



Doctoral Thesis

## **Nieren-Dipeptidase Klonierung und Charakterisierung der cDNA und des chromosomalen Gens**

**Author(s):**

Rached, Ervan

**Publication Date:**

1993

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000916312> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 10335

**Nieren-Dipeptidase:**

**Klonierung und Charakterisierung der cDNA  
und des chromosomalen Gens**

**ABHANDLUNG**  
zur Erlangung des Titels  
**DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN**  
der  
**EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH**

vorgelegt von

**Ervan Rached**

Dipl. Natw. ETH  
geboren am 22. März 1962  
von Horgen (ZH)

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. G. Semenza, Referent  
Prof. Dr. H. Hennecke, Korreferent  
Dr. N. Mantei, Korreferent

Teile der vorliegenden Arbeit sind veröffentlicht worden in:  
Biochem. J. (1990) 271, 755-760

Zürich, 1993

## Zusammenfassung

### Teil A: cDNA-Klonierung und Charakterisierung von Dipeptidase aus Schweine-Nieren

Die Nieren-Dipeptidase, 'renal dipeptidase', (RDP), (EC 3.4.13.11) ist ein Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-verankertes Ektoenzym.

Aus einer Schweinenierencortex-cDNA Bank wurden Klone der RDP isoliert: Mit Hilfe der PCR-Technik amplifizierte man einen RDP-Abschnitt, wobei 2 von bereits vorliegenden Aminosäuresequenzierdaten abgeleitete, degenerierte Primer verwendet wurden. Das PCR-Produkt wurde nach einer Ueberprüfung als Sonde eingesetzt. Von den erhaltenen cDNA Klonen konnte bei einem, dem Klon pER11, die komplette Primärstruktur des Enzyms von der erhaltenen Nukleotidsequenz abgeleitet werden. Es gelang die mRNA von pER11 in *X. laevis* -Oozyten zu exprimieren. Das Enzym wurde auf der Oozytenoberfläche GPI-verankert und war katalytisch aktiv. Durch Verdauung mit der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C konnte eine hydrophile Form der RDP von der Oozytenoberfläche abgespalten werden, was die GPI-Verankerung beweist.

### Teil B: Klonierung und Strukturanalyse des chromosomalen Gens

Eine Northern-Analyse bot einen ersten Aufschluss über die wirkliche Länge der mRNA der RDP. Die mRNA, deren poly(A)-Schwanz entfernt worden war, unterschied sich kaum von der Länge des *in vitro*-Transkripts des cDNA-Klons pER11.

Die chromosomale DNA wurde anschliessend in Lambda-EMBL-3-cos -Not kloniert. Das Absuchen der chromosomalen Bank mit der pER11-Insertion als Sonde, ergab am Ende einen positiven Klon. Nach einer Southern-Analyse verschiedener Restriktionsfragmente des Lambda-Klons, wobei wieder die pER11-Insertion als Sonde diente, wurden zwei zur Subklonierung geeignete Fragmente ausgewählt. Die darauf in einen Blueskript-Vektor umklonierten Fragmente von ca. 4.5, bzw. ca. 1.5 kbp Länge erhielten die Bezeichnungen pER27 und pER28. Die Sequenzierung der beiden Fragmente ergab, dass sämtliche Exons der Dipeptidase auf den beiden Klonen enthalten waren; Exon 1 auf pER28, die Exons 2 bis 10 auf pER27.

Das besondere Interesse galt der Promotorregion des Gens. Nach einer 'rapid amplification of cDNA ends' (RACE) -Analyse und einer S1-Analyse mit einem Fragment der 5'-Region des Klons pER28 als Sonde wurden ca. 20 Initiationsstellen ermittelt, die anschliessend an das vom cDNA-Klon pER11 her bekannte 5'- Ende sich über einen Bereich von ca. 40 Nukleotide erstrecken. In der 420 bp langen 5'-untranskribierten Region des RDP-Klons konnte keine TATA-Box gefunden werden. Das Gen der RDP besitzt demnach einen Promotoren ohne TATA-Box. Das Vorhandensein multipler Initiationsstellen und potentieller SP1-Bindungsstellen in der 5'-flankierenden Sequenz sind ausserdem typisch für diesen Typus von Promotor.

## Summary

### Part A: cDNA-cloning und characterization of pig renal dipeptidase

Renal Dipeptidase (RDP), (EC 3.4.13.11) is a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchored ectoenzyme. Clones expressing pig RDP have been isolated from a kidney cortex cDNA library. To generate a hybridization probe, two degenerate primers, derived from an already known amino acid sequence were used to amplify a segment of the RDP cDNA by PCR. The complete primary structure of the enzyme could be derived from the nucleotide sequence of one clone, pER11. cRNA produced from pER11 was successfully expressed in *X. laevis* oocytes. The enzyme was anchored on the surface of the oocytes and was catalytically active. By digestion with phosphatidylinositol-specific phospholipase C a hydrophilic form of RDP was released from the surface of the oocytes, demonstrating the GPI-anchoring.

### Part B: Cloning und structural analysis of the chromosomal gene

A Northern blot analysis gave a first idea about the real length of the RDP mRNA. There was very little difference between a natural mRNA sample with its poly(A)-tail removed and the *in vitro* transcript of the cDNA-clone pER11.

Chromosomal DNA was cloned into lambda-EMBL-3-cos-Not. Screening of the chromosomal gene bank with the insert of pER11 led finally to one positive clone. After a Southern analysis of various restriction fragments of the lambda-clone in which the pER11-insert was used again as a probe, two fragments of ca. 4.5 and ca. 1.5 kbp respectively, which seemed the most suitable for subcloning, were chosen. They were named 'pER27' and 'pER28'. Sequencing of the two clones revealed that they contain all exons of the dipeptidase: exon 1 on pER28, exons 2-10 on pER27.

The promoter region of the gene was of particular interest. The cap site was mapped by a 'rapid amplification of cDNA ends' (RACE) procedure, and by S1-mapping with a fragment of the 5'-region of pER28 as a probe. About 20 transcription-initiation sites were found adjacent to the 5'-end of the cDNA clone, spread over a stretch of ca. 40 nucleotides. No TATA-box was found in the 420 bp 5'-flanking region of the RDP-clone. Accordingly the RDP-gene has a TATA-less promoter. Potential SP1 binding sites were in the sequence, which is typical of TATA-less promoters.