acyl1 und der LDH spricht für eine Anreicherung der entsprechenden Membranen in den Mikrosomen (s. Abb. 4-6). Die Beobachtung, dass nach dem Auftauen der Vesikel nur noch 60% der LDH gegenüber noch fast 100% der pkAcyl1 membrangebunden vorlagen, spricht allerdings für einen deutlichen Unterschied in der Qualität der Bindung. Mit den nichtionischen Detergenzien Deoxycholat und Triton X-100 war die pkAcyl1 wie bei Greenhough und Turner (Greenhough und Turner, 1991) zu 90% solubilisierbar, während keine partikuläre LDH mehr nachgewiesen werden konnte. Die Darstellung der Solubilisierung mit CHAPS in Abbildung 4-7 macht die stärkere Membranbindung der pkAcyl1 gegenüber der LDH besonders deutlich.

Die Spezifität einer möglichen Bindung von Acyl1 an Membranen sollte mittels einer Dichtgradienten-Zentrifugation überprüft werden. Die Verteilung der Enzymaktivitäten des postmitochondrialen Überstandes im Saccharose-Dichtegradienten macht die Trennung von Plasmamembran- und lysosomalen Vesikeln erkennbar, an die offenbar keine bedeutende Menge Acyl1 gebunden war (s. Abb. 4-8). Um den geringen Anteil der sedimentierenden Acyl1 und LDH überhaupt erkennbar zu machen, wurden diese

Aktivitäten halblogarithmisch aufgetragen (s. Abb. 4-9). Beide Enzyme zeigten im Gradienten Peaks oder Schultern an nahezu den gleichen Positionen, statt mit einer bestimmten Vesikelfraktion zu sedimentieren. Dies weist deutlich darauf hin, dass die Acyl im postmitochondrialen Überstand zu einem geringen Anteil unspezifisch Bindungen mit Membranen eingeht, die von denen der LDH nicht zu unterscheiden sind. Bei Betrachtung der Auftrennung der mikrosomalen Fraktion im Dichtgradienten wurde offenbar, dass die unterschiedlichen Qualitäten der Membranfraktionen nach der Hochgeschwindigkeits-Zentrifugation verloren gegangen sind. Wahrscheinlich ist bei diesem Präparationsschritt auch die starke Bindung der Acyl an die Membranen erst entstanden.

Letztendlich lässt sich auf der Basis von Differential-Zentrifugations-Experimenten keine spezifische Membranassoziation der Acyl postulieren. Auch besteht bisher, zum Beispiel aufgrund funktioneller Studien, kein Anlass dazu, eine solche Lokalisation zu vermuten. Die Acyl muss demnach als ein rein zytosolisches Enzym betrachtet werden. Allerdings fällt sie durch die Bildung einer relativ starken Membranassoziation nach der Hochgeschwindigkeit-Zentrifugation auf. Ob schon während eines frühen Schrittes in der Vesikelpräparation eine spezifische Membranbindung der Acyl gelöst wurde, ist wahrscheinlich nur durch die Wahl einer anderen Vesikelseparationstechnik, zum Beispiel der 'free-flow'-Elektrophorese, weiter zu untersuchen.

5.3 Sind N-Acetylaminosäuren aus dem intrazellulären Proteinabbau die bevorzugten Substrate der Nierenacylase?

In Abschnitt 1.4.3 wurde über mögliche Funktionen der Nierenacylase nachgedacht. Im Folgenden wird vor dem Hintergrund der zellulären Acyl-Lokalisation diskutiert, ob die allgemeine Aufgabe des Enzyms, N-Acetylaminosäuren aus dem Proteinabbau zu hydrolysieren, auch eine der Hauptaufgaben der Nierenacylase sein kann. Die Möglichkeit, dass das Ultrafiltrat eine wichtige Quelle für N-Acetylaminosäuren ist, wird in Abschnitt 5.9 besprochen.

Die Untersuchung der zellulären Lokalisation der pAcyl mittels *in situ*-Hybridisierung zeigte, dass das Enzym im gesamten Nierenepithel gebildet wird (Höpfner, 1999;

Lindner *et al.*, 1999). Diese Beobachtung sowie die rein zytosolische Lokalisation des Enzyms (s. 5.2) weisen nicht auf eine Rolle der Nierenacylase bei der Modifizierung des Primärharns hin (s. 1.3.2). Vielmehr scheint das Enzym im gesamten Nierenepithel essenzielle Aufgaben zu haben. Das Nierenepithel, insbesondere der proximale Tubulus, spielt beim Metabolismus von niedermolekularen Plasmaproteinen, Peptiden und Aminosäuren, die im Ultrafiltrat enthalten sind, eine wichtige Rolle (s. 5.9). Dabei wird die Funktion des Tubulusepithels primär im Katabolismus von ultrafiltrierten Proteinen und Peptiden sowie dem Recycling der Aminosäuren gesehen. Um jedoch die Rolle der Niere im Proteinturnover des gesamten Organismus beurteilen zu können, muss man zusätzlich die Proteinsynthese und -abbauraten betrachten. Untersuchungen zum Leucinmetabolismus der Niere weisen darauf hin, dass hier nicht nur ein Recycling von Aminosäuren aus dem Ultrafiltrat stattfindet. Ein bedeutender Anteil der Aminosäuren wird vor der Freisetzung ins Blut in intrarenale Proteine eingebaut. 40% der Proteinmasse der humanen Niere unterliegen einem täglichen Turnover, gegenüber nur 2% in der Skelettmuskulatur (Garibotto *et al.*, 1997a; Garibotto *et al.*, 1997b).

Nach einer Hungerperiode atrophiert nicht nur die Muskulatur, auch in der Leber und der Niere wird der lysosomale Proteinabbau stimuliert (Voet und Voet, 1995). Dabei werden die sogenannten KFERQ-Proteine selektiv mit Hilfe des sogenannten Peptid-Erkennungsproteins in die Lysosomen transportiert (Dice, 1990). Aber auch der für die Lysosomen typische langsame, generelle Proteinabbau durch Autophagie gewinnt unter Hungerbedingungen an Bedeutung (Thumm und Wolf, 1998). In welchem Maße aus dieser Art des Proteinabbaus letztendlich *N*-acetylierte Peptide anfallen ist bislang nicht untersucht.

Im Gegensatz zu den Lysosomen spielen die Proteasomen im Kern und im Zytoplasma eine zentrale Rolle bei der Regulation des Proteinlevels, der in diesen Kompartimenten für viele zelluläre Funktionen wie der Zellzykluskontrolle, der Zelldifferenzierung und der metabolischen Adaptation kritisch ist. Neben vornehmlich kurzlebigen und ubiquitinierten Proteinen unterliegen auch fehlerhaft gefaltete und ER-Proteine einem Abbau durch das zytosolische Proteasom zu Peptiden mit einer Länge zwischen 3 und 25 (durchschnittlichen 7 bis 8) Aminosäuren (Plempert und Wolf, 1999). Es wird allgemein davon ausgegangen, dass die Proteasomen auch *N*-acetylierte Peptide freisetzen (Nussbaum, 1999).

Wenn im Nierenepithel in der Tat *N*-acetylierte Aminosäuren aus dem Proteinkatabolismus in bedeutenden Mengen frei werden, dann stellt sich die Frage, ob der hohen Nierenacylaseaktivität in diesen Zellen auch eine entsprechend hohe Acylpeptid-Hydrolaseaktivität gegenübersteht (s. Abb. 1-1). Im Gegensatz zur Acyl1 gibt es nur wenige vergleichende Studien über das Vorkommen oder die Gewebelokalisation der Acylpeptid-Hydrolase. Raphel *et al.* fanden in der Ratte die höchsten spezifischen Acylpeptid-Hydrolaseaktivitäten im Dünndarm, gefolgt von der Leber. In der Niere wurde eine nur halb so hohe Aktivität dieses Enzyms wie in der Leber nachgewiesen (Raphel *et al.*, 1993). Auch Marks *et al.* fanden bei der Ratte eine geringfügig höhere Aktivität in der Leber als in der Niere (Marks *et al.*, 1983). Miko bestimmte für die Acyl1 hingegen in der Rattenniere eine doppelt so hohe spezifische Aktivität wie in der Leber (Miko, 1993). All diese Unterschiede bei der Ratte sind jedoch nicht signifikant, im Gegensatz zu den höheren spezifischen Acyl1-Aktivitäten in der Niere von Herbivoren und Omnivoren im Vergleich zur Leber. Beim Pferd wurde in der Niere im Vergleich zur Leber eine 13fach und beim Menschen eine 5.6fach höhere Acyl1-Aktivität gefunden (Miko, 1993). Gade und Brown schlossen nach einem Vergleich der Acylpeptid-Hydrolase und der Acyl1 aus der Rinderleber, dass beide Enzyme in diesem Gewebe in angemessenen Mengen vorhanden sind, um im Proteinabbau zusammenzuarbeiten (Gade und Brown, 1981). Es sind jedoch noch weitere vergleichende Untersuchungen zu den Nierenaktivitäten der beiden Enzyme notwendig. Offenbar erreichen die Acyl1 und die Acylpeptid-Hydrolase mit der Niere, der Leber und der Darmmukosa ihre höchsten spezifischen Aktivitäten in Geweben mit einem sehr hohen regenerativen Potential. Die Vermutung liegt nahe, dass die hohe Nierenaktivität der Acyl1 sich teilweise durch die hohe Proteinturnover-Rate in diesem Organ erklären lässt (s. 5.7.2, Garibotto *et al.*, 1996; Garibotto *et al.*, 1997).

5.4 *N*-Formylmethionin (NFM) als Acylasesubstrat

Die meisten der in Mitochondrien translatierten Proteine behalten ihr *N*-formyliertes Initiator-methionin (Holt und Jacobs, 1994). Auch in Chloroplasten beginnt die Proteinsynthese mit einem *N*-Formylmethionin (NFM, Bianchetti *et al.*, 1971). Der Abbau eines mitochondrialen Proteins kann prinzipiell auf einem von drei verschiedenen Wegen geschehen. Das Mitochondrium selbst verfügt über zwei

proteolytische Systeme, eines in der Matrix und eines in der inneren Membran. Die dritte Möglichkeit ist der Abbau in einem Autophagolysosom.

Das erste System wird von der ATP-abhängigen Matrixprotease Pim1/Lon gebildet, die für den selektiven Proteinturnover und den Abbau inkorrekt gefalteter Proteine im Matrixraum zuständig ist. Das zweite System in der inneren Mitochondrienmembran wird von Mitgliedern der AAA-Familie der Metalloproteasen gebildet. Diese Proteasen liegen als Komplexe vor. In der Membran findet sich je ein Komplex zum Matrix- und einer zum Intermembranraum hin orientiert. Sie sind für den Abbau der hydrophilen Segmente von Proteinen in der Membran verantwortlich (Thumm und Wolf, 1998).

Der komplette Mitochondriengehalt einer Zelle wird durch Autophagie reguliert. Durchschnittlich alle zehn Minuten wird in einer Säugerzelle ein Mitochondrium von Membranen des ERs umschlossen, welche dann durch Fusion mit Lysosomen eine autophagische Vakuole bilden. Unter Mangelbedingungen stellt die Zelle so verstärkt ihren Nährstoffbedarf sicher (Karp, 1999).

Es ist anzunehmen, dass beim Abbau mitochondrialer Proteine *N*-formylierte Peptide freigesetzt werden. Schon vor längerer Zeit wurden *N*-Formylmethionin-Peptidhydrolase-Aktivitäten in Retikulocytenlysaten verschiedener Säuger nachgewiesen (Witheiler und Wilson, 1972; Yoshida und Lin, 1972). Die schon im Zusammenhang mit dem Abbau *N*-acetylierter Proteine besprochene Acylpeptid-Hydrolase (s. 5.3) zeigt, der Acyl1 entsprechend, eine breite Spezifität gegenüber dem Acylrest (Acetyl > Formyl > Propionyl > Butyl) und der *N*-terminalen Aminosäure (Alanin, Glycin, Serin, Methionin) *N*-acylierter Peptide (Sherriff *et al.*, 1992; Scaloni *et al.*, 1992). Es wurde eine weitere *N*-Acylpeptid-Hydrolase beschrieben, die dagegen ausschließlich *N*-Acetylmethionin (NAM) und NFM von Di- und Tripeptiden abspaltet. Die Funktion dieser zweiten, spezifischeren Acylpeptid-Hydrolase in der Darmmukosa wurde im Abbau bakterieller, chemotaktisch wirkender *N*-Formylpeptide gesehen (Sherriff *et al.*, 1992). Nach Auffassung von Chadwick und Mitarbeitern soll dieses Enzym zusammen mit einer Formylmethionin-Deformylase in der Mukosa eine Barriere gegen bioaktive, inflammatorische *N*-Formylpeptide darstellen, die durch Darmbakterien gebildet werden (Broom *et al.*, 1989; Sherriff *et al.*, 1992). Die genauere Charakterisierung der molaren Masse, der Hemmbarkeit durch Dithiothreitol und der Substratspezifität einer *N*-Formylmethionin-Deformylase aus dem Dünndarm der Ratte durch die gleichen Autoren weist interessanterweise darauf hin, dass hier Acyl1 gereinigt

und beschrieben wurde (Broom *et al.*, 1989). Das Nierenenzym der Ratte wurde auch von Uttamsingh *et al.* gereinigt, jedoch kaum charakterisiert (Uttamsingh *et al.*, 1998). *N*-Formylmethionin-Deformylase-Aktivitäten wurden in zahlreichen Säugetiergeweben nachgewiesen, wurden dabei jedoch nie eindeutig von der Acyl1 unterschieden. Ackerman und Douglas fanden eine Steigerung der Aktivität aus humanen Leukocyten durch Co^{2+} (Ackerman und Douglas, 1979). Grisolia *et al.* fanden bei der Ratte die höchste Aktivität in der Niere, gefolgt von der Leber (Grisolia *et al.*, 1977).

Zusammenfassend ist also davon auszugehen, dass NFM *in vivo* durch die Acyl1 gespalten wird. Bislant ist NFM als Acyl1-Substrat jedoch kaum charakterisiert. Die einzigen Daten existieren zum Enzym der Ratte. In Tabelle 5-1 sind Michaeliskonstanten (K_m -Werte) von *N*-Formylmethionin-Deformylaseaktivitäten der Ratte zusammengefasst.

Quelle	K_m / mM		Referenz
	NFM	NAM	
Gewebehomogenate:			
Niere	6.5	n.d.	Grisolia <i>et al.</i> , 1977
Leber	12.5	n.d.	„
Gehirn	5.0	n.d.	„
Milz	3.3	n.d.	„
Skelettmuskulatur	5.0	n.d.	„
Herzmuskulatur	5.0	n.d.	„
teilweise gereinigtes Enzym:			
Dünndarm	7.1	0.22	Broom <i>et al.</i> , 1989
Niere	20.0	0.80	Endo, 1978b

Tab. 5-1 Michaeliskonstanten (K_m -Werte) von Acylaseaktivitäten für *N*-Formylmethionin (NFM) und *N*-Acetylmethionin (NAM) in verschiedenen Geweben der Ratte. n.d.: nicht bestimmt

Sowohl Broom *et al.* als auch Endo bestimmten mit dem Enzym aus dem Dünndarm beziehungsweise der Niere der Ratte für NFM um eine Größenordnung höhere K_m -Werte als für NAM (Endo, 1978b; Broom *et al.*, 1989). Auch die in dieser Arbeit für NFM bestimmten Halbsättigungskonzentrationen mit der rekombinanten Acyl1 von Mensch und Schwein, hkAcyl1 und pkAcyl1, sind mit 11.5 mM und 20.5 mM um etwa die gleiche Größenordnung höher als für NAM mit 0.95 mM und 2.72 mM (s. Abb. 4-

3). Offenbar sorgt der längere Acetylrest bei allen untersuchten Enzymen für eine stärkeren Bindung des Substrates als der Formylrest. *In vivo* arbeiten die Enzyme von Ratte (s.o.), Schwein und Mensch mit NFM wahrscheinlich weit unterhalb ihres Sättigungsbereichs. Allerdings ist anzunehmen, dass das gleiche auch für die Hydrolyse von NAM gilt. Dabei stellt sich die Frage, ob die unterschiedlichen K_m -Werte bei Substratkonzentrationen im submillimolaren Bereich, wie sie *in vivo* vermutlich vorliegen, überhaupt eine Rolle spielen.

Während die hkAcy1 unter Sättigungsbedingungen NFM mit einer mehr als dreifach so hohen Maximalgeschwindigkeit wie NAM spaltete, verglichen mit einer vierfach höheren Geschwindigkeit beim Rattenenzym (Endo, 1978b), war die Geschwindigkeit durch die pkAcy1 um den Faktor 1.2 geringer. Die NFM-Hydrolyse war damit durch die pkAcy1 etwa siebenmal weniger effektiv als durch die hkAcy1. Ferner wurde im Gegensatz zu allen anderen Kinetiken beim Umsatz von NFM mit der pkAcy1 kein kooperativer Effekt beobachtet. Es kann jedoch nur spekuliert werden, ob NFM in der humanen Niere eine größere Rolle spielt als in der Schweineniere, weil dieses Substrat durch die pkAcy1 weniger effektiv als durch die hkAcy1 hydrolysiert wird.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass NFM wie NAM nicht nur gute Substrate der Nierenacylase der Ratte (Endo, 1978b) sondern auch der hkAcy1 und der pkAcy1 sind. Die Enzyme haben für die Rolle einer Deformylase, die am Abbau mitochondrialer Proteine beteiligt ist, geeignete katalytischen Eigenschaften.

5.5 Spielt die Nierenacylase eine Rolle bei der Hippursäuresynthese?

Die Lokalisation der pkAcy1 im gesamten Nierenepithel (Höpfner, 1999; Lindner *et al.*, 1999) und der lösliche Charakter des Enzyms (s. 5.2) sind mit einer Funktion der Acyl im Metabolismus von Benzoessäure (s. 1.4.3.2, Löffler *et al.*, 1982) gut vereinbar.

In Säugetieren wird Benzoat hauptsächlich renal als Hippursäure (*N*-Benzoylglycin) ausgeschieden. Die Konjugation von Benzoat mit Glycin geschieht durch das ATP-abhängige Benzoyl-CoA-Synthetase / Benzoyl-CoA : Glycin *N*-Acyltransferase-System in den Mitochondrien der Leber und des proximalen Tubulus. Die gebildete Hippursäure wird im proximalen Tubulus ausgeschieden (Moller und Sheikh, 1983). Bei der Ratte konnte der Transporter für organische Anionen, der für die basolaterale Aufnahme der

Hippursäure in die Tubuluszelle verantwortlich ist, kloniert und im proximalen Tubulus lokalisiert werden (Sekine, *et al.*, 1997). Der nachfolgende Transport in den Urin wird durch einen elektrochemischen Gradienten getrieben (Pritchard und Miller, 1993). Trotzdem ist nicht eindeutig klar, ob *in vivo* das gesamte Hippurat für die Exkretion ausschließlich durch das ATP-abhängige, mitochondriale Glycin-Konjugations-System gebildet wird. Beim Pferd können dies bis zu 160 g Hippursäure pro Tag sein (Kolb, 1989).

Die zelluläre Lokalisation der *pkAcy1* und eine Reihe publizierter Beobachtungen sprechen dafür, dass die *Acy1* ebenfalls an der Konjugation von Benzoesäure mit Glycin beteiligt ist. Nieren und Lebern von Herbi- und Omnivoren enthalten die höchsten *Acy1*-Aktivitäten, während bei Nagern und Carnivoren die niedrigsten nachgewiesen wurden, mit der Hundeniere als Ausnahme (Miko, 1993). Es ist bekannt, dass Herbivoren zur Benzoesäuredetoxifikation die Konjugation mit Glycin bevorzugen. Carnivoren bilden eher Glucuronide, und Omnivoren machen von beiden Möglichkeiten Gebrauch, bilden jedoch schwerpunktmäßig das Glycinkonjugat (Timbrell, 1991). Herbivoren, die sich von einer faserreichen Kost ernähren, sind einer besonders hohen Benzoesäurebelastung ausgesetzt (Kolb, 1989) und bilden aus Benzoat entweder ausschließlich oder vornehmlich Hippursäure. Darüber hinaus ist schon seit langem bekannt, dass beim Hund die Fähigkeit zur Bildung von Glycinkonjugaten generell auf die Niere beschränkt ist (Williams, 1971; Kao, 1978). Dies korreliert gut mit dem Mangel an *Acy1*-Aktivität in der Hundeleber (s. 1.1.1.1, Smorodinzew, 1922; Miko, 1993).

Alternative Wege der Benzoesäuredetoxifikation in der Niere könnten als Reserve-Mechanismen der mitochondrialen Konjugationsreaktion nützlich sein. Der lipophile Charakter der Benzoesäure (Weast, 1969) erlaubt es ihr, einfach durch Membranen zu diffundieren. Es ist folglich anzunehmen, dass sie der mitochondrialen Glycinkonjugation teilweise entgeht und zwischen Zellen, Blut, Interstitium und Ultrafiltrat zirkuliert. Die *Acy1* könnte nun solch einen Reserve-Mechanismus zur Hippursäuresynthese darstellen. Aus *in vitro*-Studien ist bekannt, dass die *Acy1*-vermittelte Synthese von Acylaminosäuren einfach möglich ist (s. 1.2.4.4). Bei physiologischem pH liegen die Gleichgewichtskonstanten der Hydrolyse/Synthese solcher Komponenten zwischen 5 und 10 (Röhm und van Etten, 1986; Galaev und Švedas, 1982). Bei hohen Eduktkonzentrationen kann die Acylaminosäuresynthese also

effizient ablaufen. Im Falle von NAM betrug die Ausbeute *in vivo* bis zu 48% (Orekhovich *et al.*, 1959).

Im Nierentubulus findet man neben Taurin auch osmotisch wirksame Konzentrationen von Glycin, zum Beispiel 7 mM in der Außenzone des Marks der Rattenniere (Silbernagel, 1996). Das Reaktionsgleichgewicht könnte zusätzlich in Richtung der Synthese verschoben werden, indem das gebildete Hippurat kontinuierlich in das Tubuluslumen exportiert wird (s. Abb. 5-2). Wie erwähnt, findet die Hippursäureexkretion zwar im proximalen Tubulus statt, aber die Literaturdaten schließen eine aktive Beteiligung distaler Tubulussegmente nicht aus.

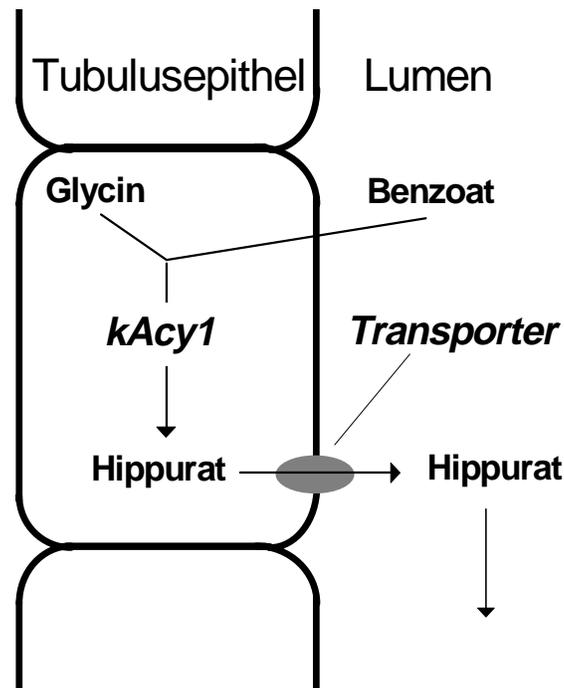


Abb. 5-2 Modell einer ATP-unabhängigen Hippursäuresynthese durch die Nierenacylase. Benzoat diffundiert durch die Zellmembran und wird durch die *Acy1* im Tubulusepithel mit Glycin konjugiert. Die entstehende Hippursäure wird, einem elektrochemischen Gradienten folgend, ins Tubuluslumen transportiert. Ihre Entfernung mit dem Urin verschiebt das Gleichgewicht der Reaktion hin zur Hippuratbildung. *kAcy1*: *kidney Acy1*

Die Ursache dafür, dass ein solcher ATP-unabhängiger Weg zur Hippursäurebildung bislang noch nicht nachgewiesen wurde, könnte darin liegen, dass der Exportschritt die Integrität der Gewebestruktur voraussetzt. Interessanterweise zeigten Phillips und Anker bei Arbeiten mit der Rattenniere, dass das zerkleinerte Gewebe die Acetylierung von Cyclohexylalanin 100mal effizienter katalysierte als das entsprechende zellfreie Homogenat. Die Autoren interpretierten diese Beobachtung als Konsequenz einer *Acy1*-

vermittelten Synthese, die durch den zellulären Export des Produkts getrieben wird. Nach einer teilweisen Reinigung zeigte sich, dass die Aktivität, die für die Acetylierung verantwortlich war, in der Tat mit der Acyl1 identisch war (Phillips und Anker, 1957).

5.6 Die Acylase 1 ist nicht die einzige Nierenacylase

Neben der Acyl1 kommen noch weitere Acylasen in der Niere vor, die allerdings nicht zur gleichen Enzymfamilie gehören. In Tabelle 5-2 sind vier weitere Acylasen mit ihrer Gewebeverteilung in der Ratte zusammengestellt. Dabei wird deutlich, dass auch diese Enzyme ihre höchsten spezifischen Aktivitäten in der Niere erreichen.

Die Aminoacylase II, auch Aspartoacylase genannt, spaltet *N*-Acetylaspartat (NAA). Im ZNS von Warmblütern wird ein hoher NAA-Gradient vom Gewebe zur extrazellulären Flüssigkeit aufrechterhalten. In der Großhirnrinde ist die NAA-Konzentration mit 6-7 $\mu\text{mol/g}$ Gewebe besonders hoch. Das Fehlen der Aminoacylase II beim Canavan Syndrom führt zur Akkumulation von NAA im ZNS und verursacht eine spongiforme Degeneration des Nervengewebes (Kaul *et al.*, 1991; Kaul *et al.*, 1993). Für *N*-Acetylhistidin (NAH) findet man eine ähnliche Gewebeverteilung nicht nur bei Warmblütern sondern auch bei Kaltblütern. Der Aminoacylase II der Säuger und der *N*-Acetylhistidin-Amidohydrolase (EC 3.4.13.5) der Fische wird eine Funktion bei der Osmoregulation im ZNS zugeschrieben. Erstaunlicherweise ist aber auch beim Fisch die Niere die reichste Quelle für die *N*-Acetylhistidin-Amidohydrolase, obwohl in diesem Organ die Menge von NAH nur äußerst gering ist (Baslow, 1997).

Die Aminoacylase III spaltet bevorzugt die *N*-Acetyl-derivate der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und Histidin (Endo, 1978a). Wie für die ϵ -Lysinacylase (Paik *et al.*, 1957) und die *N*-Acetyl- β -alanindeacetylase (Fujimoto *et al.*, 1968), deren Namen für ihre Substratspezifitäten stehen, ist für die Aminoacylase III kein physiologisches Substrat bekannt.

Die Niere scheint also über ein ganzes Acylasesystem breiter Spezifität und höherer Kapazität als andere Organe zu verfügen. Neben der Konjugation mit Glucuronsäure, Sulfat oder Glutathion in der Phase zwei der Biotransformation von Arzneimitteln und Fremdstoffen hat auch die Acetylierung eine wichtige Entgiftungsfunktion, zum Bei-

Acylyase	EC	Niere ^a	Niere ^b	Leber	Milz	Hirn	Herzmus- kulatur	Skelettmus- kulatur	Thymus	Hoden	Pankreas	Referenz
Aminoacylyase I	3.5.1.14	100	100	10	1	2	n.d.	n.d.	3	1	8	Endo, 1980
Aminoacylyase II	3.5.1.1?	3	100	11	n.d.	7	0.4	2	n.d.	n.d.	n.d.	D'Adamo, 1973
Aminoacylyase III	3.5.1.1?	4	100	11	2	2	n.d.	n.d.	1	1	4	Endo, 1980
ϵ -Lysinacylyase	3.5.1.17	n.d.	100	50	29	n.d.	14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	Paik <i>et al.</i> , 1957
N-Acetyl- β -alanindeacetylyase	3.5.1.21	5	100	13	22	4	17	0	n.d.	n.d.	n.d.	Fujimoto, 1968

Tab. 5-2 Verteilung von Acylasen in der adulten Ratte gemäß den spezifischen Aktivitäten mit Standardsubstraten.

a : Die Aminoacylyase I-Aktivität wurde 100 gesetzt.

b : Die Nierenaktivitäten wurden 100 gesetzt.

n.d.: nicht bestimmt

spiel bei Sulfonamiden. Aber auch auszuscheidende endogene Substanzen, wie Leukotrien E₄, werden acetyliert (Örning *et al.*, 1986). Aigner *et al.* fanden für die hierfür zuständige *N*-Acetyltransferase in der Niere eine 30fach höhere Aktivität als in der Leber (Aigner *et al.*, 1996). Diese Transferase ist ferner in der Lage *S*-Alkyl-L-cysteinkonjugate zu Mercaptursäuren zu acetylieren. Diese zusätzliche Acetylierung schützt die Konjugate vor der Giftung durch die β -Lyase (s. Abb. 1-6). Die Acyl1 wirkt diesem Schutz durch Deacetylierung der Mercaptursäuren entgegen, wirkt also nicht, wie möglicherweise auf die Benzoesäure (s. 5.5) entgiftend sondern indirekt giftend. Die mangelnde Spezifität des Acylasesystems der Niere wirft die Frage auf, ob die Acylasen generell eine Rolle bei der Biotransformation spielen.

5.7 LLC-PK₁-Zellen als Modell für das Nierentubulusepithel

Die mögliche Regulation der Acyl1-Aktivität in der Säugerniere sowie der zelluläre Transport ihrer vermutlichen Substrate, den *N*-Acylaminosäuren, sollten in einem Modellsystem für die Niere untersucht werden. Hierfür bot sich ein Zellkultursystem an. Jedoch war zu diesem Zeitpunkt die Frage nach dem Acylase 1-exprimierenden Zelltyp in der Niere noch nicht eindeutig geklärt (s. 1.3.1.1).

Die in den nachfolgenden Versuchen verwendete, stabile Schweinezelllinie LLC-PK₁ ist eine gut charakterisierte, polarisierte Epithelzelllinie (Hull *et al.*, 1976). Sie dient als Modell für das proximale Tubulusepithel. Sowohl ihre Morphologie als auch ihre Transport- und Stoffwechsellleistungen sowie deren Regulation entsprechen in hohem Maße denen dieses Epithels (Handler *et al.*, 1980; Rabito, 1986; Östlund, 1993).

5.7.1 Exprimieren LLC-PK₁-Zellen funktionelle Acylase 1?

In dieser Arbeit wurde mit den LLC-PK₁-Zellen eine Zelllinie gefunden, die verglichen mit anderen Nierenzelllinien, eine bemerkenswert hohe Acyl1-Aktivität enthielt (s. Abb. 4-11). Diese Aktivität war mit 130 U/g zwar zehnmal geringer als sie typischerweise in einem Schweinenieren-Homogenat nachgewiesen werden kann, jedoch wurden keine Versuche unternommen, die Acylaseaktivitäten der verschiedenen Kulturen noch zu

steigern. In Abschnitt 5.7.2 wird unter anderem die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der LLC-PK₁-Zellen von den Kulturbedingungen erläutert.

Zuerst war zu klären, ob die in den LLC-PK₁-Zellen beobachtete Acylaseaktivität in der Tat auf Acyl1 zurückzuführen war. Mittels Westernblot mit einem affinitätsgereinigten Antikörper konnte kein spezifischer Nachweis der pkAcyl1 aus kultivierten Zellen erbracht werden. Der immunologische Nachweis der rekombinanten pkAcyl1 aus SF21-Zellen war bereits früher problematisch. Pittelkow detektierte im Westernblot von 20 000 x g-Überständen von Extrakten pkAcyl1-produzierender SF21-Zellen Nebenbanden bei etwa 29 und 22 kDa (Pittelkow, 1996). Diese können als Proteolyseprodukte des Enzyms interpretiert werden. In Westernblots mit Extrakten von LLC-PK₁-Zellen (nicht gezeigt) waren jedoch sowohl bei molaren Massen über und unter 45 kDa Nebenbanden sichtbar. Im Folgenden wurde das Enzym stattdessen zur Identifizierung als pkAcyl1 aus LLC-PK₁-Zellen angereichert und nachfolgend seine Substratspezifität charakterisiert (s. 4.4.1).

Die Acylase aus einem Extrakt von LLC-PK₁-Zellen, welches eine spezifische Acylaseaktivität von 130 U/g aufwies, wurde zunächst durch Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) über Phenylsepharose CL-4B[®] angereichert. Die Aktivität wurde, wie für die pkAcyl1 charakteristisch, bei 50% Ethylenglycol eluiert (s. Abb. 4.12). Dabei wurde das Enzym mit einem Verlust von 10% dreifach angereichert. Aus einem Schweinenierenhomogenat mit einer etwa 10fach höheren spezifischen Ausgangsaktivität lässt sich das Enzym dagegen durch Ammoniumsulfatfällung, Gelfiltration und HIC 60fach anreichern. Der mangelhafte Reinigungseffekt bei der HIC des LLC-Zellextrakts ist zum einen auf die relativ geringe Ausgangsaktivität zurückzuführen. Zum anderen wird möglicherweise, im Vergleich zu Präparationen aus der Schweineniere, ein größerer Anteil der gesamten Proteinmasse der Kulturzellen bei Ethylenglycolkonzentrationen um 50% eluiert.

Die Säugeracylasen haben ein überaus breites Substratspektrum (s. 1.1.1.1). Dennoch sind die kinetischen Parameter für die Reaktionen mit verschiedenen *N*-Acylaminosäuren für die Enzyme charakteristisch. Zum Beispiel erreichte die hkAcyl1 mit *N*-Formylmethionin (NFM) eine mehr als dreifach höhere Maximalgeschwindigkeit als mit *N*-Acetylmethionin (NAM), während die pkAcyl1 bei maximaler Umsatzgeschwindigkeit NAM etwa 1.2mal schneller hydrolysierte als NFM (s. Abb. 4-3). Die Aktivitäten der aus den LLC-PK₁-Zellen angereicherten Acylase wurde

gegenüber den *N*-Acetylderivaten von Methionin, Leucin, Glutamat, Alanin und Glycin im Vergleich zur rekombinanten *pkAcy1* unter Standardbedingungen bestimmt (s. Abb. 4-13). Die identischen Profile beweisen, dass die LLC-PK₁-Zellen *Acy1* bilden. Die Acylaseaktivität der Kulturzellen war wie zu erwarten mit Dithiothreitol (DTT) hemmbar (vergl. Abb. 4-5).

Um einen Funktionsnachweis der *Acy1* in den LLC-PK₁-Zellen zu erbringen, wurde geprüft, ob die Zellen *Acy1*-abhängig die essenziellen Aminosäuren Methionin und Leucin aus ihren *N*-Acetylderivaten freisetzen können, nachdem sie diese importiert haben. Hierzu wurden diese *N*-terminal blockierten Aminosäuren dem Medium jeweils statt der freien Aminosäure in äquimolaren Mengen zugesetzt. In Abbildung 4-14 b ist deutlich zu erkennen, dass die Viabilität der Zellen nach Serumentzug für eine Dauer von 4 d mit NAM im gleichen Maße wie mit Methionin aufrecht erhalten wurde. Aus Abbildung 4-15 ist ersichtlich, dass NAL dagegen nur etwa halb so effizient verwertet wurde. In beiden Fällen stagnierte das Wachstum nach Entzug der essenziellen Aminosäure. Diese Versuche wurden mit Zellen durchgeführt, die 1:10 passagiert und 24 h in serumhaltigen Medium vorinkubiert worden waren. Möglicherweise spiegelt der Unterschied in der Verwertung von NAM und NAL die Effektivität der Hydrolyse von NAM im Gegensatz zu NAL wieder. *In vitro* spaltet die *pkAcy1* NAM 13mal effektiver als NAL (Gilles *et al.*, 1984).

In dem in Abbildung 4-14 a dargestellten Versuch waren die Zellen 1:20 passagiert und 72 h in serumhaltigen Medium vorinkubiert worden. Zum Zeitpunkt des Serumentzuges hatten die Kulturen die gleiche Viabilität wie in den beiden oben beschriebenen Versuchen. Allerdings war nur noch für weitere 24 h, mit Methionin und NAM im gleichen Maße, eine Viabilitätszunahme zu beobachten. Danach nahm die Anzahl lebender Zellen in der Kultur mit freiem Methionin innerhalb von 48 h gleichmäßig um 75% ab. NAM sorgte für eine deutlich verzögerte Abnahme der Anzahl lebender Zellen. Die Viabilität der Kultur sank ebenfalls gleichmäßig, aber erst nach 96 h auf 25%, während sie ganz ohne Methioninquelle zu diesem Zeitpunkt sogar noch geringfügig höher war.

Auf diese bemerkenswerte Tatsache wird am Ende von Abschnitt 5.7.2, im Zusammenhang mit dem Verhalten der spezifischen Acylaseaktivität in serumfreien, unterschiedlich modifizierten Medien, näher eingegangen.

Um die Verwertung der *N*-terminal blockierten Aminosäuren sicher der Acy1 zuschreiben zu können, wurde das zelluläre Enzym gehemmt. Mit Hemmstoff sollte das Überleben der Kultur mit NAM nach Serumentzug deutlich verringert sein. Allerdings kann man bei keinem der bisher charakterisierten Acy1-Inhibitoren von einer guten Zellgängigkeit ausgehen (s. 1.2.4.2, Anders und Dekant, 1994). Dithiothreitol (DTT) ist ein effektiver *pkAcy1*-Hemmstoff (s. 4.2.2). Es reduziert wahrscheinlich eine essenzielle Disulfidbrücke zwischen C270 und C292 in der trypsinempfindlichen Dimerisierungsdomäne (s. 1.2.2.1, Palm, 1994). In der *hkAcy1* befindet sich an Position C270 ein Serinrest. Eine äquivalente Disulfidbrücke kann hier folglich nicht ausgebildet werden. In der Tat ist die *hkAcy1* gegenüber DTT nahezu unempfindlich (s. Abb. 4.5). DTT diffundiert leicht durch Membranen und wurde daher trotz seiner unspezifischen Wirkung in zahlreichen Versuchen mit Kulturzellen eingesetzt. Insbesondere der Prozess der Disulfidbrückenbildung bei nascierenden Polypeptidketten im ER ließ sich mit DTT effektiv hemmen (Lodish *et al.*, 1992; Braakman *et al.*, 1992b; Tatu *et al.*, 1993). Allerdings waren in allen Fällen Konzentrationen von 1 mM DTT und höher notwendig, um signifikante Effekte zu erzielen. In CHO15B-Zellen beobachteten Helenius und Mitarbeiter bei Puls-Chase-Experimenten mit 5 mM DTT während des Puls und einem Chase bis zu 60 min keinen Effekt des Reduktionsmittels auf die Translation, die Translokation, die *N*-Glycosylierung und den sekretorischen Weg (Braakman *et al.*, 1992; Tatu, *et al.*, 1993). Stevens und Mitarbeiter beschrieben die Aktivierung von Gentranskription durch DTT in LLC-PK₁-Zellen (Chen *et al.*, 1992; Halleck *et al.*, 1997) sowie den Schutz vor der cytotoxischen Wirkung von *S*-Cysteinkonjugaten (s. 1.4.2, Chen *et al.*, 1990). Dabei waren im ersten Fall DTT-Konzentrationen von mindestens 1 mM und im zweiten von 10 mM notwendig. DTT in einer relativ niedrigen Konzentration von 100 µM war jedoch in der Lage, die Na⁺/K⁺-ATPase-hemmende Wirkung von Patulin aufzuheben (Hinton *et al.*, 1989; Riley *et al.*, 1990). Insgesamt ist festzustellen, dass DTT meist in verhältnismäßig hohen Konzentrationen eingesetzt werden muss, um einen signifikanten, intrazellulären Effekt hervorzurufen.

Der Einsatz von DTT als Hemmstoff der Acy1 in LLC-PK₁-Zellen birgt die Gefahr, dass auch mögliche Transportsysteme für NAM beeinflusst werden. DTT erhöht ferner *per se* das Redoxpotential der Zellen, welches aber im MTT-Test zur Bestimmung der Zellviabilität gemessen wird. Daher wurde zunächst zusätzlich eine Proteinbestimmung

zur Ermittlung der Zellviabilität herangezogen. Abbildung 4-16 zeigt, dass mit beiden Methoden das qualitativ gleiche Ergebnis erhalten wurde. Nach einer Inkubation von 16.5 h mit unterschiedlichen DDT-Konzentrationen ergab sich eine deutlich verringerte Verwertung von NAM im Vergleich zum freien Methionin. Geringe DDT-Konzentrationen stimulierten das Wachstum. Zwischen 200 und 400 μM DTT stieg die Viabilität mit Methionin noch leicht an, nahm aber mit NAM schon wieder leicht ab. Daher wurde für die Aufnahme der Zeitabhängigkeit der Methionin/NAM-Verwertung eine DTT-Konzentration von 350 μM gewählt. Abbildung 4-17 zeigt, dass in Gegenwart von DTT die NAM-Verwertung gegenüber freiem Methionin für mindestens 8 h blockiert war. Der erhöhte Messwerthintergrund durch das Reduktionsmittel wird deutlich, wenn man das Wachstum der Kontrolle mit Methionin und ohne DTT mit dem Wachstum mit Methionin und in Gegenwart von DTT vergleicht. Aus diesem Grund ist die Differenz, welche in Gegenwart von DTT zwischen dem Wachstum mit Methionin und mit NAM zu beobachten war, nur von qualitativer Aussagekraft.

Die Ergebnisse zeigen, dass DTT wirksam die NAM-Verwertung durch LLC-PK₁-Zellen blockiert. Dies ist vornehmlich auf die Hemmung der zellulären Acy1 zurückzuführen. Diese Interpretation setzt außerdem voraus, dass die Zellen über ein Transportsystem für *N*-Acetylaminosäuren, zumindest NAM, verfügen (s. 5.9).

5.7.2 Ist die pkAcy1-Aktivität in LLC-PK₁-Zellen reguliert?

Um diese Frage zu klären, sollte die spezifische Acy1-Aktivität in Extrakten von LLC-PK₁-Zellen bestimmt werden, die unterschiedlichen Kulturbedingungen ausgesetzt waren. Eine mögliche Enzymregulation sollte Rückschlüsse auf die Funktion der Acy1 erlauben.

Alle Versuche wurden mit Zellen durchgeführt, die 1:10 passagiert und 24 h in serumhaltigem Kulturmedium vorinkubiert worden waren. Die nachfolgenden Inkubationen wurden immer mit serumfreiem Medium durchgeführt. Das Fehlen oder die Verdopplung der Konzentrationen der essenziellen Kulturmediumkomponenten L-Arginin, L-Cystin, Glukose, i-Inositol, L-Leucin, Glycylglutamin oder Natriumphosphat hatte nach 24 h keinen Einfluß auf die spezifische Aktivität der Acy1. Die Verdopplung der L-Lysin-, L-Isoleucin- oder Glycin-Konzentrationen oder der Austausch von Methionin gegen NAM, sowie Leucin gegen NAL oder α -Ketoisocaproat hatten ebenfalls keinen Effekt. Wurden die Zellen vier Tage mit oder ohne Methionin inkubiert, folgte die spezifische Acy1-

Aktivität im Wesentlichen der Zellviabilität. Ohne Methionin stagnierte sie, wie auch die Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Aktivität, und mit Methionin stieg sie kontinuierlich an, und zwar doppelt so stark wie die LDH-Aktivität (s. Abb. 4-18). Die Acyl-Aktivität scheint also kurzfristig durch die hier getesteten Substanzen nicht beeinflusst zu werden, sondern allein vom Zellwachstum abzuhängen. Daher wurde im Folgenden der Einfluss von fetalem Kälberserum (FCS) getestet, welches ein kontinuierliches Wachstum der LLC-PK₁-Zellen bei einer Konzentration von 10% im Kulturmedium erst ermöglicht.

Alle Versuche in dieser Arbeit wurden mit einer einzigen FCS-Charge durchgeführt. Da im FCS selbst jedoch eine, wenn auch geringe, Acylaseaktivität nachgewiesen wurde (s. 4.5.1), und um definierte Bedingungen herzustellen, wurden alle Inkubationen ohne FCS durchgeführt. Unter Standardbedingungen war nach FCS-Entzug für weitere vier Tage eine Zunahme der Zellviabilität zu beobachten (s. Abb. 4-14 b). Es ist bekannt, dass nach FCS-Entzug noch nach vier Tagen bis zu 66% der LLC-PK₁-Zellen aktiv DNA synthetisieren können. Einer Steigerung der DNA-Synthese durch erneute Zugabe von FCS geht eine rapide Transkriptionsteigerung des Proto-Oncogens *c-jun* innerhalb von 60 min voraus (Östlund et al., 1993). Die essenziellen, mitogenen Stimuli durch FCS sind in unterschiedlichem Maße auf Wachstumsfaktoren, Hormone, Anheftungsfaktoren, Bindungsproteine, Lipide und Mineralien zurückzuführen (Maurer, 1992). Durch den Entzug von FCS hingegen können sogenannte ruhende Kulturen erzeugt werden (Östlund et al., 1993).

Abbildung 4-19 b zeigt deutlich den mitogenen Effekt von FCS gegenüber einer serumfreien Kultur. Doch in beiden Fällen nahm die Viabilität nicht länger als 96 h lang zu und fiel am Ende der Kultur wieder ab. Grundsätzlich verschieden verhielten sich dagegen die spezifischen Acyl-Aktivitäten in den Parallelkulturen. Statt kontinuierlich dem Wachstumstrend zu folgen, übertraf die Aktivität der serumhaltigen Kultur zwischen der 48. und 72. Stunde nach einer vierfachen Aktivitätssteigerung nur knapp die Aktivität der serumfreien Kultur, um dann bis zum Ende der Kultur auf das Dreifache des Ausgangswertes abzufallen. Ohne FCS dagegen stieg die spezifische Aktivität in den LLC-PK₁-Zellen relativ gleichmäßig an, sogar noch als die Viabilität nach 96 h wieder abnahm, und erreichte schließlich das Sechsfache ihres Ausgangswertes. Der Mechanismus, durch den diese Steigerung zu Stande kam, wurde hier nicht weiter untersucht. Dennoch liegt der Schluss nahe, dass die Acyl in den Kulturen mit FCS vornehmlich bis zur Bildung eines konfluenten Monolayers, was nach 72 h der Fall war (s. 3.3.2.1), eine Funktion hatte. Dagegen hatte sie in der serumfreien Kultur vermutlich eine

grundsätzlich andere Bedeutung, da die Aktivität zunahm, solange noch eine Restviabilität nachweisbar war.

Um zu prüfen, ob diese Beobachtung tatsächlich auf einen mitogenen Stimulus durch das FCS zurückzuführen war, wurden Versuche mit Insulin durchgeführt. Insulin ist ein für die meisten Kulturen essenzielles Hormon (Maurer, 1992). Chuman *et al.* beschrieben ein serumfreies, Hormon-supplementiertes Medium zur Kultur von LLC-PK₁-Zellen, welches unter anderem 10 µg/ml Insulin enthielt (Chuman *et al.*, 19982). Bemerkenswert ist, dass diese Konzentration um den Faktor $25 \cdot 10^4$ höher liegt als die mittlere Insulinkonzentration in 10%igem FCS, dennoch wurde sie hier verwendet.

Daneben wurde in einer Parallelkultur Albumin mit einer Konzentration von 2.3 mg/ml eingesetzt, welches der mittleren Konzentration in 10%igem FCS entspricht. Albumin vermittelt als Bindungsprotein durch rezeptorvermittelte Endocytose (Gekle *et al.*, 1997) die Aufnahme von Lipiden und Vitaminen und puffert den pH des Mediums (Maurer, 1992).

Abbildung 4-20 b zeigt, dass Insulin auf die Viabilität der Kultur fast den gleichen Effekt hatte wie FCS. Albumin dagegen hatte keinen zusätzlichen mitogenen Effekt. Die spezifische Ayc1-Aktivität blieb mit Insulin auf einem noch geringeren Niveau als mit FCS. Sie erreichte bereits nach etwa 44 h ihr Maximum bei einer zweieinhalbfachen Steigerung. Der Albuminzusatz hatte im Vergleich zur FCS-freien Kultur wiederum keinen Effekt. Eine hohe Wachstumsrate korreliert also nicht unbedingt mit einem raschen Anstieg der Ayc1-Aktivität in der frühen Kulturphase, wie der Vergleich der FCS- und der Insulin-supplementierten Kultur zeigt. Vielmehr scheint in der Letzteren ein Stimulus zu fehlen oder eine Repression der Ayc1-Aktivität wirksam zu sein.

Vor dem Hintergrund einer Rolle der Ayc1 beim intrazellulären Proteinabbau, wie sie in Abschnitt 5.3. geschildert wurde, passt die niedrige spezifische Aktivität in der serumhaltigen Kultur zu der Tatsache, dass FCS ein starker Inhibitor der zellulären Proteolyse ist (Hershko und Tomkins, 1971). Auch Insulin allein ist in der Lage, den lysosomalen Proteinabbau (Neely *et al.*, 1974; Neely *et al.*, 1977) und die Autophagie (Neely *et al.*, 1977; Mortimore und Schworer, 1977) zu hemmen. Es ist anzunehmen, dass die Ayc1 in Gegenwart von FCS und von Insulin weitgehend im Sinne der allgemeinen proteolytischen Aktivität der Zelle reguliert wird. Dennoch ergibt sich die Frage, ob allein ein durch Serumentzug verstärkter, intrazellulärer Proteinabbau die beobachtete, hohe Aktivitätssteigerung erklären kann. Alternativ könnte die Ayc1 aktiv an

einem typischerweise in serumfreien Kulturen ablaufenden, zellulären Prozess beteiligt sein. Die oben geschilderte Beobachtung der Wirkung von NAM auf die Viabilität von LLC-PK₁-Zellen nach Serumentzug wird in diesem Zusammenhang wieder interessant (s. Abb. 4-14). Im Gegensatz zu Zellen, die erst 24 h in Kultur waren (s. Abb. 4-14 b), bewirkte der Serumentzug bei einer Kultur, die zwar doppelt so stark verdünnt ausgesät, aber schon 72 h mit FCS vorinkubiert worden war, ein deutlich längeres Überleben (s. Abb. 4-14 a). In den meisten eukaryotischen Zellkulturen wird das Überleben der Zellen unter anderem exogenen Stimuli zugeschrieben, die einen aktiven Zelluntergang durch programmierten Zelltod (Apoptose) verhindern. Meist wird durch Serumentzug eine Abnahme der Anzahl lebender Zellen beobachtet, die einer Kinetik erster Ordnung folgt und durch Zugabe von bestimmten Wachstumsfaktoren verhindert werden kann. Mit dem evolutionär konservierten Prozess der Apoptose gehen morphologische Veränderungen wie Kernkondensation, Chromatinspaltung, Auflösung der Kernlamina sowie die Beseitigung der schließlich verbleibenden Zellreste durch Nachbarzellen einher (Simm *et al.*, 1997). Ein zugrundeliegender biochemischer Prozess mit Schlüsselfunktion ist dabei die Aktivierung einer Kaskade von Cysteinaspartylproteasen, den Caspasen, die zum Teil direkte Effektoren der Apoptose darstellen (Villa *et al.*, 1997; Cohen, 1997; Earnshaw, 1999). Ausgelöst werden kann der Prozess *in vivo* wie *in vitro* durch eine Reihe von exogenen chemischen sowie physikalischen Noxen, aber auch als physiologischer Vorgang bei der Entwicklung oder Selbsteliminierung von Zellen, deren Proliferationskontrolle gestört ist (Wertz und Hanley, 1996). Es ist anzunehmen, dass auch bei LLC-PK₁-Zellen der Entzug von FCS nicht nur zur Bildung ruhender Kulturen führt, sondern darüber hinaus Apoptose induziert. Möglicherweise spiegelt das verlängerte Überleben der Zellen in Abbildung 4-14 a eine Verzögerung der Apoptose wieder. Die Acyl1, deren spezifische Aktivität nach Serumentzug anstieg, könnte dabei eine Rolle spielen. Eine kompetitive Hemmung durch exogenes NAM könnte endogene Substrate vom Enzym verdrängen. Zwar würde dann Methionin freigesetzt werden, ein für den aktiven Zelluntergang essenzieller Prozess in den Zellen könnte dabei jedoch gehemmt sein.

In LLC-PK₁-Zellen wurde Apoptose durch verschiedene Agenzien, wie Cyclosporin A (Healy *et al.*, 1998), Cadmium (Ishido, *et al.*, 1998), Antimycin A (Kaushal *et al.*, 1997) aber auch Hypoxie (Ueda *et al.*, 1998) ausgelöst und charakterisiert. Simm *et al.* zeigten mit einer Fibroblastenzelllinie, dass Serumentzug nicht unbedingt zu allen Charakteristika der Apoptose in Kulturzellen führen muss. Sie beschrieben den Zelltod als einen Prozess mit Charakteristika von Apoptose und Nekrose (Simm *et al.*, 1997).

Interessant werden die hier geschilderten Beobachtungen und Folgerungen vor dem Hintergrund, dass Mayer und Noble von einem Apoptoseschutz durch *N*-Acetylcystein (NAC), ebenfalls einem Acyl-Substrat, berichteten (Mayer und Noble, 1994). Bei Konzentrationen von 0.5 bis 1 mM verhinderte NAC den Glutamat-induzierten Zelltod von Oligodendrocyten und den Tumor-Nekrose-Faktor α -induzierten Zelltod dieser Zellen sowie den von Fibroblasten. Nach Entzug von Wachstumsfaktoren schützte NAC die Oligodendrocyten effektiver als Vitamin C. Die Autoren erklärten ihre Ergebnisse mit der Wirksamkeit dieser Substanzen als Antioxidantien, die den Anteil des zellulären, reduzierten Glutathions zu heben, und so die antioxidative Kapazität der Zelle zu steigern vermögen. Reaktive Sauerstoffspezies sind integraler Bestandteil verschiedener Signaltransduktionskaskaden, die unter anderem Apoptose vermitteln (Larsson und Cerutti, 1989; Miller *et al.*, 1994).

Allerdings stützen sich die Folgerungen von Mayer und Noble auf Viabilitätsmessungen, die mittels des MTT-Tests durchgeführt wurden. Wie in Abschnitt 5.7.1 diskutiert, werden die absoluten Messwerte bei dieser Methode durch das Reduktionsmittel *per se* erhöht. Es ist zu vermuten, dass die Autoren diesen Effekt auch mit NAC hervorgerufen haben.

5.8 Die 9-Anthryldiazomethan (ADAM)-HPLC-Methode zur Analyse von *N*-Acetylamino-säuren

Das von Ohmori und Mitarbeitern entwickelte Protokoll zur Anwendung der ADAM-HPLC-Methode für die Analyse von *N*-Acetylamino-säuren (Kawakami *et al.*, 1992; Kawakami und Ohmori, 1994) war in dieser Arbeit die Methode der Wahl: Sie ist nicht nur das einzige quantitative und gleichzeitig ausreichend empfindliche Verfahren, sondern erfasst ferner genau die *N*-Acetylamino-säuren, welche gute Acyl-Substrate darstellen und damit hier von besonderem Interesse waren, nämlich *N*-Acetylmethionin (NAM), *N*-Acetyl-leucin (NAL) und *N*-Acetyl-iso-leucin (NAI) sowie die *N*-Acetyl-derivate von Valin, Alanin, Serin, Threonin und Glycin (s. 1.5.3). Bis auf NAL und NAI fallen all diese blockierten Amino-säuren beim Proteinabbau an (Aitken, 1990) und können daher theoretisch eine Rolle als physiologische Acyl-Substrate spielen.

Ein hoher Hintergrund durch interferierende Peaks ist ein großer Nachteil dieser Methode. In den Chromatogrammen aus einer Arbeit von Kawakami und Ohmori in Abbildung 5-3 ist die Auftrennung der *N*-Acylamino-säuren (a) im Vergleich zum ADAM-Leerwert (b) gezeigt (Kawakami und Ohmori, 1994). Die durch Zerfalls- und

Nebenprodukte des ADAMs entstehenden Peaks interferieren allerdings kaum mit den Peaks der *N*-Acylaminosäuren, außer im Falle von *N*-Acetylglycin, Pyroglutamat, *N*-Acetylprolin, *N*-Formylmethionin und NAL sowie NAI. In dieser Arbeit wurde ebenfalls ein mit NAL und NAI interferierender Peak beobachtet (s. Abb. 4-21), der jedoch vernachlässigbar war.

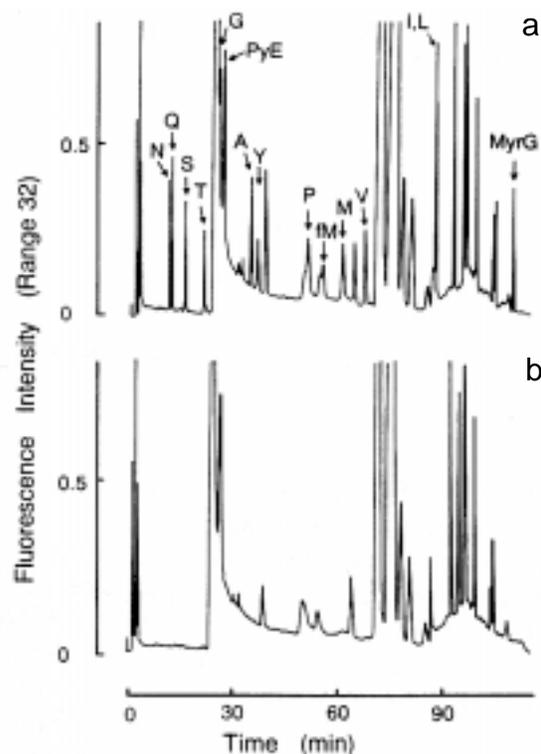


Abb. 5-3 HPLC-Chromatogramme von Anthrylestern *N*-terminal blockierter Aminosäuren, aus Kawakamin und Ohmori (1994).

- a) Alle Aminosäuren, die mit dem Einbuchstabencode abgekürzt sind, sind N^α -acetyliert. PyE, Pyroglutamat; fM, *N*-Formylmethionin; MyrG, *N*-Myristoylglycin; zur Methodik siehe 3.4.2.
- b) Eine methanolische Lösung von 9-Anthryldiazomethan wurde als Leerwert gleichbehandelt.

Mit dem von Ohmori und Mitarbeitern beschriebenen Natriumacetat-Acetonitril-Laufmittelgemisch (s. 1.5.3) konnte auf einer entsprechenden Säule, der LiChrosphere®60 RP-Select B (Merck), keine Elution erreicht werden. Von einigen Autoren wurde die Elution der Anthrylester von Fettsäuren mit Methanol (Zamir *et al.*, 1991), wässriger Methanollösung (Shimomura *et al.*, 1986) oder einem Methanol-Acetonitril-Gemisch (Kargas *et al.*, 1990) beschrieben. Auch hier wurden erst nach Einführung von Methanol in das Laufmittelgemisch Chromatogramme erhalten, die denen von Ohmori und Mitarbeitern in etwa entsprachen (s. 4-21 a und 5-6). Je höher der Methanolanteil im Laufmittelgemisch war, desto stärker verkürzte sich die Laufdauer. Während ein Lauf ohne Methanol ursprünglich fast 2 h dauerte (s. Abb. 5-3), so dauerte er mit dem modifizierten Protokoll bei isokratischer Elution (s. 3.4.2) ca. 50 min (s. Abb. 4-21) und mit dem Stufengradienten ca. 35 min (s. Abb. 4-22 b und 4-23).

Erst diese Verkürzung der Laufdauer auf fast ein Viertel der Zeit machte die Bestimmung von bis zu 20 Proben in einer einzigen Messreihe möglich.

5.8.1 Lassen sich mit der ADAM-HPLC-Methode *N*-Acetylamino-säuren in humanem Blutplasma nachweisen?

Die Interpretation der Chromatogramme humaner Plasmaproben im Vergleich zur ADAM-Kontrolle ist schwierig (s. Abb. 4-21 a und b). Offenbar veränderte sich die Qualität der Hintergrund-Peaks durch die Probe. Ausser NAL und NAI, welche beide nicht zu trennen waren (s.o.), konnte kein Peak einer *N*-Acetylamino-säure zugeordnet werden. Zur sicheren Identifizierung dieses Peaks in der Plasmaprobe als NAL/NAI wurde eine Acyl-Behandlung der Probe vor und nach der Extraktion sowie eine massenspektrometrische Analyse des gesammelten Peaks vorgenommen. Beide Versuche schlugen fehl (s. 4.7.1). Wenn sich trotzdem hinter dem vermeintlichen NAL-Peak eine andere Substanz verbirgt, die unter den gegebenen Bedingungen zum gleichen Zeitpunkt eluiert, so sollte sich diese jedoch unter anderen Laufmittelbedingungen von NAL trennen lassen. Die Abbildungen 4-22 a und b zeigen, dass die Elutionszeiten des Plasmapeaks unter verschiedenen Laufmittelbedingungen jeweils mit dem NAL-Standard übereinstimmten. Vor dem Hintergrund der obigen Annahme bestätigt dies seine Identität mit NAL/NAI.

Jedoch ist NAM und nicht NAL das mit Abstand beste Acyl-Substrat. NAM wird noch 22mal effektiver hydrolysiert als NAL (Gilles *et al.*, 1984). Falls NAM als physiologisches Acyl-Substrat eine Rolle spielt, so findet es sich jedenfalls nicht in bedeutenden Mengen im humanen Blutplasma.

Angenommen, der als NAL/NAI identifizierte Peak resultiert allein aus NAL, dann liegt bei dem hier bestimmten Plasmaspiegel von ca. 17 μM etwa ein Siebtel des Plasma-leucins *N*-acetyliert vor. Bei NAI wären es über ein Fünftel (vergl. Silbernagel, 1988). Hiermit wird klar, dass der *N*-blockierte Anteil dieser Aminosäuren in der Niere reabsorbiert werden muss, um nach der Primärfiltration nicht mit dem Urin ausgeschieden zu werden.

Bevor die Transportversuche mit NAM und NAL diskutiert werden (s. 5.9), soll noch auf Möglichkeiten eingegangen werden, die ADAM-HPLC-Methode zur Analyse von *N*-Acetylamino-säuren aus groben biologischen Proben wie Blutplasma zu verbessern. In

dieser Arbeit wurde zugunsten der Verlustminimierung auf eine weitere Reinigung der Analyten vor oder nach der Derivatisierung verzichtet, und weitgehend das von Ohmori und Mitarbeitern beschriebene Protokoll angewandt (Kawakami *et al.*, 1992; Kawakami und Ohmori, 1994). Im Folgenden werden drei Modifikationen vorgeschlagen, die jedoch möglicherweise einer Erhöhung der Probenmenge notwendig machen:

1. Die Extraktion der Probe mit Methanol birgt den Nachteil, dass weitere kurzkettige Fettsäuren ebenfalls extrahiert werden. Höchstwahrscheinlich verursachen ihre Anthrylester interferierende Peaks bei der HPLC. Als Acyl1-Inhibitoren könnten sie ferner der Grund dafür sein, dass ein Acyl1-Verdau selbst exogener *N*-Acetylaminosäuren in der Probe (s.o.) nicht gelang. Solch ein Acyl1-Verdau aber wurde zur Analyse von exogenem NAM in Schweineblut von einigen Autoren erfolgreich durchgeführt. Dabei wurden Plasmaaminosäuren differentiell, d.h. vor und nach Acyl1-Behandlung der entproteinisierten Probe, bestimmt (Stegink *et al.*, 1980; Daabees, *et al.*, 1984). Wie in der Aminosäureanalytik von Blutplasma üblich, wurden die Proben mit Sulfosalicylsäure entproteinisiert. Möglicherweise ist auf diese Weise der Anteil kurzkettiger Fettsäuren im Extrakt, der bei einer nachfolgenden Acyl1-Behandlung stört, geringer als mit der Methanol-Methode. Die Entproteinisierung mit Sulfosalicylsäure hat vermutlich jedoch einen entscheidenden Nachteil: Die Carbonsäurefunktion der im Überschuss eingesetzten Säure reagiert aller Voraussicht nach selbst mit ADAM zum Anthrylester.

2. Die Standardmethode zur Vorreinigung von *N*-Acylaminosäuren ist die Flüssigphasenextraktion mit Essigsäureethylester. Bei *N*-Acetylaminosäuren erwies sich diese Methode jedoch als ineffektiv. Die Ausbeuten nach zweifacher Extraktion aus wässriger Lösung mit dem doppelten Volumen Essigsäureethylester betragen für NAM 63%, und für die *N*-acetyliertes Glycin und Serin 6% und 2% (Green und Elce, 1974). Möglicherweise stellt eine Anionenaustausch-Chromatographie eine bessere Alternative für eine grobe Vorfraktionierung der Probe dar (Green und Elce, 1974; Yip und Liew, 1973).

3. In vielen Fällen wurde bei der ADAM-HPLC-Methode nach der Derivatisierung noch eine Reinigung der Anthrylester mittels Kieselgel-Festphasenextraktion durchgeführt. In Tabelle 5-3 sind einige Anwendungsbeispiele dafür aufgezählt.

Möglicherweise hat solch eine Extraktion auch nach der Derivatisierung von Plasmaproben für die *N*-Acetylaminosäure Erfolg.

Analyt und Quelle	Referenz
langkettige Fettsäuren aus Blutplasma	Zamir <i>et al.</i> , 1991
Peptidoleukotrien-Rezeptorantagonist SK&F 106203 aus Blutplasma	Miller-Stein <i>et al.</i> , 1993
Imidapril aus Blutplasma	Tagawa <i>et al.</i> , 1993
Eicosanoide aus Leukocyten und Makrophagen	Yamaki und Ohishi, 1992
Phycotoxine aus Muscheln	Qilliam, 1995; Lawrence <i>et al.</i> , 1996

Tab. 5-3 Beispiele für Anwendungen der ADAM-HPLC-Methode mit einer Kieselgelfestphasenextraktion vor der Säulenchromatographie

Diese Methode bietet sich auch für die Entsalzung von gesammelten Peaks nach der HPLC für eine nachfolgende massenspektrometrische Untersuchung an.

5.8.2 Eignet sich die ADAM-HPLC-Methode zur Analyse eines Transports von *N*-Acetylaminosäuren in LLC-PK₁-Zellen?

Bevor mit der Analyse von *N*-Acetylaminosäuren in Zellextrakten begonnen wurde, wurden Extrakte und Substratlösungen vor und nach der Inkubation einer Aminosäureanalyse unterzogen (s. 3.4.1). Angesichts der hohen Acylaseaktivität von 130 U/g Protein (s. Abb. 4-11) ist damit zu rechnen, dass NAM und NAL nach ihrer möglichen Aufnahme sofort zu Acetat und der freien Aminosäure hydrolysiert werden (s. 5.3). Eine signifikante Hydrolyse der Substrate sowohl außerhalb als auch innerhalb der Zellen konnte nach der Aminosäureanalyse jedoch ausgeschlossen werden (s. 4.7.2.1). Allerdings ist der Nachweis nur geringer intrazellulärer Mengenzunahmen der freien Aminosäuren unter diesen Bedingungen problematisch, da Methionin rasch durch die Methionin-Adenosyltransferase in das Methylierungagens *S*-Adenosylmethionin umgebaut wird, und Leucin durch die Verzweigtketten-Aminosäure-Transaminase zu α -Ketoisovaleriat desaminiert wird. Ob *N*-Acetylaminosäuren letztendlich von den Zellen aufgenommen wurden, ohne in nachweisbaren Mengen hydrolysiert zu werden, war des Weiteren nur durch ihren direkten Nachweis in Zellextrakten sicher zu klären.

Die ADAM-HPLC-Methode ist zur Analyse von NAM und NAL in wässrigen Extrakten von LLC-PK₁-Zellen gut geeignet (s. Abb. 4-23). Aufgrund mangelnder Empfindlichkeit wurden zur Bestimmung allerdings relativ große Zellmengen benötigt, was wiederum einen hohen Medien- und Pufferverbrauch bedeutete (300 ml EBSS und 700 ml PBS⁺⁺ pro Kinetik).

Mit der ADAM-HPLC-Methode wurden die Substrate NAM und NAL direkt in den Zellen nachgewiesen (s. Abb. 4-23). Für weitere Aufnahmemessungen mit NAL unter den gleichen Bedingungen (s. 4.7.2.2) würde es sich anbieten, nur die Radioaktivität markierten Substrates nach der Inkubation in den Zellen zu bestimmen. Man kann davon ausgehen, dass dabei das hier beschriebene, niedrigaffine NAL-Transportsystem hoher Kapazität (s. 5.9) erfasst wird.

Falls zusätzlich ein hochaffines Transportsystem mit niedriger Kapazität für NAL existiert, kann dies nur bei submillimolaren Substratkonzentrationen registriert werden. Der Einsatz radioaktiver Substrate sollte solche Messungen ohne Weiteres erlauben. Jedoch ist unter diesen Umständen nicht auszuschließen, dass dabei die Acyl1-Aktivität der Zellen ins Gewicht fällt. Es müsste wiederum durch eine analytische Auftrennung der *N*-Acetylamino-säure nach der Aufnahme, zum Beispiel durch Radio-RP-HPLC, nachgewiesen werden, dass nicht schon ein großer Anteil eines Hydrolyseprodukts in den Zellen bestimmt wird.

5.9 *N*-Acetylamino-säure-Transport in LLC-PK₁-Zellen

N-Acetylamino-säuren in Geweben und Körperflüssigkeiten wurden mit Ausnahme von Urin bisher kaum analysiert. In Tabelle 5-4 sind die Aminosäuren zusammengefasst, die unter normalen und pathologischen Bedingungen in *N*^α-acetylierter Form in humanem Urin gefunden wurden. Allerdings liegen keine quantitativen Daten vor.

N-acetylierte Aminosäure	Referenz
normaler Urin	
Tryptophan	Armstrong, 1958
Lysin	Armstrong, 1967
Histidin	Wadman, 1971
Alanin, Valin, Leucin, Aspartat, Glutamat, Tyrosin	Liebich und Först, 1984
Urin unter pathologischen Bedingungen	
Phenylalanin, Alanin (bei Phenylketonurie)	Goldstein, 1963
Tyrosin, Alanin (bei Tyrosinämie)	Dubovsky und Dubavska, 1965
Leucin, Isoleucin, Valin (bei Ahornsirupkrankheit)	Jellum <i>et al.</i> , 1986

Tab. 5-4 N^α -acetylierte Aminosäuren, die unter normalen und pathologischen Bedingungen in humanem Urin nachgewiesen wurden.

Es wird allgemein angenommen, dass Aminosäuren N^α -acetyliert werden, wenn ihre Plasmakonzentrationen steigen, wie zum Beispiel durch Abbaustörungen bei den in Tabelle 5-4 aufgeführten Krankheiten. Es ist nicht bekannt, durch welchen Mechanismus die Modifizierung zu Stande kommt. Bestimmte Aminosäuren kommen schon unter normalen Bedingungen N -acetyliert im Urin vor (s. Tab. 5-4). Sie treten, außer den basischen und aromatischen Aminosäuren und Leucin, in N -acetylierter Form auch beim Abbau N -acetylierter Proteine auf (s. 1.4.1). Ferner sind sie, einschließlich Leucin, Substrate der Acy1. Eine N -Acetyltransferase, die spezifisch freie Aminosäuren N^α -acetyliert, ist nicht bekannt. Die S -Cysteinconjugat- N -Acetyltransferase acetyliert mit geringer Effizienz als einzige Aminosäure Tryptophan (Duffel und Jakoby, 1982). Dass solche unspezifischen Transferasen jedoch bedeutende Mengen von Aminosäuren acetylieren, ist unwahrscheinlich.

In dieser Arbeit wurden N -Acetylleucin/-isoleucin (NAL/NAI) in humanem Blutplasma mit einer Konzentration von 17 μM (s. 4.7.1) nachgewiesen. Dies widerspricht der Hypothese, dass die Acy1 in der Niere eine bedeutende Rolle beim 'Salvage' von Aminosäuren spielt, die aus dem Proteinabbau stammen und in der Niere resorbiert werden. Weder Leucin noch Isoleucin wurden bisher N -acetyliert in einem Gewebe nachgewiesen. Da beide Derivate jedoch gute Acy1-Substrate sind, könnte ihr 'Salvage' eine Aufgabe des Enzyms sein. Die zelluläre Lokalisation der pkAcy1 im gesamten Tubulusepithel sowie dem Sammelrohr (Höpfner, 1999) hatten eine spezifische Funktion bei der Harnbereitung zunächst unwahrscheinlich gemacht.

Bekanntlich sind die Aminosäuren des Plasmas größtenteils Bestandteile von Di- und Tripeptiden. Die niedermolekularen Peptide und Proteine des Ultrafiltrates sind zahlreichen Peptidhydrolasen der Bürstensaum-Membran ausgesetzt, die sie hauptsächlich zu Di- und Tripeptiden abbauen (Daniel und Herget, 1997). Wie die freien Aminosäuren (Moller und Sheikh, 1983) akkumulieren diese Abbauprodukte fast ausschließlich im proximalen Tubulus (Maack, 1979). Es wäre also anzunehmen, dass filtrierte oder während des Peptidabbaus an der Bürstensaum-Membran entstehende *N*-acetylierte Aminosäuren auch hier resorbiert werden.

Dagegen korreliert die beobachtete Verteilung der Verzweigtketten-Aminosäure-Transaminase, dem ersten Enzym des Leucin-, Isoleucin- und Valinabbaus, entlang des Nephrons der Ratte, mit der Verteilung der *pkAcy1*. Die Verzweigtketten-Aminosäure-Transaminase erreicht im Nierenepithel ihre höchste spezifische Aktivität und ist vom Glomerulus bis zur Nierenpapille in großen Mengen vorhanden, mit der höchsten Aktivität im distalen Tubulus (Burch *et al.*, 1985). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass Leucin in diesem Tubulusabschnitt bevorzugt oxidiert wird (Tring-Trang-Tan, 1988). Da ein aktiver Transport die Voraussetzung für ein 'Salvage' von NAL ist, wurde, in dieser Arbeit mittels der 9-Anthryldiazomethan (ADAM)-Methode (s. 5.8.2) geprüft, ob LLC-PK₁-Zellen NAL carriervermittelt und energieabhängig aufnehmen. Die gleichen Versuche wurden weitgehend auch mit NAM durchgeführt, welches zwar nicht im Plasma nachgewiesen wurde, jedoch das weitaus beste der bekannten, möglichen *Acy1*-Substrate ist. Von NAM ist bekannt, dass es nach intraperitonealer (Rotruck und Boggs, 1975) oder oraler Gabe (Rotruck und Boggs, 1975; Stegink *et al.*, 1980; Stegink *et al.*, 1982; Daabees *et al.*, 1984) die freie Aminosäure im allgemeinen Proteinanabolismus ersetzen kann. Es wird allgemein angenommen, dass das Darmepithel NAM resorbieren kann, welches durch die *Acy1* der Mukosa hydrolysiert wird (Brachet *et al.*, 1991; Ferjancic-Biagini *et al.*, 1998). Direkte Hinweise auf die Existenz eines NAM-Transportsystem gibt es allerdings in keinem Gewebe.

Die Inkubation der LLC-PK₁-Zellen mit dem Substrat wurde in EBSS durchgeführt (s. 3.3.5.1), welches sich bei Aminosäure-Transportstudien mit den gleichen Zellen bereits als geeignet erwiesen hatte (Rabito und Karish, 1982; Rabito und Karish, 1983). Nachteilig war, dass in den Substratlösungen der pH von 7.4 mit Lauge eingestellt werden musste. Da jedoch mit NaOH und LiOH die gleichen Versuchsergebnisse erzielt

wurden, hatten die Schwankungen in der Na^+ -Konzentration offenbar einen vernachlässigbaren Effekt. Bei diesen Experimenten konnte davon ausgegangen werden, dass nur ein apikaler Transport beobachtet wurde, weil das basolaterale Kompartiment dem Substrat nicht zugänglich war (Rabito, 1986; Mertens, 1990).

Ein wichtiges Kriterium für das Vorliegen eines carriervermittelten Transports ist, dass die Aufnahme ein zeit- und konzentrationsabhängiges Sättigungsverhalten zeigt. Mit NAL konnte im Gegensatz zu NAM in der Tat solch ein Verhalten nachgewiesen werden (s. 4.7.2.2 und 4.7.2.3). Für die NAM-Aufnahme konnten keine eindeutig interpretierbaren Daten erhalten werden.

Weiterhin stellte sich heraus, dass die Durchführung der Inkubation mit oder ohne Dithiothreitol (DTT) die spezifische Aufnahmerate von NAL nicht beeinflusste (s. Tab. 4-2). Dagegen wurden in Anwesenheit des Reduktionsmittels 18% mehr NAM in den Zellen nachgewiesen. Vorausgesetzt, der Aufnahmeprozess selber war durch DTT nicht betroffen, so könnte die effektivere, durch die zelluläre Acyl vermittelte Hydrolyse von NAM im Vergleich zu NAL die Erklärung hierfür sein. Wie unter 5.7.1 erläutert, war das Enzym nur zu einer eingeschränkten Freisetzung von Leucin aus NAL in der Lage (s. Abb. 4-15), während NAM die Zellviabilität wie freies Methionin aufrecht erhielt. Wahrscheinlich machte die Hemmung der zellulären Acyl sich nur in einer höheren Ausbeute des besseren Substrates, dem NAM, bemerkbar. In allen weiteren Versuchen wurde auf DTT während der Inkubation verzichtet.

Einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung eines Transportsystems lieferten Versuche mit Proteinbiosynthese-Hemmstoffen. Tunicamycin ist ein UDP-*N*-Acetylglucosamin-Analogon und hemmt die Bildung von Dolichol-PP-*N*-Acetylglucosamin und folglich die *N*-Glycosylierung. Diese Modifikation ist oft essenziell für die Synthese von Membranproteinen. Es war also die Wahrscheinlichkeit gegeben, dass eine Komponente des vermutlichen Transportsystems als Membranprotein durch diese Hemmung betroffen und damit die spezifische Aufnahmerate deutlich gehemmt sein würde (Burston und McGivan, 1997). Als Kontrolle wurde eine Hemmung mit Cycloheximid durchgeführt. Cycloheximid hemmt die Peptidyl-Transferase der großen Ribosomenuntereinheit und damit die gesamte Proteinbiosynthese. Die beobachtete Hemmung der spezifischen Transportrate von etwa 28% durch Tunicamycin spricht deutlich für die Beteiligung einer *N*-glycosylierten Komponente und damit für einen 'Carrier' bei der Aufnahme von NAL (s. Tab. 4-3).

Nach Braakman *et al.* kann man eine Absenkung des zellulären ATP-Spiegels durch eine Vorinkubation der Zellen mit serum- und und glucosefreiem Medium mit 2-Deoxy-D-Glukose und Azid erreichen (Braakman *et al.*, 1992). Die nachfolgende, etwa 30%ige Hemmung der spezifischen NAL-Aufnahmerate spricht dafür, dass hier ein energieabhängiger Transport beobachtet wurde (s. Tab. 4-4). Der Influx von NAM war dagegen unbeeinflusst.

Da für NAM ferner kein Sättigungsverhalten der konzentrationsabhängigen Aufnahmerate nachgewiesen wurde (s.o.), kann über den Mechanismus der Aufnahme keine Aussage gemacht werden. NAL hingegen wird offenbar durch ein sättigbares, energieabhängiges Transportsystem in LLC-PK₁-Zellen aufgenommen. Mit einer Michaeliskonstante (K_m) von 9.2 mM würde dieses System *in vivo* jedoch weit unterhalb seiner Sättigung arbeiten. Im Vergleich hierzu gibt es für die meisten Aminosäure-Transportsysteme des Nierenepithels bekanntlich zwei 'Carrier'. Während im Konvolut des proximalen Tubulus hochaffine Transporter mit K_m -Werten im mikromolaren Bereich zu finden sind, gibt es, insbesondere für die neutralen Aminosäuren, in mehr distalen Segmentabschnitten Transporter, die theoretisch erst bei Aminosäure-Plasmakonzentrationen zwischen 50 und 100 mM gesättigt sind. Diesen Transportern wird eine Funktion bei hohen Aminosäurebelastungen zugeschrieben, während unter normalen Bedingungen über 95% aller Aminosäuren bereits im proximalen Konvolut resorbiert werden (Silbernagel, 1988). Die Existenz eines solchen Systems hoher Kapazität und niedriger Affinität für NAL ist also nicht ungewöhnlich. Allerdings bleibt zu vermuten, dass auch ein hochaffines System existiert.

5.10 Multiple Alignments der Acylasefamilie

An weiteren Untersuchungen zur Struktur und Funktion der Carboxypeptidase G2 (CPG2) aus *Pseudomonas*, die in der Tumorthherapie Anwendung findet (s. 1.1.1.4), und der Succinyl-Diaminopimelat-Desuccinylase (Desuccinylase), die ein potentiell Ziel von Bakteriostatika ist (s. 1.1.1.7), besteht großes Interesse. Die Desuccinylase ist mit ihrem Vorkommen in 12 verschiedenen Organismen das am weitesten verbreitete Enzym der Acylase-Familie. Die in Abbildung 4-25 und 4-26 gezeigten Alignments bilden eine Grundlage für zukünftige Untersuchungen an Acylasen.

Um vorhandene Daten vor dem Hintergrund der hier gefundenen, konservierten Reste interpretieren zu können, muß zusätzlich die Kristallstruktur der CPG2 herangezogen werden. Innerhalb der hochkonservierten Bereiche (s. Abb. 4-26) sollte die Zuordnung einer Position eines konservierten Restes in der Struktur möglich sein, obwohl die Sequenzhomologie innerhalb der Acylase-Familie meist nur zwischen 20 und 50% beträgt. Zum Beispiel könnte die Position von Lys114 der *E. coli*-*N*-Acetylornithinase (NAO), welches dem Lys143 in der CPG2 entspricht und hoch konserviert ist, Aufschluss über die Lage des Substrates geben. Pittelkow hatte beim Austausch dieses Restes gegen Isoleucin einen signifikanten Anstieg der Michaeliskonstante mit *N*-Acetylmethionin als Substrat beobachtet und vermutet, dass es sich um den Lysinrest handelt, dessen ϵ -Aminogruppe nach Frey *et al.* in der pkAcy1 an einer ionischen Wechselwirkung mit der freien Carboxylatgruppe des Substrates beteiligt ist (s. 1.2.2.1, Pittelkow, 1996; Frey *et al.*, 1977). Palm vermutete, dass der Cysteinrest an Position 115 in der pkAcy1 nahe am aktiven Zentrum liegt (Palm, 1994). Schneider sowie Röhms und Mitarbeiter hatten die Existenz eines solchen Cysteinrestes demonstriert, der nach chemischen Modifikationen den Substratbindungsschritt stört. Das Alignment macht deutlich, dass ein Cystein zwar in keiner der bakteriellen Acylasen an dieser Stelle konserviert ist, jedoch wird an der entsprechenden Position (144 in der CPG2) mit zwei Ausnahmen nur ein kleiner Rest (Serin oder Glycin) toleriert. Schneider und Kördel vermuteten in einem essenziellen Histidinrest der pkAcy1, den sie durch Photooxidation und Alkylierung nachgewiesen hatten, einen Zinkliganden (Schneider und Kördel, 1977b). Möglicherweise hat aber auch die Modifizierung des zu 100% konservierten His207 (His 229 in der CPG2) zur Enzyminaktivierung geführt. Für die Bildung einer möglichen Carboxylat-Dyade, wie von Palm diskutiert (Palm 1994), sind nach CPG2-Zählung die vollständig konservierten Reste Asp114, Glu175 und Glu390 Kandidaten. Pittelkow fand beim Austausch des dem Glu 175 entsprechenden Glutamats der *E. coli*-NAO gegen Alanin noch eine geringe Restaktivität. Die Autorin schloss daraus, dass dieser Rest nicht katalytisch wirksam ist, sondern dass allein durch seine Nachbarschaft zum zinkbindenden Glu 176 die Aktivität der Mutante beeinflusst war (Pittelkow, 1996). Auch die hochkonservierten Reste Glu130, Lys143 und Thr362 könnten für die Katalyse essenziell sein.

Zusammen mit der CPG2-Struktur bilden die hier erstellten Alignments eine Grundlage zur Überprüfung der Funktionen der konservierten Reste durch weitere Mutagenese-Experimente, die zur Zeit geplant werden.

5.11 Perspektiven

Das Baculovirus-Expressions-Vektor-System ist für die Expression von Mutanten der hkAcy1 ein geeignetes System, wie die Isolierung von homogenem Wildtyp Enzym als auch der beiden PWW-Mutanten in nur zwei Reinigungsschritten gezeigt hat. Durch die Mutagenese konservierter Reste auf der Basis des Alignments und der Struktur der *Pseudomonas*-Carboxypeptidase G2 (CPG2) sollte sich ein Modell für den Katalysemechanismus der Acylasen erarbeiten lassen. Besonders interessant ist dabei der Gedanke, durch Manipulation von Resten, die an der Substratbindung beteiligt sind, die Enzymspezifität steuern zu können. Auf diese Weise könnten neue Kombinationen von Enzym und Prodrug für den Einsatz in der ‘Antibody-directed enzyme prodrug therapy’ (ADEPT, s. 1.1.1.4, Melton und Sherwood, 1996) entwickelt werden. Allerdings muss die Lage der Substratbindungsstelle weiterhin als nicht aufgeklärt gelten, auch wenn verschiedene Autoren einen der Carboxypeptidase A analogen Katalysemechanismus postulieren (Rowell et al. 1997; Born *et al.*, 1998). Ein großer Nachteil der bakteriellen CPG2 beim Einsatz in der ADEPT ist ihre immunogene Wirkung. Die in dieser Therapie verwendeten Benzoesäure-Senfgas-Derivate (s. Abb. 5-4) werden möglicherweise auch von der hkAcy1 gespalten, die neben Hippursäure (Bruns und Schulze, 1962) auch parasubstituierte Benzoylaminosäuren als Substrate akzeptiert (Ötvös *et al.*, 1971). Für den Einsatz in der ADEPT oder auch der ‘Gene-directed enzyme prodrug therapy’ (GDEPT, s. 1.1.1.4) würde die humane Acy1 viele wichtige Anforderungen erfüllen.

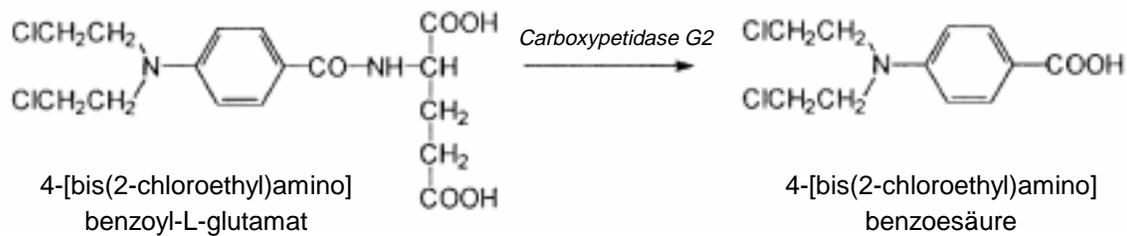


Abb. 5-4 Spaltung einer Benzoessäure-Senfgas-Prodrug durch die *Pseudomonas* Carboxypeptidase G2 (CPG2). Die CPG2 spaltet den Glutamatrest aus 4-[N,N-Bis(2-chloroethyl)amino]-benzoyl-L-glutamat ab und setzt so die toxische 4-[N,N-Bis(2-chloroethyl)amino]benzoesäure frei.

In Abschnitt 5.7.2 wurde diskutiert, ob die Acyl1 in der epithelialen Nierenzelllinie LLC-PK₁ über eine eine Rolle beim allgemeinen Proteinabbau hinaus eine essenzielle Funktion in ruhenden und apoptotischen Kulturen hat. Mit Antimycin A lässt sich in LLC-PK₁-Zellen gezielt Apoptose induzieren. Innerhalb von fünf Minuten nach Zugabe konnten Kaushal *et al.* in den Zellen Caspaseaktivität nachweisen, den ‘Trigger’ des nachfolgenden aktiven Zelltods (Kaushal *et al.*, 1997). Auf der Grundlage dieser Beobachtung werden Experimente angeregt, mit denen sich der Einfluss von Acyl1-Substraten gezielt auf frühe oder späte Ereignisse während des Zelltods untersuchen lässt.

Der Nachweis von *N*-Acetylleucin (NAL) in humanem Blutplasma wirft die Frage nach der Herkunft dieses Aminosäurederivates auf (s. 5-8). Die 9-Anthryldiazomethan-HPLC-Methode muss für weitere Analysen biologischer Proben jedoch noch weiter optimiert werden, zum Beispiel durch eine Festphasenextraktion der Anthrylester, den derivatisierten Analyten, vor der Chromatographie (s. Tab. 5-3). Zur weiteren Charakterisierung des apikalen, niedrigaffinen NAL-Transportsystems der LLC-PK₁-Zellen ist ein radioaktiver Substratnachweis vermutlich besser geeignet (s. 5.9).

Zur Überprüfung der Hypothese, dass die Acyl1 in der Säugerniere in der Lage ist, energieunabhängig Hippursäure zu synthetisieren (s. 5.5), sind nur Systeme geeignet, die der *in vivo*-Situation sehr nahe kommen. Die Entfernung des Produkts mit dem Primärharn ist nämlich die entscheidende Voraussetzung für diesen Synthesemechanismus. Zum Nachweis einer Acylase-abhängigen Hippursäuresynthese wären die Mikropunktion von corticalen Tubuli oder die Nierenperfusion mit gleichzeitiger Analyse des arteriellen und venösen Blutes sowie des Ultrafiltrates geeignete Techniken.

6 Zusammenfassung

Seit Schmiedeberg 1881 die Acylase 1 erstmals als zytosolisches „Ferment“ aus der Schweineniere anreicherte, erscheint das ungewöhnlich reichliche Vorkommen dieses Metalloenzym in der Säugerniere als rätselhaft. Die Versuche dieser Arbeit hatten zum Ziel, am Beispiel der humanen und der Schweineacylase zum Verständnis vornehmlich der Funktion aber auch der Struktur der Nierenacylase beizutragen.

- Die 9-Anthryldiazomethan-HPLC-Methode erweist sich als geeignete, quantitative Methode zum Nachweis von aliphatischen, N^α -acetylierten Aminosäuren, den bevorzugten Substraten der Acylase 1. Mit ihrer Hilfe wurde das Vorkommen von *N*-Acetylleucin/-isoleucin in humanem Blutplasma mit einer Konzentration von etwa 17 μ M nachgewiesen.
- In der apikalen Membran der proximalen Tubuluszelllinie LLC-PK₁ des Schweins wurde mittels der 9-Anthryldiazomethan-HPLC-Methode ein niedrigaffines, energieabhängiges Transportsystems für *N*-Acetylleucin nachgewiesen. Damit eine ausreichend effiziente Resorption von filtriertem *N*-Acetylleucin stattfinden kann, ist davon auszugehen, dass ein weiteres, hochaffines Transportsystem existiert.
- In LLC-PK₁-Zellen wurde, verglichen mit anderen Nierenzelllinien, eine hohe spezifische Acylaseaktivität nachgewiesen. Diese wurde eindeutig als Acylase1-Aktivität identifiziert. Ihre Regulation wurde unter verschiedenen wachstumsfördernden sowie Proteolyse-inhibierenden Bedingungen und in ruhenden Kulturen untersucht. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die zelluläre Aktivität der Acylase 1 als kataboles Enzym gemäß dem Proteolysestatus der Zelle reguliert wird.
- Bei durch Serumentzug ruhenden Kulturen von LLC-PK₁-Zellen, die statt mit freiem Methionin mit dem bevorzugten Acylase 1-Substrat *N*-Acetylmethionin inkubiert wurden, wurde ein deutlich verlängertes Überleben beobachtet. Zusammen mit dem starken Anstieg der Acylase 1-Aktivität bei Serumentzug spricht dies für eine Funktion der Acylase 1 in apoptotischen Zellen.
- Der rein lösliche Charakter der Acylase 1 wurde mittels Zellfraktionierungs-Versuchen bestätigt.

- Die Nierenacylase von Schwein und Mensch sowie zwei Mutanten des humanen Enzyms wurden mit dem Baculovirus-Expressions-Vektor-System exprimiert. Die Wildtypenzyme dienten dabei zu Vergleichszwecken. In den Mutanten waren die zwei für die Säugerenzyme charakteristischen PWW-Motive manipuliert. Es stellte sich heraus, dass eins der beiden PWW-Motive dem aktiven Zentrum nahe kommt und für dessen Funktionalität essenziell ist. Das zweite Motiv ist an der Enzymoberfläche exponiert und für die Gesamtstabilität des Proteins wichtig, ohne die Katalyse zu beeinflussen.
- Die kinetische Charakterisierung der Hydrolyse von *N*-Formylmethionin durch die rekombinanten Säugerenzyme spricht für eine Funktion der Acylase 1 beim Abbau dieser Acylaminosäure, die im mitochondrialen Proteinabbau anfällt.
- Durch Sequenzvergleiche von 27 pro- und eukaryotischen Mitgliedern der Acylase-Familie wurden neben den metallbindenden Resten sechs zu 100% konservierte und drei hochkonservierte Reste identifiziert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit am Aufbau des katalytischen Zentrums beteiligt sind.

Die Funktion der Acylase 1 in der Niere lässt sich vornehmlich durch ihre Rolle bei der intrazellulären Proteolyse erklären. Zusätzlich wird in dieser Arbeit aber auch die Hypothese diskutiert, dass das Enzym, insbesondere bei Herbivoren, an der Benzoessäureentgiftung beteiligt ist. Mit den Sequenzalignments und der Kristallstruktur der homologen Carboxypeptidase G2 ist eine Grundlage für Untersuchungen der katalytischen Eigenschaften der Acylasen geschaffen. Dies ist für eine Anwendung von Acylasen in der 'Direct enzyme prodrug therapy' (DEPT) zur Tumorthherapie von Bedeutung.

7 Literaturverzeichnis

Ackerman, S.K. und Douglas, S.D. (1979)

N-Formyl-L-methionine deformylase activity in human leucocytes and platelets
Biochem. J., **182**, 885-887

Adamson, P.C., Balis, F.M., McCully, C.L., Godwin, K.S. und Poplack, D.G. (1992)

Methotrexate pharmacokinetics following administration of recombinant carboxypeptidase-G2 in rhesus monkeys
J. Clin. Oncol., **10**, 1359-1364

Adamson, P.C., Balis, F.M., McCully, C.L., Godwin, K.S., Bacher, J.D., Walsh, T.J. und Poplack, D.G. (1991)

Rescue of experimental intrathecal methotrexate overdose with carboxypeptidase-G2
J. Clin. Oncol., **9**, 670-674

Aigner, A., Jäger, M., Pasternack, R., Weber, P., Wienke, D. und Wolf, S. (1996)
Purification and characterization of cysteine-*S*-conjugate *N*-acetyltransferase from pig kidney

Biochem. J., **317**, 213-218

Aitken, A. (1990)

Structure and sequence of acylated and alkylated proteins
in Aitken, A.: Identification of protein consensus sequences
Ellis Horwood (Chichester), pp. 55-80

Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H. und Boyd, M.R. (1988)

Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay
Cancer Res., **48**, 589-601

Anders, M.W. und Dekant, W. (1994)

Aminoacylases
Adv. Pharmacol., **27**, 431-448

Armstrong, M.D. und Robinow, M. (1967)

A case of hyperlysinemia: biochemical and clinical observations
Pediatrics, **39**, 546-554

Armstrong, M.D., Shaw, K.N.F., Gortatowski, M.J. und Singer, H. (1958)

The indole acids of human urine. Paper chromatography of indole acids
J. Biol. Chem., **232**, 17-30

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (Eds.) (1997)

Short protocols in molecular biology
John Wiley & Sons, Inc. (New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore), pp. 16-38

- Bachmair, A., Finley, D. und Varshavsky, A. (1986)**
In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue
Science, **234**, 179-186
- Bacon, C.L., Wilkinson, M., Jennings, P.V., Fhaolain, I.N. und O’Cuinn (1993)**
Purification and Characterization of an aminotripeptidase from cytoplasm of
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* AM2
Int. Dairy J., **3**, 163-177
- Baker, S.A., Monti, J.A., Christian, S.T., Benington, F. und Morin, R.D. (1980)**
9-Diazomethylanthracene as a new fluorescence and ultraviolet label for the
spectrometric detection of picomole quantities of fatty acids by high-pressure liquid
chromatography
Anal. Biochem., **107**, 116-123
- Baslow, M.H. (1997)**
A review of phylogenetic and metabolic relationships between the acylamino acids, *N*-
acetyl-L-aspartic acid and *N*-acetyl-L-histidine, in the vertebrate nervous system
J. Neurochem., **68**, 1335-1344
- Berens, W. (1999)**
Expression und Charakterisierung des Wildtyps und zweier Mutanten der humanen
Aminoacylase 1
Diplomarbeit Fachbereich Medizin, Universität Marburg
- Berg, T., Gjøen, T. und Bakke, O. (1995)**
Physiological function of endosomal proteolysis
Biochem. J., **307**, 313-326
- Bergmeyer, H.U. (1974)**
Methoden der enzymatischen Analyse. 3. Auflage
Verlag Chemie, Weinheim
- Bianchetti, R., Lucchini, G. und Sartirana, M.L. (1971)**
Endogenous synthesis of formyl-methionine peptides in isolated mitochondria and
chloroplasts
Biochem. Biophys. Res. Commun., **42**, 97-102
- Birnbaum, S.M., Levintov, L., Kingsley, R.B. und Greenstein, J.P. (1952)**
Specificity of amino acid acylases
J. Biol. Chem., **194**, 455-470
- Bishop, D.H.L. (1989)**
Control of insect pests by baculoviruses
in Notkins, A.L. und Oldstone (Eds.): Concepts in viral pathogenesis, Volume III
Springer Verlag (New York), pp. 368-382
- Bissard, G. und Rohrmann, F. (1990)**
Baculovirus diversity and molecular biology
Annu. Rev. Entomol., **35**, 127-55
- Boisell, J.P., Kasper, T.J. und Bunn, H.F. (1988)**
Cotranslational amino-terminal processing of cytosolic proteins
J. Biol. Chem., **263**, 8443-8449

- Bordallo, J., Bordallo, C., Gascón, S. und Suárez-Rendueles, P. (1991)**
Molecular cloning and sequencing of genomic DNA encoding yeast vacuolar carboxypeptidase yscS
FEBS Lett., **283**, 27-32
- Born, T.L., Zheng, R. und Blanchard, J.S. (1998)**
Hydrolysis of *N*-succinyl-L,L-diaminopimelic acid by *Haemophilus influenzae* *dapE*-encoded desuccinylase: metal activation, solvent isotope effects, and kinetic mechanism
Biochemistry, **37**, 10478-10487
- Bosman, B.W., Tan, P.S.T. und Konings, W.N. (1990)**
Purification and Characterization of a tripeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2
Appl. Environ. Microbiol., **56**, 1839-1843
- Bouvier, J., Richaud, C., Higgins, W., Böglér, O. und Stragier, P. (1992)**
Cloning, characterization, and expression of the *dapE* gene of *Escherichia coli*
J. Bacteriol., **174**, 5265-5271
- Boyen, A., Charlier, D., Charlier, J., Sakanyan, V., Mett, I. und Glansdorf, N. (1992)**
Acetylornithin deacetylase, succinyldiaminopimelat desuccinylase and carboxypeptidase G2 are evolutionary related
Gene, **116**, 1-6
- Braakman, I., Helenius, J. und Helenius, A. (1992a)**
Role of ATP and disulphide bonds during folding in the endoplasmic reticulum
Nature, **356**, 260-262
- Braakman, I., Helenius, J. und Helenius, A. (1992b)**
Manipulating disulfide bond formation and protein folding in the endoplasmic reticulum
EMBO J., **11**, 1717-1722
- Brachet, P., Gaertner, H., Tome, D., Dumontier, A.M., Guidoni, A. und Puigserver, A. (1991)**
Transport of *N*- α (or *N*- ϵ)-L-methionyl-L-lysine and acetylated derivatives across the rabbit intestinal epithelium
J. Nutr. Biochem., **2**, 387-394
- Bradford, M. M. (1976)**
A rapid and sensitive method for quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
Anal. Biochem., **72**, 248-54
- Bradshaw, R.A., (1989)**
Proteintranslocation and turnover in eukaryotic cells
Trends Biochem. Sci., **14**, 276-279
- Bradshaw, R.A., Brickey, W.W. und Kenneth, W.W. (1998)**
N-terminal processing: the methionine aminopeptidase and *N* ^{α} -acetyl transferase families
Trends Biochem. Sci., **23**, 263-267

- Broom, M.F., Sherriff, R.M., Tate, W.P., Collings, J. und Chadwick, V.C. (1989)**
Partial purification and characterization of a formylmethionine deformylase from rat small intestine
Biochem. J., **257**, 51-56
- Brown, J.L. (1979)**
A comparison of the turnover of α -N-acetylated and nonacetylated mouse L-cell proteins
J. Biol. Chem., **254**, 1447-1449
- Bruns, F.H. und Schulze, C. (1962)**
Acylase I: Reindarstellung, physikalisch-chemische Eigenschaften und Identität mit „Hippurikase“
Biochem. Z., **338**, 162-181
- Burch, H.B., Cambon, N. und Lowry, O.H. (1985)**
Branched-chain amino acid aminotransferase along the rabbit and rat nephron
Kidney Int., **28**, 114-117
- Burston, J. und McGivan, J. (1997)**
Identification and partial characterization of a novel membrane glycoprotein induced by amino acid deprivation in renal epithelial cells
Biochem. J., **322**, 551-555
- Charlier, J. (1985)**
Study of the metal-ion-mediated activation of acetylornithinase from *Escherichia coli* K12
Arch. Int. Phys. Biochem., **93**, 11-12
- Chen, Q., Jones, T.W., Brown, P.C. und Stevens, J.L. (1990)**
The mechanism of cysteine conjugate cytotoxicity in renal epithelial cells
J. Biol. Chem., **265**, 21603-21611
- Chen, Q., Yu, K., Holbrook, N.J. und Stevens, J.L. (1992)**
Activation of the growth arrest and DNA damage-inducible gene *gadd* 153 by nephrotoxic cysteine conjugates and dithiothreitol
J. Biol. Chem., **267**, 8207-8212
- Chen, R., Xu, D. und Zhou, H.M. (1997)**
The essential tryptophan residues of pig kidney aminoacylase
Biochem. Mol. Biol. Internat., **43**, 1277-1283
- Chenault, H.K., Dahmer, J. und Whitesides, G.M. (1989)**
Kinetic resolution of unnatural and rarely occurring amino acids: Enantioselective hydrolysis of N-acylamino acids catalyzed by acylase I
J. Am. Chem. Soc., **111**, 6354-6364
- Cho, H.Y., Tanizawa, K., Tanaka, H. und Soda, K. (1987)**
A spectrometric rate assay of aminoacylase
Analyt. Biochem., **165**, 142-146

- Chuman, L., Fine, L.G., Cohen, A.H. und Saier Jr, M.H. (1982)**
Continuous growth of proximal tubular kidney epithelial cells in hormone-supplemented serum-free medium
J. Cell Biol., **94**, 506-510
- Cohen, G.M. (1997)**
Caspases: The executioners of apoptosis
Biochem. J., **326**, 1-16
- Cook, R.M., Burke, B.J., Buchhagen, D.L., Minna, J.D. und Miller, Y.E. (1993)**
Human aminoacylase I: cloning, sequence and expression analysis of a chromosome 3p21 gene inactivated in small cell lung cancer
J. Biol. Chem., **268**, 17010-17017
- Cook, R.M., Franklin, W.A., Moore, M.D., Johnson, B.E. und Miller, Y.E. (1998)**
Mutational inactivation of aminoacylase-I in a small cell lung cancer cell line
Genes Chromosomes Cancer, **21**, 320-325
- Corpet, F. (1988)**
Multiple sequence alignment with hierarchical clustering
Nucl. Acids Res., **16**, 10881-10890
- Cowan, S. W. und Rosenbusch, J.P. (1994)**
Folding pattern diversity of integral membrane proteins
Science, **264**, 914-16
- Csaikl, F., Reimer, G. und Csaikl, U. (1986)**
Aminoacylase-I isoenzymes: A comparative study
Heredity, **56**, 157-160
- Cunin, R., Glansdorff, N., Piérard, A. und Stalon, V. (1986)**
Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria
Microbiol. Rev., **50**, 314-352
- Daabees, T.T., Andersen, D.W., Zike, W.L., Filer Jr., L.J. und Stegink, L.D. (1984)**
Portal and vena caval plasma methionine concentrations in young pigs administered L-methionine, N-acetyl-L-methionine and N-acetyl-D-methionine
J. Nutr., **114**, 1541-1547
- D'Adamo, A.F., Smith, J.C. und Woiler, C. (1973)**
The occurrence of N-acetylaspartate amidohydrolase (aminoacylase II) in the developing rat
J. Neurochem., **20**, 1275-1278
- Daniel, H. und Herget, M. (1997)**
Cellular and molecular mechanisms of renal peptide transport
Am. J. Physiol., **273**, F1-F8
- Deisenhofer, J. und Michel, H. (1991)**
High-resolution structures of photosynthetic reaction centers
Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., **20**, 247-266

- Demin, P., Reynaud, D., Pace-Asciak, C.R. (1995)**
High-performance liquid chromatographic separation of fluorescent esters of heptoxilin enantiomers on a chiral stationary phase
J. Chromatogr., **672**, 282-289
- Dice, F. (1990)**
Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis
Trends Biochem. Sci., **15**, 305-309
- Driessen, H.P.C., de Jong, W.W., Tesser, G.I. und Bloemendal, H. (1985)**
The mechanism of *N*-terminal acetylation of proteins
CRC Crit. Rev. Biochem., **18**, 281-306
- Dubovsky, J. und Dubavska, E. (1965)**
Clin. Chim. Acta, **12**, 118
- Duffel, W.M. und Jakoby, W.B. (1981)**
Cysteine *S*-conjugate *N*-acetyltransferase from rat kidney microsomes
Mol. Pharmacol., **21**, 444-448
- Earnshaw, W.C. (1999)**
A cellular poison cupboard
Nature, **397**, 387-389
- Edebo, L., Lange, S., Li, X.P., Allenmark, S., Lindgren, K. und Thompson, R. (1988)**
Seasonal, geographic and individual variation of okadaic acid content in cultivated mussels in Sweden
APMIS, **96**, 1036-1042
- Endo, Y. (1978a)**
N-Acyl-L-aromatic amino acid deacylase in animal tissues
Biochim. Biophys. Acta, **523**, 207-214
- Endo, Y. (1978b)**
Deacetylation and deformylation of *N*-acyl amino acids by kidney acylases
FEBS Letters, **95**, 281-283
- Endo, Y. (1980)**
In vivo deacetylation of *N*-acetyl amino acids by kidney acylases in mice and rats
Biochim. Biophys. Acta, **628**, 13-18
- Erlandsson, R., Boldog, F., Persson, B., Zabarovsky, E.R., Allikmets, R.L., Sümegi, J., Klein, G. und Jörnvall, H. (1991)**
The gene from the short arm of chromosome 3, at D3F15S2, frequently deleted in renal cell carcinoma, encodes acylpeptide hydrolase
Oncogene, **6**, 1293-1295
- Evans, V.R., Manning, A.B., Bernard, L.H., Chronwall, B.M. und Millington, W.R. (1994)**
 α -Melanocyte-stimulating hormone and *N*-acetyl- β -endorphin immunoreactivities are localized in the human pituitary but are not restricted to the zone intermedia
Endocrinology, **134**, 97-106

- Ferjancic-Biagini, A., Giardina, T. und Puigserver, A. (1998)**
Acylation of food proteins and hydrolysis by digestive enzymes: A review
J. Food Biochem., **22**, 331-345
- Fones, W.S. und Lee, M. (1953)**
Hydrolysis of *N*-acyl derivatives of alanine and phenylalanine by acylase I and carboxypeptidase
J. Biol. Chem., **201**, 847-856
- Frey, J., Kördel, W. und Schneider, F. (1977)**
The reaction of aminoacylase with chloromethylketone analogs of amino acids
Z. Naturforsch., **32c**, 769-776
- Fu, S.-C.J. und Birnbaum, S.M. (1953)**
The hydrolytic action of acylase I on *N*-acylamino acids
J. Am. Chem. Soc., **75**, 918-920
- Fujimoto, D., Koyama, T. und Tamyia, N. (1968)**
N-Acetyl- β -alanine deacetylase in hog kidney
Biochim. Biophys. Acta, **167**, 407-413
- Fujita, T., Nakajima, T., Matsuma, T., Nishida, H., Sakuma, S. und Fujimoto, Y. (1994)**
Effect of 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid on prostaglandin synthesis in rabbit kidney medulla microsomes
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., **83**, 51-60
- Gade, W. und Brown, J.L. (1981)**
Purification, Characterization and possible function of α -*N*-acylamino acid hydrolase from bovine liver
Biochim. Biophys. Acta., **662**, 86-93
- Galaev, I.Y. und Švedas, V. (1982)**
A kinetic study of a hog kidney aminoacylase
Biochim. Biophys. Acta, **701**, 389-394
- Garibotto, G., Tessari, P., Robaudo, C., Vettore, M., Saffioti, S., Zanetti, M., Sofia, A., Deferrari, G. und Tizianello, A. (1997b)**
Leucine metabolism and protein dynamics in the human kidney
in O'Donovan, D.J., Endou, H., Schoolwerth, A.C., Tizianello, A. und Walls, J. (Eds.): Nutritional and acid-base aspects of amino acid metabolism
Contrib. Nephrol., Karger (Basel), **121**, pp. 143-148
- Garibotto, G., Tessari, P., Robaudo, C., Zanetti, M., Saffioti, S., Vettore, M., Inchiostro, S. Sacco, P., Deferrari, G. und Tizianello, A. (1997a)**
Protein turnover in the kidney and the whole body in humans
Miner. Electrolyte. Metab., **23**, 185-188
- Gekle, M., Mildenerger, S., Freudinger, R., Schwerdt, G. und Sibernagel, S. (1997)**
Albumin endocytosis in OK cells: Dependence on actin and microtubules and regulation by protein kinases
Am. J. Physiol., **272**, F668-F677

Giardina, T., Biagini, A., Dalle Ore, F., Ferre, E., Reynier, M. und Puigserver, A. (1997)

The hog intestinal mucosa acylase I: subcellular localization, isolation, kinetic studies and biological function
Biochimie, **79**, 265-273

Gilles, I., Löffler, H.G. und Schneider, F. (1984)

Ein neues Isolierungsverfahren für Schweinenierenacylase. Kinetik des Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} und Cd^{2+} -Enzyms
Z. Naturforsch., **39c**, 1017-1020

Goldstein, F.B. (1963)

Studies on phenylketonuria. II. The excretion of *N*-acetyl-L-phenylalanine in phenylketonuria
Biochem. Biophys. Acta, **71**, 204

Goldstein, F.B. (1976)

Amidohydrolases of brain. Enzymatic hydrolysis of *N*-acetyl-L-aspartate and other *N*-acetyl-L-amino acids
J. Neurochem., **26**, 45-49

Green, R.M. und Elce, J.S. (1974)

Acetylation of *S*-substituted cysteines by a rat liver and kidney microsomal *N*-acetyltransferase
Biochem. J., **147**, 283-289

Greenhough, K.J., Turner, A.J. (1991)

Aminoacylase I is not a glycolipid-anchored ectoenzyme in pig kidney
Biochim. Biophys. Acta, **1076**, 364-368

Greenstein, J.P. und Winitz, M. (1961)

Chemistry of the amino acids
John Wiley & Sons, Inc. (New York), pp. 1754-1767

Grisolia, S., Reglero, A. und Rivas, J. (1977)

N-Formylmethionine deformylase of animal tissues
Biochem. Biophys. Res. Commun., **77**, 237-244

Gruenwald, S. und Heitz, J. (1993)

Baculovirus Expression Vector System: Procedures & Methods Manual, second Edition
PharMingen (San Diego)

Halleck, M.M., Holbrook, N.J., Skinner, J., Liu, H. und Stevens, J.L. (1997)

The molecular response to reductive stress in LLC-PK₁ renal epithelial cells: coordinate transcriptional regulation of *gadd153* and *grp78* genes by thiols
Cell Stress Chaperones, **2**, 31-40

Hanahan, D. (1985)

Techniques for transformation of *E. coli*
in Glover, D.M.: DNA cloning Vol. I: A practical approach
IRL-Press (Oxford), pp. 109-135

- Handler, J.S., Perkins, F.M. und Johnson, J.P. (1980)**
Studies of renal cell function using cell culture techniques
Am. J. Physiol., **228**, F1-F9
- Healy, E., Dempsey, M., Lally, C. und Ryan, M.P. (1998)**
Apoptosis and necrosis: Mechanisms of cell death induced by cyclosporin A in a renal proximal tubular cell line
Kidney Int., **54**, 1955-1966
- Heese, D. (1989)**
Kernresonanzspektroskopische Charakterisierung von Inhibitor-Komplexen mangansubstituierter Aminoacylase I
Dissertation Fachbereich Chemie, Universität Marburg
- Heese, D. und Röhm, K.H. (1989)**
Reactivities of sulfhydryl groups in native and metal-free aminoacylase I
Biol. Chem. Hoppe-Seyler, **370**, 607-612
- Heese, D., Berger, S. und Röhm, K.-H. (1990)**
Nuclear magnetic relaxation studies of the role of the metal ion in Mn²⁺-substituted aminoacylase I
Eur. J. Biochem., **88**, 175-180
- Hellendoorn, M.A., Franke-Fayard, B.M., Mierau, I., Venema, G. und Kok, J. (1997)**
Cloning and analysis of the pepV dipeptidase gene of *Lactococcus lactis* MG1363
J. Bacteriol., **179**, 3410-3415
- Henseling, J. und Röhm, K.H. (1987)**
Unusual isotope effects on the aminoacylase-catalyzed hydrolysis of acetylaminic acids
FEBS Letters, **29**, 27-30
- Henseling, J. und Röhm, K.H. (1988)**
Aminoacylase I from hog kidney: anion effects and the pH dependence of kinetic parameters
Biochim. Biophys. Acta, **959**, 370-377
- Hermesdorf, C.L. (1978)**
Tripeptide-specific aminopeptidase from *Escherichia coli* AJ005
Biochemistry, **17**, 3370-3376
- Hershko, A. und Tomkins, G.M. (1971)**
Studies on the degradation of tyrosin aminotransferase in hepatoma cells in culture. Influence of the composition of the medium and adenosine triphosphate dependence
J. Biol. Chem., **246**, 710-714
- Hink, W.F. und Vail, P.V. (1973)**
A plaque assay for titration of alfalfa looper nuclear polyhedrosis virus in a cabbage looper TN-368 cell line
Invertebr. Pathol., **22**, 168-74

- Hinton, D.M., Riley, R.T., Showker, J.L. und Rigsby, W. (1989)**
Patulin induced ion flux in renal cells and reversal by dithiothreitol and glutathione: A scanning electron microscopy (SEM) X-ray microanalysis study
J. Biochem. Toxicol., **4**, 47-54
- Holt, I.J. und Jacobs, H.T. (1994)**
The structure and expression of normal and mutant mitochondrial genomes in Darley-USmar, V. und Schapira, A.H.V. (Eds.): Mitochondria: DNA, proteins and disease
Portland press (London), pp. 27-54
- Höpfner, S. (1999)**
persönliche Mitteilung
- Hughes, P., Sherwood, R.F. und Lowe, C.R. (1984)**
Studies on the nature of transition-metal-ion-mediated binding of triazine dyes to enzymes
Eur. J. Biochem., **144**, 135-142
- Hull, R.N., Cherry, W.R. und Weaver, G.W. (1976)**
The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK₁
In Vitro, **12**, 670-677
- Ishido, M., Tohyama, C. und Suzuki, T. (1998)**
c-Myc is not involved in cadmium-elicited apoptotic pathway in porcine kidney LLC-PK₁ cells
Life Sci., **63**, 1195-1204
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. und Michel, H. (1995)**
Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *paracoccus denitrificans*
Nature, **376**, 660-669
- Jakob, M. (1992)**
Klonierung, Sequenzierung und Analyse von cDNA-Klonen der Aminoacylase I aus Schweineniere
Dissertation Fachbereich Chemie, Universität Marburg
- Jakob, M., Miller, Y.E. und Röhm K.-H. (1992)**
Cloning and sequence analysis of cDNA encoding aminoacylase from porcine kidney
Hoppe Seyler's Z. f. Physiol. Chem., **373**, 1 227-231
- James, K.J., Bishop, A.G., Draiski, R., Palleschi, L., Marchiafava, C., Ferretti, E., Satake, M. und Yasumoto, T. (1999)**
Liquid chromatographic methods for the isolation and identification of new pectenotoxin-2 analogues from marine phytoplankton and shellfish
J. Chromatogr., **844**, 53-65
- Jarvis, D.L., Garcia Jr., A. (1994)**
Long-term stability of baculoviruses stored under various conditions
BioTechniques, **16**, 508-513

- Jellum, E., Horn, L., Thoresen, O., Kvittigen, E.A. (1986)**
Urinary excretion of *N*-acetyl amino acids in patients with some inborn errors of amino acid metabolism
Scand. J. Clin. Lab. Invest., **46: Suppl. 184**, 21-26
- Johnson, B.E., Sagakuchi, A.Y., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Burch, D., Angus, M. und Naylor, S.L. (1988)**
Restriction fragment length polymorphism studies show consistent loss of chromosome 3p alleles in small cell lung cancer patients' tumors
J. Clin. Invest., **82**, 502-507
- Jones, W.M., Scaloni, A., Bossa, F., Popowicz, A.M. und Manning, J.M. (1991)**
Genetic relationship between acylpeptide hydrolase and acylase, two hydrolytic enzymes with similar binding but different catalytic specificities
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 2194-2198
- Kachel, K., Asuncion-Punzalan, E., London, E. (1995)**
Anchoring of tryptophane analogs at the hydrocarbon-polar boundary in model membrane vesicles: Parallax analysis of fluorescence quenching induced by nitroxide-labeled phospholipids
Biochemistry, **34**, 15475-15479
- Kalghatgi, K.K. und Bertino, J.R. (1981)**
Folate-degrading enzymes: a review with special emphasis on carboxypeptidase G in Holcenberg, J.S. und Roberts, J. (Eds.): Enzymes as drugs
Wiley (New York), pp. 77-102
- Kao, J., Jones, C., Fry, J.R. und Bridges, J.W. (1979)**
Species differences in the metabolism of benzoic acid by isolated hepatocytes and kidney tubule fragments
Life Sci., **23**, 1221-1228
- Kargas, G., Rudy, T., Spenetta, T., Takayama, K., Querishi, N. und Shrago, E. (1990)**
Separation and quantitation of long-chain free fatty acids in human serum by high-performance liquid chromatography
J. Chromatogr., **526**, 331-340
- Karita, M., Etterbeek, M.L., Forsyth, M.H., Tummuru, M.K.R. und Blaser, M.J. (1997)**
Characterization of *Helicobacter pylori* *dapE* and construction of a conditionally lethal *dapE* mutant
Infect. Immun., **65**, 4158-4164
- Karp, G. (1999)**
Cell and molecular biology, concepts and experiments
John Wiley & Sons, Inc. (New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore), pp. 322-325
- Kasuya, F., Igarashi, K. und Fukui, M. (1996)**
Participation of a medium chain acyl-CoA synthetase in glycine conjugation of the benzoic acid derivatives with the electron-donating groups
Biochem. Pharmacol., **51**, 805-809

- Kaul, R., Casanova, J., Johnson, A.B., Tang, P. und Matalon, R. (1991)**
Purification, characterization, and localization of aspartoacylase from bovine brain
J. Neurochem., **56**, 129-135
- Kaul, R., Gao, G.P., Balamurugan, K. und Matalon, R. (1993)**
Cloning of the human aspartoacylase cDNA and a common missense mutation in Canavan disease
Nat. Genet., **5**, 118-123
- Kaushal, G.P., Ueda, N. und Shah, S.V. (1997)**
Role of (ICE/CED 3 proteases) in DNA damage and cell death in response to a mitochondrial inhibitor, antimycin A
Kidney Int., **52**, 438-445
- Kawakami, Y. und Ohmori, S. (1994)**
Microidentification of N-terminal-blocked amino acid residues of proteins and peptides
Anal. Biochem., **220**, 66-72
- Kawakami, Y., Ohga, T., Shimamoto, C., Satoh, N. und Ohmori, S. (1992)**
Determination of free *N*-acetylamino acids in biological samples and *N*-terminal acetylamino acids of proteins
J.Chromatogr., **576**, 63-70
- Keller, J.W. (1984)**
Enzyme assay by repetitive flow injection analysis. Application to the assay of hog kidney aminoacylase
Anal. Lett., **17**, 589-598
- Kimmich, G.A., Randles, J. und Wilson, J. (1994)**
Na⁺-coupled alanine transport in LLC-PK₁ cells
Am. J. Physiol., **267**, C1119-C1129
- Kindler, S.H. und Gilvarg, C. (1960)**
N-Succinyl-L- α , ϵ -diaminopimelic acid deacylase
J. Biol. Chem., **235**, 3532-3535
- King, L.A. und Possee, R.D. (1992)**
The baculovirus expression system: A laboratory guide
Chapman and Hall, London
- Kitts, P.A. und Possee, R.D. (1993)**
A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency
Biotechniques, **14**, 810-17
- Kitts, P.A., Ayres, M.D. und Possee, R.D. (1990)**
Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors
Nucleic Acids Research, **18**, 5 667-72
- Klenk, H.D. (1996)**
Post-translational modifications in insect cells
Cytotechnology, **20**, 139-144

Kobayashi, K. und Smith, J.A. (1987)

Acyl-peptide hydrolase from rat liver
J. Biol. Chem., **262**, 11435-11445

Kolb, E. (1989)

Lehrbuch der Physiologie der Haustiere, Teil II
Gustav Fischer Verlag (Stuttgart)

Kool, M., Voncken, J.E., Vanlier, F.J.L. und Tramper, J. (1991)

Detection and analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutants with defective interfering properties
Virology, **183**, 739-46

Kördel, W. (1977)

Proteinchemische und kinetische Untersuchungen an der Aminoacylase aus Schweineniere
Dissertation Fachbereich Chemie, Universität Marburg

Kördel, W. und Schneider, F. (1975)

The pH-dependence of the peptidase activity of aminoacylase
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **356**, 915-920

Kördel, W. und Schneider, F. (1976a)

Chemical investigations on pig kidney aminoacylase
Biochem. Biophys. Acta, **445**, 446-457

Kördel, W. und Schneider, F. (1976b)

Chemical Modification of two tryptophane residues abolishes the catalytic activity of aminoacylase
Biol. Chem. Hoppe-Seyler, **369**, 559-566

Kördel, W. und Schneider, F. (1977a)

Renal aminoacylase, a zinc enzyme
Z. Naturforsch., **32c**, 342-344

Kördel, W. und Schneider, F. (1977b)

Identification of essential histidine residues of aminoacylase by photooxidation and by reaction with diethylpyrocarbonate
Z. Naturforsch., **32c**, 337-41

Kördel, W., Frey, J., Löffler, H.G. und Schneider, F. (1983)

Das aktive Zentrum der Aminoacylase aus Nieren
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **364**, 345-346

Kroll, M. (1986)

Vergleichende kinetische und proteinchemische Untersuchungen an Acylasen aus Human- und Schweineniere: Synthese und Untersuchung neuer nierenselektiver Prodrugs
Dissertation Fachbereich Chemie, Universität Marburg

Kuroda, K., Geyer, H., Geyer, R., Doerfler, W. und Klenk, H.D. (1990)

The oligosaccharides of influenza virus hemagglutinin expressed in insect cells by a baculovirus vector
Virology, **174**, 418-429

- Laemmli, U.K. (1970)**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature, **277**, 680-85
- Larsson, R. und Cerutti, P. (1989)**
Translocation and enhancement of phosphotransferase activity of protein kinase C following exposure in mouse epidermal cells to oxidants
Cancer Res., **49**, 5627-5632
- Lash, L.H. und Anders, M.W. (1989)**
Uptake of nephrotoxic S-conjugates by isolated rat renal proximal tubular cells
J. Pharmacol. Exp. Ther., **248**, 531-537
- Lawrence, J.F., Roussel, S. und Menard, C. (1996)**
Liquid chromatographic determination of okadaic acid and dinophysistoxin-1 in shellfish after derivatization with 9-chloromethylanthracene
J. Chromatogr., **721**, 359-364
- Lee, H.H. und Miller, L.K. (1978)**
Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus
Virology, **27**, 754-67
- Lehnartz, E. (1943)**
Einführung in die physiologische Chemie, 6. Auflage
Springer Verlag (Berlin), pp. 270
- Liebich, H.M. und Först, C. (1985)**
Urinary excretion of N-acetylamino acids
J. Chromatogr., **338**, 187-191
- Lin, Y., Myhrman, R., Schrag, M.L. und Gelb, M.H. (1988)**
Bacterial N-Succinyl-L-diaminopimelic acid desuccinylase
J. Biol. Chem., **263**, 1622-1627
- Lindner, H. (1996)**
Expression humaner Acylase I im Baculovirus-Expressions-Vektor-System
Diplomarbeit Fachbereich Medizin, Universität Marburg
- Lindner, H., Höpfner, S., Täfler-Naumann, M., Miko, M., Konrad, L. und Röhm, K.H. (1999)**
The distribution of aminoacylase I among mammalian species and localization of the enzyme in porcine kidney
zur Veröffentlichung eingereicht
- Lodish, H.F., Kong, N. und Wikström, L. (1992)**
Calcium is required for folding of newly made subunits of the asialoglycoprotein receptor within the endoplasmic reticulum
J. Biol. Chem., **267**, 12753-12760
- Löffler, H.G. und Schneider, F. (1987)**
Inhibition of aminoacylase from hog kidney by 2-ethoxy-1-(ethoxycarbonyl)-1,2-dihydroquinoline
Biol. Chem. Hoppe Seyler, **368**, 481-485

- Löffler, H.G., Kroll, M. und Schneider, F. (1988)**
3-(2-Furyl)-acryloyl-, -thienyl-acryloyl- and cinnamoyl- amino acids: novel substrates for aminoacylase I
Biol. Chem. Hoppe Seyler, **369**, 866
- Löffler, H.G., Röhm, K.H. und Schneider, F. (1986)**
Studies on the metal ion dependence, kinetics and SH (S-S) groups of acylamino acid amidohydrolase
in Bertini, I., Luchinat, C., Maret, W., Zeppezauer, M. (Eds.): Zinc enzymes
Birkhäuser (Boston, Basel, Stuttgart), pp. 281-288
- Löffler, H.G., Schneider, F., Aumüller, G. und Unsicker, K. (1982)**
Immunocytochemische Untersuchungen zur Lokalisation der Aminoacylase I in der Schweineniere
Acta Histochem., **Suppl XXV**, 57-60
- Löffler, M. (1999)**
persönliche Mitteilung
- Lorentz, K., Voss, J. und Flatter, B. (1975)**
A new method for the assay of aminoacylase: Elaboration of a fixed-incubation method for routine measurements
Clin. Chim. Acta, **63**, 263-269
- Maack, T., Johnson, V., Kau, S.T., Figueiredo, J. und Sigulem, D. (1979)**
Renal filtration, transport, and metabolism of low-molecular-weight proteins: A review
Kidney Int., **16**, 251-270
- Marais, R., Spooner, R., Stribbling, S.M., Light, Y., Martin, J. und Springer, C.J. (1997)**
A cell surface tethered enzyme improves efficiency in gene-directed enzyme prodrug therapy
Nat. Biotechnol., **15**, 1373-1377
- Marks, N., Lo, E.S., Stern, F. und Danho, W. (1983)**
Observations on N^{α} -deacetylation of model amino acids and peptides: Distribution and purification of a specific N -acyl amino acid releasing enzyme in rat brain
J. Neurochem., **41**, 201-208
- Marsh, D. (1996)**
Peptide models for membrane channels
Biochem. J., **315**, 345-361
- Martin, J., Stribbling, S.M., Poon, G.K., Begent, R.H., Napier, M., Sharma, S.K. und Springer, C.J. (1997)**
Antibody-directed enzyme prodrug therapy: pharmacokinetics and plasma levels of prodrug and drug in a phase I clinical trial
Cancer Chemother. Pharmacol., **40**, 189-201
- Maurer, H.R. (1992)**
Towards serum-free, chemically defined media for mammalian cell culture
in Freshney, R.I.: Animal cell culture: A practical approach
IRL-Press (Oxford), pp. 15-46

- Mayer, M. und Noble, M. (1994)**
N-Acetyl-L-cysteine is a pluripotent protector against cell death and enhancer of trophic factor-mediated cell survival
 Proc. Natl. Acad. Sci., **91**, 7496-7500
- Meinzel, T., Schmitt, E., Mechulam, Y. und Blanquet, S. (1992)**
 Structural and biochemical characterization of the *Escherichia coli argE* gene product
 J. Bacteriol., **174**, 2323-2331
- Melton, R.G. und Sherwood, R.F. (1996)**
 Antibody-enzyme conjugates for cancer therapy
 J. Natl. Cancer Inst., **88**, 153-165
- Mertens, J.J.W.M, Keukens, E.A.J., Appel, M., Spenkeling, B., Temmink, J.H.M. und van Bladeren, P.J. (1990)**
 Cytotoxicity of *S*-(1,2,3,4,4-pentachlorobutadienyl)-L-cysteine after apical and basolateral exposure of LLC-PK₁ monolayers. Involvement of an amino acid transport system
 Chem.-Biol. Interactions, **75**, 119-130
- Mertens, J.J.W.M., Gibson, N.W., Lau, S.S. und Monks, T.J. (1995)**
 Reactive oxygen species and DNA damage in 2-bromo-(glutathion-*S*-yl)hydroquinone-mediated cytotoxicity
 Arch. Biochem. Biophys., **320**, 51-58
- Metz, G., Marx, R., Röhm, K.H. (1977)**
 The quaternary structure of yeast aminopeptidase I
 Zeitschrift für Naturforschung. Section C. Journal of Biosciences, **32c**, 929-937
- Meyer, H.E. (1998)**
 persönliche Mitteilung
- Miamato, C., Smith, G.E., Farrel-Towt, J., Chizzonite, R., Summers, R. und Ju, G. (1985)**
 Production of human c-myc protein in insect cells infected with a baculo virus expression vector
 Mol. Cell. Biol., **5**, 2860-2865
- Michel, H. (1998)**
 persönliche Mitteilung
- Mierau, I., Haandrikman, A.J., Velterop, O., Tan, P.S.T., Leenhouts, K.L., Konings, W.N., Veneman, G. und Kok, J. (1994)**
 Tripeptidase gene (*pepT*) of *Lactococcus lactis*: molecular cloning and nucleotide sequencing of *pepT* and construction of a chromosomal deletion mutant
 J. Bacteriol., **176**, 2854-2861
- Miko, M. (1993)**
 Vergleichende Biochemie der Aminoacylase I
 Dissertation Fachbereich Medizin, Universität Marburg

- Miller, C.C., Hale, P. und Pentland, A.P. (1994)**
Ultraviolet B injury increases prostaglandine synthesis through a tyrosine kinase-dependent pathway
J. Biol. Chem., **269**, 3529-3533
- Miller, C.G., Miller, J.L. und Bagga, D.A. (1991)**
Cloning and nucleotide sequence of the anaerobically regulated *pepT* gene of *Salmonella typhimurium*
J. Bacteriol., **173**, 3554-3558
- Miller, L.K. (1981)**
A virus vector for genetic engineering in invertebrates
in Panopoulos, N. (Ed.): Genetic Engineering in the Plant Sciences
pp. 203-224
- Miller, Y.E. und Kao, B. (1989a)**
Monoclonal antibody based immunoassay for human aminoacylase-1
J. Immunoassay, **10**, 129-152
- Miller, Y.E., Minna, J.D. und Gazdar, A.F. (1989b)**
Lack of expression of aminoacylase-1 in small cell lung cancer
J. Clin. Invest., **83**, 2120-2124
- Miller-Stein, C., Hwang, B.Y., Rhodes, G.R. und Boppana, V.K. (1993)**
Column-switching high-performance liquid chromatographic method for the determination of SK&F 106203 in human plasma after fluorescence derivatization with 9-anthryldiazomethane
J. Chromatogr., **631**, 233-240
- Minton, N.P., Atkinson, T. und Sherwood, R.F. (1983)**
Molecular cloning of the *Pseudomonas* carboxypeptidase G2 gene and its expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*
J. Bacteriol., **156**, 1222-1227
- Minton, N.P., Atkinson, T., Bruton, C.J. und Sherwood, R.F. (1984)**
The complete sequence of the *Pseudomonas* gene coding for carboxypeptidase G2
Gene, **31**, 31-38
- Mitta, M., Kato, I. und Tsunasawa, S. (1993)**
The nucleotide sequence of human aminoacylase I
Biochim. Biophys. Acta, **1174**, 201-203
- Mitta, M., Ohnogi, H., Yamaoto, A., Kato, I., Sakiyama, F., und Tsunasawa, S. (1992)**
The primary structure of porcine aminoacylase 1 deduced from cDNA sequence
J. Biochem., **112**, 737-742
- Mitz, M.A. und Schlueter, R.J. (1958)**
Direct spectrophotometric measurement of the peptide bond: Application to the determination of acylase I
Biochem. Biophys. Acta, **27**, 168-172

- Moerschell, R.P., Hosokawa, Y., Tsunaswa, S. und Sherman, F. (1990)**
The specificities of yeast methionine aminopeptidase and acetylation of amino-terminal methionine *in vivo*
J. Biol. Chem., **265**, 19638-19643
- Moller, J.V. und Sheikh, M.I. (1983)**
Renal organic anion transport system: Pharmacological, physiological, and biochemical aspects
Pharmacol. Rev., **34**, 315-358
- Mora, R., Berndt, K.D., Tsai, H. und Meredith, S.C. (1988)**
Quantitation of aspartate and glutamate in HPLC analysis of phenylthiocarbamyl amino acids
Anal. Biochem., **172**, 368-376
- Morgenstern, B. (1999)**
DIALIGN 2: improvement of the segment to segment approach to multiple sequence alignment
Bioinformatics, **15**, 211-218
- Morgenstern, B., Werner, T. und Dress, A.W.M. (1996)**
Multiple DNA and protein sequence alignment based on segment-to-segment comparison
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 12098-12103
- Mortimore, G.E. und Schworer, C.M. (1977)**
Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver
Nature, **270**, 174-176
- Mu, X. und Welbourne, T. (1996)**
Response of LLC-PK1-F+ cells to metabolic acidosis
Am. J. Physiol., **270**, C920-C925
- Nakai, K. und Horton, P. (1999)**
PSORT: A program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization
Trends Biochem. Sci., **24**, 34-35
- Naylor, S.L., Elliott, R.W., Brown, J.A. und Shows, T.B. (1982)**
Mapping of aminoacylase-1 and β -galactosidase-A to homologous regions of human chromosome 3 and mouse chromosome 9 suggests location of additional genes
Am. J. Hum. Genet., **34**, 235-244
- Naylor, S.L., Johnson, B.E., Minna, J.D. und Sakaguchi, A.Y. (1987)**
Loss of heterozygosity of chromosome 3p markers in small cell lung cancer
Nature, **329**, 451-454
- Neely, A.N., Cox, J.R., Fortney, J.A., Schworer, C.M. und Mortimore, G.E. (1977)**
Alterations of lysosomal size and density during rat liver perfusion. Suppression by insulin and amino acids
J. Biol. Chem., **252**, 6948-6954

- Neely, A.N., Nelson, P.B. und Mortimer, G.E. (1974)**
Biochim. Biophys. Acta, **338**, 458-472
- Niculescu, D.D., Niculescu, D.I., Friedlos, F., Martin, J., Spooner, R., Davies, L., Marais, R. und Springer, C.J. (1998)**
Self-immolative nitrogen mustard prodrugs for suicide gene therapy
J. Med. Chem., **41**, 5297-5309
- Nimura, N. und Kinoshita, T. (1980)**
Fluorescent labeling of fatty acids with 9-anthryldiazomethane (ADAM) for high performance liquid chromatography
Analytical Letters, **13**, 191-202
- Nussbaum, A.K. (1999)**
persönliche Mitteilung
- O'Reilly, D.R. und Miller, L.K. (1988)**
Expression and complex formation of simian virus 40 large T-antigen and mouse p53 in insect cells
J. Virol., **62**, 3109-3119
- O'Reilly, D.R., Miller, L.K. und Luckow, V.A. (1992)**
Baculovirus expression vectors: A laboratory manual
W.H. Freeman and Company (New York)
- Ogawa, H., Gomi, T., Takata, Y., Date, T. und Fujioka, M. (1997)**
Recombinant expression of rat glycine *N*-methyltransferase and evidence for contribution of *N*-terminal acetylation to co-operative binding of *S*-adenosylmethionine
Biochem. J., **327**, 407-412
- Ohba, Y., Hattori, Y., Sakata, S., Yamashiro, Y., Okayama, N., Hirano, T., Nakanishi, T., Miyazaki und Shimizu, A. (1997)**
HB Niigata [β 1(Na1)Val \rightarrow Leu]: The fifth variant with retention of the initiator methionine and partial acetylation
Hemoglobin, **21**, 179-186
- Okuyama, T. und Satake, K. (1960)**
Biochem., **47**, 454
- Orehovitch, V.N., Schukina, L.A., Cheng-Wu, C. und Spirichev, V.B. (1958)**
The role of the character of the amino acid and of acyl radicals in the enzymatic synthesis of L-acylamino acids by acylase I
Biochimija, **24**, 667-671
- Örning, L., Norin, E., Gustafsson, B. und Hammerström, S. (1986)**
In vivo metabolism of leukotriene C₄ in germ-free and conventional rats: Fecal excretion of *N*-acetyl-leukotriene E₄
J. Biol. Chem., **261**, 766-771
- Östlund, E., Larsson, S.H., Wroblewski, R., Wroblewski, J. und Aperia, A. (1993)**
Growth of LLC-PK₁ cells: Lack of effect of Na⁺-loading
Acta Physiol. Scand., **148**, 77-83

- Ötvös, L., Moravcsik, E. und Mády, Gy. (1971)**
Investigation on the mechanism of Acylase-I-catalyzed acylamino acid hydrolysis
Biochem. Biophys. Res. Commun., **44**, 1056-1064
- Ou, Y.H., Zhao, G. und Zhou, X. (1987)**
The functional role of zinc in aminoacylase
Chin. Biochem. J., **3**, 411-416
- Paik, W.K., Bloch-Frankenthal, L., Birnbaum, S.M., Winitz, M. und Greenstein, J.P. (1957)**
 ϵ -Lysin Acylase
Arch. Biochem. Biophys., **69**, 50-66
- Palm, G.J. und Röhm, K.H. (1995)**
Aminoacylase I from porcine kidney: Identification and characterization of two major protein domains
J. Protein Chem., **14**, 233-240
- Palm, G.J. (1994)**
Charakterisierung zweier Domänen und Sequenzanalyse der Enzymfamilie von Aminoacylase I aus Schweineniere
Dissertation Fachbereich Chemie, Universität Marburg
- Perantoni, A. und Berman, J.J. (1979)**
Properties of Wilm's tumor line (TUWI) and pig kidney line (LLC-PK₁) typical of normal kidney tubular epithelium
In Vitro, **15**, 446-454
- Phillips, M.B. und Anker, H.S. (1957)**
On the acetylation of aliphatic amines by kidney preparations
J. Biol. Chem., **227**, 465-471
- Pittelkow, S. (1996)**
Expression und Charakterisierung von zwei Enzymen der Acylasefamilie
Dissertation Fachbereich Medizin, Universität Marburg
- Pittelkow, S., Lindner, H. und Röhm, K.H. (1998)**
Human and porcine aminoacylase I overproduced in a baculovirus expression vector system. Evidence for structural and functional identity with enzymes isolated from kidney
Protein Expression and Purification, **12**, 269-276
- Plempner, R.K. und Wolf, D.H. (1999)**
Retrograde protein translocation: ERADiction of secretory proteins in health and disease
Trends Biochem. Sci., **24**, 266-270
- Poon, K. und Pang, K.S. (1995)**
Benzoic acid glycine conjugation in the isolated perfused rat kidney
Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem. **23**, 255-260

Potthoff, U. (1996)

Immunhistochemische und enzymhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation der Aminoacylase I in der Schweineniere
Dissertation Fachbereich Medizin, Universität Marburg

Qilliam, M.A. (1995)

Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection
J. AOAC Int., **78**, 555-570

Quavi, H. und Kit, S. (1980)

Electrophoretic patterns of aminoacylase-1 (ACY-1) isoenzymes in vertebrate cells and histochemical procedure for detecting ACY-1 activity
Biochemical Genetics, **18**, 669-679

Rabito, C.A. (1986)

Occluding junctions in a renal cell line (LLC-PK₁) with characteristics of proximal tubule cells
Am. J. Physiol., **250**, F734-F743

Rabito, C.A. und Karish, M.V. (1983)

Polarized amino acid transport by an epithelial cell line of renal origin (LLC-PK₁). The apical systems
J. Biol. Chem., **258**, 2543-2547

Rabito, C.A. und Karish, M.V. (1982)

Polarized amino acid transport by an epithelial cell line of renal origin (LLC-PK₁). The basolateral systems
J. Biol. Chem., **257**, 6802-6808

Raphel, V., Lupi, N., Dupuis, L. und Puigserver, A. (1993)

The *N*-acylpeptide hydrolase from porcine intestine: isolation, subcellular localization and comparative hydrolysis of peptide and isopeptide bonds
Biochimie, **75**, 891-897

Rawlings, N.D. und Barrett, A.J. (1995)

Evolutionary families of metallopeptidases
Methods Enzymol., **248**, 183-228

Richardson, C.D. (1995)

Baculovirus expression protocols
Humana Press (New Jersey)

Riley, R.T., Hinton, D.M., Showker, J.L., Rigsby, W. und Norred, W.P. (1990)

Chronology of patulin-induced alterations in membrane function of cultured renal cells, LLC-PK₁
Toxicol. Appl. Pharmacol., **102**, 128-141

Röhm, K.H. (1989)

Butylmalonate is a transition state analogue for aminoacylase I
FEBS Letters, **250**, 191-194

Röhm, K.H. (1999)

persönliche Mitteilung

- Röhm, K.H. und van Etten, R.L. (1986)**
Catalysis by hog kidney acylase does not involve a covalent intermediate
Eur. J. Biochem., **160**, 327-32
- Rotruck, J.Z. und Boggs, R.W. (1975)**
Comparative metabolism of L-methionine and *N*-acetylated derivatives of methionine
J. Nutr., **105**, 331-337
- Rowell, S., Pauptit, R.A., Tucker, A.D., Melton, R.G., Blow, D.M. und Brick, P. (1997)**
Crystal structure of carboxypeptidase G₂, a bacterial enzyme with application in cancer therapy
Structure, **5**, 337-347
- Sakuma, S., Fujimoto, Y., Sawada, T., Saeki, K., Akimoto, M. und Fujita, T. (1999)**
Existence of acyl-CoA hydrolase-mediated pathway supplying arachidonic acid for prostaglandin synthesis in microsomes from rabbit kidney medulla
Prostaglandins Other Lipid Mediat., **57**, 63-72
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1982)**
Molecular Cloning: A laboratory manual
Cold Spring Harbor (New York)
- Satake, K., Okuyama, T., Ohashi, M. und Shinoda, T. (1960)**
Biochem., **47**, 654
- Scaloni, A., Jones, W., Pospischil, M., Sassa, S., Schneewind, O., Popowicz, A.M., Bossa, F., Graziano, S.L. und Manning, J. (1992)**
Deficiency of acylpeptide hydrolase in small-cell lung carcinoma cell lines
J. Lab. Clin. Med., **120**, 546-552
- Scapin, G. und Blanchard, J.S. (1998)**
Enzymology of bacterial lysine biosynthesis
Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, **72**, 279-324
- Schachter, D. und Taggart, J.V. (1953)**
Benzoyl coenzyme A and hippurate synthesis
J. Biol. Chem., **203**, 925-934
- Schachter, D. und Taggart, J.V. (1954)**
Glycine *N*-acylase: Purification and properties
J. Biol. Chem., **208**, 263-275
- Schmiedberg, O. (1881)**
Ueber Spaltungen und Synthesen im Thierkörper
Naunym-Schmiedberg's Archiv. Exp. Path. Pharmak., **19**, 379-392
- Schneider, F. (1984)**
unveröffentlichte Daten
- Schrögel, O., Krispin, O. und Allmansberger, R. (1996)**
Expression of *pepT* homologue from *Bacillus subtilis*
FEMS Microbiol. Lett., **134**, 129-135

- Sepúlveda, F.V. und Pearson, J.D. (1982)**
Characterization of neutral amino acid uptake by cultured epithelial cells from pig kidney
J. Cell. Physiol., **112**, 182-188
- Sherriff, R.M., Broom, M.F. und Chadwick, V.S. (1992)**
Isolation and purification of *N*-formylmethionine aminopeptidase from rat intestine
Biochem. Biophys. Acta, **1119**, 275-280
- Sherwood, R.F., Melton, R.G., Alwan, S.M. und Hughes, P. (1985)**
Purification and properties of carboxypeptidase G₂ from *Pseudomonas* sp. strain RS-16
Eur. J. Biochem., **148**, 447-453
- Shimomura, Y., Sugiyama, S., Takamura, T., Kondo, T. und Ozawa, T. (1986)**
Quantitative determination of the fatty acid composition of human serum lipids by high-performance liquid chromatography
J. Chromatogr., **383**, 9-17
- Silbernagel, S. (1988)**
The renal handling of amino acids and oligopeptides
Physiological Reviews, **68**, 911-1007
- Silbernagel, S., Völker, K. und Dantzler, W.H. (1996)**
Compartmentation of amino acids in the rat kidney
Am. J. Physiol., **270**, F154-F163
- Simm, A., Bertsch, G., Frank, H., Zimmermann, U. und Hoppe, J. (1997)**
Cell death of ARK-2B fibroblasts after serum removal: a process between apoptosis and necrosis
J. Cell Sci., **110**, 819-828
- Slater, T.F., Sawyer, B. und Strauli, U. (1963)**
Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts
Biochim. Biophys. Acta., **77**, 383
- Smorodinzew, I.A. (1922)**
Über die Wirkung des Histozyms auf die Homologen der Hippursäure
Hoppe Seyler's Z. f. Physiol. Chem., **124**, 123-139
- Spirichev, V.B., Cheng-Wu, C., Orekhovitch, V.N. und Schukina, L.A. (1958)**
On the reversible effect of acylase I. Enzymatic hydrolysis and synthesis of acetylalanine
Biochimija, **23**, 895-898
- Spormann, D.O., Heim, J. und Wolf, D.H. (1991)**
Carboxypeptidase yscS: gene structure and function of the vacuolar enzyme
Eur. J. Biochem., **197**, 399-405
- Spormann, D.O., Heim, J. und Wolf, D.H. (1992)**
Biogenesis of the yeast vacuole (lysosome)
J. Biol. Chem., **267**, 8021-8029

- Sridhar, P., Awasthi, A.K., Azim, C.A., Burma, S., Habib, S., Jain, A., Mukherjee, B., Ranjan, A. und Hasnain, S.E. (1994)**
Baculovirus vector-mediated expression of heterologous genes in insect cells
Biosci., **19**, 603-614
- Stegink, L.D., Filer Jr., L.J. und Baker, G.L. (1980)**
Plasma methionine levels in normal adult subjects after oral loading with L-methionine and *N*-acetyl-L-methionine
J. Nutr., **110**, 42-49
- Stegink, L.D., Filer Jr., L.J. und Baker, G.L. (1982)**
Plasma and urinary methionine levels in one-year-old infants after oral loading with L-methionine and *N*-acetyl-L-methionine
J. Nutr., **112**, 597-603
- Stevens, J., Hayden, P. und Taylor, G. (1986)**
The role of glutathione conjugate metabolism and cysteine conjugate β -lyase in the mechanism of *S*-cysteine conjugate toxicity in LLC-PK₁ cells
J. Biol. Chem., **261**, 3325-3332
- Strauch, K.L. und Miller, C.G. (1983)**
Isolation and characterization *Salmonella typhimurium* mutants lacking a tripeptidase (peptidase T)
J. Bacteriol., **154**, 763-771
- Strauch, K.L., Carter, T.H. und Miller, C.G. (1983)**
Overproduction of *Salmonella typhimurium* peptidase T
J. Bacteriol., **156**, 743-751
- Strauch, K.L., Lenk, J.B., Gamble, L.B. und Miller, C.G. (1985)**
Oxygenregulation in *Salmonella typhimurium*
J. Bacteriol., **161**, 673-680
- Stribbling, S.M., Martin, J., Pedley, R.B., Boden, J.A., Sharma, S.K., und Springer, C.J. (1997)**
Biodistribution of an antibody-enzyme conjugate for antibody-directed enzyme prodrug therapy in nude mice bearing a human colon adenocarcinoma xenograft
Cancer Chemother. Pharmacol., **40**, 277-284
- Summers, M.D. und Smith, G.E. (1978)**
Baculovirus structural polypeptides
Virology, **84**, 390-402
- Suzuki, T. und Watanabe, S. (1991)**
Screening method for phenoxy acid herbicides in ground water by high-performance liquid chromatography of 9-anthryldiazomethane derivatives and fluorescence detection
J. Chromatogr., **541**, 359-364
- Suzuki, T., Otta, H. und Yamasaki, M. (1999)**
Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis*
Toxicol., **37**, 187-198

Svedas, V.Y., Galaev, J. und Berezin, J.V. (1980)

Kinetics and thermodynamics of acetyl-L-methinine hydrolysis and synthesis catalyzed by acylase I from porcine kidney
Biochimija, **45**, 1833-1839

Szajáni, B., Kiss, A. und Boross, L. (1980)

Investigation of the active center and catalytic mechanism of porcine kidney aminoacylase: A model of the active center
Biophys. Acad. Sc. Hung., **15**, 29-37

Tagawa, K., Hayashi, K., Mizobe, M. und Noda, K. (1993)

Highly sensitive determination of imidapril, a new angiotensin I-converting enzyme inhibitor, and its active metabolite in human plasma and urine using high-performance liquid chromatography with fluorescent labelling reagent
J. Chromatogr., **617**, 95-103

Tatu, U., Braakman, I. und Helenius, A. (1993)

Membrane glycoprotein folding, oligomerization and intracellular transport: effects of dithiothreitol in living cells
EMBO J., **12**, 2151-2157

Telegdi, J., Tüdös, H., Kraicsovits, F. und Ötvös, L. (1990)

Effect of a remote chiral carbon atom in the substrate on the stereospecificity of aminoacylase
Acta Biochim. Biophys. Hung., **25**, 93-99

Thumm, M. und Wolf, D.H. (1998)

From proteasome to lysosome: Studies on yeast demonstrate the principles of protein degradation in the eukaryotic cell
Adv. Mol. Cell Biol., **27**, 43-70

Timbrell, J.A. (1991)

Principles of Biochemical Toxicology, 2nd edition
Taylor & Francis (London)

Tring-Trang-Tan, M.M., Levillain, O. und Bankir, L. (1988)

Contribution of leucine to oxidative metabolism of the rat medullary thick ascending limb
Pflügers Arch., **411**, 676-680

Tsunasawa, S. (1992)

Does uncontrolled survival of acetylated peptides lead to cell proliferation? Deletion of *N*-terminal deacetylating system for protein/peptide in small cell lung carcinoma
J. Lab. Clin. Med., **120**, 505-506

Tsunasawa, S. und Sakiyama, F. (1993)

Amino-terminal acetylation of proteins
in Tuboi, S., Taniguchi, N. und Katunuma, N. (Eds.): The post-translational modification of proteins
CRC Press (Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo), pp. 113-121

- Twentyman, P.R. und Luscombe, M. (1987)**
A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity
Br. J. Cancer, **56**, 279-285
- Ueda, N., Kaushal, G.P., Hong, X. und Shah, S.V. (1998)**
Role of enhanced ceramide generation in DNA damage and cell death in chemical hypoxic injury to LLC-PK₁ cells
Kidney Int., **54**, 399-406
- Urm, E., Yang, H., Zubay, G., Kelker, N. und Maas, W. (1973)**
In vitro repression of *N*-acetyl-L-ornithinase synthesis in *Escherichia coli*
Mol. Gen. Genet., **121**, 1-7
- Uttamsingh, V., Keller, D.A. und Anders, M.W. (1998)**
Acylase I-catalyzed deacetylation of *N*-acetyl-L-cysteine and *S*-alkyl-*N*-acetyl-L-cysteines
Chem. Res. Toxicol., **11**, 800-809
- Vamvakas, S., Richter, H. und Bittner, D. (1996)**
Induction of dedifferentiated clones of LLC-PK₁ cells upon long-term exposure to dichlorovinylcysteine
Toxicology, **106**, 65-74
- Varshavsky, A. (1992)**
The *N*-end rule
Cell, **69**, 725-735
- Varshavsky, A. (1997)**
The *N*-end rule pathway of protein degradation
Genes Cells, **2**, 13-28
- Vill, P., Kaufmann, S.H. und Earnshaw, W.C. (1997)**
Caspases and caspase inhibitors
Trends Biochem. Sci., **22**, 388-393
- Voet, D und Voet, J. (1995)**
Biochemistry, second edition
John Wiley & Sons, Inc. (New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore), pp. 1010-1014
- Vogel, H.J. und Bonner, D.M. (1956)**
Acetylornithinase of *Escherichia coli*: Partial purification and some properties
J. Biol. Chem., **218**, 97-106
- Vogel, H.J. und McLellan (1971)**
Acetylornithinase (*Escherichia coli*)
Methods Enzymol., **17A**, 265-269
- vom Bruch, T. und Röhm K.-H. (1988)**
Fluorescence properties of hog kidney aminoacylase I
Z. Naturforsch., **43c**, 671-78

- Vongerichten, K.F., Klein, J.R., Matern, H. und Plapp, R. (1994)**
Cloning and nucleotide sequence analysis of *pepV*, a carnosinase gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 7290, and partial characterization of the enzyme
Microbiology, **140**, 2591-2600
- Wadman, S.K., De Bree, P.K., Van der Heiden, C. und Van Sprang, F.J. (1971)**
Automatic column chromatographic analysis of urinary and serum imidazoles in patients with histidinaemia and normals
Clin. Chim. Acta, **31**, 215-224
- Wang, Z.X., Wang, H.R. und Zhou, H.M. (1995)**
Kinetics of inactivation of aminoacylase by 2-chloromercuri-4-nitrophenol: A new type of complexing inhibitor
Biochemistry, **34**, 6863-6868
- Weast, R.C. (Ed.) (1969)**
Handbook of chemistry and physics, 50th edition
The Chemical Rubber Co. (Cleveland)
- Wehrmann, A., Eggeling, L. und Sahn H. (1994)**
Analysis of different DNA fragments of *Corynebacterium glutamicum* complementing *dape* of *Escherichia coli*
Microbiolog, **140**, 3349-3356
- Weiß, M. (1994)**
Charakterisierung eines Mitglieds der Acylasefamilie: Die Aminoacylase aus *Bacillus stearothermophilus*
Diplomarbeit Fachbereich Medizin, Universität Marburg
- Wertz, I.E. und Hanley, M.R. (1996)**
Diverse molecular provocation of programmed cell death
Trends Biochem. Sci., **21**, 359-364
- Widemann, B.C., Balis, F.M., Murphey, R.F., Sorensen, M.J., Montello, M.J., O'Brien, M. und Adamson, P.C. (1997)**
Carboxypeptidase-G2, thymidine, and leucovorin rescue in cancer patients with methotrexate-induced renal dysfunction
J. Clin. Oncol., **15**, 2125-2134
- Widemann, B.C., Hetherington, M.L., Murphey, R.F., Balis, F.M. und Adamson, P.C. (1995)**
Carboxypeptidase-G2 rescue in a patient with high dose methotrexate-induced nephrotoxicity
Cancer, **76**, 521-526
- Williams, R.T. (1971)**
Species variations in drug biotransformation
in La Du, B., Mandel, H.G. und Way, E.L. (Eds.): Fundamentals of drug metabolism and distribution
Williams and Wilkins (Baltimore), pp 187-205

Witheiler, J. und Wilson, D.B. (1972)

The purification and characterization of a novel peptidase from sheep red cells
J. Biol. Chem., **247**, 2217-2221

Wolf, D.H. und Ehmann, C. (1978)

Carboxypeptidase S from yeast: regulation of its activity during vegetative growth and differentiation
FEBS Letters, **91**, 59-62

Wolf, G. und Stahl, R.A.K. (1996)

Angiotensin II-stimulated hypertrophy of LLC-PK₁ cells depends on the induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1}
Kidney Int., **50**, 2112-2119

Wu, H.B. und Tsou, C.L. (1993)

A comparison of Zn(II) and Co(II) in the kinetics of inactivation of aminoacylase by 1,10-phenanthroline and reconstitution of the apoenzyme
Biochem. J., **296**, 435-441

Yamada, R. und Bradshaw, R.A. (1991)

Rat liver Polysome N^α-acetyltransferase: Substrate specificity
Biochemistry, **30**, 1017-1021

Yamaki, K. und Oh-ishi, S. (1992)

Comparison of eicosanoid production between rat polymorphonuclear leukocytes and macrophages: detection by high-performance liquid chromatography with precolumn fluorescence labeling
Jpn. J. Pharmacol., **58**, 299-307

Yearian, W.C. und Young, S.Y. (1982)

Control of insect pests of agricultural importance by viral insecticides
in Kurstak, E. (Ed.): Microbial and viral pesticides
Marcel Dekker (New York), pp. 387-423

Yip, C.C. und Liew, C.C. (1973)

Role of methionine in the initiation of the biosynthesis of bovine proinsulin
Can. J. Biochem., **51**, 783-788

Yokoigawa, K., Sato, E., Esaki, N. und Soda, K. (1994)

Enantioselective synthesis of N-acetyl-L-methionine with aminoacylase in organic solvent
Appl. Microbiol. Biotechnol., **42**, 287-289

Yoshida, A. und Lin, M. (1972)

NH₂-terminal formylmethionine- and NH₂-terminal methionine cleaving enzymes in rabbits
J. Biol. Chem., **247**, 952-957

Zamir, I., Grushka, E. und Chemke, J. (1991)

Separation and determination of saturated very-long-chain free fatty acids in plasma of patients with adrenoleukodystrophy using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic analysis
J. Chromatogr., **567**, 319-30

Zhang, Y., Chen, P.R., He, B. und Zhou, H.M. (1994)

Secondary structure of holo-enzyme and apo-enzyme of aminoacylase using CD and FTIR spectroscopy

Science in China (B), **37**, 1471-1478

Zhar, B., Brauch, H., Talmadge, C. und Linehan, M. (1987)

Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma

Nature, **327**, 721-724

8 Abkürzungen

Über die gebräuchlichen SI-Einheiten und die gängigen Abkürzungen der deutschen Sprache hinaus wurden folgende Abkürzungen benutzt:

a. bidest.	zweifach destilliertes Wasser
AcNPV	<i>Autographa californica</i> Polyhedrosis virus
Acy1	Aminoacylase I (Acylase 1)
ADAM	9-Anthryldiatomethan
ADEPT	Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy
AMP	Leucinaminopeptidase
Amp ^R	Ampicillinresistenz
BEVS	Baculovirus Expressions Vector System
BOC-	<i>t</i> -Butoxycarbonyl-
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan-sulfonat
CIP	Calf Intestine Phosphatase (alkalische Phosphatase)
CMDA	4-[2-Chloroethyl](2-mesyloxyethyl)amino]benzoyl-L-glutamat
CPG2	Carboxypeptidase G2
CPS1	Carboxypeptidase S
DAP	Diaminopimelat
DEPT	Direct enzyme prodrug therapy
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EBSS	Earle's buffered salt solution
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetal calf serum
FIA	Flow injection analysis
FPLC	Fast polynucleotide liquid chromatography
GDEPT	Gene-directed Enzyme Prodrug Therapy
GPI-	Glycosylphosphatidylinositol-
h.p.i.	hours postinfektion
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
hkAcy1	Human kidney Acyl
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
KP _x Y	x mM Kaliumphosphat, pH Y

LB	Luria-Bertani
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MCS	Multiple Cloning Site
MOI	Multiplicity of Infection
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
MTT	Thiazolylblau Tetrazoliumbromid
MTX	Methotrexat
NAC	<i>N</i> -Acetylcystein
NAI	<i>N</i> -Acetylisoleucin
NAL	<i>N</i> -Acetylleucin
NAM	<i>N</i> -Acetylmethionin
NAO	<i>N</i> -Acetylornithinase
NFM	<i>N</i> -Formylmethionin
OD	optische Dichte
ori	origin of replication
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PFU	Plaque Forming Units
PITC	Phenylisothiocyanat
pkAcy1	Porcine kidney Acy1
RP	Reversed Phase
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SDAP	L,L- <i>N</i> -Succinyl-2,6-diaminopimelat
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sf	<i>Spodoptera Frugiperda</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TC	Tissue Culture
TE	Tris-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TNBS	2,4,6-Trinitro-benzolsulfonsäure
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminoethan
TSG	Tumorsuppressorgen
U	Internationale Units [$\mu\text{mol}/\text{min}$]
Upm	Umdrehungen pro Minute
URL	Uniform Resource Locator
UZ	Ultrazentrifuge
v/v	Gewicht pro Volumen [g/ml]

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Aumüller, Buckel, Elsässer, Elschenbroich, Garten, Kern, Kirchner, Koolmann, Kummer, Löffler, Lührmann, Mannherz, Müller, Petzoldt, Risau, Röhm, Schäfer, Seitz, Voigt und Waßmuth.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. K.-H. Röhm möchte ich mich für die Themenstellung, seine fachliche Betreuung und seine stetige Diskussionsbereitschaft herzlich bedanken.

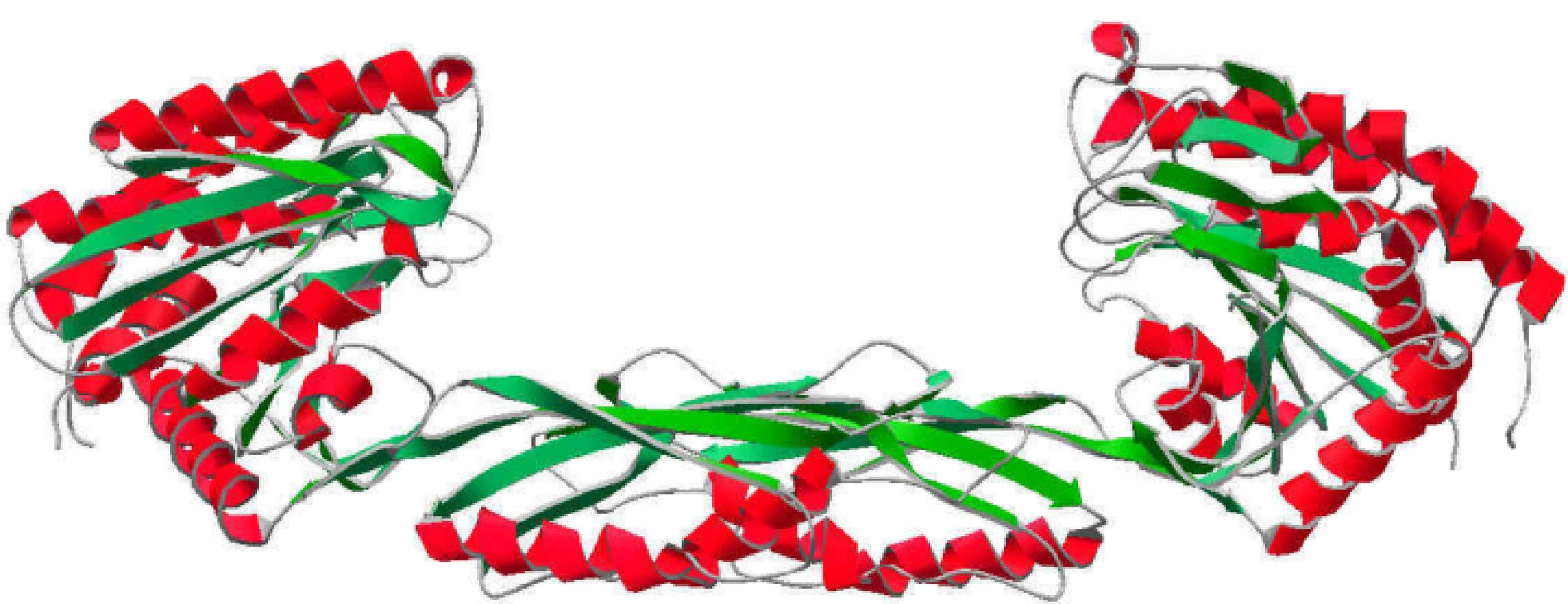
Vor allem gilt mein Dank auch Frau Dr. M. Täfler-Naumann und Herrn W. Berens für die gute die Zusammenarbeit, und Herrn J. Henseling für die technische Unterstützung, ebenso wie Frau B. Schneider, Herrn E. Linker und Frau T. Jarosch.

Ich danke Frau I. Kraus für ihre Mitarbeit und Frau S. Höpfner für die gute Kooperation.

Für ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft danke ich auch Frau Prof. Dr. M. Löffler und Herrn Dr. H.G. Löffler.

Außerdem danke ich Anja, Alexandra, Ute, Carsten, Mohammed und Stefan für ihre Hilfsbereitschaft.

Nicht zuletzt möchte ich mich besonders herzlich bei Verena bedanken, für ihr Verständnis, ihre Geduld und außerordentliche Hilfsbereitschaft.



CBPG_PSES6	1	*MRPSIHRTAI	AAVLATAFVA	GTALAQKRDN	VLFQAATDEQ	PAVIKTLEKL
PEPT_BACSU	1	-----	-----	-----	-MKEEIERF	TTYVKVDTQS
PEPT_ECOLI	1	-----	-----	-----	--MDKLLERF	LVVSLDTQS
PEPT_HAEIN	1	-----	-----	-----MISQ	IDKTELLERF	LHYVSEFHTQS
PEPT_LACLC	1	-----	-----	-----	MKYEKLLPRF	LEYVKVNTRS
PEPT_SALTY	1	-----	-----	-----	--MDKLLERF	LHYVSLDTQS
ACY1_HUMAN	1	-----	-----	-----	--TSKGPSEE	HPSVTLFRQY
ACY1_PIG	1	-----	-----	-----	--ASKGREGE	HPSVTLFRQY
ARGE_ECOLI	1	-----	-----	-----	-MKNKLPFFI	EIYRALIATP
ARGE_DICDI	1	-MTKPVASYE	LDEKRFLTLL	KKLIGETENL	QNRPPALIP	EDNAGRHVIE
DAPE_ECOLI	1	-----	-----	-----	-----	-----MSCP
DAPE_CORGL	1	-----	-----	-----	-----MNSL	KPGLDLGDP
DAPE_HAEIN	1	-----	-----	-----	-----	-----MKEKVV

*Signalpeptid (1-36) in *Pseudomonas*

CBPG_PSES6	51	VNIEGTGDA	EGIAAAGNFL	EAEKKNLGF	VTRSKSAGLV	VGDNI ^{Zn2} VGKIK
PEPT_BACSU	20	DESVDTCPS	PGQLTLGNML	-VDELKSI ^{Zn2} GM	QDAAIDEN-G	YVMATLPS ^{Zn2} NT
PEPT_ECOLI	19	KAGVRQVPST	EGQWKLLHLL	-KEQLEEMGL	INVTLSEK-G	TLMATL ^{Zn2} PANV
PEPT_HAEIN	25	KPNAKHSPSS	VGQMKLAMQL	-QKELIQ ^{Zn2} LGL	ENVEVSKY-A	VVTAFL ^{Zn2} PAND
PEPT_LACLC	21	DENS ^{Zn2} TTT ^{Zn2} PST	QALVEFAHKM	-GEDMKALGL	KDVHYLE ^{Zn2} NG	YVIGTIPAN ^{Zn2} T
PEPT_SALTY	19	KSGVRQVPST	EGQWKLLRLL	-KQLEEMGL	VNITLSEK-G	TLMATL ^{Zn2} PANV
ACY1_HUMAN	19	LRIRTVQPKP	DYGAAVAFFE	ETARQLGLGC	QKVEVAPGYV	VTVL ^{Zn2} TWP-GT
ACY1_PIG	19	LRIRTVQPEP	DYGAAVAFLE	ERARQLGLGC	QKVEVVPGHV	VTVL ^{Zn2} TWP-GT
ARGE_ECOLI	20	SISATEEALD	QSNADLITLL	ADWFKDLGFN	VEVQVPV ^{Zn2} GTR	NKFNMLASIG
ARGE_DICDI	50	ALTSYLKANG	GVLALEQVHC	-DPVNYPKRG	NIIIEYPGTS	-----KGT
DAPE_ECOLI	6	IELTQQLIRR	PSLSP-DAGC	QALLIERLQA	IGFTVERMDF	ADTQNE ^{Zn2} WAWR
DAPE_CORGL	16	IVLTQRLVDI	PSPSGQEKQI	ADEIEDALRN	LNLPGVEVFR	FNNNVLARTN
DAPE_HAEIN	7	SLAQDLIRRP	SISPN-DEGC	QQIIAERLEK	LGFQIEWMPF	NDTLNL ^{Zn2} WAKH

Zn2

CBPG_PSES6	101	GRGGKNLLLM	SHMDTVYLKG	--ILAKAPFR	-----	-----
PEPT_BACSU	68	EKDVPTIGFL	AHVD ^{Zn2} TATD ^{Zn2} FT	GKNVNPQIIE	SYD ^{Zn2} GKDIVLN	EQLQVTLSPD
PEPT_ECOLI	67	PGDIPAI ^{Zn2} GFI	SHVD ^{Zn2} TSPDCS	GKNVNPQIVE	NYRGGDIALG	IGDEV-LSPV
PEPT_HAEIN	73	PNLT ^{Zn2} TKTIGLV	AHLD ^{Zn2} TSPQCS	GKNVRPEVIE	EYRGGDIALG	IGEEF-ISPV
PEPT_LACLC	70	DKKVRKIGLL	AHLD ^{Zn2} TA-DFN	AEGVNPQILE	NYDGESVIQL	GDTEFTLDPK
PEPT_SALTY	67	EGDIPAI ^{Zn2} GFI	SHVD ^{Zn2} TSPDFS	GKNVNPQIVE	NYRGGDIALG	IGDEV-LSPV
ACY1_HUMAN	68	NPTLSSILLN	SHTD ^{Zn2} VVPVFK	-EHW ^{Zn2} SHDPFE	AEK-----	-----
ACY1_PIG	68	NPTLSSILLN	SHTD ^{Zn2} VVPVFK	-EHW ^{Zn2} SHDPFE	GFK-----	-----
ARGE_ECOLI	70	QGAGG-LLLA	GHTD ^{Zn2} TVPFDD	-GRW ^{Zn2} TRDPFT	-----	-----
ARGE_DICDI	92	SSPKTISFVG	SHLD ^{Zn2} VVPADK	-TAW ^{Zn2} DRNPFQ	-----	-----
DAPE_ECOLI	56	GQGE-TL ^{Zn2} AFA	GHTD ^{Zn2} VVPPGD	ADR ^{Zn2} WINPFE	-----	-----
DAPE_CORGL	66	RGLASRVMLA	GHID ^{Zn2} TVPIAD	NLPSR-----	-----	-----
DAPE_HAEIN	56	GTSEPVIAFA	GHTD ^{Zn2} VVPTGD	ENQ ^{Zn2} WSSPFS	AE-----	-----

Zn1/2

CBPG_PSES6	129	-----	-----VEGDK	AYG ^{Zn1/2} PSIADDK	GGNAVILHTL	KLKEYGV-R
PEPT_BACSU	118	QFPELSGYK ^{Zn1/2} G	H ^{Zn1/2} TLITD ^{Zn1/2} GTT	LLG---ADNK	AGIAEIMTAM	DYLIKHP-E
PEPT_ECOLI	116	MFPVLHQLL ^{Zn1/2} G	Q ^{Zn1/2} TLITD ^{Zn1/2} GKT	LLG---ADNK	AGIAEIMTAL	AVLQKKI--
PEPT_HAEIN	122	YYSFMQKLV ^{Zn1/2} G	Q ^{Zn1/2} TLIVTD ^{Zn1/2} GTT	LLG---ADNK	AGIAEIMTAL	SILQKENI--
PEPT_LACLC	119	DFPNLK ^{Zn1/2} NYK ^{Zn1/2} G	Q ^{Zn1/2} TLVHTD ^{Zn1/2} GTT	LLG---SDDK	SGVAEIMTAL	DYLLNINPDF
PEPT_SALTY	116	MFPVLHQLL ^{Zn1/2} G	Q ^{Zn1/2} TLITD ^{Zn1/2} GKT	LLG---ADNK	AGVAEIMTAL	AVLKGNPI--
ACY1_HUMAN	100	-----	----DSEG-Y	IYARSAQDMK	CVSIQYLEAV	RRLKVEGH-R
ACY1_PIG	100	-----	----DADG-Y	IYGRSAQDMK	CVSIQYLEAV	RRLKVEGH-H
ARGE_ECOLI	98	-----	--LTHE ^{Zn1/2} DG-K	LYGLSTADMK	GFFAFILDAL	RDVDVTKL-K
ARGE_DICDI	121	-----	---LIE ^{Zn1/2} EGDK	LYGRST ^{Zn1/2} DCL	GHVALL ^{Zn1/2} TDLE	IQLATEKP-A
DAPE_ECOLI	85	-----	--PTIR ^{Zn1/2} DGM-	LFGRGAADMK	GSLAAMVVA	ERFVAQHP-N
DAPE_CORGL	91	-----	----VEDGI-	MYGCGTVDMK	SGLAVYLHTE	ATLATSTE--
DAPE_HAEIN	88	-----	----IIDGM-	LYGRGAADMK	GSLAAMIVAA	EEYVKANP-N

Zn1

Zn2

CBPG_PSES6	163	DYGTITVLEN	TDEEK ^{Zn1} GSF ^{Zn1} GS	R-----DLI	QEEAKLADYV	LSFEPTSAGD
PEPT_BACSU	164	KHGTIRVAF ^{Zn1} T	PDEEIGR ^{Zn1} GPH	K--FDV ^{Zn1} KRFN	ASFAYTV ^{Zn1} DGG	PLGELEYE ^{Zn1} ESF
PEPT_ECOLI	161	PHGDIRVAF ^{Zn1} T	PDEEVGK ^{Zn1} GAK	H--FDV ^{Zn1} DAFD	ARWAYTV ^{Zn1} DGG	GVGELEYE ^{Zn1} ENF
PEPT_HAEIN	167	PHCNIRVAF ^{Zn1} T	PDEEIGL ^{Zn1} GIH	Y--FPMEK ^{Zn1} FS	CDWAYTID ^{Zn1} DGG	EVGELEYE ^{Zn1} ENF
PEPT_LACLC	166	EHGEIRVGF ^{Zn1} G	PDEEIGV ^{Zn1} GAD	K--FDV ^{Zn1} ADF	VDFAYTV ^{Zn1} DGG	PLGELQYETE
PEPT_SALTY	161	PHGDIKVAF ^{Zn1} T	PDEEVGK ^{Zn1} GAK	H--FDV ^{Zn1} EAFG	AQWAYTV ^{Zn1} DGG	GVGELEYE ^{Zn1} ENF
ACY1_HUMAN	134	FPRTIHMTE ^{Zn1} V	PDEEVGG ^{Zn1} HQG	M---ELFVQR	PEFHALRAGF	ALDEGIANPT
ACY1_PIG	134	FPRTIHMTE ^{Zn1} V	PDEEVGG ^{Zn1} HQG	M---ELFVQR	PEFQALRAGF	ALDEGLASPT
ARGE_ECOLI	134	KPLYILATA-	-DEETS ^{Zn1} MAGA	R-----YFA	ETTALRPDCA	II ^{Zn1} GEPTPVRA
ARGE_DICDI	157	LKHSIFAVFI	VSEENDEIPG	IGVDALDHS ^{Zn1} G	KMNPCKNGPV	YWVDSLQ ^{Zn1} SAD
DAPE_ECOLI	121	HTGRLAFLIT	SDEEASAHNG	T--VKVVEAL	MARNERLDYC	LVGE ^{Zn1} PSSIEV
DAPE_CORGL	124	LKHDLTLIAY	ECEEVADHLN	G--LGHIRDE	HPEWLAADLA	LLGEPTGGWI
DAPE_HAEIN	122	HKG ^{Zn1} TIALLIT	SDEEATAKDG	T--IHV ^{Zn1} VETL	MARDEKITYC	MVGE ^{Zn1} PSSAKN

X V

CBPG_PSES6	207	EKLSLGTS--	GIAYVQVNI	T	GKASHAGAAP	EL-----	GVNALV●IDD
PEPT_BACSU	212	NAAAAKIT--	-----	IK	GNNVHPGTAK	GK-----	MINSAKIAMK
PEPT_ECOLI	209	NAASVNIK--	-----	IV	GNNVHPGTAK	GV-----	MVNALSLAAR
PEPT_HAEIN	215	NAATAKVR--	-----	FF	GRNIHTGYAK	GK-----	MLNALTLACE
PEPT_LACLC	214	SAAAGAVIE--	-----	FQ	GKNVHPGTAK	NM-----	MVNALQLAID
PEPT_SALTY	209	NAASVNIK--	-----	IV	GNNVHPGTAK	GV-----	MVNALSLAAR
ACY1_HUMAN	181	DAFTVIFYSER	SPWVVRVTS	T	GRPGHASRFM	EDTAAEKLHK	VVNSI-LAFE
ACY1_PIG	181	DAFTVIFYSER	SPWVLRVTS	T	GKPGHGSRFI	EDTAAEKLHK	VINSI-LAFE
ARGE_ECOLI	179	HKGHISNAIR	-----	IQ	GQSGHSSDPA	RG-----	-VNAIELMHD
ARGE_DICDI	204	SQPTIGTGG-	GAQTWNLT	AH	GKNMHSAMPY	RT-----	-VNSVELVNE
DAPE_ECOLI	169	VGDVVKNGRR	GSLTCNLT	TH	GVQGHVAYPH	LA-----	-DNPVHRAAP
DAPE_CORGL	172	EAGCQ-----	GNLRIKVT	AH	GVRHSARSW	LG-----	-DNAMHKLSP
DAPE_HAEIN	170	LGDVV-KNGR	GSITGNLY	IQ	GIQGHVAYPH	LA-----	-ENPIHKAAL

CBPG_PSES6 ● ASDLVLRMTN

CBPG_PSES6	257	KAKNLRP---	-----	E	VVIGGGTYGR	NWTIAKAGNV	SNIIIPASATL
PEPT_BACSU	244	LNSLLPA---	-----	D	EAPETTEGYE	GFYHLLSIQG	DVETKLVYI
PEPT_ECOLI	241	IHAEVPA---	-----	D	ESPEMTEGYE	GFYHLASMKG	TVERADMHYI
PEPT_HAEIN	247	FQQVFPV---	-----	D	EVPEKTDGKV	GFYHLEDVFSG	DIEQVELTYL
PEPT_LACLC	246	YHNALPE---	-----	F	DRPEKTEGRE	GFYHLKLDG	TPEEARAQYI
PEPT_SALTY	241	IHAEVPA---	-----	D	EAPETTEGYE	GFYHLKLDG	TPEEARAHYI
ACY1_HUMAN	231	KEWQRLQS--	-----	NPH	LKEGSVRTSV	NLTKLEGGVA	YNVIPATMSA
ACY1_PIG	231	KEKQRLQS--	-----	NQL	KP-GAVRTSV	NLTMLEGGVA	YNVVPATMSA
ARGE_ECOLI	212	AIGHILQLDN	LKERYHYEAF		TVPYP-RT-L	NLGHIIHGGDA	SNRICACCEL
ARGE_DICDI	244	ALAEIQFYWF	DCSSTMKPTL		WKPICSSTMK	PTLWKPIAGS	YNTIPGESTI
DAPE_ECOLI	210	FLNELVAI--	---RRWDQGN		EFFPATESMQ	IANIQAGTGS	NNVIPGELEFV
DAPE_CORGL	208	IISKVAAY--	---AAEVNI		DGLTYREGKL	NIVFCESGVA	NNVIPDLAWM
DAPE_HAEIN	211	FLQELTTY--	---WDKGN		EFFPPTQSLQ	IANIHAGTGS	NNVIPAELYI

ARGE_DICDI ▼ INFKPHKAEAYK

CBPG_PSES6	284	NADVRYARNE	DFDAAMKTLE		ERAQQKKLPE	A---DVKVIV	TRGRPAFNAG
PEPT_BACSU	282	IRDFDKENFQ	NRKETMKRAV		EELQNEYGQD	R---ILLDMN	DQY YNMREKI
PEPT_ECOLI	279	IRDFDRKQFE	ARKRKMMIEIA		KK--VGKGLH	PDCYIELVIE	DSY YNMREKV
PEPT_HAEIN	285	IRDFDEQNFQ	QRKAFIKNQV		EKENAKKGLK	K--PIELEIQ	DSY QNMVDV
PEPT_LACLC	284	IRDHEEGKFN	ERKALMQEIA		DKMNAELGQN	R---VKPVIK	DQY YNMAQII
PEPT_SALTY	279	IRDFDRKQFE	ARKRKMMIEIA		KK--VGKGLH	P---VKPVIK	DQY YNMAQKV
ACY1_HUMAN	271	SDFDRVAPDV	DFKAFEEQLQ		SWCQAAGEGV	T---LEFAQK	WMHPQVTPTD
ACY1_PIG	270	CFDFRVAPDV	DLKAFEEQLQ		SWCQAAGEGV	T---PEFVQK	WMETQVTSTD
ARGE_ECOLI	260	HMDIRPLPGM	TLNELNGLLN		DALAPVSERW	P-----G	RLTVDELHPP
ARGE_DICDI	295	CGDIRLTPFY	DMKEMRAKVE		GYIKDINANI	TVKGSVSI EW	LGEASAGVAC
DAPE_ECOLI	253	QFNFRFSTEL	TDEMIKAQVL		ALLEKHQLRY	T-----VDW	WLSGQ PFLTA
DAPE_CORGL	252	NLNFRAFAPNR	DLNEATEHVV		ETLELDGQDG	-----IE	WAVEDGAGGA
DAPE_HAEIN	254	QFNLRVYCTEV	TDEIIKQKVA		EMLEKHNLKY	R-----IE	WNLSGKPFLLT

ARGE_DICDI ▼ ELRNRGPYSKYDVPASEGEVP

X V

CBPG_PSES6	331	EGGKKLVDKA	VAYYKEAGGT		LGVEERTGGG	TDA-AYAAALS	GKPVIESLGL
PEPT_BACSU	329	EPVIEIVNIA	KQAMENLGI	IE	PKI-SPIRGG	TDG-SQLSYM	GLP----TPN
PEPT_ECOLI	327	VEHPHILDIA	QQAMRDCDIE		PEL-KPIRGG	TDG-AQLSFM	GLP----CPN
PEPT_HAEIN	333	KNVPEQSIELA	DRAMKAVGIK		PNH-KPIRGG	TDG-AFLASK	GLA----CPN
PEPT_LACLC	331	EKMSIIDIA	KKAMENLDIA		PII-EPPIRGG	TDG-SKISFM	GLP----TPN
PEPT_SALTY	327	VEHPHILDIA	QQAMRDCDIT		PEM-KPIRGG	TDG-AQLSFM	GLP----CPN
ACY1_HUMAN	318	DSNFVW-AAF	SRVCKDMNLT		LEP-EIMPAA	TDN-RYIRAV	GVPALGFSPM
ACY1_PIG	317	DSDVW-AAF	SGVFKDMKLA		LEL-EICPAS	TDA-RYIRAA	GVPALGFSPM
ARGE_ECOLI	302	IPGYECPNH	QLVEVVEKLL		GAKTEVVNYC	TEA-PEIQ-T	LCPTLVLGP
ARGE_DICDI	366	KLSDSGYKAP	PLGKATSEIL		GSLTPVATCG	TLP-LVLDLQ	DSGFDIQITG
DAPE_ECOLI	297	RGKLVDAV	NAVEHYNEIK		PQL-LTGGT	SDG-RFIARM	GAQVVELGPV
DAPE_CORGL	294	LPGLGQQVTS	GLI--DAVGR		EKI-RAKFGW	TDVSRF-SAM	GIPALNFGAG
DAPE_HAEIN	297	KPGKLLDSTS	AIE-ETIGIT		PKA-ETGGGT	SDG-RFIALM	GAEVVEFGPL

Zn1

↑

CBPG_PSES6	380	P---GFGYHS	DKAEYVDISA		IPRRLYMAAR	LIMDLGAGK	-----
PEPT_BACSU	373	IFPVGGENFHG	-KFEYISVDN		MVKAVNVIVE	IAKQFEAQA	-----
PEPT_ECOLI	371	LFTGGYNYHG	-KHEFVTLEG		MEKAVQVIVR	IAELTAQRK	-----
PEPT_HAEIN	377	IFPVGGENFHG	-KHELVSLOG		MENTVQVIE	MLKCKDL--	-----
PEPT_LACLC	375	LFAGGENMHG	-RFEFVSVQT		MEKAVDTLLE	IIRLNNEVA	K-----
PEPT_SALTY	371	LFVGGYNYHG	-KHEFVTLEG		MEKAVQVIVR	IAELTAKRG	Q-----
ACY1_HUMAN	365	NRT--PVLLHD	-HDERLHEAV		FLRGVDIYTR	LLPALASVP	ALPSDS
ACY1_PIG	364	NHT--PVLLHD	-HDERLHEAV		FLRGVDIYTQ	LLSALASVP	ALPSES
ARGE_ECOLI	350	S---INQAHQ	-PDEYLETRF		IKPTRELITQ	VIHHCWH-	-----
ARGE_DICDI	413	F-GKEETYHA	-DNEYALLSD		FKNAIKILSR	TIDLLEKN-	-----
DAPE_ECOLI	344	N---ATIHK	-INECVNAAD		LQLLARMYQR	IMEQLVA--	-----
DAPE_CORGL	340	D---PSFAHK	-RDEQCPVEQ		ITDVAAILKQ	YLSE--	-----
DAPE_HAEIN	345	N---STIHK	-VNECVSVED		LKCKGEIYHK	MLVNLDS-	-----

CBPG_PSES6	107	LLIMSHMDTVYKGG--ILAKEPFR	130	EGDKLYGPGIADD-KGGNAVILHTLKL	165	GTITVLFVTDDEEKGSFCS
PEPT_BACSU	74	IGFLAHVDIATDFTSKNVNPOIIE	134	DGTTLLG---ADN-KAGIAEIMTAMDYL	166	GTIRVAFTPDDEEIGRPH
PEPT_ECOLI	73	IGFISHVDIAPDCSCKNVNPOIVE	132	DGKTLG---ADD-KAGIAEIMIALAVL	163	GDIRVAFTPDDEEVKKGAK
PEPT_HAEIN	79	ISLVAHLDTSPQCSCKNVRPEVIE	138	DGTTLLG---ADN-KAGIAEIMIALSIL	169	CNIRVAFTPDDEEIGLGIH
PEPT_LACLC	76	IGLLAHLDTA--DFNAEGVNPOIIE	135	DGTTLLG---SDD-KSGVAEIMTAMDYL	168	GEIRVGFQPDDEEIGVQAD
PEPT_SALTY	73	IGFISHVDIAPDFSGKNVNPOIVE	132	DGKTLG---ADD-KAGVAEIMIALAVL	163	GDIKVAFTPDDEEVKKGAK
ACY1_HUMAN	74	ILINSHITDVVPVFK-EHWSHDPFE	102	EGY-IYRGAQDM-KCVSIOYLEAVRRI	136	RTIHMTFVPPDEEVGGHQG
ACY1_PIG	74	ILINSHITDVVPVFK-EHWSHDPFE	102	DGY-IYRGAQDM-KCVSIOYLEAVRRI	136	RTIHMTFVPPDEEVGGHQG
ARGE_ECOLI	75	LLLAGHTDTPVDFDD--GRWIRDPFT	102	DGK-LYGLGIDM-KGFFAFILDARLV	136	IYLATA--DEETSMAQA
ARGE_DICDI	98	SFVGSHLDVVPADK--IAWDRNPFQ	124	EGDKLYGRGTTDC-LGHVALLTDLFIQL	159	HSIFAVFIVSEENDEIPG
ARGE_BACSU	98	LILNGHIDVVPVPEGSVKDWKYEPIQ	126	NGK-IYGRGSTDM-KGGNTALLFALEAL	160	GDVLFQSVVDEECGGAGT
DAPE_ECOLI	61	LAFAGHTDVVPPGDADRWINPPFE	89	DGM-LFGRGAADM-KGSLAAMVVAERF	123	GRLAFLITSDEEASAHNG
DAPE_CORGL	72	VMLAGHTDTPVPTADNLP SR-----	93	DGT-MYSCGIVDM-KSGIAVYLHTFATL	126	HDITLIAYECEEVADHIN
DAPE_HAEIN	62	LAFAGHTDVVPTGDENQWSSPPFS	90	DGM-LYRGAADM-KGSLAAMIVAAEEY	124	GTIALLITSDEEATEKDG
DAPE_HELPY	74	FCFAGHIDVVPVGN--HWQSDPFK	100	EGF-LYRGAQDM-KGGVGFLSASLNF	131	FLLSILLITSDEEGPGIFG
DAPE_RICPR	5	ICFVGHVDVVPAGNYEFWHNSNPF	33	DGK-IYRGIIVDM-KGATAOFLAASLNF	67	GSISFLITSDEEGKSKHG
DAPE_MYCTU	64	VLLAGHLDTVPAGN--LP SRRENQ	85	NDQ-LHGCGAADM-KSGDAVFLHLAATL	115	HDLTLVFYDCEEIDSAAN
DAPE_ARCFU	61	IMLTSHLDTVPAGD--ELINPVTVD	83	DGK-LYGRGSODA-KGCVAATCSASQT	111	CGIKLAFTSDEEVGGVNG
DAPE_AQUAE	62	YLISVHVDIAPVAG--FRDAYRPKE	86	NGR-IYRGAADV-KGATASLITAVEWF	120	LPVSLAFVVDEEQNTALG
DAPE_LISMO	65	LAFSGHMDVVDGDV--SKWKFPPFE	93	EGK-LYRGAIDM-KSGLAAMVIAETEL	127	GKIRLLATVGEELGELGA
DAPE_METJA	82	LHII SHLDTVPEGDISLWGTNPYE	110	DGK-IYGRGSEDNHKGIVSLLLLKMIF	144	YNLSLIFVSDDEEDGSEYG
DAPE_THEMA	83	LWIVTHIDTVPVPGDL SLWEIDPFV	111	DGK-VYRGAEDNNGGSMIASIYAGKALD	145	YNFGIALVADEEAGSEYG
DAPE_PYRHO	92	LWILSHLDVVPVGE--GWIVTEPF	119	DGK-VYRGSSEDN--GQATVSSLYAVKAL	153	RTVVIAFVSDDEETGSKYG
CBPS_YEAST	163	LLIMAHQDVVPVNN--ETLSSWKFP	194	EID-FWGRGSNDK-KNLLIAEFEAIEQL	229	RTIVMSLGFDEEASGTLG
PEPV_LACDL	82	LGILGHMDVVPAGE--GWIRDPFK	109	EGR-LYRGSADD-KGPSLIAYYGMILL	143	KKIDFVLGITNEEINWVGD
YGEY_ECOLI	76	VAMDHIDTVGIGNIKNWDFDPYE	104	DEL-TGGRGTSQD--EGGMASMVYACKIT	138	YTLVTVGIVQEEEDODGLC
ORF6_MYCHO	83	IGILAHLDVVPVAGDESQWRISAFV	111	NES-IYRGSLLDD-KGPEIINLYAMKYI	146	WKIRIIFGISEETTMKSM

CBPG_PSES6	189	EAKLADYVLS- FEPT SAG	222	NI TK GRASHAGAP EL -----G V NALV ● IDD KA KL RF	359	GGT DA - AY AALSG KPV IES IG LP---G F GY HS DK AE Y V	SP : P06621
PEPT_BACSU	194	FAYTV DGG PL- GEL E YES	220	- IK GN N VHPG TAK KK-----M IN SA KI AK LNS LL PA	356	GGT DG - SQ LS YM GLP---- TP N IF TGG EN F HG - KFE Y I	SP : P55179
PEPT_ECOLI	191	WAYTV DGGG V- GEL E FEEN	217	- IV GN N VHPG TAK GV-----M V NAL SL AAR THA EV PA	354	GGT DG - AQ LS FM GLP---- CP N LFT GG YNY H G - KHE F V	SP : P29745
PEPT_HAEIN	197	WAYT DGG EV- GEL E EYEN	223	- FF GR NI HTG YAK KK-----M L NAL TL AC EFQ Q VF P V	360	GGT DG - AF L ASK GLA--- CP N IF TGG YNF H S - KHE L V	SP : P45172
PEPT_LACLC	196	FAYTV DGG PL- GEL Q YET	222	- FQ G KN VHPG TAK KN-----M V NAL QL A IDY H NAL PE	358	GGT DG - SK IS FM GLP--- TP N LF AG GEN M HG - RFE F V	SP : P42020
PEPT_SALTY	191	WAYTV DGGG V- GEL E FEEN	217	- IV GN N VHPG TAK GV-----M V NAL SL AAR THA EV PA	354	GGT DG - AQ LS FM GLP---- CP N LFT GG YNY H G - KHE F V	SP : P26311
ACY1_HUMAN	163	FHALRAG FAL - DEG I ANP	198	ISTGR PG HAS RE ME D T AE KL HK V NSI - LA F EKE W OR L O	344	AAT DN - RY IR AV GV PA LG FSP M NRT - PV LL HD - HDE R L	SP : Q03154
ACY1_PIG	163	FQALRAG FAL - DEG L ASP	198	ISTG KP G HG S RE TE D T AE KL HK V NSI - LA F EKE K Q R L O	343	AST DA - RY IR AG V PA LG FSP M NHT - PV LL HD - HDE R L	SP : P37111
ARGE_ECOLI	158	VALR PD CA II - GEP T PVR	189	- IQ G Q SG HSS D PR GG-----M N ATE LM HD RI G HIL O	330	Y CTE A- PF I Q - IL C PT L VL G PG S--- IN Q AHQ - PDE Y L	SP : P23908
ARGE_DICDI	189	NPCK NG P VY W- VDS L OSA	220	TA HG KN MHS AMP YRT -----M V NS VEL V NE AL AEI Q F	392	CG TL P- LVL DL QDS G F D IQ IT GF - GK E E T Y HA- DNE Y A	SP : P54638
ARGE_BACSU	183	R GYR AD GAL I- PEP T NMK	213	IV KGL SA HGG TR YEG ▼ AI Q ELE K VNR AR ISD PL YDN I PIP	367	W GT D GG LL Y HA- GD TP VIV F GPG ET- KT A HQ - ANE Y I	GB : AAC33844
DAPE_ECOLI	151	R NER L DY CL V - GEP SS IE	186	TI HGV Q HV AY PHL A----- DN P VH RA AP FL NEL V A	323	GT SD G- RF T ARM G AQ V VEL GP VN --- AT I HK - INE C V	GB : ECDAPE
DAPE_CORGL	154	E WL AD LAL L- GEP T GGW	184	TA HGV RA HS ARS YL G----- DN A M HK LSP II SKV AA	319	G WT D VSR F- SAN G TP AI NE G AGD --- PS F AHK - RDE Q C	PIR: S60063
DAPE_HAEIN	152	R DEK I TY CM V - GEP SS AK	187	YT QGI Q HV AY PHL A----- EN P TH KA AL EL QEL TT	324	GT SD G- RF I AL M GA EV VE F GPL N--- ST I HK - VNE C V	PIR: F64048
DAPE_HELPI	159	K DL L PH MA IV - AEP T CEK	94	IL KGV Q HV AY PQ K----- QN P ID TL AS VL PLI SG	330	GT SD A- RF F SA H GIE V VE F GV IN--- DR I HA - IDER V	PIR: D64546
DAPE_RICPR	195	Q RYK ID F AV V - GEP T CEK	130	NI VGL AG HV AY PHK A----- HN PL P CL IK IL NEL IN	272	GT SD A- RF V KD - YCS L VE F GL IS--- DM A HK - INE Y I	PIR: A71650
DAPE_MYCTU	143	D WLS AD V AIL- GEP T AGC	173	SV TGR RA HS ARS WL G----- DN A I HK LGA VL DRL AV	304	G WT D VSR FA AL - GIP AV NY G PGD --- PN L AHC - RDER V	PIR: H70608
DAPE_ARCFU	134	E REK AD AV II- GEP T GSE	165	E FKG NS GHT ASH DAK ▼ VK SY HAV F NPS M IR GG-----	319	G VGD T- RH V RKH GV PF YL GP GGG--- NI L HG - EDEF V	PIR: C69256
DAPE_AQUAE	144	C LNG K RK C IV - LEP T YGL	174	K IKK SA HGS EF EKV ----- EN P VK VF IKL L NKL EE			PIR: C70349
DAPE_LISMO	152	Y ADD L DGL II- GEP S CHR	172	K STG KN AH SS MPE FG----- MN A ID N LL LF YNE VE K	325	G IT D AA E FT K AK KE FP VI IF GP G --- NE T PHQ - VNE N V	PRF: 2503411D
DAPE_METJA	172	E IEK K DDL I IV PD F GT PT	206	NI KG K Q CH G ST PEN G----- LN A DI V AF NE FAN EL YN	362	GGT VA - AF L RY K GY N VAV WG IGE --- ET A HQ - PNE H I	PIR: A64357
DAPE_THEMEA	184	G NEK G DF IE I - AEK S IL W	205	M VNG K Q GH AS R PQ TT----- EN A LR K GA HL ITE IDE	346	GGT CA - AF F RK KG WPA V VW ST ID --- ET A HQ - PNE Y R	GB : AAD36733
DAPE_PYRHO	187	L VL VP DGG -- NSE G TF IE	214	K VKG K Q A HAS MP HKG ----- IN A HRI AS ELL V SL DK	362	GGT FA - AF F RK IG IP AV VW AT ID --- ET A HQ - PNE Y A	GB : BAA29337
CBPS_YEAST	258	Y GDD G TY S II - DEG E GIM	298	S ILGH GG HSS Y PPD H● PF D YEF EE F DN P I YGL L TC ARE HSK	520	TK YYW - NLS KN TY R FV GS IID ID--- LI K TI HS- VNE H V	SP : P27614
PEPV_LACDL	174	F SPD A EY PI NGE Q GIF T	262	ML IGQ GA HAS MP QVG ----- KN SL AL AS DLV L RT M N	415	GT YGR - LF ER G - VAF GA Q NE PG --- MV M HA - ANE F N	SP : P45494
YGEY_ECOLI	163	S GIR PE FV VS- TEP T DCQ	193	D VQ GV SCH ES AP ERG----- DN A IF K MG PI L GE LQ E	345	K WTF ST NG V SIM GR HG IP VIG FG PG K EP E AHA - PNE K T	GB : AAC75910
ORF6_MYCHO	168	A DEK D PY I SY T PD GE W PL	230	TI KGI GG H GS TPE KG----- DN A I IK NI NI AS KEN K			GB : AAC33844

● ASDLVLRTMN
 ▼ -VSAIEKSMHVIT
 ■ -EGATYRASEYTVEKVESFRGLEGFSGSYREIFSKLGMDF
 ◆ TTIGIASELITEFEAND

