

**Biochemische Charakterisierung und bioinformatische
Sequenzanalyse plasmamembrangebundener Peroxidasen
aus Maiswurzeln (*Zea mays* L.)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
im Department Biologie der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Angela Mika

aus Bargteheide

Hamburg 2005

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. M. BÖTTGER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. T. J. BUCKHOUT
Tag der Disputation: 09. Dezember 2005

Hamburg, den 09. November 2005



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Arno Frühwald'.

Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Peroxidasen	1
1.1.1 Klassifizierung und Lokalisierung	1
1.1.2 Struktur	3
1.1.3 Reaktionsmechanismen und Substratspezifität	5
1.1.4 Peroxiredoxine	7
1.1.5 Funktionen	8
1.1.5.1 Allgemeine Funktionen	8
1.1.5.2 Stressinduzierte Funktionen	11
1.1.6 Peroxidaseaktivitäten an der pflanzlichen Plasmamembran	17
1.2 Zielsetzung	19
2. Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.2 Anzucht des Pflanzenmaterials	21
2.3 Isolierung von Plasmamembranen	21
2.4 Proteinbestimmung	22
2.5 Waschen von Plasmamembranen.	23
2.6 Solubilisierung von Membranproteinen	23
2.7 Konzentrieren von Proteinlösungen	23
2.8 Chromatographie	24
2.8.1 Entsalzung und Pufferaustausch	24
2.8.2 High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)	24
2.8.2.1 Ionenaustauschchromatographie	24
2.8.2.2 Gelfiltration	25
2.8.2.3 Affinitätschromatographie	26
2.9 Analytische Gelelektrophorese	26
2.9.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
2.9.2 Isoelektrische Fokussierung	28
2.10 Western Blotting	29
2.11 Enzymaktivitäten	30

2.12	Massenspektrometrie	31
2.12.1	Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS)	31
2.12.2	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization with Time of Flight</i> <i>Detector</i> (MALDI-TOF)	31
2.12.3	Computergestützte Sequenzanalyse	32
3.	Ergebnisse und Diskussion	34
3.1	Prothetische Gruppe	34
3.2	Charakterisierung der H ₂ O ₂ -abbauenden Enzymaktivitäten	34
3.2.1	Einfluss von Effektoren auf die Peroxidaseaktivitäten	34
3.2.2	Substratspezifität der Peroxidaseaktivitäten	36
3.3	Charakterisierung der AOS-produzierenden Enzymaktivitäten	38
3.3.1	pH-Optima der Peroxidase-Oxidaseaktivitäten	38
3.3.2	Effektorsensitivitäten und Substratspezifität der Peroxidase-Oxidase- aktivitäten	39
3.3.3	Untersuchungen zur Existenz eines putativen gp91 ^{phox} -Homologs (ZmRboh1) in der PM von <i>Zea mays</i> L.	44
3.4	Isoelektrische Punkte	49
3.5	Identifizierung einer vierten pmPOX	50
3.6	Relative molekulare Massen	51
3.7	Glykosylierung	53
3.8	Identifizierung der Sequenzen und bioinformatische Sequenzanalyse	55
3.8.1	Massenspektrometrische Peptidanalyse	55
3.8.2	<i>In silico Cloning</i> und bioinformatische Sequenzanalyse von pmPOX1, pmPOX2b und pmPOX3	57
3.8.2.1	Identifizierung und Analyse der Nukleotidsequenzen	57
3.8.2.2	Partielle bioinformatische Analyse der Genstruktur	67
3.8.2.3	Analyse der Aminosäuresequenzen	68
3.8.2.3.1	Länge der Aminosäuresequenzen	68
3.8.2.3.2	Theoretische isoelektrische Punkte, molekulare Massen und putative Glykosylierungsstellen	68
3.8.2.3.3	Targeting	71
3.8.2.3.4	Topologie	74
3.8.2.3.5	Disulfidbrücken	78
3.8.2.3.6	Aktives Zentrum und konservierte Bereiche	78
3.8.2.3.7	Strukturelles Calcium	78
3.8.2.3.8	Dreidimensionale Struktur	79

3.8.2.3.9 Homologien	81
3.8.3 <i>In silico Cloning</i> und bioinformatische Sequenzanalyse von pmPOX2a . . .	85
3.8.4 <i>In silico</i> Northern-Blot-Analyse	90
3.9 Funktionen der pmPOX	92
3.9.1 Eine gewebe- und/oder entwicklungsspezifische Expression	92
3.9.2 Eine Lokalisierung der aktiven Zentren auf verschiedenen Seiten der Plasmamembran bei gleicher Funktionalität	92
3.9.3 Eine Grob- und Feinregulierung der gleichen Substratspezifität durch verschiedene Isoenzyme	92
3.9.4 Die Enzyme erfüllen unterschiedliche Funktionen und/oder werden in Abhängigkeit verschiedener endogener oder exogener Reize reguliert . . .	93
4. Ausblick	98
5. Zusammenfassung	101
6. Literaturverzeichnis	104
7. Anhang	133
8. Danksagung	134
9. Lebenslauf	135

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenz-thiazolin-6-sulfonsäure)
AOS	<i>Active oxygen species</i> (Aktive Sauerstoffverbindungen)
APX	Ascorbatperoxidase
ARE	<i>Antioxidant-responsive elements</i> (cis-Regulatorisches Element, welches die Regulation eines Gens durch oxidativen Stress vermittelt)
AtPrx	<i>Arabidopsis thaliana peroxidase</i>
AU	<i>Absorbance unit</i> (Einheit für die Extinktion)
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i> (von einer RNA-Matrize <i>in vitro</i> synthetisierte Desoxyribonukleinsäure)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
Con A	Concanavalin A
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DPI	Diphenylenjodonium
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS/MS	<i>Electrospray Ionisation Hybrid Tandem Mass Spectrometry</i> (Elektrospray-Massenspektrometrie)
EST	<i>Expressed sequence tag</i> (teilsequenzierte cDNA in Datenbanken)
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
G	Guanin
GDPD	Glycerophosphodiester-Phosphodiesterase
gp91 ^{phox}	gp, <i>glycosylated protein</i> ; 91, ungefähres MW des Proteins in kDa; phox, <i>phagocyte oxidase</i> (Coreprotein des NADPH-Oxidasekomplexes aus humanen Phagozyten)
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPX	Glutathionperoxidase
GSS	<i>Genome survey sequence</i> (teilsequenzierte genomische DNA in Datenbanken)

HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i> (Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP _{exp}	experimentell ermittelter Isoelektrischer Punkt
IEP _{theor}	theoretischer Isoelektrischer Punkt
kDa	kiloDalton
Konz.	Konzentration
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser-desorption ionization</i> , spezielle Form der Massenspektroskopie mit <i>time-of-flight</i> -(Flugzeit-)Analysator
MES	2-[N-Morpholino]-ethansulfonsäure
MW _{exp}	experimentell ermittelte molekulare Masse
MW _{theor}	theoretische molekulare Masse
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> (Boten-RNA)
NADH	Nicotinsäuramid-adenin-dinukleotid, reduzierte Form
NADPH	Nicotinsäuramid-adenin-dinukleotid-phosphat, reduzierte Form
n.d.	nicht detektierbar
n.m.	<i>not measured</i> (nicht ermittelt)
Nox2	NADPH-Oxidase 2; gp91 ^{phox} (aus <i>Homo sapiens</i>)
OsPrx	<i>Oryza sativa peroxidase</i> (Datenbankeintrag von PeroxiBase)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (standardisierter Phosphatpuffer)
pCMB	<i>p-Chloromercurybenzoate</i> (4-Hydroxyquecksilberbenzoesäure)
PM	Plasmamembran(en)
pmPOX	plasmamembrangebundene Peroxidase bzw. Peroxidaseaktivität
PO-ox-I,-II,-III	Redoxzustände von Peroxidasen
Rboh	<i>Respiratory burst oxidase homolog</i> (Pflanzliches Homolog zu humanen NADPH-Oxidasen)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Einzelnukleotidpolymorphismen)
SOD	Superoxiddismutase
SPB	<i>Soybean seed coat peroxidase</i> (Peroxidase aus Soja)
SV	Säulenvolumen
T	Thymin

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton® X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
UTR	<i>Untranslated region</i> (Nicht-translatierte Region)
UV	Ultraviolettes Licht
XTT	2,3-bis(2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid
ZmGDPD1	<i>Zea mays</i> Glycerophosphodiester-Phosphodiesterase 1
ZmPox1	<i>Zea mays peroxidase 1</i> (Trivialname)
ZmPrx	<i>Zea mays peroxidase</i> (Datenbankeintrag von PeroxiBase)
ZmRboh1	<i>Zea mays respiratory burst oxidase homolog 1</i>
3D	Dreidimensional

1. EINLEITUNG

Peroxidasen (EC 1.11.1.7) sind Enzyme, die in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Vertebraten weit verbreitet sind. Sie enthalten in der Regel Ferriprotoporphyrin IX (Häm) als prosthetische Gruppe und oxidieren die verschiedensten Substrate unter Reduktion von Wasserstoffperoxid (Welinder et al., 1996). Da ihre Katalysen häufig von auffälligen Farbreaktionen begleitet werden, wurden bereits 1855 die ersten Peroxidaseaktivitäten beschrieben (Saunders et al., 1964). Die Bezeichnung „Peroxidase“ wurde bereits 1898 durch Linossier vorgeschlagen (Gaspar et al., 1982). Inzwischen gehören diese Enzyme zu den am intensivsten und umfangreichsten untersuchten überhaupt (Acosta et al., 2002; Shigeoka et al., 2002; Hiraga et al., 2001; Obinger et al., 1996a, Penel et al., 1992). Aufgrund der Fülle an Literatur beschränkt sich die folgende Einführung in den meisten Punkten auf pflanzliche Peroxidasen.

1.1 Peroxidasen

1.1.1 Klassifizierung und Lokalisierung

In höheren Pflanzen existiert eine sehr hohe Anzahl von Isoformen dieser Enzyme, d. h. Peroxidasen, welche die gleichen Reaktionen katalysieren können, sich aber in ihrer Struktur unterscheiden. So wurden in Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH, Ackerschmalwand) allein 73 Gene identifiziert, welche für Peroxidasen kodieren (EC 1.11.1.7; Tognolli et al., 2002; Welinder et al., 2002). Zusätzlich werden jedoch durch posttranskriptionale und posttranslationale Modifikationen noch sehr viel mehr Isoenzyme gebildet (Tognolli et al., 2002; Jackson et al., 1996; Welinder et al., 1996). Neben dem Klassifizierungssystem der Internationalen Biochemischen Vereinigung, die einige Peroxidasen wie Ascorbat- (EC 1.11.1.11) oder NADH-Peroxidasen (EC 1.11.1.1) aufgrund ihrer Charakteristika aus der oben genannten Klasse ausgliedert, wurde ein übersichtlicheres und eindeutigeres System entwickelt: Nach Welinder et al. (1992) wurde die Superfamilie der bakteriellen, pflanzlichen und aus Pilzen stammenden Peroxidasen (Superfamilie 1) auf der Basis von Sequenzvergleichen in drei Klassen eingeteilt.

Der **Klasse I** werden die intrazellulären Peroxidasen zugeordnet, welche nicht dem sekretorischen Stoffwechselweg angehören. Neben der Cytochrom-*c*-Peroxidase, einem löslichen Protein, welches zuerst in Mitochondrien der Bierhefe (*Saccharomyces cerevisia* MEYEN) nachgewiesen wurde, werden in diese Klasse unter anderem die cytosolischen und

chloroplastidären Ascorbatperoxidasen höherer Pflanzen und bakterielle Catalaseperoxidasen eingeordnet. Die zuletzt genannten üben sowohl Peroxidase- als auch Catalaseaktivitäten aus (Dalton, 1991, Welinder, 1991). Pflanzliche Catalasen sind $\text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{O}_2$ -Oxidoreduktasen (EC 1.11.1.6), welche Wasserstoffperoxid als alleiniges Substrat zu Sauerstoff und Wasser umsetzen. Peroxidasen der Klasse I enthalten keine Disulfidbrücken, keine Glykosylierung, kein strukturelles Calcium und kein zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) dirigierendes Signalpeptid,

Klasse II besteht aus Peroxidasen, welche dem sekretorischen Stoffwechselweg angehören und von Pilzen gebildet werden. Es handelt sich um monomere Glykoproteine, welche am Ligninabbau beteiligt sind. Es werden Ligninperoxidasen, sogenannte Ligninasen, und manganabhängige Peroxidasen unterschieden. In manganabhängigen Peroxidasen dient Mn^{2+} als reduzierendes Substrat (Reddy und D'Souza, 1994). Klasse-II-Proteine enthalten vier konservierte Disulfidbrücken und zwei Calciumbindungsstellen.

In **Klasse III** werden alle pflanzlichen Peroxidasen des sekretorischen Stoffwechselweges zusammengefasst. Dazu gehören lösliche sowie membrangebundene Peroxidasen des ER, des Golgi-Apparates und der sekretorischen Vesikel. Membrangebundene Peroxidasen der Plasmamembran (PM), lösliche apoplastische, zellwandgebundene oder sekretierte Enzyme werden hier eingeordnet. Klasse-III-Peroxidasen sind in der Regel monomere Glykoproteine, die vier konservierte Disulfidbrücken und zwei Calciumionen enthalten, wobei sich die Positionierung der Disulfide von denen der Klasse-II-Enzyme unterscheidet. Peroxidasen werden entwicklungs- und gewebespezifisch exprimiert (Jackson et al., 1996).

Neben der Superfamilie der Peroxidasen aus Pflanzen, Bakterien und Pilzen wurden tierische und humane Peroxidasen in einer zweiten Superfamilie zusammengefasst, zu der Myeloperoxidasen, Eosinophile Peroxidasen, Lactoperoxidasen, Glutathionperoxidasen, Thyroidperoxidasen und Prostaglandin H-Synthasen gehören (Superfamilie 2; Klebanoff, 2005; Hiraga et al., 2001).

Pflanzliche Glutathionperoxidasen (GPX; EC 1.11.1.9) wurden in den letzten Jahren aufgrund von Sequenzvergleichen und Strukturanalysen als eine eigenständige Familie aus der Klassifizierung nach Welinder et al. (1992) ausgegliedert (De Gara, 2004). Da sie in zahlreichen Charakteristika tierischen bzw. humanen Glutathionperoxidasen ähneln, werden sie von einigen Autoren in die Superfamilie 2 eingeordnet.

1.1.2 Struktur

Die kristallographische Struktur von Peroxidasen aus allen drei Klassen der Superfamilie von Peroxidasen aus Pflanzen, Bakterien und Pilzen wurde inzwischen vollständig aufgeklärt (Sundaramoorthy et al., 2005; Yamada et al., 2001; Schuller et al., 1996; Patterson und Poulos, 1995; Finzel et al., 1984). Obwohl sich die Peroxidasen dieser Superfamilie in ihrer Primärstruktur stark unterscheiden, zeigen sie eine sehr ähnliche dreidimensionale Struktur. Die Sekundärstruktur der Enzyme besteht vorwiegend aus α -Helices, von denen zehn in allen Unterfamilien konserviert zu sein scheinen (Veitch, 2004; Welinder, 1992). Während tierische und humane Peroxidasen über kovalent gebundene Hämgruppen als prosthetische Gruppen verfügen, enthalten Peroxidasen aus Pflanzen, Bakterien und Pilzen in der Regel nichtkovalent gebundene Hämgruppen. In pflanzlichen Peroxidasen der Superfamilie 1 bilden zwei antiparallele α -Helices aus zwei verschiedenen Domänen einen Spalt, in den die Hämgruppe eingefügt ist (Schuller et al., 1996, Bosshard et al., 1991). Das komplex an das Protoporphyrin gebundene Eisenion ist an der fünften Koordinationsstelle über einen proximalen Histidinrest mit dem Protein verbunden, der in der Helix der C-terminalen Domäne lokalisiert ist. Ein zweiter konservierter Histidinrest befindet sich auf der distalen Seite des Häms. Der distale Histidinrest ist Teil der Helix der N-terminalen Domäne und formt zusammen mit weiteren konservierten Aminosäureresten die Bindungsstelle für H_2O_2 . Er fungiert je nach Bedarf als Protonendonator oder -akzeptor für die Reaktion des Enzyms mit Wasserstoffperoxid (Henriksen et al., 1999; Schuller et al., 1996).

Als prosthetische Gruppen können nicht nur Hämgruppen dienen. Das aktive Zentrum einer NADH-Peroxidase aus *Streptococcus faecalis* enthält ein Flavinadenindinukleotid (FAD; Ahmed und Claiborne, 1992). In Braunalgen wurden Bromperoxidasen charakterisiert, die statt einer Hämgruppe ein Vanadiumion der Oxidationsstufe +V enthalten (Almeida et al., 1996). Tierische und humane Glutathionperoxidasen enthalten ein Selenocystein in ihrem aktiven Zentrum, welches für die hohe Aktivität dieser Enzyme verantwortlich ist (Arthur, 2000; Chambers et al., 1986). Auch pflanzliche Glutathionperoxidasen sind teilweise selenhaltige Enzyme (Ren et al., 2001; Huang et al., 1994, Shigeoka et al., 1991).

Bei Klasse-III-Peroxidasen handelt es sich, wie bereits erwähnt, um Monomere, deren molekulare Massen in der Regel zwischen 20 und 60 kDa liegen. Im Gegensatz dazu finden sich intrazellulär auch Oligomere. So handelt es sich bei cytosolischen Ascorbatperoxidasen höherer Pflanzen um Homodimere, welche aus zwei identischen 29 kDa-Untereinheiten bestehen (Sano et al., 1996; Mittler und Zilinskas, 1991). Pflanzliche Glutathionperoxidasen scheinen Tetramere zu bilden, welche aus sehr kurzen Polypeptidketten zusammengesetzt

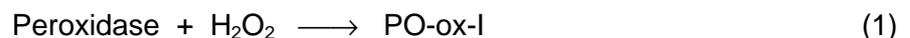
sind (Kang et al., 2004). So besteht eine lösliche Glutathionperoxidase aus Blättern der Aloe vera (*Aloe barbadensis* MILLER) aus vier Untereinheiten mit einer molekularen Masse von jeweils 16 kDa (Sabeh et al., 1993). Catalaseperoxidasen aus Bakterien und Pilzen scheinen Di- oder Tetramere mit molekularen Massen von 150 - 240 kDa zu sein (Carpena et al., 2002; Hiraga et al., 2001), welche im Gegensatz zu anderen Peroxidasen pro Untereinheit durchschnittlich nur 0,5 Hämgruppen enthalten (Hillar et al., 2000). In menschlichen Geweben finden sich wesentlich größere Peroxidasen. So sind humane Glutathionperoxidasen Tetramere, deren Untereinheiten eine molekulare Masse von 100 kDa aufweisen können (Arthur, 2000).

Über die Art der Bindung von membranassoziierten Peroxidasen ist noch relativ wenig bekannt. Die meist auf Sequenzanalysen basierenden Aussagen deuten jedoch auf die Existenz einer unterschiedlichen Anzahl transmembraner Domänen hin (Murphy et al., 2003; Jespersen et al., 1997). Thylakoidgebundene Ascorbatperoxidasen enthalten eine zusätzliche hydrophobe Domäne am C-Terminus, welche cytosolischen und Ascorbatperoxidasen des Stromas fehlt (Yoshimura et al., 1998, Jespersen et al., 1997, Asada et al., 1996). Diese hydrophobe Domäne ermöglicht es ihnen wahrscheinlich, in der Nähe von Photosystem I an die Stromathylakoidmembran zu binden (Asada et al., 1996). In Baumwolle (*Gossypium hirsutum* L.) wurde eine Ascorbatperoxidase (28 kDa) identifiziert, welche über eine C-terminale transmembrane Domäne an die Glyoxisomenmembran gebunden ist (Bunkelmann und Trelease, 1996). Die endständigen fünf Aminosäurereste des C-Terminus sind positiv geladen und ragen wahrscheinlich der von Heijne Regel entsprechend ins Cytosol, während das aktive Zentrum des Enzyms im Innern der Glyoxisomen agiert. Im Gegensatz dazu wurde in Spinat (*Spinacia oleracea* L.) und Kürbis (*Cucurbita spec.*) eine membrangebundene Ascorbatperoxidase identifiziert, deren aktives Zentrum auf der Außenseite der Glyoxysomenmembran lokalisiert ist (Nito et al., 2001; Ishikawa et al., 1998; Yamaguchi et al., 1995). In der Hüllmembran von Peroxisomen findet sich ebenfalls eine integral gebundene Ascorbatperoxidase (Mullen et al., 2001). Untersuchungen mit der sogenannten Permeabilisierung-/Immunofluoreszenzmethode und Experimente mit Chimärenproteinen zeigten, dass der C- und N-Terminus dieses Enzyms (22 kDa) in Arabidopsis ins Cytosol ragen (Murphy et al., 2003). Im Gegensatz zu bisher charakterisierten membrangebundenen Peroxidasen scheinen in diesem Protein vier transmembrane Domänen vorhanden zu sein (Murphy et al., 2003; Tugal et al., 1999). Das aktive Zentrum des Enzyms befindet sich auf der Matrixseite der peroxisomalen Membran. Über die Topologie einer membrangebundenen Cytochrom-c-Peroxidase aus mitochondrialen Membranen von Maiskeimlingen (*Zea mays* L.) sind keine näheren Details bekannt (Prasad et al., 1995).

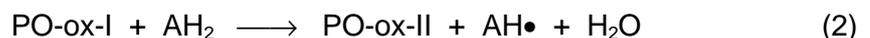
Aus Epithelzellen der menschlichen Schilddrüse konnte eine plasmamembrangebundene Peroxidase, die humane Thyroidperoxidase (hTPO), identifiziert und bis zur Homogenität gereinigt werden (Niccoli-Sire et al., 2001, Fayadat et al., 1998, Czarnocka et al., 1985). Diese ist ebenso wie die bisher aufgeklärten membrangebundenen pflanzlichen Peroxidasen ein integrales Membranprotein. Es handelt sich um ein glykosyliertes Heterodimer von etwa 110 kDa (Kimura et al., 1987). Das aktive Zentrum ist auf der Außenseite der Membran lokalisiert. Tierische Peroxidasen der Endomembransysteme scheinen nur teilweise integral gebunden zu sein (Roveri et al., 1994).

1.1.3 Reaktionsmechanismen und Substratspezifität

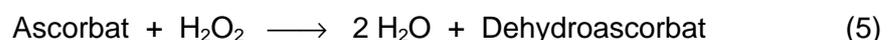
Peroxidasen kommen unter physiologischen Bedingungen in fünf verschiedenen Redoxzuständen vor (Longu et al., 2004; Penel und Castillo, 1991). Zusätzlich zu der Ferro- (Fe^{2+}) und Ferriform (Fe^{3+}) treten drei weitere Zustände (PO-ox-I,-II und -III) mit den Oxidationszahlen IV, V und VI auf. Bei einer katalytischen Reaktion erfolgt zunächst die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes aus Peroxidase und Wasserstoffperoxid.



Anschließend reagieren zwei Moleküle eines Elektronendonators in zwei Schritten mit dem Enzym-Substrat-Komplex.



Mit Ascorbat als natürlichem Substrat ergibt sich die folgende Gesamtreaktion:



Als natürliche Substrate können neben Ascorbat und Cytochrom *c*, Thiole wie Cystein, Halogenide, phenolische Säuren, Monolignole, Fettsäuren und andere Substanzen umgesetzt werden (Saffert et al., 2000, Bolwell, 1999, Almeida et al., 1996, Obinger et al., 1996b, Gaspar et al., 1982). Darüber hinaus können Peroxidasen auch künstliche Elektronendonatoren wie 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazolin-6-sulphonsäure) (ABTS), *o*-Dianisidin, *o*-Phenylendiamin oder Pyrrogallol oxidieren. Eines der am häufigsten verwendeten künstlichen Substrate ist Guajacol (Abb. 1.1), aus dem durch Oxidation und Kondensation das orangebraune Octodehydrotetraquajacol entsteht, welches sich sowohl

makroskopisch als auch photometrisch leicht nachweisen lässt. Wie bereits deutlich wurde, werden Peroxidasen in der Regel entsprechend ihrer Substratspezifität benannt. Häufig ist jedoch die Spezifität nur schwer zu ermitteln, da die meisten Peroxidasen *in vitro* fast alle der

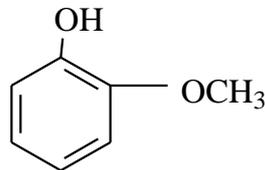


Abb. 1.1: Chemische Formel von Guajacol.

genannten Substrate umsetzen können (De Marco et al., 1999). Aufgrund dieses Charakteristikums werden Peroxidasen der Klasse III in der Literatur meistens als Guajacolperoxidasen bezeichnet.

Glutathionperoxidasen zeigen eine hohe Affinität zu reduziertem Glutathion (GSH) und bilden eine Sonderform der pflanzlichen Peroxidasen, da sie neben der Reduktion von Wasserstoffperoxid auch organische Hydroperoxide und Lipidhydroperoxide umsetzen können (Chaudiere und Tappel, 1983; Flohe und Gunzler, 1984). Aufgrund dieser Substratspezifität wurden sie in der Literatur teilweise auch als Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidasen (PHGPX) bezeichnet (Kang et al., 2004).

Neben der katalytischen Umsetzung unterschiedlicher Substrate in Gegenwart von Wasserstoffperoxid sind Peroxidasen in der Lage, Substanzen wie NAD(P)H, Dithiothreitol, Dihydroxyfumarat oder das Auxin Indol-3-essigsäure (*Indole acetic acid*, IAA) unter Sauerstoffverbrauch zu oxidieren (Krylov und Dunford, 1996; Hauser und Ohlsen, 1996; Penel und Castillo, 1991). Die genauen enzymatischen Abläufe sind teilweise noch unbekannt. Sie werden als Peroxidase-Oxidationsreaktionen bezeichnet und sind ungewöhnlich, da sie nichtlineares dynamisches Verhalten wie Bistabilitäten, Oszillationen und Chaos zeigen (Olsen et al., 2001; Krylov und Dunford, 1996). Die Startreaktion verläuft wahrscheinlich nichtenzymatisch und basiert auf der Bildung von Starterradikalen bzw. einer Autooxidation des Substrates in Gegenwart von Sauerstoff. Als Teil der ablaufenden Zwischenreaktionen reagiert die Ferriperoxidase mit Superoxidanionen ($O_2^{\bullet-}$) bzw. die Ferroperoxidaseform mit Sauerstoff. Es entsteht PO-ox-III, die bei der kinetisch am besten charakterisierten Peroxidase, der Peroxidase C aus Meerrettich (*Horseradish peroxidase*, HRP C; *Armoracia rusticana* L.), eine wesentlich geringere Reaktivität für die Donorsubstrate besitzt als PO-ox-I und PO-ox-II. Der Komplex zerfällt langsam in Ferriperoxidase, $O_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 . Als Gesamtreaktion kann für NADH die folgende Reaktionsgleichung angegeben werden:



Als toxische Nebenprodukte dieser Reaktion können jedoch große Mengen an H_2O_2 und/oder $\text{O}_2^{\cdot -}$ produziert werden. Ein Prozess der *in vivo* über Effektoren kontrolliert und gezielt eingesetzt wird (Krylov und Dunford, 1996).

1.1.4 Peroxiredoxine

In den letzten zwei Jahrzehnten wurde eine neue Klasse pflanzlicher Peroxidasen entdeckt und charakterisiert, die sogenannten Peroxiredoxine (Dietz, 2003; McGonigle et al., 1998). Sie bilden eine Familie von thiol-spezifischen Proteinen, welche ähnlich wie pflanzliche Glutathionperoxidasen nicht nur H_2O_2 , sondern auch andere Peroxide wie Peroxinitrit und Hydroperoxide (Echalier et al., 2005; Baier und Dietz, 1996) reduzieren können. Sie werden daher in der Literatur manchmal auch als Thiolperoxidasen bezeichnet. Seit 1988 das erste Peroxiredoxin aus Hefe beschrieben wurde, wurden zahlreiche weitere Enzyme dieses Typs in Bakterien, Säugern und Pflanzen identifiziert (Wood et al., 2003; Dietz, 2003; Hofmann et al., 2002; Kim et al., 1988). Ein ungewöhnliches Charakteristikum ist das Fehlen einer prosthetischen Gruppe. Das aktive Zentrum wird von einem oder zwei Cysteinresten gebildet. Ein konservierter Cysteinrest oder zwei Cysteinreste, welche eine intramolekulare Disulfidbrücke formen, reagieren mit einem Hydroperoxid und werden anschließend durch ein thiolhaltiges Substrat regeneriert. Bei der tierischen thio-redoxin-abhängigen Peroxidreduktase befinden sich in unmittelbarer Nähe zu dieser intramolekularen Disulfidbrücke vier Phenylalaninreste, welche ein delokalisiertes π -Elektronensystem bilden. Diese stellen das Äquivalent zur Hämgruppe anderer Peroxidasen dar. Die Regeneration der Enzyme kann je nach Reaktionsmechanismus durch Cyclophilin, Liponsäure, Glutathion oder verschiedene Disulfidoxidoreduktasen erfolgen.

Je nach Redoxstatus der Proteine, der herrschenden Ionenstärke und des pH-Wertes liegen Peroxiredoxine in verschiedenen oligomeren Formen vor. Neben Homodimeren treten Dekamere auf. Ein kürzlich kristallographisch aufgeklärtes dimeres Peroxiredoxin aus Balsampappel (*Populus trichocarpa* L.) enthielt pro Untereinheit sieben zentrale β -Faltblätter, welche von fünf α -Helices umgeben waren (Echalier et al., 2005), und enthüllte damit weitere strukturelle Unterschiede zwischen Peroxiredoxinen und Hämperoxidasen höherer Pflanzen.

1.1.5 Funktionen

1.1.5.1 Allgemeine Funktionen

So groß die Anzahl an Peroxidaseisoformen in einer Pflanzenzelle ist, so vielfältig sind die von diesen Enzymen vermittelten Funktionen (Passardi et al., 2005; Shigeoka et al., 2002; Hiraga et al., 2001). Eine der Hauptfunktionen extrazellulärer, pflanzlicher Peroxidasen ist ihre Beteiligung an der Polymerisierung und Depolymerisierung von Zellwandkomponenten. Während die von holzabbauenden Pilzen sekretierten Ligninperoxidasen und manganabhängigen Peroxidasen einen Ligninabbau bewirken (Gold und Alic, 1993), dienen pflanzliche Peroxidasen der Ligninsynthese und Quervernetzung von Suberinmonomeren zur Verholzung bzw. Korkbildung in und an den Zellwänden (Bernards et al., 2004; Li et al., 2003; Quiroga et al., 2000; Bernards et al., 1999). Pflanzliche Peroxidasen katalysieren den ersten Schritt der Lignifizierung, indem sie bestimmte phenolische Alkohole, die sogenannten Monolignole 4-Hydroxycimol-, Coniferyl- und Sinapylalkohol, zu Phenoxyradikalen umsetzen. Die entstehenden Radikale können Dimere, Trimere und größere Oligomere bilden (Ralph et al., 2004a; Ros Barceló et al., 2004; Sasaki et al., 2004; Takahama und Oniki, 1996). Die diesem Prozess folgenden Schritte der Ligninsynthese werden ebenfalls durch Beteiligung von Peroxidasen vermittelt, wobei das für die Reaktionen benötigte H_2O_2 von den Enzymen selbst produziert wird (Christensen et al., 1998; Alba et al., 1996; Christensen et al., 1996). Neben löslichen apoplastischen sind auch zellwandassoziierte Peroxidasen an der Lignifizierung beteiligt, welche *in vivo* an die Pektine der Zellwand gebunden vorliegen sollen (Carpin et al., 2001; Penel et al., 1996). Möglicherweise sind diese Enzyme in Gegenwart von Calciumionen über elektrostatische Bindungen mit Polygalacturonsäure, dem Hauptbestandteil der Pektine, verknüpft. Neben der Lignifizierung und Suberinisierung sind Peroxidasen an der Assoziation von Monolignolen an Zellwandpolysaccharide und der intramolekularen Vernetzung von Polysacchariden, hauptsächlich von Cellulose und Pektinen, durch Bildung von Diferulatbrücken beteiligt (Ralph et al., 2004b; Iiyama et al., 1994). Darüber hinaus wurde eine Reihe von Extensinperoxidasen aus verschiedenen Pflanzenarten isoliert, welche hydroxyprolinreiche Glykoproteine der Zellwand, die Extensine, durch Verknüpfung von Tyrosinresten und möglicherweise auch Lysinresten vernetzen (Ralph et al., 2004b; Fry, 2004; Price et al., 2003; Schnabelrauch et al., 1996). Auf diese Weise spielen Peroxidasen wahrscheinlich eine Schlüsselrolle während der Zellwandbildung und in der Kontrolle der Zellwandplastizität während der Zellstreckung (Hoson et al., 1995). Darüber hinaus wurde kürzlich eine Beteiligung von Peroxidasen an der Zellwandlockerung diskutiert, welche für die Dehnbarkeit bzw. Streckung der Zelle sowie für die Fruchtreifung und Abszission von Organen notwendig erscheint (Liszskay et al., 2003). Eine peroxidasevermittelte Bildung von Hydroxyradikalen an der Zellwand und eine daraus

resultierende Spaltung von Zellwandpolysacchariden wurde ebenfalls postuliert (Schweikert et al., 2000; Fry, 1998).

Peroxidasen spielen eine regulatorische Rolle im Phytohormonstoffwechsel, da sie an der Ethylenbiosynthese und am Auxinkatabolismus beteiligt sind (Jimenez et al., 1998; Gazaryan et al., 1996, Campa et al., 1991). Einige Peroxidasen sind in der Lage das Auxin IAA als Substrat umzusetzen. Darüber hinaus konnten Korrelationen zwischen Peroxidaseaktivitäten und Wachstum bzw. Alter eines Gewebes festgestellt werden. So resultiert eine Unterexpression von Peroxidasen bei Tabakpflanzen in gesteigertem Wachstum, frühzeitiger Blühinduktion und anderen Veränderungen des Phänotyps, die normalerweise auf hohe endogene Auxingehalte zurückzuführen sind (Lagrimini, 1996, Ludwig-Müller et al., 1990). Peroxidasen spielen eine Rolle beim Übergang der Pflanze von der Skoto- zur Photomorphogenese, d. h. dem Übergang von unterirdischem zu überirdischem Wachstum (Jackson et al., 1996), und werden mit Seneszenzprozessen in Verbindung gebracht (Oh et al., 1997; Abeles et al., 1988).

Haloperoxidasen, wie beispielsweise Iodo- oder Bromoperoxidasen aus Braunalgen, sind für die Halogenierung organischer Substanzen verantwortlich (Almeida et al., 1996). Eine wahrscheinlich an der Innenseite des Tonoplasten lokalisierte basische Peroxidase aus Blättern des Madagaskar-Immergrüns (*Catharanthus roseus* (L.) G. DON.) ist in die Synthese von Indolalkaloiden involviert, deren Zwischenprodukte über einen peroxidasevermittelten *ion-trap*-Mechanismus in die Vakuole transportiert werden (Sottomayor et al., 2004; 1996). Andere Peroxidasen werden mit dem enzymatischen Braunwerden von Früchten in Verbindung gebracht (Richard-Forget und Gauillard, 1996). Phenolische Substanzen werden zu Chinonen umgesetzt, die zu braunen, roten oder schwarzen Pigmenten polymerisiert werden. Peroxidasen aus *Capsicum*-Arten sind an der Biosynthese von Capsaicinoiden, d.h. Säureamiden verzweigter Fettsäuren (C₉ - C₁₁) und Vanillylaminen, beteiligt, welche für die Schärfe von Früchten des Pfeffers sowie von Chilipflanzen verantwortlich sind (Díaz et al., 2004). Darüber hinaus werden Peroxidasen mit dem Chlorophyllabbau in Verbindung gebracht (Yamauchi et al., 2004).

Die Hauptfunktion der plasmamembrangebundenen, humanen Thyroidperoxidase liegt in der Synthese der Schilddrüsenhormone Thyroxin (T₄) und Triiodthyronin (T₃). Die Synthese der Hormone erfolgt durch Iodierung und Verknüpfung von Tyrosinresten der Hormonvorstufe Thyroglobulin (Niccoli-Sire et al., 2001).

Ascorbat- und Glutathionperoxidasen sind als Radikalfänger (*Scavenger*) an der Kontrolle aktiver Sauerstoffspezies (*Active oxygen species, AOS*) und an der Reparatur von Biomembranen beteiligt (Asada, 1992). Diese Schutzfunktion gegen oxidativen Stress üben sie vor allem im Cytosol und in den Chloroplasten aus (Herbette et al., 2005; Yabuta et al., 2002; De Gara et al., 1996). Trotz ihres Reichtums an Catalasen kommen Ascorbatperoxidasen auch in Glyoxysomen und Peroxisomen vor. Da Ascorbatperoxidasen eine fast 1000fach höhere Affinität für H_2O_2 haben als Catalasen und in der Lage sind, ihre Aktivität als Antwort auf die unterschiedlichsten Streßbedingungen zu erhöhen, werden sie als Schlüsselenzyme in der Entgiftung von AOS angesehen (De Gara et al., 1996).

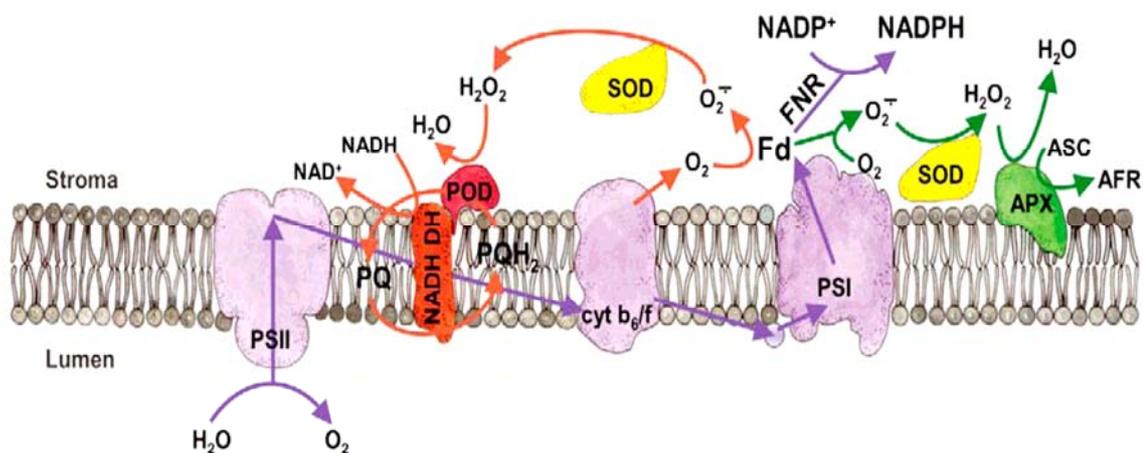


Abb. 1.2: Entgiftung von AOS an der Thylakoidmembran.

Die photosynthetischen Komplexe und Elektronenflüsse sind in violett dargestellt. Die unter optimalen physiologischen Bedingungen bzw. unter oxidativem Stress AOS entgiftenden Systeme (*AOS scavenging systems*) wurden grün bzw. rot markiert (Details siehe Text; De Gara, 2004). Die frei im Stroma diffundierende Ascorbatperoxidase wurde nicht dargestellt. Dieses Enzym ist ebenfalls an der Entgiftung des entstehenden Wasserstoffperoxids beteiligt. APX, Ascorbatperoxidase; ASC/AFR, Ascorbat/freies Ascorbatradikal; $\text{cyt } b_6/f$, Cytochrom- b_6 -f-Komplex; Fd, Ferredoxin; FNR, Ferredoxin-NADPH-Oxidoreduktase; NADH DH, eine dem mitochondrialen Komplex I ähnliche NADH-Dehydrogenase; PQ/PQH₂, Plastochinon/Plastohydrochinon; POD, Hydrochinonperoxidase; PS I, Photosystem I; PS II, Photosystem II; SOD, Cu-Zn-Superoxiddismutase.

Die Photosynthese ist eine der möglichen Produktionsstellen für AOS. So wurde geschätzt, dass sogar unter optimalen Bedingungen 3 – 27 % des gesamten Elektronenflusses von Chloroplasten an die univalente Reduktion von Sauerstoff (O_2) „verschwendet“ werden (Badger, 1985). Da die potentielle AOS-Produktion unter nicht-optimalen Bedingungen stark ansteigt, sind umfangreiche Schutz- und Reparatursysteme vorhanden (De Gara, 2004). Unter anderem liegen in Chloroplasten verschiedene Ascorbatperoxidasen vor. Zum einen finden sich lösliche, frei im Stroma diffundierende Enzyme, zum anderen wurde die bereits erwähnte thylakoidgebundene Ascorbatperoxidase identifiziert, die wahrscheinlich in der

Nähe von Photosystem I an die Stromathylakoidmembran gebunden vorliegt (Yoshimura et al., 1998, Asada et al., 1996). Ein anderes Enzym, die chloroplastidäre Superoxiddismutase (SOD), ist ebenfalls mit der Thylakoidmembran assoziiert und entgiftet an Photosystem I gebildete Superoxidanionen. Zusätzlich wurde eine Klasse-III-Peroxidase mit einer hohen Affinität für Hydrochinone identifiziert, welche ebenfalls mit der Thylakoidmembran assoziiert zu sein scheint und möglicherweise Plastochinon als natürliches Substrat umsetzt (Zapata et al., 1998; Laloue et al., 1997). Die Aktivität dieser Hydrochinonperoxidase wird durch photooxidativen Stress gesteigert (Casano et al., 1999). Das Enzym wird anders reguliert als die thylakoidgebundene Ascorbatperoxidase (De Gara, 2004; Murgia et al., 2004; Yabuta et al., 2002). Die Hydrochinonperoxidase ist Teil eines Enzymkomplexes, welcher für die sogenannte Chlororespiration verantwortlich und in den eine chloroplastidäre NADH-Dehydrogenase involviert ist (Casano et al., 2000). Die Bezeichnung Chlororespiration beschreibt eine putative respiratorische Elektronentransportkette der Thylakoidmembran, welche mit der photosynthetischen Elektronentransportkette in Interaktion stehen soll (Peltier und Cournac, 2002). Abb. 1.2 zeigt ein Modell für die Lokalisierung und Funktion der membrangebundenen Peroxidasen in Chloroplasten. Da sowohl in den Thylakoidreaktionen der Photosynthese als auch als Nebenprodukt der von der SOD katalysierten Entgiftungsreaktion H_2O_2 entsteht, ist diese Mikrokompartimentierung der membrangebundenen Peroxidasen an den Orten, an denen diese Substanzen gebildet werden, eine elegante Lösung (Tarantino et al., 2005; Asada et al., 1996). Der photosynthetische Apparat kann auf diese Weise optimal geschützt werden. Die Cytochrom-c-Peroxidase aus Hefe ist an der mitochondrialen Elektronentransportkette beteiligt, wo sie wahrscheinlich eine Schutzfunktion gegen toxische Peroxide ausübt (Welinder, 1992). Bakterielle Catalaseperoxidasen scheinen das Bakterium vor oxidativem Streß zu schützen (Welinder 1991). Zhang et al. (1992) stellten fest, dass eine Mutation des *KatG*-Gens, welches für eine Catalaseperoxidase in *Mycobacterium tuberculosis* kodiert, eine Resistenz gegen Isoniazid vermittelt. Isoniazid ist ein wichtiges Tuberkulosemedikament. Glutathionperoxidasen und Peroxiredoxine werden als Antioxidanzien angesehen, welche durch Zerstörung von Alkylhydroperoxiden zusätzliche Entgiftungsreaktionen vermitteln können (Yoshimura et al., 2004; Dietz, 2003; McGonigle et al., 1998).

1.1.5.2 Stressinduzierte Funktionen

Pflanzliche Peroxidasen üben ihre verschiedenen Funktionen nicht nur entwicklungs- und gewebespezifisch aus. Die Expression und/oder Aktivitätssteigerung vieler Peroxidasen erfolgt stressinduziert (Hiraga et al., 2001; Campa, 1991). Wirksame Faktoren sind

beispielsweise Salz-, Ozon- und Schwermetallstress, Verwundungen und/oder Pathogenbefall (Garcia et al., 1996, Ranieri et al., 1996, Scott-Craig et al., 1995, Botella et al., 1994). In Seerosen (*Nymphaeaceae*) wurden Peroxidasen mit der Entgiftung von Schwermetallen in Verbindung gebracht (Lavid et al., 2001). Dort scheinen sie an der Synthese von phenolischen Polymeren beteiligt zu sein, in welche Cadmium eingelagert wird. In Raps (*Brassica napus* L.) spielen Peroxidasen eine Rolle beim Abbau des toxischen Pestizids 2,4-Dichlorphenol (Agostini et al., 2003). Darüber hinaus können diese Enzyme aufgrund ihrer sensitiven Reaktion auch als Biomarker für atmosphärische Umweltverschmutzung dienen (Passardi et al., 2005).

Verwundungsstress wird in Pflanzen durch zahlreiche biotische und abiotische Faktoren ausgelöst, auf welche die Pflanze mit Reparatur- und Abwehrmechanismen gegen Pathogene und Herbivoren reagiert. In verschiedenen Pflanzenarten wurden Peroxidasen beschrieben, deren Aktivität oder mRNA-Gehalte im Anschluss an mechanische Verletzungen gesteigert werden (Ref. in Hiraga et al., 2001). Experimente mit Methyljasmonat, Abscisinsäure, Salicylsäure und Ethylen deuten in diesem Zusammenhang auf die Existenz unterschiedlicher Signaltransduktionsketten zur Induktion von Peroxidasegenen hin (Allison und Schultz, 2004; De Obeso et al., 2003; Roberts und Kolattukudy, 1989). Verschiedene Arten von Verwundung induzierten unterschiedliche Peroxidasen (Hiraga et al., 2000a). Im Rahmen der Wundheilung findet eine peroxidasevermittelte, stressinduzierte Suberinisierung der verletzten Gewebereiche statt (Bernards et al., 1999; Espelie et al., 1986). Weiterhin werden einige Peroxidasen bei der Ausbildung von Symbiosen wie den Wurzelknöllchen von Leguminosen sowie von Mykorrhiza spezifisch exprimiert (Ref. in Passardi et al., 2005).

Eine äußerst wichtige Funktion von Peroxidasen ist ihre Beteiligung an der Pathogenabwehr. Zahlreiche Peroxidasen der pflanzlichen Zelle werden bei Infektionen durch Pilze (Harrison et al., 1995; Thordal-Christensen et al., 1992), Bakterien (Rasmussen et al., 1995; Reimers et al., 1992), Viren (Hiraga et al., 2000b; Lagrimini und Rothstein, 1987) und Viroide induziert (Vera et al., 1993). Proteine, welche bei Pathogenbefall der Pflanzenzelle neu gebildet werden und in Abwehrprozesse oder ähnliche Reaktionen involviert sind, werden als PR-Proteine (*pathogenesis-related proteins*) bezeichnet. Spezifisch pathogeninduzierte Peroxidasen werden daher auch als PR-9-Proteine katalogisiert (Hiraga et al., 2001; Chittoor et al., 1999). Durch Umsetzung zahlreicher Prozesse können Peroxidasen Resistenzen gegen Krankheitserreger und pflanzliche Parasiten vermitteln (Castillejo et al., 2004; Simons und Ross, 1970). Auch in Mais wurden durch vergleichende Analysen von anfälligen und krankheitsresistenten Maislinien mehrfach Peroxidasen mit Resistenzen gegen Insekten und

verschiedene infektiöse Pilzarten in Verbindung gebracht (Dowd und Johnson, 2005; Dowd et al., 1997; Shimoni et al., 1991; Brad et al., 1974; Macri et al., 1974). Neben der entwicklungsspezifisch auftretenden Ligninsynthese kommt es bei Pathogenbefall zu einer stressinduzierten, peroxidasevermittelten Polymerisierung von Zellwandsubstanzen, um die Stabilität der Zellwand an gefährdeten Stellen zu erhöhen (Hilaire et al., 2001; Jackson et al., 1996). Auch bei Pathogenbefall werden nicht nur Lignin und Suberin, sondern auch Polysaccharide und hydroxyprolinreiche Glykoproteine miteinander vernetzt. Gleichzeitig können aus phenolischen Substanzen Produkte gebildet werden, die antibakteriell, antiviral sowie fungizid wirken oder als Fraßschutz gegen Insekten dienen (Kristensen et al., 2004; Kobayashi et al., 1996). Abwehrsubstanzen, die als Antwort auf einen Pathogenbefall gebildet werden, werden als Phytoalexine bezeichnet (Pedreño et al., 1996). Darüber hinaus werden Peroxidasen mit dem sogenannten oxidativen Burst und der Hypersensitivitätsreaktion in Verbindung gebracht (Delannoy et al., 2003; Bolwell et al., 2002; Martinez et al., 1998). Die Hypersensitivitätsreaktion ist eine spezielle Form des programmierten Zelltods einer oder mehrerer Zellen, um die Ausbreitung eines Pathogens im Organismus zu verhindern (Lüthje et al., 2000, Bolwell et al., 1998).

Der oxidative Burst ist eine massive Produktion von AOS, welcher sowohl bei Säugern als auch bei Pflanzen als Antwort auf einen Pathogenangriff und verschiedene abiotische und biotische Stressfaktoren auftritt (Mika et al., 2004; Lüthje et al., 2000; Bolwell et al., 1998). Als Teil des Immunsystems wird der oxidative Burst bei Säugern durch einen transmembranen Enzymkomplex, den sogenannten NADPH-Oxidasekomplex, erzeugt, der in speziellen weißen Blutkörperchen, den neutrophilen Phagolysosomen, lokalisiert ist (Henderson, 1998, Segal et al., 1998). Diese Leukozyten phagozytieren Pathogene und zerstören sie anschließend mit einem Gemisch aus Verdauungsenzymen, AOS und anderen toxischen Substanzen (Henderson und Chappell, 1996). Der für die AOS-Produktion verantwortliche NADPH-Oxidasekomplex gehört zur Flavocytochrom-*b*-Familie und besteht aus einem Heterodimer (gp91^{phox}, p22^{phox}), welches über cytosolische Komponenten und G-Proteine reguliert und durch den Inhibitor Diphenylenjodonium (DPI) gehemmt wird. Die durch einen transmembranen Elektronentransport am NADPH-Oxidasekomplex synthetisierten Superoxidanionenradikale ($O_2^{\cdot-}$) werden unter Beteiligung einer löslichen Myeloperoxidase und weiterer Enzyme zu H_2O_2 , hypochloriger Säure, Chloraminen und Hydroxylradikalen (OH^{\cdot}) umgesetzt. Alle entstehenden Substanzen sind für die phagozytierten Pathogene äußerst toxisch. Neben der NADPH-Oxidase der Neutrophilen finden sich in humanen Zellen PM-gebundene Dualoxidasen, d.h. NADPH-Oxidasen, welche eine zusätzliche Domäne mit Peroxidaseaktivität enthalten und unter anderem die Vernetzung von Tyrosinresten der extrazellulären Matrix katalysieren (Edens et al., 2001; Lüthje et al., 2000).

In vielerlei Hinsicht ähnelt der oxidative Burst von Pflanzen dem der Neutrophilen. In Pflanzen scheinen jedoch in verschiedenen Spezies unterschiedliche Mechanismen zu existieren (Mika et al., 2004; Able et al., 2000; Bolwell et al., 1998; Papadakis und Roubelakis-Angelakis, 1999). Neben extrazellulären Amin- und Oxalatoxidasen sowie intrazellulären Enzymen der Mitochondrien, Chloroplasten und Peroxisomen, welche als mögliche Quellen für die Bildung von AOS in Frage kommen, wurden bisher zwei dominierende Modelle entwickelt: Pflanzen wie die Damaszener Rose (*Rosa damascena* MILL.) zeigten als Antwort auf einen Pathogenbefall bzw. einen Kontakt der Zelle mit Elizitoren, einen oxidativen Burst, bei dem sowohl $O_2^{\bullet-}$ als auch H_2O_2 freigesetzt wurden (Bolwell et al., 1998). Elizitoren sind natürlich vorkommende oder künstliche Substanzen, die von Pflanzen als pathogenzugehörig oder –produziert erkannt werden. Da dieser oxidative Burst unter anderem durch DPI gehemmt wurde und an der PM lokalisiert zu sein schien, wurde in vielen Publikationen ein pflanzlicher NADPH-Oxidasekomplex postuliert (Torres et al., 1998, Desikan et al., 1998, Groom et al., 1996, Auh und Murphy, 1995). Obwohl in mehreren Pflanzenarten homologe Gene (*Respiratory burst oxidase homologs*, Rboh) zur katalytischen Untereinheit der NADPH-Oxidase der Säugerzellen (gp91^{phox}) nachgewiesen wurden, konnten deren Expressionsprodukte an der pflanzlichen PM bis heute nicht schlüssig bewiesen werden (Mika et al., 2004; Lühje et al., 2000; Murphy et al. 1998).

Als alternative Möglichkeit zur Produktion von AOS wurde in Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris* L.), Weinrebe (*Vitis vinifera* L.) und anderen Pflanzen eine Beteiligung von Peroxidasen am oxidativen Burst *in vivo* nachgewiesen (Bolwell et al., 2002; Bolwell, 1999; Papadakis und Roubelakis-Angelakis, 1999). Wie bereits erwähnt, können Peroxidasen nicht nur H_2O_2 entgiften, sondern sie können auch AOS produzieren. Die elizitorinduzierte Pathogenantwort dieser Pflanzen wird unter anderem durch Peroxidaseinhibitoren wie Cyanid bzw. Azid gehemmt und ist teilweise DPI-unabhängig. Es wird in der Regel ausschließlich H_2O_2 freigesetzt. Als essentieller Bestandteil der zum oxidativen Burst führenden Signaltransduktion kommt es zu einer Alkalisierung des Apoplasten, wobei pH-Werte zwischen pH 7,0 und 7,2 erreicht werden. In Gartenbohne wurde als mögliche Quelle für die Produktion der AOS eine zellwandgebundene Peroxidase (46 kDa) identifiziert, deren pH-Optimum für die Bildung von H_2O_2 in Gegenwart zugegebener Substrate oder apoplastischer Flüssigkeit elizitorbehandelter Zellen im neutralen Bereich liegt (Bolwell und Wojtaszek, 1997, Bolwell et al., 1995). Eine Antisense-Expression dieser Peroxidase führte in Arabidopsispflanzen zu einer verstärkten Anfälligkeit für infektiöse Bakterien und Pilze (Bolwell et al., 2002). Die hierdurch in Arabidopsis vermindert exprimierte Peroxidase wurde jedoch noch nicht identifiziert.

Neben der bisher postulierten antimikrobiellen Wirkung des oxidativen Bursts sowie des Bedarfs an AOS zur Vernetzung von Zellwandkomponenten kristallisierte sich in den letzten Jahren eine weitere Funktion von H_2O_2 heraus. Wie immer mehr Beweise zeigen, scheint H_2O_2 eine Schlüsselrolle in der pflanzlichen Signaltransduktion einzunehmen (Gechev und Hille, 2005; Laloi et al., 2004; Neill et al., 2002; Dat et al., 2000). Die H_2O_2 -vermittelte Signaltransduktion reguliert Stomataschließbewegungen, das Wachstum von Wurzeln, den Gravitropismus und die Pathogenabwehr. Viele abiotische oder biotische Stressfaktoren aktivieren eine Signalkaskade, in welche H_2O_2 , Stickstoffmonoxid (NO), Salicylsäure, Ca^{2+} und eine Reihe anderer Faktoren involviert sind (Ref. in Mika et al., 2004). Diese führt zu verschiedenen Abwehrreaktionen und kann in einer systemisch erworbenen Resistenz der Pflanze (*Systemic acquired resistance*, SAR) resultieren (Durner et al., 1998; Lopez-Delgado et al., 1998; Shirasu et al., 1997; Schwacke und Hager, 1992). In höheren Pflanzen werden mitogenaktivierte Proteinkinase-(MAPK)-Kaskaden und Calciumkanäle durch H_2O_2 aktiviert (Kroj et al., 2003; Chico et al., 2002; Desikan et al., 1999). Darüber hinaus scheint die Transkription mehrerer pathogeninduzierter Gene durch AOS kontrolliert zu werden (Desikan et al., 2001; Levine et al., 1994).

Die Peroxidaseaktivitäten in der Zellwand und den Endomembransystemen der Zellen höherer Pflanzen steigen während des oxidativen Bursts hauptsächlich dort an, wo ein Pathogenangriff stattfindet (McLusky et al., 1999; Bestwick et al., 1998; Cadena-Gomez et al., 1987). Eine plasmamembrangebundene Peroxidaseaktivität wäre in diesem Zusammenhang von großem Interesse und wurde tatsächlich an der Außenseite der PM verschiedener Spezies gefunden (Mika, 2001; Vianello und Macri 1991). Eine solche Peroxidase wäre analog zur humanen NADPH-Oxidase in der Lage, AOS direkt an der Membran zu bilden und/oder könnte einen durch eine apoplastische Peroxidase generierten oxidativen Burst unterstützen. Dies wäre sinnvoll, da die PM die letzte äußere Barriere der Zelle gegen eindringende Pathogene darstellt und die Schnelligkeit der AOS-Produktion eine *de novo* Synthese von Proteinen ausschließt. Damit ist die vorhandene Anzahl an Peroxidasen vor Ort entscheidend für die Stärke der AOS-Produktion (Bolwell et al., 1999). Die von einer plasmamembrangebundenen Peroxidase generierten AOS und das möglicherweise gleichzeitig von anderen Enzymen produzierte O_2^{\bullet} könnten dabei unterschiedlichen Zwecken dienen (Bérczi und Møller, 2000; Lüthje et al., 2000).

Durch einen oxidativen Burst können im Inkubationsmedium von Pflanzenzellen H_2O_2 -Konzentrationen von 10 - 100 μM erzeugt werden (Küpper et al., 2001; Bolwell et al., 1998; Kauss und Jeblick, 1996). Diese Konzentrationen sind hoch genug, um das Wachstum von Pilzen oder Bakterien zu hemmen (Xenopoulos und Bird, 1997; Peng und Kuc, 1992). Neben dem Entstehen von H_2O_2 aufgrund zellulärer Prozesse sowie durch externe Quellen im

Zusammenhang mit Pflanzen-Pathogen-Interaktionen (Bolwell et al., 2002; Schützendübel und Polle, 2002; Jackson und Taylor, 1996; Schraudner et al., 1996) können hierdurch massive Belastungen für die pflanzliche PM entstehen. Das Plasmalemma hat einen hohen Anteil an sehr langkettigen und vielfach ungesättigten Fettsäuren (Bohn et al., 2001), wodurch die Membran unter oxidativem Stress sehr anfällig für eine Lipidperoxidation ist (Jalloul et al., 2002; Rawlyer et al., 2002; Quartacci et al., 2001; Qiu und Liang, 1995) und es zu einer Veränderung der Membranpermeabilität kommen kann (Cakmak et al., 1987). Cytochrom P-450 oder Cytochrom b_5 , welche am Fettsäurestoffwechsel beteiligt sind, konnten in der pflanzlichen PM nicht nachgewiesen werden (Lüthje et al., 2005; Bérczi und Møller, 2000; Asard et al., 1998). Coenzym Q_{10} oder Tocopherole, die als Radikalfänger in Biomembranen fungieren, konnten im Plasmalemma ebenfalls nicht detektiert werden. Dieser Befund weist auf alternative Schutzmechanismen hin (Döring et al., 1998). An der PM lokalisierte Peroxidasen wären daher möglicherweise nicht nur in der Lage AOS zu produzieren, sondern könnten entstehendes H_2O_2 direkt am Entstehungsort entgiften, um einen optimalen Schutz der Membran zu gewährleisten. Sie könnten sogar ähnlich der für chloroplastidäre Ascorbatperoxidasen postulierten Mikrokompartimentierung ganz gezielt bestimmte funktionelle Bereiche der Membran schützen (Mika et al., 2004). Viele Peroxidasen des sekretorischen Stoffwechselweges erfüllen multiple Funktionen (Hiraga et al., 2001). Daher könnte eine PM-gebundene Peroxidase auch in zahlreiche der dargestellten Prozesse involviert sein.

Grundsätzlich ist es jedoch selbst bei genauer Kenntnis der Lokalisierung schwierig, die Funktion(en) von Peroxidasen zu ermitteln. Die Gründe hierfür sind hauptsächlich die große Anzahl nah verwandter Isoenzyme, die breite Substratspezifität, die vielen möglichen Funktionen und die Fähigkeit anderer Isoformen in *Knock-out*-Experimenten die entsprechende Funktion zu übernehmen (Hiraga et al., 2001; De Marco et al. 1999, Christensen et al., 1996).

1.1.6 Peroxidaseaktivitäten an der pflanzlichen Plasmamembran

Obwohl zahlreiche lösliche intrazelluläre und extrazelluläre Peroxidasen detailliert charakterisiert wurden (Shigeoka et al., 2002; Hiraga et al., 2001), ist wenig über membrangebundene Enzyme, insbesondere PM-gebundene Peroxidasen, bekannt. An der pflanzlichen PM wurden in den 1980er und 1990er Jahren wiederholt Peroxidaseaktivitäten beschrieben (Vianello et al., 1997; Zancani et al., 1995; De Marco et al., 1995; Ludwig-Müller und Hilgenberg, 1992; Ludwig-Müller et al., 1990; Pantoja und Willmer, 1988; Askerlund et al., 1987; Møller und Bérczi, 1986), allerdings konnten für diese Arbeiten Verunreinigungen durch adsorbierte, lösliche cytosolische oder apoplastische Proteine nicht ausgeschlossen werden. Für diese PM-gebundene Enzymaktivität wurden zahlreiche Funktionen postuliert. So wurde unter anderem eine Beteiligung dieser Peroxidase an der Biosynthese des Wachstumshormons IAA, der Schwermetallresistenz, der Produktion von AOS und der Entgiftung von H_2O_2 zum Schutz der Plasmamembran diskutiert (Vianello et al., 1997; Ludwig-Müller und Hilgenberg, 1992; Vianello und Macri, 1991).

Bereits 1982 beschrieb Lin einen gesteigerten Sauerstoffverbrauch durch intakte Protoplasten aus Maiswurzeln in Gegenwart von extrazellulärem NADH. Pantoja und Willmer (1988) erhielten ähnliche Ergebnisse mit Protoplasten aus Schließzellen der Taublume (*Commelina communis* L.) in Gegenwart von NAD(P)H. PM-Vesikel aus verschiedenen Pflanzenarten und Geweben zeigten NAD(P)H-Oxidaseaktivitäten, welche mit denen von Peroxidasen vergleichbar waren (Sagi und Fluhr, 2001; Zancani et al., 1995; De Marco et al., 1995; Vianello et al., 1990; Askerlund et al., 1987; Møller und Bérczi, 1986).

NADH-Oxidaseaktivitäten von PM aus Blumenkohl (*Brassica oleracea* L.) konnten durch phenolische Substanzen stimuliert und durch klassische Effektoren von Peroxidasen, wie Catalase, SOD, KCN oder Azid, gehemmt werden (Askerlund et al., 1987). In Fraktionen angereicherter PM aus Arabidopsis und Chinakohl (*Brassica campestris* L. subsp. *pekinensis*) wurde eine Oxidation von Tryptophan in Gegenwart von H_2O_2 beschrieben (Ludwig-Müller et al., 1990; Ludwig-Müller und Hilgenberg, 1992). Ungewaschene PM aus Wurzeln der Sojabohne (*Glycine max* (L.) MERILL) zeigten eine Peroxidaseaktivität in Gegenwart von *o*-Dianisidin, Guajacol und Ascorbat (Vianello et al., 1997). Diese Ascorbatoxidation konnte durch phenolische Säuren, wie Kaffee- und Ferulasäure, intensiv stimuliert werden. Die ermittelten Raten der Guajacol- oder *o*-Dianisidinoxidation wurden durch $CaCl_2$ gesteigert und durch Kaliumcyanid und Azid gehemmt.

Zusätzlich zu den dargestellten photometrischen Bestimmungen der Enzymaktivitäten wurden Antikörper gegen apoplastische Peroxidasen genutzt, um mittels Immunogoldlabelling und Elektronenmikroskopie PM-gebundene Peroxidasen *in situ* nachzuweisen (Andrews et al., 2002; Crevecoeur et al., 1997, Penel und Castillo 1991, Hu et

al. 1989). Askerlund et al. (1987) zeigten, dass das Vorhandensein von Peroxidaseaktivitäten in PM-Präparationen hochgradig davon abhängig ist, ob und wie intensiv die Membranen gewaschen werden.

Inzwischen konnte jedoch erstmals die Existenz von mindestens zwei membrangebundenen Peroxidaseaktivitäten an PM aus Maiswurzeln experimentell belegt werden, deren Aktivitäten eindeutig nicht auf lösliche adsorbierte oder periphere Proteine zurückzuführen waren (Mika, 2001). Durch eine Kationenaustauschchromatographie von CHAPS/Aminocaproinsäure-solubilisaten erfolgte eine Trennung der PM-gebundenen Peroxidaseaktivität in zwei Peaks (pmPOX1, pmPOX2). Diese pmPOX zeigten Guajacolperoxidaseaktivitäten mit unterschiedlichen pH-Optima, Temperaturoptima und Thermostabilitäten. In einer anschließenden Gelfiltration der Peakfraktionen wurde pmPOX2 in zwei weitere Peaks aufgespalten (pmPOX2a, pmPOX2b). Sofern es sich nicht um verschiedene Protein-Detergenzkomplexe desselben Proteins handelt, könnte dies auf die Existenz einer weiteren PM-gebundenen Peroxidase hindeuten.

1.2 Zielsetzung

Da PM-gebundene Peroxidasen höherer Pflanzen bisher kaum charakterisiert wurden und diese Enzyme wesentlich an Zellwandmodifikationen, einer stressinduzierten AOS-Produktion, der Zelldetoxifizierung und/oder der Reparatur der Membran beteiligt sein könnten, ist eine detaillierte Untersuchung dieser Proteine von großem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit sollten die PM-gebundenen Peroxidaseaktivitäten anhand der folgenden Teilaspekte charakterisiert werden:

- 1) Optimierung der Proteinreinigung und biochemische Charakterisierung
- 2) Identifizierung von Peptidsequenzen der Proteine
- 3) Bioinformatische Sequenzanalyse

Im Rahmen einer biochemischen Charakterisierung der Peroxidasen sollte zunächst durch Optimierung des Reinigungsprotokolles geklärt werden, wie viele Isoenzyme in PM aus Maiswurzeln tatsächlich vorliegen. Dazu sollten die Enzyme bezüglich ihres Molekulargewichtes, prosthetischer Gruppen, Glykosylierung sowie Substratspezifität und Effektoren untersucht werden, um die Peroxidasen nach Welinder et al. (1992) klassifizieren zu können. Darüber hinaus sollte untersucht werden in wie weit PM-gebundene Peroxidasen an einer DPI-sensitiven AOS-Produktion beteiligt sein könnten und ob das für Mais postulierte ZmRboh1 in der PM nachweisbar ist.

Da die Vorarbeiten Hinweise auf mindestens zwei Peroxidasen lieferten, sollten die partiell gereinigten Proteine massenspektroskopisch untersucht werden, um aus den ermittelten Peptidsequenzen die Nukleinsäuresequenzen der PM-gebundenen Peroxidasen ableiten zu können.

Durch bioinformatische Sequenzanalyse verfügbarer genomischer Nukleinsäuresequenzen sollte die Genstruktur der pmPOX analysiert werden. Anhand der Aminosäuresequenzen sollten Informationen über Homologien, Phylogenie, Klassifizierung und Struktur der Peroxidasen abgeleitet werden. Darüber hinaus sollten die experimentell ermittelten biochemischen Daten (molekulare Massen, isoelektrische Punkte, Glykosylierung) mit den theoretischen Eigenschaften der Proteine verglichen werden. Durch Hydropathieplots sollten mögliche transmembrane Domänen der Peroxidasen untersucht werden. Es sollte auch geklärt werden, in wie weit die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung und Sequenzierung Rückschlüsse auf die Lokalisation der pmPOX an der Innen- oder Außenseite der Membran zulassen. Um Informationen über eine gewebespezifische

Expression der pmPOX zu erhalten, sollten so weit möglich *in silico* Northern-Blot-Analysen durchgeführt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Wasserstoffperoxid wurde von der Firma Roth (Karlsruhe, BRD), Saccharose von ICN Biomedicals (Aurora, USA) und Dextran T500 von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, BRD) bezogen. Glycerol, TEMED, Ammoniumpersulfat und der Farbstoff Serva Blue G wurden von Serva (Heidelberg, BRD) benutzt. Sofern nicht anders ausgewiesen wurden alle wässrigen Lösungen mit Milli-Q-Wasser (Millipore, Eschborn, BRD) angesetzt. Feinchemikalien bzw. Enzyme wurden von Sigma-Aldrich Chemie (Deisendorf, BRD) geliefert. Milchpulver stammte von De-Van-Ge (Frema Reform, Lüneburg, BRD). Alle übrigen Chemikalien wurden von AppliChem (Darmstadt, BRD), Merck Eurolab (Darmstadt, BRD) oder Roth (Karlsruhe, BRD) bezogen.

Das Keimpapier stammte von Graham Professional (Ederol Medikrepp, Hainichen, BRD). Zum Entgasen von Puffern wurden OE 67 Membranfilter von Schleicher und Schuell (Dassel, BRD) benutzt. Nylonfilternetze wurden von Hydrobios (Kiel, BRD) bezogen. Maiskaryopsen (*Zea mays* L. cv. Jet) wurden von der Firma Saatunion (Hannover, BRD) geliefert.

2.2 Anzucht des Pflanzenmaterials

Karyopsen der Art *Zea mays* L. cv. Jet wurden in einer Apparatur mit geschlossenem Wasserkreislauf (Aquariumpumpe 2213, Eheim, Deizisau, BRD) vier Stunden in Leitungswasser vorgequollen. Die Karyopsen wurden anschließend auf Plastiknetze überführt, mit angefeuchtetem Keimpapier bedeckt und bei 26°C im Dunkeln kultiviert. Unterhalb der Netze befand sich 2 l Hydrokulturmedium (3 mM KCl, 500 µM CaCl₂, 125 µM MgSO₄) in ca. 40 x 60 cm großen Kulturschalen. Die Maiswurzeln wurden fünf Tage nach dem Keimen geerntet (Lüthje et al., 1998).

2.3 Isolierung von Plasmamembranen

Alle folgenden Arbeitsschritte zur Isolierung von Plasmamembranen wurden bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt. Nach Lüthje et al. (1998) wurden 80 – 130 g Primärwurzeln von *Z. mays* innerhalb von 30 min mit einer Rasierklinge geerntet und in Hydrokulturmedium auf Eis zwischengelagert. Nach der Ernte wurden die Wurzeln in 200 ml kaltem

Homogenisierungspuffer (250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 50 mM HEPES – KOH, pH 7,5) aufgenommen und mit 1 mM Dithiothreitol und 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon versetzt. Nach dreimaligem Homogenisieren (15 s) in einem Waring-Blendor mit Zeitgeber (Durst TIM 60, Hamburg, BRD) wurde der Rohextrakt durch ein Nylonnetz mit 125 µm Maschenweite filtriert und mit 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid versetzt. Durch differenzielle Zentrifugation (10 min bei 10.000 g und 30 min bei 50.000 g, Centrikon H-401 Zentrifuge, Kontron Instruments, Neufahrn, BRD) wurde ein mikrosomales Pellet hergestellt, welches in Resuspensionspuffer A (250 mM Saccharose, 5 mM KCl, 5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7,8) aufgenommen und anschließend in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert wurde.

Eine Isolierung der Plasmamembranen aus der mikrosomalen Fraktion erfolgte mittels *Phase-Partitioning* in sechs Schritten: Das resuspendierte mikrosomale Pellet wurde mit einer 27 g-Phasenmischung vereinigt, mit Resuspensionspuffer A auf 36 g aufgefüllt und gut durchmischt. Die Phasentrennung des nun vollständigen Phasensystems (6,5 % (w/w) Dextran T500, 6,5 % (w/w) Polyethylenglycol 3350, 250 mM Saccharose, 5 mM KCl, 5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7,8) erfolgte durch Zentrifugation (10 min, 1.000 g). Die resultierende Oberphase wurde auf die Unterphase eines frischen 36 g-Phasensystems überführt, das bereits verwendete Phasensystem erneut mit frischer, polyethylenglycolreicher Oberphase aufgefüllt und in beiden Systemen eine Phasentrennung induziert. Eine Wiederholung der Prozedur erfolgte fünfmal, wobei die Zentrifugationsdauer auf je 5 min verkürzt wurde. Die resultierenden Oberphasen des sechsten Phasensystems wurden auf Eis vereinigt, mit 200 - 250 ml Resuspensionspuffer B (250 mM Saccharose, 50 mM HEPES, pH 7,0 – KOH) verdünnt und die enthaltenen Membranen durch Ultrazentrifugation bei 105.000 g 45 min sedimentiert (L-60 Ultrazentrifuge, Beckmann, München, BRD). Die entstandenen Pellets wurden in 1 – 1,5 ml Resuspensionspuffer B aufgenommen und bei -70°C gelagert.

2.4 Proteinbestimmung

Die Proteingehalte wurden nach Bradford (1976) bestimmt. Die Messungen erfolgten in Gegenwart von 0,01 % Triton X-100. In Lösungen mit besonders niedrigem Proteingehalt und den zugehörigen Plasmamembransuspensionen wurde zusätzlich das sensitive Protokoll von Pierce genutzt (*BCA Protein Assay*[®], Pierce, Rockford, USA). In beiden Fällen diente Rinderserumalbumin als Standard. Die Messungen erfolgten photometrisch bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ bzw. $\lambda = 562 \text{ nm}$.

2.5 Waschen von Plasmamembranen

Plasmamembranen (10 - 12 mg Protein) wurden mit Waschpuffer A (25 mM Natriumacetat – HCl, pH 4,0, 500 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,01 % (w/v) Triton X-100) ad 30 ml aufgefüllt und 30 min bei 4°C auf einem KL2 Schüttler (75 min⁻¹, Bühler, Ratingen, BRD) inkubiert, um periphere und adsorbierte Proteine von den Membranen zu entfernen. Die gewaschenen Membranen wurden bei 105.000 g und 4°C 45 min sedimentiert (L-60 Ultrazentrifuge, Beckmann, München, BRD) und in kaltem Acetatpuffer A (25 mM Natriumacetat – HCl, pH 4,0, 1 mM EDTA, 0,01 % (w/v) CHAPS) resuspendiert.

2.6 Solubilisierung von Membranproteinen

Eine Solubilisierung der Peroxidaseaktivitäten erfolgte in Gegenwart von CHAPS in einem Detergenz/Proteinverhältnis von 30 : 1 in Kombination mit 0,5 mM Aminocaproinsäure. Gewaschene PM (ca. 7 mg Protein) wurden mit Acetatpuffer A verdünnt, langsam mit den entsprechenden Mengen Detergenz und Aminocaproinsäure versetzt und unter langsamem Rühren (100 min⁻¹, MR 2002, Heidolph, Omnilab, Hamburg, BRD) 10 min bei RT und anschließend 1 h auf Eis inkubiert (Mika, 2001). Das Endvolumen entsprach 9 ml. Die solubilisierten Proteine wurden durch Ultrazentrifugation von den unlöslichen Membranbestandteilen abgetrennt (1 h, 4°C, 105.000 g, L-60 Ultrazentrifuge, Beckmann, München, BRD). Das entstandene Pellet wurde in ca. 2 ml Acetatpuffer A resuspendiert und im Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert. Das Solubilisat und das Pellet wurden entweder bei –70°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

2.7 Konzentrieren von Proteinlösungen

Die proteinhaltigen Lösungen wurden in Centricon YM-10 Mikrokonzentratoren (Millipore, Bedford, USA) durch Zentrifugation auf das gewünschte Volumen eingeeengt, wobei Moleküle mit Molekulargewichten über 10 kDa zurückgehalten wurden. Durch 30 min Zentrifugation bei 3.000 g und 4°C (Heraeus Labofuge GL, Kendro, Hanau, BRD) war eine 8-fache Einengung zu erreichen. Der obere Teil der Filterapparatur wurde nach Invertierung erneut zentrifugiert (2 min, 1.000 g, 4°C), die eingeeengte Fraktion abgenommen und die Konzentratoren unter vollständigem Invertieren mit 20 % (v/v) Ethanol regeneriert (30 s, 400 g, 4°C).

2.8 Chromatographie

2.8.1 Entsalzung und Pufferaustausch

Um Proteine in andere Puffer zu überführen oder Lösungen zu entsalzen, wurden Sephadex G-25 Säulen (PD-10, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD) verwendet. Jede Säule wurde bei 4°C mit 30 ml des gewünschten Puffers äquillibriert. Die Fließgeschwindigkeit ergab sich aus dem Widerstand der Säulenmatrix. Pro Säule wurden 2,5 ml Probenlösung aufgetragen. Nach Absinken des Flüssigkeitspegels auf den die Matrix nach oben begrenzenden Filter wurden 3,5 ml des gewählten Puffers aufgegeben und das Eluat aufgefangen. Zur Regeneration und Lagerung erfolgte ein Äquillibrieren der Säulen mit je 30 ml 0,02 % Natriumazid.

2.8.2 High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Zur Proteinreinigung wurde ein HPLC-System des Typs ÄKTA (P-920 Pumpen, INV-907/M-925 Injektionssystem, UPC-900 Steuersystem, Frac-900/901 Fraktionssammler; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD) in Kombination mit einer analytischen Software (Unicorn V 3.20, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD) verwendet. Alle für die HPLC verwendeten Lösungen wurden mit pyrogenfreiem Milli-Q-Wasser (Millipore, Eschborn, BRD) angesetzt und mit OE 67 Membranfiltern durch ein Vakuumfiltrationsgerät (Nr. 16307 Sartorius, Göttingen, BRD) entgast. Vor chromatographischen Trennungen wurde das gesamte HPLC-System mit pyrogenfreiem Milli Q Wasser sowie dem jeweiligen Laufpuffer gewaschen. Eine Lagerung des Systems erfolgte in 20 % (v/v) Ethanol. Die Läufe wurden bei 4°C durchgeführt.

2.8.2.1 Ionenaustauschchromatographie

Die Kationenaustauschchromatographie erfolgte zunächst über eine UnoS1-HR-5/5-Säule (Bio-Rad, München, Deutschland) mit einem Säulenvolumen (SV) von 1,35 ml (Mika, 2001). Die Flussrate betrug 1 ml min⁻¹. Die Säule wurde mit je 10 SV pyrogenfreiem Milli-Q-Wasser sowie CEC-Puffer (25 mM Natriumacetat – HCl, pH 4,0, 1 mM EDTA, 1 % (w/v) Glycerol, 1 mM CHAPS) äquillibriert. 8 – 10 ml einer zu trennenden Proteinlösung wurden injiziert und ungebundene Proteine mit 10 SV CEC-Puffer ausgewaschen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte durch einen linearen KCl-Gradienten (0 – 1 M) über 13 SV gefolgt von 2 SV 1 M KCl. Es wurden Fraktionen von 1 ml (Durchfluss, Waschen) bzw. 0,5 ml Größe (Elution) gesammelt. Die Läufe wurden durch Leitfähigkeits- und UV-Messungen ($\lambda = 280$ nm) verfolgt. Gesammelte Fraktionen wurden auf Eis überführt und auf Enzymaktivität untersucht

(Details siehe Abschnitt 2.11). Die Uno S1-Säule wurde mit 10 SV pyrogenfreiem Milli-Q-Wasser regeneriert und nach mehreren Läufen mit 5 SV Regenerationspuffer 1 (20 mM Na_3PO_4), 5 SV Regenerationspuffer 2 (20 mM Na_3PO_4 , 1 M NaCl) sowie 5 SV Regenerationspuffer 1 gereinigt.

Zur Verbesserung der Trennleistung wurde die chromatographische Methodik zur Reinigung der Peroxidasen im Anschluss an die biochemische Charakterisierung der prosthetischen Gruppen und der Enzymaktivitäten modifiziert. Im Folgenden wurden die Kationenaustauschchromatographien mit einer MonoS-HR-5/5-Säule (SV 0,98 ml; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD) durchgeführt. Die Flussrate war $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Die Säule wurde mit je 10 SV pyrogenfreiem Milli-Q-Wasser sowie CEC-Puffer äquillibriert. 8 – 10 ml einer zu trennenden Proteinlösung wurden injiziert und ungebundene Proteine mit 10 SV MonoS-Puffer ausgewaschen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte durch einen linearen KCl-Gradienten (0 – 1 M) über 26 SV gefolgt von 2 SV 1 M KCl. Es wurden Fraktionen von 2 ml (Durchfluss, Waschen) bzw. 0,5 ml Volumen (Elution) gesammelt. Die Läufe wurden ebenfalls durch Leitfähigkeits- und UV-Messungen ($\lambda = 280 \text{ nm}$) verfolgt und gesammelte Fraktionen auf Enzymaktivität untersucht. Die MonoS-Säule wurde nach jedem Lauf mit 10 SV pyrogenfreiem Milli-Q-Wasser regeneriert und mit 500 μl 2 M NaCl, 500 μl 2 M NaOH, 500 μl 1 M HCl sowie 1 ml 2 M KCl gereinigt. Zwischen jedem Reinigungsschritt wurde die Säulenmatrix mit mindestens 5 SV pyrogenfreiem Milli-Q-Wasser gewaschen. Eine Lagerung der Säule erfolgte in 20 % (v/v) Ethanol. Aktive Fraktionen wurden bei -70°C gelagert.

2.8.2.2 Gelfiltration

Gelfiltrationen wurden mit einer Superdex-200-HR-10/30-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD) mit einem Säulenvolumen von 23,6 ml durchgeführt (Mika, 2001). Die Säule wurde mit 4 SV Gelfiltrationspuffer (50 mM Na_2HPO_4 , pH 7,0, 150 mM NaCl, 1 mM CHAPS, 1 mM EDTA) äquillibriert. Die Flußrate betrug $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. 300 – 500 μl Probe wurden mit einer Mikroliterspritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) injiziert. Die Elution der Proteine erfolgte mit 1,5 SV Gelfiltrationspuffer. Die Fraktionsgröße betrug 0,75 ml. Gesammelte Fraktionen wurden auf Eis überführt und auf Aktivität untersucht. Aktive Fraktionen wurden bei -70°C gelagert. Die Säule wurde zu Lagerungszwecken in 2 SV Regenerationspuffer G (50 mM Na_2HPO_4 , pH 7,0, 150 mM NaCl, 1 mM CHAPS, 1 mM EDTA, 0,02 % Natriumazid) äquillibriert.

2.8.2.3 Affinitätschromatographie

Für die Affinitätschromatographie wurde eine Lektinmatrix (Concanavalin-A-Sepharose-4B, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD) verwendet. Concanavalin A bindet reversibel α -D-Mannopyranosyl-, α -D-Glukopyranosyl- oder sterisch ähnliche Reste von Glykoproteinen, Polysacchariden und Glykolipiden.

Die Matrix wurde in fünf Schritten mit 50 ml Con-A-Puffer (20 mM HEPES, pH 7,4 – KOH, 500 mM NaCl) gewaschen, indem eine Zugabe von je 10 ml Puffer, ein Schütteln der Suspension und das Absaugen des Überstandes nach Absinken der Sepharose erfolgte. Die Matrix wurde anschließend 15 min entgast, blasenfrei in eine HR-5/5-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD) gegossen und mit 3 SV Con-A-Puffer bei maximaler Flußrate ($0,33 \text{ ml min}^{-1}$) äquillibriert, bis sich eine konstante Füllhöhe einstellte. Das Säulenvolumen entsprach 0,98 ml. Anschließend wurde die Säule mit einer Flußrate von $0,22 \text{ ml min}^{-1}$ mit 5 SV Con-A-Puffer äquillibriert. Die Injektion einer EDTA-freien Probenlösung erfolgte mit einer Flußrate von $0,1 \text{ ml min}^{-1}$. Ungebundene Proteine wurden durch 10 SV Con-A-Puffer mit einer Flußrate von $0,22 \text{ ml min}^{-1}$ ausgewaschen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte durch einen linearen α -D-Methylglucosidgradienten (0 - 500 mM) über 13 SV gefolgt von 2 SV 1 M α -D-Methylglucosid. Es wurden Fraktionen von 1 ml (Äquillibrieren, Waschen) bzw. 0,5 ml Größe (Elution) gesammelt. Die gesammelten Fraktionen wurden auf Eis überführt und auf Aktivität untersucht. Die aktiven Fraktionen wurden bei -70°C gelagert. Eine Regeneration der Säule erfolgte durch Waschen der Matrix mit je 2 - 3 SV Regenerationspuffer ConA1 (20 mM Tricin, pH 8,5, 500 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MnCl_2 , 1 mM MgCl_2) und Regenerationspuffer ConA2 (20 mM Natriumacetat, pH 4,5 – HCl, 500 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MnCl_2 , 1 mM MgCl_2). Eine Prozedur, die dreimal wiederholt und mit 5 SV Con-A-Puffer abgeschlossen wurde. Eine Lagerung der Matrix erfolgte in 100 mM Natriumacetat, pH 6,0 – HCl, 1 M NaCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MnCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0,01 % Thimerosal bei 4°C .

2.9 Analytische Gelelektrophorese

2.9.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophoresen wurden mit selbstgegossenen Acrylamidgelen unterschiedlichen Vernetzungsgrades durchgeführt. Das Herstellen der Gele erfolgte in einem mit Ethanol entfetteten Gießstand (*Mini Protein II Dual Slab Cell*, Bio-Rad, München, BRD). Die gewünschte Trenngellösung (10 / 11 oder 12 % (w/v) Acrylamid, 0,27 / 0,29 oder 0,32 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 3,75 mM TRIS, pH 8,8 – HCl, 0,1 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) Ammoniumpersulfat, 0,05 % (v/v) TEMED) wurde zunächst ohne TEMED und

Ammoniumpersulfat hergestellt und wahlweise unter Vakuum oder im Ultraschallbad 15 min entgast. Anschließend wurden die fehlenden Lösungen zugegeben. Nach kurzem Schwenken erfolgte das Gießen der Minigele (7 x 8 cm). Die Lösung wurde für die Dauer der Polymerisierung (45 – 60 min) mit 200 µl Isopropanol überschichtet, anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen und mit entgaster Sammelgellösung [4 % (w/v) Acrylamid, 0,11 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 125 mM TRIS, pH 6,8 – HCl, 0,1 % SDS, 0,04 % Ammoniumpersulfat, 0,08 % (v/v) TEMED] sowie Teflonkamm komplettiert. Nach vollständiger Polymerisation (30 - 45 min) konnten die Gele sofort verwendet oder in feuchtem Zustand mehrere Tage bei 4°C gelagert werden.

17 µl Probe wurden mit 17 µl 2x Probenpuffer (125 mM TRIS, pH 6,8 – HCl, 4 % (w/v) SDS, 0,002 % Bromphenolblau, 20 % (w/v) Glycerol, 50 mM Dithiothreitol) versetzt, für 5 min bei 95°C inkubiert, abgekühlt und 30 µl des Gemisches auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung wurde schrittweise bei 120 V (15 min) und 150 V (45 - 50 min) in einer mit Tankpuffer (25 mM TRIS, pH 8,3 – HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) gefüllten Minigelkammer (*Mini-Protein II Dual Slab Cell*, Bio-Rad, München, BRD) entsprechend der Originalmethode nach Laemmli (1970) durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard wurden je nach Färbemethode 5 µl konzentrierte oder 1 : 5 verdünnte Lösung eines Breitbandmarkers verwendet (*Broad Range*, Bio-Rad, München, BRD). Eine Anfärbung der Proteine erfolgte mit Coomassie-Blue (*Coomassie Stain R-250*, Bio-Rad, München, BRD) nach Wilson (1983) oder Silberfärbung (*Silver Staining Kit Plus*, Bio-Rad, München, BRD) nach Merril et al. (1984).

Eine Anfärbung von Hämproteinen im Gel wurde durch die Durchführung einer modifizierten SDS-PAGE erreicht. Die Endkonzentration von SDS war 0,1 % (w/v) in allen Lösungen und Gelen (Trost et al., 2000). 25 µl konzentrierte Probe (0,9-5,0 µg Protein) wurden mit 10 µl 4x nichtreduzierendem Probenpuffer (250 mM TRIS, pH 6,8 – HCl, 0,4 % (w/v) SDS, 40 % (w/v) Glycerol, 0,008 % Bromphenolblau) versetzt. 30 µl dieses Gemisches wurden innerhalb von 30 min und ohne Hitzeeinwirkung auf das Gel aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde HRP verwendet. Da die Trennleistung von Monomeren im Gel durch die geringere SDS-Konzentration nicht beeinflusst wurde, wurde derselbe Breitbandmarker verwendet. Jede Probe wurde doppelt aufgetragen und das Gel im Anschluss an die elektrophoretische Trennung in der Mitte auseinandergeschnitten. Eine Hälfte des Gels wurde durch Silberfärbung, die andere Hälfte wurde in Gegenwart der Peroxidasubstrate Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid angefärbt: Das Gel wurde in einer Lösung aus 6,3 mM TMB, 175 mM Natriumacetat – HCl, pH 5,0, 30 % (v/v) Methanol vorinkubiert und die Färbereaktion nach 90 min durch Zugabe von H₂O₂ in einer

Endkonzentration von 30 mM gestartet (Thomas et al., 1976). Um ausgefallenes TMB zu entfernen und die Intensität der Färbung zu steigern wurde das gefärbte Gel mit 100 ml Waschpuffer (175 mM Natriumacetat – HCl, pH 5,0, 30 % (v/v) Isopropanol) gewaschen und dieser Waschschrift zweifach wiederholt.

2.9.2 Isoelektrische Fokussierung

Isoelektrische Fokussierungen wurden mit mobilen pH-Gradienten durchgeführt. Das Anfertigen der Gele erfolgte in einer mit Ethanol entfetteten Elektrophoresekammer (Protean xi 2D Cell, Bio-Rad, München, BRD). Die Gele wurden mit Hilfe ausgezogener Glaskapillaren blasenfrei in senkrecht eingespannte und unten mit Parafilm verschlossene Glasröhrchen (Innendurchmesser 1,5 mm, Außendurchmesser 6,0 mm, Länge 15 cm) gegossen. Sie wurden mit (8 M Harnstoff, 4,5 % (w/v) Acrylamid, 0,12 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 2 % Ampholyt (pH 3 - 10; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD), 0,001 % (v/v) TEMED, 0,0002 % (w/v) Ammoniumpersulfat) oder ohne Harnstoff (4,5 % (w/v) Acrylamid, 0,12 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 2 % Ampholyt (pH 3-10), 0,0015 % (v/v) TEMED, 0,0003 % (w/v) Ammoniumpersulfat) in Gegenwart oder Abwesenheit von Detergenz (2 % (w/v) CHAPS) gegossen. Die Polymerisierung erfolgte 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht.

Sowohl der Anodenpuffer (10 mM Phosphorsäure) als auch der Kathodenpuffer (20 mM NaOH) wurden mit OE 67 Membranfiltern (Porengröße 0,45 µm, Schleicher und Schuell, Dassel, BRD) in einem Vakuumfiltrationsgerät (Nr. 16307 Sartorius, Göttingen, BRD) entgast. Nach Entfernen des Parafilms und Einfüllen des Anodenpuffers wurden 21 µl konzentrierte Probe mit 14 µl Probenpuffer versetzt und 30 µl des Gemisches mit einer Hamilton-Spritze blasenfrei auf ein einzelnes Gel aufgetragen. Der Probenpuffer bestand aus 5 % Ampholyt und enthielt je nach Gelzusammensetzung zusätzlich 8 M Harnstoff und/oder 5 % (w/v) CHAPS. Als Positivkontrolle wurden 5 µl IEF-Marker (Bio-Rad, München, BRD) verwendet. Die oberen Gelöffnungen wurden mit Kathodenpuffer überschichtet. Die elektrophoretische Trennung wurde schrittweise (2 h 200 V, 2 h 500 V, 9 h 800 V) über Nacht bei 4°C durchgeführt. Anschließend wurden die oberen und unteren Enden der Gele bzw. Glasröhrchen mit Milli Q-Wasser gespült und die Gele mit Druckluft aus den Glasröhrchen herausgedrückt. Eine Anfärbung der Proteine erfolgte durch Hämefärbung. Negativkontrollen wurden mit einer Rasierklinge in 0,5 cm lange Segmente zerschnitten und jedes Segment über Nacht in 300 µl H₂O auf einem Schüttler (150 min⁻¹; KL2, Bühler, Ratingen, BRD) inkubiert. Der pH-Wert der Lösungen wurde anschließend mit einer Mikro-pH-Elektrode ermittelt und eine Eichgerade des je nach Gelzusammensetzung variierenden

pH-Gradienten erstellt, anhand welcher die isoelektrischen Punkte der detektierten Proteinbanden errechnet wurden.

2.10 Western Blotting

Partiell gereinigte Proteine wurden durch SDS-PAGE oder modifizierte nicht-reduzierende SDS-PAGE getrennt. Die Membranen wurden vor der Gelelektrophorese für 30 min bei Raumtemperatur in Beladungspuffer (32% (v/v) Glycerol, 4% SDS, 200 mM Tris pH 6.8, 0.16% Bromophenolblau, 10% (v/v) Mercaptoethanol) vorinkubiert und anschließend für 5 min bei 95°C erhitzt. Zur Western Blot-Analyse wurden die Proteine in einer *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad, München, BRD) innerhalb von 45 min bei ca. 2°C und 100 V auf eine Nitrocellulosemembran (Sartorius, Göttingen, BRD) transferiert. Der Blottingpuffer enthielt 25 mM Tris, 180 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol. Markerbanden wurden durch Ponceau-Färbung (Sigma-Aldrich Chemie, Deisendorf, BRD) sichtbar gemacht und mit Bleistift markiert. Nach 5 minütigem Waschen mit Milli Q-Wasser. wurde die Nitrocellulosemembran über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler (75 min⁻¹, KL2, Bühler, Ratingen, BRD) in 5 % (w/v) Milchpulver in PBS Tween 20 (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,1 % (v/v) Tween 20) inkubiert. Die folgenden Schritte der Immunodetektion erfolgten alle bei RT unter langsamem Schütteln. Eine Inkubation mit dem primären Antikörper wurde für 1 h in 5 % (w/v) Milchpulver in PBS Tween 20 durchgeführt. Einer der Antikörper war gegen die ersten 12 Aminosäuren des C-Terminus des gp91^{phox} gerichtet (1 : 1000; L. Henderson, Bristol, GB), während H-60 gegen den dritten externen Loop (Aminosäure 231 - 290) des gp91^{phox} gerichtet war (1 : 200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Nach dreimaligem 5 minütigem Waschen mit PBS Tween 20 wurde die Nitrocellulosemembran für 1 h mit einem sekundären Antikörper (1 : 1000; Donkey anti-Rabbit IgG-HRP; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) inkubiert und anschließend 3 x 5 min mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen. Protein-Antikörperkomplexe wurden durch das ECL Plus Western Blotting-Detektionsreagenz (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD) detektiert und auf Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD) in einem Professional X-Ray-Film Processor (Protec, Oberstenfeld, BRD) sichtbar gemacht. Um Reaktionen der pmPOX mit dem ECL-Reagenz auszuschließen, wurde von jeder Probe eine Negativkontrolle ohne zweiten Antikörper durchgeführt.

Um eine Glykosylierung der partiell gereinigten Proteine nachzuweisen, wurde im Anschluss an das Western Blotting das ECL Glycoprotein Detection Module (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, BRD) verwendet.

2.11 Enzymaktivitäten

Peroxidaseaktivitäten wurden anhand der Oxidation von Guaiacol (8,26 mM, $\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) in Gegenwart von 8,8 mM H_2O_2 über einen Zeitraum von 2 min pro Ansatz photometrisch ermittelt. Der Versuchsansatz (1 ml) enthielt Acetatpuffer B (25 mM Natriumacetat, pH 5,0 – HCl) und 25 μl Fraktion. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Guaiacol gestartet und photometrisch (DU 7500, Beckmann, München, BRD) als Extinktionszunahme bei 470 nm verfolgt. Die Umsetzung anderer Substrate wurde als Extinktionsabnahme oder –zunahme von ABTS ($A_{405 \text{ nm}}$; $\epsilon = 36,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), Coniferylalkohol ($A_{265 \text{ nm}}$; $\epsilon = 7,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 4-Hydroxycimtsäure ($A_{310 \text{ nm}}$; $\epsilon = 16,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), *o*-Dianisidin ($A_{460 \text{ nm}}$; $\epsilon = 30,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), IAA ($A_{261 \text{ nm}}$; $\epsilon = 3,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) oder TMB ($A_{652 \text{ nm}}$; $\epsilon = 39,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) statt Guaiacol gemessen. Die Versuchsbedingungen waren die gleichen. Die katalytische Umsetzung von Ascorbat (0,5 mM; $A_{290 \text{ nm}}$; $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) wurde in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,0 in Gegenwart von 8,8 mM H_2O_2 in einem Zeitraum von 1 min ermittelt.

Die Effektoren wurden entsprechend der im Ergebnisteil (siehe Abschnitt 3.2.1 und 3.3.2) angegebenen Konzentrationen verwendet. Ferulasäure, Hydroxycimtsäure, Coniferylalkohol, Propylgallat, und DPI wurden 1 : 1 in 50 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Pro Versuchsansatz (1 ml) wurden 10 μl DMSO-haltige Substrat- bzw. Effektorlösung verwendet. Die Endkonzentration für DMSO betrug 0,5 % (v/v), welche keinen Einfluß auf die gemessenen Aktivitäten hatte. Alle verwendeten Lösungen mit Ausnahme der in DMSO gelösten Substrate wurden auf Eis aufbewahrt. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Die Reaktion der Ansätze wurde durch Hinzufügen eines Substrates gestartet. Um mögliche Blindreaktionen abzuschätzen, wurden entsprechende chemische Kontrollen durchgeführt und subtrahiert.

NADH : XTT-Oxidoreduktaseaktivitäten wurde als Extinktionszunahme von 0,2 mM XTT ($A_{470 \text{ nm}}$; $\epsilon = 21,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) in Gegenwart von 0,2 mM NADH ermittelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NADH gestartet. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur in 50 mM HEPES - KOH, pH 7,0 bzw. pH 8,0 in Gegenwart oder Abwesenheit von 50 U ml^{-1} SOD.

Die Absorptionsspektren wurden in Quarzküvetten (1 cm) an einem Photometer des Typs Uvikon 943 (Kontron Instruments, Mailand, Italien) mit einer Geschwindigkeit von 50 nm min^{-1} gemessen. Die Standardabweichungen wurden mit Microcal Origin (Version 5.0, Additive GmbH, Friedrichsdorf/TS, BRD) errechnet.

Die NADH-Oxidaseaktivitäten wurden mit einer Sauerstoffelektrode (Clark-Elektrode, H. Saur, Reutlingen, BRD) mit einem Stromversorgungsgerät CB1D (Bachhofer, Reutlingen,

BRD) bei 22°C in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml als Sauerstoffverbrauch gemessen. Der Ansatz enthielt 25 mM Natriumacetat – HCl, pH 4,25 und 75µl Probe. Die Lösung wurde für 3 min gerührt, anschließend wurden Effektoren (siehe auch Abschnitt 2.11.1) zugegeben und die Proben für weitere 3 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NAD(P)H (0,1 – 2 mM) gestartet und 4 min als Sauerstoffverbrauch in Gegenwart oder Abwesenheit von 50 U ml⁻¹ SOD verfolgt. Um mögliche Blindreaktionen abzuschätzen, wurden chemische Kontrollen durchgeführt und subtrahiert. Aufgrund der chemischen Reaktivität von DPI mit EDTA und CHAPS wurden die partiell gereinigten Proteine vor den Messungen einem Pufferaustausch unterzogen und in 25 mM Natriumacetat – HCl, pH 4,25 aufgenommen. Die pH-Abhängigkeiten der NAD(P)H-Oxidaseaktivitäten wurden in 25 mM Natriumacetat (pH 4,0 – 5,0), MES (pH 5,5 – 6,5) bzw. HEPES (pH 7,0 – 8,0) ermittelt.

2.12 Massenspektrometrie

2.12.1 Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS)

Die zu untersuchenden Proteinbanden wurden aus modifizierten SDS-PAGE-Gelen herausgeschnitten. Die enthaltenen Proteine wurden mit Dithiothreitol reduziert, Cysteinreste mit Iodacetamid modifiziert und die enthaltenen Proteine mit Trypsin im Gel verdaut (5 g modifiziertes Trypsin/µl (Promega, Mannheim, BRD) in 50 mM NH₄HCO₃, 37°C). Im Anschluss wurden die behandelten Gelstücke wiederholt extrahiert (50 % Acetonitril/5 % Ameisensäure). Die vereinigten Extrakte wurden unter Vakuum konzentriert, in 5 % Methanol/5 % Ameisensäure aufgenommen, über C18 mZipTips (Millipore, Schwalbach, BRD) entsalzt und mit 1 ml 60 % Methanol/5 % Ameisensäure eluiert. Eine Analyse der Eluate erfolgte durch Nanoelektrospray-Massenspektrometrie in einem Q-TOF-2-Instrument (Micromass, Manchester, GB). Die durch kollisionsinduzierte Fragmentierung der Peptide erhaltenen MS/MS-Spektren wurden anhand des Mascot MS/MS-Ionen-Suchalgorithmus (Matrix Sciences, London, GB) sowie manuell ausgewertet.

2.12.2 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization with Time of Flight Detector)

Für die Aufnahme von Laserdesorptionsmassenspektren (MALDI-TOF) wurde die Extraktion der Proben aus dem Gel und deren Probenvorbereitung wie unter 2.12.1 beschrieben durchgeführt. 0,5 µl (5 %) der Probe wurden mit 0,5 µl Matrixlösung (gesättigte Lösung von α-Cyano-4-Hydroxymizinsäure in 30 % Acetonitril/Wasser/0,1% Trifluoressigsäure) vermischt und auf ein MALDI-Target aufgetragen. Die Messungen wurden mit dem MALDI-Massenspektrometer REFLEX IV (Bruker, Bremen, BRD) durchgeführt. Dabei werden durch

einen Laserpuls punktuell Matrixkristalle zusammen mit den darin eingeschlossenen Peptiden verdampft. Die Masse der so in die Gasphase überführten Peptide wird in einem Time of Flight (Flugzeit, TOF)-Massenanalysator bestimmt. Die ermittelten Daten, d.h. der sogenannte *Peptide Mass Fingerprint* des untersuchten Proteins, wurden anhand des Mascot MS/MS-Ionen-Suchalgorithmusses (Matrix Sciences, London, GB) zur Datenbankrecherche verwendet. Durchsucht wurde die jeweils aktuellste Version von GenBank (National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA).

2.12.3 Computergestützte Sequenzanalyse

Die Sequenzdaten wurden *online* aus den aktuellsten Versionen der verfügbaren Datenbanken extrahiert und mit den folgenden Programmen verarbeitet und analysiert:

Datenbanken

ARAMEMNON (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>; Universität Köln, BRD)

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA)

MAGI (<http://maize.ece.iastate.edu/>; Universität von Iowa, IA, USA)

MaizeGDB und PlantGDB (<http://www.maizegdb.org/>; <http://www.maizegdb.org/plantgdb-blast.php>; Universität von Iowa, IA, USA)

PeroxiBase (<http://peroxidase.isb-sib.ch/index.php>; Universität Genf, Genf, Schweiz)

TIGR (<http://www.tigr.org/tdb/tgi/>; Institut für Genomforschung, Rockville, MD, USA)

UniProt (<http://www.pir.uniprot.org/search/blast.shtml>; Europäisches Institut für Bioinformatik, GB; Schweizer Institut für Bioinformatik, Schweiz; Protein Information Resource, Universität von Georgetown, Washington DC, USA)

Sequenzbearbeitung

Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA)

Sequenzanalyse und Visualisierung

Zahlreiche Vorhersage- und Analyseprogramme sind erreichbar durch die beiden folgenden Adressen und wurden nicht im einzelnen genannt:

Bioinformatics.Net (<http://bioinformatics.vg/index2.shtml>; Oxford, GB)

Expasy [<http://www.expasy.org/tools/>; Schweizerisches Institut für Bioinformatik, Schweiz; unter anderem DAS (Cserzo et al., 1997); HMMTop (Tusnády and Simon, 2001; 1998); big-PI Predictor (Eisenhaber et al., 1999); SignalP (Bendtsen et al., 2004); TargetP (Emanuelsson et al., 2000)]

Weiterhin wurden verwendet:

ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>; Europäisches Institut für Bioinformatik, GB)

DNA→Protein (http://www.in-silico.com/s_translate/; Universität des Baskenlandes, Spanien)

GeneDoc (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>; Pittsburgh Supercomputing Center, Pittsburgh, PA, USA)

MemSat (<http://saier-144-37.ucsd.edu/memsat.html>; Universität von Kalifornien, San Diego, USA),

PHD/PredictProtein (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html> Columbia Universität, NY, USA)

Phobius (<http://phobius.cgb.ki.se/index.html>; Universität von Kopenhagen, Kopenhagen, Dänemark)

PredTmr (<http://biophysics.biol.uoa.gr/PRED-TMR/input.html>; Universität von Athen, Athen, Griechenland)

Proteinexplorer (<http://www.proteinexplorer.org>; Universität von Massachusetts, Amherst, MA, USA)

Thumbup (http://theory.med.buffalo.edu/Softwares-Services_files/thumbup.htm; State University of New York at Buffalo, NY, USA)

TreeView X (<http://darwin.zoology.gla.ac.uk/%7Erpage/treeviewx/>; Universität von Glasgow, Glasgow, GB)

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Der Ergebnis- und Diskussionsteil der vorliegenden Arbeit gliedert sich in zwei Bereiche. In der ersten Hälfte werden die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung der PM-gebundenen Peroxidaseaktivitäten (pmPOX) aus Maiswurzeln vorgestellt. Im zweiten Teil erfolgt eine detaillierte Darstellung der durch massenspektrometrische Analysen und *in silico Cloning* identifizierten Nukleinsäuresequenzen der pmPOX und deren bioinformatischer Sequenzanalyse.

3.1 Prosthetische Gruppe

Zunächst wurden die bereits beschriebenen PM-gebundenen Peroxidaseaktivitäten pmPOX1 und pmPOX2 aus den Peakfraktionen der Kationenaustauschchromatographie detaillierter charakterisiert. Absorptionsspektren in einem Bereich von 350 - 700 nm zeigten für pmPOX1 und pmPOX2 Cytochrom-*b*-Spektren, d.h. der Kurvenverlauf war typisch für Proteine mit nichtkovalent gebundenen Hämgruppen als prosthetischer Gruppe (Converso und Fernandez, 1995; Kvaratskhelia et al., 1997). Die Absorptionsspektren beider pmPOX waren fast identisch. Sowohl pmPOX1 als auch pmPOX2 zeigten einen Soretpeak bei 416 nm (Abb. 3.1). Zusätzlich wurden α - und β -Absorptionsbanden bei den Wellenlängen 607 bzw. 528 nm sichtbar. Der Soretpeak und die α -Bande verschoben sich nach einer Reduktion durch Natriumdithionit auf 425 und 559 nm. Der A_{416}/A_{280} -Wert, welcher als Kriterium für die Reinheit von Proteinen und deren Hämgehalt gilt, betrug 0,5 bzw. 0,2 für pmPOX1 und pmPOX2. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass Hämgruppen aufgrund der Reinigung der Proteine im saurem pH-Bereich teilweise verloren gegangen sein könnten, scheinen die Enzyme daher noch nicht bis zur Homogenität gereinigt worden zu sein. Ein Ergebnis, welches auch in den späteren Gelelektrophoresen deutlich wurde. Die α -Absorptionsbande bei 607 nm konnte aus diesem Grund nicht eindeutig der Hämgruppe der Peroxidase(n) zugeordnet werden. Die Spektren beider pmPOX zeigten größere Ähnlichkeiten zu Spektren von Guajacol- als von Ascorbatperoxidasen (Chen und Asada, 1989; Converso und Fernandez, 1995; Kvaratskhelia et al., 1997).

3.2 Charakterisierung der H₂O₂-abbauenden Enzymaktivitäten

3.2.1 Einfluss von Effektoren auf die Peroxidaseaktivitäten

Die H₂O₂-entgiftenden Enzymaktivitäten von pmPOX1 und pmPOX2 aus den Peakfraktionen der Kationenaustauschchromatographie wurden in Gegenwart von klassischen Peroxidase-

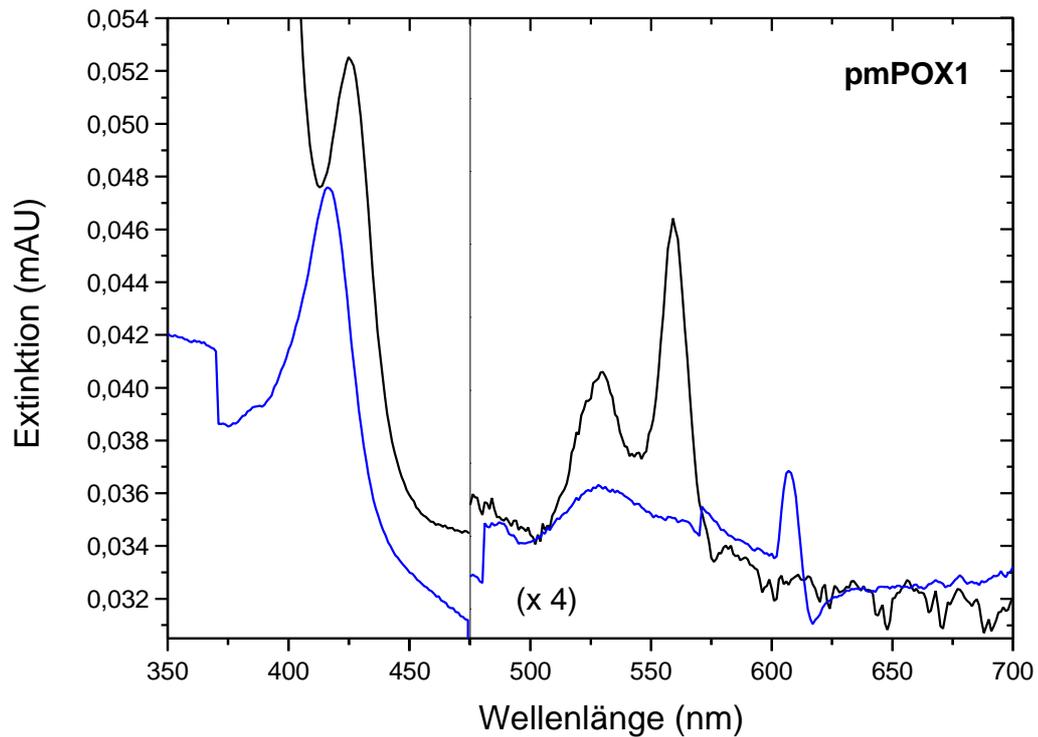


Abb. 3.1: Absorptionsspektrum am Beispiel von partiell gereinigter pmPOX1.

Proben des nativen Enzyms ($1,1 \text{ mg Protein ml}^{-1}$; blau) wurden in 50 mM Natriumphosphatpuffer ($\text{pH } 7,0$) gegen Puffer als Kontrolle gemessen. Eisen-(III)-haltige Enzyme wurden durch Zugabe von ungefähr $1,5 \text{ mM}$ Dithionit reduziert (schwarze Linie). Die Spektren wurden mit einer Genauigkeit von 50 nm min^{-1} ermittelt. $n = 2$ unabhängige Präparationen zeigten identische Ergebnisse. Die Spektren zeigen die Existenz von Hämgruppen als prosthetische Gruppe an.

effektoren charakterisiert (Tab. I). Typische Inhibitoren wie Kaliumcyanid verursachten einen vollständigen Verlust der PM-gebundenen Peroxidaseaktivitäten. Diese Ergebnisse stimmen mit der mehr als 90 %igen Hemmung der Aktivitäten durch Azid überein (Mika, 2001) und bestätigen die Existenz von Hämgruppen als prosthetische Gruppe.

Da die Enzyme an der pflanzlichen PM lokalisiert sind, sind sie wahrscheinlich Teil des sekretorischen Stoffwechselweges. Nach Welinder et al. (1996) wird oft 4-Hydroxy-quecksilberbenzoesäure (*p*-Chloromercuribenzoate; pCMB), ein Sulfhydrylinhibitor, verwendet, um zwischen Klasse-I- und Klasse-III-Peroxidasen zu unterscheiden. Wie in Tab. I gezeigt, hatte dieser Inhibitor keinen Effekt auf die Guajacolperoxidaseaktivitäten von pmPOX1 oder pmPOX2. Es scheinen keine SH-Gruppen am aktiven Zentrum der Isoenzyme beteiligt zu sein. Daher sind die PM-gebundenen Peroxidasen möglicherweise Klasse-III-Peroxidasen.

Mn²⁺ hatte keinen Effekt auf pmPOX1 oder pmPOX2. Im Gegensatz zu den PM-gebundenen Enzymen werden die Aktivitäten vieler löslicher Peroxidasen durch Behandlung mit Mn²⁺ gesteigert. Mn²⁺ ist möglicherweise an der Regulation dieser Peroxidasen beteiligt (Van Huystee et al., 1996). Loukili et al. (1999) charakterisierten jedoch lösliche Peroxidasen, welche nicht durch Magnesiumionen beeinflusst wurden. Darüber hinaus war Mn²⁺ in PM aus Maiswurzeln nicht nachweisbar (Lüthje et al., 1995).

In Gegenwart des Auxins IAA nahm die Guajacolperoxidaseaktivität von pmPOX2 geringfügig ab, während die Aktivität von pmPOX1 nicht beeinflusst wurde. Dieser inhibitorische Effekt könnte auf einer kompetitiven Hemmung beruhen. Er ähnelt den Effekten, welche mit Propylgallat, einem Phenol, erzielt wurden (Mika, 2001).

Tab. I: Guajacol-abhängige Peroxidaseaktivitäten in Gegenwart oder Abwesenheit typischer Peroxidaseeffektoren. Die Peroxidaseaktivitäten wurden mit den partiell gereinigten Enzymen aus der Kationenaustauschchromatographie in Gegenwart von 8,26 mM Guajacol und 8,8 mM Wasserstoffperoxid bei pH 7,0 gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von $n = 3$ Messungen. pCMB, *p*-Chloromercuribenzoate; IAA, Indol-3-essigsäure; n.d., nicht detektierbar; a, pH 5,0.

Substanz	Konz.	pmPOX1	pmPOX2
		Peroxidaseaktivität [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein}$]	
Kontrolle		5,2 ± 0,1	1,6 ± 0,1
		(% der Kontrolle)	
Kontrolle		100,0 ± 1,5	100,0 ± 4,9
KCN	1 mM	n.d.	n.d.
pCMB	50 μM	112,5 ± 7,1	111,1 ± 5,7
	200 μM	105,7 ± 2,3	102,2 ± 5,0
	1 mM	110,2 ± 4,3	106,9 ± 0,6
MnCl ₂	100 μM	105,3 ± 1,2 ^a	107,4 ± 3,4 ^a
	500 μM	102,3 ± 3,6 ^a	101,6 ± 2,4 ^a
IAA	10 μM	98,5 ± 0,5 ^a	83,2 ± 0,2 ^a

3.2.2 Substratspezifität der Peroxidaseaktivitäten

pmPOX1 setzte künstliche Elektronendonatoren mit der im Folgenden dargestellten Affinität um: *o*-Dianisidin > Guajacol > TMB >> ABTS (Tab. II). pmPOX2 zeigte im Gegensatz zu pmPOX1 eine höhere Affinität für TMB als für Guajacol. Beide pmPOX oxidierten natürliche Substrate wie phenolische Säuren und Alkohole in der folgenden Reihenfolge: Coniferylalkohol > Ferulasäure > 4-Hydroxycimtsäure. Hydroxycimtalkohole werden von apoplastischen Peroxidasen in der Ligninpolymerisierung verwendet, während

Hydroxycimtsäuren in der Suberinsynthese Verwendung finden (Kristensen et al., 2004; Hiraga et al., 2001). Eine Oxidation von IAA durch Peroxidasen wurde mehrfach nachgewiesen (Converso und Fernandez, 1995; Gazaryan und Lagrimini, 1996). Dieses Phytohormon wurde sowohl durch pmPOX1, als auch durch pmPOX2 umgesetzt (Tab. II). Die höchste Peroxidaseaktivität wurde mit beiden pmPOX in Gegenwart von Coniferylalkohol als Substrat erreicht.

Für pmPOX1 und pmPOX2 waren keine Ascorbatperoxidaseaktivitäten detektierbar. Dieses Ergebnis änderte sich auch in Gegenwart der doppelten Enzymmenge nicht. Die Fähigkeit zur Ascorbatoxidation könnte jedoch im Zuge der Reinigung der Proteine beeinträchtigt worden sein, da einige intrazelluläre Ascorbatperoxidasen ihre Enzymaktivität bei einer Extraktion in Abwesenheit von Ascorbat verlieren (Chen und Asada, 1989; Amako et al., 1994). Andere cytosolische Ascorbatperoxidasen werden durch den Verlust von Ascorbat nicht beeinflusst (Mittler und Zilinskas, 1991; Koshiba, 1993). Im Gegensatz zu den PM-gebundenen Enzymaktivitäten aus Maiswurzeln wurden in PM aus Wurzeln der Sojabohne (*Glycine max* L.) Ascorbatperoxidaseaktivitäten nachgewiesen (Vianello et al., 1997). Die PM-Vesikel aus Soja wurden ebenfalls in Abwesenheit von Ascorbat isoliert. Da jedoch ungewaschene Membranen verwendet wurden, kann eine Verunreinigung durch lösliche Ascorbatperoxidasen nicht ausgeschlossen werden.

Tab. II: Substratspezifitäten PM-gebundener Peroxidasen.

Die Enzymaktivitäten wurden in Gegenwart von 8,8 mM H₂O₂ und den angegebenen Substratkonzentrationen bei pH 5,0 gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von (*n*) Messungen. Die Oxidationsraten von Guajacol wurden in Tab. I gezeigt. a, pH 7,0. ABTS, 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenz-thiazolin-6-sulfonsäure), IAA, Indole-3-essigsäure; TMB, Tetramethylbenzidin

Substrat	Konz. [mM]	pmPOX1	pmPOX2
		Relative Aktivität (%)	
Guajacol	8,26	100,0 ± 1,5 (3)	100,0 ± 4,9 (3)
ABTS	0,36	1,8 ± 0,1 (3)	10,9 ± 0,3 (3)
o-Dianisidin	0,127	133,1 ± 6,1 (4)	206,9 ± 10,7 (3)
TMB	0,083	86,0 ± 4,4 (3)	179,6 ± 8,5 (3)
Ascorbat	0,5	n.d. (4) ^a	n.d. (4) ^a
Coniferylalkohol	0,1	225,9 ± 4,6 (3)	288,3 ± 9,2 (3)
Ferulasäure	0,1	71,1 ± 2,4 (3)	30,1 ± 1,5 (3)
4-Hydroxycimtsäure	0,1	9,5 ± 0,2 (3)	4,3 ± 0,1 (3)
IAA	0,2	60,3 ± 3,4 (4)	56,1 ± 4,3 (4)

Insgesamt betrachtet zeigten pmPOX1 und pmPOX2 mehr Übereinstimmungen mit apoplastischen als mit cytosolischen Peroxidasen.

3.3 Charakterisierung der AOS-produzierenden Enzymaktivitäten

3.3.1 pH-Optima der Peroxidase-Oxidaseaktivitäten

Die peroxidaseabhängige Produktion von AOS wurde als Sauerstoffabnahme in Gegenwart von NADH bestimmt. Sowohl in Gegenwart von pmPOX1 als auch in Gegenwart von pmPOX2 waren *in vitro* NADH-Oxidaseaktivitäten messbar. Ein maximaler Sauerstoffverbrauch wurde in Gegenwart von pmPOX1 bei $\text{pH } 3,91 \pm 0,03$ bzw. in Gegenwart von pmPOX2 bei $\text{pH } 4,05 \pm 0,02$ erreicht (Abb. 3.2). Diese Ergebnisse wurden wahrscheinlich durch die steigende Instabilität von NADH im sauren pH-Bereich mitverursacht. Im Gegensatz dazu lagen die pH-Optima der Guajacolperoxidaseaktivitäten von pmPOX1 und pmPOX2 zwischen pH 5,0 und 5,5 (Mika, 2001).

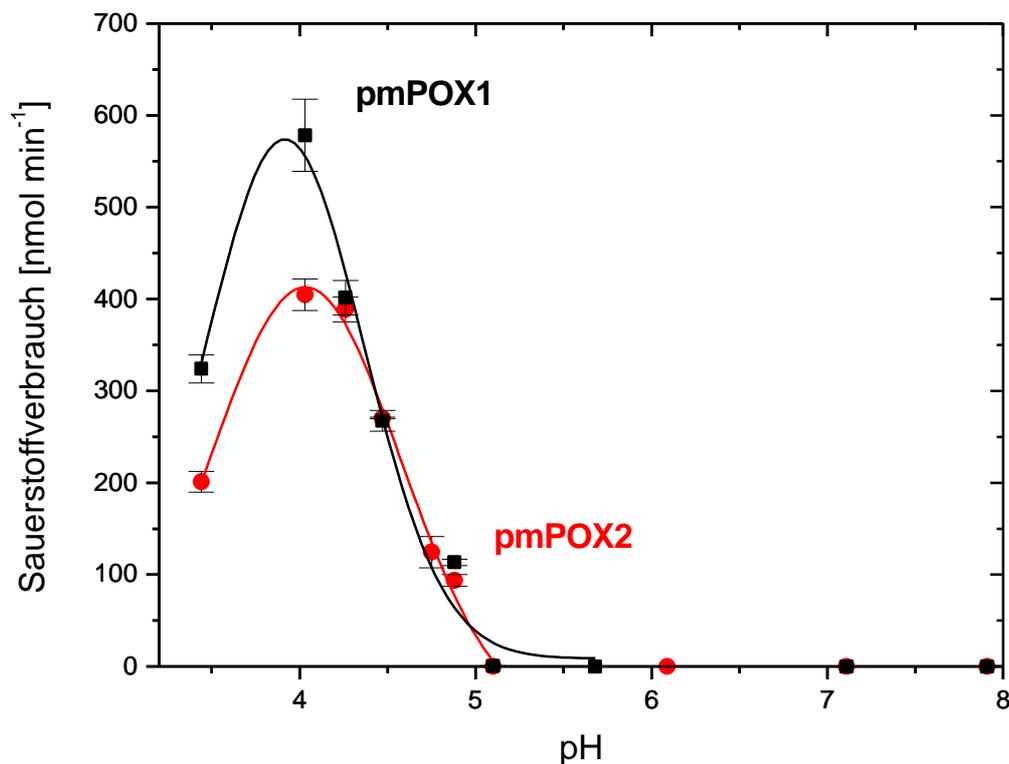


Abb. 3.2: pH-Abhängigkeit der NADH-Oxidaseaktivität partiell gereinigter pmPOX.

NADH-Oxidaseaktivitäten wurden als Sauerstoffverbrauch in Gegenwart von 2 mM NADH in 25 mM Natriumacetat- (pH 3,4 – 5,0), MES- (pH 5,5 - 6,5) oder HEPES-Puffer (pH 7,0 - 8,0) gemessen. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte von $n = 2$ unabhängigen Experimenten.

In Gegenwart von pmPOX2 wurde ein signifikanter Sauerstoffverbrauch bis zu einem pH-Wert von pH 5,0 ermittelt, während pmPOX1 NADH-Oxidaseaktivitäten bis zu pH 5,5 zeigte. Im Gegensatz zu den hohen Raten im sauren pH-Bereich, konnten keine NADH-Oxidaseaktivitäten bei pH 7,0 bzw. pH 8,0 detektiert werden. Ein solcher Kurvenverlauf ist typisch für die durch Peroxidasen der Klasse III vermittelte NADH-Oxidation (Avigliano et al., 1985). Im Vergleich dazu zeigten Messungen der NADH-Oxidaseaktivität von PM-Vesikeln aus Mais ein pH-Optimum von 5,5 (Hadži-Taškovic Šukalovic et al., 1998). Für eine PM-gebundene Peroxidaseaktivität aus Wurzeln von Weizen wurde mit NADH als Elektronendonator ein pH-Optimum von pH 5,0 ermittelt (Møller und Bérczi, 1986). Allerdings wurden in beiden Fällen Gesamtaktivitäten ungewaschener PM-Vesikel ermittelt. D.h. neben Verunreinigungen durch lösliche Enzyme anderer Kompartimente könnten auch NAD(P)H-Oxidaseaktivitäten anderer PM-gebundener Enzyme an den gemessenen Raten beteiligt gewesen sein.

3.3.2 Effektorsensitivitäten und Substratspezifität der Peroxidase-Oxidaseaktivitäten

Divalente Kationen wie Ca^{2+} oder Mn^{2+} hemmten die NADH-Oxidaseaktivität von pmPOX1 und pmPOX2 (Tab. III). Die Aktivitäten wurden durch Ca^{2+} nur schwach inhibiert, während Mn^{2+} die NADH-Oxidaseaktivitäten um bis zu 90 % verringerte.

Tab. III: NADH-Oxidaseaktivität von pmPOX1 und pmPOX2 nach der Kationenaustauschchromatographie.

Die Enzymaktivitäten wurden in 25 mM Natriumacetat, pH 4,25 anhand des Sauerstoffverbrauchs in Gegenwart von 2 mM NADH ermittelt. Die Proteine wurden drei Minuten mit dem jeweiligen Effektor vorinkubiert. Die Kontrollraten waren für pmPOX1 $31,7 \pm 2,2 \mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ und für pmPOX2 $25,4 \pm 0,1 \mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm \sigma$ von $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

Effektor	Konz. [mM]	pmPOX1 (% der Kontrolle)	pmPOX2 (% der Kontrolle)
Ca^{2+}	1	$101,8 \pm 2,5$	$101,0 \pm 5,9$
	2	$89,4 \pm 7,6$	$83,5 \pm 2,6$
	3	$88,2 \pm 4,5$	$80,7 \pm 4,9$
Mn^{2+}	0,1	$36,4 \pm 2,2$	$75,6 \pm 3,8$
	0,5	$11,1 \pm 0,8$	$42,9 \pm 1,2$
Ferulasäure	0,07	6559 ± 322	2560 ± 79
Propylgallat	0,5	$418,2 \pm 13,9$	$81,7 \pm 25,4$

In Gegenwart von phenolischen Substanzen wie Ferulasäure oder Propylgallat wurde der Sauerstoffverbrauch beider pmPOX hochgradig stimuliert, nur auf pmPOX2 wirkte Propylgallat hemmend.

Nach einer zusätzlichen Gelfiltration der Proteine zeigten die PM-gebundenen Peroxidasen ebenfalls hohe NAD(P)H-Oxidaseaktivitäten (Tab. IV). Im Gegensatz zu pmPOX1 waren die Affinitäten von pmPOX2a und pmPOX2b bei niedrigen Substratkonzentrationen für NADPH höher als für NADH.

Tab. IV: NAD(P)H-Oxidaseaktivitäten partiell gereinigter pmPOXs.

pmPOXs wurden durch Kationenaustauschchromatographie in Kombination mit zusätzlichen Gelfiltrationen gereinigt. Die Enzymaktivitäten wurden bei pH 4,25 in Gegenwart der angegebenen Substratkonzentrationen gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm \sigma$ ($n = 3$).

Substrat	Konz. [mM]	pmPOX1	pmPOX2a	pmPOX2b
		[$\mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Protein}$]		
NADH	0,1	0,09 \pm 0,01	0,62 \pm 0,24	4,04 \pm 0,56
	2	9,85 \pm 0,67	5,90 \pm 1,19	24,95 \pm 2,10
NADPH	0,1	0,08 \pm 0,01	1,18 \pm 0,23	6,41 \pm 0,33
	2	5,94 \pm 0,05	2,32 \pm 0,13	15,78 \pm 0,63

Die Größenordnung der AOS-Produktion durch die partiell gereinigten PM-gebundenen Peroxidasen war im Vergleich mit den entsprechenden Aktivitäten gereinigter löslicher extrazellulärer Peroxidasen zwar gering (Hadži-Taškovic Šukalovic et al., 1998; Brooks, 1986; Avigliano et al., 1985), im Vergleich mit anderen NAD(P)H umsetzenden Enzymen der pflanzlichen PM jedoch außerordentlich hoch (van Gestelen et al., 1997). Im Gegensatz zu den von pmPOX auf einer Seite der Membran erzeugten *cis*-Aktivitäten, gibt es in Maiswurzeln auch transmembrane Elektronentransportvorgänge, welche zur Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies in der Lage sind (Menckhoff und Lüthje, 2004). Versiegelte und mit NADPH beladene PM-Vesikel zeigen einen cyanid-insensitiven transmembranen Elektronentransport, welcher jedoch im Unterschied zum oxidativen Burst des humanen gp91^{phox} *in vitro* nur geringe Mengen an AOS produzieren kann (765 pmol min⁻¹ mg⁻¹ Protein gegenüber 365 nmol min⁻¹ mg⁻¹ Protein; Menckhoff und Lüthje, 2004). Diese *trans*-Aktivität spielt daher möglicherweise eher eine Rolle in der Signaltransduktion durch AOS als im oxidativen Burst.

Die für die partiell gereinigten pmPOX mit NADH in Gegenwart von Ferulasäure ermittelten Raten (Tab. III) waren um den Faktor 1750 höher als die für ungewaschene PM aus Mais gemessenen Gesamtaktivitäten in Gegenwart von phenolischen Substanzen (Hadži-Taškovic Šukalovic et al., 1998). Ein ähnliches Verhältnis zeigte sich im Vergleich mit der

Gesamtaktivität gewaschener PM aus Blütenständen des Blumenkohls (*Brassica oleracea* L.) mit NADH als Substrat und in Abwesenheit phenolischer Substanzen (Askerlund et al., 1987). Eine Hemmung durch Mn^{2+} wurde auch für NAD(P)H-Oxidaseaktivitäten ungewaschener PM-Vesikel aus Blumenkohlblütenständen und Sojabohnenhypokotylen beschrieben (Zancani et al., 1995; Askerlund et al., 1987; Penel und Castillo, 1991). Wie bereits im Zusammenhang mit den H_2O_2 -entgiftenden Enzymaktivitäten dargestellt kann Mn^{2+} an der Regulation von Peroxidasen beteiligt sein (Greppin et al., 1999; van Huystee et al., 1996).

Wie erwartet wurden die NAD(P)H-Oxidaseaktivitäten von allen drei PM-gebundenen Peroxidaseaktivitäten durch Zugabe von SOD vollkommen gehemmt (Tab. V). Die Differenz der NADH-Oxidation in Abwesenheit bzw. Gegenwart von SOD gilt als Maß für entstehende Superoxidanionen (Askerlund et al., 1987).

Tab. V: NADH-Oxidaseaktivitäten von pmPOX in Gegenwart verschiedener Effektoren.

Der Sauerstoffverbrauch in Gegenwart der PM-gebundenen Peroxidasen nach einer Reinigung durch Kationenaustauschchromatographie und zusätzliche Gelfiltration wurde bei pH 4,25 gemessen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mM NADH gestartet. Die Kontrollraten sind in Tab. IV dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von ($n = 3$) Experimenten. FAD, Flavinadenindinukleotid; FMN, Flavinmononukleotid; SOD, Superoxiddismutase

Effektor	Konz.	pmPOX1	pmPOX2a	pmPOX2b
		(% der Kontrolle)		
Kontrolle		100,0 ± 9,9	100,0 ± 5,8	100,0 ± 8,4
FMN	1 µM	133,1 ± 8,8	1155,5 ± 38,7	481,1 ± 63,9
	10 µM	340,9 ± 18,4	480,4 ± 51,7	129,0 ± 18,1
FAD	1 µM	186,3 ± 10,8	277,4 ± 14,0	283,7 ± 3,4
	10 µM	285,1 ± 11,5	316,4 ± 26,6	165,4 ± 14,7
Azid	1 mM	58,7 ± 4,8	83,5 ± 13,6	87,0 ± 5,0
Catalase	50 U ml ⁻¹	53,3 ± 3,7	90,7 ± 14,3	84,1 ± 19,7
SOD	50 U ml ⁻¹	0	0	0

Während der klassische Peroxidaseinhibitor Azid die Guajacolperoxiaseaktivitäten der pmPOX fast vollständig zum Erliegen brachte (Mika, 2001), wurden deren NADH-Oxidaseaktivitäten um maximal 41 % gehemmt (Tab. V). In Gegenwart von Catalase wurde die Aktivität von pmPOX1, pmPOX2a und pmPOX2b um 9 – 47 % gehemmt. Beide Effektoren zeigten eine ähnliche Größenordnung der Effekte bei NADH-Oxidaseaktivitäten von PM aus Blumenkohl (Askerlund et al., 1987), während die Gesamtaktivität von ungewaschenen PM aus Soja bei einem pH-Wert von 5,5 durch Azid wesentlich stärker

gehemmt wurde (Vianello et al., 1997). Bei Hämperoxidasen treten in der Regel stärkere Hemmungen in Gegenwart von Azid und Catalase auf. Möglicherweise ist ein nicht unerheblicher Teil der Rate auf die autokatalytische Zerfallsreaktion des NADH zurückzuführen, so dass die Inhibition bei Messungen in einem weniger sauren pH-Bereich prozentual stärker ausgefallen wäre.

Eine intensive Stimulation von NADH-Oxidaseaktivitäten durch phenolische Säuren, wie Ferulasäure, wurde für Peroxidasen beschrieben (Mäder und Füssli, 1982) und auch an PM aus Blumenkohlinfloreszenzen beobachtet (Askerlund, 1987). Phenolische Substanzen steigern die Oxidation von NAD(P)H durch den Abbau der inaktiven Form der Peroxidasen (PO-ox-III), welche als Nebenprodukt der Reaktion entsteht (Penel und Castillo, 1991).

Die Charakteristika der AOS-Produktion durch PM-gebundene Peroxidasen zeigten auch Ähnlichkeiten zur NADPH-Oxidase der humanen Phagozyten: Flavine wie FAD und FMN führten zu einer starken Stimulierung der AOS-Produktion der drei pmPOX (Tab. V).

Die NADH-Oxidaseaktivität von pmPOX2a stieg in Gegenwart von 1 μM FMN auf mehr als 1100 % an. Möglicherweise handelt es sich daher bei diesem Enzym *in vivo* um ein Flavoprotein. Eine Bestätigung dieser Annahme sollte jedoch durch eine Sequenzanalyse erfolgen. Im humanen NADPH-Oxidasekomplex ist ein FAD am transmembranen Elektronentransport beteiligt (Henderson und Chappell, 1996).

Die humane NADPH-Oxidase wird durch DPI inhibiert (Henderson und Chappell, 1996). Ein häufig zitiertes Argument für die Existenz eines Rboh in der pflanzlichen PM, ist daher eine Hemmung der AOS-Produktion durch DPI. Andererseits ist bekannt, dass dieser Inhibitor auch mit anderen Flavoenzymen sowie mit Peroxidasen reagiert (Baker et al., 1998; Frahy und Schopfer, 1998; Trost et al., 1997). Interessanterweise wurden die NAD(P)H-Oxidaseaktivitäten aller drei PM-gebundenen Peroxidasen bereits in Gegenwart geringer Konzentrationen dieses Effektors (20–100 μM) vollständig gehemmt (Abb. 3.3). Eine 50 %ige Inhibition konnte für pmPOX1 bei einer Konzentration von 10 μM , für pmPOX2a bei 26 μM und für pmPOX2b bei 49 μM DPI in Gegenwart von 1 μM FMN festgestellt werden. DPI scheint hierbei nicht auf den enzymatisch kontrollierten $\text{O}_2^{\bullet-}$ -bildenden Schritt pflanzlicher Peroxidasen einzuwirken, sondern möglicherweise auf die nicht-enzymatischen bimolekularen Reaktionen (Ros Barceló und Ferrer, 1999).

Die pH-Optima der NAD(P)H-Oxidaseaktivitäten der pmPOX im sauren Bereich stimmten nicht mit der für Gartenbohne und andere Pflanzen gefundenen Alkalisierung während des oxidativen Bursts überein (Bolwell et al., 2002; Otte et al., 2001; Boller, 1995). Die Verwendung von NAD(P)H als Substrat ist möglicherweise nur bei einer Lokalisierung der pmPOX auf der Innenseite der Membran möglich, da die Existenz von NAD(P)H im

Apoplasten bisher nicht nachgewiesen wurde. An Zellkulturen der Gartenbohne wurde eine apoplastische lösliche Peroxidase untersucht, deren pH-Optimum für die Bildung von AOS in Gegenwart apoplastischer Flüssigkeit elizitorbehandelter Zellen im neutralen Bereich liegt und die *in vitro* Cystein zur Produktion von AOS als Elektronendonator verwenden kann (Bolwell und Wojtaszek 1997, Bolwell et al., 1995).

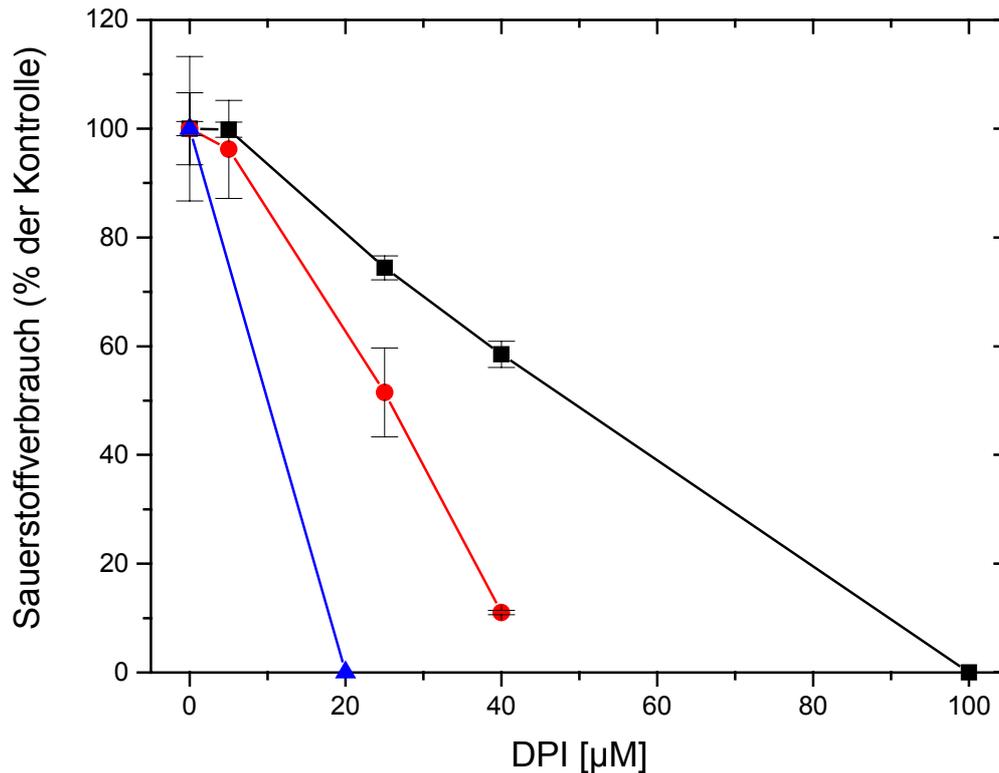


Abb. 3.3: Effekt von Diphenyljodonium auf die NAD(P)H-Oxidaseaktivitäten von pmPOX.

Die Enzymaktivität der partiell gereinigten Peroxidasen wurde als Sauerstoffverbrauch in Gegenwart von 1 µM FMN und 2 mM NADPH (pmPOX2a, ■) oder NADH (pmPOX1, ▲, pmPOX2b, ●) detektiert wie im Material und Methodenteil beschrieben.

Im Gegensatz zur AOS-Produktion der pmPOX waren die NADPH-Oxidaseaktivitäten ungewaschener PM aus Tomate (*Lycopersicon esculentum* MILL.) und Tabak (*Nicotiana tabacum* L.) durch Ca^{2+} stimulierbar (Sagi und Fluhr, 2001). Da für eine pflanzliche NADPH-Oxidase, eine Regulation durch Ca^{2+} postuliert wurde (Keller et al., 1998) und die Enzymaktivitäten in Tomate und Tabak unter anderem durch DPI gehemmt wurden, wurden diese einem Rboh zugeschrieben und als Indiz für eine Lokalisierung des Enzyms in der PM dieser Pflanzen gewertet. Die Wirkung von Peroxidaseinhibitoren wie Azid oder KCN auf die Aktivitäten wurde jedoch nicht untersucht.

Da eine Öffnung von Calciumkanälen in der PM essentiell für die Initiierung der AOS-Produktion in Tabak zu sein scheint (Olmos et al., 2003, Chandra und Low, 1997), könnte es auch in Mais im Rahmen einer entsprechenden Signaltransduktion zu einem Absinken der Calciumkonzentration im Apoplasten und einem Anstieg der Konzentration im Cytosol kommen. Da die AOS-Produktion der pmPOX *in vitro* in Abwesenheit von Ca^{2+} höher ist, wäre eine Beteiligung dieser Enzyme am oxidativen Burst im Hinblick auf eine Regulation durch Ca^{2+} nur denkbar, wenn die Regulation der Peroxidasen auf der Außenseite der Membran erfolgen würde. Ein Cadmiuminduzierter oxidativer Burst in Tabakzellkulturen wurde in Gegenwart von 5 mM Ca^{2+} im Medium vollständig unterdrückt, während eine Ca^{2+} -Konzentration von 0,5 mM keine Wirkung auf den Ablauf der AOS-Produktion zeigte (Olmos et al., 2003)

3.3.3 Untersuchungen zur Existenz eines putativen gp91^{phox}-Homologs (ZmRboh1) in der PM von *Zea mays* L.

Im Zusammenhang mit den ermittelten NAD(P)H-Oxidaseaktivitäten der PM-gebundenen Peroxidasen (siehe Abschnitt 3.3.2) stellte sich die Frage, ob diese auf der Existenz von Dualoxidasen basieren könnten, d.h. humane NADPH-Oxidasen, welche über Domänen mit Peroxidaseaktivität verfügen. In Datenbanken konnten bisher jedoch weder im Mais- noch im Arabidopsisgenom putative Sequenzen pflanzlicher Dualoxidasen gefunden werden (September 2005). Stattdessen wurde durch Sequenzvergleiche von *Expressed Sequence Tags* (ESTs) mit der Nukleinsäuresequenz des humanen gp91^{phox}, der zentralen Untereinheit der humanen NADPH-Oxidase aus Neutrophilen, eine putative homologe cDNA dieses Enzyms (*ZmRboh1*; *Zea mays respiratory burst oxidase homolog 1*) in Mais identifiziert (L. Henderson und S. Lühje, *pers. Mitteilung*). Die Aminosäuresequenz des aus *ZmRboh1* abgeleiteten Proteins wies eine Ähnlichkeit von 25 % zu gp91^{phox}, 47 % zu RbohF aus Arabidopsis und 72 % zu RbohA aus Reis (*Oryza sativa* L.) auf. Da das abgeleitete Protein jedoch N-terminal unvollständig zu sein scheint, ließ sich aus der Sequenz keine putative Lokalisierung vorhersagen.

Aufgrund der besonders deutlichen Übereinstimmung der C-terminalen Region des aus *ZmRboh1* abgeleiteten Proteins mit dem C-Terminus von gp91^{phox} wurden Experimente mit polyklonalen Antikörpern gegen diese Region durchgeführt, um zu klären, ob *ZmRboh1* als ein weiteres möglicherweise AOS-produzierendes Protein an der PM von Mais lokalisiert ist. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abb. 3.4 dargestellt. Anhand der Antikörper gegen die C-terminale Region des gp91^{phox} wurde keine der PM-gebundenen Peroxidasen detektiert. Stattdessen wurde in PM-Vesikeln aus Maiswurzeln ein einzelnes Protein mit einer molekularen Masse von 70 kDa markiert. Dieses wird im Folgenden als Antikörper-

detektierbares Protein bezeichnet. Polyklonale Antikörper (H-60) gegen den dritten externen Loop des gp91^{phox}, detektierten keinerlei Protein. Dieses Ergebnis war jedoch nicht überraschend, da die entsprechende Region des ZmRboh1 nur sehr geringe Ähnlichkeit mit dem humanen Protein aufweist. Alle Antikörper reagierten mit gp91^{phox} in humanen Phagozytenmembranen, welche als Positivkontrolle verwendet wurden.

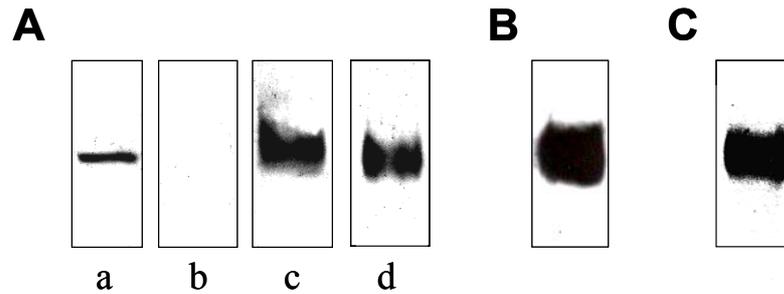


Abb. 3.4: *Western Blots des Antikörper-detektierbaren Proteins.*

Je 50 µg Protein aus verschiedenen Membranfraktionen wurden in einer SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und einer Immunodetektion unterzogen (**A**). Anhand von polyklonalen Antikörpern gegen den C-Terminus des humanen gp91^{phox} wurde in PM aus Maiswurzeln und in Solubilisaten gewaschener PM ein einzelnes Protein detektiert, welches eine molekulare Masse von 70 kDa aufwies. Dargestellt sind Ergebnisse aus $n = 2 - 3$ unabhängigen Experimenten. Positivkontrolle (a; humane Phagozytenmembran); Mikrosomen (b), PM (c) und CHAPS/Aminocaproinsäure-Solubilisat aus PM (d) von Maiswurzeln. In einer Wiederholung der Experimente mit einer modifizierten nicht-reduzierenden SDS-PAGE (**B**) wurde die gleiche 70 kDa-Bande detektiert. Daher handelt es sich offenbar um ein monomeres Protein. Weiterhin konnte die Glykosylierung des enthaltenen Proteins anhand der Biotin/Streptavidin-Methode (Details siehe Material und Methodenteil) nachgewiesen werden (**C**).

Das Antikörper-detektierbare Protein konnte zusammen mit den PM-gebundenen Peroxidaseaktivitäten aus den Membranen solubilisiert und durch die für pmPOX etablierten Reinigungsschritte akkumuliert werden. Es eluierte in der Kationenaustauschchromatographie bei einer KCl-Konzentration von 240 mM, d.h. zwischen pmPOX1 und pmPOX2 (Abb. 3.5 A). Die weitere Reinigung des Proteins durch eine zusätzliche Gelfiltration trennte das Protein vollständig von pmPOX1 und pmPOX2b ab, während eine Überschneidung des Peaks mit pmPOX2a zu verzeichnen war (Abb. 3.5 B). Vergleiche von Ergebnissen aus SDS- und modifizierter SDS-PAGE zeigten, dass es sich um ein Monomer handelt (Abb. 3.4). Eine Glykosylierung des Proteins wurde durch die Breite und Diffusität der Bande im Gel bereits angedeutet und konnte durch die Biotin-Streptavidin-Methode nachgewiesen werden.

Eine AOS-Produktion, ermittelt als NAD(P)H-abhängige XTT-Reduktion im alkalischen pH-Bereich (pH 7,0 – 8,0), war in den Peakfraktionen der Gelfiltration weder in Abwesenheit noch in Gegenwart von Calcium detektierbar. Wie bereits erwähnt, wurde eine Stimulierung

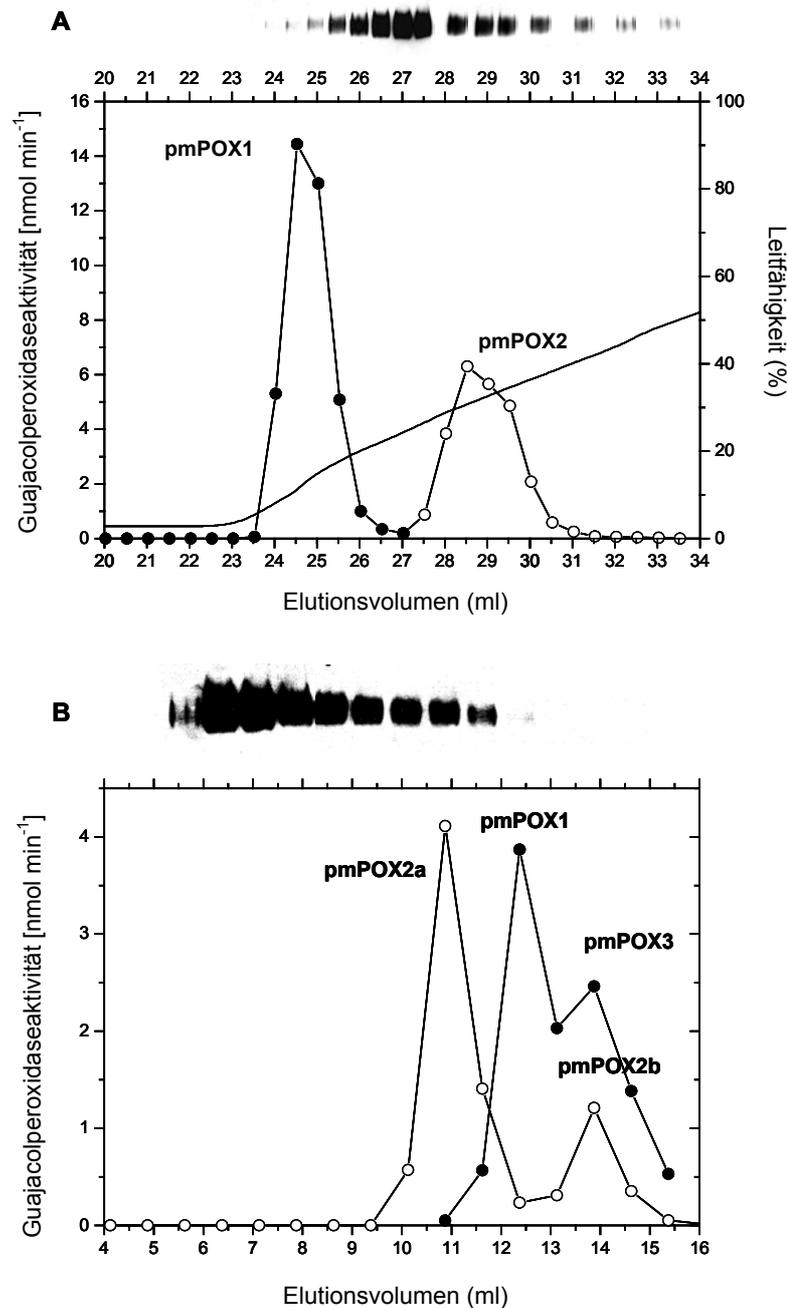


Abb. 3.5: Elutionsprofile der pmPOX im Vergleich zum Antikörper-detektierbaren Protein.

A. Durch Kationenaustauschchromatographie wurden pmPOX1 und pmPOX2 voneinander getrennt. Es kam in beiden Fällen zu einer Überlagerung mit dem Antikörper-detektierbaren Protein. **B.** Durch Gelfiltrationen der jeweiligen Peakfraktionen aus den Kationenaustauschchromatographien wurden die pmPOX weiter aufgespalten, während das Antikörper-detektierbare Protein mit Ausnahme von pmPOX2a von den Peroxidasen abgetrennt werden konnte.

der NADPH-Oxidaseaktivität der pflanzlichen Rboh durch Ca^{2+} postuliert (Sagi und Fluhr, 2001; Keller et al., 1998). Da die humane NADPH-Oxidase aus Neutrophilen erst in Gegenwart cytoplasmatischer Komponenten die volle Aktivität zeigt, könnte das Fehlen einer Aktivität in den partiell gereinigten Proteinfractionen auf den Verlust solcher Komponenten zurückzuführen sein. Andererseits konnten homologe Gene zu einigen dieser Komponenten in Pflanzen bisher nicht identifiziert werden. Ein Verlust der postulierten nichtkovalent gebundenen Hämgruppen aufgrund der sauren pH-Bedingungen während der Solubilisierung und Reinigung kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Tab. VI: Massenspektrometrische Analyse des Antikörper-detektierbaren Proteins.

Peakfraktionen des Antikörper-detektierbaren Proteins aus Gelfiltrationen wurden in einer modifizierten SDS-PAGE aufgetrennt. Die detektierte Proteinbande wurde aus dem Gel ausgeschnitten, durch Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) in einem QTOF-2-Instrument analysiert und anhand des Mascot MS/MS-Ionen-Suchalgorithmusses evaluiert. Passende ESTs wurden allen verfügbaren Datenbanken entnommen, durch *in silico Cloning* zu überlappenden Contigs zusammengefügt und mit Sequenzen der *TIGR Tentative Consensus*-Datenbank verglichen. Die dargestellten EST-Contigs aus *Z. mays* enthalten alle ESTs, welche zu den identifizierten Peptiden passen (Februar 2005). (a) TC253916 aus Mais ist durch eine korrespondierende genomische DNA (ZmGSStuc04-27-04.899.1; Plant GDB) im Vergleich mit ähnlichen Aminosäuresequenzen und EST-Contigs anderer Spezies verlängerbar (Q651P3 aus Reis, LYM2_ARATH aus Arabidopsis und TC144557 aus Tomate); (b) TC252026 aus Mais ist durch eine korrespondierende genomische DNA (MAGI_75305; MAGI) verlängerbar.

Nr.	Tryptische Peptide identifiziert durch ESI-MS/MS	Passende Sequenzen (<i>Z. mays</i>)	Ähnliche Proteine (<i>O. sativa</i>)	Bezeichnung
1	FYLSMLGLTSLGK	TC249113	Q6AUG3	Putatives fascilin-ähnliches Protein
2	ALLAANGLPLSTPPTAPAPVPLR	TC253916 ^a	Q651P3	Protein mit einer putativen peptidoglykan-bindenden LysM-Domäne
3	SLLAGQVLDVPLR			
4	ASTPLDFPATDLAADAAGGK	TC252026 ^b	Q84QW4	Putativ auxin-induziertes Protein mit einer DUF568-Domäne
5	QIVIGDTVVFITYNK	TC258129	Q84M48	Putatives Phytocyanin

In massenspektrometrischen Analysen des Antikörper-detektierbaren Proteins wurden mehrere Peptide identifiziert (Tab. VI). Korrespondierende ESTs konnten aus Datenbanken extrahiert und zu putativen cDNAs zusammengesetzt werden, welche Ähnlichkeiten zu verschiedenen Proteinen zeigten. Das Antikörper-detektierbare Protein scheint daher nicht bis zur Homogenität gereinigt worden zu sein. In Vergleichen der identifizierten Peptidsequenzen und allen korrespondierenden ESTs mit der Aminosäuresequenz von ZmRboh1 und anderen Rbohs wurden keine signifikanten Sequenzübereinstimmungen

ermittelt. gp91^{phox} enthält sechs transmembrane Domänen. Da entsprechende Vorhersageprogramme auch in der aus *ZmRboh1* abgeleiteten Aminosäuresequenz sechs hydrophobe Domänen vorhersagten, könnte das Protein so hydrophob sein, dass möglicherweise keines seiner Peptide in der massenspektrometrischen Analyse detektiert wurde.

Eine Region des EST-Contigs TC258129 zeigte eine schwache Ähnlichkeit zum C-Terminus des gp91^{phox}. Daher könnte dieses Protein von den polyklonalen Antikörpern detektiert worden sein. Aufgrund der massenspektrometrischen Analyse wurde in der Bande unter anderem ein Protein identifiziert, welches eine putative peptidoglycanbindende LysM-Domäne enthält (TC253916). Dieses Protein enthielt zwei der ermittelten Peptide. Es zeigte eine hohe Ähnlichkeit zu dem Glycoprotein LYM2_ARATH (O23006) aus Arabidopsis. LYM2_ARATH ist Teil des sekretorischen Stoffwechselweges und liegt über einen GPI-Anker an die Membran gebunden vor (Borner et al., 2003).

Die molekulare Masse des aus *ZmRboh1* abgeleiteten Proteins beträgt etwa 70 kDa. Aufgrund der N-terminal fehlenden Aminosäurereste dürfte der tatsächliche Wert jedoch wesentlich größer sein. Die aus der Aminosäuresequenz des RbohA aus Reis errechnete molekulare Masse beträgt 97 kDa (Groom et al., 1996). Da die breite und diffuse Form der Bande sowohl in der Detektion durch die Antikörper gegen gp91^{phox} als auch beim Nachweis der Glykosylierung identisch war (Abb. 3.4), scheint die Glykosylierung Teil des Antikörperdetektierbaren Proteins und nicht eines der zusätzlich enthaltenen Proteine zu sein. Daher kann die molekulare Masse des nichtglykosylierten Apoproteins weniger als 70 kDa betragen. Beispielsweise beträgt die aus der Sequenz des phagozytären gp91^{phox} ableitbare theoretische molekulare Masse 57 kDa, das glykosylierte Protein erscheint jedoch in SDS-PAGE-Gelen bei etwa 70 kDa (Abb. 3.4). Aus den genannten Gründen ist eine Übereinstimmung des Antikörperdetektierbaren Proteins mit *ZmRboh1* unwahrscheinlich. Da durch die gegen den C-Terminus des gp91^{phox} gerichteten Antikörper in PM aus Mais kein weiteres Protein detektiert wurde, ist *ZmRboh1* möglicherweise in einem anderen Kompartiment der Maiszelle lokalisiert. Sowohl die hier gezeigten Ergebnisse als auch die von anderen Autoren diskutierten Beobachtungen (Lüthje et al., 2005; 2000; Murphy et al., 1998) sprechen gegen eine Lokalisation dieses Proteins in der PM.

Fazit

Durch polyklonale Antikörper gegen den C-Terminus von gp91^{phox} wurde in PM aus Maiswurzeln ein monomeres, glykosyliertes Protein mit einer molekularen Masse von 70 kDa detektiert. Dieses Protein wurde partiell gereinigt und konnte von den pmPOX durch Gelfiltration getrennt werden. Durch ESI-MS/MS-Analysen der Proteinbande wurden jedoch keine Peptide mit Ähnlichkeit zu putativen Rbohs identifiziert. In Peakfraktionen des Proteins

aus Gelfiltrationen wurde keine AOS-Produktion detektiert. Daher scheint dieses Protein nicht an der in dieser Untersuchung beobachteten Superoxidradikalproduktion beteiligt zu sein.

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten partiell gereinigten pmPOX in der Lage sind, *in vitro* große Mengen an AOS zu produzieren. Die ermittelten Charakteristika der AOS-Produktion scheinen jedoch anders zu sein, als die bisher für die Beteiligung von Peroxidasen am oxidativen Burst postulierten. Daher scheint eine Beteiligung dieser Proteine am oxidativen Burst *in vivo* eher unwahrscheinlich zu sein (Mika et al., 2004). Für Mais ist jedoch nur relativ wenig über die AOS-Produktion in Gegenwart der verschiedensten abiotischen und biotischen Stressfaktoren, des oxidativen Bursts bei Pflanzen-Pathogen-Interaktionen oder der Beteiligung von AOS an der Signaltransduktion bekannt.

Aufgrund der Gesamtheit der Ergebnisse müssen jedoch einige Veröffentlichungen, in denen die AOS-Produktion an pflanzlichen PM-Vesikeln durch DPI auf ein NADPH-Oxidasehomologon zurückgeführt wurden (z.B. Jiang und Zhang, 2003; Sagi und Fluhr, 2001; Keller et al., 1998), neu überdacht werden. Da in diesen Arbeiten keine oder zu geringe Konzentrationen an Peroxidaseinhibitoren verwendet wurden, könnten PM-gebundene Peroxidasen teilweise für die Raten mitverantwortlich gewesen sein. Darüber hinaus zeigten die unterschiedlichen Charakteristika der NAD(P)H-Oxidaseaktivitäten der drei pmPOX, dass es sich um mindestens drei verschiedene PM-gebundene Peroxidasen handelt.

3.4 Isoelektrische Punkte

Isoelektrische Fokussierungen der PM-gebundenen Peroxidasen wurden unter den unterschiedlichsten Bedingungen, d.h. in Gegenwart oder Abwesenheit von Harnstoff und / oder Detergenz, durchgeführt, um eine Auftrennung der eher hydrophoben Membranproteine zu optimieren und eine Detektierung durch Hämefärbung zu ermöglichen. Es zeigte sich, dass pmPOX1 und pmPOX2b anionische Peroxidasen sind. Für pmPOX1 konnte ein isoelektrischer Punkt von 5,2 ermittelt werden ($n = 3$). In pmPOX2b-haltigen Fraktionen konnten wie in der modifizierten SDS-PAGE drei Banden identifiziert werden, welche in einem pH-Bereich zwischen 5,5 und 7,0 lagen. Eine Isoelektrische Fokussierung von pmPOX2a detektierte eine anionische (IEP = 4,9) und eine kationische Proteinbande (IEP = 7,9). Da jedoch sowohl für pmPOX2b als auch für pmPOX2a keine Unterschiede in der Intensität der Banden feststellbar waren, konnte keine der Banden den Peroxidasen eindeutig zugeordnet werden. Pflanzliche Peroxidasen zeigen das gesamte Spektrum an

möglichen isoelektrischen Punkten. Bisher in Mais identifizierte Peroxidasen wiesen Werte von pH 4 bis >10 auf (Dowd and Johnson, 2005; Gray und Montgomery, 2003; De Souza und MacAdam, 2001; Prasad et al., 1995; Kim et al., 1988). Ludwig-Müller et al. (1990) solubilisierten Peroxidaseaktivitäten aus PM von *Brassica campestris* L. mit CHAPS und führten Isoelektrische Fokussierungen mit Aktivitätsfärbungen durch. Es wurden fünf verschiedene Banden mit isoelektrischen Punkten von 4,5; 7,8; 8,1 sowie 8,7 identifiziert. Da die isolierten Membranvesikel jedoch vor der Solubilisierung nicht gewaschen wurden, waren die PM wahrscheinlich durch lösliche Proteine verunreinigt.

3.5 Identifizierung einer vierten pmPOX

Zur Verbesserung der Trennleistung wurde die im Labor bereits etablierte Methode zur Reinigung der Peroxidasen (Mika, 2001) im Anschluss an die biochemische Charakterisierung der prosthetischen Gruppen und der Enzymaktivitäten modifiziert. Statt einer Uno-S-Säule wurde für die Kationenaustauschchromatographie eine Mono-S-Säule verwendet und die Laufbedingungen geringfügig geändert (Details siehe Material und Methoden). Die Charakteristika der Elution änderten sich nicht. Die solubilierte Peroxidaseaktivität wurde in der Kationenaustauschchromatographie in zwei Peaks aufgetrennt und eluierte bei den gleichen KCl-Konzentrationen. Auch die Relationen der Peaks blieben identisch. Es traten jedoch zwei Veränderungen auf: Erstens wurde durch die Verdoppelung des Elutionsvolumens eine deutlichere Trennung der beiden Peroxidaseaktivitäten erreicht und weitere unerwünschte Proteine abgetrennt. Zweitens wurde nicht nur pmPOX2 sondern auch pmPOX1 in einer anschließenden Gelfiltration in weitere Aktivitätspeaks aufgespalten (Abb. 3.5). Die zusätzlich gereinigte vierte Peroxidaseaktivität scheint von der Uno-S-Säule nicht gebunden worden zu sein und war offenbar Teil der im Durchfluss der Kationenaustauschchromatographie ermittelten geringen Guajacolperoxidaseaktivität (Mika, 2001). Genauer biochemisch charakterisiert wurden jedoch im Wesentlichen pmPOX1, pmPOX2a und pmPOX2b. Um Missverständnissen vorzubeugen wurde die neu identifizierte Peroxidaseaktivität als pmPOX3 bezeichnet. pmPOX3 eluiert in Gelfiltrationen nach dem gleichen Elutionsvolumen wie pmPOX2b. In pmPOX3-angereicherten Fraktionen der Gelfiltration wurden in Gegenwart von Guajacol Oxidationsraten von $54,7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein gemessen, während pmPOX1, pmPOX2a und pmPOX2b Guajacolperoxidaseaktivitäten von 61,9; 26,5 und $6,9 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein zeigten.

3.6 Relative molekulare Massen

Durch Experimente mit einer modifizierten SDS-PAGE und im Anschluss daran durchgeführter Zymogramme ist es gelungen, pmPOX1, pmPOX2a und pmPOX2b im Gel zu identifizieren und deren scheinbare molekulare Massen zu ermitteln. In pmPOX1-haltigen Fraktionen wurde nach der Gelfiltration durch Anfärbung von Hämgruppen eine einzelne Bande mit einer molekularen Masse von 98 kDa detektiert (Abb. 3.6). Für pmPOX2b war nach der Gelfiltration eine starke Intensivierung einer 55 kDa-Bande zu beobachten, während in pmPOX2a-haltigen Fraktionen neben zwei dünnen, sehr schwachen Banden mit molekularen Massen von 184 und >200 kDa eine breite Bande von 138 kDa auftrat. Die Intensität dieser 138 kDa-Bande nahm ebenfalls nach der Gelfiltration stark zu. In pmPOX3-haltigen Fraktionen waren im Anschluss an die Gelfiltration zwei intensiv gefärbte Banden mit molekularen Massen von 57 und 64 kDa zu beobachten.

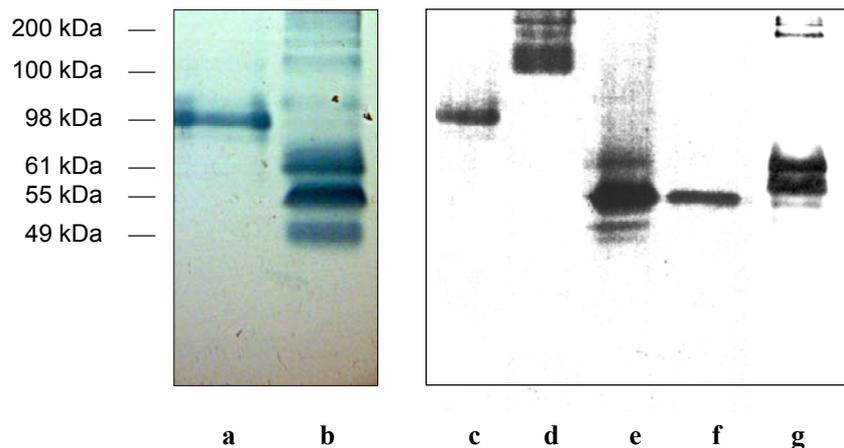


Abb. 3.6: Häm-färbung von pmPOX-Fractionen nach modifizierter SDS-PAGE.

Die Elektrophorese wurde mit verringerter SDS-Konzentration (0,1 % (w/v) SDS) in allen Lösungen und in allen Gelen sowie ohne Dithiothreitol oder Mercaptoethanol durchgeführt. Dementsprechend wurden Oligomere nicht in ihre Untereinheiten getrennt. Proteine mit Hämgruppen wurden aufgrund ihrer Reaktion mit den Peroxidasesubstraten Tetramethylbenzidin und H_2O_2 visualisiert wie im Material und Methodenteil beschrieben. pmPOX1 (a) und pmPOX2 (b) nach Kationenaustausch-Chromatographie (links), pmPOX1 (c), pmPOX2a (d), pmPOX2b (e), pmPOX3 (g) nach zusätzlicher Gelfiltration (rechts). (f) zeigt zusätzlich pmPOX2b nach Behandlung mit 25 mM Dithiothreitol. Balken kennzeichnen die korrespondierenden molekularen Massen.

Aufgrund der Modifizierungen der SDS-PAGE handelt es sich um molekulare Massen nichtreduzierter Enzyme (siehe Material und Methoden), d.h. möglicherweise vorhandene

Oligomere blieben erhalten. Die unterschiedlichen Massen verdeutlichten die Existenz von mindestens vier verschiedenen PM-gebundenen Peroxidasen.

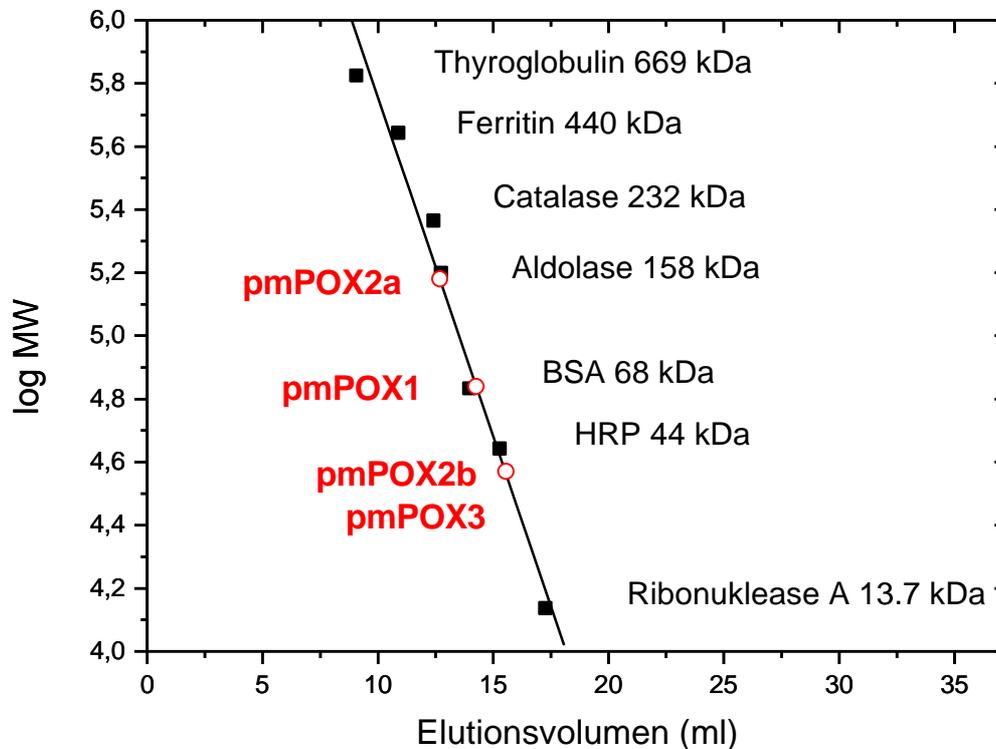


Abb. 3.7: Halblogarithmische Darstellung der nativen molekularen Massen der pmPOX.

Verschiedene Markerproteine (■) wurden über eine Superdex 200-Gelfiltrationssäule unter den gleichen Versuchsbedingungen eluiert, unter denen die Peroxidaseaktivitäten (○) aufgetrennt wurden. Im Vergleich mit den Elutionsvolumina der pmPOX konnten deren native molekulare Massen berechnet werden. BSA, Rinderserumalbumin; HRP, *Horseradish peroxidase*. Für pmPOX1, pmPOX3, pmPOX2a sowie pmPOX2b wurden scheinbare native Molekulargewichte von 70, 38, 155 und 38 kDa ermittelt.

Um die Ergebnisse aus den Gelelektrophoresen zu verifizieren, wurde ein zweiter experimenteller Ansatz gewählt: Verschiedene Markerproteine wurden über eine Superdex-200-Gelfiltrationssäule unter den gleichen Versuchsbedingungen eluiert, unter denen die Peroxidaseaktivitäten aufgetrennt wurden. Aus den jeweiligen Elutionsvolumina konnte eine Eichkurve erstellt und die molekularen Massen der nativen pmPOX berechnet werden (Abb. 3.7). Für pmPOX1, pmPOX3, pmPOX2a sowie pmPOX2b wurden als scheinbare native Molekulargewichte 70, 38, 155 und 38 kDa ermittelt. Diese Werte liegen im Rahmen der möglichen Abweichungen zwischen nativ und durch SDS-PAGE ermittelten Daten, welche unter anderem durch die Elution von Protein/Detergenz-Komplexen erzeugt werden können. Bekannte Klasse-III-Peroxidasen zeigten molekulare Massen zwischen

28 und 100 kDa (Hiraga et al., 2001; Kim et al., 1988). Eine 138 kDa-Peroxidase wurde bisher für höhere Pflanzen nicht beschrieben.

In PM aus Wurzeln der Sojabohne wurden durch SDS-PAGE in Kombination mit einer Hämfärbung Banden mit einer molekularen Masse von 38 und 45 kDa identifiziert (Vianello et al., 1997). Diese Massen sind jedoch kleiner als die für alle pmPOX ermittelten und die korrespondierenden Banden zeigten eine Abnahme der Intensität nach Waschen der PM-Vesikel mit NaCl. Darüber hinaus wurden eine Reihe von apoplastischen löslichen Peroxidasen mit vergleichbaren molekularen Massen in verschiedenen pflanzlichen Spezies identifiziert (Hendriks et al., 1991). Die Unterschiede in den molekularen Massen könnten jedoch auch auf dem unterschiedlichen Material basieren.

Die Peroxidasefärbung der isolierten Proteine deutet auf eine relativ starke nichtkovalente Bindung der Hämgruppen an die Proteine hin. Nur pmPOX2b konnte nach einer Behandlung mit Dithiothreitol durch Hämfärbung detektiert werden. Da pmPOX2b dieselbe molekulare Masse zeigte wie in Abwesenheit reduzierender Substanzen (Abb. 3.6), konnte das Protein als Monomer identifiziert werden. In pmPOX1- und pmPOX2a-haltigen Proben konnten nach der gleichen Behandlung keine sichtbaren Banden detektiert werden. Möglicherweise führten die Spaltungen von Disulfidbrücken zu Konformationsänderungen, die in einer Freisetzung der Hämgruppen resultierten. Aufgrund der Existenz von Hämgruppen scheint es sich bei den vier PM-gebundenen Enzymen daher nicht um Peroxiredoxine, d.h. Peroxidasen ohne prosthetische Gruppe (Dietz, 2003), zu handeln.

Im Anschluss an die Zuordnung von Proteinbanden zu den PM-gebundenen Peroxidaseaktivitäten werden die Abkürzungen pmPOX1, pmPOX2a, pmPOX2b und pmPOX3 im Folgenden auch für die zugehörigen Proteine, Transkripte oder Gene verwendet.

3.7 Glykosylierung

Eine Glykosylierung der Peroxidasen wurde für pmPOX1, pmPOX2a und pmPOX2b durch eine Kombination aus modifizierter SDS-PAGE, Western Blotting und Biotin/Streptavidin-Detektion untersucht und konnte für alle drei Peroxidasen bestätigt werden ($n = 2$). Diese Ergebnisse stimmen mit der Hemmung der Peroxidaseaktivitäten durch Lektine überein (Mika, 2001) und wurden auch anhand von diffusen Proteinbanden in SDS-Gelen sichtbar (Abb. 3.6). Zusätzlich wurde die Glykosylierung von pmPOX1 in einer Affinitätschromatographie mit einer Lektinmatrix deutlich. Das Enzym wurde an die Matrix gebunden. Viele nichtglykosylierte Proteine konnten auf diese Weise abgetrennt werden. Die auf der Methode basierenden Aktivitätsverluste waren jedoch so gravierend, dass ein solcher Reinigungsschritt nicht effektiv genug erschien. Vianello et al. (1997) fanden ähnliche

Hinweise: Nach einer Behandlung von Sojabohnenwurzeln mit Tunicamycin, einem Inhibitor der Glykoproteinsynthese, reduzierte sich die Guajacolperoxidaseaktivität von ungewaschenen PM-Vesikeln um 40 %. Aufgrund der Glykosylierung der von pmPOX1, pmPOX2a und pmPOX2b können die wirklichen molekularen Massen der Proteine von den experimentell ermittelten abweichen.

In pmPOX2a-haltigen Fraktionen konnte in vorläufigen Experimenten sowohl nach modifizierter als auch nach reduzierender SDS-PAGE die gleiche 138 kDa-Bande detektiert werden. Möglicherweise handelt es sich daher auch bei diesem Enzym um ein Monomer.

3.8 Identifizierung der Sequenzen und bioinformatische Sequenzanalyse

3.8.1 Massenspektrometrische Peptidanalyse

Da ein Edman-Abbau äußerst stark angereicherter Proben der Peroxidase pmPOX2a und des Antikörper-detektierbaren Proteins aufgrund zu geringer Proteinmengen und/oder einer N-terminalen Blockierung der Proteine keinerlei Ergebnisse erzielte, wurde die gesamte Proteinsequenzierung mittels ESI-MS/MS durchgeführt. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse sind in Tab VII dargestellt.

Anhand der identifizierten Mikrosequenzen, den dazugehörigen Massen und den aufgrund der verwendeten Protease bekannten terminalen Aminosäuren der Peptide wurden BLAST-Suchläufe in allen verfügbaren Datenbanken durchgeführt und eine Anzahl *Expressed Sequence Tags* (ESTs) identifiziert, deren translatierte Nukleotidsequenzen den ermittelten Peptiden zu 100 % entsprachen. Identifizierte ESTs wurden durch überlappende ESTs verlängert und sofern vorhanden im Vergleich mit ihrer zugehörigen genomischen DNA und gut charakterisierten sehr ähnlichen Proteinsequenzen aus anderen Spezies zu Contigs zusammengefügt und überprüft. Zur Bestätigung der resultierenden *full length cDNAs* (cDNAs vollständiger Länge) oder fast vollständigen Nukleinsäuresequenzen wurden mit dreien der fünf Proteine zusätzlich MALDI-TOF-Analysen durchgeführt und deren Ergebnisse mit den virtuell abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Sequenzierung verglichen.

Tab. VII zeigt einen Überblick über die Zugehörigkeit der identifizierten vollständigen Nukleinsäuresequenzen oder Sequenzabschnitte zu den entsprechenden Enzymfamilien basierend auf Sequenzähnlichkeiten. Für pmPOX1, pmPOX2b und pmPOX3 konnten anhand der identifizierten massenspektrometrischen Daten korrespondierende Sequenzen identifiziert werden, welche hohe Sequenzähnlichkeiten zu Peroxidasen der Klasse III, d.h. des sekretorischen Stoffwechselweges, zeigten. Das Zusammenfügen bzw. die Identifizierung der Sequenzen und deren Sequenzanalyse werden im Folgenden für die einzelnen Proteine detailliert besprochen.

Tab. VII: ESI-MS/MS-Analyse der vier pmPOX und Zugehörigkeit der anhand dieser Mikrosequenzen und Massen ermittelten vollständigen oder fast vollständigen Aminosäuresequenzen.

Die Proteinbanden wurden im Anschluss an eine modifizierte SDS-PAGE aus dem Gel ausgeschnitten, durch Nanoelektrospray-Massenspektrometrie in einem Q-TOF-2-Instrument analysiert und anhand des MascotMS/MSion-Suchalgorithmusses evaluiert. Mit den identifizierten Peptiden wurden BLAST-Suchläufe in allen verfügbaren Datenbanken durchgeführt und entsprechende Nukleinsäuresequenzen der Proteine abgeleitet (Details siehe Kapitel 3.8.2.1). Dargestellt sind die monoisotopischen Gesamtmassen der Peptide. Aufgrund des Verdauers der Proteine mit Trypsin werden alle Peptide mit Ausnahme der N- bzw. C-terminalen Peptide der Proteine von Lysin (K) oder Arginin (R) eingerahmt. (1) Ableitbare vollständige oder partielle Aminosäuresequenz; C-terminale Peptidbereiche, für deren Massen es in Datenbanken keinerlei Entsprechung gab, sind als Massen dargestellt (Masse in Da, in kleinen Klammern); alternative Aminosäuresequenzen (in großen Klammern, durch Kommata getrennt). Leucin (L) kann auch Isoleucin (I) bzw. Phenylalanin (F) kann ein oxidiertes Methionin (M) sein, da deren Massen identisch sind. (2) Aufgrund der Massendifferenz könnte dieser Tyrosinrest möglicherweise ungewöhnlich modifiziert sein.

Probe	MW _{exp}	Massenspektrometrisch identifizierte Peptide			Enzymfamilie (Subfamilie)
		Nr.	Masse (Da)	Aminosäuresequenz ¹	
pmPOX1	98	pep 1	1736,86	DSISLTGVSYSYQVPAGR	Superfamilie der Peroxidasen aus Pflanzen, Bakterien und Pilzen (Klasse III)
		pep 2	1861,62	DSISLTGVSYSYQVPAGR ²	
		pep 3	1400,70	GMGLFFSDNQLR	
pmPOX2b	55	pep 1	1588,72	MGNISPLTGTQGIR	
		pep 2	2100,02	GLLHSDQQLFNGGATDGLVR	
		pep 3	1870,86	ALSG _[1095]	
pmPOX3	57	pep 1	1698,82	DGVVALGGPSWTVLLGR	
		pep 2	1620,74	LNLGT _[814]	
		pep 3	1662,76	LNLGS _[870]	
		pep 4	1104,58	VLLP _[682]	
pmPOX2a	138	pep 1	1104,52	LGFGVDDAVVK	Glycerophosphodiester- Phosphodiesterase
		pep 2	1940,76	FQE[NGG, EV]LE	
		pep 3	1792,76	PEFLLLE _[734]	
		pep 4	1296,50	[LS, EA, TV, AE, SL, VT]DFL _[703]	
		pep 5	1544,60	FDYL[SS, QDD] _[831, 647]	
		pep 6	1621,70	AAGLAV[Y, N] _[620, 669]	
		pep 7	1722,60	GGFSGLFPDSSDFAYR	

3.8.2 *In silico* Cloning und bioinformatische Sequenzanalyse von pmPOX1, pmPOX2b und pmPOX3

3.8.2.1 Identifizierung und Analyse der Nukleotidsequenzen

Für pmPOX2b wurden durch ESI-MS/MS-Analyse drei Peptide ermittelt (Tab. VII). Anhand von BLAST-Suchläufen in allen verfügbaren Datenbanken wurden zehn ESTs, eine größere Anzahl *Genome Survey Sequences* (GSSs; Genomisches Equivalent zu ESTs) und eine genomische DNA mit einer Länge von 2985 bp (MAGI_11759, Universität von Iowa) identifiziert (Abb. 3.8 A). Aus diesen konnte eine vollständige Nukleinsäuresequenz zusammengesetzt werden, in welcher die Massen und die korrespondierenden Nukleotidsequenzen der drei Peptide zu 100 % enthalten waren. Sowohl die genomischen Sequenzen als auch die identifizierten ESTs waren in allen überlappenden Bereichen identisch. Die Anordnung der ESTs zur putativen cDNA erfolgte in Übereinstimmung mit der genomischen Sequenz. Da die anhand der ESTs abgeleitete cDNA am 5'-Ende unvollständig war, wurde die genomische DNA zusätzlich zur Komplettierung herangezogen, da deren Exons durch Vergleiche mit den identifizierten ESTs und Nukleinsäure- bzw. Aminosäuresequenzen sehr ähnlicher Peroxidasen aus anderen Pflanzenarten identifiziert werden konnten. Als Beispiel wurde die cDNA von OsPrx109 (*Oryza sativa peroxidase 109*), die ähnlichste Peroxidase aus Reis, schematisch abgebildet. Die resultierende Nukleinsäuresequenz ist in Abb. 3.8 unter B dargestellt. Die putative cDNA von pmPOX2b hat eine Länge von 1525 bp. Der Translationsstart befindet sich in Position 592 und der offene Leserahmen besteht aus 966 bp.

Die Nukleotidsequenz der Peroxidase pmPOX1 konnte aus acht ESTs der Linie *Zea mays* L. cv. B73 und einer aus *Zea mays* L. cv. W64 isolierten cDNA (*ZmPox1*, AJ401274; De Obeso et al., 2003) zusammengefügt werden (Abb. 3.9 A). Die aus den ESTs der Linie B73 abgeleitete putative cDNA von pmPOX1 enthielt beide durch ESI-MS/MS identifizierten Peptidsequenzen, die aus W64 stammende cDNA enthielt jedoch nur eines der Peptide. Die Nukleotidsequenzen von pmPOX1 und *ZmPox1* unterschieden sich jedoch nur in vier Basenpaaren (Abb. 3.9 B). Dieser Unterschied scheint zu gering für verschiedene Isoenzyme und könnte auf Sequenzierfehler, linienspezifische Sequenzunterschiede oder die Existenz von Gendublikaten zurückzuführen sein.

Ausgehend von der putativen cDNA von pmPOX1, die auf ESTs der Maislinie B73 basiert, findet sich an Position 489 im Vergleich mit *ZmPox1* ein zusätzliches Basenpaar. Um mit der Sequenz von *ZmPox1* trotz dieser Leserahmenverschiebung einen peroxidaseähnlichen Leserahmen zu erhalten, postulierten De Obeso et al. (2003) einen Translationsstart an Position 455 (Startcodon blau markiert, Abb. 3.9 C) und ignorierten das auch in ihrer

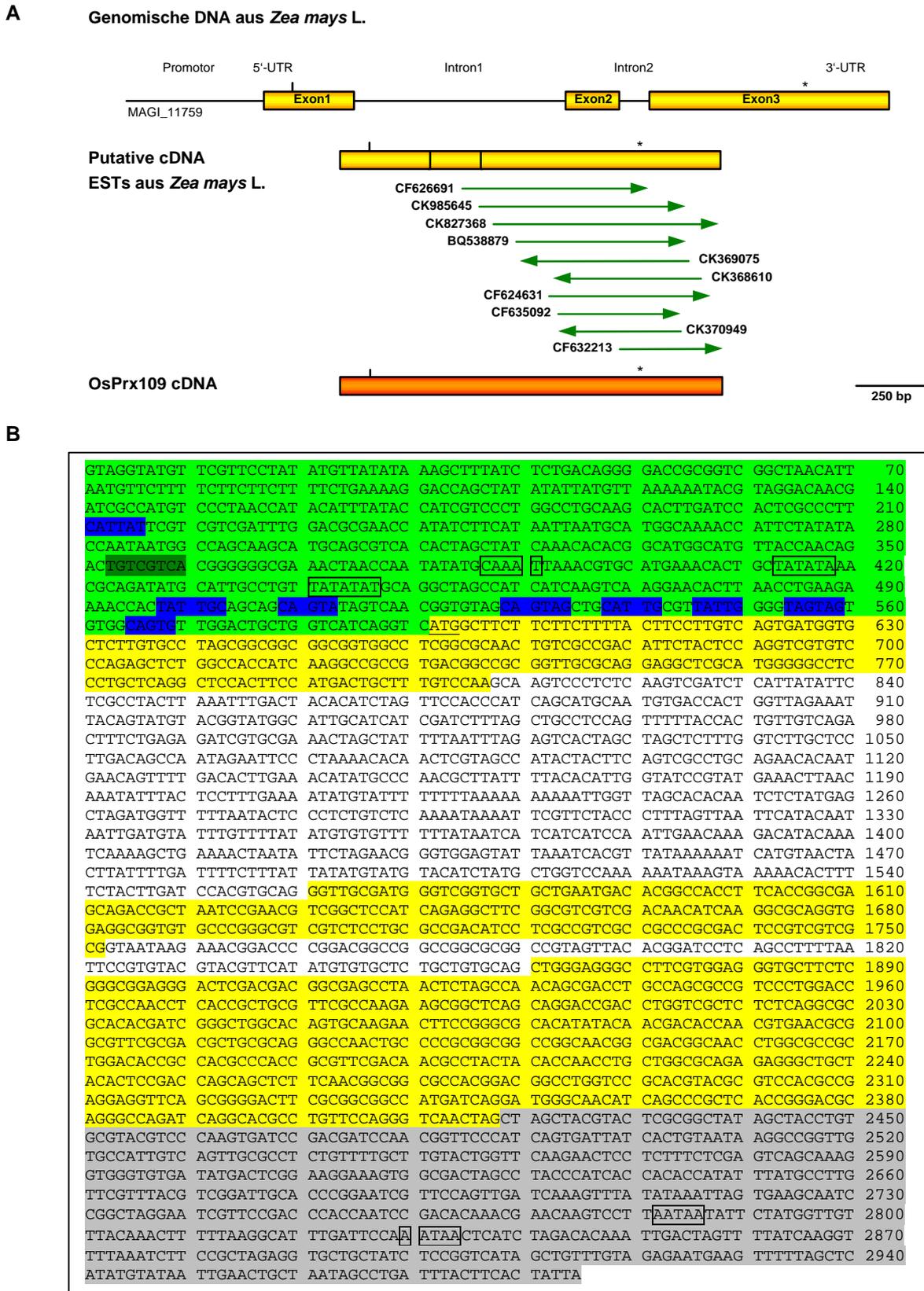


Abb. 3.8: Identifizierung und Analyse der Nukleinsäuresequenz von pmPOX2b

A. Schematische Übersicht über die Genstruktur und die für die Herleitung der cDNA-Sequenz verwendeten EST-Klone. Startcodon (|), Stopcodon (*); (Details siehe Text) **B.** Genomische Nukleinsäuresequenz von pmPOX2b. Promotorregion und 5'UTR (hellgrün), translatierter Bereich (gelb), Introns (weiß), 3'-UTR bzw. 3'-Region (grau), Start-, Stopcodon (unterstrichen), putative CAAT- und TATA-Boxen bzw. Polyadenylierungssignale (eingerahmt), putative cis-Regulatorische Elemente (Core-Bereiche von Antioxidant-responsive elements; blau; As1, dunkelgrün; siehe Abschnitt 3.8.2.2)

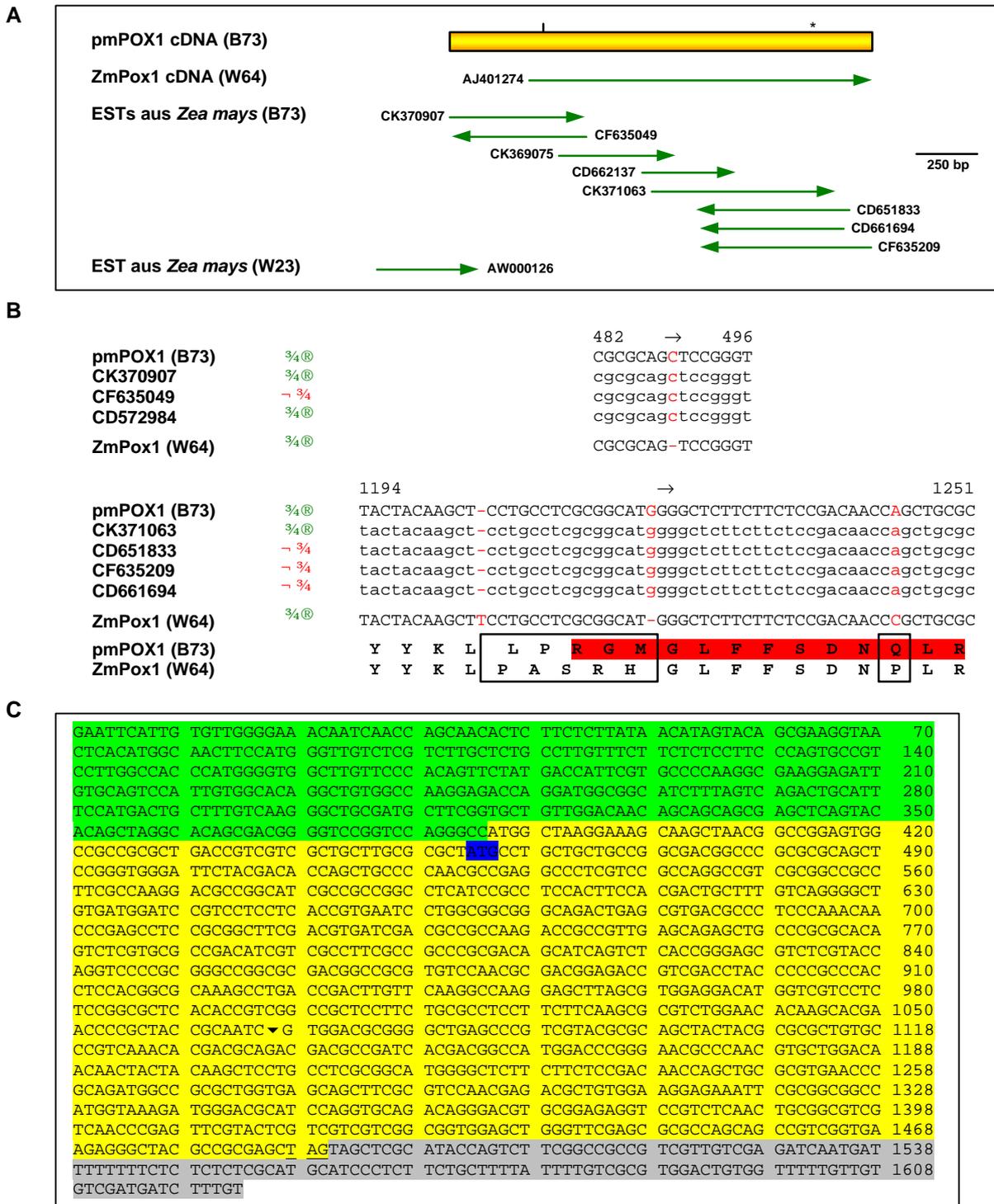


Abb. 3.9: Identifizierung und Analyse der Nukleotidsequenz von pmPOX1

A. Schematische Übersicht über die Genstruktur und die für die Herleitung der cDNA-Sequenz verwendeten EST-Klone. (Details siehe Text) **B.** Partielles Alignment der Nukleinsäure- bzw. Aminosäuresequenzen von pmPOX1 und ZmPox1. Unterschiede zwischen den cDNA-Sequenzen von ZmPox1 und pmPOX1 bestehen an vier Positionen. Abweichungen sind in der Nukleotidsequenz rot, in der Aminosäuresequenz durch Rahmen markiert. Die durch massenspektrometrische Analyse der Proteinproben an dieser Stelle determinierte Peptidsequenz ist rot unterlegt. Richtung der EST-Sequenzierung (®, -). **C.** Putative cDNA von pmPOX1, zusammengefügt in Übereinstimmung mit ESTs aus der Maislinie B73. 5'UTR (grün), kodierender Bereich (gelb), 3'UTR (grau); Start-, Stopcodon (unterstrichen), von De Obeso et al. (2003) postuliertes Startcodon (blauer Kasten), Intronposition (▼).

Sequenz vorhandene weiter 5' liegende ATG an Position 387. Die entsprechend abgeleiteten putativen Proteine unterscheiden sich daher in den ersten 35 Aminosäuren. Darüber hinaus konnte in der Sequenz von ZmPox1 an Position 1205 ein zusätzliches Thymin identifiziert werden. Die Verschiebung des Leserahmens und der daraus resultierende Unterschied in der Aminosäuresequenz erstreckt sich jedoch nur über fünf Aminosäuren (Abb. 3.9 B; linker Rahmen), da in *pmPOX1* eine kurze Strecke sequenzabwärts an Position 1221 ebenfalls eine Insertion (G) zu finden ist. Die Nukleotidsequenz von *pmPOX1* ist jedoch definitiv die, welche anhand der ESTs aus der Maisinzuchtlinie B73 identifiziert werden konnte, da exakt dieser Teil der Sequenz durch die ESI-MS/MS-Analyse als Peptid sequenziert wurde (rot markiert). Die veränderten Aminosäurereste liegen in einem relativ variablen Bereich und spielen möglicherweise eine untergeordnete Rolle für die Struktur und Funktion des Proteins. Die zur Isolierung der Sequenzierproben verwendete Maislinie Jet scheint daher größere Übereinstimmung mit B73 als mit W64 zu haben. Das an Position 1244 ausgetauschte Basenpaar könnte entweder auf einer Transversion oder auf einem Sequenzierfehler basieren. Ein Vergleich willkürlich ausgewählter ESTs anderer putativer Peroxidasen zeigte nur geringe Unterschiede in den Nukleotidsequenzen verschiedener Maislinien. Sollten die Unterschiede zwischen *pmPOX1* und *ZmPox1* nicht auf Sequenzierfehlern sondern auf tatsächlichen Unterschieden zwischen Maislinien basieren, so wäre dies auf genomischer Ebene eine enorme Veränderung. Eine derartige Nukleotiddiversität ist jedoch möglich. In einer Analyse der allelischen Varianz eines Peroxidasegens (*ZmPox3*) aus Mais, welches möglicherweise an der Lignifizierung beteiligt ist, wurden 37 Maisinzuchtlinien untersucht (Guillet-Claude et al., 2004). Während insbesondere Introns besonders reich an Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) und Insertionen oder Deletionen waren, traten in der kodierenden Region von *ZmPox3* maximal fünf nicht-synonyme Einzelnukleotidpolymorphismen und eine Insertion oder Deletion auf. Entsprechend der Klassifizierungen für den Austausch von Aminosäuren nach Li et al. (1985) und Grantham (1974) entsprachen den fünf nicht-synonymen SNPs im kodierenden Bereich des Gens fünf ausgetauschte Aminosäuren, deren Wechsel konservativ (Val/Leu und Phe/Leu) oder mäßig konservativ (Ser/Thr, Ala/Ser und Ala/Thr) erfolgte. Das aktive Zentrum, die proximale Hämbindestelle sowie das N-terminale Signalpeptid blieben von diesen Änderungen ausgenommen (Guillet-Claude et al., 2004). Die Sequenzunterschiede zwischen *pmPOX1* und homologen Peroxidasen aus anderen Spezies (siehe Abschnitt 3.8.2.3.9) sind im Gegensatz zu den von Guillet-Claude et al. (2004) beschriebenen Polymorphismen weitaus größer.

Durch zusätzliche MALDI-TOF-Analysen derselben Proteinbande wurde die von der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz von *pmPOX1* und die Abweichung der Aminosäuresequenz von *pmPOX1* im Vergleich mit *ZmPox1* eindeutig bestätigt (Tab. VIII). Da jedoch in Datenbanken keine EST-Klone zu finden waren, welche mit der abweichenden

Nukleinsäuresequenz von ZmPox1 korrespondierten, scheint es sich bei *pmPOX1* und *ZmPox1* eher nicht um eine Genduplikation innerhalb des Genoms einer Maislinie zu handeln, sondern um Transkripte des gleichen Gens. Somit wären die Sequenzabweichungen nur auf die unterschiedlichen Maislinien zurückzuführen.

Die *full length* cDNA von pmPOX1 hat eine Länge von 1731 bp. Der offene Leserahmen ist 1105 bp lang.

Tab. VIII: MALDI-TOF-Analyse von pmPOX1.

Die Proteinbande von pmPOX1 wurde im Anschluss an eine modifizierte SDS-PAGE aus dem Gel ausgeschnitten, die enthaltenen Proteine extrahiert, tryptisch verdaut und nach entsprechender Vorbereitung massenspektrometrisch analysiert. Die ermittelten Massen der tryptischen Peptide wurden zur Überprüfung der putativen cDNA von pmPOX1 mit deren Aminosäuresequenz verglichen. Die Sequenz konnte eindeutig bestätigt werden.

MALDI-TOF Masse _{exp} (Da)	Position	Korrespondierende Aminosäuresequenz in der putativen Aminosäuresequenz von pmPOX1
1289.63	446-457	IQVQTGTCGEVR
1346.35	446-457	IQVQTGTCGEVR (C modifiziert)
1380.96	253-265	TVSCADIVAFAR
1400.78	402-413	GMGLFFSDNQLR
1737.05	266-282	DSISLTGSVSYQVPAGR
1862.94	398-413	LLPRGMGLFFSDNQLR
1915.11	206-224	GCDGSVLLTVNPGGGQTER
1915.11	314-331	ELSVEDMVVLSGAHTVGR
2745.48	341-366	VWNTSTNPATAIVDAGLSPSYAQLLR
3400.64	367-397	ALCPSNTTQTTPITTAMDPGTPNVLDNNYYK

In allen verfügbaren Datenbanken waren im Vergleich mit den massenspektrometrischen Daten zu pmPOX1 und pmPOX2b keine weiteren passenden Nukleinsäuresequenzen zu finden. Translatierte EST-Klone bzw. EST-Contigs mit ähnlichen Peptidsequenzen zeigten zu große Unterschiede in der Aminosäuresequenz.

Für die erst kürzlich durch Proteinreinigung identifizierte pmPOX3 wurde eine Sequenzierung begonnen. Durch modifizierte nichtreduzierende SDS-PAGE mit anschließender Hämefärbung wurden in pmPOX3-haltigen Fraktionen aus Gelfiltrationen zwei intensiv gefärbte Banden mit molekularen Massen von 57 und 64 kDa identifiziert (siehe Abschnitt 3.6). In einer ESI-MS/MS-Analyse der höhermolekularen Bande mit anschließender Datenbankrecherche wurde ein bekanntes Protein identifiziert, welches keine Sequenzähnlichkeit zu Peroxidasen auswies (Daten nicht dargestellt). Im Gegensatz dazu

zeigten tryptische Peptide, welche aus der 57 kDa-Bande extrahiert wurden, große Übereinstimmungen mit Peroxidasen.

Basierend auf dem durch ESI-MS/MS-Analyse ermittelten Peptid 1 (DGVVALGGPSWTVLLGR; Tab. VII) konnten jedoch anhand von Datenbankenanalysen nicht nur eine sondern drei Nukleinsäuresequenzen identifiziert werden (*pmPOX3-1*, *pmPOX3-2* und *pmPOX3-3*). Basierend auf Sequenzähnlichkeiten können alle drei Sequenzen als Klasse-III-Peroxidasen eingestuft werden.

Die als *pmPOX3-1* bezeichnete Nukleotidsequenz wurde sowohl als genomische DNA (MAGI_10042) als auch als Transkript durch ESTs identifiziert (TC272358, AY108658, BM501477, BG320952, BG517356, BM267589, CK827701, BM332139, BI431028, BM380022, BI992944, BM078563, BG841623, AI978227, BM382221, BM382301, CO534318, BQ539158, BM349475, BM381015, BE640528). Die genomische DNA ist in Abb. 3.10 dargestellt. Die durch Vergleich zwischen ESTs, genomischer DNA und Proteinsequenzen anderer bekannter Klasse-III-Peroxidasen abgeleitete cDNA bzw. Aminosäuresequenz von *pmPOX3-1* hat einen offenen Leserahmen von 966 bp. Das vorhergesagte Protein ist 321 Aminosäuren lang. Darüber hinaus konnte eine weitere Nukleotidsequenz (DNA-Patent AX546778) gefunden werden, die mit der für *pmPOX3-1* ermittelten Sequenz fast vollständig übereinstimmt. Die Nukleotidsequenz von AX546778 zeigt jedoch eine Insertion (T), welche eine Leserahmenverschiebung verursachen würde, so dass die dort abgeleitete C-terminale Aminosäuresequenz keinerlei Ähnlichkeit mit Peroxidasen aufweist. In der noch im Aufbau befindlichen Datenbank pflanzlicher Peroxidasen (PeroxiBase) wird die unvollständige Sequenz von *pmPOX3-1* als *ZmPrx10* sowie *ZmPrx42* geführt.

Die Sequenz des als *pmPOX3-2* bezeichneten Gens ist am 5'-Ende unvollständig. Der bislang bekannte Sequenzbereich hat eine Länge von 971 bp (Abb. 3.10; MAGI_94644). Das aus ESTs (TC265104, CK347913, CF628730, CF632737, CF626696, CK347697) abgeleitete putative Transkript zeigt einen offenen Leserahmen von 735 bp und kodiert für 245 Aminosäuren. Basierend auf Sequenzähnlichkeiten mit bekannten Peroxidasen scheint am 5'-Ende ein Bereich zu fehlen, der ca. 75 Aminosäuren entspricht. In der Datenbank pflanzlicher Peroxidasen wird ein C-terminales Fragment des abgeleiteten Proteins unter der Bezeichnung *ZmPrx66* geführt.

Die als *pmPOX3-3* bezeichnete Nukleotidsequenz konnte vollständig identifiziert werden. Der transkribierte Bereich des Gens (MAGI_101543) hat eine Länge von ca. 1329 bp. Die durch MAGI vorhergesagte sowie durch Vergleich mit anderen bekannten Klasse-III-Peroxidasen abgeleitete cDNA kodiert für einen Leserahmen aus 963 bp. Das abgeleitete Protein besteht aus 320 Aminosäureresten. Auf Transkriptebene lässt sich eine korrespondierende vollständige mRNA finden (AF037034, Q9ZTS7, TC276447, Trivialname *p7x*), zu welcher zusätzlich eine Promotorsequenz veröffentlicht wurde (AF402769). Die

putativen Exons der genomischen DNA unterscheiden sich von dieser mRNA in zehn Nukleotiden. Diese Unterschiede sind über die ganze Sequenz verteilt (Daten nicht dargestellt). Die Sequenz des 5'-UTRs ist jedoch identisch. Zusätzlich findet sich in der mRNA von *p7x* in Position 918 eine Insertion (C) und demzufolge eine Leserahmenverschiebung. Daher zeigt nur die aus der genomischen DNA abgeleitete C-terminale Aminosäuresequenz große Ähnlichkeit zu anderen Peroxidasen. Obwohl neben der Insertion, welche auf einem Sequenzierfehler beruhen könnte, auf Nukleotidebene zehn weitere Basenpaare verschieden sind, unterscheiden sich die von beiden Sequenzen abgeleiteten Proteinsequenzen nur in drei Aminosäuren. Da die Nukleotidsequenzen aus unterschiedlichen Maisvarietäten stammen, ist davon auszugehen, dass die Unterschiede nicht auf Sequenzierfehlern basieren, sondern tatsächliche evolutionäre Sequenzunterschiede dieses Gens zwischen den Maisvarietäten darstellen. Denkbar ist auch, dass *p7x* ein eigenständiges Gen repräsentiert, welches möglicherweise als vierter Kandidat für *pmPOX3* in Frage käme, da das massenspektrometrisch ermittelte Peptid 1 sich nur in einem Nukleotid bzw. einer von 18 Aminosäuren unterscheidet. Massenspektrometrisch darf es keine solche Abweichung geben. Die Nukleinsäuresequenz von *p7x* kann jedoch an dieser Stelle fehlerhaft sein.

Da sich *pmPOX3-2* und *pmPOX3-3* ebenfalls nur geringfügig mehr voneinander unterscheiden als *pmPOX3-3* und *p7x*, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt werden, ob es sich um zwei, drei oder vier verschiedene Peroxidasen handelt. Zusätzlich zu den sehr ähnlichen Isoenzymen in Enzymsuperfamilien, finden sich speziell bei Mais aufgrund des allopolyploiden Genoms duplizierte Gene (Walbot und Petrov, 2001), welche oft äußerst ähnlich sind und sich z.T. nur in ihren Promotoren unterscheiden (R. Lorbiecke, *pers. Mitteilung*).

Die drei weiteren durch ESI-MS/MS sequenzierten Peptide bzw. Massen (Tab. VII) konnten in keiner der drei bzw. vier Sequenzen identifiziert werden. In allen verfügbaren Datenbanken wurden keine anderen passenden ESTs oder Sequenzen identifiziert. Einerseits könnte dieses Ergebnis auf *pmPOX3-2* hindeuten, da die bisher identifizierte Nukleotidsequenz am 5'-Ende unvollständig ist. Andererseits ist eine Heterogenität der ausgeschnittenen Gelbande möglich. D.h. die Peptide könnten möglicherweise zu einem unbekanntem Protein gehören, welches als Verunreinigung vorliegt.

Trotz mehrfach durchgeführter Reinigung des Proteins und Analysen durch ESI-MS/MS wurden keine weiteren Peptide identifiziert. In einer zusätzlich durchgeführten Analyse der gleichen Proteinbande mittels MALDI-TOF wurden sechs Massen ermittelt (791,39; 1349,60; 1458,87; 1881,21; 2161,17; 2238,42 Da).

pmPOX3-1	:	CTATAAATATGCATGGAGTAGAGCAACCTCTATGCACACCACACAACAACAATAATACAGCAA	:	68
pmPOX3-2	:	-----	:	-
pmPOX3-3	:	-----	:	-
pmPOX3-1	:	GGAGGCTAGCAGAAGTGCAGGATTAATAAGCTAAGCTAGTAGAAATTAAGCAAAGCATAGGCACAGCC	:	136
pmPOX3-2	:	-----	:	-
pmPOX3-3	:	ACACACCATAATCACAAGCAAGCGCCAACGATCGAGCAGAAAGAAGATCGTCGAGATCGAGCATAAGCC	:	68
pmPOX3-1	:	ATGGCTACCTCCTCTGGTTCTTGCCTTATTATTAGCCTGTTGGTGGTGGTGGTGGCGGCGGCGCTGTC	:	204
pmPOX3-2	:	-----	:	-
pmPOX3-3	:	ATGGCGGCGCTCTGTTTCTGCCTCTTGCCTTATTAGCCTGTCGTCGTTGGCGGTGGTGGTGGTGGCGCT	:	136
pmPOX3-1	:	GGCCTCAACGGCGTCGGCACAGCTGTCGTCGACGTTCTACGACACGTCGTCGCCACAGCGCGATGTCCA	:	272
pmPOX3-2	:	-----	:	-
pmPOX3-3	:	GGCGTCGGCGGCGTCGGCGCAGCTGTCGTCGACGTTCTACGACAGGTCATGCCCAACGCGCTGTCCA	:	204
pmPOX3-1	:	CCATCAGCAGCGGCGTGAACCTCCGCCGTGGCGCAGCAGGCTCGTGTGGGGGCGTCGCTGCTCCGGCTC	:	340
pmPOX3-2	:	-----	:	-
pmPOX3-3	:	CCATCAGGAGCGGCGTGAACCTCCGCCGTGAGGCAGGAGCCTCGCGTGGGGGCGTCGCTGCTCAGGCTC	:	272
pmPOX3-1	:	CACTTCCACGACTGCTTTCGTCCAA GCAAGTCTAGCTGTCTCAGATGCATCTATCTATCTACTTATATA	:	408
pmPOX3-2	:	-----	:	-
pmPOX3-3	:	CATTTCCACGACTGCTTTGTCCGG GCAAGTGAAGTCTCCGTCATCTTTTCTGCTTTCTTTCTAGAAAA	:	340
pmPOX3-1	:	TAAGCATGATTTCCTTTTCTAGCTAGCTAGCATCGTCGTCATTTAATTTGAAGATAAAAGATTAGCA	:	476
pmPOX3-2	:	-----	:	-
pmPOX3-3	:	CA-----CATCCATGACCCACGAAAACCTGAGCTTAAA-----	:	373
pmPOX3-1	:	CGTCGTATATGCATGCGATTAATTAACCAGGAGGCATCATGGTGAATTTCTGGTGGTCCACCAG GGC	:	544
pmPOX3-2	:	----- GGA	:	3
pmPOX3-3	:	-----AAACCTAAATATTTCTGCAG GGC	:	397
pmPOX3-1	:	TGCGACGCGTCCATTCTGCTGAACGACACGTCCTCGGGGAGCAGACCCAGCCGCCAACCTAACTCTGAA	:	612
pmPOX3-2	:	TGCGACGCGTCCCTTCTGCTGAACGACACGTCAGGGGAGCAGAGCCAGGGCCGAATCTAACTCTGAA	:	71
pmPOX3-3	:	TGCGACGCGTCCCTTCTGCTGAACGACACGTCAGGGGAGCAGAGCCAGGGCCGAATCTAACTCTGAA	:	465
pmPOX3-1	:	CCCGAGGGCCTTCGACGTCGTCGAACAGCATCAAGGCGCAGGTGGAGGCGGCGTGCCTCGGGGCGTCT	:	680
pmPOX3-2	:	CCCGAGGGGCTTCGTTGTCGTCGAACAGCATCAAGGCGCAGGTGGAGTCCGTCGTCGCCGGGATCGTCT	:	139
pmPOX3-3	:	CCCGAGGGGCTTCGTTGTCGTCGAACAGCATCAAGGCGCAGGTGGAGTCCGTCGTCGCCGGGATCGTCT	:	533
pmPOX3-1	:	CCTGCGCCGACATCCTCGCCGTGCGCGCCCGCAGCGAGTTGTGCGG GT---ACGTAGCTACATCACC	:	745
pmPOX3-2	:	CCTGCGCCGACATCCTCGCCGTGGCTGCGCGCAGCGAGTTCGTAGCG GTGAGAGATGAAGACTAGATA	:	207
pmPOX3-3	:	CCTGCGCCGACATACTCGCCGTGGCGCCCGCAGCGAGTTCGTAGCG GTGAGAGATGAAGACTAGATA	:	601
		R D G V V A		
pmPOX3-1	:	GTGCCTATTAATTTGCTGGCTAG-TAGCTTGTGGTTTGCAAACCTAACTAACTAACTCCGATCGTATG	:	812
pmPOX3-2	:	GATCATAGATATATCCCTGCTAGCTAGCTAGCTAGGTTGTGACCTGATGA--TGATGATGTACGCATG	:	273
pmPOX3-3	:	GATCATAGATATATCCCTGCTAGCTAGCTAGCTAGGTTATGACCTGATGA--TGATGATGTACGCATG	:	667
pmPOX3-1	:	CGTGGTGCA---TATGCAG CTCGGGCGGCTTCGTGGACCGTCTTCTGGGCAGAAGGGACTCGACCG	:	877
pmPOX3-2	:	CATATCATATCCTATCCAG CTCGGGCGGCTTCGTGGACAGTTCCTACTAGGGCGAAGGGACTCTACCG	:	341
pmPOX3-3	:	CATATCATATCCTATCCAG CTCGGGCGGCTTCGTGGACAGTTCCTACTAGGGCGAAGGGACTCTACCG	:	735
		L G G P S W T V L L G R		
pmPOX3-1	:	GTTCTGTTCCCTAGCCAGACAAGCGACCTCCACCTCCGACGTCGAGCCTCCAAGCACTGTTAGCCGCG	:	945
pmPOX3-2	:	CTTCATTTCGACAGCCAGACAAGCGACCTCCACCTCCGACGTCGAGCCTCCGACAGCTTTTGTCTGCG	:	409
pmPOX3-3	:	CTTCATTTCGACAGCCAGACAAGCGACCTCCACCTCCGACGTCGAGCCTCCGACAGCTTTTGTCTGCG	:	803
pmPOX3-1	:	TACAGCAAGAAGAACCTCGACGCGACCGACATGGTTCGCTCTCTCAGGCGC -----	:	995
pmPOX3-2	:	TATAACAAGAAGAACCTCAACCCAACCGACATGGTTGCACCTCTCAG GTGCCCTCCTAGTTAGCATAGC	:	477
pmPOX3-3	:	TATAACAAGAAGAACCTCAACCCAACCGACATGGTTGCACCTCTCAG GTGCCCTCCTATCCTAGCTAGC	:	871

pmPOX3-1	:	-----	:	-
pmPOX3-2	:	AGTAGCAGCTAGCTTAGCTACAGCT----GAT--CGACGATACATA-----CCTTCCATA----CAT	:	530
pmPOX3-3	:	AGTAGCAGCTAGCTTAGCTACTGATCGACGATGACGATGATATATATAATACTTTCCATATATACAT	:	939
pmPOX3-1	:	----TCACACAATCGGGCAGGCCAGTGCTCGAGCTTCAACGGCCACATCTACAACGACACGAA	:	1055
pmPOX3-2	:	GCAGGAGCTCACACGATCGGACAGGCGCAGTGCTCGAGCTTCAACGACCACATCTACAACGACACCAA	:	598
pmPOX3-3	:	GCAGGAGCTCACACGATCGGACAGGCGCAGTGCTCGAGCTTCAACGACCACATCTACAACGACACCAA	:	1007
pmPOX3-1	:	CATCAACGCGGCCTTCGCGACGTCGCTCAAGGCCAACTGCCCATGTCCGGCGGCAGCAGCCTGGCGC	:	1123
pmPOX3-2	:	CATCAACTCCGCCTTCGCGCGCTCGCTCAGGGCCAACTGCCCCAGGGCAGGCAGCACCGCCCTTGGCGC	:	666
pmPOX3-3	:	CATCAACTCCGCCTTCGCGCGCTCGCTCAGGGCCAACTGCCCCAGGGCAGGCAGCACCGCCCTTGGCGC	:	1075
pmPOX3-1	:	CGCTGGACACCATGACCCCGACCGTGTTCGACAACGACTACTACAAGAACCTGCTGTGCGAGAAGGGG	:	1191
pmPOX3-2	:	CGCTGGACACCAACGACGCCAACGCGTTCGACAACGCCTACTACACCAACCTGCTGTCCAGAAGGGG	:	734
pmPOX3-3	:	CGCTGGACACCAACGACGCCAACGCGTTCGACAACGCCTACTACACCAACCTGCTGTCCAGAAGGGG	:	1143
pmPOX3-1	:	CTGCTGCACTCGGACCAGGAGCTGTTCAACAACGGCAGCACCGACAGCACGGTCAGCAACTTTGCGTC	:	1259
pmPOX3-2	:	CTCCTGCACTCGGACCAGGAGCTCTTCAACAGCGGCAGCACCGACAGCACGGTCAGGAGCTTCGCGTC	:	802
pmPOX3-3	:	CTCCTGCACTCGGACCAGGAGCTCTTCAACAGCGGCAGCACCGACAGCACGGTCAGGAGCTTCGCGTC	:	1211
pmPOX3-1	:	CAGCTCGGCCGCTTACCAGCGCCTTACGGCGGCCATGGTGAAGATGGGGAACCTCGGCCGCTCA	:	1327
pmPOX3-2	:	CAGCACGTCGGCCTTCAACAGCGCCTTCGCCACGGCCATGGTCAAGATGGGCAACCTCAGCCCCAGA	:	870
pmPOX3-3	:	CAGCACGTCGGCCTTCAACAGCGCCTTCGCCACGGCCATGGTCAAGATGGGCAACCTCAGCCCCAGA	:	1279
pmPOX3-1	:	CCGGGACCAGTGGGCAGATCAGGCTCACCTGCTGGAAGTCAACTCGTCCTAAFAATTAAGGACGGAC	:	1395
pmPOX3-2	:	CCGGAACCCAGGGGCAGATCAGGCGCAGCTGCTGGAAGTCAACTCGTAAACTACTACGCCCAATGCA	:	938
pmPOX3-3	:	CCGGAACCCAGGGGCAGATCAGGCGCAGCTGCTGGAAGTCAACTCGTAA-----	:	1329
pmPOX3-1	:	GTCCGATAGACGATCCTGCGCAATCGTATCGTACGTGCATGATACGCATACATCTGGAAACTACTATA	:	1463
pmPOX3-2	:	ATCGTATATGGCAGGCAGATCAGAGCCAATTAA-----	:	971
pmPOX3-3	:	-----	:	-

Abb. 3.10: Mögliche Nukleinsäuresequenzen des pmPOX3-Gens.

Die aus pmPOX3-1 (MAGI_10042), pmPOX3-2 (MAGI_94644) sowie pmPOX3-3 (MAGI_101543) abgeleiteten Proteine enthalten das durch ESI-MS/MS-Analyse identifizierte Peptid (roter Kasten unter der korrespondierenden Nukleinsäuresequenz). Exons (gelb), Introns (weiß), 5'-UTR (grün), 3'UTR (grau).

Trotzdem konnte keine der drei bzw. vier Sequenzen anhand dieser Daten eindeutig ausgeschlossen werden, da einige der ermittelten Massen trotz unterschiedlicher Aminosäuresequenzen in allen vier abgeleiteten Proteinen auftreten.

Obwohl das internationale Maisgenomsequenzierungsprojekt erst kurz vor dem Abschluss steht, ist es wahrscheinlich, dass die meisten konstitutiv exprimierten Gene in Form von Transkripten als cDNAs oder ESTs bereits in Datenbanken vorliegen. Im Gegensatz zu dikotylen Angiospermen wie Arabidopsis, in deren Genom 73 Peroxidasegene gefunden wurden (Tognolli et al., 2002; Welinder et al., 2002), scheinen monokotyle Pflanzen eine noch wesentlich größere Anzahl dieser Isoenzyme zu exprimieren. Basierend auf der kürzlich erfolgten Komplettierung der Sequenzierung des Reisgenoms (*Oryza sativa japonica*

cv. Nipponbare) wurden 138 Gene und 14 Pseudogene identifiziert, welche für sekretorische Peroxidasen kodieren (OsPrx, *Oryza sativa peroxidase*; Passardi et al., 2004). Datenbankanalysen ergaben, dass jedoch nur etwa 40 % der sekretorischen Peroxidasen aus Reis konstitutiv vorhanden zu sein scheinen (Passardi et al., 2004). Dies ist nicht verwunderlich, da die Expression vieler Peroxidasen durch die verschiedensten abiotischen und biotischen Stressoren induziert wird (Hiraga et al., 2001). Bei den aus Maiswurzeln gereinigten PM-gebundenen Peroxidasen handelt es sich um konstitutiv translatierte Proteine. Aufgrund der Allopolyploidie des Maisgenoms wäre in Mais eine Anzahl von bis zu 200 Genen, welche für Klasse-III-Peroxidasen kodieren, denkbar, von denen schätzungsweise etwa die Hälfte konstitutiv exprimiert werden könnten. cDNA-Banken von Mais enthalten in der Regel auch die konstitutiv vorhandenen Transkripte. Basierend auf den aus cDNA-Banken abgeleiteten ESTs und cDNAs lassen sich inzwischen in Datenbanken mehr als 120 vollständige oder fast vollständige Nukleinsäuresequenzen mit hoher Sequenzähnlichkeit zu Klasse-III-Peroxidasen finden bzw. zusammenfügen (Daten nicht gezeigt). Obwohl aufgrund der großen Anzahl an Peroxidasegenen nicht ausgeschlossen werden kann, dass weitere noch unbekannt Sequenzen mit großer Sequenzähnlichkeit zu den für pmPOX1, pmPOX2a und pmPOX3 identifizierten existieren, ist es daher jedoch wahrscheinlich, dass die meisten konstitutiv transkribierten Sequenzen erfasst wurden. Alle fünf ermittelten Nukleinsäuresequenzen konnten fast vollständig durch ESTs aus cDNA-Banken identifiziert werden, welche aus Wurzel-RNA synthetisiert wurden (siehe Abschnitt 3.8.4).

Fazit

Für pmPOX1 und pmPOX2b konnten durch ESI-MS/MS- und MALDI-TOF-Analysen in Kombination mit Datenbankrecherchen und *in silico Cloning* vollständige Nukleinsäuresequenzen identifiziert werden. Mit pmPOX1 konnte ein bisher unbekanntes Protein einer bekannten Nukleinsäuresequenz (*ZmPox1*; De Obeso et al., 2003) zugeordnet werden. Unterschiede der massenspektrometrisch abgeleiteten Aminosäuresequenz von pmPOX1 zur cDNA von *ZmPox1* konnten durch eine bioinformatische Analyse auf maislinienspezifische Unterschiede zurückgeführt werden. Es scheint sich daher um das gleiche Gen zu handeln. Im Gegensatz dazu wurde für pmPOX2b eine bislang unbekannte cDNA identifiziert. Für die erst kürzlich zusätzlich gereinigte Peroxidase pmPOX3 wurden drei passende ebenfalls unbekannte Nukleinsäuresequenzen identifiziert. Da diese jedoch untereinander große Sequenzidentitäten zeigten, konnte trotz MALDI-TOF- und wiederholter ESI-MS/MS-Analysen keine eindeutig dem Protein pmPOX3 zugeordnet werden. Aufgrund des allopolyploiden Genoms finden sich speziell bei Mais duplizierte Gene mit extrem hoher Sequenzidentität. Daher konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei den drei möglichen Nukleinsäuresequenzen um drei eigenständige Gene handelt. Aufgrund der

massenspektrometrischen Ergebnisse konnte jedoch das in pmPOX3-haltigen Fraktionen durch modifizierte SDS-PAGE identifizierte 57 kDa-Protein der Peroxidaseaktivität zugeordnet werden.

3.8.2.2 Partielle bioinformatische Analyse der Genstruktur

Für *pmPOX1* war eine Analyse der genomischen DNA nur partiell möglich, da zum jetzigen Zeitpunkt nur ein Fragment von 426 bp Länge aus *Zea mays* L. cv. B73 vorhanden war (MAGI_91566), welche der cDNA von pmPOX1 von Basenpaar 675 bis 1069 entspricht. Aus diesem cDNA-Fragment konnte bisher nur ein Intron abgeleitet werden (Abb. 3.9, Pfeil). In der vollständigen genomischen DNA von pmPOX2b (2985 bp; MAGI_11759) konnten jedoch im Vergleich mit ESTs zwei Introns an Position 808 und 1753 identifiziert werden (Abb. 3.8). In Abb. 3.10 wurden die genomischen Nukleotidsequenzen von pmPOX3-1, pmPOX3-2 und pmPOX3-3 graphisch dargestellt. In genomischen Sequenzen von bisher aufgeklärten Klasse-III-Peroxidasen kamen vorwiegend ein, zwei oder drei Introns an bestimmten Positionen vor (Guillet-Claude et al., 2004; Passardi et al., 2004; Baga et al., 1995). Das gleiche Muster wird hier deutlich: So enthält *pmPOX3-1* (MAGI_10042) zwei, während *pmPOX3-3* (MAGI_101543) drei Introns zeigt. In der noch unvollständigen Sequenz von *pmPOX3-2* (MAGI_94644) konnten zwei Introns identifiziert werden. Aufgrund der in Klasse-III-Peroxidasen üblichen Anordnung der Introns ist die Existenz eines dritten jedoch sehr wahrscheinlich. Das zweite und sofern vorhanden auch das dritte Intron der *pmPOX* enthalten die klassischen GU/AG-Spleißstellen. Im Gegensatz dazu scheint die Prozessierung des jeweiligen ersten Introns an einer GC-Donorstelle stattzufinden. Identische Spleißstellenmuster finden sich auch in Peroxidasegenen anderer monokotyle Pflanzen (Baga et al., 1995). Die relativ selten auftretenden GC-5'-Spleißstellen werden auffällig oft in Genen gefunden, welche für Proteine kodieren, die in Reaktionen mit Sauerstoff involviert sind (Baga et al., 1995).

In den teilweise bekannten Promotorregionen der identifizierten Sequenzen wurden mehrere putative *cis*-regulatorische Elemente durch bioinformatische Analysen vorhergesagt. Neben einem *cis*-regulatorischen Element (As1), welches in die wurzelspezifische Expression eines Gens involviert sein soll, wurden in der Promotorregion von *pmPOX2b* regulatorische Elemente vorhergesagt, welche auf eine Regulation des Gens durch Auxine, Elizitoren, Hitzestress, Methyljasmonat, Salicylsäure und Verwundungsstress hindeuten könnten. Die Genexpression und/oder Aktivität zahlreicher Klasse-III-Peroxidasen wird durch diese Faktoren induziert (Lee et al., 2002; Hiraga et al., 2001). Zusätzlich fanden sich im 5'-UTR von *pmPOX2b* sieben dicht aufeinanderfolgende Elemente, deren Sequenzen Ähnlichkeit mit der Konsensussequenz von *antioxidant-responsive elements* (ARE) zeigten (Abb. 3.8 blau).

Eine vergleichbare Anordnung konnte in *pmPOX1* nicht identifiziert werden. Die Existenz von AREs wird mit einer Regulierung des entsprechenden Gens durch oxidativen Stress in Zusammenhang gebracht. Promotordeletionen des *AtPER1*-Gens, welches für ein Peroxiredoxin in Arabidopsis kodiert, zeigten, dass das Gen bei intakter ARE-Sequenz durch H_2O_2 und Hydrochinone induziert wird (Haslekås et al., 2003). Das Peroxiredoxin AtPER1 wird mit einer Schutzfunktion vor ROS während der Trocknung und Rehydratation von reifen Samen diskutiert (Stacy et al., 1996; Haslekås et al., 1998). Ebenso wurden in Promotoren mehrerer für Catalasen kodierender Gene (*Cat*) aus Mais ARE-Sequenzen identifiziert (Polidoros und Scandalios, 1999). Untersuchungen des *Cat1*-Gens aus Mais verdeutlichten eine Beteiligung von AREs an Genantworten auf H_2O_2 über spezifische Protein-DNA-Interaktionen ähnlich wie in tierischen Systemen. *Cis*-regulatorische Elemente sind jedoch nur einige Basenpaare lang. Daher können Vorhersagen, wie oben für *pmPOX2b* durchgeführt, nur Hinweise auf mögliche Regulationsvorgänge geben.

3.8.2.3 Analyse der Aminosäuresequenzen

In der im Folgenden dargestellten bioinformatischen Analyse der aus den Nukleinsäuresequenzen abgeleiteten Proteine lag der Schwerpunkt der Untersuchungen auf *pmPOX1* und *pmPOX2b*.

3.8.2.3.1 Länge der Aminosäuresequenzen

Die von den Nukleinsäuresequenzen abgeleiteten Polypeptide von *pmPOX1*, *pmPOX2b*, *pmPOX3-1* und *pmPOX3-3* bestehen aus 367, 321, 321 und 320 Aminosäureresten. Die am 5'-Ende unvollständige Sequenz von *pmPOX3-2* kodiert für mindestens 245 Aminosäuren. Eine Größenordnung von 305 – 370 Aminosäureresten ist charakteristisch für Polypeptidketten sekretorischer Peroxidasen (Welinder, 1992) und entspricht auch der Länge der bisher in Mais identifizierten cDNA-Sequenzen von Klasse-III-Peroxidasen (De Obeso et al., 2003; Padegimas und Reichert, 2004; Teichmann et al., 1997). Im Gegensatz dazu sind die Aminosäuresequenzen intrazellulärer Glutathion- und cytosolischer Ascorbatperoxidasen 160 bis 180 bzw. ca. 250 Aminosäuren lang. Eine Ausnahme hiervon bildet die thylakoidgebundenen Ascorbatperoxidase, welche aufgrund ihrer zusätzlichen C-terminalen transmembranen Domäne eine Aminosäuresequenz von über 400 Aminosäuren Länge besitzt (Jespersen et al., 1997).

3.8.2.3.2 Theoretische isoelektrische Punkte, molekulare Massen und putative Glykosylierungsstellen

Aus der Gesamtlänge der Aminosäuresequenzen ließen sich für *pmPOX1*, *pmPOX2b*, *pmPOX3-1* und *pmPOX3-2* deren theoretische isoelektrische Punkte (IEP_{theor}) errechnen. Diese zeigten ein Spektrum aller Kategorien. Während die IEP_{theor} von *pmPOX2b* und

pmPOX3-3 mit 8,94 bzw. 8,39 im kationischen Bereich liegen, ist das aus pmPOX3-1 abgeleitete Protein anionisch ($IEP_{\text{theor}} = 5,39$). Im Gegensatz dazu kann pmPOX1 mit einem Wert von 6,81 als neutral eingestuft werden. Die IEP_{theor} der abgeleiteten Proteine veränderten sich durch die Abspaltung eines vorhergesagten N-terminalen Signalpeptides nicht. Im Vergleich mit den durch isoelektrische Fokussierung experimentell ermittelten isoelektrischen Punkten ($IEP_{\text{exp}} = 5,2$ für pmPOX1 und 5,5 - 7,0 für pmPOX2b) waren die errechneten Werte etwa zwei pH-Stufen alkalischer. Derartige Unterschiede treten jedoch häufig auf (Price et al., 2003; Zimmerlin et al., 1994). So wurde der IEP_{exp} einer Peroxidase aus Hafer (*Hordeum vulgare* L.) mit einem Wert von 8,5 angegeben (Kerby, 1992; Kristensen et al., 1997), für die korrespondierende cDNA wurde ein IEP_{theor} von 6,4 errechnet (Thordal-Christensen et al., 1992). Aufgrund der Unterschiede war eine eindeutige Zuordnung von pmPOX2b zu einer der drei in der isoelektrischen Fokussierung detektierten Gelbanden nicht möglich.

Tab. IX: Vergleich experimentell ermittelter und aus den Sequenzen abgeleiteter theoretischer Charakteristika PM-gebundener Peroxidasen.

(a) N-Terminus unvollständig; (b) ermittelt durch modifizierte nichtreduzierende SDS-PAGE, detektierte Proteine können Oligomere sein; (c) nur eine der drei Sequenzen entspricht wahrscheinlich dem Protein pmPOX3; n.m. nicht ermittelt

	pmPOX1	pmPOX2b	pmPOX3-1	pmPOX3-2 ^a	pmPOX3-3
Anzahl an Aminosäuren	367	321	321	245	320
MW_{nativ} (kDa)	70	38	38 ^c		
MW_{exp}^b (kDa)	98	55	57 ^c		
MW_{theor} (kDa)	38,33	33,39	33,06	25,56	33,47
IEP_{err}	6,8	8,9	5,39	6,31	8,39
Glykosylierung_{exp}	+	+	n.m.		
putative Glykosylierungsstellen	3	3	3	3	3

Übereinstimmend mit der biochemischen Detektion einer Glykosylierung von pmPOX1 und pmPOX2b (siehe Abschnitt 3.7) wurden in den korrespondierenden Aminosäuresequenzen jeweils drei putative N-Glykosylierungsstellen vorhergesagt (NX(S/T)X; X≠P; Abb. 3.11). Diese müssen jedoch nicht alle glykosyliert sein. An den sieben möglichen Glykosylierungsstellen der *Soybean seed coat peroxidase* (SPB) wurden maximal sechs Glykane mit Massen zwischen 0,3 und 2,3 kDa identifiziert (Welinder und Larsen, 2004). Diese extrazelluläre Peroxidase ist zu etwa 18 % der molekularen Masse glykosyliert (Gray und Montgomery, 1997; Gray et al., 1996). Die Mehrheit der Peroxidasen des sekretorischen Stoffwechselweges ist hochgradig N-glykosyliert, obwohl der Anteil an der molekularen Masse 0 - 25 % betragen kann (Welinder, 1992). Da die Glykane von Peroxidasen

Heterogenität zeigen können (Wan et al., 1994; Gray et al., 1996), können verschiedene Proteinbanden eines Polyacrylamidgels das gleiche Polypeptid enthalten. So variierte die massenspektrometrisch ermittelte molekulare Masse der *Soybean seed coat peroxidase* zwischen 39 und 41 kDa, da unterschiedliche Glykosylierungen ein und derselben Polypeptidkette vorlagen (Welinder und Larsen, 2004; Gray und Montgomery, 1997). Wie die bisherigen biochemischen Ergebnisse und bioinformatischen Analysen zeigten, bestehen jedoch alle pmPOX aus unterschiedlichen Polypeptidketten. Die Glykosylierung von Klasse-III-Peroxidasen wurde und wird detailliert untersucht, da sie an der Faltung der Proteine, der Stabilität der Enzyme und an deren katalytischer Aktivität beteiligt zu sein scheint (van Huystee et al., 2004; Lige et al., 2001; van Huystee und McManus, 1998).

Als theoretische molekulare Massen (MW_{theor}) ließen sich für pmPOX1 38,33 kDa, für pmPOX2b 33,39 kDa, für pmPOX3-1 33,06 kDa und für pmPOX3-3 33,47 kDa ableiten (Tab. IX). Die durch modifizierte SDS-PAGE experimentell ermittelten molekularen Massen (MW_{exp} , Abschnitt 3.6) wichen von diesen Werten ab. Die für pmPOX2b und die für pmPOX3 und deren putative Sequenzen ermittelte Differenz ist charakteristisch für glykosylierte, monomere Klasse-III-Peroxidasen. So wurden aus dem Xylem von Pappelholz mehrere stark glykosylierte, lösliche anionische Peroxidasen mit scheinbaren molekularen Massen von 50 und 54 kDa isoliert, welche nach einer Deglykosylierung in einer SDS-PAGE eine molekulare Masse von 37 kDa zeigten (Christensen et al., 1998). Eine glykosylierte apoplastische Extensinperoxidase aus Lupine (*Lupinus albus* L.) zeigte ein MW_{exp} von 51 kDa und ein MW_{theor} der korrespondierenden cDNA von 35 kDa (Price et al., 2003). Thylakoidgebundene, nichtglykosylierte, monomere Ascorbatperoxidasen aus verschiedenen Pflanzenarten wiesen im Gegensatz dazu experimentell ermittelte molekulare Massen von maximal 46 kDa auf (Jespersen et al., 1997; Asada et al., 1996), während die an Glyoxisomen- bzw. Peroxisomenmembranen gebundenen Peroxidasen Werte von 22 - 31 kDa zeigten (Murphy et al., 2003; Nito et al., 2001; Bunkelmann und Trelease, 1996). Zwar ließ sich pmPOX3 noch keiner der drei Nukleinsäuresequenzen eindeutig zuordnen, aufgrund der Länge und hohen Ähnlichkeit der Sequenzen zu Klasse-III-Peroxidasen, der Existenz von putativen Glykosylierungsstellen sowie den Differenzen zwischen MW_{exp} und MW_{theor} scheint es sich jedoch wie bei pmPOX2b um ein glykosyliertes Monomer zu handeln. Aufgrund der Größenordnung der Differenz zwischen MW_{exp} und MW_{theor} scheinen die PM-gebundenen Peroxidasen relativ stark glykosyliert zu sein. Ein weiteres Indiz für eine starke Glykosylierung könnte die fehlende Anfärbbarkeit der PM-gebundenen Peroxidasen sein. Obwohl in den Proteinbanden, welche für die ESI-MS/MS-Analyse verwendet wurden, nachweisbar große Mengen an Protein vorhanden waren, ließ sich keine der Banden durch Coomassie-Colloidal- oder Silberfärbung detektieren.

Im Gegensatz zu pmPOX2b und pmPOX3 ist die Differenz zwischen der experimentellen und theoretischen molekularen Masse von pmPOX1 zu groß, um sie allein durch die vorhandene Glykosylierung erklären zu können (Tab. IX). Die Größenordnung der Differenz deutet auf die Existenz eines Dimers hin. Viele Klasse-I-Peroxidasen wie beispielsweise cytosolische Ascorbatperoxidasen liegen als Homodimere vor (Patterson und Poulos, 1995, Mittler und Zilinskas, 1991), während es sich bei Klasse-III-Peroxidasen in der Regel um Monomere handelt (Welinder, 1992). Eine kristallographisch untersuchte rekombinante, cytosolische Ascorbatperoxidase aus Erbse (*Pisum sativum* L.) lag als nichtkovalent gebundenes Homodimer vor, welches durch eine Reihe von ionischen Wechselwirkungen zwischen Asp, Glu, Arg und Lysinseitenketten zusammengehalten wurde (Patterson und Poulos, 1995). D.h. drei seitliche Helices einer Untereinheit traten mit den gleichen Helices (A, D und J) einer um 180° gedrehten Untereinheit in Wechselwirkung. Diese Aminosäurereste traten an den entsprechenden Positionen der Aminosäuresequenz von pmPOX1 nicht auf. Aufgrund der Unterschiede zwischen Klasse-I- und Klasse-III-Peroxidasen ist dies jedoch nicht verwunderlich. Interessanterweise wurde in pmPOX1 durch Vorhersageprogramme ein sogenanntes Leucinreißverschlussmotiv vorausgesagt. Ein solches Motiv tritt häufig bei DNA-bindenden Proteinen auf und vermittelt eine Dimerisierung von Proteinuntereinheiten, indem charakteristisch angeordnete Leucinreste miteinander in Wechselwirkung treten (Stryer, 1999; Bannister et al., 1991). Für eine dimere humane Peroxidase, die Prostaglandinendoperoxidsynthase 1, wurde bereits eine Dimerisierung des Proteins aufgrund solcher *Leucinzipper*-Regionen diskutiert (Hsi et al., 1993). Rückschlüsse auf eine Dimerisierung von pmPOX1 durch hydrophobe Wechselwirkungen lassen sich allein aus dieser Vorhersage noch nicht ziehen.

3.8.2.3.3 Targeting

Übereinstimmend mit der biochemischen Einstufung der pmPOX als Klasse-III-Peroxidasen und entsprechend der Lokalisierung der isolierten Proteine in der PM detektierten fünf von $n = 5$ Vorhersageprogrammen in pmPOX1, pmPOX2b, pmPOX3-1 und pmPOX3-3 ein N-terminales zum ER dirigierendes Signalpeptid (Abb. 3.11). PSORT sagte für pmPOX2b sogar eine Nichtabspaltung des Signalpeptids und eine Lokalisierung des Enzyms an der PM oder der ER-Membran voraus. De Obeso et al. (2003) fanden für ZmPox1 (pmPOX1) kein Signalpeptid, da der von ihnen postulierte Leserahmen diese N-terminalen Aminosäuren nicht enthielt und zogen den Schluss, dass es sich um ein cytoplasmatisches Protein handeln müsse, obwohl dies mit den strukturellen Charakteristika nicht übereinstimmte.

Charakteristisch für lösliche sekretorische Proteine eukaryotischer Organismen ist die Abspaltung eines N-terminalen Signalpeptids während der Reifung des Proteins. Bei membrangebundenen Proteinen kann das Signalpeptid jedoch erhalten bleiben und

anschließend aufgrund seiner Hydrophobizität als N-terminale transmembrane Domäne fungieren. Heutige Suchalgorithmen können dies jedoch anhand der Sequenz nicht zuverlässig genug voraussagen. Durch Vorhersageprogramme wird für Sequenzen von Klasse-III-Peroxidasen neben der Abspaltung des Signalpeptids eine N-terminale Blockierung durch Pyrrolidincarboxylsäure postuliert, da bei vielen löslichen Klasse-III-Peroxidasen der N-Terminus des reifen Proteins mit dieser Modifikation beginnt (Welinder et al., 2002). Eine solche Modifikation basiert auf einer Abspaltung des Signalpeptids, der daraus resultierenden N-terminalen Positionierung eines Glutamins und dessen zyklischer Umsetzung (Welinder und Larson 2004). Eine Klasse-III-Peroxidase aus Teeblättern (TcPOD II; *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) zeigte eine derartige Modifikation jedoch nicht (Kvaratskhelia et al., 1999). Bisher untersuchte intrazelluläre membrangebundene Ascorbatperoxidasen scheinen diese Modifikation ebenfalls nicht zu besitzen (Murphy et al., 2003; Nito et al., 2001; Jespersen et al., 1997).

Die Aminosäuresequenz von pmPOX1 ist am C-Terminus 46 Aminosäurereste länger als die der anderen pmPOX und als die der meisten Peroxidasen der Klasse III. In einigen bisher beschriebenen Peroxidasen kommen ebenfalls solche Verlängerungen vor (Welinder et al., 2002). Beispielsweise enthalten HRP C und eine Peroxidase aus Hafer (BP 1) eine C-terminale Verlängerung (Johansson et al., 1992; Welinder, 1979), welche anscheinend als Propeptid fungiert und das Targeting der Proteine zur Vakuole bewirkt (Matsui et al., 2003). Während des Imports in die Vakuole werden die entsprechenden Aminosäuren abgespalten. Allerdings spricht die Reinigung von pmPOX1 aus PM-Vesikeln gegen ein solches Targeting. Das zur Vakuole dirigierende Propeptid der HRP C war jedoch nur 15 Aminosäurereste lang (Matsui et al., 2003). Darüber hinaus zeigten HRP C und BP 1 eine C-terminale Heterogenität in ihren Sequenzen. Da die Aminosäuresequenz einer zellwandgebundenen Peroxidase aus Bohne ebenfalls eine C-terminale Verlängerung von etwa 40 Aminosäuren Länge enthält (Blee et al., 2001), sind möglicherweise spezifische Propeptideigenschaften für die spätere Lokalisierung wichtig.

3.8.2.3.4 Topologie

Alle verwendeten Programme zur Vorhersage transmembraner Domänen identifizierten eine N-terminale hydrophobe Domäne in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen von pmPOX1, pmPOX2b, pmPOX3-1 und pmPOX3-3 (Abb. 3.12), welche gleichzeitig Teil des Signalpeptids ist. Zusätzlich wurden in pmPOX2b, pmPOX3-1, pmPOX3-2 und pmPOX3-3 von einigen Programmen eine oder zwei weitere schwach hydrophobe Domänen ermittelt. Aufgrund der wesentlich größeren Sequenzähnlichkeit der bisher unvollständigen Sequenz von pmPOX3-2 zu Peroxidasen des sekretorischen Stoffwechselweges als zu intrazellulären Klasse-I-Peroxidasen ist auch in dieser Sequenz ein Signalpeptid und damit eine

hydrophobe Domäne am N-Terminus zu erwarten. Eine putative Verankerung der pmPOX durch Glycosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker oder Myristoylierung wurde nicht detektiert.

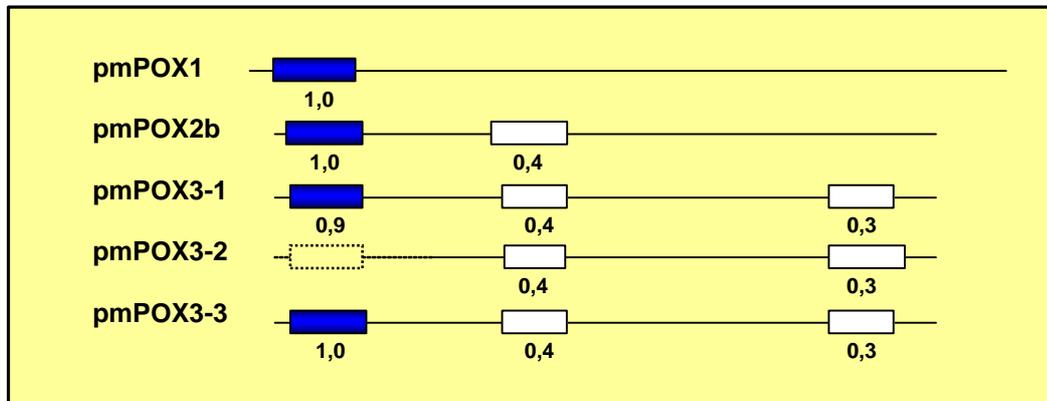


Abb. 3.12: Vorhersage transmembraner Domänen in pmPOX.

Neun bzw. zehn von $n = 10$ verwendeten Programmen zur Vorhersage transmembraner Domänen identifizierten eine N-terminale hydrophobe Domäne in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen von pmPOX1, pmPOX2b, pmPOX3-1 und pmPOX3-3 von Aminosäure 10 bis 29, 6 - 25, 7 - 25 bzw. 7-27 (gemittelt). Zusätzlich wurden von einigen Programmen eine oder zwei weitere schwach hydrophobe Domänen ermittelt (Position 114 - 134 in pmPOX2b bzw. 120 - 136 und 277 - 296 in pmPOX3-1), welche sich im Alignment der Aminosäuresequenzen an homologen Stellen befanden. Das Konsensus-Schema zeigt eine Zusammenfassung der Vorhersagen. Aufgrund der wesentlich größeren Sequenzähnlichkeit von pmPOX3-2 zu Peroxidasen des sekretorischen Stoffwechselweges als zu intrazellulären Klasse-I-Peroxidasen ist auch in dieser Sequenz ein Signalpeptid und damit eine hydrophobe Domäne am N-Terminus zu erwarten.

Wie bereits erwähnt können N-terminale Signalpeptide am reifen Protein verbleiben und als transmembrane Domänen erhalten bleiben. Da in Solubilisierungsexperimenten deutlich wurde, dass die PM-gebundenen Peroxidasen relativ fest an die Membran gebunden sind (Mika, 2001), wäre aufgrund der Sequenzanalyse die Existenz von N-terminalen Membrandomänen die logische Schlussfolgerung. Eine kovalente Bindung der Enzyme an andere integrale Membranproteine hätte sich für pmPOX2b als Differenz zwischen den experimentell ermittelten molekularen Massen der Gelfiltration und SDS-PAGE bemerkbar machen müssen. Aufgrund der für pmPOX1 ermittelten Differenz zwischen MW_{exp} und MW_{theor} wäre eine kovalente Bindung an ein anderes Membranprotein bei Annahme einer monomeren Struktur zwar denkbar. Die Ergebnisse der MALDI-TOF- und ESI-MS/MS-Analysen der Proteinbande aus einer nichtreduzierenden SDS-PAGE, in welcher ein derartiges Protein enthalten sein sollte, deuteten jedoch nicht auf das Vorhandensein eines zweiten Proteins hin. Daher scheint auch pmPOX1 über eine N-terminale Transmembrandomäne an die PM gebunden zu sein. Die für die Gesamtlänge der Aminosäuresequenzen errechneten molekularen Massen scheinen dementsprechend auch für die reifen Enzyme zu gelten.

Über die Topologie membrangebundener Peroxidasen ist noch relativ wenig bekannt. In membrangebundenen Peroxidasen intrazellulärer Membransysteme wurden eine oder mehrere transmembrane Domänen identifiziert (Murphy et al., 2003; Jespersen et al., 1997). Neben diesen Arten der Bindung an die Membran deuten Sequenzanalysen der 138 Sequenzen von Klasse-III-Peroxidasen aus Reis auf die Existenz weiterer Formen von Membranproteinen hin (ARAMEMNON). Unter anderem wurden für OsPrx87 eine in der Mitte der Aminosäuresequenz lokalisierte hydrophobe Domäne und für OsPrx95 ein GPI-Anker vorausgesagt, während OsPrx100 und OsPrx101 möglicherweise Teil eines putativen Mn^{2+} -Transporters sind, der über neun putative Membrandomänen verfügt. Die Expressionsprodukte dieser Gene wurden jedoch bisher noch nicht charakterisiert.

Im Arabidopsisgenom ließen sich neben der an die Thylakoid- und die Peroxisomenmembran gebundenen Ascorbatperoxidasen zwei weitere putative Peroxidasegene finden, für deren abgeleitete Proteine zehn von zehn Vorhersageprogramme eine transmembrane Domäne voraussagten (ARAMEMNON). Eine der beiden (AtPrx43; Q9SZH2) zeigt große Sequenzähnlichkeit zu Klasse-III-Peroxidasen. Das abgeleitete Protein enthält eine putative transmembrane Domäne nahe des N-Terminus', wobei diese jedoch nicht mit dem N-terminalen Signalpeptid überlappt. Interessanterweise wurde für das Protein durch PSORT eine Lokalisierung in der PM von Arabidopsis vorausgesagt. Ein Alignment mit pmPOX1, pmPOX2b, pmPOX3-1, pmPOX3-2 und pmPOX3-3 zeigte jedoch nur geringe Sequenzübereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen (30 - 36 %). Sollte die Vorhersage stimmen, könnte es sich möglicherweise um ein homologes Protein zu pmPOX2a handeln (siehe Abschnitt 3.8.3).

Weiterhin wäre es denkbar, dass aus den für die pmPOX kodierenden Genen *in vivo* nicht nur die PM-gebundenen Peroxidasen sondern auch lösliche Peroxidasen des sekretorischen Stoffwechselweges abgeleitet werden. Während in Arabidopsis zwei verschiedene Gene für die lösliche, frei im Stroma diffundierende sowie die thylakoidgebundene Ascorbatperoxidase kodieren (Jespersen et al., 1997), entstehen die beiden chloroplastidären Enzyme in Spinat, Tabak und Kürbis durch alternatives Spleißen der mRNA eines einzigen Gens (Yoshimura et al., 2002; Mano et al., 1997; Ishikawa et al., 1996). Bei Transkripten mehrerer humaner Peroxidasen, einschließlich der PM-gebundenen Thyroidperoxidase, tritt ebenfalls alternatives Spleißen auf (Knopp et al., 1999; Kimura et al., 1987).

Da sich tierische bzw. humane Peroxidasen beträchtlich in der Struktur, Funktion, Substratspezifität und anderen Charakteristika von pflanzlichen Peroxidasen unterscheiden, konnten aus der Existenz der PM-gebundenen, humanen Thyroidperoxidase (Niccoli-Sire et al., 2001; Kimura et al., 1987) und anderen membrangebundenen Peroxidasen der Superfamilie tierischer und humaner Peroxidasen (Yant et al., 2003; Pfeifer et al., 2001; Takahashi et al., 1992) keine Rückschlüsse über die Bindung der pmPOX an die Membran gezogen werden.

Über die Orientierung der pmPOX in der Membran, d.h. der Lokalisierung des aktiven Zentrums auf der Außen- oder Innenseite der PM, ist noch nichts bekannt. Zwar postulierte Askerlund et al. (1987) die Lokalisierung einer Peroxidaseaktivität aus PM von Blumenkohlinfloreszenzen auf der apoplastischen Seite der Membran, da sich die NADH-Oxidaseaktivität der isolierten Vesikel nach Zugabe des Detergenzes Triton X-100 nicht änderte. Bei der Isolierung von Plasmamembranvesikeln entstehen etwa 95 % *Right-side-out*-Vesikel, d.h. Vesikel, bei denen die apoplastische Seite der Membran nach außen zeigt (Larsson et al., 1987). Die für NADH zunächst impermeable Membran wurde nach Zugabe des Detergenzes durchlässig (Askerlund et al., 1987). Allerdings waren bereits in Messungen ohne Detergenz 0,5 % Dimethylsulfoxid im Versuchsansatz enthalten, welches die Permeabilität der Membran bereits von Anfang an verändert haben könnte. Im Gegensatz dazu ermittelten Vianello et al. (1997) an PM-Vesikeln aus Sojabohnenwurzeln eine Steigerung der NADH-Oxidation nach Zugabe verschiedener Detergenzien (Brij 58, CHAPS, Triton X-100). Reine *Right-side-out*-Vesikel aus Maiswurzeln zeigten etwa 10 % höhere Guaiacolperoxidaseaktivitäten als *Inside-out*-Vesikel, während nach einer Zugabe von Detergenzien identische Raten zu verzeichnen waren (Mika, 2001). H₂O₂ kann jedoch auch in Abwesenheit von Detergenzien durch die Membran permeieren und für Guaiacol ist eine solche Möglichkeit nicht auszuschließen. Eine Beteiligung löslicher cytosolischer oder apoplastischer Peroxidasen kann für die Experimente ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Obwohl pmPOX1 und pmPOX2 hinsichtlich der Substratspezifität und anderer biochemischer Charakteristika mehr Ähnlichkeit zu apoplastischen als zu cytosolischen Peroxidasen zeigten, ließ sich aus diesen Untersuchungen noch keine eindeutige Lokalisierung der PM-gebundenen Peroxidasen ermitteln. Die Glykosylierung in Kombination mit der Positionierung der putativen Glykosylierungsstellen von pmPOX1 und pmPOX2b deutet jedoch auf eine Lokalisierung des aktiven Zentrums der beiden Enzyme auf der apoplastischen Seite der Membran hin. Die Oligosaccharide von glykosylierten, membrangebundenen Proteinen der Zellmembran tierischer und humaner Zellen sind ausschließlich auf der extrazellulären Seite der Membran lokalisiert, während deren intrazelluläre Seite keine Zuckerreste aufweist (Lehninger et al., 1998). Die Gesamtheit dieser Glykosylierung wird auch als Glykokalix bezeichnet und spielt unter anderem eine wesentliche Rolle für Zellerkennungsprozesse sowie für die proteolytische Halbwertszeit eines Proteins (Stryer, 1999; Olden et al., 1985). Neueste Erkenntnisse deuten darauf hin, dass auch die beiden *Layer* der PM pflanzlicher Zellen sehr unterschiedlich zusammengesetzt sind (Ikonen, 2001; Brown et al., 2000; Le Gall et al., 1995) und Glykosylierungen möglicherweise ebenfalls nur auf der Außenseite auftreten. Aus der Voraussage transmembraner Domänen am N-Terminus und nicht innerhalb der

Aminosäuresequenz der PM-gebundenen Peroxidasen, der biochemisch ermittelten Glykosylierung von pmPOX1 und pmPOX2b (siehe Abschnitt 3.7) und der Position der putativen Glykosylierungsstellen resultiert eine mögliche Lokalisierung der Peroxidaseaktivität beider Enzyme auf der Außenseite der Membran.

3.8.2.3.5 Disulfidbrücken

Die für Peroxidasen der Klasse III charakteristischen acht konservierten Cysteinreste zur Bildung von vier Disulfidbrücken (Welinder et al., 2002) waren in allen Aminosäuresequenzen an den entsprechenden Positionen enthalten. Die Ausbildung der Disulfidbrücken in pmPOX1 wurde nach einem konservierten Muster wie folgt vorausgesagt: C₄₄ → C₁₂₅, C₇₇ → C₈₂, C₁₃₁ → C₃₃₅, C₂₀₉ → C₂₄₄. Entsprechend erfolgt die Brückenbildung in pmPOX2b zwischen C₃₆ → C₁₁₆, C₆₉ → C₇₄, C₁₂₂ → C₃₁₇ sowie C₂₀₁ → C₂₂₆. Die zur Bildung einer Salzbrücke konservierten Aminosäurereste, ein Asparaginsäure- und ein Argininrest, waren ebenfalls in allen Sequenzen vorhanden. In pmPOX2b traten sie in Position 124 und 148 auf.

3.8.2.3.6 Aktives Zentrum und konservierte Bereiche

Die Sequenzen pflanzlicher Peroxidasen enthalten drei konservierte Bereiche, von denen zwei für die Enzymaktivität von essentieller Bedeutung sind (Welinder et al., 1992). An Position 66 bis 77 bzw. 58 bis 69 fanden sich in pmPOX1 und pmPOX2b das aktive Zentrum bzw. die sogenannte distale Hämbindestelle (*distal heme binding site*). An Position 194 bis 204 bzw. 186 bis 196 wurde die proximale Hämbindestelle identifiziert. Neben den Ergebnissen der Experimente mit Effektoren, den Absorptionsspektren und der Anfärbbarkeit der Proteine durch Hämfärbung ist dies eine weitere Bestätigung für die Existenz von Hämgruppen als prosthetische Gruppe. In Abb. 3.11 sind die essentiellen Histidinreste zur Bindung der Hämgruppe innerhalb der konservierten Domänen blau unterlegt. Darüber hinaus ist die Zusammensetzung und Anordnung der Aminosäurereste in diesen Regionen charakteristisch für Klasse III-Peroxidasen, d.h. Guajacolperoxidasen. Die dritte konservierte Region, eine zentrale konservierte Domäne unbekannter Funktion, fand sich in pmPOX1 und pmPOX2b an Position 128 bis 144 bzw. 119 bis 135.

3.8.2.3.7 Strukturelles Calcium

Entsprechend der Charakterisierung bzw. Identifizierung der pmPOX als Klasse-III-Peroxidasen waren auch potentielle Calciumbindestellen vorhanden (Abb. 3.11 rosa), da sekretorische pflanzliche Peroxidasen definitionsgemäß zwei strukturelle Calciumionen enthalten (Abb. 3.13; Welinder et al., 1992). In pmPOX1 befinden sich die Aminosäurereste zur Bindung von Calcium 1 in Position 76, 79, 81, 83 und 85 sowie die für Calcium 2 in

Position 203, 259, 262 und 267. Einige Peroxidasen reagieren bei einem Verlust des Ca^{2+} mit einem Absinken der thermalen Stabilität und Konformationsänderungen des aktiven Zentrums (van Huystee et al., 1996). Da jedoch sowohl die Guaiacolperoxidaseaktivität von pmPOX1 und pmPOX2 (siehe Abschnitt 3.2.1) als auch deren AOS-Produktion (siehe Abschnitt 3.3.2) nicht durch Calcium stimuliert sondern gehemmt wurde, sind möglicherweise andere Kationen involviert. So deuteten Kristallographische Untersuchungen von Distanzen zwischen Metall und Liganden und Berechnungen der Elektroneutralität einer rekombinanten cytosolischen Ascorbatperoxidase aus Erbse darauf hin, dass in diesem Enzym K^+ statt Ca^{2+} als strukturelles Kation vorgezogen wird (Patterson und Poulos, 1995). Eine sekretierte Peroxidase aus Erdnuss enthielt neben den zwei Calciumionen ein Mn^{2+} , welches möglicherweise eine regulatorische Funktion ausübt (van Huystee et al., 1996).

3.8.2.3.8 Dreidimensionale Struktur

Mindestens sechs verschiedene pflanzliche Peroxidasen des sekretorischen Stoffwechselweges wurden bisher bereits kristallographisch aufgeklärt (Henriksen et al., 2001; Mirza et al., 2000; Østergaard et al., 2000; Henriksen et al., 1998; Gajhede et al., 1997; Schuller et al., 1996). Obwohl die Anzahl von α -Helices variiert, liegen 12 der Helices und zwei kurze β -Faltblätter in Peroxidasen der Klasse III konserviert vor. Auch die Tertiärstruktur der Peroxidasen ist trotz größerer Sequenzunterschiede sehr ähnlich. So wiesen die Tertiärstrukturen von bisher aufgeklärten Klasse-I-Peroxidasen wie beispielsweise die der Cytochrom-c-Peroxidase aus Bierhefe, welche weniger als 40 % Sequenzähnlichkeit zu Klasse-III-Peroxidasen zeigen, große strukturelle Übereinstimmungen mit kristallographisch untersuchten Klasse-III-Peroxidasen auf. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten erschien eine 3D-Modellierung der PM-gebundenen Peroxidasen möglich. In Abb. 3.11 ist die vorhergesagte Sekundärstruktur von pmPOX1 und pmPOX2b dargestellt. Unter Einbeziehung der Existenz einer N-terminalen transmembranen Domäne in beiden Enzymen wurden in pmPOX1 bzw. pmPOX2b 18 bzw. 16 α -Helices sowie die zwei konservierten β -Faltblätter an fast identischen Positionen modelliert. Auch die modellierte Tertiärstruktur beider Peroxidasen unterschied sich kaum. Abb. 3.13 zeigt beispielhaft die putative 3D-Struktur von pmPOX1 im Vergleich mit HRP E5 und der als Matrize (*Template*) verwendeten *Soybean seed coat peroxidase*.

Die Anordnung der Helices und Faltblätter sowie die Positionierung der Hämgruppe, der beiden Calciumionen und der Disulfidbrücken ist dargestellt. Der modellierte Bereich der dreidimensionalen Struktur erstreckte sich entsprechend der Sequenzähnlichkeiten sowie der Länge der als Matrize verwendeten Proteine von Aminosäure 29 - 346 für pmPOX1 sowie von Aminosäure 21 - 321 für pmPOX2b.

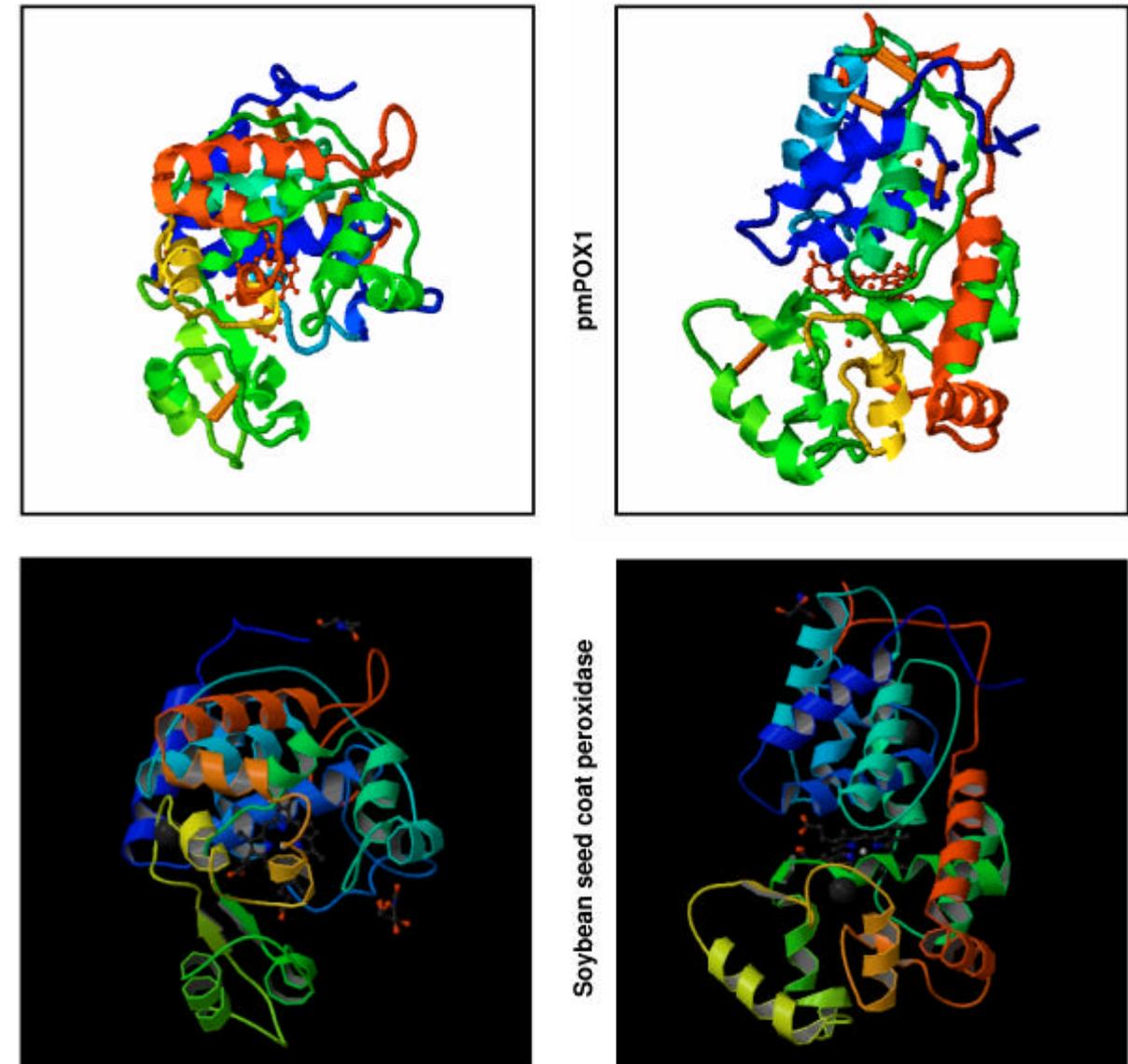
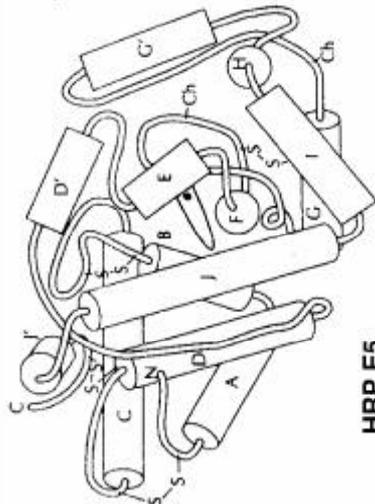


Abb. 3.13: Modellierung der 3D-Struktur von pmPOX1.

Von den bisher kristallographisch aufgeklärten pflanzlichen Peroxidasen zeigte die Soybean seed coat peroxidase (SBP; 1FHF unter <http://www.rcsb.org/pdb>; Weinder und Larsen, 2004; Henriksen et al., 2001), sowie eine aus Arabidopsis stammende Peroxidase (1QO4, 1PA2; Nielsen et al., 2001; Østergaard et al., 2000) die größte Sequenzähnlichkeit zu pmPOX1 (44,4 % bzw. 43,9 %). Daher wurden diese Proteine zur 3D-Modellierung (SwissModel) herangezogen. Template und Modell unterschieden sich, wie zu erwarten war, nur geringfügig. Der potentielle N-terminale Membrananker ist nicht dargestellt, da dieser aufgrund eines fehlenden Gegenstücks in den kristallographisch aufgeklärten



Proteinen nicht modelliert werden konnte. Verschiedene Ansichten der SBP (Mitte) und pmPOX1 (Rechts; Disulfidbrücken, gelb; Hämgruppe und beide strukturellen Calciumionen, rot).

Die Aminosäuresequenz von pmPOX2b war SPB und einer kationischen Peroxidase aus Erdnuss (1SCH; Schuller et al., 1996) am ähnlichsten (46,9 bzw. 63,8%). Das abgeleitete 3D-Modell zeigte große Ähnlichkeit zu pmPOX1 (nicht dargestellt).

Zur Verdeutlichung der Struktur ist zusätzlich die Tertiärstruktur einer basischen Peroxidase aus Meerrettich (HRP E5; Links) als Schema abgebildet. Das Eisenatom der Hämgruppe ist als schwarzer Punkt dargestellt. α -Helices sind von A-J durchnummeriert. Glykosylierungsstellen (Ch) sowie N- und C-Terminus sind markiert.

3.8.2.3.9 Homologien

Die aus den Nukleinsäuresequenzen von pmPOX2b, pmPOX3-1, pmPOX3-2 und pmPOX3-3 abgeleiteten Proteine zeigten untereinander einen hohen Grad an Sequenzidentität (63 - 98 %), während die Aminosäuresequenz von pmPOX1 mit diesen wesentlich weniger übereinstimmte (41 - 42 %). Deutlich wurde dies auch in einem Alignment der pmPOX mit allen sekretorischen Peroxidasen aus Reis. Nach Passardi et al. (2004) ließen sich die 138 Peroxidasen der Klasse-III aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in acht Gruppen bzw. 16 Untergruppen einordnen. Während pmPOX1 die größte Übereinstimmung bzw. Ähnlichkeit mit Peroxidasen der Untergruppe I.4 aus Reis zeigte, ließen sich sowohl pmPOX2b als auch pmPOX3-1, pmPOX3-2 und pmPOX3-3 in Untergruppe IV.3 einordnen (Abb. 3.14). Falls es sich bei *pmPOX3-1*, *pmPOX3-3* und *ZmPrx6* um eigenständige Gene handelt (siehe Abschnitt 3.8.2.1), so deutet die gemeinsame Homologie aller drei Peroxidasesequenzen zu OsPrx110 darauf hin, dass es sich um Genduplikate handeln könnte (Abb. 3.14). Darüber hinaus zeigten Alignments mit den *full length* Sequenzen aller bisher verfügbaren Klasse III-Peroxidasen aus Mais, dass zu jeder der von Passardi et al. (2004) aufgestellten 16 Untergruppen homologe Peroxidasen vorhanden sind (Daten nicht dargestellt). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in Abb. 3.14 zum größten Teil auf die Darstellung von Einzelsequenzen verzichtet.

Im Folgenden wurden im Zusammenhang mit Peroxidasesequenzen aus Spezies, deren Genom noch nicht vollständig sequenziert wurde, der Begriff Homologie vermieden, da noch unbekanntere ähnliche Sequenzen existieren könnten.

Von allen 138 Klasse-III-Peroxidasen aus Reis wurden OsPrx12 bzw. OsPrx109 als ähnlichste Proteine, d.h. Homologe zu pmPOX1 und pmPOX2b, identifiziert (Abb. 3.14, Tab. X, Tab. XI). In Alignments der pmPOX mit allen 73 Klasse-III-Peroxidasen des Arabidopsisgenoms zeigte AtPrx52 (*Arabidopsis thaliana peroxidase 52*) mit 75 % die größte Sequenzähnlichkeit zu pmPOX2b. Diese scheint daher das homologe Protein zu sein. Das pmPOX1-ähnlichste Protein aus Arabidopsis, AtPrx3, zeigte jedoch nur 56 % Sequenzähnlichkeit (Tab X). Da nach Welinder et al. (2004) bei Peroxidasen wahre Orthologie erst ab einer Sequenzähnlichkeit von ≥ 90 % auftreten soll, besitzt Arabidopsis möglicherweise keine orthologe Peroxidase zu pmPOX1.

Obwohl die Aminosäuresequenzen aus Reis häufig die größte Ähnlichkeit zu Proteinen aus Mais zeigen, ließen sich für pmPOX1 und pmPOX2b in anderen monokotylen Pflanzen noch ähnliche Sequenzen finden. So wies eine putative Peroxidase aus Zuckerrohr (TC50964, *Saccharum officinarum* L.) eine Sequenzähnlichkeit von 89 % zu pmPOX1 auf (Tab. X), während eine putative Peroxidase aus Hafer (TC143417) mit 82 % pmPOX2b am ähnlichsten war (Tab. XI).

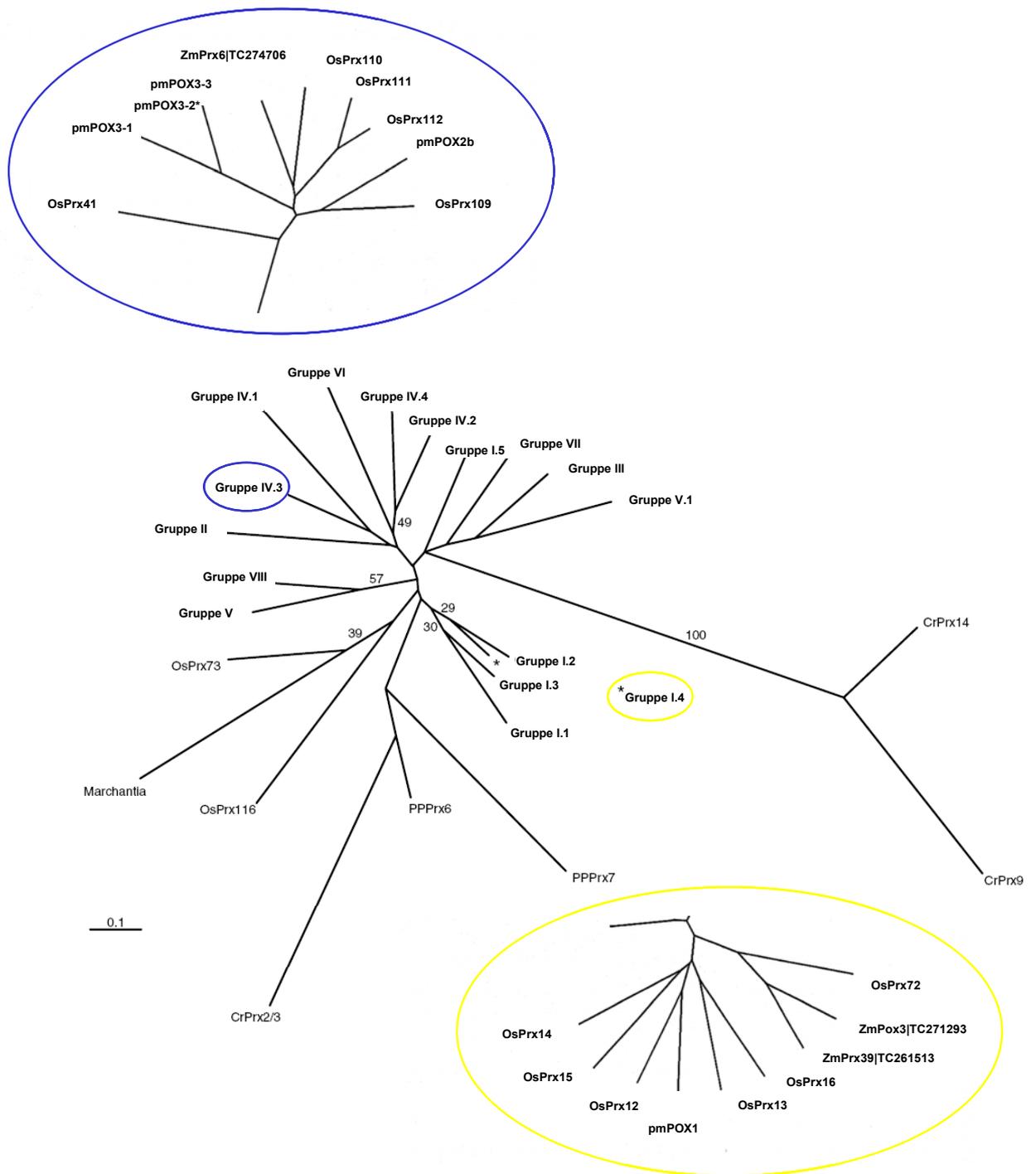


Abb. 3.14: Einordnung der pmPOX in einen phylogenetischen Baum von Klasse-III-Peroxidasen aus Reis.

Nach Passardi et al. (2004) ließen sich alle 138 Klasse-III-Peroxidasen aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in acht Gruppen (I-VIII) bzw. 16 Untergruppen einordnen. Der hier dargestellte nichtverwurzelte phylogenetische Baum zeigt eine Übersicht über die in *O. sativa* vorhandenen Untergruppen (**Mitte**; Passardi et al., 2004) und detaillierte Ausschnitte der Untergruppen, zu denen die Sequenzen der pmPOX die größte Ähnlichkeit zeigten (**oben und unten**). Der von Passardi et al. (2004) erstellte mittlere Baum basiert auf einer ausgewählten cDNA-Sequenz jeder Untergruppe und wurde nach der *maximum-likelihood* Methode erstellt. Zusätzlich wurden vollständige Peroxidasesequenzen des Farns *C. richardii*, des Lebermooses *M. polymorpha* und des Mooses *P. patens* eingebunden. Angegebene Zahlen zeigen *Bootstrap*-Werte an, welche größer als 20 % sind. Alle Äste der mittleren Graphik wurden skaliert. Der Standardbalken entspricht 0,1 *Substitution per Site*. Peroxidasen sind teilweise durch zwei Namen charakterisiert: Einem Trivialnamen oder der Listenbezeichnung der Schweizer Datenbank pflanzlicher Peroxidasen PeroxiBase (z.B. OsPrx) folgt der entsprechende Sequenzeintrag von TIGR (z.B. TC263233). pmPOX1 zeigte die größte Sequenzübereinstimmung zu Peroxidasen aus Untergruppe I.4 (**unten rechts**, Ausschnitt aus Gruppe I.4 mit weiteren homologen Peroxidasen aus *Z. mays*), während pmPOX2b, pmPOX3-1, pmPOX3-2 und pmPOX3-3 mit Peroxidasen aus *O. sativa* der Gruppe IV.3 korrespondierten (**oben rechts**, Ausschnitt aus Gruppe IV.3). Unvollständige Sequenz (*)

Tab. X: Homologe und ähnlichste Sequenzen zu pmPOX1 aus anderen Pflanzenarten.

Zusätzlich wurde die ähnlichste Peroxidase aus Mais ermittelt. Neben den 73 bzw. 138 Peroxidasen der Klasse III aus Arabidopsis und Reis wurden Datenbanken zum Alignment herangezogen, welche auf genomischer DNA, cDNAs und/oder EST-Contigs basieren (siehe Material und Methodenteil). Bisher wurden in Datenbanken der genannten Pflanzenarten mit Ausnahme von Baumwolle (73) und Tabak (31) weit mehr als jeweils 100 putative Peroxidasesequenzen eingetragen. In Weizen ließen sich über 500 Sequenzen Peroxidasen zuordnen (TIGR, Genindices). Dargestellt sind die Sequenzidentitäten und –ähnlichkeiten der abgeleiteten Proteine.

Sequenz ID	Bezeichnung	Spezies		Identität (%)	Ähnlichkeit (%)
TC254065	Peroxidase ZmPrx49	<i>Z. mays</i>		64	70
Q5U1T1	Peroxidase OsPrx12	<i>O. sativa</i>	Monokotyle	70	74
TC142318	putative Peroxidase	<i>H. vulgare</i>		72	76
TC50964	putative Peroxidase	<i>S. officinarum</i>		86	89
TC102107	putative Peroxidase	<i>S. bicolor</i>		51	62
TC238988	putative Peroxidase	<i>T. aestivum</i>		70	74
O23044	Peroxidase AtPrx3	<i>A. thaliana</i>		Dikotyle Pflanzen	42
TC28971	Putative Peroxidase	<i>G. hirsutum</i>	45		57
TC207747	Putative Peroxidase	<i>G. max</i>	47		57
TC164601	Putative Peroxidase	<i>L. esculentum</i>	42		55
NP916988	Putative Peroxidase	<i>N. tabacum</i>	43		55

Tab XI: Homologe und ähnlichste Sequenzen zu pmPOX2b aus anderen Pflanzenarten.

Zusätzlich wurde die ähnlichste Peroxidase aus Mais ermittelt (Details siehe Tab. X).

Sequenz ID	Bezeichnung	Spezies		Identität (%)	Ähnlichkeit (%)
Q97TS9	Peroxidase ZmPrx6	<i>Z. mays</i>		70	74
Q5U114	Peroxidase OsPrx109	<i>O. sativa</i>	Monokotyle	77	81
TC143417	Putative Peroxidase	<i>H. vulgare</i>		74	82
TC67678	Putative Peroxidase	<i>S. officinarum</i>		64	75
TC93955	Putative Peroxidase	<i>S. bicolor</i>		66	77
Q43220	Peroxidase TaPOX4	<i>T. aestivum</i>		73	79
Q9FLC0	Peroxidase AtPrx52	<i>A. thaliana</i>		Dikotyle Pflanzen	62
Q7XYR7	Peroxidase pod7	<i>G. hirsutum</i>	62		75
TC206181	Putative Peroxidase	<i>G. max</i>	61		74
TC165410	Putative Peroxidase	<i>L. esculentum</i>	58		74
Q9XIV9	Peroxidase tpoxC1	<i>N. tabacum</i>	59		73

Vergleiche der pmPOX mit deren ähnlichsten Sequenzen aus verschiedenen dikotylen und monokotylen Pflanzenarten zeigten eine Gruppierung der Sequenzen aus Monokotylen, d.h. eine größere Sequenzähnlichkeit dieser Proteine untereinander. Dieses Phänomen war bei pmPOX1 nicht nur anhand der prozentualen Sequenzähnlichkeiten bzw. Sequenzübereinstimmungen der abgeleiteten Proteine stärker ausgeprägt, sondern wurde auch aufgrund bestimmter Charakteristika der Sequenzen deutlich. So zeigten die ähnlichsten Peroxidasen aus Monokotylen ohne Ausnahme eine C-terminale Verlängerung (siehe auch Abschnitt 3.8.2.3.3), die ähnlichsten Peroxidasen aus Dikotylen enthielten eine solche nicht.

pmPOX1 sowie pmPOX2b zeigten 39 bzw. 48 % Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz zu HRP C1, der bekanntesten und am besten untersuchten Klasse-III-Peroxidase. Intrazelluläre Glutathionperoxidasen und Peroxidasen der Klasse I und II aus Bakterien, Pilzen und Pflanzen einschließlich Mais wiesen Sequenzidentitäten von 4 - 18 % auf. Catalasen aus Mais, pflanzliche Peroxiredoxine, bekannte Peroxidasen tierischen und humanen Ursprungs, einschließlich der humanen PM-gebundenen Thyroidperoxidase, sowie die Peroxidasedomäne humaner Dualoxidasen zeigten keinerlei Sequenzidentität zu den PM-gebundenen Peroxidasen aus Maiswurzeln (3 - 9 %).

Als ähnlichste Klasse-III-Peroxidasen innerhalb des Maistranskriptoms wurden ZmPrx49 bzw. ZmPrx6 identifiziert (Tab. X, Tab. XI). Nicht nur die Allotetraploidie des Maisgenoms (Walbot und Petrov, 2001), sondern auch die Entstehung der gesamten Superfamilie pflanzlicher Hämperoxidasen scheint durch Genduplikationsereignisse in der Evolution erfolgt zu sein (Zámocký, 2004; Duroux und Welinder, 2003). Da ZmPrx49 und ZmPrx6 jedoch nur Sequenzähnlichkeiten von bis zu 74 % zeigten, scheint es sich nicht um kürzlich entstandene Genduplikate zu handeln.

Interessanterweise wurde keines der homologen bzw. ähnlichsten Proteine bisher auf Proteinebene identifiziert. Neben der Veröffentlichung der Nukleinsäuresequenzen und deren Analyse wurde nur die Regulation der korrespondierenden Gene auf Transkriptebene untersucht (Hiraga et al., 2000b; Llorente et al., 2002; Baga et al., 1995). Über die Lokalisierung der homologen Peroxidasen ist daher nichts bekannt.

Fazit

Die Identifizierung der Nukleinsäuresequenzen der pmPOX ermöglichte erstmals eine Aminosäuresequenzanalyse membrangebundener Peroxidasen des sekretorischen Stoffwechselweges. Neben der Bestätigung von biochemisch ermittelten Ergebnissen hinsichtlich der pmPOX konnten typische Charakteristika von Klasse-III-Peroxidasen sowie neue Erkenntnisse über diese Enzyme abgeleitet werden.

3.8.3 *In silico* Cloning und bioinformatische Sequenzanalyse von pmPOX2a

In Gelen, in welchen pmPOX2a-haltige Fraktionen aufgetrennt wurden, wurde durch Häm-färbung eine sehr breite und intensive Bande sowie zwei schwache schmale Banden detektiert, welche molekulare Massen von 138, 184 und >200 kDa aufwiesen (siehe Ergebnisteil 3.6). Aufgrund einer starken Intensivierung der 138 kDa-Bande mit zunehmender Akkumulation bzw. Reinigung wurde diese pmPOX2a zugeordnet. In einer massenspektrometrischen Analyse dieser Bande durch ESI-MS/MS wurden sieben verschiedene Peptide identifiziert (siehe Abschnitt 3.8.1 Tab. VII), anhand derer durch Datenbankanalysen eine putative Nukleotidsequenz zusammengefügt werden konnte (Abb. 3.15). Diese Nukleotidsequenz zeigt jedoch große Ähnlichkeit zu sogenannten Glycerophosphodiester-Phosphodiesterasen (GDPD), welche bisher in Pflanzen kaum beschrieben wurden (van der Rest et al., 2004; 2002).

GDPDs (EC 3.1.4.46) setzen Glycerophosphodiester wie Glycerophosphocholin, Glycerophosphoethanolamin, Glycerophosphoglycerol oder Bis(glycerophospho-glycerol) in Gegenwart von H₂O zu sn-Glycerol-3-Phosphat und dem entsprechenden Alkohol um. Aktivitäten von GDPDs wurden in Bakterien (Shang et al., 1997; Munson und Sasaki, 1993; Tommassen et al., 1991), Hefen (Patton et al., 1995; Paltauf et al., 1985) und Säugern (Spanner und Ansell, 1987; Dawson, 1956) wiederholt untersucht. In Pflanzen wurden jedoch erst vor Kurzem zwei GDPDs, ein zellwandgebundenes und ein möglicherweise in der Vakuole lokalisiertes lösliches Enzym, aus Zellsuspensionskulturen der Karotte (*Daucus carota* L.) beschrieben (van der Rest et al., 2004; 2002).

Die in Mais identifizierte Nukleotidsequenz, im Folgenden als *ZmGDPD1* bezeichnet, wurde anhand von Peptid 1 und 7 identifiziert und aus 38 überlappenden ESTs zu einer putativen cDNA von 2762 Basenpaaren Länge zusammengesetzt (CD438382, CO524253, CO524254, TC255295; BQ635566, CN844386, AI795282, CD987682, CF638286, CD973606, CD986944, CD977823, CD975254, CD975129, CD977724, CD975305, CD973224, CD974975, CF635232, AI978046, CA400655, CF635686, CF624042, CD987878, BG836725, CA404135, AI622191, CD990459, CF057969, CD986278, CD986182, CF052273, CD977388, CD996916, CF634605, CA404754, CF057944, CF058930, BG354262, TC249816). Die Reihenfolge bzw. Anordnung der ESTs erfolgte durch Vergleiche mit einer partiell vorhandenen genomischen DNA (MAGI_26775; 2157 bp) und ähnlichen Aminosäuresequenzen putativer GDPDs aus Arabidopsis und Reis. Ein kurzer Abschnitt von 59 Basenpaaren bzw. 20 Aminosäuren in der Mitte der Sequenz wurde anhand der genomischen DNA ergänzt, da ein korrespondierender EST nicht vorhanden und keine Anzeichen für das Auftreten eines Introns in diesem Abschnitt der genomischen Sequenz zu finden waren (Abb. 3.15 türkis).

Mit guten massenspektrometrischen Daten können zwei Peptide für die Identifizierung eines Proteins ausreichen, sofern es keine besonders ähnlichen Sequenzen gibt. In diesem Fall gab es keine anderen Nukleotidsequenzen, in welchen diese Peptide in einem sinnvollen Leserahmen vorkamen bzw. es waren keinerlei ähnliche Peptide in anderen Sequenzen vorhanden. Aufgrund der im Maisgenom zahlreich vorhandenen Genduplikate könnte es jedoch auch eine bisher unbekannt weitere Sequenz geben, welche sehr große Ähnlichkeit zu *ZmGDPD1* hat und welche bisher nicht in Datenbanken verfügbar ist. Einen Hinweis darauf stellen die Aminosäuremikrosequenzen der durch ESI-MS/MS identifizierten Peptide 4, 5 und 6 dar, welche nur in einer ähnlichen Form in *ZmGDPD1* zu finden waren (Abb. 3.15). Ähnlichere oder identische Mikrosequenzen zu diesen Peptiden waren jedoch an homologen Stellen in putativen GDPDs aus Reis zu finden. Daher scheinen es keine Verunreinigungen durch andere Proteine zu sein. Dennoch handelt es sich bei dem isolierten Protein um eine putative GDPD. Für Peptid 2 und 3 waren in allen verfügbaren Datenbanken keine korrespondierenden Sequenzen zu finden. Entsprechende Massen mit ähnlichen Mikrosequenzen kamen in Peroxidasesequenzen nicht vor. Die putative cDNA von *ZmGDPD1* enthält einen offenen Leserahmen von 2250 bp Länge mit einem Translationsstart in Position 280. Die partiell vorhandene genomische Nukleinsäuresequenz deutet auf die Existenz von mindestens vier Introns hin (Abb. 3.15). Das abgeleitete Protein besteht aus 750 Aminosäureresten. Im Vergleich dazu waren bisher identifizierte GDPDs aus *Escherichia coli* nur 357 bis 392 Aminosäuren lang (van der Rest et al., 2004; Tommassen et al., 1991). In Arabidopsis und Reis lassen sich durch Datenbankanalysen jedoch mehrere putative Glycerophosphodiesterasen finden, welche hohe Sequenzähnlichkeiten (>60 %) zu *ZmGDPD1* zeigten und für welche Längen von 740 - 760 Aminosäuren vorhergesagt wurden.

ZmGDPD1 enthält sieben potentielle Glykosylierungsstellen (Abb. 3.15, grün). Aus der Sequenz abgeleitet ergibt sich eine theoretische molekulare Masse von 81,40 kDa und ein theoretischer isoelektrischer Punkt von 5,25. Diese Ergebnisse stimmen durchaus mit der biochemisch ermittelten Glykosylierung des partiell gereinigten Proteins überein. Die Differenz zwischen theoretisch und experimentell ermittelter molekularer Masse ($MW_{\text{exp}} = 138 \text{ kDa}$) lässt sich durch die offensichtlich starke Glykosylierung erklären. Dieses Phänomen wurde auch für die aus Karottenzellen partiell gereinigte, zellwandgebundene GDPD beobachtet (van der Rest et al., 2004). Darüber hinaus wurde für die aus Karotte isolierte GDPD anhand der Differenz aus nativer molekularer Masse (275 kDa) und denaturierter molekularer Masse von 55 kDa nach SDS-PAGE eine oligomere Struktur postuliert. Im Gegensatz dazu scheint das in der vorliegenden Untersuchung isolierte 138 kDa-Protein aus Maiswurzeln ein Monomer zu sein. Der theoretische isoelektrische Punkt des von *ZmGDPD1* abgeleiteten Polypeptids könnte auf eine mögliche Überein-

CTCTCTCTCGGTCTTAAAAATCCAGCGCCAACGCGGCCGCCGGAC 45

GCGCATTGCTCTCCCTCTCTGCCTCGTCTCTCACCTCATCTCGCCACATCTTCTCTGCTCCCTCTCCAGGTG 123
 CGTTTCTGGAGCTCCAGCTCTCGAGCTGCGTCTGTCTACGCCGCGCGGTTGTGCTTGGGTGGCGGCAGCCCGCA 201
 ATGGGAGGAGCGCGCTGCCCTTCTCGTTCCGCCAGCTGCTCTCCTGCTGCTCTCGCTCGGCTCC 279

M G R S S R A C S L L G S A Q L L L L L L L L S L G S
 TTTTTCGCCAGAAGGGCTCCACATGGAAGACCCTGAGCGCAAGGCTCCAGTAATCGTTGCTAAGGGCGGTTCTCC 357
 F F A Q K G S T W K T L S G K A P V I V A K G G F S
 GGTCATTTCTGATTCAGTGATTTGCTTATCGGATTTGGGACCATTAGCTCCCTGACACAGTCATGTGGTGT 435
 G L F P D S S D F A Y R I L G T I S S P D T V M W C
 GATGTTCCGTTGACAAAGGATGGCGATGGTATCTGCCTACCGAGCATAAACATGGATAACTGCACATGATAGACAAT 513
 D V R L T K D G D G I C L P S I N M D C T M I D N
 GTTTTCCGAAGGAAGAAGACCTACAATGTTAATGGTGATCTACGGTGGGATGGTTCTCCGTGGACATACGAGC 591
 V F P E G K K T Y N V N G V S T V G W F S V D Y T S
 ACTGATCTGTCGCAACCTGACACTGAAGCAATCGGTCTTATCTCGTACCCTGTGTATGATGGTCCATGTTGATA 669
 T D L L P V T L K Q S V L S R T P V Y D G S M L I
 AATTCTGTTAAATGTTTACCTCATTTAAGCCTCGAGTTTGGTTAAATGTCAGCAAGACAGTTTCTACAGC 747
 N S V E N V F T S F N A S A V W L N V Q Q D S F Y S
 CAGTTAAGCTTAGCATGCGAAACTATATCTGTCTTTATCGAAACAATTATTACTGATTACATCTCATCGCTGAA 825
 Q F K L S M R N Y A I L S L S K Q F I T D Y I S S P E
 GTGAACCTTCCCTACCAGTATATCTGGAAGGTTAGCAAGGATTAAGCAAGCTTGTGTTCCGCTTTCTTGACGAAGCCT 903
 V N F L T S I S G R V S K K T K L V F R F L D E G S
 ATTGAGCCATCGACAAACCAGACATATGGGTCCATGTTGAAAATCTAACATTTGTCAAGACTTTTGCCTCTGGAATA 981
 I E P S A T N Q T Y G S M L K N L T F V K T F A S G I
 CTTGTTCCCAAAGTATACTGGCTGTTACACCAAGATAACTACTGCCTTATACTCAGTTGTTGATGCTGCT 1059
 L V P K S Y I W P V T P D N Y L L P Y T S V V D D A
 CACAAAGCGGGCTAGAAATCTATGCTGCTGATTTGCAATGACTTTACTATCAGTATAACTACAGCTTTGATCCA 1137
 H K A G L E I Y A A D F A N D F T I S Y N Y S F D P
 TTAGCGGAATATCTTCTTCAATGGTAACAGTGCCTTCTGTGATGGTGTGTTGACTGATTTCCCGATTACTCT 1215
 L A E Y L S F I G N S A F S V D G V L T D F P I T P
 TCAGAAGCAGTTG GTTGCTTTAGTAACCTGAACAACAGCAAGATCGACCATG CTAACCTCTGGTTATCTCTCATAAT 1293
 S E A V G C F S N L N N S K I D H A K P L V I S H N
 GGTGCTAGCGGTGACTCCAGACTGCAGTGACCAAGCTTATGAAAAGGCAGTTGCTGATGGTGCAGATGTCATTGAC 1371
 G A S G D Y P D C I D Q A Y E K A V A D G A D V I D
 TGCTCTGTTCAAGTGACCAAGATGGCATACTGATATGCATGAGTTCTGTTGACCTAATGGATGTCACTACTGTTGGA 1449
 C P V Q V T K D G I L I C M S S V D L M D V T T V G
 AAATCATCTTACTTCGCAAGTAACCTACCATCAACGATGGAAGGCTGGTCTTCCAGCTTCCACTTACTTACT 1527
 K S S F T S Q V T T I N D L K A G P G V F T F N L T
 TGGGATGATATTTCTAAGAACCCTACAG CCCATGATATCGAACCAATGAGCACCTATAAACTGTACAGAAATCCCGA 1605
 W D D I S K N L Q P M I S N P M S T Y K L Y R N P R
 AACAGAATGCAGGAATTTTCATGAGATTATCAGACTTTTTCAGPMTTTCGAAAGGAAAGGATTTGTCAGGATCATG 1683
 N K N A G N F M R L S D F L T F A K G K D L S G I M
 ATAAGTGTGAG CATGCTGCATTCATGCGAGAGAAGCTTGGATTTGGAGTGGTAGACGAGTGGTCAAAGCATTGAT 1761
 I T V E H A A F M A E K L G F G V V D A V V K A L D
 GACTCTGGTTATAGCAAACAGACTGCCAGAATGTTATGATTGATCAACCAACAGCTCGGTGCTAAGAAGTTCAAG 1839
 D S G Y F S K Q T A Q N V M I Q S T N S S V L K K F K
 CAGGAAACCAAGTACAGCCTTGTCTACATGATTGAAGAAGGTGTCAGAGATGCCGCACCTTCATCCCTTGCAGACATT 1917
 Q E T K Y S L V Y M I E E G V R D A A P S S L A D I
 AAGAAGTTGCTAATGCCGTCTCTGTTAGCACCACATCTGTTTACCACAGACCCATTATTATTGACAAACAGACACC 1995
 K K F A N A N A V S V S T T S V L P Q T H Y Y L T N Q T
 AATAAGCTTGTACGTCCTTTCAGTCTGCGGGCCTCCAAGTTTACGTCTATGTGCTCATGAATGAGTTTGCATCTCAG 2073
 N K L V T S L Q S A G L Q V Y V Y V L M N E F A S Q
 CCGAATGACTTCTTCGACAGCCACTTSCAGATTAATGCTTATGTGCAAGGTGCTAAGGTGGACGGGATCACT 2151
 P N D F F A D A T F S Q I N A Y V Q G A K V D G I I T
 GATTTCCCTGGGACTGCTCAGACATACAAATTGAACTCCTGCACGAGCATGGGAAACAGCGCACCCTATTTATGCAG 2229
 D F P G T A H R Y K L N S C T S M G N S A P L F M Q
 CCTCCGCAACCAGGTAGCCTCCTTTAACCATGGCCCCAGATGTACAGCCACCAGCAGCGGCCCAATGCCGCTCTTG 2307
 P P Q P G S L L L T M A P D V Q P P A A A P M P L L
 ACGGACGCTGACGTTGCAGAACAGCCCTACCTCCAGTCAAGAACACCACAGCTGCATCTCCTTCGCATGCCGCC 2385
 T D A D V A E P A L P P V S N T T T A A S P S H A A
 CTCAGAATGCAACCGATGCTCGATCCTCATCGCATTGCTGATGCTATGTGCTTCCCTCCTCATCTGAGGTTAGTCC 2463
 L R M R T D V S I L I A L L M L C A S L L I -
 TGCACAACATCATATGCGGCGTGGTGCATTAGAGCTGAGGATTTACATTTAGCTGCTAATAGCAATTTCTTTCCACCA 2541
 TTTATGTAGGATTTTTTTTCTTGTCTGTCGGTGTGTTGAAAGGATGGATGGATGTTACGCTTGATACCTCAACGG 2619
 TGACACTTGTGTGCTGCGCTGCCTCTAGGTATATTTGGTACATATATGTGGTGATACATTGTTCAAGTTCATCTT 2697
 TTCTACTGCCAAACCTTGCCCGGAGGGCAAAAATATTCACTCAAATCGAGATAGATTGCCATT

Abb. 3.15: Putative cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz von ZmGDPD1.

Durch ESI-MS/MS identifizierte Peptide oder Aminosäuren (rot, Erläuterungen siehe Text); aus genomischer DNA abgeleitete Sequenz (türkis); Intronpositionen (▼); Start-, Stopcodon (unterstrichen); hydrophobe Bereiche des abgeleiteten Proteins (gelb); potentielle Spaltstelle für GPI-Anker (violett); potentielle Glykosylierungsstellen (grün); konservierter Bereich (rosa). Eine in Datenbanken vorhandene genomische DNA korrespondiert mit dem mittleren Bereich der putativen cDNA zwischen Basenpaar 1228 und 2181.

stimmung der putativen GDPD mit der durch Isoelektrische Fokussierung ermittelten anionischen Bande ($IEP_{exp} = 4,9$) hindeuten.

Topologische Voraussagen zehn verschiedener Vorhersageprogramme ermittelten eine N-terminale (Aminosäure 8-29, gemittelt) sowie eine C-terminale (Aminosäure 732-750, gemittelt) hydrophobe Domäne. Die N-terminale hydrophobe Domäne ist gleichzeitig Teil eines zum ER dirigierenden Signalpeptids. PSORT sagte eine Lokalisierung des Proteins in der PM mit 92 %iger Wahrscheinlichkeit voraus. D.h. das Protein könnte über zwei oder im Falle einer Abspaltung des Signalpeptids an Aminosäure 29 über eine transmembrane Helix verfügen. Andererseits ist diese Verteilung hydrophober Aminosäuren Teil eines charakteristischen Erkennungssignals für Glycosylphosphatidylinositol-(GPI)-Ankerproteine. GPI-Anker kommen in allen eukaryotischen Organismen vor (Udenfriend und Kodukula, 1995). Der C-Terminus eines reifen GPI-Ankerproteins ist kovalent über Phosphoethanolamin und ein konserviertes Glykan an Phosphatidylinositol oder an ein Ceramid gebunden (Kinoshita und Inoue, 2000). Der hydrophobe C-Terminus des unreifen Proteins formt höchstwahrscheinlich eine transiente transmembrane Domäne, welche als Erkennungssignal für eine Transamidase wirkt. Diese spaltet das C-terminale Propeptid ab und ersetzt es durch einen vorher zusammengefügt GPI-Anker. In vielen Organismen wurden GPI-Ankerproteine spezifisch im äußeren Layer der PM gefunden (Brown et al., 2000; Le Gall et al., 1995). Dort scheinen sie mit den sogenannten *Lipid Rafts* assoziiert vorzuliegen (Ikonen, 2001; Muniz und Riezman, 2000; Peskan et al., 2000).

Drei von drei unterschiedlichen GPI-Vorhersageprogrammen sagten einen GPI-Anker mit einer potentiellen Spaltstelle an Aminosäure 725 voraus. Für das ZmGDPD1 ähnlichste Protein aus Arabidopsis (Q9SZ11) wurde im Rahmen von Proteomanalysen ein GPI-Anker nachgewiesen (Borner et al., 2003). Eine putative Myristoylierung war anhand der Sequenz von ZmGDPD1 nicht detektierbar.

In den unterschiedlichsten pflanzlichen Spezies wurden sehr ähnliche Sequenzen identifiziert. So zeigt ZmGDPD1 Sequenzübereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen zu Proteinen sowie translatierten EST-Contigs aus Reis (Q6YY47), Hafer (TC132548), Weizen (TC266673) und Arabidopsis (Q9SZ11) von 75, 74, 72 bzw. 59 %. Eine einzelne Domäne scheint in Sequenzen bekannter und putativer GDPDs stark konserviert zu sein (Abb. 3.15 rosa), wie dies auch schon in Sequenzvergleichen humaner, bakterieller und bisher aufgeklärter pflanzlicher GDPDs festgestellt wurde.

Zellkulturen aus Karotte, Mais, Arabidopsis und Bergahorn (*Acer pseudoplatanus* L.) zeigten hohe intrazelluläre und niedrige extrazelluläre Glycerophosphodiesteraseaktivitäten in Gegenwart von Glycerophosphocholin, welche durch Phosphatmangel im Kulturmedium significant gesteigert wurden (van der Rest et al. (2002). In Mais wurden jedoch keine Enzymaktivitäten einzelner Kompartimente untersucht. Daher handelt es sich bei der partiell gereinigten GDPD sowie der Nukleinsäuresequenz von ZmGDPD1 um das erste Protein

bzw. die erste beschriebene Sequenz aus Mais und die erste membrangebundene GDPD aus pflanzlichen Organismen.

Die physiologische Bedeutung von Glycerophosphodiesterasen ist bisher noch unklar. Neben der Beteiligung am konstitutiv stattfindenden Phospholipid-*Turnover* wären auch stressinduzierte Funktionen denkbar. Da Phosphatmangel im Kulturmedium der Karottenzellen zu einer Steigerung der bisher untersuchten pflanzlichen Enzymaktivitäten führte, könnte eine mögliche Funktion der GDPDs darin bestehen, Phosphat zu mobilisieren. Dies wäre aus dem Boden, in welchem bis zu 7 % des immobilisierten Phosphates in Form von Phospholipiden vorliegen, oder durch Phospholipidkatabolismus sowie Umsatz der eigenen Zellkomponenten möglich (van der Rest et al., 2004). In *Borrelia hermsii* wird die Expression einer bakteriellen GDPD, die sogenannte GLPQ, ebenfalls durch Phosphatmangel gesteigert (Antelmann et al., 2000), während das Gen für die in *E. coli* beschriebene GLPQ Teil des Glyceroloperons und mit der Aufnahme von Glycerol assoziiert ist, wenn die Verfügbarkeit von Kohlenstoff gering ist (Larson et al., 1983). GDPDs könnten möglicherweise auch an der Membrandegradation im Rahmen der unterschiedlichen Formen des programmierten Zelltods, beispielsweise bei der Tracheenbildung, beteiligt sein (van der Rest et al., 2002). In Säugern wurden bereits mehrere PM-gebundene Glycerophosphodiesterasen beschrieben (Zheng et al., 2000; Lloyd-Davies et al., 1972). Die im Gehirn von Säugern exprimierte MIR16 soll eine Funktion im Lipidmetabolismus haben und an der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion beteiligt sein (Zheng et al., 2003; 2000). Dieses Protein ist jedoch nicht über einen GPI-Anker an die Membran gebunden.

Fazit

In der zunächst pmPOX2a zugeordneten Proteinbande wurden Peptide ermittelt, welche eine hohe Sequenzidentität zu einer bisher unbekanntem putativen Glycerophosphodiester-Phosphodiesterase (GDPD) aufwiesen. Da für diese Enzyme bisher keine Hämgruppe und kein Kupfer als prosthetische Gruppe nachgewiesen wurden, deuten die Anfärbbarkeit der Bande durch TMB und die Detektierung zusätzlicher Peptide auf mindestens ein weiteres Protein in der Proteinbande hin. Die zusätzlich identifizierten Peptide zeigten jedoch keine Ähnlichkeit zu den in Datenbanken verfügbaren Sequenzen. Ein mit diesen Peptiden korrespondierendes Protein könnte durch die partielle Reinigung der Proteine stärker konzentriert worden sein, als die in den Fraktionen enthaltene Peroxidase. Dies würde die stärkere Intensivierung der Proteinbande in der Hämfärbung im Anschluss an die Gelfiltration erklären. Aufgrund der hohen Qualität der massenspektrometrischen Ergebnisse der Probe ist es relativ unwahrscheinlich, dass tryptische Peptide einer enthaltenen Peroxidase nicht detektiert wurden. Daher ist die Peroxidaseaktivität von pmPOX2a möglicherweise einer der beiden höhermolekularen Banden (184 bzw. >200 kDa) zuzuordnen.

3.8.4 *In silico* Northern-Blot-Analyse

Die Information über das Ursprungsgewebe von EST-Klonen kann bereits erste Hinweise auf die gewebespezifische Expression eines Gens liefern. 90 % der *pmPOX2b*-zugehörigen ESTs wurden aus Maiswurzeln isoliert. Auch die *pmPOX2b* ähnlichsten Proteine aus Arabidopsis, Hafer, Hirse, Reis, Tomate und Weizen korrespondierten vornehmlich mit ESTs aus Wurzelgeweben oder aus cDNA-Banken, in welchen Gewebe aus Wurzeln und Blättern gemeinsam verwendet wurden (Abb. 3.16).

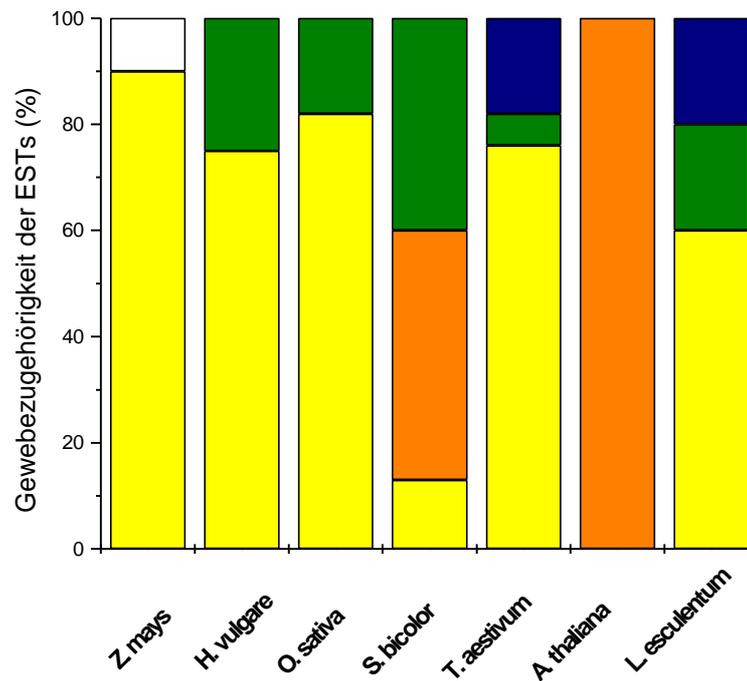


Abb. 3.16: *In silico* Northern Blot von *pmPOX2b* und deren ähnlichsten Sequenzen aus anderen monokotylen und dikotylen Pflanzen.

Dargestellt ist die Zugehörigkeit der in Datenbanken vorhandenen ESTs, welche mit den entsprechenden Peroxidasen bzw. putativen Peroxidasesequenzen korrespondieren (TC143417 aus *H. vulgare*, OsPrx109 aus *O. sativa* (Q5U114), TC93955 aus *S. bicolor*, TaPOX4 aus *T. aestivum* (Q43220), AtPrx52 aus *A. thaliana* (Q9FLC0, TC256454), TC165410 aus *L. esculentum*). Die ESTs wurden aus cDNA-Banken verschiedener Gewebe gewonnen: Wurzeln (gelb), gemischtes Gewebe (Wurzeln und Blätter; orange), Blätter (dunkelgrün), Keimlinge und Seide (weiss), Früchte bzw. Ähren (blau). Die Anzahl der verfügbaren ESTs entsprach $n = 10, 4, 11, 15, 17, 4$ und 5 . Der überwiegende Teil der ESTs von *pmPOX2b* als auch dessen Homologs in Reis und den drei ähnlichsten Sequenzen aus anderen monokotylen Pflanzen wurde aus Wurzeln isoliert.

Die auf der Basis von Sequenzvergleichen *pmPOX2b* ähnlichste Peroxidase aus Weizen, *TaPOX4*, wird hauptsächlich in Wurzeln exprimiert. Nur wenige Transkripte waren in Blättern nachweisbar (Baga et al., 1995). Die Ergebnisse der *in silico* Northern Blot-Analyse korrelieren mit der Voraussage eines *cis*-regulatorischen Elements im Promotor von *pmPOX2b*, welches in die wurzelspezifische Expression eines Gens involviert sein soll

(siehe Abschnitt 3.8.2.2), und könnten auf eine entsprechende Expression des Gens hindeuten.

Die mit *pmPOX1* korrespondierenden ESTs stammten zu 50 % aus Wurzeln und zu 50 % aus den Hüllblättern des Maiskolbens (Daten nicht dargestellt). EST-Klone zu den *pmPOX1* auf Aminosäureebene ähnlichsten Peroxidasen aus anderen monokotylen und dikotylen Pflanzenarten wurden zu 0 – 72 % aus Wurzelgeweben isoliert. Diese Ergebnisse waren weniger eindeutig als für *pmPOX2b*, trotzdem wird *pmPOX1* offenbar vorwiegend in Wurzeln exprimiert. Unter Verwendung des spezifisch hybridisierenden 3' UTRs der cDNA von *pmPOX1*, dort *ZmPox1* genannt, untersuchten De Obeso et al. (2003) deren Genexpression in verschiedenen Geweben von Maiskeimlingen durch Northern-Blot-Analysen. Die mRNA von *pmPOX1* wurde in allen Teilen der Wurzel einschließlich Wurzelspitze, Elongationszone und Mesokotyl, jedoch nicht in Blättern nachgewiesen. Durch *In situ*-Hybridisierungen wurde die mRNA von *pmPOX1* sowohl in vaskulärem Gewebe als auch in der Epidermis von Wurzelspitzen lokalisiert, während sie in Querschnitten junger Wurzeln aus sieben Tage alten Maiskeimlingen nur noch in der Epidermis detektierbar war (De Obeso et al., 2003).

Von 20 mit *pmPOX3-1* korrespondierenden ESTs hatten 10 % ihren Ursprung in cDNA-Banken aus Wurzelmaterial und 45 % stammten aus gemischten Geweben, in welchen Wurzeln mitverwendet wurden, während für *pmPOX3-2* alle verfügbaren *Expressed Sequence Tags* ausschließlich aus Maiswurzeln abgeleitet wurden. Die cDNA von p7x, welche möglicherweise das Transkript zu *pmPOX3-3* darstellt und welche mit einer Resistenz der Pflanze gegen Nematoden in Verbindung gebracht wird, wurde ebenfalls aus Wurzelmaterial isoliert (Padegimas und Reichert, 2004). Da sowohl für *pmPOX3-1* und *pmPOX3-2* als auch für *pmPOX3-3* EST-Klone bzw. cDNAs aus Wurzelmaterial vorhanden waren, konnten anhand der Zugehörigkeit der Transkripte keine weiteren Hinweise darauf gewonnen werden, welches der drei Gene bzw. welche der drei cDNAs mit dem durch Reinigung identifizierten PM-gebundenen Protein *pmPOX3* korrespondieren.

3.9 Funktionen der pmPOX

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist es nicht möglich, aus den identifizierten biochemischen Charakteristika und den durch bioinformatische Sequenzanalyse ermittelten Ergebnissen eine Funktion der vier pmPOX abzuleiten. Wie in der Einleitung erwähnt, liegt dies bei Klasse-III-Peroxidasen unter anderem in der breiten Substratspezifität begründet (De Marco et al., 1999). Grundsätzlich stellt sich die Frage, warum an der PM vier verschiedene Peroxidasen existieren. Hierfür sind die im Folgenden dargestellten Erklärungen denkbar:

3.9.1 Eine gewebe- und/oder entwicklungspezifische Expression

Da Maiswurzeln ein heterogenes Gemisch aus verschiedenen Zelltypen enthalten, wäre nicht nur eine entwicklungs- sondern auch eine gewebespezifische Expression der vier PM-gebundenen Peroxidasen denkbar. Wie in Abschnitt 3.8.4 erwähnt, konnte dies für die Expression des *pmPOX1*-Gens bereits gezeigt werden (De Obeso et al., 2003). Dennoch ist das Vorhandensein mehrerer Peroxidasen in einem Kompartiment für pflanzliche Zellen charakteristisch. So finden sich im Cytosol je zwei Ascorbatperoxidasen und im Medium von Tabakzellsuspensionskulturen wurden nicht weniger als sieben Isoenzyme identifiziert (De Marco et al. 1999). In fast allen bisher untersuchten Kompartimenten kommen mehrere Peroxidasen vor, welche bei Gendefekten zudem in der Lage sind, die Funktion fehlender Isoformen zu übernehmen (De Marco et al. 1999, Christensen et al. 1996). Die gleichzeitige Existenz mehrerer pmPOX an der PM einer Zelle eines Zelltyps ist daher durchaus denkbar.

3.9.2 Eine Lokalisierung der aktiven Zentren auf verschiedenen Seiten der Plasmamembran bei gleicher Funktionalität

Die Substratspezifitäten, die Glykosylierung und/oder die Sequenzanalyse von pmPOX1, pmPOX2b und pmPOX3 deuten auf eine Lokalisierung der Enzyme auf der apoplastischen Seite der Membran hin (siehe Abschnitt 3.3.2, 3.7 und 3.8.2.3.2). Die Lokalisierung von pmPOX2a ist jedoch noch unklar. Daher könnte das aktive Zentrum dieser Peroxidase auch auf der cytosolischen Seite der PM agieren.

3.9.3 Eine Grob- und Feinregulierung der gleichen Substratspezifität durch verschiedene Isoenzyme

Ein klassisches Beispiel für die Aufteilung einer Funktion in Grob- und Feinregulierung ist die Koexistenz von Catalasen und Peroxidasen in Peroxisomen und Glyoxisomen, in denen beide Enzymklassen auf unterschiedliche Weise die Entgiftung von H_2O_2 vermitteln (De Gara, 2004; De Gara et al., 1996). Ähnliches wäre auch für die PM-gebundenen Peroxidasen im Verhältnis zueinander denkbar.

3.9.4 Die Enzyme erfüllen unterschiedliche Funktionen und/oder werden in Abhängigkeit verschiedener endogener oder exogener Reize reguliert

Die mRNA von pmPOX1 wurde durch *In situ*-Hybridisierungen sowohl in vaskulärem Gewebe als auch in der Epidermis von Wurzelspitzen nachgewiesen, während sie in Querschnitten junger Wurzeln aus sieben Tage alten Maiskeimlingen nur noch in der Epidermis detektierbar war (De Obeso et al., 2003). Eine derartige Transkriptverteilung, d.h. vor allem das Fehlen von mRNA in lignifizierendem vaskulärem Gewebe junger Wurzeln, die Existenz von Transkripten in der Wurzelspitze und eine fehlende Anhäufung von mRNA in der Elongationszone, sprechen gegen eine Beteiligung von pmPOX1 an einer entwicklungspezifischen Lignifizierung (Collazo et al., 1992). Im Gegensatz dazu wurde ein derartiges mRNA-Muster bei apoplastischen Peroxidasen gefunden, welche eine Rolle in der Suberinisierung spielen (Quiroga et al., 2000; Teichmann et al., 1997). Da die Expression von *pmPOX1* jedoch nicht durch Verwundungstress induziert wurde (De Obeso et al., 2003), könnte diese Peroxidase eher an der entwicklungspezifischen und nicht an der wundinduzierten Suberinisierung beteiligt sein. Es ist bekannt, dass Suberin in der Epidermiszone von Wurzeln akkumuliert (Quiroga et al., 2000; Wallace und Fry, 1994). Im Gegensatz dazu zeigten die Untersuchungen zur Substratspezifität von pmPOX1 und pmPOX2 *in vitro* (siehe Abschnitt 3.2.2) jedoch eine wesentlich größere Affinität beider Peroxidaseaktivitäten für Coniferylalkohol als für phenolische Säuren. Hydroxymethylalkohole werden von apoplastischen Peroxidasen in der Ligninpolymerisierung verwendet, während Hydroxymethylsäuren in der Suberinsynthese Verwendung finden (Hiraga et al., 2001). Eine Änderung der Transkription in Gegenwart von Elizitoren oder Pathogenen im Rahmen der stressinduzierten Lignifizierung zur Verstärkung der Zellwand an gefährdeten Stellen wurde von De Obeso et al. (2003) allerdings nicht untersucht.

Humane bzw. tierische Peroxidasen zeigen in der Regel große strukturelle und funktionelle Unterschiede zu pflanzlichen Peroxidasen (Hiraga et al., 2001). Interessant ist jedoch, dass die Funktion der PM-gebundenen, humanen Thyroidperoxidase in einer Verknüpfung von Tyrosinresten besteht (Niccoli-Sire et al., 2001). Ein ähnlicher Mechanismus wurde für pflanzliche Klasse-III-Peroxidasen zur Vernetzung von Glykoproteinen der Zellwand beschrieben (Fry, 2004), so dass eine derartige Funktion für eine oder mehrere pmPOX denkbar ist.

Chittoor et al. (1999) fanden eine Korrelation zwischen der Genregulation von Peroxidasen und deren Primärstruktur. Sie verglichen die Aminosäuresequenz zwischen der proximalen Häm-bindestelle und dem siebten konservierten Cysteinrest (Aminosäure 200 - 244 in pmPOX1) von 62 Peroxidasesequenzen verschiedener Pflanzenarten. Diese Region ist sehr variabel in Klasse III-Peroxidasen und bildet einen Teil des Substratkanals (*Substrate access channel*; Gajhede et al., 1997, Schuller et al., 1996). Da sich die meisten der

pathogeninduzierten Gene aufgrund großer Sequenzübereinstimmungen in dieser Region in zwei von elf Untergruppen einordnen ließen, postulierten Chittoor et al. (1999), dass dieser Bereich die biologische Funktion einer Peroxidase widerspiegelt, d.h. die gruppierten Peroxidasen möglicherweise *in vivo* identische Enzymaktivitäten ausüben. Ein Alignment dieser Peptidregion der pmPOX mit den entsprechenden Bereichen aus 26 Peroxidasesequenzen monokotyler Pflanzenarten, deren Genregulation bereits untersucht wurde, führte zu einer Gruppierung von pmPOX1 mit Peroxidasen, welche mit Suberinisierungs- und wundinduzierten Prozessen in Verbindung gebracht werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigten pmPOX2b, pmPOX3-1, pmPOX-3-2 und pmPOX3-3 die größte Sequenzübereinstimmung mit pathogeninduzierten Genen und Peroxidasen, welche in Lignifizierungsprozesse involviert sind. Um eine Funktionalität der Peroxidasen ableiten zu können, fehlt jedoch eine genauere Charakterisierung dieser Region.

Die meisten, der für PM-gebundene Peroxidasen postulierten Funktionen, wie beispielsweise eine Beteiligung der Enzyme am Auxinkatabolismus, könnten ebenso von löslichen, extrazellulären Peroxidasen übernommen werden. Auffällig ist allerdings die relativ hohe Affinität von pmPOX1 und pmPOX2 für IAA. Nur einige extrazelluläre lösliche Klasse-III-Peroxidasen sind in der Lage IAA umzusetzen (De Marco et al., 1999; Gazaryan und Lagrimini, 1996; Converso und Fernandez, 1995). In transgenen Tabakpflanzen, in denen eine Überexpression einer IAA oxidierenden löslichen Peroxidase erreicht wurde, wurde die Bildung von Seitenwurzeln unterdrückt (Lagrimini et al., 1997a). Ein Effekt der möglicherweise auf eine gesteigerte Degradation von IAA zurückzuführen war. In einigen Studien dieser Peroxidase wurden jedoch auch eine Beteiligungen an der Lignifizierung und am Polyphenolmetabolismus deutlich (Klotz et al., 1998; Lagrimini et al., 1997b), welche eine multiple Funktionalität dieser Tabakperoxidase in Wachstum und Entwicklung der Pflanze nahe legen. Plasmamembrangebundene Peroxidasen könnten durch Degradation des Phytohormons an der Regulation des extrazellulären Auxingehalts beteiligt sein. Der extrazelluläre Auxingehalt bestimmt unter anderem die Auxinwirkung, da einer der Auxinrezeptoren extrazellulär lokalisiert ist (Christian et al., 2006).

Die Untersuchungen der NAD(P)H-Oxidaseaktivitäten der pmPOX zeigten, dass sowohl pmPOX1 als auch pmPOX2a und pmPOX2b in der Lage sind, *in vitro* große Mengen an AOS zu bilden (Abschnitt 3.3.2). Die Charakteristika der AOS-Produktion wiesen jedoch deutliche Unterschiede zu den bisher in der Literatur beschriebenen Formen des oxidativen Bursts bei Pflanzen auf (Mika et al., 2004; Bolwell et al., 2002). So ließen sich die Aktivitäten zwar durch KCN und DPI inhibieren, hohe Aktivitäten im neutralen pH-Bereich oder eine Stimulierung durch Calcium konnten jedoch nicht beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.3).

Möglicherweise treten jedoch bei der Verwendung anderer Substrate andere Charakteristika auf. So ist es trotz intensiver Untersuchungen bis heute nicht gelungen, das unter physiologischen Bedingungen *in vivo* verwendete Substrat zu identifizieren, welches eine in Bohne vorhandene extrazelluläre Peroxidase verwendet, die mit dem oxidativen Burst in dieser Pflanze in Verbindung gebracht wird (FBP1; Bolwell et al., 2002). Einige Publikationen deuten auf eine Sekretion von Peroxidasen zum Ort der Infektion bzw. als Reaktion auf eine Behandlung der Wurzel mit Salicylsäure oder Schwermetallen hin (Minibayeva et al., 2001; Bestwick et al., 1997). Auf derartige Reize erfolgt zudem eine Änderung der Eigenschaften sekretierter bzw. apoplastischer Peroxidasen (Minibayeva et al., 2003; Morimoto et al., 1999). So bindet eine vorher apoplastische Peroxidase in *Scutellaria baicalensis* GEORGI sofort nach einer mechanischer Beschädigung oder einer Behandlung durch Elizitoren an das Ligningerüst der Zellwand (Morimoto et al., 2001). Neben der Teilnahme einer apoplastischen Peroxidase am oxidativen Burst zogen Bolwell et al. (2002) daher auch die Freisetzung einer PM-gebundenen Peroxidase an den Ort der Infektion in Erwägung. Eine Beteiligung am H₂O₂-vermittelten *Signaling* ist jedoch auch ohne eine direkte Produktion von AOS durch die pmPOX denkbar. Die PM-gebundenen Enzyme könnten die Permeation extrazellulär gebildeten Wasserstoffperoxids durch die Membran auf der Basis des H₂O₂-Abbaus strikt regulieren.

Obwohl im Lumen von Glyoxisomen und Peroxisomen Catalasen lokalisiert sind, enthalten die Membranen dieser Vesikel, wie bereits erwähnt, integral gebundene Peroxidasen, welche am Schutz der Membran vor den im Innern ablaufenden cytotoxischen Prozessen beteiligt sind (Murphy et al., 2003; Nito et al., 2001; Bunkelmann und Trelease, 1996). Ebenso wurden in Mitochondrien sowohl eine Catalase als auch mindestens eine membran-gebundene Peroxidase identifiziert (Prasad et al., 1995; Scandalios et al., 1980). In der evolutionären Entwicklung der Photosynthese wurden zum Schutz des photosynthetischen Apparats in den Chloroplasten sogar Peroxidasen der Verwendung von Catalasen vorgezogen (De Gara, 2004). Aufgrund des hohen Anteils sehr langkettiger und vielfach ungesättigter Fettsäuren und des Fehlens von Coenzym Q₁₀, Tocopherolen und P-450-Cytochromen in bzw. an der pflanzlichen PM (Lüthje et al., 2005; Bohn et al., 2001) ist die Integrität dieser Membran bei oxidativem Stress besonders gefährdet. Daher liegt es nahe, dass zumindest einige der PM-gebundenen Peroxidasen eine Schutzfunktion für die Membran ausüben (De Gara, 2004; Mika et al., 2004). Neben der postulierten Mikrokompartimentierung der thylakoidgebundenen Peroxidasen der Chloroplasten (Tarantino et al., 2005; Asada et al., 1996) scheinen auch zahlreiche Proteine der pflanzlichen PM in funktionell zusammengehörige Bereiche gegliedert zu sein (Ikonen, 2001; Muniz und Riezman, 2000). Daher könnten auch die PM-gebundenen Peroxidasen eine

derartige Mikrokompartimentierung zeigen, um gezielt bestimmte funktionelle Bereiche der Membran zu schützen.

Als natürlicher Elektronendonator für PM-gebundenen Peroxidasen könnten in diesem Zusammenhang Flavonoide dienen, da Ascorbat von diesen Proteinen nicht umgesetzt wird (siehe Abschnitt 3.2.2). Flavonoide sind sekundäre Pflanzenphenole (Jaakola et al., 2003). Sie hemmen die Lipidperoxidation, chelatisieren redoxaktive Metalle und schwächen Prozesse ab, die durch reaktive Sauerstoffverbindungen vermittelt werden (Heim et al., 2002; Yamasaki, 1997; Bors et al., 1994, 1990). Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass Flavonole als Elektronendonator für Peroxidasen fungieren (Takahama, 1986; Miller und Schreier, 1985; Schreier und Miller, 1985) und, dass diese Reaktion von der Zelle als H₂O₂-Scavenger-System genutzt werden kann (Takahama, 1989, 1988; Yamasaki, 1997). Alternativ wäre auch eine Umsetzung der im Apoplasten vorhandenen phenolischen Substanzen denkbar. Unter der Annahme, dass eine Peroxidaseaktivität auf der Außenseite der PM existiert, wurde von Zancani et al. (1997) eine ascorbatabhängige Detoxifizierung von H₂O₂ diskutiert, bei der gleichzeitig Phenole als Elektronendonatoren erster Ordnung umgesetzt werden könnten. Der Abbau des H₂O₂ könnte gleichzeitig zur Synthese von Phytoalexinen oder anderen Produkten genutzt werden.

Mit der Reparatur von Membranen werden vor allem Glutathionperoxidasen und Peroxiredoxine in Verbindung gebracht, da sie über die Fähigkeiten zur Umsetzung von Alkylperoxiden verfügen (Dietz, 2003; McGonigle et al., 1998). Alle vier pmPOX konnten jedoch aufgrund ihrer Sequenzen und/oder ihrer biochemischen Charakteristika als Klasse-III-Peroxidasen eingestuft werden. Eine Katalyse von Alkylperoxiden durch die pmPOX ist jedoch trotzdem denkbar, da die Struktur einer Peroxidase nicht immer Rückschlüsse auf eine Substratspezifität oder Funktion zulässt. So wurde in Teeblättern eine lösliche Peroxidase identifiziert, deren Sequenz alle Charakteristika einer Klasse-III-Peroxidase aufwies. Obwohl Ascorbatperoxidasen aufgrund von Struktur- und Sequenzanalysen bisher immer der Klasse I der Superfamilie von Peroxidasen aus Pflanzen, Bakterien und Pilzen zugeordnet werden konnten, zeigte diese Peroxidase die höchste Ascorbatperoxidaseaktivität, die bisher gemessen wurde (Kvaratskhelia et al., 1999). Zudem wurden auch für peroxisomale und chloroplastidäre Peroxidasen Membranreparaturmechanismen postuliert oder gezeigt (Svistunenko, 2005; Jespersen et al., 1997; Bunkelmann und Trelease, 1996; Asada et al., 1996; Asada, 1992).

Obwohl Peroxidasen in der Regel nur schwer voneinander abzugrenzen sind, zeigten pmPOX1 und pmPOX2 (pmPOX2a und pmPOX2b) bereits signifikante Unterschiede in ihren Effektorsensitivitäten (Abschnitt 3.2.1) und Substratspezifitäten (Abschnitt 3.2.2). Daher sind unterschiedliche Funktionen für die verschiedenen pmPOX denkbar. Vorläufige

Untersuchungen der Promotorregion von *pmPOX2b* (siehe Abschnitt 3.8.2.2) deuten eine Regulierung des Gens durch zahlreiche Faktoren an. Ein Phänomen, welches bei Klasse-III-Peroxidasen häufig auftritt (Park et al., 2003, Klotz et al., 1998; Lagrimini et al., 1997b) und auf eine multiple Funktionalität einer Peroxidase hindeuten kann. Dies muss jedoch weiter untersucht werden. Da die Enzymaktivitäten in Gegenwart verschiedener Substrate unterschiedlich stark durch Mn^{2+} beeinflusst wurden, scheinen sie anders reguliert zu werden, als die meisten Klasse-III-Peroxidasen. Möglich wäre auch eine Änderung der Funktionalität der Enzyme durch veränderte Substratverfügbarkeit oder diverse regulatorische Substanzen bzw. Prozesse. So wird die Funktionalität mehrerer extrazellulärer Peroxidasen über pH-Änderungen reguliert, welche teilweise in drastischen Konformationsänderungen des Proteins resultieren (Bolwell et al., 2002; Henriksen et al., 1998). Wie bereits für viele andere Peroxidasen des sekretorischen Stoffwechselweges gezeigt, kann die Funktion von Klasse-III-Peroxidasen im Gegensatz zu vielen anderen Enzymklassen erst durch eine Kombination zahlreicher Untersuchungen, wie beispielsweise einer biochemischen Charakterisierung der Enzyme *in vitro* in Kombination mit Analysen der Lokalisierung der Enzyme, der Genregulation sowie von Veränderungen einer Funktionalität durch Über- oder Unterexpression einer Peroxidase oder ähnlichem, abgeleitet werden (Hiraga et al., 2001). Eine weitere Aufklärung der Funktionalität der PM-gebundenen Peroxidasen wäre nicht zuletzt aufgrund der möglichen multiplen Funktionen und der möglichen Bedeutung dieser Enzyme für die verschiedensten zellulären Prozesse äußerst interessant.

4. AUSBLICK

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen die Existenz von mindestens vier verschiedenen PM-gebundenen Peroxidasen in Maiswurzeln und schaffen die Grundlage für eine Reihe weiterer interessanter Untersuchungen.

In der zunächst **pmPOX2a** zugeordneten Proteinbande wurden durch massenspektrometrische Analyse tryptische Peptide ermittelt, welche mit der Sequenz einer putativen Glycerophosphodiester-Phosphodiesterase übereinstimmen. Da die Peroxidaseaktivität der Proteinfraction daher möglicherweise mit einer der beiden höhermolekularen Banden korrespondiert (184 kDa, >200 kDa; siehe Abschnitt 3.8.3), könnte eine Reinigung ausreichender Mengen dieser Proteine und eine anschließende ESI-MS/MS-Analyse dieser Proben in Kombination mit einer bioinformatischen Sequenzanalyse eine Identifizierung der zugehörigen Proteinbande und eine Aufklärung der Sequenz dieser Peroxidase ermöglichen.

An erster Stelle weiterer Untersuchungen sollte jedoch die Bestätigung der Sequenzen von pmPOX1, pmPOX2b, pmPOX3-1, pmPOX3-2 und pmPOX3-3 auf der Basis von **mRNA aus Maiswurzeln** stehen. Anhand von spezifischen Primern gegen die Nukleinsäuresequenzen könnten mit mRNA aus Maiswurzeln der Maislinie Jet sowie B73 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktionen (RT-PCRs) durchgeführt werden. Um eine spezifische Bindung von Primern oder Sonden an die gesuchten Sequenzen zu gewährleisten, sind die untranslatierten Regionen der Transkripte aufgrund der sehr großen Anzahl sehr ähnlicher Peroxidasen in Mais in der Regel am besten geeignet. Im Anschluss an eine Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte können die *in vivo* vorliegenden *full length* cDNAs der Peroxidasen mit den aus Datenbanken abgeleiteten Sequenzen verglichen werden. Alternativ könnten ausgewählte EST-Klone, welche mit den PM-gebundenen Peroxidasen korrespondieren, sequenziert werden.

Obwohl die Reinigung der pmPOX aus PM-Vesikeln darauf hindeutet, dass diese membrangebundenen Enzyme in der PM lokalisiert sind, könnten weitere Experimente dies zusätzlich bestätigen. So könnten die offenen Leserahmen der Peroxidasen als GFP- oder YFP-Fusionsproteine (*Green* bzw. *Yellow fluorescent protein*) beispielsweise in Zwiebelepidermiszellen (*Allium cepa* L.) transient exprimiert werden. Eine Lokalisierung der pmPOX in einzelnen Zellkompartimenten könnte anschließend durch klassische oder konfokale Fluoreszenzmikroskopie erfolgen. Eine Unterscheidung von Zellwand und PM wäre durch eine Plasmolyse der transformierten Zellen möglich.

Für eine Klärung der physiologischen Funktion(en) der PM-gebundenen Peroxidasen ist eine eindeutige Identifizierung ihrer **Lokalisierung** auf der Außen- oder Innenseite der Membran von Bedeutung. Anhand gewaschener *inside-out*- und *right-side-out*-Vesikel, die durch *Freeze-thawing*-Zyklen erzeugt und mittels *Phase-Partitioning* getrennt werden, kann die Lokalisation der nativen Enzyme untersucht werden. Weitere Experimente mit Peroxidasesubstraten oder -effektoren, bieten sich nicht an, da deren Membrangängigkeit entweder nicht auszuschließen ist oder diese auch mit anderen Proteinen der PM interagieren. Die Außenseiten gewaschener *inside-out*- und *right-side-out*-Vesikel könnten separat mit Protein-Biotinkonjugaten biotinyliert werden. Im Anschluss könnten die Peroxidasen isoliert, über eine modifizierte SDS-PAGE getrennt, auf eine PVDF-Membran gebロットet und durch Avidin-Fluoreszenzkonjugate hochspezifisch detektiert werden.

Eine durchschnittliche PM-Präparation aus Maiswurzeln ergibt ca. 3-5 mg membrangebundenes Protein, die Ausbeute an gereinigtem Protein ist sehr viel geringer. Für weiterführende Untersuchungen der Funktion wie beispielsweise Rekonstitutionsversuche an Liposomen werden jedoch größere Proteinmengen benötigt. Die Identifizierung der Sequenzen der Proteine eröffnet daher die Möglichkeit **rekombinante Proteine** durch Klonierung und Expression in bakteriellen oder eukaryotischen Systemen herzustellen. Im Detail könnten die offenen Leserahmen der Peroxidasen fusioniert mit verschiedenen *Tags* funktional in *E.coli* exprimiert werden. Durch einen Histidin-*Tag* des rekombinanten Proteins kann dieses beispielsweise anschließend durch *Immobilised Metal Affinity Chromatographie* (IMAC) gereinigt werden. Durch Vergleich der Enzymaktivitäten der rekombinanten Peroxidasen mit denen der nativen Enzyme kann überprüft werden, ob eine Expression erreicht wurde und ob eine in *E. coli* fehlende *post*-translationale Glykosylierung die Enzymaktivität beeinträchtigt. Falls dies der Fall sein sollte oder andere Schwierigkeiten im Zuge der Expression oder Reinigung auftreten, kann alternativ auf eukaryotische Expressionssysteme wie Insektenzellkulturen oder Hefen zurückgegriffen werden, welche posttranslationale Modifikationen ermöglichen.

Da an der pflanzlichen PM vier Peroxidasen existieren, bleibt die Interpretation von Enzymaktivitäten, die an PM-Vesikeln gemessen werden können, in Hinsicht auf ein einzelnes dieser Enzyme spekulativ. Rekombinante Proteine ermöglichen die separate **Rekonstitution** der einzelnen pmPOX **in Liposomen**. Mit diesem experimentellen Ansatz könnten Wechselwirkungen mit Lipiden der nativen Membran und mit anderen Membrankomponenten gezielt untersucht werden. Im Anschluss an die Rekonstitution könnten die Peroxidaseaktivitäten durch Zugabe von unterschiedlichen Substraten und Effektoren gezielt charakterisiert werden, um einen Aufschluss über mögliche **Funktionen**

dieser Enzyme zu erhalten. Durch Zugabe geeigneter Stressoren könnte sowohl in PM-Vesikeln als auch in rekonstituierten Systemen - eine **Lipidperoxidation** ausgelöst werden, um abzuschätzen, inwieweit die Peroxidasen unter Stressbedingungen an der **Aufrechterhaltung des Lipidbilayers** und der **Reparatur der Membran** beteiligt sind. Darüber hinaus könnten verschiedene Lipide und Lipidabbauprodukte sowie beispielsweise Flavonoide als Effektoren und Substrate der Peroxidasen untersucht werden.

Neben einer Funktionsanalyse der pmPOX hinsichtlich Schutz und/oder Reparatur der Membran könnten auch die **Wirkungen verschiedener Stressfaktoren** auf die Expression der pmPOX Aufschluss über die Funktionalität der Enzyme geben. Maiskeimlinge könnten verschiedenen abiotischen oder biotischen Stressfaktoren ausgesetzt oder mit verschiedenen Substanzen behandelt werden, welche mit der Genregulation von Peroxidasen in Verbindung gebracht werden. So wäre es aufgrund der Ergebnisse der vorläufigen Analyse der Promotorregion von pmPOX2b sinnvoll, die Wirkungen von Hitze- und Verwundungsstress, Elizitoren, Methyljasmonat und Salicylsäure zu ermitteln. Änderungen der Expression der pmPOX in Gegenwart dieser Stressoren sowie eine Änderung der Aktivität der Enzyme könnte vergleichend untersucht werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten beiden Jahrzehnten gab es mehrfach Hinweise für die Existenz einer plasmamembrangebundenen Peroxidaseaktivität in pflanzlichen Zellen. Für diese membrangebundene Enzymaktivität wurde unter anderem eine Beteiligung an der Produktion von aktiven Sauerstoffverbindungen (*Active oxygen species*, AOS) sowie eine Entgiftung von AOS zum Schutz der Membran im Zusammenhang mit Pathogenabwehr und Zellwandaufbau diskutiert. Allerdings konnten Verunreinigungen durch lösliche apoplastische oder cytosolische Proteine für diese Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden. Inzwischen wurde jedoch der Nachweis für die Existenz von fest an die Membran gebundenen Peroxidaseaktivitäten erbracht (Mika, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden diese membrangebundenen Peroxidaseaktivitäten aus Plasmamembranen von Maiswurzeln (*Zea mays* L.) partiell gereinigt und erstmals biochemisch charakterisiert. Die Sequenzen der zugehörigen Enzyme wurden identifiziert und bioinformatisch analysiert.

Es konnten vier verschiedene plasmamembrangebundene Peroxidasen (pmPOX1, pmPOX2a, pmPOX2b und pmPOX3) nachgewiesen werden. Als prosthetische Gruppen der Proteine wurden nichtkovalent gebundene Hämgruppen identifiziert. Die nativen molekularen Massen der Enzyme wurden durch Gelfiltration im Vergleich mit Standardproteinen ermittelt. Analysen der partiell gereinigten Proteine durch eine modifizierte nicht-reduzierende SDS-PAGE in Kombination mit einer Hämfärbung bestätigten die aus der chromatographischen Reinigung abgeleiteten Massen (138, 98, 57 und 55 kDa). Eine Glykosylierung der Proteine konnte durch verschiedene Methoden gezeigt werden. Als isoelektrische Punkte traten sowohl anionische als auch neutrale und kationische Werte auf.

Die partiell gereinigten Peroxidaseaktivitäten zeigten die für diese Enzyme charakteristische breite Substratspezifität. Da die Enzymaktivitäten in Gegenwart von 4-Hydroxyquecksilberbenzoesäure unverändert blieben und die Enzyme hohe Affinitäten zu phenolischen Substraten zeigten, ließen sich die untersuchten pmPOX entsprechend der Klassifizierung nach Welinder (1992) in die Klasse III der Superfamilie von Peroxidasen aus Pflanzen, Bakterien und Pilzen einordnen.

Für viele peroxidasevermittelte Funktionen ist die Bildung von AOS essentiell. Im Zusammenhang mit verschiedenen Stressfaktoren werden im wesentlichen zwei mögliche Quellen für die massive Produktion von AOS (oxidativen Burst) diskutiert: 1) Apoplastische Peroxidasen und 2) eine diphenylenjodoniumsensitive NAD(P)H-Oxidase (*Respiratory burst oxidase homolog*, Rboh). Um zu klären, ob und unter welchen Bedingungen die

plasmamembrangebundenen Peroxidasen *in vitro* AOS produzieren können, wurden deren NAD(P)H-Oxidaseaktivitäten detailliert untersucht. So waren pmPOX1, pmPOX2a und pmPOX2b *in vitro* in der Lage, große Mengen an AOS zu produzieren. Einige Charakteristika dieser Aktivitäten, insbesondere ein pH-Optimum im sauren pH-Bereich sowie eine fehlende Stimulierbarkeit durch Calcium zeigten jedoch deutliche Unterschiede zu den bisher für eine Beteiligung von Peroxidasen am oxidativen Burst postulierten Eigenschaften. Ein postuliertes ZmRboh1 konnte weder durch Enzymassays noch durch Western-Blot-Analysen in der Plasmamembran von Maiswurzeln nachgewiesen werden. Da die Enzymaktivitäten der plasmamembrangebundenen Peroxidasen in Gegenwart verschiedener Substrate unterschiedlich stark durch Mn^{2+} und nur unwesentlich durch Ca^{2+} beeinflusst wurden, scheinen diese Enzyme anders reguliert zu werden als die meisten Klasse-III-Peroxidasen.

Durch massenspektrometrische Analysen der Proteine und *in silico Cloning* konnten die *full length* Nukleinsäuresequenzen von pmPOX1 und pmPOX2b identifiziert und drei mögliche Sequenzen für pmPOX3 ermittelt werden. In einer bioinformatischen Analyse dieser Sequenzen konnten zahlreiche weitere Charakteristika der Enzyme abgeleitet und mit den experimentell ermittelten Daten verglichen werden. So wurden auf der Basis genomischer Nukleinsäuresequenzen der pmPOX strukturelle Aspekte der korrespondierenden Gene abgeleitet.

Alle Sequenzen der pmPOX zeigten auf Aminosäureebene die größten Sequenzübereinstimmungen zu Peroxidasen der Klasse III und deren klassische Charakteristika: Neben konservierten Peroxidasedomänen konnten unter anderem entsprechende putative Disulfidbrücken, Calciumbindestellen, Glykosylierungsstellen und zum ER-dirigierende N-terminale Signalpeptide identifiziert werden. Die proximale und distale Hämbindestelle bzw. das aktive Zentrum wurden abgeleitet. Dabei traten die wahrscheinlich am aktiven Zentrum und Substratkanal (*Substrate access channel*) beteiligten Aminosäurereste an Positionen auf, welche typisch für Guajacolperoxidasen sind. Die dreidimensionale Struktur von pmPOX1 und pmPOX2b konnte anhand ähnlicher, löslicher Klasse-III-Peroxidasen modelliert werden. Bioinformatische Voraussagen hydrophober Domänen im Vergleich mit Solubilisierungsexperimenten deuten darauf hin, dass das zum ER-dirigierende Signalpeptid jeweils nicht abgespalten und die Proteine durch eine N-terminale transmembrane Domäne verankert werden. Die Differenz zwischen den errechneten theoretischen molekularen Massen von pmPOX1, pmPOX2b bzw. pmPOX3 und den experimentell durch nichtreduzierende SDS-PAGE ermittelten molekularen Massen verdeutlichte, dass es sich bei pmPOX2b und pmPOX3 um stark glykosylierte Monomere handelt, während pmPOX1 offenbar als glykosyliertes Dimer vorzuliegen scheint. Letzteres ist für Klasse-III-Peroxidasen ungewöhnlich.

Homologe Proteine der plasmamembrangebundenen Peroxidasen konnten in verschiedenen monokotylen und dikotylen Pflanzenarten ermittelt sowie die einzelnen pmPOX in die von Passardi et al. (2004) aufgestellten Untergruppen für sekretorische Peroxidasen eingeordnet werden. Eine *in silico* Northern-Blot-Analyse deutet darauf hin, dass sowohl pmPOX1 als auch pmPOX2b hauptsächlich in Wurzelgeweben exprimiert werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden mögliche Funktionen der plasmamembrangebundenen Enzyme im Rahmen von entwicklungspezifischen oder stressinduzierten Zellwandmodifikationen, einer Beteiligung am Auxinkatabolismus sowie am Schutz oder der Reparatur der Membran diskutiert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abeles FB, Dunn LJ, Morgens P, Callahan A, Dinterman RE, Schmidt J** (1988) Induction of 33-kD and 60-kD peroxidases during ethylene-induced senescence of cucumber cotyledons. *Plant Physiol.* **87**: 609-615
- Able AJ, Guest DI, Sutherland MW** (2000) Hydrogen peroxide yields during the incompatible interaction of tobacco suspension cells inoculated with *Phytophthora nicotianae*. *Plant Physiol.* **124**: 899-910
- Acosta M, Rodríguez-López JN, Pedreño MA** (2002) Plant peroxidases - biochemistry and physiology. VI International Plant Peroxidase Symposium. Universität von Murcia und Universität von Coruña, Spanien. 307 Seiten
- Agostini E, Coniglio MS, Milrad SR, Tigier HA, Giulietti AM** (2003) Phytoremediation of 2,4-dichlorophenol by *Brassica napus* hairy root cultures. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **37**: 139-144
- Ahmed SA, Claiborne A** (1992) Active-site structural comparison of streptococcal NADH peroxidase and NADH oxidase. Reconstitution with artificial flavins. *J. Biol. Chem.* **267**: 3832-3840
- Alba CM, De Forchetti SM, Tigier HA** (1996) Peroxidase and phenoloxidase activities in peach endocarp. *In*: Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H. (Hrsg.). *Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. Universität Wien, Österreich und Universität Genf, Schweiz, 243-246
- Allison SD, Schultz JC** (2004) Differential activity of peroxidase isozymes in response to wounding, gypsy moth, and plant hormones in northern red oak (*Quercus rubra* L.). *J. Chem. Ecol.* **30**: 1363-1379
- Almeida M, Humanes M, Silva JA, Melo R, Fraústo da Silva JJR** (1996) *Phyllariopsis brevipes* – a brown algae with vanadium-dependent iodoperoxidases. *In*: Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H. (Hrsg.). *Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. Universität Wien, Österreich und Universität Genf, Schweiz, 146-152
- Amako K, Chen GX, Asada K** (1994) Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant Cell Physiol* **35**: 497-504

- Andrews J, Adams SR, Burton KS, Evered CE** (2002) Subcellular localization of peroxidase in tomato fruit skin and the possible implications for the regulation of fruit growth. *J. Exp. Bot.* **53**: 2185-2191
- Antelmann H, Scharf C, Hecker M** (2000) Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis. *J. Bacteriol.* **182**: 4478-4490
- Arthur JR** (2000) The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**: 1825-1835
- Asada K, Miyake C, Ogawa K, Hossain MA** (1996) Microcompartmentation of ascorbate peroxidase and regeneration of ascorbate from ascorbate radical: its dual role in chloroplasts. *In: Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H. (Hrsg.). Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology.* Universität Wien, Österreich und Universität Genf, Schweiz, 163-167
- Asada K** (1992) Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide – scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* **85**: 235-241
- Asard H, Horemans N, Preger V, Trost P** (1998) Plasma membrane *b*-type cytochromes. *In: Asard H, Bérczi A, Caubergs RJ (Hrsg.) Plasma Membrane Redox Systems and Their Role in Biological Stress and Disease.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1-31
- Asard H, Venken M, Caubergs RJ, Reijnders W, Oltmann FL, De Greef JA** (1989) *b*-Type cytochromes in higher plant plasma membranes. *Plant Physiol.* **90**: 1077-1083
- Asard H, Caubergs R, Renders D, Degreef JA** (1987) Duroquinone-stimulated NADH oxidase and *b*-type cytochromes in the plasma membrane of cauliflower inflorescences. *Plant Sci.* **53**: 109-119
- Askerlund P, Larsson C, Widell S** (1989) Cytochromes of plant plasma membranes. Characterization by absorbance difference spectrophotometry and redox titration. *Physiol. Plant.* **76**: 123-134
- Askerlund P, Larsson C, Widell S, Møller IM** (1987) NAD(P)H oxidase and peroxidase activities in purified plasma membranes from cauliflower inflorescences. *Physiol Plant* **71**: 9-19
- Auh CK, Murphy TM** (1995) Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of $O_2^{\cdot -}$ and H_2O_2 by *Phytophthora* elicitor-stimulated rose cells. *Plant Physiol.* **107**: 1241-1247
- Avigliano L, Carelli V, Casini A, Finazzi-Agró A, Liberatore F** (1985) Oxidation of NAD dimers by horseradish peroxidase. *Biochem. J.* **226**: 391-395
- Baga M, Chibbar RN, Kartha KK** (1995) Molecular cloning and expression analysis of peroxidase genes from wheat. *Plant Mol Biol.* **29**: 647-662

- Baier M, Dietz KJ** (1996) The 2-Cys peroxiredoxin bas1 insight in a new family of plant peroxidases. *In: Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H.* (Hrsg.). *Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. Universität Wien, Österreich und Universität Genf, Schweiz, 204-209
- Baker CJ, Deahl K, Domek J, Orlandi EW** (1998) Oxygen metabolism in plant/bacteria interactions: effect of DPI on the pseudo-NAD(P)H oxidase activity of peroxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **252**: 461-464
- Bannister AJ, Cook A, Kouzarides T** (1991) In vitro DNA binding activity of Fos/Jun and BZLF1 but not C/EBP is affected by redox changes. *Oncogene* **6**: 1243-1250
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S** (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**:783-795
- Bérczi A, Møller IM** (2000) Redox enzymes in the plant plasma membrane and their possible roles. *Plant Cell Environ.* **23**: 1287-1302
- Bérczi A, Møller IM** (1998) Characterization and solubilization of residual redox activity in salt-washed and detergent-treated plasma membrane vesicles from spinach leaves. *Protoplasma* **205**: 59-65
- Bernards MA, Summerhurst DK, Razem FA** (2004) Oxidases, peroxidases and hydrogen peroxide: The suberin connection. *Phytochemistry Rev.* **3**: 113-126
- Bernards MA, Fleming WD, Llewellyn DB, Priefer R, Yang X, Sabatino A, Plourde GL** (1999) Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiol* **121**: 135-146
- Bestwick CS, Brown IR, Mansfield JW** (1998) Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol.* **118**: 1067-1078
- Bestwick CS, Brown IR, Bennett MH, Mansfield JW** (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Cell* **9**: 209-221
- Blee KA, Jupe SC, Richard G, Zimmerlin A, Davies DR, Bolwell GP** (2001) Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and related members of the gene family. *Plant Mol. Biol.* **47**: 607-620
- Bohn M, Heinz E, Lühje S** (2001) Lipid Composition and Fluidity of Plasma Membranes isolated from Corn (*Zea mays* L.) Roots. *Arch. Biochem. Biophys.* **387**: 35-40
- Boller T** (1995) Chemoreception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 189-214

- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F** (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Bot.* **53**: 1367-1376
- Bolwell GP** (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Opinion in Plant Biology* **2**: 287-294
- Bolwell GP, Davies DR, Gerrish C, Auh CK, Murphy TM** (1998) Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and french bean cells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiol.* **116**: 1379-1385
- Bolwell GP, Wojtaszek P** (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **51**: 347-366
- Bolwell GP, Butt VS, Davies DR, Zimmerlin A** (1995) The origin of the oxidative burst in plants. *Free Rad. Res.* **23**: 517-532
- Borner GHH, Lilley KS, Stevens TJ, Dupree P** (2003) Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Arabidopsis. A proteomic and genomic analysis. *Plant. Physiol.* **132**: 568-577
- Borner GHH, Sherrier DJ, Stevens TJ, Arkin IT, Dupree P** (2002) Prediction of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Arabidopsis. A genomic analysis. *Plant Physiol.* **129**: 486-499
- Bors W, Michel C, Saran M** (1994) Flavonoid antioxidants: rate constants for reactions with oxygen radicals. *Methods Enzymol.* **234**: 420-429
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M** (1990) Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* **186**: 343-355
- Bosshard HR, Anni H, Yonetani T** (1991) Yeast cytochrome *c* peroxidase. In Everse J, Everse KE und Grisham MB (Hrsg.) *Peroxidases in Chemistry and Biology*. CRC Press, Boca Raton, Bd. **2**: 51-84
- Botella MA, Queseda MA, Kononowicz AK, Bressan RA, Pliego F, Hasagawa PM, Valpuesta V** (1994) Characterization and *in situ* localization of a salt-induced tomato peroxidase mRNA. *Plant Mol. Biol.* **25**: 105-114
- Brad I, Terbea M, Marcu Z, Hurduc N** (1974) Influenta infectarii cu *Fusarium moniliforme* Scheld a unor linii si hibrizi de porumb, asupra spectrului izoenzimelor peroxidazic. *St. Cerc. Biochim.* **17**: 11-14
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Brooks JL** (1986) Oxidase reactions of tomato anionic peroxidase. *Plant Physiol.* **80**: 130-133

- Brown O, Cowen RL, Preston CM, Castro MG, Lowenstein PR** (2000) Subcellular post-transcriptional targeting: delivery of an intracellular protein to the extracellular leaflet of the plasma membrane using a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) membrane anchor in neurons and polarised epithelial cells. *Gene Ther.* **7**: 1947-1953
- Bunkelmann J, Trelease RN** (1996) Ascorbate peroxidase. A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiol* **110**: 589-598
- Cadena-Gomez G, Nicholson RL** (1987) Papilla formation and associated peroxidase-activity: A non-specific response to attempted fungal penetration of maize. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **31**: 51-67
- Cakmak I, van de Wetering DAM, Marschner H, Bienfait HF** (1987) Involvement of superoxide radical in extracellular ferric reduction by iron-deficient bean roots. *Plant Physiol.* **85**: 310-314.
- Campa A** (1991) Biological roles of plant peroxidases: known and potential funktion. In Everse, J., Everse, K.E. und Grisham, M.B. (Hrsg.) *Peroxidases in Chemistry and Biology*. CRC Press, Boca Raton, Bd. **2**: 25-50
- Carpna X, Switala J, Loprasert S, Mongkolsuk S, Fita I, Loewen PC** (2002) Crystallization and preliminary X-ray analysis of the catalase-peroxidase KatG from *Burkholderia pseudomallei*. *Acta Cryst.* **D58**: 2184-2186
- Carpin S, Crèvecoeur M, De Meyer M, Simon P, Greppin H, Penel C** (2001) Identification of a Ca²⁺-pectate binding site on an apoplastic peroxidase. *Plant Cell* **13**: 511-520
- Casano LM, Zapata JM, Martin M, Sabater B** (2000) Chlororespiration and poisoning of cycling electron transport. Plastoquinone as electron transporters between thylakoid NADH dehydrogenase and peroxidase. *J. Biol. Chem.* **275**: 942-948
- Casano LM, Martin M, Zapata JM, Sabater B** (1999) Leaf age- and paraquat dependent effects on the levels of enzymes protecting against photooxidative stress in barley. *Plant Sci.* **149**: 13-22
- Castillejo MA, Amimour N, Dumas-Gaudot E, Rubiales D, Jorriñ JV** (2004) A proteomic approach to studying plant response to crenate broomrape (*Orobancha crenate*) in pea (*Pisum sativum*). *Phytochemistry* **65**: 1817-1828
- Chambers I, Frampton J, Goldfarb P, Affara N, McBain W, Harrison PR** (1986) The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *EMBO J.* **5**: 1221-1227
- Chandra S, Low PS** (1997) Measurement of Ca²⁺ fluxes during elicitation of the oxidative burst in aequorin-transformed tobacco cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 28274-28280
- Chaudiere J, Tappel AL** (1983) Purification and characterization of selenium-glutathione peroxidase from hamster liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **226**: 448-457

- Chen GX, Asada K** (1989) Ascorbate peroxidase in tea leaves: Occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol* **30**: 987-998
- Chico JM, Raices M, Tellez-Inon MT, Ulloa RM** (2002) A calcium-dependent protein kinase is systemically induced upon wounding in tomato plants. *Plant Physiol.* **128**: 256-270
- Chittoor JM, Leach JE, White FF** (1999) Induction of peroxidase during defense against pathogens. *In: Datta, SK and Muthukrishnan S, (Hrsg.) Pathogenesis-Related Proteins in Plants.* CRC Press, Boca Raton, FL 171-193
- Christensen JH, Bauw G, Welinder KG, van Montagu MV, Boerjan W** (1998) Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant Physiol.* **118**: 125-135
- Christensen JH, Bauw G, van Montagu M, Boerjan W** (1996) Towards the identification of lignin specific peroxidases in poplar. *In: Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H. (Hrsg.). Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology.* Universität Wien, Österreich und Universität Genf, Schweiz, 113-117
- Christian M, Schenck D, Böttger M, Steffens B, Lüthen H** (2006) New insight into auxin perception, signal transduction and transport. *Progr. Bot.* **67**: 217-245
- Collazo P, Montoliu LI, Puigdomenech P, Rigau J** (1992) Structure and expression of lignin *o*-methyltransferase gene from *Zea mays* L. *Plant Mol. Biol.* **20**: 857-867
- Converso DA, Fernandez ME** (1995) Peroxidase isozymes from wheat germ: Purification and properties. *Phytochemistry* **40**: 1341-1345
- Crevecoeur M, Pinedo M, Greppin H, Penel C** (1997) Peroxidase activity in shoot apical meristem from spinach. *Acta Histochem* **99**: 177-186
- Cserzo M, Wallin E, Simon I, von Heijne G, Elofsson A** (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method. *Prot. Eng.* **10**: 673-676
- Czarnocka B, Ruf J, Ferrand M, Carayon P, Lissitzky S** (1985) Purification of the human peroxidase and its identification as the microsomal antigen involved in autoimmune diseases. *FEBS Lett.* **190**: 147-152
- Dalton DA** (1991) Ascorbate peroxidase. *In Everse J, Everse K.E, Grisham MB (Hrsg.). Peroxidases in Chemistry and Biology.* CRC Press, Boca Raton, Bd. **2**: 139-153
- Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol. Life Sci.* **57**: 779-795
- Dawson RMC** (1956) Liver glycerophosphorylcholine diesterase. *Biochem. J.* **62**: 689-693

- De Gara L** (2004) Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. *Phytochemistry Rev.* **3**: 195-205
- De Gara L, de Pinto MC, Paciolla C, Cappetti V, Arrigoni O** (1996) Is ascorbate peroxidase only a scavenger of hydrogen peroxide? *In*: Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H. (Hrsg.). *Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. Universität Wien, Österreich und Universität Genf, Schweiz, 157-162
- De Marco A, Guzzardi P, Jamet É** (1999) Isolation of tobacco isoperoxidases accumulated in cell-suspension culture medium and characterization of activities related to cell wall metabolism. *Plant Physiol* **120**: 371-382
- De Marco A, Pinton R, Fischer-Schliebs E, Varanini Z** (1995) Possible interaction between peroxidase and NAD(P)H-dependent nitrate reductase activities of plasma membranes of corn roots. *J Exp Bot* **46**: 1677-1683
- De Obeso M, Caparrós-Ruiz D, Vignol F, Puigdomènech P, Rigau J** (2003) Charakterisation of maize peroxidases having differential patterns of mRNA accumulation in relation to lignifying tissues. *Gene* **309**:23-33
- De Souza IR, MacAdam JW** (2001) Gibberellic acid and dwarfism effects on the growth dynamics of B73 maize (*Zea mays* L.) leaf blades: a transient increase in apoplastic peroxidase activity precedes cessation of cell elongation. *J. Exp. Bot.* **52**: 1673-1682
- Delannoy E, Jalloul A, Assigbetse K, Marmey P, Geiger JP, Lherminier J, Daniel JF, Martinez C, Nicole M** (2003) Activity of class III peroxidases in the defense of cotton to bacterial blight. *Mol. Plant-Microbe-Interact.* **16**: 1030-1038
- Desikan R, Mackerness SA-H, Hancock JT, Neill SJ** (2001) Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* **127**: 159-172
- Desikan R, Clarke A, Hancock JT, Neill SJ** (1999) H₂O₂ activates a MAP kinase-like enzyme in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *J. Exp. Bot.* **50**: 1863-1866
- Desikan R, Burnett EC, Hancock JT, Neill SJ** (1998) Harpin and hydrogen peroxide induce the expression of a homologue of gp91^{phox} in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *J. Exp. Bot.* **49**: 1767-1771
- Díaz J, Pomar F, Bernal Á, Merino F** (2004) Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L. *Phytochemistry Reviews* **3**: 141-157
- Dietz KJ** (2003) Plant peroxiredoxins. *Ann. Rev. Plant Biol.* **54**: 93-107
- Döring O, Lüthje S, Böttger M** (1998) To be or not to be – a question of plasma membrane redox? *Prog. Bot.* **59**: 328-354
- Dowd PF, Johnson ET** (2005) Association of a specific cationic peroxidase isozyme with maize stress and disease resistance responses, genetic identification, and identification of a cDNA coding for the isozyme. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 4464-4470

- Dowd PF, Lagrimini LM** (1997) The role of peroxidase in host insect defenses. *In* Carozzi N, Koziel M (Hrsg.) *Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants*. Taylor und Francis, Bristol, PA; 195-223
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF** (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:10328-10333
- Duroux L, Welinder KG** (2003) The peroxidase gene family in plants: a phylogenetic overview. *J. Mol. Evol.* **57**: 397-407
- Echalier A, Trivelli X, Corbier C, Rouhier N, Walker O, Tsan P, Jacquot JP, Aubry A, Krimm I, Lancelin JM** (2005): Crystal structure and solution NMR dynamics of a D (Type II) peroxiredoxin glutaredoxin and thioredoxin dependent: a new insight into the peroxiredoxin oligomerism. *Biochemistry* **44**: 1755-1767)
- Edens WA, Sharling L, Cheng G, Shapira R, Kinkade JM, Lee T, Edens HA, Tang X, Sullards C, Flaherty DB, Benian GM, Lambeth JD** (2001) Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J. Cell Biol.* **154**: 879-891
- Eisenhaber B, Bork P, Eisenhaber F** (1999) Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences. *JMB* **292**: 741-758
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G** (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **300**: 1005-1016
- Espelie KE, Franceschi VR, Kolattukudy PE** (1986) Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue. *Plant Physiol.* **81**: 487-492
- Fayadat L, Niccoli-Sire P, Lanet J, Franc JL** (1998) Human thyroperoxidase is largely retained and rapidly degraded in the endoplasmatic reticulum. Its N-glycans are required for folding and intracellular trafficking. *Endocrinology* **139**: 4277-4285
- Finzel BC, Poulos TL, Kraut J** (1984) Crystal structure of yeast cytochrome c peroxidase refined at 1.7 Ångström resolution. *J. Biol. Chem.* **259**: 13027-13036
- Flohe L und Gunzler WA** (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **105**: 114-121
- Frahry G, Schopfer P** (1998) Inhibition of O₂-reducing activity of horseradish peroxidase by diphenyliodonium. *Phytochem.* **48**: 223-227
- Fry SC** (2004) Oxidative coupling of tyrosine and ferulic acid residues: intra- and extra-protoplasmic occurrence, predominance of trimers and larger products, and possible role in inter-polymeric cross-linking. *Phytochemistry Reviews* **3**: 97-111

- Fry SC** (1998) Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochem. J.* **332**: 507-515
- Gajhede M, Schuller DJ, Henriksen A, Smith AT, Poulos TL** (1997) Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 1032-1038
- Garcia A, Navarro P, Castillo FJ** (1996) Peroxidase and NADPH oxidase activities in leaves and roots of sunflower plants as markers of heavy metals toxicity. *In: Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H. (Hrsg.). Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology.* Universität Wien, Österreich und Universität Genf, Schweiz, 369-373
- Gaspar T, Penel C, Thorpe T, Greppin H** (Hrsg., 1982) Peroxidases 1970 – 1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Universität Genf, Schweiz, 253 S.
- Gazaryan IG, Lagrimini LM** (1996) Tobacco anionic peroxidase overexpressed in transgenic plants: Aerobic oxidation of indole-3-acetic acid. *Phytochemistry* **42**: 1271-1278
- Gechev TS, Hille J** (2005) Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J. Cell Biol.* **168**: 17-20
- Gold MH, Alic M** (1993) Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol Rev.* **57**: 605-622
- Grantham R** (1974) Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* **185**: 862-864
- Gray JSS, Montgomery R** (2003) Purification and characterization of a peroxidase from corn steep water. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 1592-1601
- Gray JSS, Montgomery R** (1997) The N-glycosylation sites of soybean seed coat peroxidase. *Glycobiology* **7**: 679-685
- Gray JSS, Yang BY, Hull SR, Venzke DP, Montgomery R** (1996) The glykans of soybean peroxidase. *Glycobiology* **6**: 23-32
- Greppin H, Wiater RG, Ginalska G, Lobarzewski J** (1999) The cabbage peroxidase isoforms changes influenced by Ca²⁺ and Mg²⁺ ions. *Plant Peroxidase Newsletter* **13**: 129-135
- Groom QJ, Torres MA, Fordham Skelton AP, Hammond-Kosack KE, Robinson NJ, Jones JDG** (1996) RbohA, a rice homologue of the mammalian gp91^{phox} respiratory burst oxidase gene. *Plant J.* **10**: 515-522
- Guillet-Claude C, Birolleau-Touchard C, Manicacci D, Rogowsky PM, Rigau J, Murigneux A, Martinant JP, Barriere Y** (2004) Nucleotide diversity of the ZmPox3 maize peroxidase gene: relationships between a MITE insertion in exon 2 and variation in forage maize digestibility. *BMC Genetics* **5**: 19-29

- Hadži-Tašković Šukalović V, Vuletić M** (1998) Properties of peroxidase activities in plasma membrane and cell wall from maize root. *Jugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta* **34**: 103-109
- Harrison SJ, Curtis MD, McIntyre CL, Maclean DJ, Manners JM** (1995) Differential expression of peroxidase isogenes during early stages of infection of the tropical forage legume *Stylosanthes humilis* by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**: 398-406
- Haslekås C, Grini PE, Nordgard SH, Thorstensen T, Viken MK, Nygaard V, Aalen RB** (2003) ABI3 mediates expression of the peroxiredoxin antioxidant *AtPER1* gene and induction by oxidative stress. *Plant Mol. Biol.* **53**: 313-326
- Haslekås C, Stacy RA, Nygaard V, Culianez-Macia FA, Aalen RB** (1998) The expression of a peroxiredoxin antioxidant gene, *AtPER1*, in *Arabidopsis thaliana* is seed-specific and related to dormancy. *Plant Mol. Biol.* **36**: 833-845.
- Hauser MJB, Olsen LF** (1996) Experimental studies of the mechanism of the peroxidase-oxidase reaction. *In: Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H. (Hrsg.). Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology.* Universität Wien, Österreich und Universität Genf, Schweiz, 82-87
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ** (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **13**: 572-584
- Henderson LM** (1998) Role of histidines identified by mutagenesis in the NADPH oxidase-associated H⁺ channel. *J. Biol. Chem.* **273**: 33216-33223
- Henderson LM, Chappell JB** (1996) NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta* **1273**: 87-107
- Hendriks T, Wijsman HJ, Van Loon LC** (1991) Petunia peroxidase a: isolation, purification and characteristics. *Eur J Biochem* **199**: 139-146
- Henriksen A, Mirza O, Indiani C, Teilum K, Smulevich G, Welinder KG, Gajhede M** (2001) Structure of soybean seed coat peroxidase: A plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions. *Protein Science* **10**: 108-115
- Henriksen A, Welinder KG, Gajhede M** (1999) The structures of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates. *J. Biol. Chem.* **274**: 35005-35011
- Henriksen A, Welinder KG, Gajhede M** (1998) Structure of barley grain peroxidase refined at 1.9- Å resolution. A plant peroxidase reversibly inactivated at neutral pH. *J. Biol. Chem.* **273**: 2241-2248
- Herbette S, Menn AL, Rousselle P, Ameglio T, Faltin Z, Branlard G, Eshdat Y, Julien JL, Drevet JR, Roeckel-Drevet P** (2005) Modification of photosynthetic regulation in

- tomato overexpressing glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1724**: 108-118
- Hilaire E, Young SA, Willard LH, McGee JD, Sweat T, Chittoor JM, Guikema JA, Leach JE** (2001) Vascular defense responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 1411-1419
- Hillar A, Peters B, Pauls R, Loboda A, Zhang H, Mauk AG, Loewen PC** (2000) Modulation of the activities of catalase-peroxidase HPI of *Escherichia coli* by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **39**: 5868-5875
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H** (2001) A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol* **42**: 462-468
- Hiraga S, Yamamoto K, Ito H, Sasaki K, Matsui H, Honma M, Nagamura Y, Sasaki T, Ohashi Y** (2000a) Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase genes. *FEBS Lett.* **471**: 245-250
- Hiraga S, Ito H, Yamakawa H, Ohtsubo N, Seo S, Mitsuhara I, Matsui H, Honma M, Ohashi Y** (2000b) An HR-induced tobacco peroxidase gene is responsive to spermine, but not to salicylate, methyl jasmonate, and ethephon. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 210-216
- Hofmann B, Hecht HJ, Flohé L** (2002) Peroxiredoxins. *Biol. Chem.* **383**: 347-364
- Hoson T, Wakabayashi K, Masuda Y** (1995) Inhibition of the breakdown of xyloglucans in azuki bean epicotyls by concanavalin A. *Plant Cell Physiol.* **36**: 897-902
- Hsi LC, Tsai AL, Kulmacz RJ, English DG, Siefker AO, Otto JC, Smith WL** (1993) Trp387 and the putative leucine zippers of PGH synthases-1 and -2. *J. Lipid Mediat.* **6**: 131-138
- Hu C, Smith R, Van Huystee R** (1989) Biosynthesis and localization of peanut peroxidases. A comparison of the cationic and the anionic isozymes. *Plant Physiol* **135**: 391-397
- Huang K, Lauridsen E, Clausen J** (1994) Selenium-containing peroxidases of germinating barley. *Biol. Trace Elem. Res.* **46**: 173-182
- Iiyama K, Lam T, Stone BA** (1994) Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol.* **104**: 315-320
- Ikonen E** (2001) Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 470-477
- Ishikawa T, Yoshimura K, Sakai K, Tamoi M, Takeda T, Shigeoka S** (1998) Molecular characterization and physiological role of a glyoxysome-bound ascorbate peroxidase from spinach. *Plant Cell Physiol.* **39**: 23-34
- Ishikawa T, Sakai K, Yoshimura K, Takeda T, Shigeoka S** (1996) cDNAs encoding spinach stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidase, differing in the presence or absence of their 3'-coding regions. *FEBS Lett.* **384**: 289-293

- Jaakola L, Maatta-Riihinen K, Karenlampi S, Hohtola A** (2003) Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta* **218**: 721-728
- Jackson AO, Taylor CB** (1996) Plant-microbe interactions: Life and death at the interface. *Plant Cell* **8**: 1651-1668
- Jackson P, Paulo S, Ricardo CP** (1996) B2, the major soluble peroxidase of lupins, in vegetative development and the plant response to pathogenic agents. *In*: Obinger C, Burner U, Ebermann R, Penel C, Greppin H (Hrsg.). *Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. Universität Wien, Österreich und Universität Genf, Schweiz, 247-254
- Jalloul A, Montillet JL, Assigbetse K, Agnel JP, Delannoy E, Triantaphylides C, Daniel JF, Marmey P, Geiger JP, Nicole M** (2002) Lipid peroxidation in cotton: *Xanthomonas* interactions and the role of lipoxygenases during the hypersensitive reaction. *Plant J.* **32**: 1-12
- Jespersen HM, Kjærsgård IVH, Østergaard L, Welinder KG** (1997) From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. *Biochem J* **326**: 305-310
- Jiang M, Zhang J** (2003) Cross-talk between calcium and reactive oxygen species originated from NADPH oxidase in abscisic acid-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Environ.* **26**: 929-938
- Jimenez A, Hernandez JA, Pastori G, del Rio LA, Sevilla F** (1998) Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *PlantPhysiol.* **118**: 1327-1335
- Johansson SK, Rasmussen JE, Harthill KG, Welinder KG** (1992) Amino acid and carbohydrate sequence of barley seed-specific peroxidase BP 1. *Plant Mol. Biol.* **18**: 1151-1161
- Kang SG, Jeong HK, Suh HS** (2004) Characterization of a new member of the glutathione peroxidase gene family in *Oryza sativa*. *Mol. Cells* **17**: 23-28
- Kauss H, Jeblick W** (1996) Influence of salicylic acid on the induction of competence for H₂O₂ elicitation. *Plant Physiol.* **111**:755-763
- Keller T, Damude HG, Werner D, Doerner P, Dixon RA, Lamb C** (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91^{phox} subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* **10**: 255-266
- Kerby K, Somerville SC** (1992) Purification of an infection-related, extracellular peroxidase from barley. *Plant Physiol.* **100**: 397-402

- Kieselbach T, Bystedt M, Hynds P, Robinson C, Schroder WP** (2000) A peroxidase homologue and novel plastocyanin located by proteomics to the Arabidopsis chloroplast thylakoid lumen. *FEBS Lett.* **480**: 271-276
- Kim K, Kim I, Lee KY, Rhee SG, Stadtman ER** (1998): The isolation and purification of a specific "protector" protein which exhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe^{III}/O₂ mixed-function oxidation system. *J. Biol. Chem.* **263**: 4704-4711
- Kim SH, Terry ME, Hoops P, Dauwalder M, Roux SJ** (1988) Production and characterization of monoklonal antibodies to wall-localized peroxidases from corn seedlings. *Plant Physiol.* **88**: 1446-1453
- Kimura S, Kotani T, McBride OW, Umeki K, Hirai K, Nakayama T, Ohtaki S** (1987) Human thyroid peroxidase: complete cDNA and protein sequence, chromosome mapping, and identification of two alternately spliced mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 5555-5559
- Kinoshita T, Inoue N** (2000) Dissecting and manipulating the pathway for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**: 632-638
- Klebanoff SJ** (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* **77**: 598-625
- Klotz KL, Liu TTY, Liu L, Lagrimini LM** (1998) Expression of the tobacco anionic peroxidase gene is tissue-specific and developmentally regulated. *Plant Mol. Biol.* **36**: 509-520
- Knopp EA, Arndt TL, Eng KL, Caldwell M, LeBoeuf RC, Deeb SS, O'Brien KD** (1999) Murine phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: cDNA sequence, tissue expression, and mapping. *Mamm. Genome* **10**:601-605
- Kobayashi A, Fukusaki E, Kajiyama S** (1996) Bioactive potentiality of POD products derived from natural simple phenolics. *In: Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H. (Hrsg.). Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology.* Universität Wien, Österreich und Universität Genf, Schweiz, 292-297
- Koshiba T** (1993) Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant Cell Physiol* **34**: 713-721
- Kristensen BK, Burhenne K, Rasmussen SK** (2004) Peroxidases and the metabolism of hydroxycinnamic acid amides in poaceae. *Phytochemistry Reviews* **3**: 127-140
- Kristensen BK, Brandt J, Bojsen K, Throdal-Christensen H, Kerby K, Collinge DB, Mikkelsen JD, Rasmussen SK** (1997) Expression of a defence-related intercellular barley peroxidase in transgenic tobacco. *Plant Sci.* **122**: 173-182
- Kroj T, Rudd JJ, Nurnberger T, Gabler Y, Lee J, Scheel D** (2003) Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *J. Biol. Chem.* **278**: 2256-2264.

- Krylov SN, Dunford HB** (1996) Reaction of horseradish peroxidase with indole-3-acetic acid. In: Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H. (Hrsg.). *Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. Universität Wien, Österreich und Universität Genf, Schweiz, 59-69
- Küpper FC, Kloareg B, Guern J, Potin P** (2001) Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *Plant Physiol.* **125**: 278–291
- Kvaratskhelia M, Winkel C, Naldrett MT, Thorneley RNF** (1999) A novel high activity ascorbate peroxidase from tea (*Camellia sinensis*) – A class III peroxidase with unusual substrate specificity. *J. Plant Physiol.* **154**: 273-282
- Kvaratskhelia M, Winkel C, Thorneley RNF** (1997) Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves. *Plant Physiol* **114**: 1237-1245
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lagrimini LM, Joly RJ, Dunlap JR, Liu TTY** (1997a) The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. *Plant Mol. Biol.* **33**: 887-895
- Lagrimini LM, Gingas V, Finger F, Rothstein S, Liu TTY** (1997b) Characterization of antisense transformed plants deficient in the tobacco anionic peroxidase. *Plant Physiol.* **114**: 1187-1196
- Lagrimini LM** (1996) The role of the tobacco anionic peroxidase in growth and development. In: Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H. (Hrsg.). *Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. Universität Wien, Österreich und Universität Genf, Schweiz, 235-242
- Lagrimini LM, Rothstein S** (1987) Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* **84**: 438-442
- Laloue H, Weber-Lofti F, Lucau-Danila A, Guillemaut P** (1997) Identification of ascorbate and guaiacol peroxidase in needle chloroplasts of spruce trees. *Plant Physiol. Biochem.* **35**: 341-346
- Larson TJ, Ehrmann M, Boos W** (1983) Periplasmic glycerophosphodiester phosphodiesterase of *E. coli*, a new enzyme of the *glp* regulon. *J. Biol. Chem.* **258**: 5428-5432
- Larsson C, Widell S, Kjellbom P** (1987) Preparation of high purity plasma membranes. *Meth. Enzymol.* **148**: 558-562
- Lavid N, Schwartz A, Yarden O, Tel-Or E** (2001) The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (*Nymphaeaceae*). *Planta* **212**: 323-331

- Le Gall AH, Yeaman C, Muesch A, Rodriguez-Boulan E** (1995) Epithelial cell polarity: new perspectives. *Semin. Nephrol.* **15**: 272-284
- Lee DJ, Kim SS, Kim SS** (2002) The regulation of Korean radish cationic peroxidase promoter by a low ratio of cytokinin to auxin. *Plant Sci.* **162**: 345-353
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM, Tschesche H** (1998) *Prinzipien der Biochemie.* Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 2. Auflage
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C** (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-593
- Li Y, Kajita S, Kawai S, Katayama Y, Morohoshi N** (2003) Down-regulation of an anionic peroxidase in transgenic aspen and its effect on lignin characteristics. *J. Plant Res.* **116**: 175-182
- Li WH, Wu CI, Luo CC** (1985) A new method for estimating synonymous and nonsynonymous rates of nucleotide substitution considering the relative likelihood of nucleotide and codon changes. *Mol. Biol. Evol.* **2**: 150-174
- Lige B, Ma S, van Huystee RB** (2001) The effects of the site-directed removal of N-glycosylation from cationic peanut peroxidase on its function. *Arch. Biochem. Biophys.* **386**: 17-24
- Lin W** (1982) Responses of corn root protoplasts to exogenous reduced nicotinamide adenine dinucleotide: oxygen consumption, ion uptake and membrane potential. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 3773-3776
- Liszskay A, Kenk B, Schopfer P** (2003) Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta* **217**: 658-667
- Llorente F, López-Cobollo RM, Catalá R, Martínez-Zapater JM, Salinas J** (2002) A novel cold-inducible gene from *Arabidopsis*, RCI3, encodes a peroxidase that constitutes a component for stress tolerance. *Plant J.* **32**: 13-24
- Lloyd-Davies KA, Michell RH, Coleman R** (1972) Glycerolphosphorylcholine phosphodiesterase in rat liver. Subcellular distribution and localization in plasma membranes. *Biochem. J.* **127**: 357-368
- Lobarzewski J, Brzyska M, Greppin H** (1996) The fungal peroxidase kinetics with some phenolics hydrogen donors in relation to lignin degradation. *In* C Obinger, U Burner, R Ebermann, C Penel, H Greppin, eds, *Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology.* University of Vienna, Austria and University of Geneva, Switzerland, pp 153-156
- Longu S, Medda R, Padiglia A, Pedersen JZ und Floris G** (2004): The reaction mechanism of plant peroxidases. *Ital. J. Biochem.* **53**: 41-45

- Lopez-Delgado H, Dat JF, Foyer CH, Scott IM** (1998) Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂. *J. Exp. Bot.* **49**: 713-720
- Loukili A, Limam F, Ayadi A, Boyer N, Ouelhazi L** (1999) Purification and characterization of a neutral peroxidase induced by rubbing tomato internodes. *Physiol Plant* **105**: 24-31
- Ludwig-Müller J, Hilgenberg W** (1992) Tryptophan oxidizing enzyme and basic peroxidase isoenzymes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.: Are they identical? *Plant Cell Physiol* **33**: 1115-1125
- Ludwig-Müller J, Rausch T, Lang S, Hilgenberg W** (1990) Plasma membrane bound high pl peroxidase isoenzymes convert tryptophan to indole-3-acetaldoxime. *Phytochemistry* **29**: 1397-1400
- Lüthje S, Böttger M, Döring O** (2005) Proton channeling *b*-Type cytochromes in plant plasma membranes? *Progr. Bot.* **66**: 187-217
- Lüthje S, Böttger M, Döring O** (2000) Are plants stacked neutrophiles? Comparison of pathogen-induced oxidative burst in plants and mammals. *Progr. Bot.* **61**: 187-222
- Lüthje S, Van Gestelen P, Córdoba-Pedregosa MC, Gonzáles-Reyes JA, Asard H, Villalba JM, Böttger M** (1998) Quinones in plant plasma membranes – a missing link? *Protoplasma* **205**: 43-51
- Lüthje S, Niecke M, Böttger M** (1995) Iron and copper in plasma membranes of maize (*Zea mays* L.) roots investigated by proton induced X-ray emission. *Protoplasma* **184**: 145-150
- Macri F, di Llenna P, Vianello A** (1974) Preliminary research on peroxidase, polyphenoloxidase activity and phenol content in healthy and infected corn leaves susceptible and resistant to *Helminthosporium maydis* race *T*. *Riv. Pathol. Veget. Ser.* **4 10**: 109-121
- Mäder M, Füssl R** (1982) Role of peroxidase in lignification of tobacco cells. II. Regulation by phenolic compounds. *Plant Physiol* **70**: 1132-1134
- Mano S, Yamaguchi K, Hayashi M, Nishimura M** (1997) Stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases are produced by alternative splicing in pumpkin. *FEBS Lett.* **413**: 21-26
- Martinez C, Montillet J, Bresson E, Agnel J, Dai G, Daniel J, Geiger J, Nicole M** (1998) Apoplastic peroxidase generates superoxide anions in cells of cotton cotyledons undergoing the hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* race 18. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 1038-1047
- Matsui T, Nakayama H, Yoshida K, Shinmyo A** (2003) Vesicular transport route of horseradish C1a peroxidase is regulated by N- and C-terminal propeptides in tobacco cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**: 517-522

- McGonigle S, Dalton JP, James ER** (1998) Peroxidoxins: a new antioxidant family. *Parasitology Today* **14**: 139-145
- McLusky SR, Bennett MH, Beale MH, Lewis MJ, Gaskin P, Mansfield JW** (1999) Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *Plant J.* **17**: 523-534
- Menckhoff M, Lühje S** (2004) Transmembrane electron transport in sealed and NAD(P)H-loaded right-side-out plasma membrane vesicles isolated from maize (*Zea mays* L.) roots. *J. Exp. Bot.* **55**: 1343-1349
- Merril CR, Goldman D, Van Keuren ML** (1984) Gel protein stains: silver stain. *Methods Enzymol* **104**: 441-447
- Mika A, Minibayeva F, Beckett R, Lühje S** (2004) Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Rev.* **3**: 173-193
- Mika A, Lühje S** (2003) Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiol.* **132**: 1489-1498
- Mika A** (2001) Biochemische Charakterisierung einer Peroxidaseaktivität aus Plasmamembranen von Maiswurzeln (*Zea mays* L.). Diplomarbeit an der Universität Hamburg, 1-82 Seiten
- Miller E, Schreier P** (1985) Studies on flavonol degradation by peroxidase (donor: H₂O₂-oxidoreductase, EC 1.11.1.7). Part 1: kaempferol. *Food Chem.* **17**: 143-154
- Minibayeva F, Mika A, Lühje S** (2003) Salicylic acid changes the properties of extracellular peroxidase activity secreted from wounded wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Protoplasma* **221**: 67-72
- Minibayeva F, Gordon LK, Kolesnikov OP, Chasov AV** (2001) Role of extracellular peroxidase in the superoxide production by wheat root cells. *Protoplasma* **217**: 125-128
- Mirza O, Henriksen A, Østergaard L, Welinder KG, Gajhede M** (2000): *Arabidopsis thaliana* peroxidase N. Structure of a novel neutral peroxidase. *Acta Crystallogr.* **D56**: 372-375
- Mittler R, Zilinskas A** (1991) Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiol* **97**: 962-968
- Møller IM, Bérczi A** (1986) Salicylhydroxamic acid-stimulated NADH oxidation by purified plasmalemma vesicles from wheat roots. *Physiol Plant* **68**: 67-74

- Morimoto S, Tateishi N, Inuyama M, Taura F, Tanaka H, Shoyama Y** (1999) Identification and molecular characterization of novel peroxidase with structural protein-like properties. *J. Biol. Chem.* **274**: 26192-26198
- Mullen RT, Lisenbee CS, Flynn CR, Trelease RN** (2001) Stable and transient expression of chimeric peroxisomal membrane proteins induces an independent "zippering" of peroxisomes and an endoplasmic reticulum subdomain. *Planta* **213**: 849-863
- Muniz M, Riezman H** (2000) Intracellular transport of GPI-anchored proteins. *EMBO J.* **19**:10-15
- Munson Jr. RS, Sasaki K** (1993) Protein D, a putative immunoglobulin D-binding protein produced by *Haemophilus influenzae*, is a glycerophosphodiester phosphodiesterase. *J. Bacteriol.* **175**: 4569-4571
- Murgia I, Tarantino D, Vannini C, Bracale M, Carravieri S, Soave C** (2004) Arabidopsis thaliana plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. *Plant J.* **38**: 940-953
- Murphy MA, Phillipson BA, Baker A, Mullen RT** (2003) Characterization of the Targeting Signal of the Arabidopsis 22 kDa integral peroxisomal membrane protein. *Plant Physiol.* **133**: 813-828
- Murphy TM, Vu H, Nguyen T** (1998) The superoxide synthases of rose cells. *Plant Physiol.* **117**: 1301-1305
- Neill S, Desikan R, Hancock J** (2002) Hydrogen peroxide signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 388-395
- Niccoli-Sire P, Fayadat L, Siffroi-Fernandez S, Malthierry Y, Franc JL** (2001) Alternatively spliced form of human thyroperoxidase, TPO: activity, intracellular trafficking, and role in hormogenesis. *Biochemistry* **40**: 2572-2579
- Nielsen KL, Indiani C, Henriksen A, Feis A, Becucci M, Gajhede M, Smulevich G, Welinder KG** (2001) Differential activity and structure of highly similar peroxidases. Spectroscopic, crystallographic, and enzymatic analyses of lignifying *Arabidopsis thaliana* peroxidase A2 and horseradish peroxidase A2. *Biochemistry* **40**: 11013-11021
- Nito K, Yamaguchi K, Kondo M, Hayashi M, Nishimura M** (2001) Pumpkin peroxisomal ascorbate peroxidase is localized on peroxisomal membranes and unknown membranous structures. *Plant Cell Physiol* **42**: 20-27
- Obinger C, Burner U, Ebermann R, Penel C, Greppin H** (Hrsg., 1996a) *Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. Universität Wien, Österreich und Universität Genf, Schweiz, 1-420

- Obinger C, Burner R, Vötsch B, Hofstetter W, Ebermann R** (1996b) Reaction of peroxidases with thiols: hydrogen peroxide generation and the influence of phenols. In: Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H. (Hrsg.). *Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. Universität Wien, Österreich und Universität Genf, Schweiz, 106-112
- Oh SA, Park JH, Lee GI, Paek KH, Park SK, Nam HG** (1997) Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **12**: 527-535
- Olden K, Bernard BA, Humphries MJ, Yeo KT, White SL, Newton SA, Bauer HC, Parent JB** (1985) Function of glycoprotein glykans. *TIBS* **10**: 78-82
- Olmos E, Martinez-Solano JR, Piqueras A, Hellin E** (2003) Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *J. Exp. Bot.* **54**: 291-301
- Olsen LF, Lunding A, Lauritsen FR, Allegra M** (2001) Melatonin activates the peroxidase-oxidase reaction and promotes oscillations. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **284**: 1071-1076
- Østergaard L, Teilum K, Mirza O, Mattsson O, Petersen M, Welinder KG, Mundy J, Gajhede M, Henriksen A** (2000) Arabidopsis ATP A2 peroxidase. Expression and high resolution structure of a plant peroxidase with implications for lignification. *Plant Mol. Biol.* **44**: 231-243
- Otte O, Pachten A, Hein F, Barz W** (2001) Early elicitor-induced events in chickpea cells: functional links between oxidative burst, sequential occurrence of extracellular alkalisation and acidification, K^+/H^+ exchange and defence-related gene activation. *Z. Naturforsch. C* **56**: 65-76
- Padegimas N, Reichert L** (2004) Nematode-upregulated peroxidase gene and promoter from nematode-resistant maize line Mp307. US-Patent 6.703.541
- Paltauf F, Zinser E, Daum G** (1985) Utilization of exogenous glycerophosphodiester and glycerol-3-phosphate by inositol-starved yeast, *Saccharomyces uvarum*. *Biochim. Biophys. Acta* **835**: 322-330
- Pantoja O, Willmer CM** (1988) Redox activity and peroxidase activity associated with the plasma membrane of guard-cell protoplasts. *Planta* **174**: 44-50
- Papadakis AK, Roubelakis-Angelakis KA** (1999) The generation of active oxygen species differs in tobacco and grapevine mesophyll protoplasts. *Plant Physiol.* **121**: 197-206
- Park SY, Ryu SH, Kwon SY, Lee HS, Kim JG, Kwak SS** (2003) Differential expression of six novel peroxidase cDNAs from cell cultures of sweet potato in response to stress. *Mol. Genet. Genomics* **269**: 542-552
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C** (2005): Peroxidases have more functions than a swiss army knife. *Plant Cell Rep.* **24**: 255-265

- Passardi F, Longet D, Penel C, Dunand C** (2004) The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry* **65**: 1879-1893
- Patterson W, Poulos TL** (1995) Crystal structure of recombinant pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Biochemistry* **34**: 4331-4341
- Patton JL, Pessoa-Brandao L, Henry SA** (1995) Production and reutilization of an extracellular phosphatidylinositol catabolite, glycerophosphoinositol, by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**: 3379-3385
- Pedreño MA, Morales M, Caleron AA, Zapata JM, Ros Barcelo A** (1996) A *trans*-resveratrol oxidizing basic peroxidase isoenzyme from *Vitis vinifera*. In: Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H. (Hrsg.). *Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. Universität Wien, Österreich und Universität Genf, Schweiz, 338-344
- Peltier G, Cournac L** (2002) Chlororespiration. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**: 523-550
- Penel C, Crevecoeur M, Greppin H** (1996) The binding of peroxidases to pectins. In: Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H. (Hrsg.). *Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. Universität Wien, Österreich und Universität Genf, Schweiz, 259-263
- Penel C, Gaspar T, Greppin H** (Hrsg., 1992) *Plant Peroxidases. 1980 - 1990. Topics and Detailed Literatur on Molecular, Biochemical, and Physiological Aspects*. Universität Genf, Schweiz, 475 S.
- Penel C, Castillo FJ** (1991) Peroxidases of plant plasma membranes, apoplastic ascorbate, and relation of redox activities to plant pathology. In FL Crane, DJ Morré, H Loew, eds, *Oxidoreduction at the Plasma Membrane, Vol II*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 121-147
- Peng M, Kuc J** (1992) Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disk. *Phytopathol.* **82**: 696-699
- Peskan T, Westermann M, Oelmüller R** (2000) Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *Eur. J. Biochem.* **267**: 6989-6995
- Pfeifer H, Conrad M, Roethlein D, Kyriakopoulos A, Brielmeier M, Bornkamm GW, Behne D** (2001) Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J.* **15**: 1236-1238
- Polidoros AN, Scandalios JG** (1999) Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiol. Plant.* **106**: 112-120

- Prasad TK, Anderson MD, Stewart CR** (1995) Localization and characterization of peroxidases in the mitochondria of chilling-acclimated maize seedlings. *Plant Physiol.* **108**: 1597-1605
- Price NJ, Pinheiro C, Soares CM, Ashford DA, Pinto Ricardo C, Jackson PA** (2003) A biochemical and molecular characterization of LEP1, an extensin peroxidase from lupin. *J. Biol. Chem.* **278**: 41389-41399
- Quartacci MF, Cosi E, Navari-Izzo F** (2001) Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. *J. Exp. Bot.* **52**: 77-84
- Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barceló A, Amaya I, Medina MI, Alonso FJ, Milradde-Forchetti S, Tigier H, Valpuesta V** (2000) A Tomato Peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol.* **122**, 1119–1127
- Qiu QS, Liang HG** (1995) Lipid peroxidation caused by the redox system of plasma membranes from wheat roots. *J. Plant Physiol.* **145**: 261-265
- Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Lu F, Kim H, Schatz PF, Marita JM, Hatfield RD, Ralph SA, Christensen JH, Boerjan W** (2004a) Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochemistry Reviews* **3**: 29-60
- Ralph J, Bunzel M, Marita JM, Hatfield RD, Lu F, Kim H, Schatz PF, Grabber JH, Steinhart H** (2004b) Peroxidase-dependent cross-linking reactions of *p*-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochemistry Reviews* **3**: 79-96
- Ranieri A, Nali C, Amoroso S, Lorenzini G, Soldatini GF** (1996) Are peroxidase systems related to different ozone resistance of poplar clones. *In*: Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H. (Hrsg.). *Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. Universität Wien, Österreich und Universität Genf, Schweiz, 352-357
- Rasmussen JB, Smith JA, Williams S, Burkhardt W, Ward E, Somerville SC, Ryals J, Hammerschmidt R** (1995) cDNA cloning and systemic expression of acidic peroxidases associated with systemic acquired resistance to disease in cucumber. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **46**: 389-400
- Rawlyer A, Arpagaus S, Braendle R** (2002) Impact of oxygen stress and energy availability on membrane stability of plant cells. *Ann. Bot. (Lond)*. **90**: 499-507
- Reddy CA, D'Souza TM** (1994) Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 137-152
- Reimers PF, Guo A, Leach JE** (1992) Increased activity of a cationic peroxidase associated with an incompatible interaction between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice *Oryza sativa*. *Plant Physiol.* **99**: 1044-1050

- Ren X, Yang L, Liu J, Su D, You D, Liu C, Zhang K, Luo G, Mu Y, Yan G, Shen J** (2001) A novel glutathione peroxidase mimic with antioxidant activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **387**: 250-256
- Richard-Forget F, Gaillard F** (1996) A possible involvement of peroxidase in enzymatic browning of pear (*Pyrus communis* L. cv. Williams). In: Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H. (Hrsg.). *Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. Universität Wien, Österreich und Universität Genf, Schweiz, 264-268
- Roberts E, Kolattukudy PE** (1989) Molecular cloning, nucleotide sequence, and abscisic acid induction of a suberization-associated highly anionic peroxidase. *Mol. Gen. Genet.* **217**: 223-232
- Ros Barceló A, Gómez Ros LV, Gabaldón C, López-Serrano M, Pomar F, Carrión JS, Pedreño MA** (2004) Basic peroxidases: The gateway for lignin evolution? *Phytochemistry Reviews* **3**: 61-78
- Ros Barceló A, Ferrer MA** (1999) Does diphenylene iodonium chloride have any effect on the O₂³-generating step of plant peroxidases? *FEBS Lett.* **462**: 254-256
- Roveri A, Maiorino M, Nisii C, Ursini F** (1994) Purification and characterization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from rat testis mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1208**: 211-221
- Rusterucci C, Montillet JL, Agnel JP, Battesti C, Alonso B, Knoll A, Bessoule JJ, Etienne P, Suty L, Blein JP, Triantaphylides C** (1999) Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. *J. Biol. Chem.* **274**: 36446-36455
- Sabeh F, Wright T, Norton SJ** (1993) Purification and characterization of a glutathione peroxidase from the Aloe vera plant. *Enzyme Protein* **47**: 92-98
- Saffert A, Hartmann-Schreier J, Schon A, Schreier P** (2000) A dual function alpha-dioxygenase-peroxidase and NAD(+) oxidoreductase active enzyme from germinating pea rationalizing alpha-oxidation of fatty acids in plants. *Plant Physiol.* **123**: 1545-1552
- Sagi M, Fluhr R** (2001) Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* **126**: 1281-1290
- Sano S, Ueda M, Kurano N, Miyachi S, Shigeoka S, Yokota A** (1996) Ascorbate peroxidase from a red alga, *Galdieria partita*. In: Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H. (Hrsg.). *Proceedings of the IV. International Symposium on*

- Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. Universität Wien, Österreich und Universität Genf, Schweiz, 168-172
- Sasaki S, Nishida T, Tsutsumi Y, Kondo R** (2004) Lignin dehydrogenative polymerization mechanism: a poplar cell wall peroxidase directly oxidizes polymer lignin and produces in vitro dehydrogenative polymer rich in β -O-4 linkage. *FEBS Lett.* **562**: 197-201
- Saunders BC, Holmes-Siedle AG, Stark AG, Stark BP** (1964) Peroxidase. The properties and uses of a versatile enzyme and some related catalyts. Butterworths, London, 271 S.
- Scandalios JG, Tong WF, Roupakias DG** (1980) *Cat3*, a third gene locus coding for a tissue-specific catalase in maize: genetics, intrazellular location, and some biochemical properties. *Mol. Gen Genet.* **179**: 33-41
- Schnabelrauch LS, Kieliszewski M, Upham BL, Alizedeh H, Lamport DT** (1996) Isolation of pl 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val-Tyr-Lys as putative intermolecular cross-link site. *Plant J.* **9**: 477-489
- Schraudner M, Langebartels C, Sandermann H Jr** (1996) Plant defence systems and ozone. *Biochem. Soc. Trans.* **24**: 456-61
- Schreier P, Miller E** (1985) Studies on flavonol degradation by peroxidase (donor: H₂O₂-oxidoreductase, EC 1.11.1.7). Part 2: Quercetin. *Food Chem.* **18**: 301-317
- Schützendübel A, Polle A** (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* **53**: 1351-1365.
- Schuller DJ, Ban N, Huystee RB, McPherson A, Poulos TL** (1996) The crystall structure of peanut peroxidase. *Structure* **4**: 311-321
- Schwacke R, Hager A** (1992) Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that is dependent on Ca²⁺ and protein kinase activity. *Planta* **187**: 136-141
- Schweikert C, Liskay A, Schopfer P** (2000) Scission of polysaccharides by peroxidase-generated hydroxyl radicals. *Phytochemistry* **53**: 565-570
- Scott-Craig JS, Kerby K, Stein BD, Sommerville SC** (1995) Expression of an extracellular peroxidase that is induced in barley (*Hordeum vulgare*) by the powdery mildew pathogen (*Erysiphe graminis*). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **47**: 407-418
- Segal AW, Wientjes F, Stockley R, Dekker LV** (1998) Components of the NADPH oxidase of phagocytic cells and their abnormality in the molecular pathology of chronic granulomatous disease (CGD). In: Asard, H., Bérczi, A., Caubergs, R. (Hrsg.) *Plasma Membrane Redox Systems and Their Role in Biological Stress and Disease*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 69-101

- Shang ES, Skare JT, Erdjument-Bromage H, Blanco DR, Tempst P, Miller JN, Lovett MA** (1997) Sequence analysis and characterization of a 40-kilodalton *Borrelia hermsii* glycerophosphodiester phosphodiesterase homolog. *J. Bacteriol.* **179**: 2238-2246
- Sherrier DJ, Prime TA, Dupree P** (1999) Glycosylphosphatidylinositol-anchored cell surface proteins from Arabidopsis. *Electrophoresis* **20**: 2027-2035
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K** (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* **53**: 1305-1319
- Shigeoka S, Takeda T, Hanaoka T** (1991) Characterization and immunological properties of selenium-containing glutathione peroxidase induced by selenite in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem. J.* **275**: 623-627
- Shimoni M, Bar-Zur A, Reuveni R** (1991) The association of peroxidase activity and resistance of maize to *Exserohilum turcicum*. *J. Phytopathol.* **131**: 315-321
- Shirasu K, Nakajima H, Rajasekhar VK, Dixon RA, Lamb C** (1997) Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* **9**:261-270
- Showalter AE** (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell Mol. Life Sci.* **58**: 1399-1417
- Simons TJ, Ross AF** (1970) Enhanced peroxidase activity associated with induction of resistance to tobacco mosaic virus in hypersensitive tobacco. *Phytopathology* **60**: 383-384
- Sottomayor M, Lopes Cardoso I, Pereira LG, Ros Barceló A** (2004) Peroxidase and the biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Phytochemistry Rev.* **3**: 159-171
- Sottomayor M, Dicomio F, Salema R, Ros Barcelo A** (1996) Coll is the key catalytic intermediate in the oxidation of ajmalicine by a tonoplast-located basic peroxidase purified from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *In: Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H. (Hrsg.). Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology.* Universität Wien, Österreich und Universität Genf, Schweiz, 128-133
- Spanner S, Ansell GB** (1987) The hydrolysis of glycerophosphocholine by rat brain microsome: activation and inhibition. *Neurochem. Res.* **12**: 203-206
- Stacy RA, Munthe E, Steinum T, Sharma B, Aalen RB** (1996) A peroxiredoxin antioxidant is encoded by a dormancy-related gene, *Per1*, expressed during late development in the aleurone and embryo of barley grains. *Plant Mol. Biol.* **31**: 1205-1216
- Stryer L** (1999) *Biochemie.* Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 4. Auflage

- Sundaramoorthy M, Youngs HL, Gold MH, Poulos TL** (2005) High-resolution crystal structure of manganese-peroxidase: substrate and inhibitor complexes. *Biochemistry* **44**: 6463-6470
- Svistunenko DA** (2005) Reaction of haem containing proteins and enzymes with hydroperoxides: the radical view. *Biochim. Biophys. Acta* **1707**: 127-155
- Takahama U, Oniki T** (1996) Enhancement of peroxidase-dependent oxidation of sinapyl by alcohol esters of 4-coumaric and ferulic acids. *In: Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., Greppin, H. (Hrsg.). Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology.* Universität Wien, Österreich und Universität Genf, Schweiz, 118-123
- Takahama U** (1989) A role of hydrogen peroxide in the metabolism of phenolics in mesophyll cells of *Vicia faba* L. *Plant Cell Physiol.* **30**: 295-301
- Takahama U** (1986) Spectrophotometric study on the oxidation of rutin by horseradish peroxidase and characteristics of the oxidized products. *Biochim. Biophys. Acta* **882**: 445-451
- Takahashi Y, Ueda N, Yoshimoto T, Yamamoto S, Yokoyama C, Miyata A, Tanabe T, Fuse I, Hattori A, Shibata A** (1992) Immunoaffinity purification and cDNA cloning of human platelet prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**: 433-438
- Tarantino D, Vannini C, Bracale M, Campa M, Soave C, Murgia I** (2005) Antisense reduction of thylakoidal ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* enhances Paraquat-induced photooxidative stress and nitric oxide-induced cell death. *Planta* **221**: 757-765
- Teichmann T, Guan C, Kristoffersen P, Muster G, Tietz O, Palme K** (1997) Cloning and biochemical characterization of an anionic peroxidase from *Zea mays*. *Eur J Biochem* **247**: 826-832
- Thomas PE, Ryan D, Levin W** (1976) An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **75**: 168-176
- Thordal-Christensen H, Brandt J, Cho BH, Rasmussen SK, Gregersen PL, Smedegaard-Petersen V, Collinge DB** (1992) cDNA cloning and characterization of two barley peroxidase transcripts induced differentially by the powdery mildew fungus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **40**: 395-409
- Tognolli M, Penel C, Greppin H, Simon P** (2002) Analysis and expression of the large class III peroxidase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **288**: 129-138

- Tommassen J, Eiglmeier K, Cole ST, Overduin P, Larson TJ, Boos W** (1991) Characterization of two genes, *gopQ* und *ugpQ*, encoding glycerophosphoryl diester phosphodiesterases of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **226**: 321-327
- Torres MA, Onouchi H, Hamada S, Machida C, Hammond-Kossack KE, Jones DJG** (1998) Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (*gp91^{phox}*). *Plant J.* **14**: 365-370
- Trost P, Berczi A, Sparla F, Sponza G, Marzadori B, Asard H, Pupillo P** (2000) Purification of cytochrome b-561 from bean hypocotyls plasma membrane. Evidence for the presence of two heme centers. *Biochim. Biophys. Acta* **1468**: 1-5
- Trost P, Foscarini S, Preger V, Bonora P, Vitale L, Pupillo P** (1997) Dissecting the diphenylene iodonium-sensitive NAD(P)H:quinone oxidoreductase of zucchini plasma membrane. *Plant Physiol* **114**: 737-746
- Tugal GB, Pool M, Baker A** (1999) *Arabidopsis* 22-kilodalton peroxisomal membrane protein: nucleotide sequence and biochemical characterization. *Plant Physiol.* **120**: 309-320
- Tusnády GE, Simon I** (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* **17**: 849-850
- Tusnády GE, Simon I** (1998) Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J. Mol. Biol.* **283**: 489-506
- Udenfriend S, Kodukula K** (1995) How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 563-591
- Van der Rest B, Rolland N, Boisson A-M, Ferro M, Bligny R, Douce R** (2004) Identification and characterization of plant glycerophosphodiester phosphodiesterase. *Biochem. J.* **379**: 601-607
- Van der Rest B, Boisson A-M, Gout E, Bligny R, Douce R** (2002) Glycerophosphocholine metabolism in higher plant cells. Evidence of a new glyceryl-phosphodiester phosphodiesterase. *Plant Physiol.* **130**: 244-255
- Van Gestelen P, Asard H, Caubergs R** (1997) Solubilization and separation of a plant plasma membrane NADPH-O₂-synthase from other NAD(P)H oxidoreductases. *Plant Physiol.* **115**: 543-550
- Van Huystee RB, Roig MG, Shnyrov VL, Sakharov IY** (2004) Peroxidase stability related to its calcium and glykans. *Phytochemistry Rev.* **3**: 19-28
- Van Huystee RB, McManus MT** (1998) Glykans of higher plant peroxidases: recent observations and future speculations. *Glycoconjugate J.* **15**: 101-106
- Van Huystee RB, Rodriguez Marañón MJ, Wan L** (1996) Peanut peroxidase, a trimetal glycoprotein. *In* C Obinger, U Burner, R Ebermann, C Penel, H Greppin, eds, *Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry*

- and Physiology. University of Vienna, Austria and University of Geneva, Switzerland, pp 42-44
- Veitch NC** (2004) Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochemistry Rev.* **3**: 3-18
- Vera P, Tornero P, Conejero V** (1993) Cloning and expression analysis of a viroid-induced peroxidase from tomato plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 790-794
- Vianello A, Zancani M, Nagy G, Macri F** (1997) Guaiacol peroxidase associated to soybean root plasma membranes oxidizes ascorbate. *J Plant Physiol* **150**: 573-577
- Vianello A, Macri F** (1991) Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide at the surface of plant cells. *J. Bioenerg. Biomembr.* **23**: 409-423
- Vianello A, Macri F** (1989) NAD(P)H oxidation elicits anion superoxide formation in radish plasmalemma vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **980**: 202-208
- Walbot V, Petrov DA** (2001) Gene galaxies in the maize genome. *PNAS* **98**: 8163-8164
- Wallace G, Fry SC** (1994) Phenolic components of the plant cell wall. *Int. Rev. Cytol.* **151**: 229-267
- Wan L, Gijzen M, van Huystee RB** (1994) Heterogeneous glycosylation of cationic peanut peroxidase. *Biochem. Cell Biol.* **72**: 411-407
- Wang L, Burhenne K, Kristensen BK, Rasmussen SK** (2004) Purification and cloning of a Chinese red radish peroxidase that metabolises pelargonidin and forms a gene family in Brassicaceae. *Gene* **343**: 323-335
- Welinder KG, Larsen YB** (2004) Covalent structure of soybean seed coat peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1698**: 121-126
- Welinder KG, Justesen AF, Kjaersgard IV, Jensen RB, Rasmussen SK, Jespersen HM, Duroux L** (2002) Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* **269**: 6063-6081
- Welinder KG, Jespersen HM, Kjærsgård IVH, Ostergaard L, Abelskov AK, Hansen LN, Rasmussen SK** (1996) What can we learn from *Arabidopsis* peroxidases? In C Obinger, U Burner, R Ebermann, C Penel, H Greppin, eds, Proceedings of the IV. International Symposium on Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology. University of Vienna, Austria and University of Geneva, Switzerland, pp 173-178
- Welinder KG** (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**: 388-393
- Welinder KG** (1991) Bacterial catalaseperoxidases are gene duplicated members of the plant peroxidase superfamily. *Biochim. Biophys. Acta* **1080**: 215-220
- Welinder KG** (1979) Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. Amino and carboxyl termini, cyanogen bromide and tryptic fragments, the complete sequence,

- and some structural characteristics of horseradish peroxidase C. *Eur. J. Biochem.* **96**: 483-502
- Wilson C** (1983) Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures. *Methods Enzymol.* **91**: 236-247
- Wood ZA, Schröder E, Harris JR, Poole LB** (2003): Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **28**: 32-40
- Xenopoulos MA, Bird DF** (1997) Effect of acute exposure to hydrogen peroxide on the production of phytoplankton and bacterioplankton in a mesohumic lake. *Photochem. Photobiol.* **66**: 471-478
- Yabuta Y, Motoki T, Yoshimura K, Takeda T, Ishikawa T, Shigeoka S** (2002) Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photo-oxidative stress. *Plant J.* **32**: 915-925
- Yamada Y, Saijo S, Sato T, Igarashi N, Usui H, Fujiwara T, Tanaka N** (2001) Crystallization and preliminary X-ray analysis of catalase-peroxidase from the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **57**: 1157-1158
- Yamaguchi K, Mori H, Nishimura M** (1995) A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant Cell Physiol.* **36**: 1157-1162
- Yamasaki H, Sakihama Y, Ikehara N** (1997) Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiol* **115**: 1405-1412
- Yamauchi N, Funamoto Y, Shigyo M** (2004) Peroxidase-mediated chlorophyll degradation in horticultural crops. *Phytochemistry Rev.* **3**: 221-228
- Yant LJ, Ran Q, Rao L, van Remmen H, Shibatani T, Belter JG, Motta L, Richardson A, Prolla TA** (2003) The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic. Biol. Med.* **34**: 496-502
- Yoshimura K, Miyao K, Gaber A, Takeda T, Kanaboshi H, Miyasaka H, Shigeoka S** (2004) Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing *Chlamydomonas* glutathione peroxidase in chloroplasts of cytosol. *Plant J.* **37**: 21-33
- Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S** (2002) Identification of a *cis*-element for tissue-specific alternative splicing of chloroplast ascorbate peroxidase pre-mRNA in higher plants. *J. Biol. Chem.* **277**: 40623-40632
- Yoshimura K, Ishikawa T, Nakamura Y, Tamoi M, Takeda T, Tada T, Nishimura K, Shigeoka S** (1998) Comparative study on recombinant chloroplastic and cytosolic ascorbate peroxidase isozymes of spinach. *Arch Biochem. Biophys.* **353**: 55-63

- Zámocký M** (2004) Phylogenetic relationships in class I of the superfamily of bacterial, fungal, and plant peroxidases. *Eur. J. Biochem.* **271**: 3297-3309
- Zancani M, Nagy G, Macri F, Vianello A** (1997) Ascorbate-dependent regulation of phenolic oxidation by plasma membrane-bound peroxidase. Abstract Book 3rd Intl. Conf. *Oxygen, free radicals and environmental stress in plants*, Pisa, 59
- Zancani M, Nagy G, Vianello A, Macri F** (1995) Copper-inhibited NADH-dependent peroxidase activity of purified soya bean plasma membranes. *Phytochemistry* **40**: 367-371
- Zapata JM, Sabater B, Martín M** (1998) Identification of a thylakoid peroxidase of barley which oxidizes hydroquinone. *Phytochemistry* **48**: 1119-1123
- Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S** (1992) The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* **358**: 591-593
- Zheng B, Berrie CP, Corda D, Farquhar MG** (2003) GDE1/MIR16 is a glycerophosphoinositol phosphodiesterase regulated by stimulation of G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 1745-1750
- Zheng B, Chen D, Farquhar MG** (2000) MIR16, a putative membrane glycerophosphodiester phosphodiesterase, interacts with RGS16. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 3999-4004
- Zimmerlin A, Wojtasek P, Bollwel G** (1994) Synthesis of dehydrogenation polymers of ferulic acid with high specificity by a purified cell-wall peroxidase from French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biochem J.* **299**: 747-753

7. ANHANG

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Artikel in Fachzeitschriften veröffentlicht:

Mika A, Lühje S (2003) Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiol.* **132**: 1489-1498

Minibayeva F, Mika A, Lühje S (2003) Salicylic acid changes the properties of extracellular peroxidase activity secreted from wounded wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Protoplasma* **221**: 67-72

Mika A, Minibayeva F, Beckett R, Lühje S (2004) Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews* **3**: 173-193

8. DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde in der Abteilung Pflanzenphysiologie des Biozentrums Klein Flottbek und Botanischer Garten der Universität Hamburg unter der Anleitung von Prof. Dr. M. Böttger sowie mit Beteiligung folgender Kooperationspartner durchgeführt:

Dr. Friedrich Buck (Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg) - Durchführung der ESI-MS/MS- und MALDI-TOF-Analysen;

Dr. Lydia Henderson (Medical School, Universität Bristol, UK) – Antikörper gegen gp91phox

Hiermit möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Michael Böttger danken. Meiner Betreuerin Frau Dr. Sabine Lüthje möchte ich für die tolle Betreuung ganz besonders danken. Herrn Prof. Dr. Thomas Buckhout (Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin) möchte ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens danken.

Meiner gesamten Arbeitsgruppe möchte ich ganz besonders für die tolle Arbeitsatmosphäre, nette Zusammenarbeit und die ständige Hilfsbereitschaft danken. Unter anderem sollten Hartwig Lüthen, Olaf Döring, Ljiljana Menckhoff, May Christian, Bianka Steffens, Daniel Schenck und Magret Vielhaben nicht unerwähnt bleiben. Ich danke René Lorbiecke und Dirk Warnecke für ihre Tipps; und Ich danke allen „Studis“, die meinen Spass an der Lehre und am Diskutieren noch gesteigert haben.

Darüber hinaus möchte ich Farida Minibayeva (Kazan, Russland) für die gute Zusammenarbeit danken, durch die meine Englischkenntnisse so schön gefördert wurden - Lydia Henderson für die tolle und interessante Zusammenarbeit in Bristol (Großbritannien) - Richard Beckett (Scottsville, Südafrika) für interessante Diskussionen und Friedrich Buck (UKE, Hamburg) für seine Bereitwilligkeit, mich in die Auswertung massenspektrometrischer Daten einzuführen.

Der Universität Hamburg danke ich für ein zweijähriges Stipendium (HmbNFG) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für zwei weitere Jahre finanzielle Unterstützung.

Ganz besonders danke ich meiner Mutter, Inge Mika, für die liebevolle Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit und meiner Mutter und meinem Vater, Eugen Mika, dafür, dass sie die Liebe zur Natur und zur Naturwissenschaft in mir wachgerufen haben. Besonders möchte ich auch meinem Freund, Stefan Böttcher, für seine Unterstützung und Nicole Lodders für ihre „Wir schaffen das!“-e-Mails danken.

Meinen Eltern, diesmal insbesondere meiner Mutter, und meinem Freund gewidmet

9. LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name, Vorname: Mika, Angela
geboren: 27. November 1974 in Hamburg
Eltern: Inge und Eugen Mika
1981-1985 Carl-Orff Grundschule in Bargteheide
1985-1994 Kreisgymnasium Bargteheide I, Abschluß "*Allgemeine Hochschulreife*"
(Leistungskurse: Biologie, Chemie und Deutsch)

Studium:

1994-2001 Studium der Biologie, Universität Hamburg,
Hauptfach:
Allgemeine Botanik (Schwerpunkte: Molekularbiologie, Cytologie, Pflanzenphysiologie)
Nebenfächer:
Biochemie (Humane Biochemie und Molekularbiologie)
Zoologie (Stoffwechsel- und Ökophysiologie)
Bodenkunde

1997-2000 Tutorin (Betreuung von Erstsemesterstudenten) und Studentische Hilfskraft im Bereich Lehre (diverse Praktika des 1. und 2. Studienabschnitts),
Mitarbeit in der Studentischen Selbstverwaltung, Gremienarbeit in verschiedenen Kommissionen des Fachbereiches Biologie

2000-2001 Diplomarbeit mit dem Titel „Biochemische Charakterisierung einer Peroxidaseaktivität aus Plasmamembranen von Maiswurzeln (*Zea mays* L.)“, Institut für Allgemeine Botanik und Botanischer Garten, Abteilung Pflanzenphysiologie, Prof. Dr. M. Böttger

2001 Abschluß "*Diplom-Biologin*"

2000-2001 Studentische Hilfskraft im Bereich Forschung:
Universität Hamburg, Institut für Allgemeine Botanik, Abteilung Pflanzenphysiologie, Dr. S. Lüthje, DFG-Projekt (DFG Lu 668/1-2):
"Untersuchungen zur Modulation der Cytochrom *b*-Reduktion an Plasmamembranen von Maiswurzeln (*Zea mays* L.)",
Methoden: Phase-Partitioning, FPLC, SDS-PAGE

ab 2002 Doktorarbeit mit dem Titel „Biochemische Charakterisierung und bioinformatische Sequenzanalyse plasmamembrangebundener Peroxidasen aus Maiswurzeln (*Zea mays* L.)“, Biozentrum Klein Flottbek und Botanischer Garten, Abteilung Pflanzenphysiologie, Prof. Dr. M. Böttger;

2002-2004 Promotionsstipendium der Universität Hamburg im Rahmen der Landesgraduiertenförderung (HmbNFG)

2004 Lehrauftrag der Universität Hamburg, Unterrichtsveranstaltung des

1. Studienabschnitts 14.049 „Pflanzenphysiologischer Kurs für DB und LAOA“ sowie mehrfache Mithilfe in Praktika des 2. Studienabschnitts
- 2004-2006** Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft zum Thema „Expression und funktionale Analysen von Plasmamembran-gebundenen Peroxidasen“ (DFG Lu-668/4-1)
- 2005** Promotion
- Auslandsaufenthalte:**
- 2003** Zweiwöchiger DAAD-geförderter Aufenthalt in der Arbeitsgruppe von Dr. Lydia Henderson, Universität Bristol, UK, Western-Blot-Analysen
- 2004** Dreiwöchiger DAAD-geförderter Aufenthalt in der Arbeitsgruppe von Dr. Lydia Henderson, Universität Bristol, UK, Western-Blot-Analysen und Whole cell voltage clamp
- 2005** Dreiwöchiger DAAD-geförderter Aufenthalt in der Arbeitsgruppe von Dr. Lydia Henderson, Universität Bristol, UK, Whole cell voltage clamp
- Kongresse:**
- 2000** 5th International Conference on Plasma Membrane Redox Systems and their Role in Biological Stress and Disease (Hamburg);
Teilnahme und Mitorganisation
- 2001** International Meeting on Stress Signals and Stress Proteins (Halle, Saale);
Posterpräsentation
- 2002** 6th. International Conference on Plasma Membrane Redox Systems and their Role in Biological Stress and Disease (Ravenna, Italien);
Posterpräsentation
Zellbiologieworkshop Hoheneiche, Thüringen;
Vortrag
VI International Plant Peroxidase Symposium (Murcia, Spanien)
Posterpräsentation
Botanikertagung 2002 (Freiburg i.B.)
Kurzvortrag
- 2003** Conference on Plant Stress, Reactive Oxygen and Antioxidants (Freising-Weihenstephan)
Posterpräsentation
- 2004** VII International Conference on Plasma Membrane Redox Systems and their Role in Biological Stress and Disease (Asilomar, Kalifornien, USA)
Posterpräsentation
Botanikertagung 2004 (Braunschweig)
Kurzvortrag
- 2005** International Meeting on Stress Signals and Cellular Responses (Halle, Saale)
Posterpräsentation

Veröffentlichungen:

- 2003** **Mika A, Lüthje S** (2003) Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiol.* **132**: 1489-1498
- Minibayeva F, Mika A, Lüthje S** (2003) Salicylic acid changes the properties of extracellular peroxidase activity secreted from wounded wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Protoplasma* **221**: 67-72
- 2004** **Mika A, Minibayeva F, Beckett R, Lüthje S** (2004) Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews* **3**: 173-193

Kooperationen:

R. Beckett, Universität von KwaZulu-Natal, Scottsville, Südafrika;
F. Buck, Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie,
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg;
L. Henderson, Medical School, Universität Bristol, UK;
F. Minibayeva, Russian Academy of Sciences, Institut für Biochemie und
Biophysik, Kazan, Russland

Hamburg, den 22. Oktober 2005 _____ [Angela Mika]