

# Functional analysis of insulin-degrading enzyme in higher plants

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Huet, Yoann

**Publication date:**

2004

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004907098>

**Rights / license:**

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

Diss. ETH N°. 15732

# Functional Analysis of Insulin-Degrading Enzyme in Higher Plants

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
ZURICH

for the degree of  
DOCTOR of NATURAL SCIENCES

Presented by

Yoann Huet

MSc of Biology  
University of Nice Sophia-Antipolis, France

Born 27.03.1975  
Citizen of France

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. N. Amrhein, referent  
Prof. Dr. K. Apel, co-referent  
Prof. Dr. A. Schaller, co-referent

Zurich, 2004

## Abstract

Insulin-degrading enzymes (IDEs) are evolutionary well conserved metalloproteases of the inverzincin family, characterized by their HXXEH catalytic motif, a functional inversion of the HEXXH motif found in the vast majority of metal-dependent peptidases. This work reports the cloning of the first *IDE* cDNA from plant origin and the biochemical characterization of the encoded protein. A partial tomato *IDE* (*LeIDE*) cDNA was previously isolated in a two-hybrid based genetic screen in yeast aiming to identify proteases able to cleave the wound-hormone systemin, an 18 amino acid peptide involved in the wound response and defense against herbivorous insects in tomato plants. Recombinant GST-*LeIDE* was shown to cleave systemin at the carboxy side of Lys<sup>14</sup> in a MALDI-TOF mass spectrometry assay, as well as several other unrelated peptides. Specificity of *LeIDE* did not depend on an amino acid motif in the primary structure of its substrates suggesting that, like its animal homologues, *LeIDE* recognizes higher order structural elements rather than the primary sequence. An antiserum directed against the N-terminal catalytic domain revealed the presence of *LeIDE* in all investigated tissues including roots, leaves, flowers, green fruits, and cotyledons but failed to detect the enzyme in apoplastic wash fluids or cell cultured supernatants. Absence of *LeIDE* from the apoplast, the suspected site of systemin inactivation, and the analysis of *LeIDE*-silenced plants indicated that *LeIDE* is unlikely to be involved in systemin degradation *in planta*. In order to further investigate *IDE* function in higher plants, *Arabidopsis ide* mutants were isolated and characterized. The *Arabidopsis* genome contains two *IDE* paralogues, *IDE1* and *IDE2*, which are 75 % identical at the protein level. For the *IDE2* transcript, several alternative splicing events were observed including the retention of part of intron 2, leading to a frame-shift and the disruption of the coding sequence for the catalytic motif. A T-DNA insertion library was screened leading to the isolation of the *ide1-1* and *ide2-1* mutants with T-DNA insertions in the middle of the respective gene. RT-PCR analysis confirmed that both mutants do not produce the full-length transcript anymore but truncated variants were still detected. *Ide2-1* showed a reduced rate of seed germination, ABA and sucrose hypersensitivity of seedlings, and a decrease of cytokinin-dependent shoot regeneration from calli. *Ide1-1* showed similar but less severe defects. Analysis of the *ide1-1/ide2-1* double mutant revealed a synergistic interaction of the two mutations for some of the

phenotypes, indicating partial redundancy between *IDE1* and *IDE2* function. A possible role for *Arabidopsis IDEs* in the regulation of proteasome activity, as shown in animal system, is discussed.

## Résumé

Les IDEs (Insulin-degrading enzymes) sont des métalloprotéases qui ont été remarquablement bien conservées au cours de l'évolution. Elles appartiennent à la famille des inverzincines et sont caractérisées par leur motif catalytique HXXEH, une inversion fonctionnelle du motif HEXXH retrouvé chez la majorité des autres protéases nécessitant un ion métallique comme cofacteur. Le travail présenté ici reporte le clonage du premier cDNA d'origine végétal codant pour une IDE, ainsi que la caractérisation biochimique de l'enzyme. Un cDNA incomplet de tomate, codant pour une IDE (*LeIDE*), fût auparavant isolé à la suite d'un criblage génétique basé sur le system du double hybride chez la levure ayant pour but d'identifier des protéases capables de dégrader la systémine, un polypeptide de 18 acides aminés impliqué dans la réponse aux blessures et dans le système de défense contre les insectes herbivores. Une analyse utilisant la spectrométrie de masse MALDI-TOF a montré que la protéine recombinante GST-*LeIDE* coupe la systémine du côté carboxyle de la Lys<sup>14</sup>, ainsi que d'autres peptides non apparentés. La spécificité du site de coupure dans les substrats de *LeIDE* est indépendante de leur structure primaire suggérant que, de la même façon que ses homologues animaux, *LeIDE* reconnaît des éléments structuraux d'ordre supérieur. Un anti-sérum dirigé contre le site catalytique localisé dans la partie N-terminale de la protéine a révélé la présence de *LeIDE* dans tous les tissus analysés incluant les racines, les feuilles, les fleurs, les fruits verts et les cotylédons mais l'enzyme n'a pu être détectée dans des préparations de fluides apoplastiques, ni dans des surnageants de culture cellulaire. L'absence de *LeIDE* dans l'apoplast, le site présumé de l'inactivation de la systémine, ainsi que l'analyse des plantes dans lesquelles l'expression de *LeIDE* est réprimée par RNA interférence, indique que *LeIDE* n'est vraisemblablement pas impliquée dans la dégradation de la systémine *in planta*.

Afin d'approfondir l'étude fonctionnelle des IDEs chez les plantes supérieures, des mutants *ide* ont été isolés et caractérisés chez *Arabidopsis*. Le génome d'*Arabidopsis* contient deux paralogues, *IDE1* et *IDE2*, qui montrent 75 % de similarités au niveau de la séquence protéique. Concernant le transcript *IDE2*, plusieurs épissages alternatifs ont été observés, incluant la rétention d'une partie de l'intron 2 provoquant un déplacement du code de lecture et la disruption de la séquence codant pour le domaine catalytique. Une collection d'*Arabidopsis* transgéniques pour des insertions de T-DNA a été criblée et a permis l'isolation des mutants *ide1-1* et *ide2-1* pour lesquels un T-DNA s'est inséré au

milieu du gène respectif. Des analyses de RT-PCR ont démontré que, pour les deux mutants, les transcripts complets sont absents bien que des variants tronqués peuvent encore être détectés. *Ide2-1* présente un taux de germination réduit, une hypersensitivité des plantules au sucrose et à l'ABA, et une réduction de la capacité à régénérer des nouvelles pousses à partir de calli cultivés en présence de cytokinine. *Ide1-1* montre un phénotype similaire bien que moins sévère. L'analyse du double mutant *ide1-1/ide2-1* a révélé une interaction synergique des deux mutations pour certains des phénotypes observés, indiquant une redondance partielle de la fonction d' *IDE1* et *IDE2*. Un rôle supposé des IDEs dans la régulation de l'activité du protéasome chez *Arabidopsis*, comme montré dans les systèmes animaux, est discuté.