Der Einfluss von Aminopeptidasen auf die Antigenprozessierung

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt von

Mark Schatz

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.2005

Dekan: Prof. Dr. S. Laufer
1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-G. Rammensee
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schild

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG ..... - 7 -

1.1 Das Immunsystem ..... - 7 -

1.2 Die angeborene Immunität ..... - 7 -

1.3 Die erworbene Immunität ..... - 8 -

1.4 Das immunologische Gedächtnis ..... - 9 -

1.5 Major Histocompatibility Complex (MHC) ..... - 9 -

1.6 Aufbau und Funktion der MHC-Klasse I- und II-Moleküle ..... - 10 -

1.7 Der MHC-Klasse I-Antigenprozessierungsweg ..... - 11 -

1.8 Der MHC-Klasse II-Antigenprozessierungsweg ..... - 17 -

1.9 Zielsetzung und experimenteller Ansatz ..... - 18 -

2 MATERIAL UND METHODEN ..... - 20 -

2.1 Verwendete Chemikalien ..... - 20 -

2.2 Zell-Kultur ..... - 20 -

2.2.1 Verwendete Zell-Linien ..... - 20 -

2.2.2 Zell-Kultivierung ..... - 20 -

2.2.3 Bestimmung der Zellzahl ..... - 20 -

2.2.4 Zellen einfrieren ..... - 21 -

2.2.5 Zellen auftauen ..... - 21 -

2.3 Statistische Methoden ..... - 21 -

2.3.1 MHC-Klasse I-Liganden-Datensatz ..... - 21 -

2.3.2 Vergleich der proteasomalen Schnittspezifität, des TAP-Transports und der Aminopeptidase-Trimmeffizienz N-terminal von MHC-Klasse I-Liganden ..... - 21 -

2.4 Aufreinigung Cytosol/ER/Gesamtlysat, zugehörige Assays und Berechnungen ..... - 22 -

2.4.1 Aufreinigung der cytosolischen und mikrosomalen Fraktion ..... - 22 -

2.4.2 Messung der Aminopeptidaseaktivität im Cytosol oder ER ..... - 23 -

2.4.3 Bestimmung der Umsatzraten und der kompartimentellen Präferenzen ..... - 23 -

2.4.4 Zellproteasen-Gesamtlysat-Assay ..... - 24 -

2.4.5 Aufreinigung von Milzzellen ..... - 24 -

2.4.6 Messung der Aminopeptidaseaktivität der rekombinanten oder aufgereinigten Enzyme ..... - 24 -

2.4.7 Bestimmung der Aminopeptidaseaktivität in einem Inhibitorassay ..... - 25 -

2.5 Bestimmung aller relevanten Aminopeptidaseaktivitäten im Cytosol ..... - 27 -

2.5.1 Auftrennung der Aminopeptidaseaktivitäten aus dem Cytosol durch Hydrophobe Interaktionschromatographie ..... - 27 -

2.5.2 Aufreinigung und Identifizierung der zwei unbekannten Proteasen ..... - 27 -

2.5.2.1 Puffer ..... - 27 -

2.5.2.2 1. Säule: HiPrep 16/10 DEAE FF (Anionenaustauscher, Ion Exchange Chromatography (IEC)) ..... - 27 -

2.5.2.3 2. Säule: HiTrap Phenyl HP 5 ml (Hydrophobe Interaktion, Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC)) ..... - 28 -

2.5.2.4 3. Säule: Superdex 200 10/300 GL (Gelfiltration (GF)) ..... - 28 -
2.5.2.5 4. Säule: MiniQ 4.6/50 PE (Anionenaustauscher, Ion Exchange Chromatography (IEC)) ..... - 29 -
2.5.2.6 SDS-PAGE und Identifizierung der Aminopeptidasen durch Massenspektrometrie ..... - 29 -
2.5.2.7 SDS-PAGE (diskontinuierliches SDS-Gel) ..... - 30 -
2.5.2.8 Zn-Stain (Bio-Rad) ..... - 30 -
2.5.2.9 Zn-Destain (Bio-Rad) ..... - 31 -
2.5.2.10 Tryptischer In-Gel-Verdau für die Massenspektrometrie ..... - 31 -
2.5.2.11 Proteinidentifikation durch Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisation und Tandem-MS ..... - 31 -

2.6 Expression und Aufreinigung rekombinanter Enzyme ..... - 32 -
2.6.1 Aufreinigung der humanen Bleomycin-Hydrolase ..... - 32 -
2.6.2 Aufreinigung von ERAP1 ..... - 33 -
2.6.3 SDS-PAGE (diskontinuierliches SDS-Gel) ..... - 33 -
2.6.4 Coomassie-Färbung ..... - 33 -
2.6.5 Zn-Stain (Bio-Rad) ..... - 34 -
2.6.6 Rapid Silver Stain (Modifikation der Morrissey-Technik) ..... - 34 -
2.6.7 Proteinbestimmung mit Roti®-Nanoquant (Roth) ..... - 34 -
2.6.8 Messung der Aminopeptidaseaktivität der rekombinanten oder aufgereinigten Enzyme ..... - 34 -

2.7 Prozessierungs-Versuche *in vivo* ..... - 34 -
2.7.1 Membrangängigkeit der Inhibitoren ..... - 34 -
2.7.2 293-K^b-Zellen mit integriertem verlängertem SIINFEKL-Konstrukt ..... - 35 -
2.7.3 Acid-Wash ..... - 36 -
2.7.4 FACS-Färbung und FACS-Analyse ..... - 36 -

2.8 Tierhaltung und Genotypisierung ..... - 36 -
2.8.1 Mausstämme ..... - 36 -
2.8.2 Genotypisierung von Mäusen ..... - 37 -
2.8.3 Polymerase Chain Reaction (PCR) zur Bestimmung des Genotyps der PSA-K.O.- und BH-K.O.-Mäuse ..... - 37 -
2.8.3.1 PSA-PCR ..... - 37 -
2.8.3.2 BH-PCR ..... - 38 -
2.8.3.3 Agarose-Gel für PCR-Produkte ..... - 38 -

A) Entdeckung eines N-terminalen MHC-Klasse I-Liganden-Prozessierungsmotivs und der Einfluss von Aminopeptidasen auf dessen Sequenz

3 ERGEBNISSE ..... - 40 -

3.1 Entdeckung eines N-terminalen Prozessierungsmotivs ..... - 40 -

3.2 Das Prozessierungsmotiv passt zu den Sequenzspezifitäten von Proteasom und TAP ..... - 42 -

3.3 Proteasom und TAP sind nicht genug ..... - 43 -

3.4 Bestimmung der cytosolischen und endoplasmatischen Aminopeptidasespezifität ..... - 43 -

3.5 Die cytosolische und endoplasmatische Aminopeptidasespezifität beeinflusst das N-terminale Prozessierungsmotiv ..... - 50 -

3.6 Aminopeptidasen im ER: Ist es nur ERAP1? - 52 -

3.7 Vergleich der Breitspektrenanalyse mit experimentellen Daten am Beispiel der Prozessierung des murinen Cytomegalovirus pp89 immunodominanten H-2L^d Epitops - 54 -

4 DISKUSSION - 55 -

B) Bestimmung aller relevanten Aminopeptidasen im Cytosol und deren Rolle bei der Antigenprozessierung

5 ERGEBNISSE - 62 -

5.1 Das Fehlen der beiden cytosolischen Aminopeptidasen PSA und BH im Maussystem ist letal - 62 -

5.2 Bedeutung der Aminopeptidasen PSA und BH für den cytosolischen Aminosäureabbau - 63 -

5.3 Entdeckung von vier Hauptaminopeptidaseaktivitäten im Cytosol - 64 -

5.4 Aufreinigung und Charakterisierung der zwei bisher unbekannten Hauptaminopeptidaseaktivitäten im Cytosol - 66 -

5.4.1 Aufreinigungsstrategie - 66 -
5.4.2 Aufreinigung der für Arginin, Lysin und Prolin spezifischen Aminopeptidase - 67 -
5.4.2.1 Anionenaustauscher (DEAE) - 67 -
5.4.2.2 Hydrophobe Wechselwirkungs-Chromatographie (Phenyl-Sepharose) - 68 -
5.4.2.3 Gelfiltration - 70 -
5.4.2.4 Anionenaustauscher (Q) - 72 -
5.4.2.5 SDS-PAGE und Zink-Färbung - 73 -
5.4.2.6 Identifizierung der Banden durch MALDI/Tandem-MS - 74 -
5.4.3 Aufreinigung der für Cystein spezifischen Aminopeptidase - 74 -
5.4.3.1 Anionenaustauscher (DEAE) - 74 -
5.4.3.2 Hydrophobe Wechselwirkungs-Chromatographie (Phenyl-Sepharose) - 75 -
5.4.3.3 Gelfiltration - 76 -
5.4.3.4 Anionenaustauscher (Q) - 77 -
5.4.3.5 SDS-PAGE und Zink-Färbung - 78 -
5.4.3.6 Identifizierung der Banden durch MALDI/Tandem-MS - 79 -

5.5 Einstellung der Inhibitoren für alle vier Aminopeptidasen - 80 -

5.5.1 Inhibitoren - 80 -
5.5.2 Titration von Puromycin - 81 -
5.5.3 Titration von E64 - 83 -
5.5.4 Titration von Arphamenin A - 84 -
5.5.5 Titration von Captopril - 85 -
5.5.6 Inhibitorprofil aller relevanten Aminopeptidasen - 86 -

5.6 Nachweis der Inhibitorspezifität anhand von Maus-Knockout-Modellen - 87 -

5.6.1 Nachweis der Spezifität von E64 für BH am Maus-Knockout-Modell - 87 -
5.6.2 Nachweis der Spezifität von Puromycin für PSA am Maus-Knockout-Modell - 88 -

5.7 Bestimmung des Anteils der dominanten Aminopeptidasen am Abbau aller 20 Aminosäuren im Cytosol - 89 -

5.8 Bestimmung der Aktivität relevanter Aminopeptidasen - 91 -

5.9 Test auf Membrangängigkeit der Inhibitoren - 93 -

5.10 Nachweis des finalen Trimmings im ER am Beispiel des Ovalbumin-H2-K^b-Epitops SIINFEKL ..... - 95 -

6 DISKUSSION ..... - 99 -

7 ZUSAMMENFASSUNG ..... - 104 -

8 ABKÜRZUNGEN ..... - 106 -

9 LITERATUR ..... - 108 -

10 AUS DIESER ARBEIT HERVORGEGANGENE PUBLIKATIONEN ..... - 118 -

11 DANKSAGUNG ..... - 119 -

12 AKADEMISCHE LEHRER ..... - 120 -

13 TABELLARISCHER LEBENSLAUF ..... - 121 -

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

“Nine-tenths of our sickness can be prevented by right thinking plus right hygiene – nine-tenths of it!” (Henry Miller, 1891-1980)

Somit verbleibt jedoch immer noch im Idealfall mindestens ein Zehntel an Krankheiten, die unabwendbar sind und für die unbedingt eine Immunabwehr benötigt wird, um zu überleben. Der hohen Anzahl der pathogenen Erreger, ihrer extrem niedrigen Generationszeit und ihrer damit verbundenen hohen Mutationsrate muss der menschliche Organismus etwas entgegensetzen, das mindestens genauso vielfältig und reaktionsfähig ist - und dabei handelt es sich um das Immunsystem.

Die Abwehr schädlicher Organismen fängt schon mit den epithelialen Barrieren an. Die trockene und kaum durchdringbare Oberfläche der Haut, die zudem noch einen sauren pH-Wert besitzt, macht es Pathogenen schwer sich niederzulassen. Andere angreifbarere Epithelien sind durch Mukusschichten geschützt, die mittels Cilien einem ständigen Fluss unterworfen sind. Weitere Möglichkeiten der Abwehr sind Enzyme wie Lysozym in Speichel, Schweiß und Tränenflüssigkeit oder Pepsin im Magen. Aber auch antibakterielle Peptide lassen sich finden. Gerade der Magen ist durch die Nahrungsaufnahme extrem gefährdet und besitzt wohl auch aus diesem Grunde einen sehr niedrigen pH-Wert. Zudem schützt den Menschen auch noch die normale Flora auf den Epithelien, die mit möglichen Pathogenen um Platz und Nahrung konkurriert und zudem selbst eine Abwehr besitzt.

Falls es jedoch einem Krankheitserreger gelingt, diese vielfältigen Barrieren zu durchbrechen, hat der Körper noch andere Mittel, um diesen zu bekämpfen. Hierzu gehören zum einen die angeborene und zum anderen die erworbene Immunität, wobei sich beide Systeme überschneiden und Hand in Hand arbeiten.

1.2 Die angeborene Immunität

Diese Art von Immunantwort beruht auf der Erkennung von vordefinierten Mustern, die für Pathogene spezifisch sind. Da keinerlei Adaption vorgenommen werden muss, ist hier die Reaktionszeit extrem schnell, wodurch schon viele Infektionen im Keim erstickt werden können.

Hierbei spielen insbesondere Phagocyten, die sich vor allem aus Makrophagen und Neutrophilen Granulocyten zusammensetzen, eine große Rolle. Diese Zellen können Pathogene über Rezeptoren für Lipopolysaccharide (LPS), Lipophosphoglycane, filamentöses Hemagglutinin, manche Strukturen der Hefe und andere Oberflächenmoleküle der Krankheitserreger erkennen, diese dann aufnehmen und verdauen. Dabei sekretieren sie zudem Cytokine, wie Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-12, Tumor necrosis factor (TNF)-α, aber auch Sauerstoffradikale, Peroxide, NO und verschiedene Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine und Leukotriene. Dies führt zu einer Entzündungsreaktion, die selbst Pathogene zerstört, weitere Phagocyten anlockt und schon die Zellen für die möglicherweise folgende erworbene Immunantwort stimuliert. Des Weiteren werden durch die Erkennung pathogener Strukturen kostimulatorische Moleküle produziert, die Makrophagen zu effektiven

Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) werden lassen, was wiederum eine Verbindung und Überlappung zur erworbenen Immunität darstellt. Eine weitere wichtige Zellpopulation der angeborenen Immunität sind die Natürlichen Killer (NK)-Zellen, die die Möglichkeit besitzen über ihre Rezeptoren eine infizierte Zelle erkennen zu können.

Darüber hinaus gibt es auch noch von direktem Zellkontakt unabhängige Systeme. Hierzu gehört z.B. der Alternative-Komplement-Aktivierungs-Weg, bei dem das Fehlen Komplement-kontrollierender Proteine, wie sie auf den Wirtszellen zu finden sind, zu einer Aktivierung der Komplementkaskade und zur Zerstörung der Erreger führt.

Bei Viren wiederum sind ganz entscheidend die beiden anti-viralen Interferone (IFN) IFN-α und IFN-β, die nach einer viralen Infektion von der Zelle synthetisiert werden, an einer Blockierung der weiteren Ausbreitung, sowie an einer Hochregulierung immunologisch entscheidender Moleküle, wie MHC (Major Histocompatibility Complex)-Klasse I und TAP (Transporter Associated with Antigen Processing), beteiligt. Ein weiterer Effekt dieser Interferone ist die direkte Aktivierung von NK-Zellen.

Der Übergang zwischen angeborener und erworbener Immunität wird besonders deutlich bei der Wirkung von Toll-like Rezeptoren (TLRs), die sich auf allen relevanten Zellen des Immunsystems befinden. Diese Rezeptoren erkennen so genannte PAMs (Pathogen-associated molecular patterns), wie z.B. LPS, Flagellin, Zymosan, dsRNA, ssRNA und unmethylierte CpG-DNA. Die Erkennung führt zu einer Ausschüttung diverser Cytokine, aber auch zu einer Hochregulierung von kostimulatorischen Molekülen.

1.3 Die erworbene Immunität

Obwohl die angeborene Immunität fähig ist einen Großteil der Infektionen in den Griff zu bekommen bevor sich diese etablieren können, ist es diversen Pathogenen entweder aufgrund ihrer Menge, des Infektionsortes oder diverser Schutzmechanismen möglich zu entkommen. Für diese Fälle ist es notwendig, dass der Körper ohne vorherigen Kontakt spezifisch auf diese Erreger reagieren kann. Diese Funktion übernimmt die erworbene Immunität. Auch hierbei hat die angeborene Immunität einen großen Anteil, da sie zum einen die spezifische Antwort, wie oben schon beschrieben, vorbereitet und zum anderen die Etablierung der Infektion extrem verlangsamt. Dies kann entscheidend sein, da die spezifische Reaktion einige Tage braucht bis sie richtig aufgebaut werden kann.

Die erworbene Immunität lässt sich weiter in die humorale und die zellvermittelte Immunität untergliedern. Die humorale Antwort besteht darin, dass für das Pathogen spezifische Antikörper gebildet werden, die an bestimmte Proteinsequenzen auf der Oberfläche des Erregers binden. Die Antikörper können dann zur Aktivierung der Komplementkaskade führen und damit zur Lyse des Bakteriums. Eine andere Möglichkeit ist die Opsonisierung (Einhüllung mit Antikörpern) eines Bakteriums, das dadurch zur Phagocytose und somit zur Zerstörung markiert wird. Produziert werden Antikörper von Plasmazellen, die aus B-Zellen im Falle einer Aktivierung hervorgehen. Zur Aktivierung benötigt die entsprechende B-Zelle zwei Signale: Das erste stammt von der Erkennung eines Antigens mittels des membranständigen Antikörpers. Für das zweite muss die B-Zelle ein Antigen aufnehmen, prozessieren und über ein MHC-Klasse II-Molekül auf der Oberfläche präsentieren. Falls eine dafür spezifische $CD4^+$-T-Helferzelle mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) das prozessierte Antigen erkennt, liefert sie der B-Zelle das zweite Signal. Nach Aktivierung proliferiert die B-Zelle zuerst und wandelt sich dann zur Antikörper-sekretierenden Plasmazelle um. Dabei

behält sie ihre Spezifität bei, so dass jede Plasmazelle nur einen Antikörper produziert. Um zu gewährleisten, dass es immer einen passenden Antikörper für ein Pathogen gibt, muss dessen Bindungsstelle extrem variabel sein. Dies wird erreicht durch vier verschiedene Prozesse: 1.) das Vorhandensein vieler verschiedener Kopien jeder Art von Gensegmenten, die die variable Region ausmachen, 2.) verschiedene Kombinierungsmöglichkeiten der leichten und schweren Kette, 3.) verschiedene rekombinatorische Prozesse an den Nahtstellen der zusammengefügten Gensegmente, 4.) Punktmutationen durch somatische Hypermutation nach der Rekombination. Antikörper spielen somit eine große Rolle bei der Bekämpfung extrazellulärer Pathogene, wie z.B. Bakterien. Allerdings sind sie auch sehr wichtig bei viralen Infektionen und sorgen dafür, dass freie Viren abgefangen werden bevor sie neue Zellen infizieren können.

Die zellvermittelte Immunität beruht auf einem direkten Zell-Zell-Kontakt, bei der eine Immunzelle eine andere Zelle auf etwaige Stoffwechseländerungen, verbunden mit einer Infektion, untersucht. Dabei tastet eine aktivierte $CD8^+$-T-Killerzelle (Cytotoxische T-Lymphocyte (CTL)) mit Hilfe ihres TCRs eine Wirtszelle ab. Falls der TCR ein mit Peptid-beladenes MHC-Klasse I-Molekül erkennt, führt dies zur Ausschüttung von Perforin und Granzymen durch die T-Zelle ebenso wie zur direkten FasL/Fas-Interaktion, wodurch die Apoptose der Wirtszelle eingeleitet wird. Da die CTLs vorher zum einen positiv auf körpereigene MHC-Klasse I-Moleküle und zum anderen negativ auf körpereigene Antigene selektiert wurden, lassen sich so körperfremde Proteine über die Präsentation daraus erhaltener Peptide an der Zelloberfläche erkennen. Zur Aktivierung der T-Zelle, die für die Einleitung der Apoptose unbedingt notwendig ist, werden zwei Signale benötigt: Einer $CD8^+$-T-Zelle muss Antigen im Kontext mit MHC-Klasse I in Verbindung mit einem kostimulatorischen Signal (B7/CD28-Wechselwirkung) präsentiert werden, welches nur von einer APC gegeben werden kann. Die große Variabilität des TCRs wird durch ähnliche Mittel erreicht wie die eines Antikörpers und auch hier führt die Aktivierung zuerst zu einer Proliferation der T-Zelle. Die zellvermittelte Immunität spielt insbesondere ein Rolle bei der Bekämpfung intrazellulärer Pathogene, wie Viren, aber auch intrazellulär lebender Bakterien. Eine weitere wichtige Funktion ist die Zerstörung von cancerogenen Zellen.

1.4 Das immunologische Gedächtnis

Jede erworbene Immunantwort führt auch zu einem ihr spezifischen immunologischen Gedächtnis. Dies bedeutet, dass der Körper sehr viel schneller und effektiver auf Pathogene reagieren kann, die er früher schon einmal bekämpft hat. Solch ein Effekt deutet auf das Vorhandensein von antigen-spezifischen Lymphocyten (B- und T-Zellen) schon vor der eigentlichen Infektion hin. Durch das immunologische Gedächtnis wird der Körper somit resistent gegenüber Krankheiten, denen er immer wieder begegnet. Es gibt zwei Theorien, die diesen Effekt erklären könnten. Entweder wandelt sich ein Teil der aktivierten Zellen während einer adaptiven Immunantwort zu Gedächtniszellen um, die jederzeit wieder aktiviert werden können oder es verbleibt für eine lange Zeit etwas Antigen im Körper, das immer wieder präsentiert wird, wobei immer wieder neu aktivierte Zellen entstehen.

1.5 Major Histocompatibility Complex (MHC)

Bei dem Major Histocompatibility Complex handelt es sich um eine DNA-Sequenz von ca. 4 bis $7x10^6$ Basenpaaren, die über 200 Gene beim Menschen einschließt. Viele dieser

Gene codieren Proteine, die einen Teil des Immunsystems darstellen. Innerhalb des MHCs liegen z.B. die Gene für die α-Ketten der MHC-Klasse I-Moleküle, die α- und β-Ketten der MHC-Klasse II-Moleküle, TAP1 und TAP2, LMP2, LMP7, Tapasin und viele andere.

Die benötigte Variabilität von MHC-Klasse I und MHC-Klasse II wird zum einen dadurch erreicht, dass es für MHC-Klasse I-Moleküle drei und für MHC-Klasse II-Moleküle vier codierende Gene bzw. Gensätze gibt und zum anderen durch den hohen Polymorphismus des MHCs. Für einige MHC-Klasse I- und II-Stellen gibt es über 200 Allele, die alle relativ häufig in der Bevölkerung zu finden sind. Zudem sind viele Individuen noch heterozygot an diesen Stellen, was aufgrund der Tatsache, dass beide Allele exprimiert werden, dazu führt, dass ein Mensch im Durchschnitt sechs verschiedene MHC-Klasse I- und acht verschiedene MHC-Klasse II-Moleküle exprimiert. Bei MHC-Klasse II können zudem in manchen Fällen noch die α- und β-Ketten von verschiedenen Chromosomen kombiniert werden.

Da der Polymorphismus insbesondere die Peptidbindungsgrube betrifft, besitzt jedes Allelprodukt andere Peptidbindungseigenschaften. Diese zeigen sich in der unterschiedlichen Spezifität für bestimmte Aminosäuren an den Ankerpositionen eines Peptids. Ankerpositionen sind die Stellen innerhalb eines Epitops, die für die Bindung an ein MHC-Molekül verantwortlich sind. Der Polymorphismus erhöht nun innerhalb eines Individuums die Wahrscheinlichkeit der Bindung eines Peptids aus einem Antigen, während er innerhalb der Population dafür sorgt, dass es für jedes Pathogen zumindest einen Teil der Bevölkerung gibt, die darauf ansprechen kann.

1.6 Aufbau und Funktion der MHC-Klasse I- und II-Moleküle

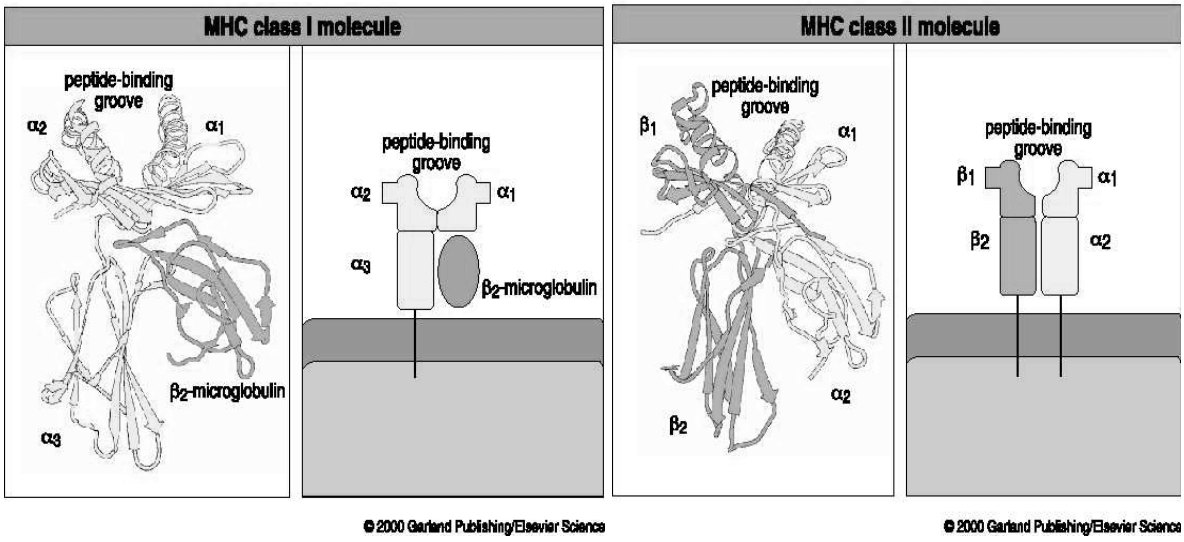


Abbildung 1: Aufbau der MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-Moleküle. (Garland Publishing/Elsevier Science, 2000)

Die Strukturen des MHC-Klasse I- und II-Moleküls ähneln sich stark. Beide besitzen vier Domänen, von denen jeweils zwei die Peptidbindungsgrube bilden. Diese besteht aus zwei α-Helices als seitliche Abgrenzung und einem antiparallelen β-Sheet als Boden. Der Unterschied zwischen den beiden Proteinen besteht darin, dass das MHC-Klasse I-Molekül aus einer α-Kette besteht, die drei Domänen bildet, inklusive der Peptidbindungsgrube, und

zudem noch den einzigen Transmembrananker besitzt. Die vierte Domäne wird von dem nicht kovalent assoziierten β_2-Mikroglobulin gebildet. Im Gegensatz dazu besteht das MHC-Klasse II-Molekül aus einer α- und einer β-Kette, die beide zwei Domänen besitzen, in der Membran verankert sind und jeweils zur Hälfte an der Bindungsgrube teilnehmen. Ein weiterer Unterschied besteht in der Länge der Peptide, die gebunden werden können. Bei MHC-Klasse I-Molekülen sind dies Peptide mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren, während MHC-Klasse II-Moleküle Peptide mit einer Länge von 13 und mehr Aminosäuren binden können.

MHC-Klasse I-Moleküle befinden sich auf der Oberfläche von fast allen Zellen des Körpers im Gegensatz zu den MHC-Klasse II-Dimeren, die ausschließlich auf professionellen APCs gefunden werden können. Beiden ist gemein, dass sie Peptide an der Oberfläche zur T-Zell-Erkennung präsentieren. Allerdings stammen die Liganden auf Klasse I von intrazellulären Pathogenen und werden von $CD8^+$-T-Zellen (T-Killerzellen) erkannt, die die Apoptose der Wirtszelle einleiten können, während die Klasse II-Liganden von Proteinen extrazellulärer Erreger stammen, die über Endocytose aufgenommen und nach Prozessierung von $CD4^+$-T-Zellen (T-Helferzellen) erkannt werden können, die dann ihrerseits B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen.

1.7 Der MHC-Klasse I-Antigenprozessierungsweg

MHC-Klasse I-Moleküle präsentieren Peptide auf der Zelloberfläche, die von intrazellulären Proteinen stammen. Dies erlaubt es dem Immunsystem pathogene Infektionen und karzinogene Zellen zu erkennen.

Die Bildung dieser Peptide ist ein Prozess, der in mehreren Schritten abläuft. Er beginnt mit dem Abbau von hauptsächlich neu synthetisierten aber defekten Proteinen, DRiPs (defective ribosomal products) genannt (Schubert et al., 2000; Yewdell et al., 2001; Yewdell, 2002; Schubert et al., 2000), durch das Proteasom (Kloetzel, 2004). Hierbei handelt es sich um die dominanteste Endopeptidase in der Zelle und daher auch das wichtigste Enzym zum Proteinabbau im Cytoplasma. Der so genannte 20S-Kern des Proteasoms ist ein großer, multikatalytischer, zylindrischer Komplex, der aus vier übereinander liegenden Ringen besteht, von denen jeder aus entweder sieben α- oder sieben β-Untereinheiten aufgebaut ist. Die Ringe sind in der Reihenfolge αββα angeordnet, wobei sich die sechs proteolytischen Zentren in den inneren β-Untereinheiten des Zylinders befinden, drei in jedem der zentralen Ringe (Groll et al., 1997). Dabei handelt es sich um β1 (δ), β2 (Z, MC14) und β5 (X, MB1), wobei es drei verschiedene Spezifitäten gibt, nämlich Chymotrypsin-ähnlich (Schnitt C-terminal von hydrophoben Aminosäuren), Trypsin-ähnlich (Schnitt C-terminal von basischen Aminosäuren) und Kaspase-ähnlich, auch bekannt als PGPH (Schnitt C-terminal von sauren Aminosäuren). Durch diese aktiven Zentren werden dann die Proteine im hohlen Kern des Proteasoms zu Peptiden abgebaut.

Sehr interessant ist die Tatsache, dass die drei konstitutiven Untereinheiten mit katalytischer Aktivität in neu synthetisierten Proteasomen durch die IFN-γ-induzierbaren Untereinheiten Low Molecular Weight Protein (LMP) 2, LMP7 und MECL-1 ausgetauscht werden können, die ebenso eine katalytische Aktivität besitzen. Ein Proteasom, das keine dieser IFN-γ-induzierbaren Untereinheiten besitzt, heißt konstitutives Proteasom oder Standardproteasom. Dabei handelt es sich um die gewöhnliche Form in den meisten Zelltypen. In professionellen APCs und in entzündeten Geweben ist das Proteasom mit LMP2, LMP7 und MECL-1, Immunoproteasom genannt (Boes et al., 1994), die dominante Form. Entweder das

konstitutive oder das Immunoproteasom sind verantwortlich für den korrekten Schnitt am C-Terminus der meisten bekannten Epitope. Dabei unterscheidet sich die Schnittspezifität von Immunoproteasom und konstitutivem Proteasom (Morel et al., 2000; Toes et al., 2001), wobei es so scheint, dass vom Immunoproteasom bevorzugt Peptide mit hydrophoben oder basischen C-Termini produziert werden, welche eine höhere Affinität für MHC-Klasse I-Moleküle besitzen und auch von TAP bevorzugt transportiert werden. Es gibt jedoch auch eine große Menge an Epitopen, die ausschließlich vom konstitutiven Proteasom gemacht werden.

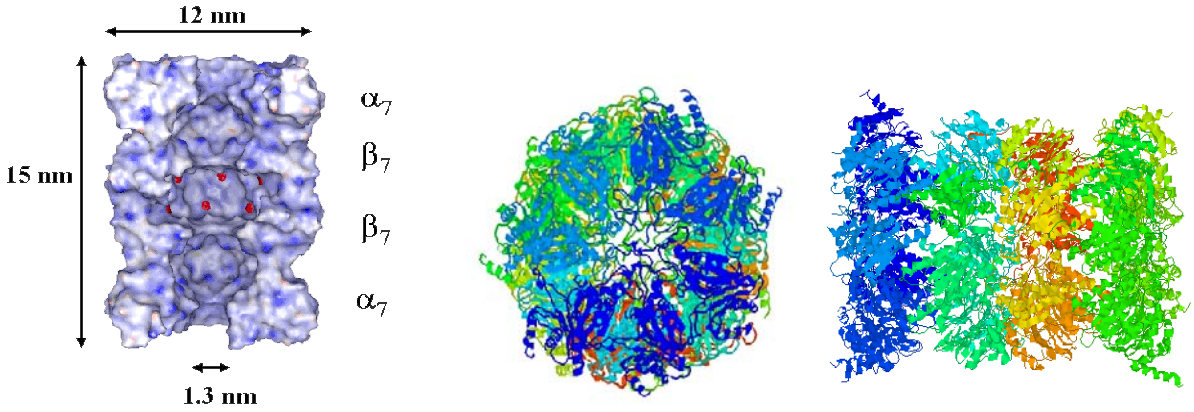


Abbildung 2: Aufbau des 20S-Proteasoms.

Die induzierbaren Untereinheiten sind jedoch nicht die einzige Möglichkeit die Aktivität des Proteasoms zu beeinflussen. Interaktionspartner, wie das 19S-Cap, welches zusammen mit dem 20S-Kern das 26S-Proteasom bildet, können dies ebenfalls. In diesem Komplex ist das 19S-Cap für die Erkennung von ubiquitinylierten Proteinen, die dadurch für den Abbau markiert sind, verantwortlich (Hershko and Ciechanover, 1998; Jentsch and Schlenker, 1995).

Ein weiterer Bindungspartner ist PA28, auch 11S-Regulator genannt (Dubiel et al., 1992), welches genauso wie die speziellen Immunoproteasomunterheiten durch IFN-γ induziert wird. PA28 ist ein hexamerer Ring, der aus zwei alternierenden Untereinheiten besteht (PA28α und PA28β). Dieser Ring bindet flach an einen der proteasomalen α-Ringe, wodurch die Kapazität des Proteasoms Proteine zu schneiden erhöht wird und damit auch die Menge an produzierten Epitopen oder deren Vorläufern. PA28 steigert nicht nur die Aktivität, sondern ändert auch die Spezifität des Proteasoms.

Es gibt Fälle, in denen das Proteasom alleine die fertigen Epitope herstellen kann (Lucchiari-Hartz et al., 2000). Es gibt jedoch auch Fälle, in denen das Proteasom Epitopvorläufer produziert, die zwar den korrekten C-Terminus besitzen (Craiu et al., 1997; Stoltze et al., 1998; Mo et al., 1999), aber einen verlängerten N-Terminus (Kisselev et al., 1999; Morel et al., 2000; Toes et al., 2001; Cascio et al., 2001; Kessler et al., 2001; York et al., 2002; Reits et al., 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Präsentation von CTL-Epitopen im Falle der Injektion von Epitopvorläuferpeptiden mit modifizierten N-Termini, was das Trimming durch Aminopeptidasen hemmt, unterdrückt ist (Mo et al., 1999; Reits et al., 2003). Diese Beobachtung führte zur Schlussfolgerung, dass weder das Proteasom noch andere Endopeptidasen für das finale N-terminale Trimming verantwortlich sind, sondern Aminopeptidasen.

Über viele Beispiele von N-terminalem Peptidtrimming entweder im Cytosol oder im Endoplasmatischen Retikulum (ER) wurde schon berichtet (Snyder et al., 1994; Roelse et al.,

1994; Elliott et al., 1995; Beninga et al., 1998; Paz et al., 1999; Stoltze et al., 2000; Lobigs et al., 2000; Fruci et al., 2001). Eine cytosolische Peptidase, die besonders bedeutend zu sein scheint, vor allem für den cytosolischen Abbau längerer proteasomaler Produkte, ist die Tripeptidylpeptidase II (TPPII). Diese Peptidase kann entweder als eine Tripeptidylaminopeptidase (Tomkinson, 1999) oder als eine Endopeptidase (Geier et al., 1999) agieren und wurde mit der Herstellung einiger antigener Peptide in Verbindung gebracht (Levy et al., 2002; Seifert et al., 2003; Kloetzel, 2004; Reits et al., 2004). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass TPPII ebenfalls für die Bildung des C-Terminus einiger Epitope verantwortlich ist. Dies beschränkt sich aber wohl hauptsächlich auf Epitope, die mit einem Lysin enden (Seifert et al., 2003). Die Hauptfunktion dieser Protease jedoch scheint der Abbau von Oligopeptiden mit einer Länge von über 15 Aminosäuren zu sein (Reits et al., 2004). Wegen ihrer Längenpräferenz und den Resultaten von Hemmstudien wurde von Reits *et al.* vorgeschlagen, dass das Proteasom hauptsächlich Oligopeptide mit einer Länge von mehr als 15 Aminosäuren herstellt und TPPII dann später in der Prozessierung wirkt, um Epitope und Vorläufer von weniger als 16 Aminosäuren zu bilden.

Es wurde auch noch von anderen Proteasen berichtet, die in der post-proteasomalen Antigenprozessierung involviert sein sollen (Lopez and Del Val, 1997; Stoltze et al., 2000; Lopez et al., 2000; Del Val and Lopez, 2002; Levy et al., 2002). Dazu gehören die IFN-γ-induzierbare Leucin-Aminopeptidase (LAP) (Beninga et al., 1998; Reits et al., 2003), die Puromycin-sensitive Aminopeptidase (PSA) (Stoltze et al., 2000; Levy et al., 2002), die Bleomycin-Hydrolase (BH) (Stoltze et al., 2000) und die Thimet Oligopeptidase (TOP) (Saric et al., 2001; York et al., 2003; Kim et al., 2003; Saric et al., 2004).

Um der vollständigen proteolytischen Zerstörung durch diverse Proteasen im Cytosol zu entkommen, muss das Epitop oder der Epitopvorläufer mittels des Transporter associated with Antigen Processing (TAP) in das ER gelangen (Neefjes et al., 1993). Dieses Heterodimer, bestehend aus TAP1 und TAP2, welche beide im MHC kodiert und durch IFN-γ hochregulierbar sind, durchspannt die ER-Membran und ermöglicht somit den Transport vom Cytosol ins ER. TAP ist ein Mitglied der ATP-binding Cassette (ABC)-Familie von Transportern und benötigt somit ATP für seine Translokationsaktivität. Der Transporter bindet Peptide mit einer Länge von 8 bis 13 Aminosäuren. Er kann jedoch auch längere Peptide mit bis zu 40 Aminosäuren transportieren. Dies ermöglicht die Translokation des fertigen Epitops genauso wie die von diversen verlängerten Vorläufern. Humanes TAP transportiert bevorzugt Peptide mit hydrophoben oder basischen C-Termini, eine Tatsache, die sehr gut zu den proteasomalen Produkten und den MHC-Klasse I-Bindungsbevorzugungen passt. Jedoch wird die Bindungsaffinität von TAP nicht nur vom C-Terminus beeinflusst, sondern auch von den ersten drei N-terminalen Aminosäuren.

Die Frage wie die Peptide vom Proteasom oder den Aminopeptidasen zum TAP gelangen, kann noch nicht schlüssig beantwortet werden. Diese könnte durch Diffusion geschehen, aber auch durch eine Art Shuttle-Transport nach Bindung an cytosolische Chaperone, wie z.B. die Hitzeschockproteine.

Im Lumen des ERs kann falls nötig dann der Vorläufer weiter durch endoplasmatische Aminopeptidasen getrimmt werden (Wei and Cresswell, 1992; Henderson et al., 1992; Snyder et al., 1994; Craiu et al., 1997; Wang et al., 1998; Paz et al., 1999; Fruci et al., 2001). Für viele Antigene konnte bewiesen werden, dass das finale Trimming im ER-Lumen für die effiziente Präsentierung des Epitops notwendig ist (Fruci et al., 2001; Komlosh et al., 2001; Brouwenstijn et al., 2001; Serwold et al., 2001). Das Trimming zur endgültigen Größe kann entweder stattfinden bevor (Fruci et al., 2001) oder während (Brouwenstijn et al., 2001) der

Vorläufer an ein MHC-Klasse I-Molekül gebunden ist. Dieses Modell wurde schon 1990 von Falk *et al.* vorgeschlagen, die zeigen konnten, dass MHC-Moleküle eine beträchtliche Anreicherung an MHC-bindenden Peptiden bewirken (Falk et al., 1990). Die erste identifizierte Aminopeptidase im Zusammenhang mit endoplasmatischem Trimming ist die IFN-γ-induzierbare ERAP1 (ER Aminopeptidase 1) (York et al., 2002; Saric et al., 2002; Rock et al., 2004), auch ERAAP (ER-associated Aminopeptidase) genannt (Serwold et al., 2002). Zuvor wurde sie beschrieben als A-LAP (Adipocyte-derived Leucine Aminopeptidase), PILS-AP (Puromycin-insensitive Leucyl-specific Aminopeptidase) oder Type 1 Tumor Necrosis Factor Receptor-shedding Aminopeptidase Regulator. Eine erst kürzlich identifizierte Aminopeptidase im ER, die ebenso durch IFN-γ hochreguliert werden kann, ist ERAP2, auch bekannt als L-RAP (Leukocyte-derived Arginine Aminopeptidase) (Tanioka et al., 2003).

An dieser Stelle sollte noch angemerkt werden, dass die Prozessierung im ER nicht der letzte Schritt sein muss. Durch den Sec61p-Komplex ist eine retrograde Translokation von Peptiden aus dem ER in das Cytosol möglich, womit sich der ganze Prozessierungsvorgang beliebig oft wiederholen kann (Werner et al., 1996; Kopito, 1997).

Das fertig prozessierte Peptid wird nun entweder an ein MHC-Klasse I-Molekül gebunden oder liegt sogar schon gebunden vor. Diese Beladung mit Peptid im ER ist der letzte Schritt beim Zusammenbau des MHC-Klasse I-Komplexes (Lapham et al., 1993). Der Vorgang beginnt damit, dass sich eine neu synthetisierte Klasse I-schwere Kette mit Calnexin im ER zusammenschließt. Nach der Bindung von β_2-Mikroglobulin (β_2m) an die schwere Kette wird Calnexin durch Calreticulin ausgetauscht.

Jedoch gibt es noch eine ganze Reihe anderer Proteine, die an der Bildung des MHC-Klasse I-Peptid-Beladungskomplexes beteiligt sind. Eines davon ist Tapasin, welches als Brücke zwischen dem Klasse I-Heterodimer und TAP dient. Tapasin ist ebenso wie viele andere immunologisch relevante Moleküle im MHC-Locus kodiert und wird durch IFN-γ hochreguliert. Die hauptsächliche Aufgabe dieses Proteins scheint darin zu bestehen, dass es leere MHC-Klasse I-Moleküle in unmittelbare Nähe zu TAP bringt, um dadurch die Beladungsgeschwindigkeit zu erhöhen. Zudem besitzt Tapasin noch eine Art von Kontrollfunktion: Es katalysiert den Austausch von schwach an MHC gebundenen Peptiden gegen stark bindende. Dies führt zu stabilen und daher langlebigen MHC-Klasse I/Peptid-Komplexen auf der Zelloberfläche, was wiederum zu einer starken und anhaltenden Immunantwort führt und außerdem den Austausch von gebundenen intrazellulären Peptiden gegen extrazelluläre nach dem Transport des Komplexes an die Oberfläche verhindert.

Ein weiteres Molekül des MHC-Klasse I-Peptid-Beladungskomplexes ist ERp57, welches nichtkovalent mit Calreticulin und durch eine Disulfid-Brücke mit Tapasin interagiert (Lindquist et al., 1998). Es scheint für die korrekte Disulfidbrückenbildung in der schweren Kette verantwortlich zu sein (Dick et al., 2002).

Der genaue Zeitablauf des Zusammenbaus des MHC-Klasse I/Peptidbeladungskomplexes ist nicht bekannt. Wahrscheinlich binden Tapasin und ERp57 an TAP mit der Unterstützung durch Calnexin. Danach wechselwirkt das leere MHC-Klasse I-Molekül mit diesem Komplex. Gleichzeitig wird Calnexin gegen Calreticulin ausgetauscht.

Eine quantitative Analyse zeigt, dass der Komplex eine höhere Ordnung hat. Jeweils vier Tapasin-Moleküle binden an ein TAP-Heterodimer und jedes Tapasin interagiert mit einem MHC-Klasse I-Molekül. In diesem Komplex scheint es weniger Calreticulin und ERp57 zu

geben als dies stöchiometrisch zu erwarten wäre. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es noch mehr Moleküle gibt, die am Aufbau des Peptidbeladungskomplexes beteiligt oder sogar ein Teil davon sind.

Nach der Bindung des Peptids dissoziiert der MHC-Klasse I/Peptid-Komplex vom Beladungskomplex, bindet an Calnexin und verbleibt für eine gewisse Zeit noch im Endoplasmatischen Retikulum. Danach verlässt der Komplex das ER und wandert durch den Golgi-Apparat zur Plasmamembran, wo er $CD8^+$-T-Zellen präsentiert wird. Dies geschieht mit der Unterstützung durch Transportrezeptoren (Pamer and Cresswell, 1998; Van Kaer, 2002; Janeway CA Travers P, 2005; Janeway et al., 1999).

Sogar auf dem Weg zur Zelloberfläche gibt es noch eine Möglichkeit Peptide zu prozessieren. Dies geschieht mittels der Protease Furin, die sich im *trans*-Golgi Netzwerk befindet (Gil-Torregrosa et al., 1998; Gil-Torregrosa et al., 2000). In wiefern diese Alternative Verwendung findet, ist jedoch nicht geklärt.

In nichtinfizierten Zellen füllen Peptide von zelleigenen Proteinen die Petidbindungsgrube der MHC-Klasse I-Komplexe, welche genauso an der Oberfläche präsentiert werden, jedoch aufgrund der negativen T-Zell-Selektion nicht zur Aktivierung von $CD8^+$-T-Zellen führen. Dieser ununterbrochene Umsatz sorgt dafür, dass der Körper Pathogene schnell bemerken kann, um eine Immunantwort schon in einem frühen Infektionsstadiums auszulösen.

Leere MHC-Klasse I-Moleküle, die kein Peptid gebunden haben, dissoziieren unter Sekretion von β_2m und Abbau der schweren Kette durch das Proteasom nach retrograder Translokation durch den Sec61p-Komplex vom ER in das Cytosol. Dieser Kontrollmechanismus ist notwendig, um das Erscheinen von leeren MHC-Klasse I-Heterodimeren an der Oberfläche zu vermeiden, da diese dann eventuell extrazelluläre Peptide binden könnten, was zu einer ungewollten Immunantwort führen würde.

Zur Quantifizierung der Antigenprozessierung lässt sich abschätzen, dass ungefähr 10 000 Moleküle eines Proteins abgebaut werden müssen, um einen Klasse I/Peptid-Komplex auf der Oberfläche zu bilden (Yewdell, 2001).

Der oben beschriebene Vorgang ist der klassische Antigenprozessierungsweg für MHC-Klasse I. Es gibt jedoch auch noch eine ganze Reihe alternativer Wege, die mehr oder weniger gut untersucht sind. Beim Cross-priming zum Beispiel nehmen Makrophagen und Dendritische Zellen unter bestimmten Bedingungen exogene Antigene auf, prozessieren diese mit der Hilfe von TAP und dem Proteasom und präsentieren sie über MHC-Klasse I an der Zelloberfläche.

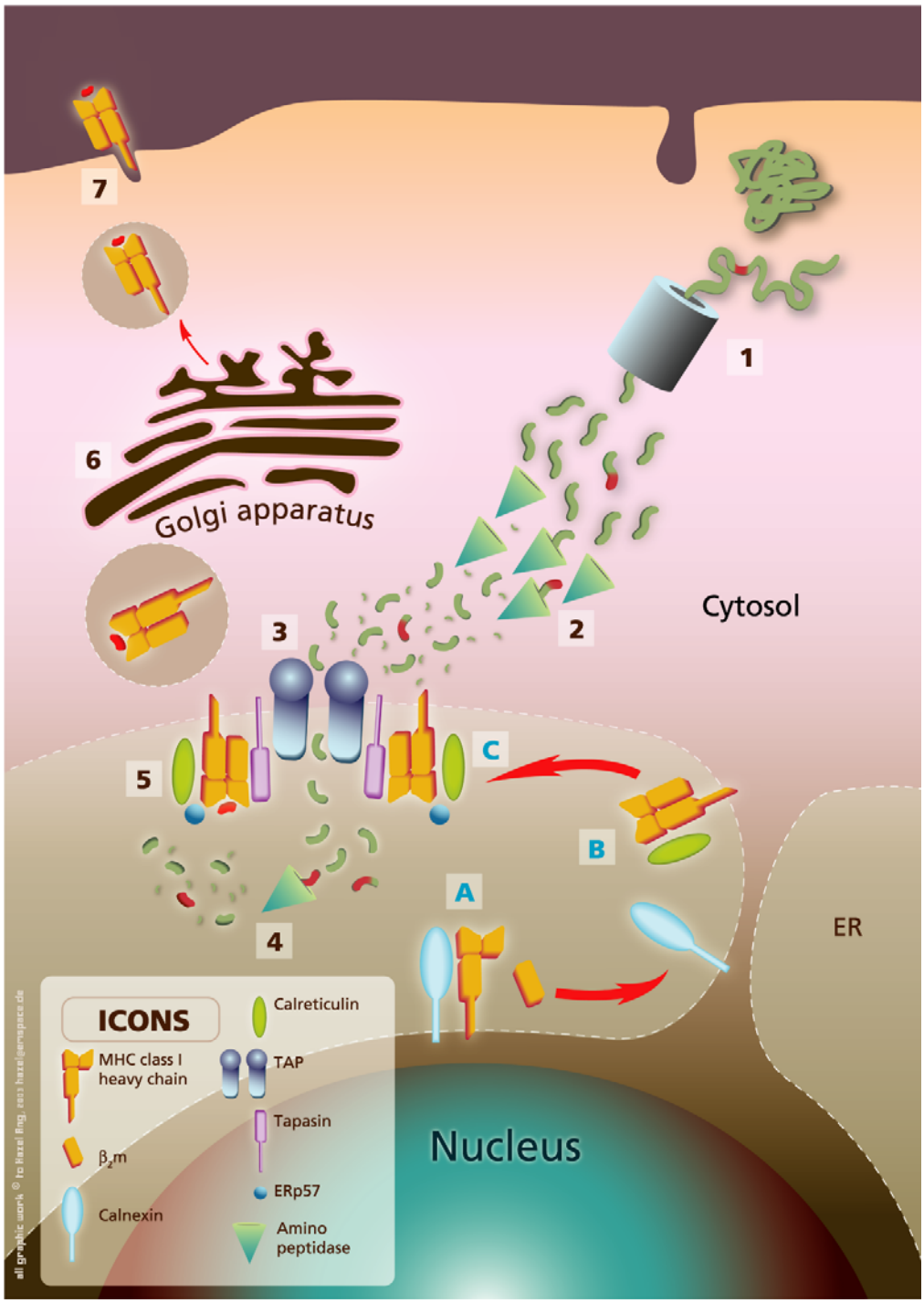


Abbildung 3: Prozessierung und Präsentierung von Antigenen auf MHC-Klasse I-Molekülen. 1) Abbau von Proteinen zu kleineren Fragmenten durch das Proteasom im Cytosol; **2)** Abtrennung N-terminaler Aminosäuren durch cytosolische Aminopeptidasen; **3)** Transport von Peptiden ins ER durch TAP; **4)** Weiteres Trimming des N-Terminus durch endoplasmatische Aminopeptidasen; **5)** Ladung der Peptide auf MHC-Klasse I-Moleküle durch den Peptidbeladungskomplex; **6)** Dissoziation des MHC-Klasse I/Peptid-Komplexes vom Beladungskomplex und Transport durch den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche; **7)** Präsentation der Peptide auf der Zelloberfläche. **Zusammenbau des MHC-Klasse I-Peptidbeladungskomplexes. A)** Stabilisierung der neusynthetisierten MHC-Klasse I-schweren Kette durch Calnexin; **B)** Bindung von β_2m an die schwere Kette unter Austausch von Calnexin durch Calreticulin; **C)** Bildung des MHC-Klasse I/Peptidbeladungskomplexes bestehend aus TAP, Tapasin, MHC-Klasse I-Heterodimer, Calreticulin und ERp57. (Schatz, M.M., Schild, H., Editor: Vohr, H.W., Abbildung: Ang, H. (2005). MHC class I antigen presentation. Encyclopedic Reference of Immunotoxicology. Springer Verlag Heidelberg.)

1.8 Der MHC-Klasse II-Antigenprozessierungsweg

Der Hauptunterschied zum Klasse I-Weg ist, dass die Antigene hier meistens nicht-cytosolischen Ursprungs sind. Dabei können sie entweder mittels Endocytose aus dem extrazellulären Raum aufgenommen werden oder sich schon in intrazellulären Vesikeln in der Zelle selbst befinden. Diese Endosomen mit den Antigenen können nun entweder immer stärker angesäuert werden oder sie fusionieren mit sauren Partikeln. Der genaue Mechanismus ist noch nicht mit Sicherheit geklärt. So oder so sinkt der pH der Endosomen immer weiter ab, wodurch so genannte saure Proteasen aktiviert werden, die die Proteine in den Vesikeln abbauen. Bekannte Vertreter dieser Proteasenart sind die Cysteinproteasen Cathepsin B, D, S und L, wobei Cathepsin S und L wohl die dominante Rolle einnehmen. Die entstehenden Peptide können dann an MHC-Klasse II-Moleküle binden.

Die Klasse II-Heterodimere werden, wie andere Oberflächenproteine auch, in die ER-Membran synthetisiert. Da sich im Lumen des ERs schon eine Vielzahl an Peptiden befindet, die wie schon erwähnt über den Klasse I-Weg präsentiert werden können, muss verhindert werden, dass diese an die neuen MHC-Klasse II-Moleküle binden. Dies wird durch den Zusammenschluss der neu synthetisierten MHC-Klasse II-Moleküle mit der MHC-Klasse II-assoziierten invarianten Kette (Ii) erreicht, welche nun die Bindungsstelle einnimmt und somit blockiert. Die invariante Kette liegt als Trimer vor, wobei jede Kette für sich nichtkovalent an ein MHC-Klasse II-Heterodimer bindet. Auch mit diesem Komplex ist während des Zusammenbaus Calnexin assoziiert, das erst nach der Fertigstellung abfällt, womit der Komplex dann das ER verlässt. Die zweite Funktion der invarianten Kette ist die zielgesetzte Lieferung des Komplexes zu den niedrig-pH-Endosomen. Dort angekommen wird die invariante Kette von den Cathepsinen, vornehmlich Cathepsin S, abgebaut bis nur noch das kurze Fragment CLIP (Class II-assoziiertes invariantes Ketten Peptid) übrig bleibt, welches immer noch die Bindungsgrube belegt und vor einer Peptidbindung dissoziieren oder ausgetauscht werden muss. Die Vesikel, wo der Abbau von Ii und die Beladung mit Peptid stattfindet, bezeichnet man als MIIC (MHC Class II Compartment).

Bei der Peptidbeladung spielt das Molekül Human Leukocyte Antigen (HLA)-DM eine besondere Rolle. Zum einen stabilisiert es leere MHC-Klasse II-Heterodimere und zum anderen katalysiert es die Freigabe des CLIP-Fragments und die Bindung eines Peptids. Darüber hinaus kann HLA-DM aber auch den Austausch eines gebundenen Peptids katalysieren, wodurch am Ende nur die Peptide mit der stärksten Affinität wirklich gebunden vorliegen. Dies führt zu sehr stabilen MHC-Klasse II/Peptid-Komplexen, die nun an die Oberfläche transportiert und $CD4^+$-T-Zellen präsentiert werden können (Pieters, 1997; Janeway et al., 1999).

HLA-DM wiederum kann von einem anderen Molekül beeinflusst werden. Dabei handelt es sich um HLA-DO, das in B-Zellen und im Thymusepithel, jedoch nicht in anderen APCs, vorkommt. Seine Aufgabe liegt in der Inhibierung der DM-vermittelten Peptidbeladung und limitiert dadurch die Antigenpräsentation. Dadurch hemmt es jedoch nicht nur die Beladung, sondern ändert auch die Zusammensetzung der auf Klasse II-präsentierten Peptide (van Ham et al., 2000).

Auch bei der MHC-Klasse II-Antigenprozessierung gibt es alternative Wege. Hierbei sind die Liganden nicht extrazellulären Ursprungs, sondern stammen aus dem Cytosol. Dies konnte insbesondere im Falle der Autophagie gezeigt werden (Dengjel et al., 2005).

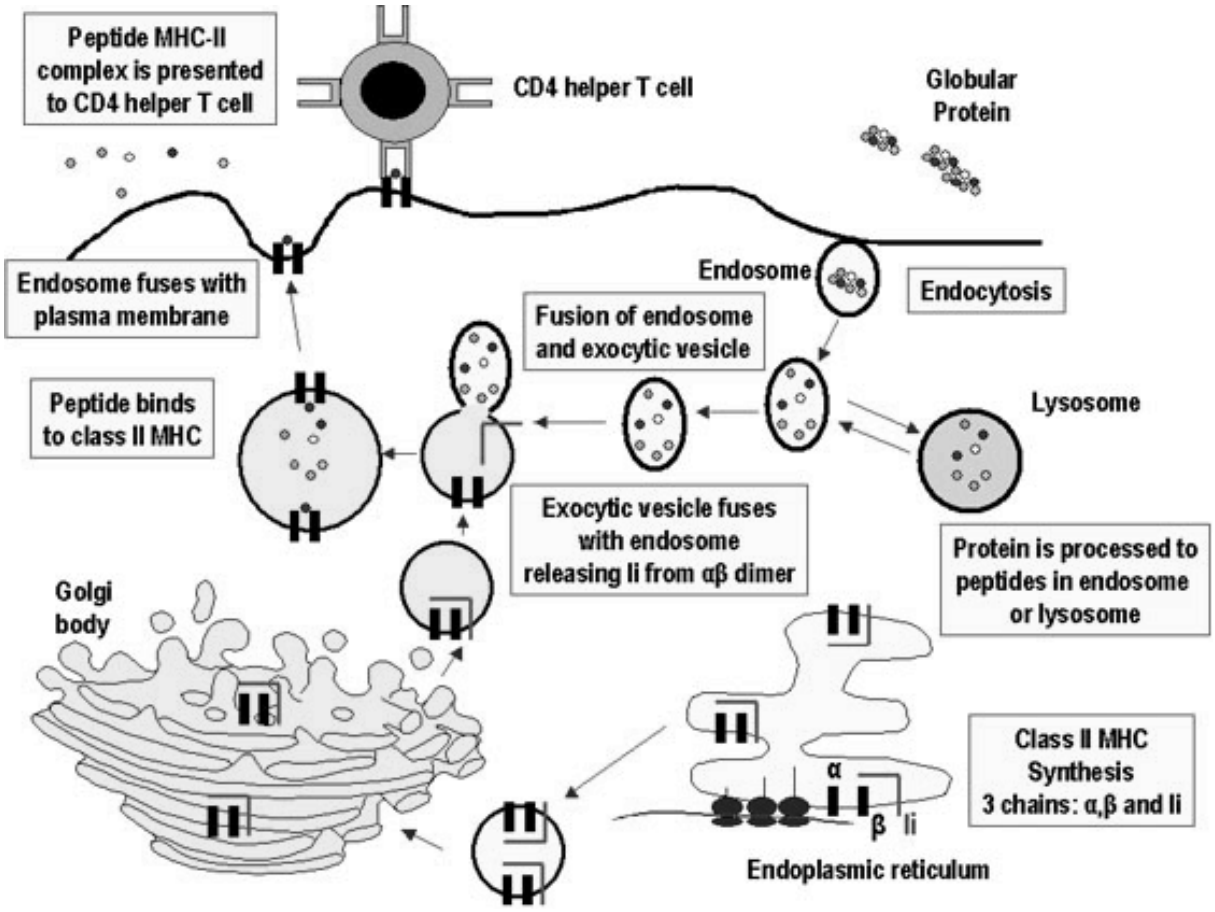


Abbildung 4: Prozessierung und Präsentierung von Antigenen auf MHC-Klasse II-Molekülen. (Microbiology and Immunology On-line, University of South Carolina, School of Medicine, Dr. William Bowers, edited and illustrated by Dr. Richard Hunt, Immunology, Chapter Eleven, Response to antigen: Processing and Presentation / MHC restriction and Role of the Thymus)

1.9 Zielsetzung und experimenteller Ansatz

Ziel dieser Arbeit war es, die entscheidenden Schritte bei der Prozessierung des N-Terminus von Epitopen im Kontext von MHC-Klasse I aufzudecken. Dazu sollte zuerst versucht werden ein N-terminales Motiv und die dazu passenden Spezifitäten zu finden. Um eine allgemeine Aussage treffen zu können, sollte eine Breitspektrenanalyse verwendet werden, die biochemische sowie biostatistische Daten miteinander vereinigt. Dabei sollte insbesondere der Einfluss von N-terminalen Aminosäuren auf die Prozessierbarkeit durch das Proteasom, TAP, cytosolische und endoplasmatische Aminopeptidasen geklärt werden. Aber auch Fragen wie die nach der Längenverteilung von proteasomalen sowie von TAP-transportierten Epitopvorläufern oder dem Anteil von cytosolischem und endoplasmatischem Trimming sollten beantwortet werden. Viele dieser Fragen sind für den C-Terminus schon geklärt, jedoch noch weitgehend offen für den N-Terminus. Für diese Untersuchungen sollten zum einen eine statistische Auswertungen vieler MHC-Klasse I-Liganden aus öffentlichen Datenbanken, genauso wie Vorhersagealgorithmen für Proteasom und TAP, aber auch komplett neue Daten wie die für diese Arbeit erstellten cytosolischen und endoplasmatischen Aminopeptidase-Schnittspezifitäten kombiniert werden. Der komplette Satz über alle 20 Aminosäuren der cytosolischen und endoplasmatischen Aminopeptidaseaktivität sollte mit

Hilfe des Umsatzes an fluorogenen Ein-Aminosäure-Substraten erstellt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit sollte es dann sein, die erhaltenen quantifizierten Aktivitäten einzelnen Aminopeptidasen zuzuordnen, sowie deren individuelle Bedeutung für die Epitopprozessierung zu bestimmen. Dazu sollte die Aktivität der endoplasmatischen Protease ERAP1 quantifiziert und mit der allgemeinen ER-Aktivität verglichen werden. Für das Cytosol sollten die Hauptaktivitäten mit Hilfe diverser Aufreinigungsstrategien und Detektion über fluorogene Substrate sowie spezifischer Inhibitoren ausfindig gemacht und deren genauer Anteil am Umsatz jeder einzelnen Aminosäure bestimmt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt sind alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich und Roth.

2.2 Zell-Kultur

2.2.1 Verwendete Zell-Linien

HeLa (Humanes cervicales Adenokarzinom)
MC57 (Maus-Fibrosarkom)
RMA (Maus-Thymom)
J774 (Maus-Makrophagenzelllinie)
EL4 (Maus-T-Zell-Lymphom aus C57BL/6N)
D2SC/1 (Maus-Dendritische Zelllinie)
RAW309 (Maus-Makrophagen-Zelllinie)

2.2.2 Zell-Kultivierung

Die verwendeten Zelllinien wuchsen in einem Zellinkubator bei 37°C und 5% CO_2 und wurden alle 2-3 Tage in neuem Medium (RPMI 1640 (Biowhittaker) oder Iscoves Medium mit 10% FCS (hitzeinaktiviert 1 h bei 56°C); 2 mM Glutamin; 1 mM Pyruvat; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin) ca. 1:10 verdünnt. Bei adhärenten Zellen wurde zuerst das Medium entfernt und die Zellen danach mit PBS kurz gewaschen. Dann wurden sie durch Zugabe einer geringen Menge an Trypsin/EDTA nach ca. 2 min durch Klopfen von der Flasche abgelöst und in frischem Medium suspendiert. Nach Zentrifugation (1500 rpm, 3 min) wurden die Zellen in Medium aufgenommen und 1:10 in einer neuen Flasche mit frischem Medium wieder in Kultur genommen.

2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Zellen abzentrifugieren (1500 rpm, 3 min, RT) und resuspendieren, dann 10 µl der Lösung mit 90 µl Trypanblau (Merck; 0,4% in PBS) mischen (entspricht einem Verhältnis von 1:10). Die Verdünnung kann beliebig gewählt werden, muss jedoch bei der späteren Berechnung beachtet werden. Davon 10 µl auf eine Neubauer-Zählkammer auftragen und 2-3 Großquadrate auszählen (es sollten 10-100 Zellen pro Großquadrat sein). Tote Zellen sind bei diesem Verfahren blau angefärbt, während lebendige Zellen farblos bleiben.

Zellen pro ml = gezählte Zellen/Großquadrat x Verdünnungsfaktor x 10^4

2.2.4 Zellen einfrieren

Zellen abzentrifugieren (1500 rpm, 3 min, RT) und Pellet schnell in kalter Freezing Solution (50% FCS; 40% serumfreies RPMI; 10% DMSO; lichtempfindlich!) resuspendieren (<60 Mio Zellen pro Cryovial (Greiner; 2 ml)). Dann bei -80 °C mit Frierbox (NALGENE Cryo 1°C Freezing Container, enthält Isopropanol) einfrieren (über Monate haltbar). Hierbei verhindert das DMSO, dass sich beim Frierprozess Wasserkristalle bilden können, die die Zellmembran zerreißen würden. Die Frierbox mit Isopropanol sorgt für einen langsamen, gleichmäßigen und damit schonenden Frierprozess der Zellen. Zur weiteren Lagerung in flüssigen Stickstoff überführen (-180 °C; über Jahre haltbar).

2.2.5 Zellen auftauen

Zellen schnell bei 37°C im Wasserbad auftauen, sofort in Medium resuspendieren, abzentrifugieren und in frischem Medium aufnehmen. Danach eine Verdünnungsreihe (1:3) in einer 12 Well-Platte ansetzen und Zellen im Inkubator bei 37°C wachsen lassen.

2.3 Statistische Methoden

2.3.1 MHC-Klasse I-Liganden-Datensatz

MHC-Klasse I-Liganden sind Peptide, die gebunden an MHC-Klasse I-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Diese können, müssen jedoch nicht, Epitope darstellen, die die Möglichkeit haben eine T-Zellantwort auszulösen. Für diese Arbeit wurde aus der SYFPEITHI-Datenbank (Rammensee et al., 1999) ein Satz von 894 humanen MHC-Klasse I-Liganden mit einer Länge von 8 bis 11 Aminosäuren von bekannter Proteinquelle entnommen. Die Analyse wurde auf Liganden begrenzt, die auf beiden Seiten von mindestens 20 Aminosäuren flankiert sind, um Randeffekte zu vermeiden (inklusive der Möglichkeit, dass die Aminopeptidaseaktivität alleine den Liganden befreien könnte oder Endopeptidasen keine Bindungsmotive finden). Damit bleiben noch 885 Liganden übrig, die diese Kriterien erfüllen.

2.3.2 Vergleich der proteasomalen Schnittspezifität, des TAP-Transports und der Aminopeptidase-Trimmeffizienz N-terminal von MHC-Klasse I-Liganden

Für eine feste Distanz *d* relativ zum N-Terminus eines MHC-Klasse I-Liganden wurde der Durchschnitt über alle Scores *s(d)* aller vorhandenen Proteinsequenzen gelegt: $S(d)=\langle s(d)\rangle_{proteins}$. Diese Durchschnittsscores an festen Positionen wurde verglichen mit den Durchschnittsscores, die aus zufälligen Positionen im selben Proteinsatz berechnet wurden $S^*=\langle s(d=random)\rangle_{proteins}$. Die Durchschnittsscore an zufälligen Positionen S^* wurde 1000x berechnet, was es ermöglicht dessen Mittelwert $\langle S^*\rangle$ und Standardabweichung *stdev(S*)* zu bestimmen. In den Abbildungen 8 und 16 stellt die x-Achse verschiedene Werte für die Position *d* dar, während die y-Achse den Unterschied zwischen dem Durchschnittsscore an einer festen Position *S(d)* und dem Durchschnittsscore an zufälligen Positionen $\langle S^*\rangle$ in Einheiten der Standardabweichung *stdev(S*): (S(d) - <S*>) / stdev(S*)* beschreibt.

Die Scores $S_{proteasome}(d)$ für den proteasomalen Schnitt zwischen den Positionen *d-1* und *d*, was ein Fragment mit der Aminosäure an der Position *d* an seinem N-Terminus abspaltet, wurden berechnet wie im Detail beschrieben in (Tenzer et al., 2005). Kurz zusammengefasst wurden die quantitativen Verdaus der Proteine Enolase (Toes et al., 2001), Casein (Emmerich et al., 2000) und Prionprotein (Tenzer et al., 2004) zur Bildung von SMM-Scoring-Matrizes für das konstitutive und das Immuno-Proteasom verwendet (Peters et al., 2003b). Im Gegensatz zur originalen SMM-Publikation wurde ein Regulationsparameter λ_{pos} für jede Sequenzposition in der Matrix verwendet.

Die Scores $S_{TAP}(d)$ für den TAP-Transport der Fragments mit der jeweiligen Aminosäure an Position *d* als N-Terminus wurden berechnet wie schon beschrieben in (Peters et al., 2003a). Nur der Beitrag der drei N-terminalen Aminosäuren eines Peptids zum TAP-Transport wurde berücksichtigt.

Für die Berechnung des mit der Position *d* assoziierten Aminopeptidasescores $S_{AP}(d)$ wurden die experimentell bestimmten Umsatzraten der Aminosäuren an Position *d* verwendet. Die Logarithmisierung der Umsatzraten befindet sich im Einklang mit den proteasomalen Schnittvorhersagescores, welche im Grunde log(produzierte Menge)-Werte ergeben, und mit den TAP-Transportvorhersagen, welche log(IC50)-Werte ergeben. Den Durchschnitt aus den logarithmischen Werten ziehen ist das selbe wie den geometrischen Durchschnitt zu verwenden, welches eher angemessen ist für diese Analyse, da die Werte selbst nicht einer Gauß-Verteilung folgen.

Statistische Analysen wurden in Kooperation mit Björn Peters von der Arbeitsgruppe H.G. Holzhütter, Charité, Berlin durchgeführt.

2.4 Aufreinigung Cytosol/ER/Gesamtlysat, zugehörige Assays und Berechnungen

2.4.1 Aufreinigung der cytosolischen und mikrosomalen Fraktion

Die Aufreinigung des Cytosols und der Mikrosomen basiert auf dem Protokoll von Walter und Blobel (Walter and Blobel, 1983). Die sieben Zelllinien HeLa (humanes cervicales Adenokarzinom), MC57 (Maus-Fibrosarkom), RMA (Maus-Thymom), J774 (Maus-Makrophagenzelllinie), EL4 (Maus-T-Zell-Lymphom), D2SC/1 (Maus-Dendritische Zelllinie) und RAW309 (Maus-Makrophagen-Zelllinie) wurden jeweils in 2 l RPMI 1640 (Biowhittaker) mit 10% FCS (SeraPlus) bei 37°C kultiviert. Adhärente Zellen wurden mit 0,3 mM EDTA in PBS; pH 7,2 abgelöst. Nach dem Pelletieren (1000 x g, 5 min, 4°C) wurden die Zellen einmal mit PBS und zweimal mit Protease-Assay (PA)-Puffer (20 mM HEPES/KOH; pH 7,6; 150 mM KCl; 5 mM $MgCl_2$; 0,5 mM DTT) gewaschen.

Die folgenden Schritte wurden bei 0-4°C durchgeführt. Alle verwendeten Puffer wurden bei 0,45 µm (Millipore), Sucrose bei 1,2 µm filtriert. Ein minimales Volumen an PA-Puffer wurde vor der Homogenisierung mit einem Elvehjem-Potter (20x, 10-15 Sekunden hoch/runter, 2000 rpm) zum Pellet gegeben. Die Mikrosomen und das Cytosol wurden mittels Differentieller Zentrifugation aufgereinigt: zuerst 10 min bei 1 000 x g, dann 10 min bei 10 000 x g und zuletzt 2,5 h bei 140 000 x g. Bei den ersten beiden Schritten wurde jeweils der Überstand für die nächste Zentrifugation verwendet, während Pellet und flotierendes Fett

verworfen wurden. Beim letzten Schritt wurde die Probe durch ein Sucrosekissen (1,3 M Sucrose in PA-Puffer; Verhältnis Probe zu Kissen 3:1) zentrifugiert, um Cytosol und Mikrosomen quantitativ voneinander zu trennen. Kissen und Membranfraktionen wurden komplett entfernt und verworfen. Der Überstand, bestehend aus reinem Cytosol, wurde aliquotiert bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Das Pellet, bestehend aus der mikrosomalen Fraktion, wurde in PA-Puffer resuspendiert und mit dem selben Volumen an Stripping-Puffer (50 mM EDTA und 1 M KCl in PA-Puffer) zur Entfernung anhaftender Proteine versetzt. Nach Inkubation für 15 min bei 0-4°C wurde die Probe 1 h bei 140 000 x g durch ein Sucrosekissen (0,5 M Sucrose in PA-Puffer; Verhältnis Probe zu Kissen 3:1) zentrifugiert. Kissen und Überstand wurden quantitativ entfernt und das Pellet mit PA-Puffer gewaschen ohne es aufzuwirbeln. Die aufgereinigten Mikrosomen wurden mit PA-Lyse-Puffer (1% Triton-X-100 in PA-Puffer) aufgelöst und aliquotiert bei -80°C gelagert.

2.4.2 Messung der Aminopeptidaseaktivität im Cytosol oder ER

Die Aminopeptidaseaktivität wurde in einer transparenten 96-Well-Flachbodenplatte (Greiner Bio-One) in einem Gesamtvolumen von 200 µl gemessen. Für jede Aminosäure wurde ein Well mit der cytosolischen oder mikrosomalen Fraktion, dem entsprechenden Puffer (PA-Puffer für das Cytosol oder PA-Lyse-Puffer für die Mikrosomen) und BSA mit einer finalen Konzentration von 1 mg/ml gefüllt. Zur Bestimmung der Umsatzraten der Aminopeptidasen dienten Ein-Aminosäure-Substrate mit einem fluorogenen an die C-terminale Carboxylgruppe angehängten 7-Amido-4-methylcoumarin (AMC) (Bachem). Vor dem Start der Reaktion durch Zugabe des Aminosäure-AMC-Substrates mit einer finalen Konzentration von 100 µM wurden die Proben zuerst auf eine Temperatur von 37°C gebracht. Dann wurde sofort die Fluoreszenz in Real Fluorescence Units (RFU) über die Zeit mit dem Fluorimeter SPECTRAFluor Plus (Tecan) bei einer Excitationswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm bei 37°C gemessen.

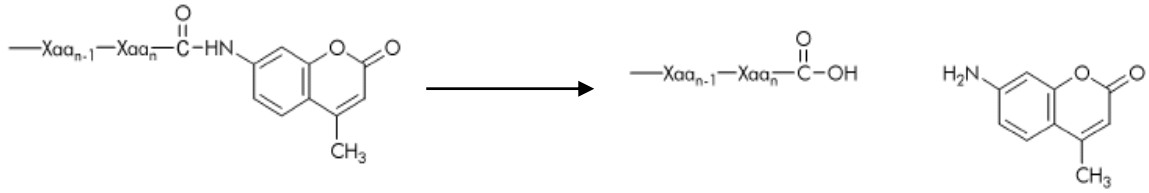


Abbildung 5: Spaltung eines Aminosäuresubstrates mit AMC als fluorogene Gruppe. (Bachem, Chromophors/Fluorophors: Spectral Properties and Characteristics)

Eine weitere Fluoreszenzgruppe, die für Aminopeptidaseassays verwendet wurde, ist ß-Naphthylamid (ß-NA). Die Abspaltung der Aminosäure bzw. des Peptids und damit die Bildung des freien ß-NA kann bei einer Excitationswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 405 nm gemessen werden.

2.4.3 Bestimmung der Umsatzraten und der kompartimentellen Präferenzen

Die Anfangsgeschwindigkeit (v_0) der Umsatzraten für jede einzelne Aminosäure wurde über die Steigung der Trendlinie durch den linearen Anfangsteil der Kurve in einem RFU über Zeit-Diagramm bestimmt. Dieser Wert ($RFU*min^{-1}$) wurde zuerst auf das verwendete Volumen normalisiert ($RFU*min^{-1}*\mu l^{-1}$) und dann, um verschiedene Datensätze miteinander

vergleichen zu können, als prozentualer Anteil an der Gesamtaktivität, bestehend aus allen 20 addierten Einzelaktivitäten des Satzes, dargestellt: *% der Gesamtaktivität = (v_0 [RFUs*µl^{-1}*min^{-1}] der entsprechenden Aminosäure) / ((Σ v_0 [RFUs*µl^{-1}*min^{-1}] von allen 20 Aminosäuren des Satzes) / 100)*.

Um wie in Abbildung 15 relative Präferenzen des Cytosols und ERs jeder einzelnen Aminosäure zuteilen zu können, wurden die prozentualen Abbauraten so angepasst, dass die addierten Werte jedes Cytosol/ER-Paares 100% ergeben, während das Verhältnis unverändert bleibt. Dies ergibt die absolute prozentuale Präferenz für den Abbau im Cytosol oder ER. Um die relative Präferenz zu erhalten, muss nun die Differenz zwischen den absoluten Werten bestimmt werden: *% relative Präferenz = % absolute ER-Präferenz - % absolute Cytosol-Präferenz*.

2.4.4 Zellproteasen-Gesamtlysat-Assay

Zuerst Zellen abzentrifugieren (1500 rpm, 3 min, RT), 1x mit PBS waschen und in 1,5 ml Eppendorf-Cups überführen. Noch 2x waschen mit Proteasen-Assay (PA)-Puffer (20 mM HEPES/KOH; pH 7,6; 150 mM KCl; 5 mM $MgCl_2$). Das Pellet dann mittels Auftauen/Einfrieren (3x) in flüssigem Stickstoff lysieren, etwas PA-Puffer zugeben und grobe Zellbestandteile durch Zentrifugation (13 000 rpm, 15 min, 4°C) abtrennen. Überstand in einem Aktivitätsassay weiterverwenden.

2.4.5 Aufreinigung von Milzzellen

Die Maus mittels cervicaler Dislokation töten und Milz entnehmen. Das Organ dann durch ein Zellsieb drücken und die separierten Zellen in 10 ml PBS aufnehmen. Nach Zentrifugation (1500 rpm, 3 min) und Abschütten des Puffers das Pellet in 5 ml ACK-Puffer (8,3 g NH_4Cl (150 mM); 1,0 g $KHCO_3$ (1 mM); 200 µl 0,5 M EDTA (0,1 mM) in 1 l H_2O bei pH 7,3) aufnehmen und 5 min bei RT inkubieren, was zur Lyse der Erythrozyten führt. Die Lymphozyten abzentrifugieren und einmal mit PBS waschen. Die Zellen dann je nach weiterer Verwendung mit dem passenden Puffer aufnehmen.

2.4.6 Messung der Aminopeptidaseaktivität der rekombinanten oder aufgereinigten Enzyme

Die humane Bleomycin-Hydrolase wurde als rekombinantes Enzym in E. coli exprimiert (Plasmid freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J.S. Lazo, Pittsburgh, USA).

Die Puromycin-sensitive Aminopeptidase wurde von M.W. Thompson, Arbeitsgruppe L.B. Hersh, Kentucky, USA als Bacculovirus-exprimiertes Protein zur Verfügung gestellt.

Die Leucin-Aminopeptidase wurde von Lars Stoltze, Arbeitsgruppe H.G. Rammensee zur Verfügung gestellt.

gp96 wurde von Norbert Hilf, Arbeitsgruppe H.G. Rammensee zur Verfügung gestellt.

Der Ansatz und die Berechnung sind identisch mit denen des Standardaktivitätsassays.

2.4.7 Bestimmung der Aminopeptidaseaktivität in einem Inhibitorassay

Der Assay wird genauso wie der normale Aktivitätsassay durchgeführt mit der Ausnahme, dass die jeweilige Probe vor der Substratzugabe 30 min lang mit dem Inhibitor bei 37°C inkubiert wird. Falls nicht anders beschrieben, wurden für die Inhibitorassays folgende Konzentrationen verwendet: 100 µM Puromycin (2 µl aus einer 10 mM Stocklösung) für PSA, 100 µM E64 (2 µl aus einer 10 mM Stocklösung) für BH, 1 µM Arphamenin A (2 µl aus einer 100 µM Stocklösung) für AP B und 100 µM Captopril (2 µl aus einer 10 mM Stocklösung) für LTA4H. Die folgende Tabelle enthält eine Liste mit allgemein verwendeten Inhibitoren, ihren Konzentrationen und Spezifitäten.

Inhibitoren (Konzentration) **Ausgangslösung / einzusetzendes Volumen für ein Endvolumen von 200 µl**	**inhibierbare Enzyme**	**Besonderheiten**
Lactacystin (100 µM) 10 mM / 2 µl	Proteasom, TPP II (zum Teil)	
Butabindid (10 µM) 1 mM / 2 µl	TPP II	
Puromycin (100 µM) 10 mM / 2 µl	PSA, Membrane alanyl aminopeptidase (schwach)	
CMK (100 µM) 10 mM / 2 µl	unspezifisch	Effekt beim Trimming von VSV-NP 52-59
E64 (0,5-10 µg/ml (1,4-28,0 µM) bzw. 100 µM) 10 mM / 1 µl (50 µM)	Cystein-Proteasen	Cystein-Proteasen stehen in Verbindung mit der ER-Antigen-Prozessierung
LLnL (100 µM) 10 mM / 2 µl	Cystein-Proteasen, Calpaine, Proteasom, LAP	ER-Peptid-Trimming
Bestatin (40 µg/ml (130 µM)) 10 mM / 3 µl (150 µM)	Aminopeptidasen, LAP, Aminopeptidase B, Tripeptide Aminopeptidase	
L-Leucinethiol (60 µM) 6 mM / 2 µl + DTT (1 mM) 100 mM / 2 µl	Aminopeptidasen, LAP, Aminopeptidase B	Disulfid zuerst mit DTT reduzieren; inhibiert eine ER-Aminopeptidase

Inhibitoren (Konzentration) **Ausgangslösung / einzusetzendes Volumen für ein Endvolumen von 200 µl**	**inhibierbare Enzyme**	**Besonderheiten**
TLCK (37-50 µg/ml (100-135 µM)) 10 mM / 3 µl (150 µM)	Serin- und Cystein-Proteasen	Schnitt im ER
TPCK (70-100 µg/ml (200-284 µM))	Serin- und Cystein-Proteasen	Schnitt im ER
PMSF (17-170 µg/ml (0,1-1 mM))	Serin-Proteasen	
Pefabloc (0,1-1 mg/ml) 100 mg/ml / 2 µl	Serin-Proteasen	
Leupeptin (0,5 µg/ml (1 µM)) 0,1 mg/ml / 1 µl	Ser/Cys-Proteasen & viele lysosomale Proteasen	
Pepstatin (0,7 µg/ml (1 µM)) 140 µg/ml / 1 µl	Aspartyl-Proteasen	
Aprotinin (0,06-0,2 µg/ml (0,01-0,3 µM))	Serin-Proteasen	
EDTA (0,2-0,5 mg/ml (0,5-1,3 mM)) 0,3M/1µl (1,5 mM) (empfohlen) 0,5M/4µl (10 mM) (am besten)	Metallo-Proteasen	auch Calpaine, da Ca-abhängig
PNT (1,10-Phenanthrolin) (1-10 mM) 1 M / 2 µl	Metallo-Proteasen, LAP	ER-Aminopeptidase
EGTA (0,2-0,5 mg/ml (0,5-1,3 mM), pH ~8) 50 mg/ml / 2 µl	Ca-abhängige Proteasen (z.B. Calpaine)	
Arphamenin A (1 µM) 100 µM / 2 µl	Aminopeptidase B	
Captopril (100 µM) 10 mM / 2 µl	Leukotrien A4 Hydrolase	

2.5 Bestimmung aller relevanten Aminopeptidaseaktivitäten im Cytosol

2.5.1 Auftrennung der Aminopeptidaseaktivitäten aus dem Cytosol durch Hydrophobe Interaktionschromatographie

Hierbei wurde EL4-Cytosol auf eine HiTrap Phenyl HP 5 ml - Säule (Hydrophobe Interaktion, Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC)) aufgetragen und durch einen Gradienten mit 0-100% HIC-Puffer A bis B (s. 2.5.2.1) fraktioniert eluiert. Der Gradient lief über 20 Column Volumes (CV) mit CV = 5 ml mit einer Flussrate von 1 ml/min und einer Fraktionsgröße von 2 ml. Für den Aktivitätstest wurden je 20 µl der Fraktionen mit Leu-AMC als Substrat in PA-Puffer mit BSA getestet.

2.5.2 Aufreinigung und Identifizierung der zwei unbekannten Proteasen

2.5.2.1 Puffer

Puffer für Anionen-Austauscher (IEC) (DEAE und MiniQ):
IEC-Puffer A (20 mM Tris/HCl; pH 8; 2 mM $MgCl_2$; 1 mM DTT; 10 mM NaCl)
IEC-Puffer B (20 mM Tris/HCl; pH 8; 2 mM $MgCl_2$; 1 mM DTT; 500 mM NaCl)

Puffer für Hydrophobe Interaktion (HIC) (Phenyl Sepharose):
HIC-Puffer A (50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 2 mM $MgCl_2$; 1 mM DTT; 10 mM NaCl; 1 M $(NH_4)_2SO_4$)
HIC-Puffer B (50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 2 mM $MgCl_2$; 1 mM DTT; 10 mM NaCl)

Puffer für Gel-Filtration (GF) (Superdex 200):
GF-Puffer (50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 2 mM $MgCl_2$; 1 mM DTT; 150 mM NaCl)

Die gesamte Aufreinigung der Proteasen wurde mit dem ÄKTApurifier (Amersham Biosciences) bei 4°C durchgeführt.

2.5.2.2 1. Säule: HiPrep 16/10 DEAE FF (Anionenaustauscher, Ion Exchange Chromatography (IEC))

18 ml aufgereinigtes EL4-Cytosol wurden mit 100 ml IEC-Puffer ohne Salz zur Reduktion der Ionenstärke, Angleichung des Puffers und Einstellung des korrekten pH von 8 verdünnt. Diese Probe wurde nun nach dem Äquilibrieren der Säule mit IEC-Puffer A aufgetragen und mit IEC-Puffer B fraktioniert eluiert. Dabei wurde folgender Gradient angelegt: 15 Column Volumes (CV) 0-50% B, 5 CV 50-100% B, wobei CV = 20 ml ist. Dabei eluierte die Arg/Pro-Aminopeptidase mit den Fraktionen 1F9-1, 1G1-9 (Peak bei 120 mM NaCl) und die Cys-Aminopeptidase bei 1D11-1, 1E1-7 (Peak bei 80 mM NaCl), welche jeweils für sich vereinigt ein Volumen von 36 ml ergaben. Die Flussrate betrug hierbei 2 ml/min und die aufgefangenen Fraktionen hatten ein Volumen von 2 ml. Zur Bestimmung der Aktivität in den einzelnen Fraktionen wurden jeweils 10 µl Probe entnommen und mit dem jeweiligen Substrat in einem Endvolumen von 100 µl in IEC-Puffer A getestet.

2.5.2.3 2. Säule: HiTrap Phenyl HP 5 ml (Hydrophobe Interaktion, Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC))

Die Fraktionen, die die Arg/Pro-Aminopeptidase enthalten, wurden mit 1 M Ammoniumsulfat ausgefällt, was bei dem verwendeten Volumen von 35 ml einer Zugabe von 4,62g Ammoniumsulfat entspricht, wobei das Enzym im Überstand zu finden war. Bei der Cys-Protease wurde die Fällung mit 2 M Ammoniumsulfat durchgeführt, wobei 9,25 g für die 35 ml benötigt wurden. Die verunreinigenden Proteine wurden nach dem Lösen des $(NH_4)_2SO_4$ bei 4°C 30 min unter Schütteln oder Rotation gefällt und bei 10 000 x g, 10 min, 4°C abzentrifugiert. Für den Aktivitätstest wurde das Pellet in demselben Volumen wie der Überstand gelöst und 10 µl in 200 µl mit dem entsprechenden Substrat getestet. Die Fällung diente zum einen der Aufreinigung und zum anderen der Anpassung des Puffers für die folgende HIC-Säule. Der Überstand mit der entsprechenden Aminopeptidase konnte nun aufgetragen werden. Dazu wurde zuerst die Säule mit HIC-Puffer A äquilibriert, dann die jeweilige Probe aufgetragen und schließlich über einen Gradienten mit HIC-Puffer B fraktioniert eluiert. Dabei wurde für die Arg/Pro-Aktivität der Gradient 4 CV 0-40% B, 20 CV 40-90% B, 1 CV 90-100% B mit CV = 5 ml und für die Cys-Aktivität der Gradient 5 CV 0-50% B, 20 CV 50-100% B angelegt. Die Arg/Pro-Peptidase eluierte dabei mit den Fraktionen B4-1, C1-7 (Peak bei 500 mM $(NH_4)_2SO_4$) und die Cys-Peptidase bei B4-1, C1-7 (Peak bei 420 mM $(NH_4)_2SO_4$). Die Flussrate war hierbei 2 ml/min mit 2 ml pro Fraktion. Zur Aktivitätsbestimmung der jeweiligen Fraktionen wurden je 10 µl entnommen und in einem Endvolumen von 200 µl in HIC-Puffer B mit dem jeweiligen Substrat getestet.

2.5.2.4 3. Säule: Superdex 200 10/300 GL (Gelfiltration (GF))

Da ein kleines Auftragsvolumen hierbei Bedingung ist, wurden zuerst die Fraktionen mit der Arg/Pro-Aktivität mittels eines 10k-Centricons (Millipore) und die Cys-Aktivität mittels eines 50k-Centricons (Millipore) auf je 0,5 ml aufkonzentriert. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit GF-Puffer wurde die Probe aufgetragen und fraktionell eluiert. Dabei ließ sich die Arg/Pro-Aktivität in den Fraktionen C6-9 (2 ml) (Peak bei 14,25 ml) und die Cys-Aktivität in C6-9 (2 ml) (Peak bei 14,75 ml) wiederfinden. Die Flussrate war hierbei 0,5 ml/min und das Volumen pro Fraktion 0,5 ml. Für den Aktivitätstest wurden 10 µl der Fraktionen verwendet in einem Endvolumen von 200 µl in GF-Puffer.

Der Vorteil bei diesem Schritt ist nicht nur die weitere Aufreinigung, sondern es gibt noch zwei weitere: Das Ammoniumsulfat wird abgetrennt, womit die Probe schon für die nächste Säule vorbereitet wird und mittels der Gelfiltration lässt sich die ungefähre Masse der jeweiligen nativen Aminopeptidase durch den Vergleich mit Massenmarkern bestimmen. Für diese Bestimmung wurden Blue Dextran 2000, Aldolase, Albumin, Ovalbumin, Chymotrypsinogen A und Ribonuclease A verwendet. Mittels des Dextrans konnte das Säulenausschlussvolumen V_0 mit 7,81 ml bestimmt werden. Das Gesamtsäulenvolumen V_t von 23,562 ml ist vom Hersteller angegeben. Nun lässt sich über das Elutionsvolumen V_e jeder Probe der Wert K_{av} mit $K_{av} = (V_e-V_0)/(V_t-V_0)$ bestimmen. Die jeweilige Proteasenmasse lässt sich nun aus dem Eich-Diagramm mit der x-Achse = log(Da) und der y-Achse = K_{av} ablesen. Hierbei ergab sich für die Arg/Pro-Aminopeptidase in Fraktion C7 eine Masse von berechneten 74 kDa und für die Cys-Aminopeptidase in Fraktion C7 eine Masse von 59 kDa.

	MW (Da)	Ve (ml)	Kav	log (Da)
Blue Dextran 2000	xxx	7,81	xxx	xxx
Aldolase	158000	12,83	0,31868969	5,19865709
Albumin	67000	14,13	0,40121889	4,8260748
Ovalbumin	43000	15,2	0,46914678	4,63346846
Chymotrypsinogen A	25000	17,05	0,58659218	4,39794001
Ribonuclease A	13700	17,77	0,63230066	4,13672057

Kav = -0,3145*log(kDa) + 1,9404

	Ve (ml)	Kav	log (Da)	MW (Da)	MW (kDa)
Arg/C7	14,25	0,40883697	4,86983474	74102,8214	74
Cys/C7	14,75	0,44057897	4,76890628	58736,2591	59

2.5.2.5 4. Säule: MiniQ 4.6/50 PE (Anionenaustauscher, Ion Exchange Chromatography (IEC))

Aus beiden Aufreinigungen wurden jeweils die Fraktionen C6-9 (2 ml) 1:10 mit IEC-Puffer A verdünnt, wobei man ein Endvolumen von 20 ml und eine NaCl-Konzentration von ca. 24 mM erhält. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit IEC-Puffer A wurde die jeweilige Probe aufgetragen und ein Gradient mit IEC-Puffer B angelegt unter Fraktionierung des Eluats. Der Gradient für die Arg/Pro-Aminopeptidase war 15 CV 0-60% B, 5 CV 60-100% B und für die Cys-Aminopeptidase 15 CV 0-60% B, 5 CV 60-100% B mit CV = 1 ml. Dabei eluierte die Arg/Pro-Aktivität bei B12-11 (1 ml) (Peak bei 90 mM NaCl) und die Cys-Aktivität bei A8-10 (1,5 ml) (Peak bei 55 mM NaCl). Die Durchflussrate betrug 0,5 ml/min und das Fraktionsvolumen war 0,5 ml. Für den Aktivitätstest wurden jeweils 10 µl pro Fraktion entnommen und mit dem jeweiligen Substrat in einem Endvolumen von 200 µl in IEC-Puffer A getestet. Die MiniQ-Säule hat hierbei den Vorteil, dass sie hochauflösend ist und zudem die Probe konzentriert eluiert wird. Zur weiteren Analyse wurden nun die MiniQ-Peakfraktionen vereinigt, wie auch die jeweils umliegende Fraktionen und mit YM-10 Microcons (10 kD) (Millipore) für 1,5 ml Eppendorf-Tubes bei 12 000 rpm in einer Tischzentrifuge (entspr. 13 700 x g) bis zu einem Volumen von je 180 µl aufkonzentriert.

2.5.2.6 SDS-PAGE und Identifizierung der Aminopeptidasen durch Massenspektrometrie

Von den vereinigten Fraktionen wurden nun entsprechend ihrer Elutionsreihenfolge je 30 µl auf ein 4-15% Gradienten-Gel (Bio-Rad) aufgetragen und eine SDS-PAGE durchgeführt. Anschließend wurden die Banden durch Zink-Färbung sichtbar gemacht. Die relevanten Proteinbanden wurden ausgeschnitten und entfärbt. Nach einem In-Gel-Verdau mit Trypsin wurden dann die zugehörigen Proteine über MALDI/Tandem-MS und dem Datenbankprogramm Proteinprospektor identifiziert.

2.5.2.7 SDS-PAGE (diskontinuierliches SDS-Gel)

4x Resolving Buffer: 18,18 g Tris-Base; 0,4 g SDS; ad 100 ml (H_2O); pH 8,8 (4 M HCl)

4x Stacking Buffer: 6,06 g Tris-Base; 0,4 g SDS; ad 100 ml (H_2O); pH 6,8 (4 M HCl)

10x Running Buffer: 30,4 g Tris-Base; 10 g SDS; 144 g Glycin; ad 1 l (H_2O)

5x Sample Buffer (nonreducing): 1 g SDS; 3 mg EDTA; 10 mg Bromphenolblau; 2,5 ml Resolving Buffer; ad 20 ml (Glycerin)

	8% Laufgel (10 ml)	12% Laufgel (10 ml)	5% Sammelgel (5 ml)
H_2O	3,0 ml	2,0 ml	3,1 ml
Glycerin	2,5 ml	2,5 ml	---
Acrylamid; Bis 40% T, 3% C	2,0 ml	3,0 ml	0,6 ml
Resolving Buffer 4x	2,5 ml	2,5 ml	---
Stacking Buffer 4x	---	---	1,3 ml
TEMED	6 µl	4 µl	5 µl
APS 40%	25 µl	25 µl	12 µl

Mit dieser Methode kann das Sammelgel sofort auf das Laufgel gegossen werden.

Für die Probenpräparation zuerst den Sample Buffer zur Probe geben und zusätzlich noch 1 µl 1 M DTT für jede 10 µl Sample Buffer. Die Lösung 5-10 min bei 95°C im Heizblock erhitzen. Danach wiederum 1 µl 1 M DTT für jede 10 µl Sample Buffer zugeben und die Probe inklusive des Markers auf das Gel auftragen. Der Lauf wird gestartet bei 100-120 V und nach dem Eintritt der Probe ins Laufgel auf 120-140 V erhöht.

2.5.2.8 Zn-Stain (Bio-Rad)

Die Zink-Stain-Lösungen A (enthält Imidazol) und B (enthält Zinksulfat) werden zuerst 1:10 separat verdünnt. Das SDS-PAGE-Gel wird kurz mit Wasser abgespült und dann in einem Container mit Lösung A 10 min lang auf einem Mixer bei geringer Geschwindigkeit geschüttelt. Lösung A wird abgeschüttet und das Gel inklusive Container wiederum kurz mit Wasser gespült, um Reste der Imidazol-Lösung zu entfernen. Dann Lösung B zu dem Gel geben und unter Schütteln die Banden entwickeln lassen (30-60 sek). Dabei ist ein dunkler Untergrund von Vorteil, da bei diesem Verfahren die Banden ungefärbt bleiben und der Hintergrund weiß hervortritt. Lösung B abschütten und nach kurzem Abspülen das Gel 3 min mit Wasser auf dem Mixer schütteln lassen. Dieses Wasser wird wiederum abgeschüttet und der Container erneut mit frischem Wasser gefüllt.

Nun lässt sich das entwickelte Gel entweder gegen einen schwarzen Hintergrund fotografieren oder mittels eines Durchlichtscanners direkt digitalisieren. Die Nachweisgrenze liegt hierbei deutlich über der der Coomassie-Färbung und das Verfahren ist zudem noch schneller. Der große Vorteil des Zink-Stain liegt jedoch darin, dass die Proteine selbst nicht angefärbt werden und somit unverändert vorliegen, was gerade für die Identifizierung durch Massenspektrometrie von großem Nutzen ist. Zudem lässt sich das Gel wieder entfärben, wodurch die Proteinbanden nun erneut mit jedem anderen Verfahren (z.B. Coomassie- oder Silberfärbung) sichtbar gemacht werden können.

2.5.2.9 Zn-Destain (Bio-Rad)

Für die Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie ist es empfehlenswert das Gel wieder zu entfärben. Dazu wurden zuerst nach der Färbung die interessanten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und jede Bande dann einzeln entfärbt. Hierfür wird die Zink-Destain-Lösung (enthält Tris/Glycin) 1:10 mit Wasser verdünnt. Diese Lösung wird zur jeweiligen Bande gegeben und unter Schütteln 5 min inkubiert. Je nach Geldicke wird dieser Schritt noch ein- bis zweimal für 3-10 min wiederholt (siehe dazu das Originalprotokoll). Nun ist das Gel bereit für die weitere Analyse.

2.5.2.10 Tryptischer In-Gel-Verdau für die Massenspektrometrie

Verwendete 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße werden mit einer 100 mM Glycinlösung 1 h bei 37°C vorbehandelt, um unspezifische Peptidbindungen an den Gefäßwänden zu vermeiden. Des Weiteren müssen Chemikalien höchster Reinheit verwendet werden (z.B. LiChrosolv-Wasser (Merck)).

Die ausgeschnittenen und entfärbten Gelbanden werden zuerst zerkleinert, dann auf einem Schüttler je 10 min lang 2x mit 1 ml H_2O, 1x mit 1 ml 50% Acetonitril und 1x mit 1 ml H_2O gewaschen und schließlich in der Speedvac eingetrocknet. Das Pellet wird dann in 100 µl $NaHCO_3$ (0,1 M) mit sofortiger Zugabe von 5 µl DTT (45 mM) 1 h bei 55°C inkubiert. Nun werden 5 µl Jodacetamid (100 mM) zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Der Überstand wird verworfen, die Gelstücke mit 1 ml H_2O gewaschen und erneut in der Speedvac eingetrocknet. Dann werden 20 µl Trypsinlösung (0,05 µg/µl Trypsin (Sigma) in 0,1 M $NaHCO_3$) zum Pellet gegeben und 15 min bei 37°C inkubiert. Es folgt die Zugabe von 50 µl $NaHCO_3$ und nach weiteren 15 min nochmals 100 µl. Schließlich wird 12 h (bzw. über Nacht) verdaut.

Der Überstand des Verdaus wird separat auf Peptide untersucht. Zur Extraktion der Peptide aus den Gelstücken werden diese 2x je 20 min bei RT in 100 µl TFA/H_2O (50%/50%)-Lösung geschüttelt und die beiden Überstände vereinigt. Dann zur weiteren Extraktion noch 2x in der TFA/Acetonitril (50%/50%) -Lösung 20 min bei RT inkubieren und die Überstände mit den TFA/H_2O-Überständen vereinigen.

Das eluierte Probenmaterial und der Verdauüberstand werden nun in der Speedvac eingetrocknet und in 20 µl Lösung A (0,1% TFA/99,9% H_2O) aufgenommen. Dann wird die Probe mittels Ziptips (Millipore), die mit C18 Material gefüllt sind, um Peptide zu binden, entsalzt. Die Ziptips werden zuerst mit 20 µl Lösung B (40% Methanol/1% Ameisensäure/60% H_2O) 2x gewaschen, mit 20 µl Lösung A 3x vorbehandelt und dann die Probe 10x aufgesogen. Dann wird 3x mit je 20 µl Lösung A gewaschen und mit 15 µl Lösung B eluiert. Die so vorbereitete Probe kann nun direkt für die Massenspektrometrie verwendet werden.

2.5.2.11 Proteinidentifikation durch Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisation und Tandem-MS

Bei der MALDI (Matrix Assisted Desorption Ionization)-Massenspektrometrie werden 0,5 µl einer Trägersubstanz (20 mg 2,5-Dihydroxy-Acetophenon + 5 mg Ammoniumcitrat in 1 ml Isopropanol (4:1)) auf ein Gold-Target aufgetragen und unter Vakuum getrocknet. Auf dieses Target wird dann 1 µl der entsalzten Probe aufgetragen und auch unter Vakuum getrocknet,

so dass Probe und Trägersubstanz zusammen kristallisieren. Durch einen Schuss mit einem Laser werden Ionen aus dem Target herausgerissen und in einem elektrischen Feld beschleunigt. Dies geschieht in einem LD-TOF-System (Laser Desorption - Time Of Flight) (Hewlett-Packard G2025A) bei 10^{-6} Torr und einer Laserenergie von 1,5 µJ. Die Flugzeit ist dabei proportional zur Quadratwurzel des m/z-Verhältnisses. Da die Teilchen normalerweise nur einfach geladen sind, misst man mit diesem Verfahren die $[M+H]^+$-Ionen. Mittels MALDI und anschließender Tandem-MS (Massenspektrometrie) lässt sich nun die Primärstruktur verschiedener Peptidfragmente des jeweiligen Proteins nachweisen. Mit Hilfe der Teilsequenzen und dem Datenbankprogramm Proteinprospektor der University of California San Francisco (http://prospector.ucsf.edu/) kann nun jede der Proben und damit jede der Ausgangsbanden dem entsprechenden Protein zugeordnet werden. Die Identifizierung mit MALDI/Tandem-MS wurde durchgeführt von Jörn Dengjel aus der Arbeitsgruppe von H.G. Rammensee, Tübingen.

2.6 Expression und Aufreinigung rekombinanter Enzyme

2.6.1 Aufreinigung der humanen Bleomycin-Hydrolase

Rekombinante hBH mit einem entfernbaren (Thrombin) N-terminalen Hexahistidin-Tag wurde im E. coli-Stamm BL21(DE3), die mit einem IPTG-induzierbaren und Kanamycin-resistenten pET28b-Vektor transformiert wurden, in einer 2,5 l Kultur exprimiert. Dazu 5 ml LB; 100 µg/ml Kanamycin mit hBH-E.Coli (Clon 3) aus der eingefrorenen Ausgangsprobe animpfen und über Nacht bei 37°C unter Schütteln bei 180 rpm hochziehen. Diese Vorkultur in 100 ml LB, 100 µg/ml Kanamycin überführen und 3 h bei 37°C, 180 rpm weiter wachsen lassen. 20 ml der letzten Kultur in 3 l LB (5 * 600 ml); 30 µg/ml Kanamycin bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD_{600} = 0,7 wachsen lassen (ca. 3-4 h). Dann die Expression mit 1 mM IPTG (16 h, 25°C (RT), 180 rpm) induzieren. Bakterien ernten (5000 rpm, 12 min) und waschen mit 20 mM Kaliumphosphat; 10 mM Imidazol; 0,5 M NaCl; pH 7,7. Danach das Pellet bei -80°C einfrieren oder sofort mit der Aufreinigung fortfahren.

Pellet resuspendieren in Lyse-Puffer (20 mM Kaliumphosphat; 10 mM Imidazol; 10% Glycerol; 0,5 M NaCl; pH 7,7). Bakterien mittels French Press lysieren (3x, Medium / 1000) und Lysat zentrifugieren (47 000 x g = 25 300 rpm mit Rotor Ti70, 4°C, 20 min). Dann Aufreinigung der BH mit dem Äkta-System über den His-Tag inklusive dessen Abspaltung mit 2 ml des Säulenmaterials Ni-NTA-Superflow: 1. Säule mit Lyse-Puffer äquilibrieren, 2. Probe injizieren, 3. waschen mit 5% (entspricht 35 mM Imidazol) Affinitäts-Elutions-Puffer (20 mM Kaliumphosphat; 500 mM Imidazol; 10% Glycerol; 0,5 M NaCl; pH 7,7), 4. Thrombin auf die Säule injizieren (20 U/ml in 5% Affinitäts-Elutions-Puffer) und 1 h bei RT inkubieren, 5. hBH mit 5% Affinitäts-Elutions-Puffer eluieren, 6. Säule mit 100% Affinitäts-Elutions-Puffer waschen. Eine andere Möglichkeit ist die Aufreinigung ohne Abspaltung des His-Tags. Dabei wird auf Thrombin verzichtet und die gebundene His-hBH über den Gradienten 5 - 100% Affinitäts-Elutions-Puffer eluiert und fraktioniert gesammelt. Dann sollte jedoch das Protein dialysiert oder entsalzt werden, da der Elutionspuffer mit 500 mM Imidazol zur Präzipitation über Nacht führt.

Zur Abtrennung des Thrombins nach der Entfernung des His-Tags und allgemein zur weiteren Aufreinigung der Protease folgt als nächster Schritt eine Anionen-Austauscher-

Chromatographie mit dem Äkta-System und der Säule MonoQ HR5/5. Zuerst muss die Probe entweder dialysiert, entsalzt oder mit Puffer A (25 mM Tris/HCl; 50 mM NaCl; 1 mM DTT; 10% Glycerol; pH 8) verdünnt werden (auf Ionenstärke achten!). Dann die Säule mit Puffer A äquilibrieren, die Probe injizieren (evtl. vorher bei 0,22 µm filtrieren) und einen Gradienten mit Puffer B (25 mM Tris/HCl; 500 mM NaCl; 1 mM DDT; 10% Glycerol; pH 8) anlegen. Die hBH sollte bei ungefähr 250 mM NaCl eluieren. Der Elutionspeak kann über das Fluoreszenzsubstrat Leu-AMC nachgewiesen werden.

Danach die saubere BH aliquotiert bei -80°C einfrieren. Die Reinheit wurde durch SDS-PAGE mit anschließender Zink-Färbung nachgewiesen. Die Menge an hBH und His-hBH wurde jeweils mit Roti®-Nanoquant (Roth) und die Aktivität durch einen Fluoreszenzassay mit Leu-AMC bestimmt.

2.6.2 Aufreinigung von ERAP1

Die komplette ERAP1 cDNA wurde vom Vektor phA-LAP1 (ein Geschenk von Dr. M. Tsujimoto) mittels der High Fidelity Polymerase (Advantage HF, BD Biosciences Clontech, Le Pont de Claix, France) PCR-amplifiziert, subcloniert in pIVEX2.3 (Roche, Meylan, France), welcher eine poly-His-Erweiterung enthält und schließlich mit der carboxyterminalen poly-His-Erweiterung in den Baculovirus-Transfervektor pVL1393 überführt. Ein rekombinanter Baculovirus, welcher ERAP1 kodiert, wurde mittels Co-Transfektion von Sf9-Insektenzellen mit BaculoGold DNA (BD Pharmingen) und dem Transferplasmid erzeugt. ERAP1 wurde aus Sf9-Zellen aufgereinigt, die 4 bis 5 Tage zuvor mit dem rekombinanten Virus infiziert wurden. Zur Aufreinigung von nativem ERAP1 wurden die Zellen in 20 mM Tris/pH 7,9 mit 0.6% CHAPS und Proteaseinhibitoren suspendiert und mittels Dounce-Homogenisierer and Ultraschallbehandlung lysiert. ERAP1 wurde dann an Ni-NTA-Kugeln (ProBond, Invitrogen) gebunden, eluiert mit 250 mM Imidazol und gegen PBS dialysiert. Verunreinigungen wurden durch Gelfiltrationschromatographie über eine Superdex 200-Säule (Amersham-Pharmacia, Les Ulis, France) entfernt. Die Fraktionen mit der Peptidaseaktivität wurden vereinigt und aufkonzentriert (Amicon Ultra, Millipore). Die Reinheit der ERAP1-Präparation zeigt sich bei der SDS-PAGE als einzelne Bande. Das aufgereinigte Protein wurde freundlicherweise von P. van Endert (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris) zur Verfügung gestellt.

2.6.3 SDS-PAGE (diskontinuierliches SDS-Gel)

siehe 2.5.2.7

2.6.4 Coomassie-Färbung

Das Gel wird in Coomassie-Lösung (40% Methanol; 10% Essigsäure; 50% H_2O; 0,2% Coomassie Brilliant Blue) für ca. 30-60 min gefärbt. Danach wird es in mehreren Schritten, den letzten über Nacht, mit Entfärber-Lösung (40% Methanol; 10% Essigsäure; 50% H_2O) behandelt. Nun kann es direkt fotografiert oder eingescannt werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Trocknung auf einem Filterpapier für 2 h bei 80°C in einem Vakuum-Dryer (Gel Dryer Model 583, BioRad).

2.6.5 Zn-Stain (Bio-Rad)

siehe 2.5.2.8

2.6.6 Rapid Silver Stain (Modifikation der Morrissey-Technik)

Zuerst wird das Gel nach der Elektrophorese für 30 min in 100 ml 50% Methanol / 10% Essigsäure gelegt. Die Lösung wird verworfen, 50% Methanol / 7% Essigsäure werden zugegeben und in der Mikrowelle für 3 min bei 600 W erhitzt. Lösung wiederum verwerfen, Wasser zugeben und in der Mikrowelle für 3 min bei 600 W erhitzen. Dieses Wasser wegschütten, 100 ml 10 µg/ml DTT (H_2O) zugeben und wieder in der Mikrowelle für 3 min bei 600 W erhitzen. Die DTT-Lösung abschütten, 100 ml 0,1% Silbernitrat-Lösung zugeben und in der Mikrowelle für 3 min bei 600 W erhitzen. Diese Lösung abschütten und 100 ml 3% Natriumcarbonat mit 50 µl 37% Formaldehyd zugeben. Diese Lösung sofort verwerfen und nochmals 100 ml 3% Natriumcarbonat mit 50 µl 37% Formaldehyd zugeben. Das Ganze bei RT schütteln während sich das Gel entwickelt. Die Proteine treten als schwarze Banden hervor. Die Entwicklung dann mit 10 ml 2,3 M Zitronensäure stoppen und alles abschütten. Das Gel kann nun fotografiert oder eingescannt werden.

2.6.7 Proteinbestimmung mit Roti®-Nanoquant (Roth)

In einer 96-Well-Platte werden zu 50 µl der Probe bzw. der Eichlösungen (bestehend aus einer BSA-Verdünnungsreihe von 0, 20, 30, 40, 50, 60, 80 und 100 µg/ml) 200 µl Roti®-Nanoquant (Roth) (5x-Lösung 1:5 mit Wasser verdünnt) gegeben. Nach ca. 5 min Inkubationszeit bei RT wird die OD bei 590 nm und 450 nm gemessen. Die Proteinmenge in der Probe ergibt sich dann aus der Steigung der Trendlinie des Eichdiagramms, bei dem die x-Achse die BSA-Proteinmenge und die y-Achse die OD 590/450 angibt.

2.6.8 Messung der Aminopeptidaseaktivität der rekombinanten oder aufgereinigten Enzyme

siehe 2.4.6

2.7 Prozessierungs-Versuche *in vivo*

2.7.1 Membrangängigkeit der Inhibitoren

Hierfür wurden die Zellen zuerst in serumfreiem Medium resuspendiert (Suspensionskultur) oder mit diesem überschichtet (adhärente Zellen). Dann wurde der entsprechende Inhibitor zugegeben. Konzentration und Inkubationszeit war verschieden für jeden Versuch und kann aus dem jeweiligen Versuchstext entnommen werden. Die Inkubation wurde im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 durchgeführt. Zum Test auf die Membrangängigkeit wurden die Zellen pelletiert und mehrmals gewaschen, um das Medium mit Inhibitor vollständig abzutrennen.

Die Zellen wurden dann wie beschrieben lysiert und grobe Bestandteile durch Zentrifugation entfernt.

Zur Bestimmung der Hemmung wurden Zellen mit und ohne Inhibitorinkubation miteinander verglichen. Dazu wurde zum einen ein Substrat verwendet, das typisch für die zu hemmende Protease ist und zum anderen ein Substrat, auf das die Hemmung keinen Einfluss haben sollte. Das zweite Substrat dient damit zur Normalisierung, um die Unterschiede bei der Umsatzrate des ersten Substrates erkennen zu können. Zudem wurde in einem weiteren Ansatz nach der Lyse der Zellen noch Inhibitor zugegeben. Dabei kann man nun die Membrangängigkeit daran erkennen, dass diese Zugabe keinerlei zusätzlichen Effekt mehr zeigt.

2.7.2 293-K^b-Zellen mit integriertem verlängertem SIINFEKL-Konstrukt

Hierfür wurde das Flp-In-System von der Firma Invitrogen verwendet. Mittels einer entsprechenden Flp-In™-Host-Zelllinie, die nur eine einzige Flp-Recombinase-Target (FRT)-Sequenz im Genom an einer transkriptionell aktiven Stelle integriert hat, kann garantiert werden, dass nur jeweils ein Transkript im Genom der Zelle integriert wird. Zur Transfektion mit dem verlängerten SIINFEKL-Konstrukt wurde die Zelllinie FlpIn293 (Invitrogen Europe, Freiburg, Deutschland) eingesetzt, die zum einen mit dem Expressionsvektor pcDNA5 inklusive des SIINFEKL-Konstrukts über das Flp-In-System und zum anderen mit H2-K^b, das für die Präsentation des Epitops auf der Oberfläche notwendig ist, transfiziert wurde.

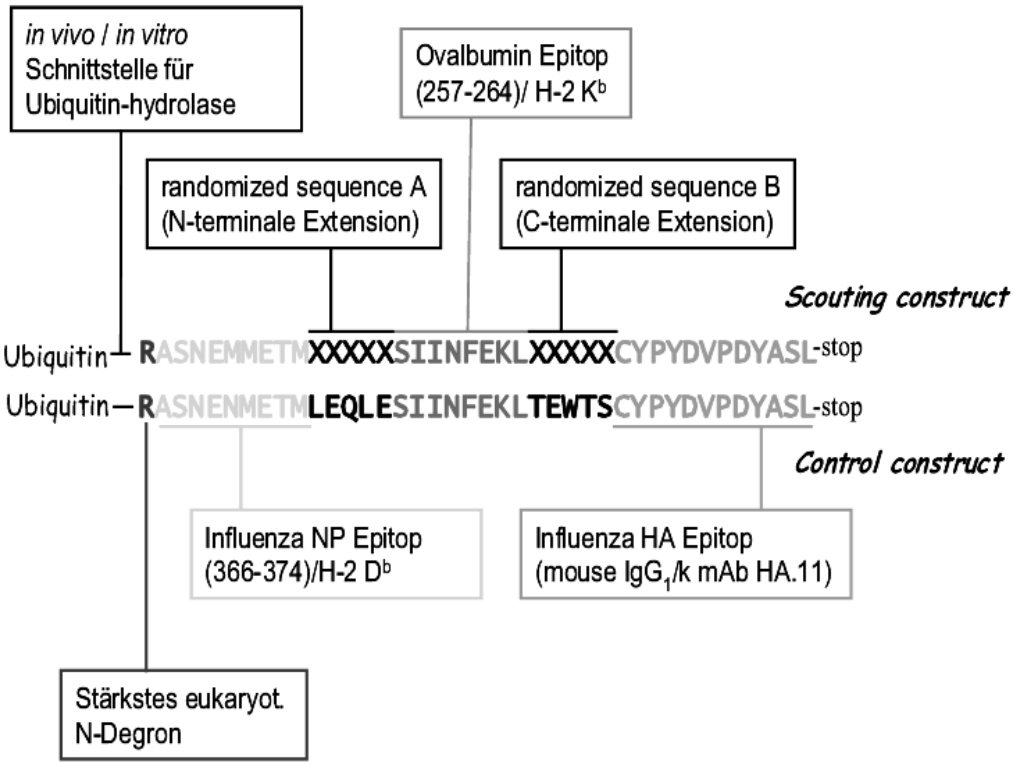


Abbildung 6: Aufbau des RAP-Konstruktes. (Emmerich, 2001 und Tenzer, 2005)

Das integrierte Konstrukt hat folgenden Aufbau (Abbildung 6): Es beginnt mit einem Ubiquitin, das direkt von der Ubiquitin-Hydrolase geschnitten werden kann. Darauf folgt die

N-terminale Verlängerung RASNEMMETMLEQLE mit dem sich anschließenden Epitop SIINFEKL. Das für diesen Versuch verwendete Konstrukt besitzt im Anschluss ein Stopp-Signal, wodurch der Rest nicht weiter exprimiert wird. Somit lässt sich nun der Abbau der RASNEMMETMLEQLE-Sequenz über die Präsentation von SIINFEKL in Komplex mit H-2K^b auf der Zelloberfläche untersuchen. Die Zellen mit dem integrierten Konstrukt wurden von Stefan Tenzer, Labor H.G. Rammensee/H.J. Schild, Tübingen zur Verfügung gestellt.

2.7.3 Acid-Wash

Zellen in Suspensionskultur können direkt verwendet werden, adhärente Zellen sollten mit EDTA (nicht Trypsin!) abgelöst werden. Zellen ($1x10^6$) mit PBS waschen und Überstand komplett abnehmen. 500 µl Acid Wash Lösung (1:1-Mix aus 0,263 M Zitronensäure und 0,132 M NaH_2PO_4, immer frisch machen!) zu dem Pellet geben und 1 min bei RT inkubieren. Dann 1 ml Stopp-Lösung (0,15 M NaH_2PO_4; pH 7,5) zugeben. Zellen abzentrifugieren (1800 rpm, 3 min), 1x mit 3 ml PBS und 1x mit 3 ml Medium waschen. Zur Untersuchung der erneuten Peptigenerierung die Zellen wieder in Kultur nehmen.

2.7.4 FACS-Färbung und FACS-Analyse

Zellen in FACS-Puffer (1% BSA und 0,05% Azid in PBS) aufnehmen und in eine 96 Well-Platte (je 200 µl) überführen. 1-2x mit je 200 µl FACS-Puffer waschen und abzentrifugieren (1700 rpm, 2-3 min, 4°C). Zu dem jeweiligen Zellpellet 50 µl Erstantikörper (in FACS-Puffer) oder Hybridom-Überstand geben und 30 min bis 1 h bei 4°C im Dunkeln stehen lassen. Nach dieser Zeit 150 µl FACS-Puffer zugeben, abzentrifugieren, noch 1-2x mit je 200 µl FACS-Puffer waschen und wiederum abzentrifugieren. 50 µl des markierten Zweitantikörpers (in FACS-Puffer) zum jeweiligen Pellet geben und 30 min bis 1 h bei 4°C im Dunkeln stehen lassen. Wiederum 150 µl FACS-Puffer zugeben, abzentrifugieren, noch 1-2x mit je 200 µl FACS-Puffer waschen und abzentrifugieren. Zuletzt die Zellen in je 200 µl FACS-Puffer in kleine FACS-Röhrchen überführen. Alternativ können die Zellen auch mit Fixierpuffer (1% PFA in PBS) aufgenommen werden und sind damit länger haltbar.

Zum Nachweis des Epitops SIINFEKL auf H-2K^b wurde der Maus-Primärantikörper 25.D1-16 bzw. direkt der Hybridomüberstand verwendet. Als Sekundärantikörper wurde der PE-konjugierte Ziege-Anti-Maus-IgG-Antikörper (Dianova) eingesetzt.

Die markierten Zellen wurden dann mittels FACS (FACSCalibur und Software CellQuest Pro von BD) analysiert.

2.8 Tierhaltung und Genotypisierung

2.8.1 Mausstämme

Blmh$^{-/-}$ C57BL/6 (Schwartz et al., 1999)
Goku BALB/c (Osada et al., 1999)
BALB/c (Charles River Laboratories)
C57BL/6 (Charles River Laboratories)

2.8.2 Genotypisierung von Mäusen

Zur Ohrbiopsie werden 20 µl Genomic Lysis Puffer (300 mM NaCl; 25 mM EDTA; 50 mM Tris; pH 8; 0,2% SDS; 0,5 mg/ml Proteinase K (vor Gebrauch zugeben; Stocklösung 20-25 mg/ml in PBS bei -70°C lagern) gegeben. Dann 2-3 h bei 55°C inkubieren. 480 µl H_2O zugeben, vortexen und danach die Protease 10 min bei 95°C inaktivieren. 3 µl davon bei der PCR einsetzen bei einem Gesamtvolumen von 25 µl (PCR über 40 Zyklen).

2.8.3 Polymerase Chain Reaction (PCR) zur Bestimmung des Genotyps der PSA-K.O.- und BH-K.O.-Mäuse

2.8.3.1 PSA-PCR

Primer LPSA-14 (CAG GTG AAT ACT AGA TGT TAT GAA TAC TAG GTG)
Primer LPSA-15 (GTG ACA GCA GCA TAG CGC AC)
Primer V2P1-4 (CAC TCC CAT ACA TCT TGC AG)

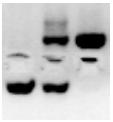
Primercombi: 25 µl Primer LPSA-14 + 25 µl Primer LPSA-15 + 25 µl Primer V2P1-4 + 25 µl H_2O mit 20 µM Primer-Ausgangslösung

2,5 µl PCR-Puffer (BD 10x cDNA PCR Reaction Buffer)
0,5 µl TAQ (BD Advantage cDNA Polymerase Mix 50x)
0,5 µl dNTPs
1 µl Primercombi
3 µl DNA
17,5 µl H_2O

Programm:
94°C, 2 min
****
94°C, 30 sec
60°C, 30 sec
68°C, 1 min
→ 35 Cyclen
****
68°C, 5 min

wt-Bande (LPSA-14/LPSA-15): ca. 940 bp
KO-Bande (LPSA-14/V2P1-4): ca. 530 bp

KO +/- wt



2.8.3.2 BH-PCR

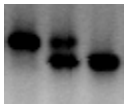
Primer BHCode2 (CAC TGT AGC TGT ACT CAC AC)
Primer BHP3 (ATT TGT CAC GTC CTG CAC GAC G)
Primer BHCom1 (GCG ACA GAG TAC CAT GTA GG)

5 µl 10x PCR-Puffer
3 µl $MgCl_2$
1 µl dNTPs
0,5 µl Primer BHCode2 (20µM)
0,25 µl Primer BHCom1 (20µM)
0,5 µl Primer BHP3 (20µM)
0,25 µl TAQ
5 µl DNA
34,5 µl H_2O

Programm:
95°C, 5 min
****
95°C, 30 sec
50°C, 30 sec
72°C, 2 min
→ 35 Cyclen
****
72°C, 5 min

KO-Bande (BHCode2/BHP3): ca. 900 bp
wt-Bande (BHCode2/BHCom1): ca. 600 bp

KO +/- wt



2.8.3.3 Agarose-Gel für PCR-Produkte

Zur Auftrennung der PCR-Banden wurden 1% Agarose-Gele verwendet. Dazu wurde zuerst 1% Agarose in Wasser eingerührt und kurz in der Mikrowelle bis zum kompletten Auflösen aufgekocht. Bei ca. 60°C wurde eine entsprechende Menge an 50x TAE-Puffer und an einer 1% Ethidiumbromid-Lösung zugegeben und gut gemischt. Nach Gießen und Erstarren-lassen des Gels wurde es mit 1x TAE-Puffer inklusive Ethidiumbromid überschichtet und die Probe in 1x Loading Buffer aufgetragen. Das Gel lief bei einer Spannung von 100 V mit anschließender Visualisierung der Banden durch UV-Licht.

TAE 50x (242 g (2 M) Tris; 57,1 ml Eisessig; 14,6 g (0,05 M) EDTA in 1 l H_2O)
Ethidiumbromid: 1,5 µl der 1%igen Stocklösung in 30 ml Gel oder Puffer
Loading Buffer 10x (5 ml Glycerol; 2 ml TAE 50x; 0,25% Bromphenolblau in 10 ml H_2O)

Kleines Gel (30 ml Gelvolumen; 250 ml Puffer; 100 V)
Mittelgroßes Gel (150 ml Gelvolumen; 700 ml Puffer; 100 V)

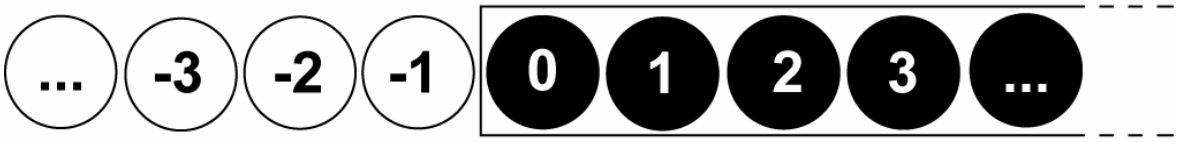
A) Entdeckung eines N-terminalen MHC-Klasse I-Liganden-Prozessierungsmotivs und der Einfluss von Aminopeptidasen auf dessen Sequenz

3 Ergebnisse

3.1 Entdeckung eines N-terminalen Prozessierungsmotivs

Wenn die N-terminale Prozessierung eine wichtige Rolle bei der Bildung von MHC-Klasse I-Liganden spielt und zudem noch eine signifikante Selektivität besitzt, sollte dies einen Einfluss auf das Aminosäuremuster N-terminal von präsentierten Liganden ausüben (Abbildung 7A). Aus diesem Grunde wurden von 885 MHC-Klasse I-Liganden aus der SYFPEITHI-Datenbank (Rammensee et al., 1999) die Aminosäurehäufigkeiten an diesen Positionen untersucht und mit den durchschnittlichen Häufigkeiten in deren Ausgangsproteinen verglichen (Abbildung 7B). Mittels einer χ^2-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Positionen -14, -12, -6, -4, -2 und -1 ein signifikant ($p \leq 0,05$) verschiedenes Sequenzprofil als erwartet zeigen. Diese Signifikanz blieb in einer vorherigen Analyse (Altuvia and Margalit, 2000) wahrscheinlich aufgrund limitierender Datenmengen zu dieser Zeit unentdeckt. Als nächstes wurden die Abweichungen der Häufigkeiten an verschiedenen Sequenzpositionen mittels einer Korrelationsanalyse miteinander verglichen (Abbildung 7C).

A



B

Aminosäure-Häufigkeiten

	Er-war-tet	Abstand bis MHC-Liganden-N-Terminus															
		-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
A	7,3%	7,0%	7,0%	7,2%	6,0%	7,3%	6,6%	6,6%	6,9%	6,9%	7,0%	7,1%	8,4%	8,5%	9,5%	8,1%	10,0%
C	1,8%	2,1%	1,9%	1,0%	1,9%	1,6%	1,4%	2,2%	1,8%	1,8%	0,9%	2,3%	1,5%	1,6%	2,0%	1,9%	0,1%
D	5,2%	5,5%	6,1%	4,5%	4,4%	4,6%	6,0%	6,0%	4,7%	4,1%	4,0%	4,4%	4,7%	5,8%	5,7%	6,8%	8,5%
E	7,5%	4,8%	8,3%	5,0%	5,2%	7,5%	7,8%	7,0%	6,7%	6,9%	5,8%	7,3%	7,7%	7,1%	7,3%	7,6%	7,6%
F	3,5%	2,6%	2,6%	4,2%	3,4%	4,6%	4,0%	3,8%	3,8%	3,4%	4,6%	4,6%	3,1%	2,5%	3,5%	3,5%	4,4%
G	6,8%	6,5%	5,9%	7,8%	9,6%	7,1%	6,1%	8,5%	7,2%	7,2%	7,1%	5,2%	5,3%	5,4%	6,6%	7,7%	7,5%
H	2,3%	3,6%	2,5%	2,1%	2,9%	2,3%	2,4%	3,1%	2,6%	2,9%	2,7%	2,1%	3,2%	2,7%	2,2%	2,5%	2,6%
I	4,8%	4,7%	5,4%	4,8%	3,1%	3,2%	5,8%	6,0%	7,0%	4,6%	6,0%	6,1%	6,5%	4,6%	4,1%	3,8%	5,8%
K	6,2%	7,0%	6,3%	6,5%	9,2%	6,8%	7,3%	5,2%	7,1%	6,7%	7,0%	5,8%	5,8%	5,8%	6,0%	5,1%	7,5%
L	9,7%	9,4%	8,7%	10,8%	11,4%	9,5%	8,8%	9,6%	9,2%	11,0%	11,6%	8,6%	9,0%	9,6%	10,4%	10,4%	4,1%
M	2,4%	2,7%	2,2%	3,4%	3,1%	1,7%	2,1%	2,3%	3,2%	2,3%	1,8%	2,4%	2,2%	3,0%	2,7%	2,8%	1,7%
N	3,7%	4,3%	5,2%	3,0%	4,1%	4,7%	3,7%	2,7%	3,9%	3,3%	3,0%	3,6%	3,2%	4,1%	4,3%	4,5%	3,7%
P	5,7%	5,2%	3,2%	4,9%	5,7%	5,3%	6,0%	5,8%	5,1%	4,8%	4,8%	4,1%	4,0%	3,5%	1,8%	1,8%	0,4%
Q	4,7%	4,2%	5,4%	5,1%	3,9%	5,2%	4,6%	5,1%	4,1%	3,6%	3,7%	4,7%	4,5%	4,6%	4,7%	5,6%	2,5%
R	5,4%	6,1%	4,8%	4,3%	7,2%	4,6%	4,3%	5,9%	4,1%	6,4%	5,5%	7,3%	4,5%	6,3%	5,8%	6,8%	7,6%
S	7,2%	7,0%	9,5%	8,6%	4,6%	5,9%	5,4%	6,2%	5,2%	6,2%	8,5%	6,6%	7,2%	6,8%	7,2%	9,3%	10,2%
T	5,3%	5,2%	5,5%	5,0%	4,2%	5,5%	7,0%	3,7%	6,0%	5,7%	4,6%	5,8%	6,9%	5,4%	6,5%	3,2%	4,8%
V	6,4%	7,6%	7,0%	7,3%	5,9%	7,1%	7,5%	6,3%	6,7%	7,6%	6,8%	6,8%	6,9%	7,5%	4,9%	5,2%	5,8%
W	1,1%	0,9%	0,8%	0,7%	0,7%	1,0%	1,0%	1,0%	1,3%	1,8%	2,1%	1,7%	1,7%	1,8%	1,1%	0,6%	0,1%
Y	2,8%	3,4%	1,8%	3,5%	3,6%	4,3%	2,2%	3,0%	3,3%	2,6%	2,6%	3,6%	3,9%	3,5%	3,7%	2,8%	5,3%
	χ^2	24,9	**33,5**	28,9	**62,6**	24,2	22,1	22,6	25,9	19,3	**35,7**	28,6	**31,7**	25,7	**40,9**	**57,9**	**179,8**

C

Korrelation der Abweichungen

Abstand bis MHC-Liganden-N-Terminus	-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
-15	X															
-14	0,19	X														
-13	0,15	-0,06	X													
-12	0,55	-0,24	0,32	X												
-11	0,01	-0,23	0,15	0,30	X											
-10	-0,16	0,15	0,04	-0,20	0,09	X										
-9	0,20	-0,19	0,01	0,21	-0,19	-0,14	X									
-8	0,24	-0,13	0,20	0,17	0,00	0,36	0,13	X								
-7	0,17	-0,24	-0,27	0,10	-0,03	-0,02	0,04	0,27	X							
-6	-0,14	-0,24	0,19	-0,17	0,01	0,15	0,01	0,16	0,60	X						
-5	-0,08	-0,14	-0,26	-0,24	0,04	-0,14	0,02	0,27	0,45	0,25	X					
-4	0,13	0,03	-0,04	-0,40	0,04	0,16	-0,05	0,44	0,43	0,47	0,47	X				
-3	0,35	0,17	-0,12	-0,10	-0,06	-0,23	-0,16	0,18	0,46	0,23	0,43	0,64	X			
-2	0,15	0,38	0,08	0,07	0,18	-0,27	-0,15	0,14	0,11	-0,06	0,40	0,34	0,55	X		
-1	0,24	0,57	0,26	0,24	0,04	-0,38	0,20	-0,18	-0,27	-0,23	-0,02	-0,14	0,21	0,69	X	
0	0,16	0,38	0,57	0,19	0,20	0,17	-0,04	0,01	-0,30	0,08	-0,15	0,11	0,08	0,42	0,60	X

Abbildung 7: Aminosäurehäufigkeiten N-terminal von MHC-Klasse I-Liganden. **A)** Erklärung zur verwendeten Nomenklatur: Schwarze Kreise in einem Rechteck symbolisieren jeweils eine Aminosäure innerhalb des Epitops. Dabei wird vom N- zum C-Terminus gezählt mit dem Epitop-N-Terminus als Position 0. Weiße Kreise stehen für Aminosäuren N-terminal außerhalb des Epitops. Dabei ist die erste Position vor dem Epitop -1 mit fortlaufender Nummerierung vom N-Terminus weg. **B)** Beobachtete Häufigkeit (F_{pos}) der 20 Aminosäuren an verschiedenen Sequenzpositionen pos = -15, -14,...-1, 0 upstream des N-Terminus von MHC-Klasse I-Liganden. Die statistische Analyse wurde über einen Satz von 885 MHC-Liganden mit bekannten Ausgangsproteinen durchgeführt. Die linke Spalte zeigt die durchschnittlichen (= erwarteten) Häufigkeiten (F_{exp}) innerhalb des gesamten Satzes an Ausgangsproteinen. Beobachtete Aminosäurehäufigkeiten, die sich von den erwarteten Häufigkeiten mehr als eine Standardabweichung unterscheiden, sind in hellgrau (über Erwartung) oder dunkelgrau (unter Erwartung) hervorgehoben. Die untere Reihe zeigt die Ergebnisse von Pearsons χ^2-Test, der durchgeführt wurde, um zu untersuchen, ob sich die Häufigkeitsverteilung der 20 Aminosäuren an einer bestimmen Sequenzposition (Werte in einer Spalte der Matrix) von der Gesamtverteilung in den Ausgangsproteinen (Werte in der linken Spalte) unterscheidet. Sequenzpositionen mit χ^2-Werten über 30,14 unterscheiden sich signifikant mit $p_{diff=19} \leq 0{,}05$. **C)** Abweichungen von Aminosäurehäufigkeiten an einer bestimmten Sequenzposition von ihren erwarteten Häufigkeiten wurden gemessen mit $\log(F_{pos}/F_{exp})$. Für jedes Paar an Sequenzpositionen wurde der Korrelationskoeffizient r zwischen dem Satz dieser Abweichungsmessungen ermittelt. Positive Werte von r deuten auf gleichgerichtete Abweichungen von Aminosäurehäufigkeiten in den zwei Sequenzpositionen hin, negative Werte auf entgegengesetzte Abweichungen. Werte von r über 0,38 zeigen eine statistisch signifikante Korrelation mit $p \leq 0{,}05$ (signifikante Nummern sind in grau hervorgehoben). Benachbarte Sequenzpositionen vom N-Terminus an bis Position -7 haben die Tendenz ähnliche Abweichungen zu besitzen.

Dies enthüllte die Tatsache, dass benachbarte Stellen zwischen -7 und -1 ein ähnliches Profil an Frequenzabweichungen besitzen, welches nun auch die Stellen -7, -5 und -3 beinhaltet, für die die Sequenzzusammensetzung keine signifikante Differenz zum Ausgangsprotein zeigte. Erwähnenswert ist auch, dass es kein durchgehend einheitliches Abweichungsprofil im Prozessierungsmotiv gibt. Ganz im Gegenteil, weiter entfernte Stellen haben die Tendenz eine niedrige oder sogar negative Korrelation zu besitzen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es ein Sequenzfenster von ungefähr sieben Aminosäuren gibt, das dem MHC-Klasse I-Liganden vorausgeht, welches eine nicht-zufällige Anhäufung von Aminosäuren aufweist, das man als N-terminales Prozessierungsmotiv bezeichnen kann. Dies scheint eine selektive Prozessierungspräferenz widerzuspiegeln, die für benachbarte Stellen ähnlich ist, sich aber mit der Distanz zum N-Terminus ändert.

3.2 Das Prozessierungsmotiv passt zu den Sequenzspezifitäten von Proteasom und TAP

Das Vorhandensein eines N-terminalen Prozessierungsmotivs könnte durch verschiedene Prozesse verursacht werden: durch die Proteasom- oder TAP-Präferenzen und durch das N-terminale Trimming im Cytosol oder im ER. Abbildung 8 vergleicht wie gut die bekannten Spezifitäten des konstitutiven Proteasoms, des Immunoproteasoms und von TAP zu den Aminosäuren in der N-terminalen Region von MHC-Klasse I-Ligandenvorläufern passen. Für jede Position, die einem potentiellen N-Terminus eines Ligandenvorläufers entspricht, wurde die Wahrscheinlichkeit eines proteasomalen Schnitts und des Transports des entstehenden Vorläufers mittels TAP ins ER vorhergesagt. Diese Vorhersage wurde mit jenen verglichen, die an zufälligen Stellen in derselben Gruppe von Ausgangsproteinen gemacht wurden.

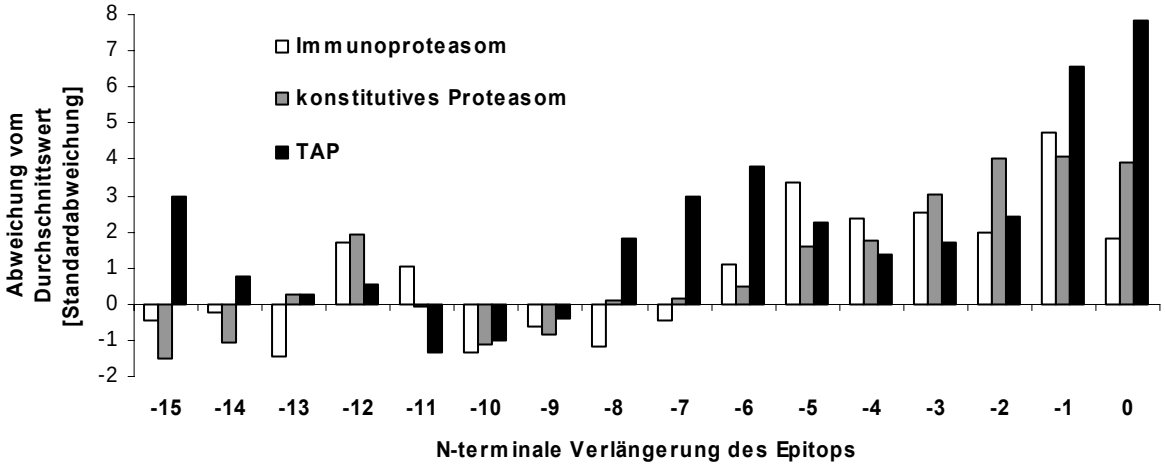


Abbildung 8: Vorhergesagte Effizienz der proteasomalen Bildung und des TAP-Transports von MHC-Klasse I-Ligandenvorläufern. Durchschnittliche proteasomale Schnittwerte an den Sequenzpositionen pos = -15, -14,..., -1, 0 upstream des N-Terminus von MHC-Klasse I-Liganden und durchschnittliche TAP-Transportwerte für die zugehörigen Vorläuferpeptide wurden berechnet mittels des im Methoden-Teil besprochenen Vorhersagealgorithmus. Diese Vorhersagealgorithmen basieren nicht nur auf der Aminosäure an der angegebenen Sequenzposition, sondern beinhalten auch die Aminosäuren innerhalb eines Sequenzfensters um diese Sequenzposition herum. Die Werte sind in Einheiten der Standardabweichung über oder unter den Ergebnissen von Vorhersagen an zufälligen Positionen angegeben, wie im Methoden-Teil beschrieben.

Bis Position -5 ist der durchschnittliche Wert für konstitutive oder immunoproteasomale Schnitte mindestens eine Standardabweichung über dem Wert an zufälligen Stellen. Für TAP ist der durchschnittliche Vorhersagewert für den Transport von um 8 Aminosäuren verlängerten Vorläufern mindestens eine Standardabweichung über dem Zufallswert. Daraus

lässt sich folgern, dass es vor CTL-Epitopen eine Anreicherung an Aminosäuren gibt, die bevorzugt proteasomale Schnittstellen und N-Termini für den TAP-Transport darstellen. Dies unterstützt die oben aufgestellte Hypothese des N-terminalen Prozessierungsmotivs, das zumindest teilweise das Resultat von proteasomalen Schnitten und TAP-Transport von MHC-Klasse I-Liganden und deren Vorläufern darstellt.

3.3 Proteasom und TAP sind nicht genug

Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass das Prozessierungsmotiv nur durch seine Spezifität für proteasomale Schnitte und TAP-Transport definiert ist. Die Produkte des Proteasoms, die nicht die korrekte Größe besitzen, müssen noch entweder im Cytosol oder im ER getrimmt werden. Darüber hinaus müssen N-terminal verlängerte Vorläufer, die von TAP transportiert werden, auch noch von endoplasmatischen Aminopeptidasen verkürzt werden. Wenn dieses Trimming mit unterschiedlicher Effizienz für unterschiedliche Aminosäuren abläuft, sollte man erwarten, dass dies weiterhin die Zusammensetzung der N-terminalen Verlängerung beeinflusst. Dies würde in Unterschieden zwischen den Aminosäuren resultieren, die man in den N-terminalen Verlängerungen findet und denen, die von Proteasom und TAP bevorzugt werden. In der Tat gibt es solche Differenzen: Die Aminosäuren A, F, I, L, M, V, W und Y haben alle einen überdurchschnittlichen Score für proteasomale Schnitte (Tenzer et al., 2005) und für TAP-Transport (Peters et al., 2003a), wenn man den Durchschnitt über das ganze Sequenzfenster in der Vorhersage berechnet. Deshalb sollte man erwarten, dass alle diese Aminosäuren in überdurchschnittlichen Häufigkeiten in allen Positionen innerhalb des Prozessierungsmotivs zu finden sind. Wie man aus Abbildung 7B erkennen kann, ist das nicht der Fall: W, I und V sind an Stelle -1 signifikant unter Durchschnitt vertreten. Weiter entfernt vom N-Terminus, an Positionen -7 bis -3, treten sie allerdings in überdurchschnittlicher Häufigkeit auf. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass in diesen Fällen die Aminosäurebelegung an Stelle -1 im Prozessierungsmotiv nicht vom Proteasom oder von TAP, sondern von Aminopeptidasepräferenzen beeinflusst ist. Damit lässt sich die Vorhersage ableiten, dass die Aminosäuren W, I und V nicht effizient an der Position -1 getrimmt werden können. Aufgrund dieser kurzen Analyse lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die Trimmeffizienz für verschiedene Aminosäuren variiert, was die Zusammensetzung des N-terminalen Prozessierungsmotivs beeinflusst.

3.4 Bestimmung der cytosolischen und endoplasmatischen Aminopeptidasespezifität

Um die Hypothese zu testen, werden experimentelle Daten benötigt, die die Aminopeptidasespezifität im Cytosol und im ER charakterisieren. Da bisher noch keine solchen Daten verfügbar waren, wurde die cytosolische and die endoplasmatische Aminopeptidaseaktivität für alle 20 Aminosäuren durch Messung der Umsatzraten von individuellen fluorogenen Ein-Aminosäure-Substraten in entweder aufgereinigtem Cytosol oder aufgereinigten aufgelösten Mikrosomen, welche die ER-Aktivität widerspiegeln, bestimmt.

Ein Nachteil von Ein-Aminosäure-Substraten liegt darin, dass sie keine Informationen über mögliche Längenpräferenzen liefern. Der große Vorteil ihres Einsatzes ist jedoch, dass die

damit erhaltenen Ergebnisse nicht von Endopeptidasen beeinflusst sind, da diese, wie später noch gezeigt wird, die Substrate nicht umsetzen können. Zudem zeigen die meisten Aminopeptidasen, mit ein paar eventuellen Ausnahmen, ihre Aminosäurepräferenzen auch beim Umsatz mit Einfachsubstraten, eine Tatsache, die diesen Ansatz rechtfertigt. Der Einfluss benachbarter Positionen in einem längeren Peptid kann vernachlässigt werden, da in dieser biostatistischen Analyse aufgrund des großen Datensatzes eine hohe Variabilität an jeder Position vorliegt.

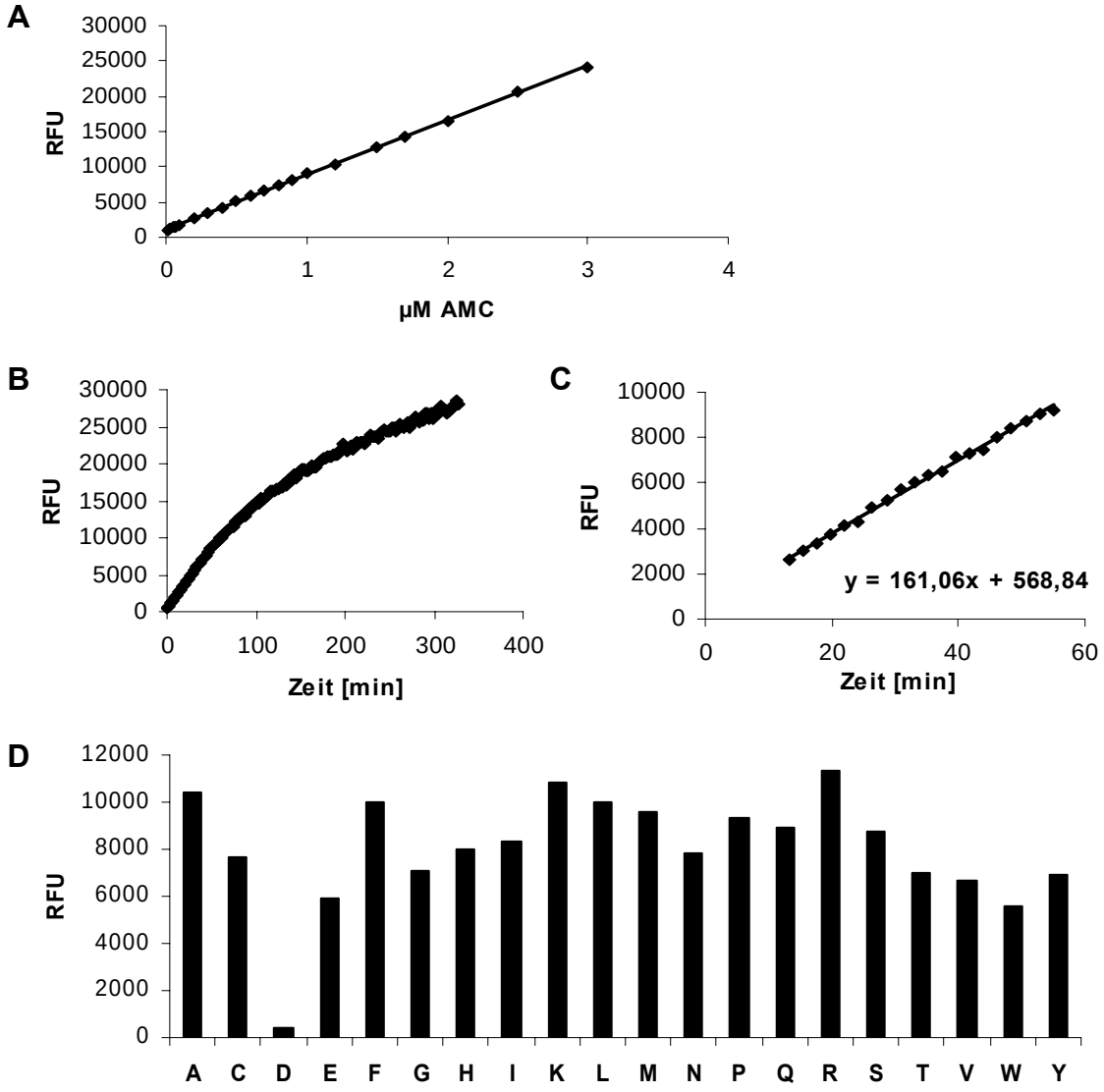


Abbildung 9: Bestimmung und Normalisierung des cytosolischen und endoplasmatischen Substratumsatzes. A) Titration von AMC und Vergleich mit der beobachtbaren Fluoreszenz zur Bestimmung des linearen Messbereiches. **B)** Beispielhafte Substratumsatzkurve von Phenylalanin-AMC durch das RMA-Cytosol über die Zeit. **C)** Beispielhafte Bestimmung der Phenylalanin-Substratumsatzrate des RMA-Cytosols durch Ermittlung der Enzym-Anfangsgeschwindigkeit (entspricht der Steigung der Trendlinie durch den linearen Anfangsbereich eines Umsatz-Zeit-Diagramms). **D)** Gemessene RFUs nach einer Stunde Umsatz aller 20 Aminosäure-AMC-Substrate durch angepasste Volumina an RMA-Cytosol.

Der Umsatz der einzelnen Substrate wurde über die Messung der RFUs (Real Fluorescence Units) bei λ_{Ex} = 360 nm und λ_{Em} = 450 nm in einem Fluoreszenzmessgerät bei 37°C über die Zeit bestimmt. Um Quencheffekte bei den Messungen ausschließen zu können, wurde zuerst der lineare Zusammenhang zwischen Fluoreszenz [RFU] und AMC-Substratkonzentration

[µM] untersucht. Dieser besteht bis zu einem Wert von in etwa 25 000 RFUs, was bei den nachfolgenden Messungen berücksichtigt wurde (Abbildung 9A). Die Umsatzrate für jede Aminosäure entspricht dann der Anfangsgeschwindigkeit (v_0) in einem RFU über Zeit Diagramm (Abbildung 9B,C). Um Messwerte zu erhalten, die im linearen Bereich für das Substrat liegen, wurde soweit möglich ein Cytosolvolumen für jede individuelle Aminosäure verwendet, das einem Substratumsatz von in etwa 10 000 RFUs pro Stunde entspricht (Abbildung 9D).

Für das sehr viel weniger aktive ER wurden dieselben Volumina übernommen, um jegliche Fehler durch Variationen zu vermeiden. Die Umsatzrate [RFU*min^{-1}] wurde zuerst auf das jeweils eingesetzte Volumen normalisiert [RFU*min^{-1}*µl^{-1}] und dann, um verschiedene Messreihen miteinander vergleichen zu können, als Prozentzahl vom Gesamtumsatz dargestellt. Der Gesamtumsatz errechnet sich aus der Summe aller 20 Einzelaktivitäten der Messreihe. Die Prozentzahl jeder einzelnen Aminosäure errechnet sich dann folgendermaßen: % vom Gesamtumsatz = (v_0 [RFUs*µl^{-1}*min^{-1}] der entsprechenden Aminosäure) / ((Σ v_0 [RFUs*µl^{-1}*min^{-1}] aller 20 Aminosäuren der Messreihe) / 100) (Abbildung 10).

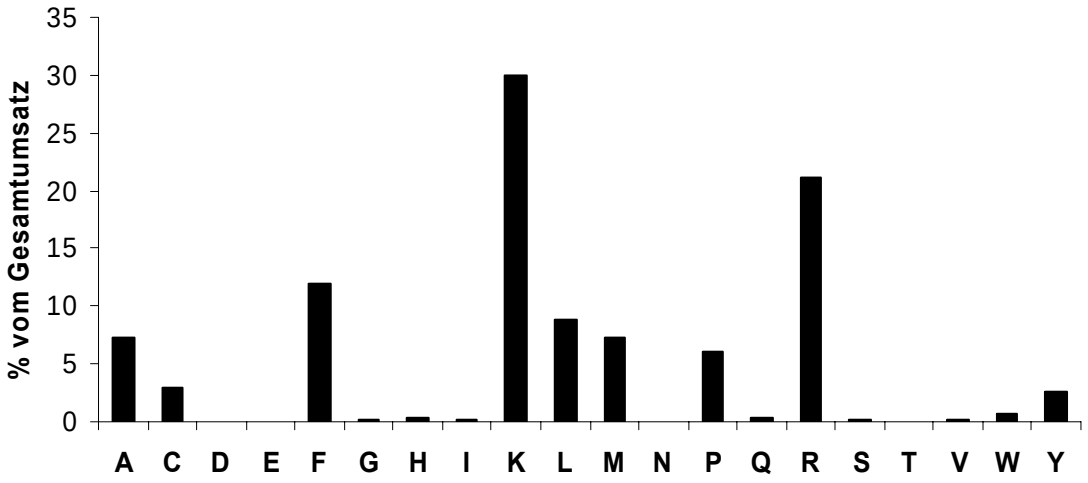


Abbildung 10: Aminopeptidase-Aktivität im Cytosol am Beispiel von RMA. Die Aminosäuren sind nach der Ein-Aminosäure-Nomenklatur sortiert. Die Balken stellen den prozentualen Umsatz jeder einzelnen Aminosäure am Gesamtumsatz dar, sofern alle Aminosäuren in gleichen Mengen vorhanden sind. Somit repräsentieren diese Werte die Präferenz des Cytosols oder ERs für die verschiedenen Aminosäuren.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass Endopeptidasen den Ansatz stören, wurde 20S-Proteasom und TPPII ebenfalls mit den Ein-Aminosäure-Substraten getestet. Obwohl sie ohne Probleme ihre bevorzugten Drei-Aminosäure-Substrate schneiden konnten, war es ihnen unmöglich die entsprechenden Ein-Aminosäure-Substrate abzubauen. Somit bleiben nur noch Aminopeptidasen für deren Umsatz übrig (Abbildung 11A,B).

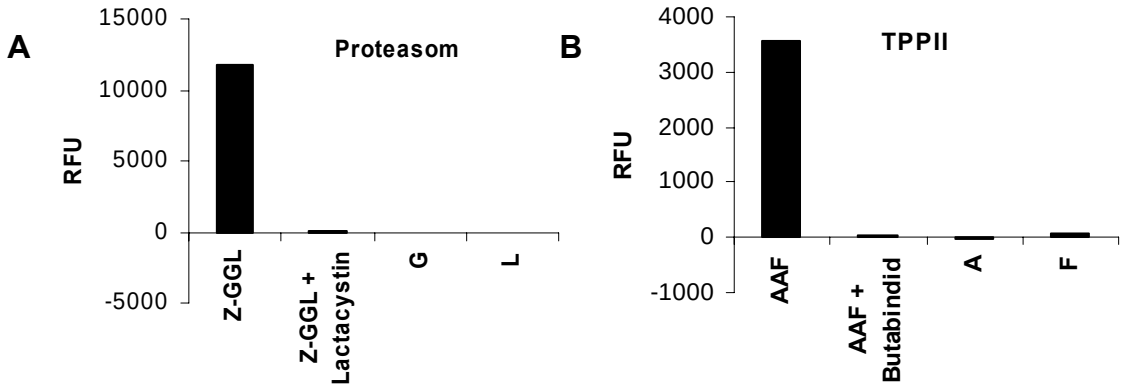


Abbildung 11: Umsatz von Ein-Aminosäure-Substrate durch das Proteasom und TPPII. Schnitt der betreffenden Drei-Aminosäure-AMC-Substrate und der dazu passenden Ein-Aminosäure-AMC-Substrate durch das Proteasom (A) oder durch TPPII (B) in einer Stunde mit oder ohne deren spezifischen Inhibitoren Lactacystin (für das Proteasom) oder Butabindid (für TPPII).

Ein weiterer Vortest für unseren Ansatz war notwendig aufgrund der Problematik, dass nicht sicher geklärt ist, ob jede Aminosäure unabhängig von der vorangegangenen geschnitten wird oder ob einmal an das Peptid gebunden, die Aminopeptidase mit gleicher oder zumindest erhöhter Geschwindigkeit fortschreitet. Um zu zeigen, dass dies nicht der Fall ist, wurde dieser Effekt mittels der fluorogenen Substrate F-βNA, G-βNA und FG-βNA bei der Aminopeptidase PSA (Puromycin-sensitive Aminopeptidase) untersucht.

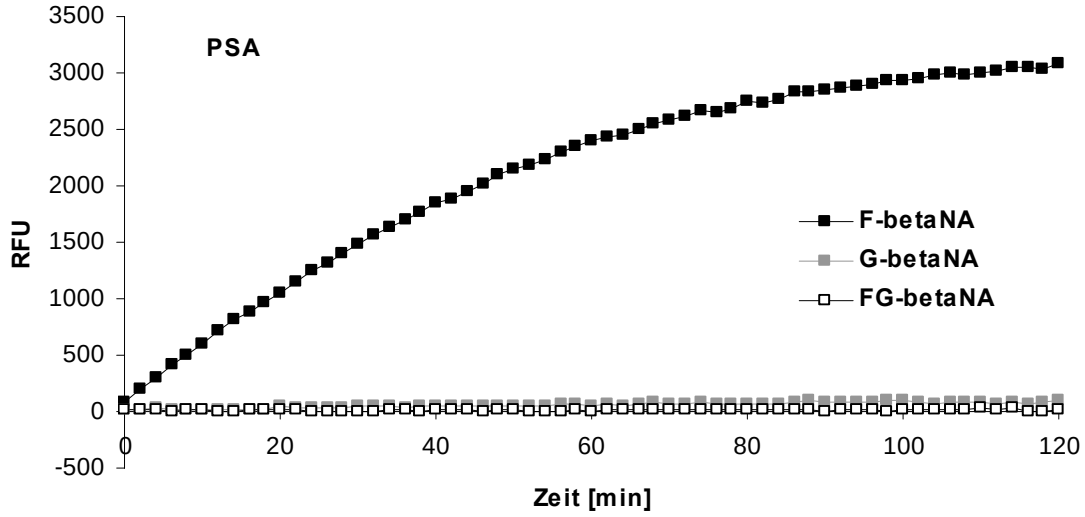


Abbildung 12: Einfluss der Position einer Aminosäure in einem Peptid auf die Schnittgeschwindigkeit. Vergleich der Schnittgeschwindigkeit eines Zweier-Substrates (FG-βNA) mit der der korrespondierenden Einer-Substrate (F-βNA und G-βNA) durch die exemplarische Aminopeptidase PSA.

Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, wird obwohl Phenylalanin stark bevorzugt ist, das Phenylalanin-Glycin-Substrat nicht schneller umgesetzt als Glycin alleine. Daraus lässt sich schließen, dass man für die jeweiligen Umsatzraten einer Aminosäure innerhalb eines Peptids die Werte verwenden kann, die sich aus dem Umsatz der Einer-Substrate ergeben.

Um die durch die Bestimmung der Umsatzraten erhaltenen Aminopeptidasespezifitäten verallgemeinern zu können, wurden insgesamt sieben Zell-Linien verschiedenen Ursprungs getestet, die sehr ähnliche Ergebnisse lieferten (Abbildung 13A,B).

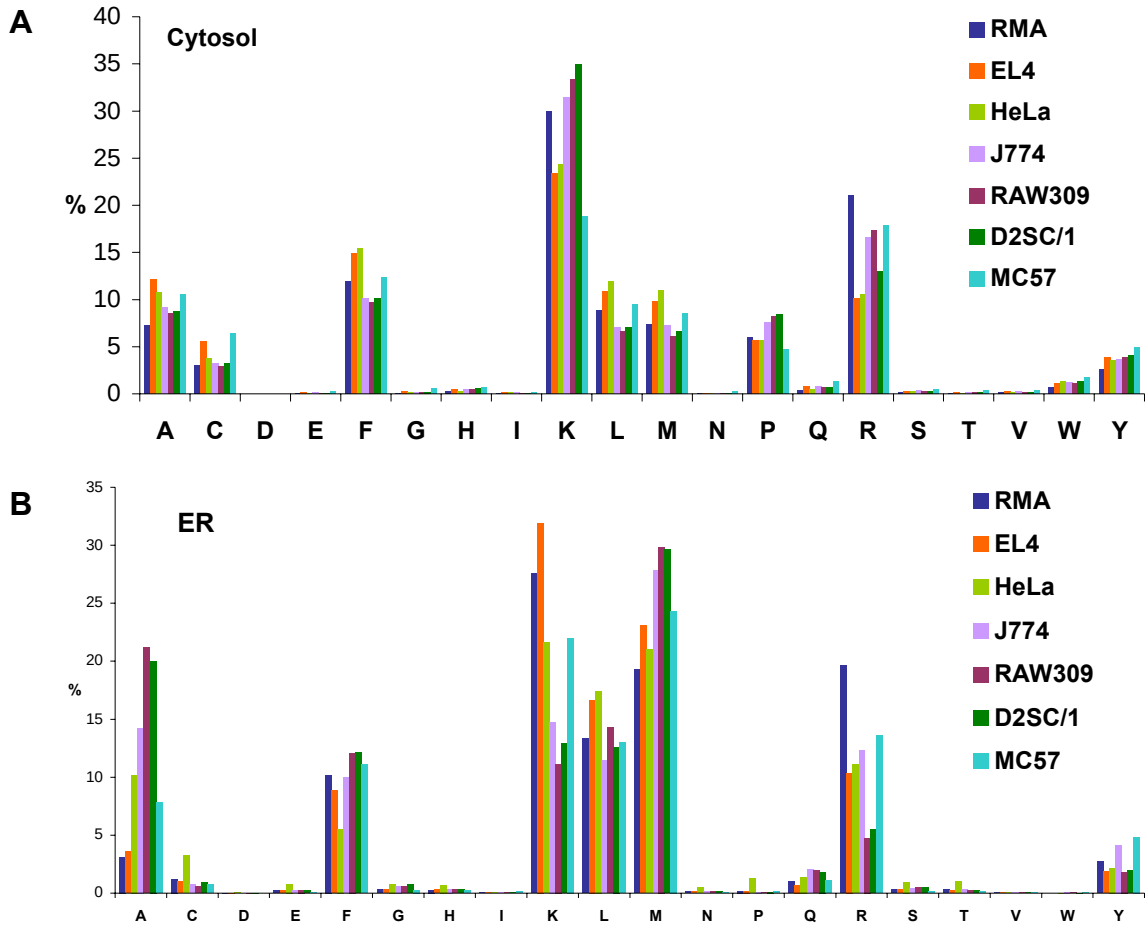


Abbildung 13: Cytosolische (A) und endoplasmatische (B) Umsatzraten für alle 20 Ein-Aminosäure-Fluoreszenz-Substrate in sieben verschiedenen Zell-Linien. Die Umsatzrate für jede individuelle Aminosäure ist dargestellt in Prozent des Gesamtumsatzes, bestehend aus allen 20 addierten einzelnen Aktivitäten eines Satzes. Die genaue Berechnung ist im Methoden-Teil beschrieben. Aminosäuren sind alphabetisch nach dem Ein-Buchstaben-Code sortiert.

Interessanterweise scheint es hierbei keine großen Unterschiede zwischen Menschen und Mäusen zu geben, was man aus der Tatsache schließen kann, dass die humane HeLa-Zell-Linie sich nicht von den Maus-Zell-Linien unterscheidet. Die stärkere Abweichung bei der ER-Messung lässt sich aus den sehr viel kleineren Umsatzraten erklären.

In dem Assay konnte man eine überraschend große Variation in den Umsatzraten für verschiedene Aminosäuren im Cytosol (Abbildung 14A,C) und auch im ER (Abbildung 14B,D) beobachten.

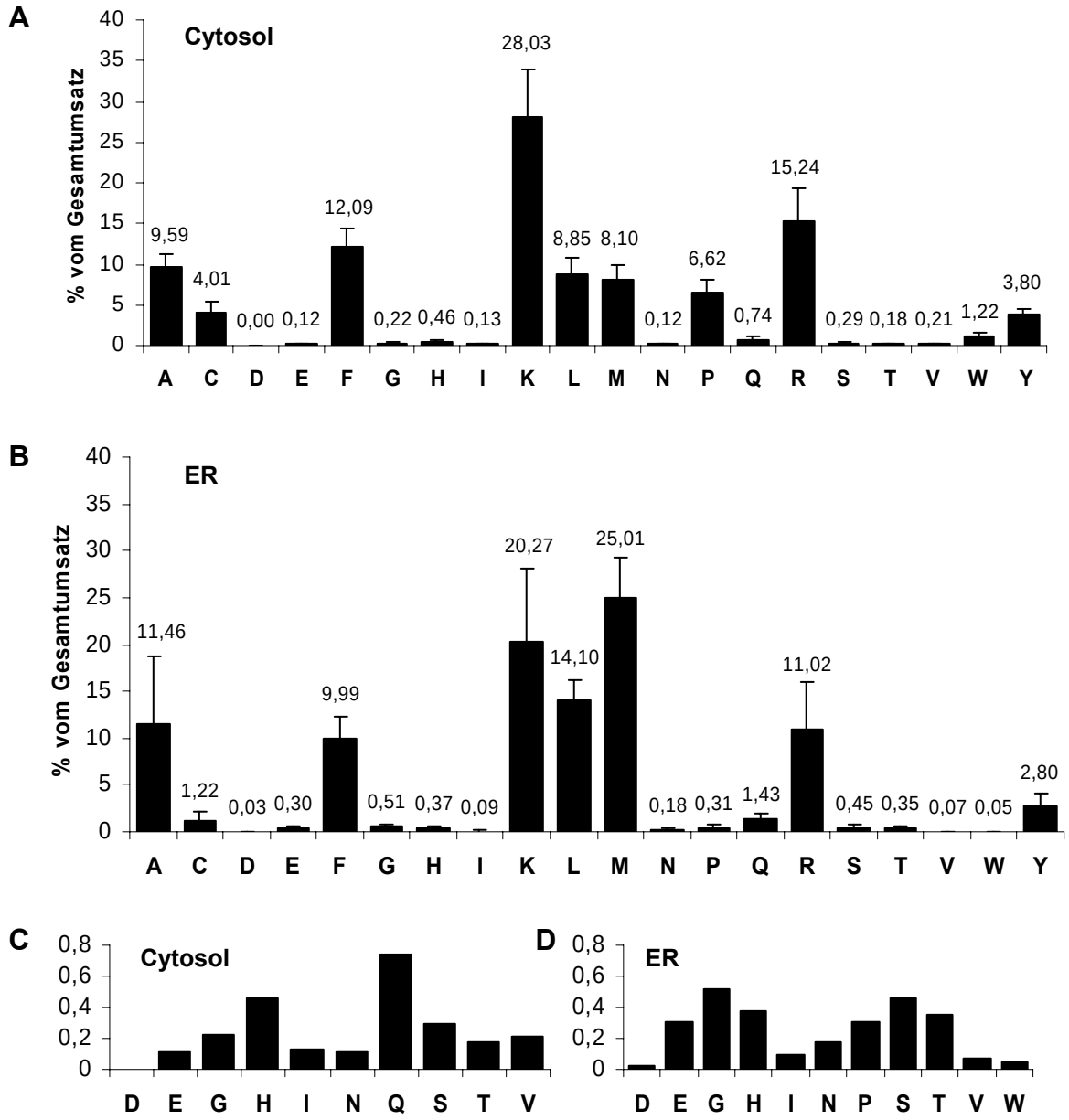


Abbildung 14: Aminopeptidase-Aktivität im Cytosol und im ER. Durchschnittliche cytosolische **(A,C)** oder endoplasmatische **(B,D)** Umsatzraten für alle 20 Aminosäuren, welche die Aminopeptidasespezifität im jeweiligen Kompartiment widerspiegeln. Die Werte basieren auf den Resultaten von sieben verschiedenen Zell-Linien. Der Umsatz für jede einzelne Aminosäure ist dargestellt als prozentualer Anteil am Gesamtumsatz, bestehend aus allen 20 addierten Einzelaktivitäten des Satzes. Die genaue Berechnung ist beschrieben im Methoden-Teil. Die Aminosäuren sind alphabetisch geordnet nach dem Einbuchstabencode. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der sieben Experimente. Die Abbildungen (C) und (D) zeigen nur die Aminosäuren mit Abbauraten unter 1%, um hier kleinere Unterschiede erkennen zu können.

Dies war zuerst überraschend, besonders da man einen gleichmäßigen Umsatz aller 20 Aminosäuren für einen schnellen Peptidabbau erwarten würde. Wenn man jedoch bedenkt, dass jede Aminopeptidase eine gewisse Spezifität hat und dass jedes Kompartiment einen limitierten Satz an Peptidasen besitzt, dann führt dies zwangsläufig zu einer ungleichmäßigen Verteilung an Aktivitäten. Insbesondere die cytosolische Präferenz für die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin, aber auch für die hydrophoben Aminosäuren Alanin, Phenylalanin, Leucin and Methionin ist ausgeprägt. Sogar Prolin, welches chemisch keine Amino- sondern eine Iminosäure ist, stellt ein bevorzugtes Substrat im Cytosol dar. Die

sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat sind unter den am wenigsten bevorzugten, genauso wie die hydrophoben Aminosäuren Glycin, Isoleucin und Valin. Im ER sind basische Aminosäuren auch stark bevorzugt, während die sauren dies nicht sind. Hydrophobe Aminosäuren sind in beiden Kategorien anzutreffen.

Wie erwartet, gab es auch relevante Unterschiede zwischen den cytosolischen and endoplasmatischen Schnittdaten (Abbildung 15).

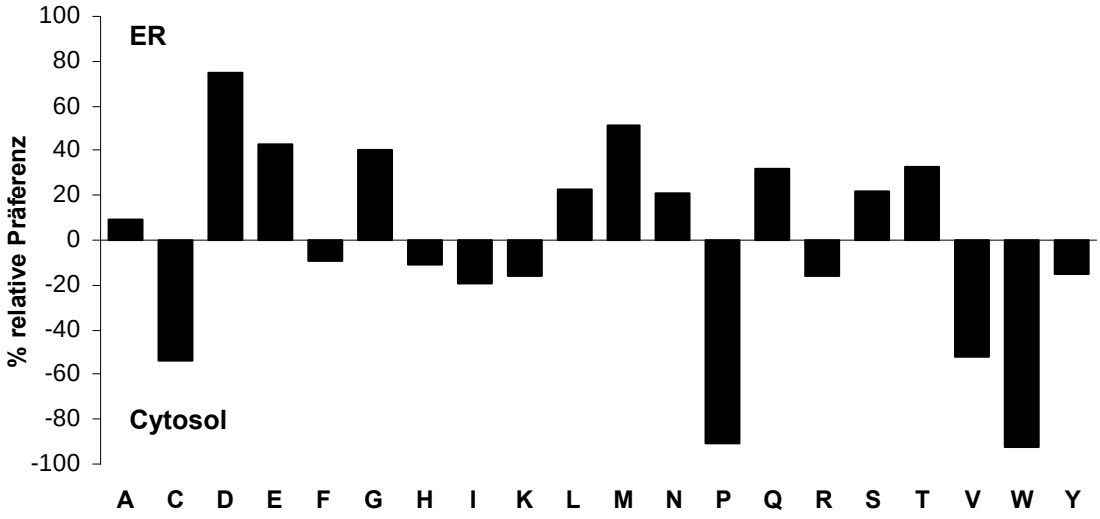


Abbildung 15: Präferenz der cytosolischen und endoplasmatischen Aminopeptidasen für jede Aminosäure. Positive Balken stehen für eine Bevorzugung von endoplasmatischem und negative Balken von cytosolischem Abbau. Für die Berechnung wurden zuerst die prozentualen Umsatzraten aus Abbildung 14 für das Cytosol und das ER normalisiert und miteinander verglichen. Die relative prozentuale Präferenz für jedes Kompartiment ergibt sich aus der resultierenden Differenz, wie beschrieben im Methoden-Teil.

Obwohl manche Präferenzen ähnlich sind, wie die für die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin oder für manche hydrophoben Aminosäuren, wie Phenylalanin und Leucin, lassen sich andere klar unterscheiden. Eines der deutlichsten Beispiele hierbei ist Prolin, welches ein bevorzugtes Substrat im Cytosol darstellt, während im ER so gut wie keine Prolin-spezifische Peptidaseaktivität zu finden ist. Die Abwesenheit der Prolinaktivität in der mikrosomalen Präparation ist ein gutes Maß für die Reinheit dieser Fraktion, besonders da die Aktivität dafür im Cytosol so stark ausgeprägt ist. Eine andere Aminosäure, Tryptophan, ist ebenfalls stark vom Cytosol bevorzugt. Eine gegenläufige Tendenz lässt sich für die Aminosäuren Aspartat und Glutamat erkennen und ebenso für die hydrophobe Aminosäure Methionin, welche alle effizienter im ER abgebaut werden. Diese Differenzen in der Spezifität von cytosolischen und endoplasmatischen Aminopeptidasen sollten ihren Weg in das Prozessierungsmotiv finden.

3.5 Die cytosolische und endoplasmatische Aminopeptidasespezifität beeinflusst das N-terminale Prozessierungsmotiv

Um den Einfluss der Aminopeptidaseaktivitäten auf die MHC-Klasse I-Liganden-Bildung zu klären und folglich auch auf das Prozessierungsmotiv, wurden die Umsatzraten vom Cytosol, vom ER und vom Verhältnis ER zu Cytosol für die verschiedenen Aminosäuren aus den Abbildungen 14 und 15 mit den Aminosäurehäufigkeiten in den N-terminalen Verlängerungen von 885 MHC-Klasse I-Liganden verglichen (Abbildung 16).

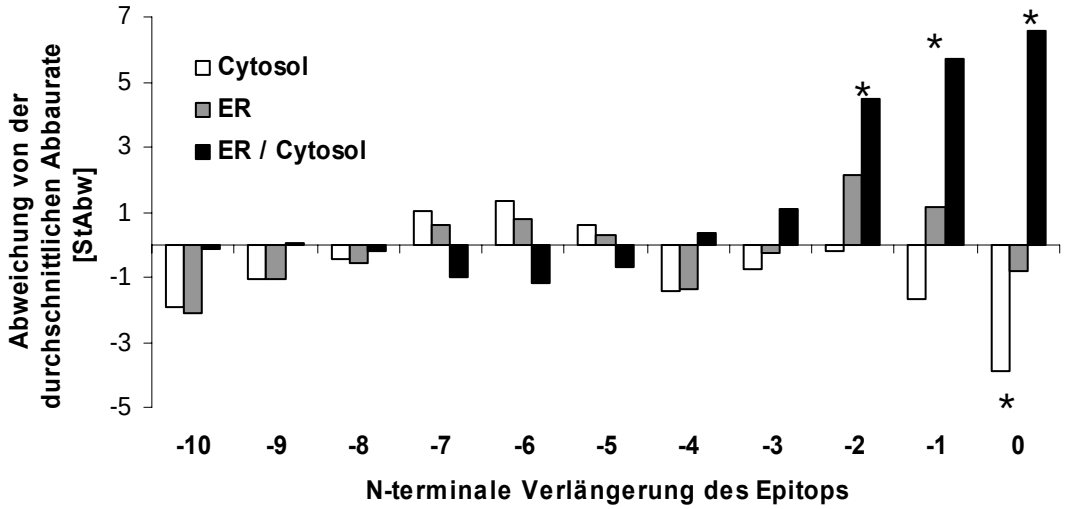


Abbildung 16: Erwartete Aminosäure-Trimmingraten von MHC-Klasse I-Ligandenvorläufern. Basierend auf den Aminopeptidaseaktivitäten, bestimmt durch fluorogene Ein-Aminosäure-Substrate, wurden die durchschnittlichen Umsatzraten ermittelt mit denen Aminosäuren an den Positionen -10, -9, ... -1, 0 upstream des N-Terminus von MHC-Liganden durch Aminopeptidaseaktivitäten des Cytosols, des ERs und des ERs im Vergleich zu denen des Cytosols entfernt werden. Die Umsatzraten sind in Einheiten der Standardabweichung der korrespondierenden Referenzumsatzraten, welche an zufälligen Sequenzpositionen desselben Ausgangsproteins errechnet wurden, angegeben. Weiße Säulen repräsentieren cytosolische, graue endoplasmatische und schwarze das Verhältnis von endoplasmatischen zu cytosolischen Umsatzraten. Werte mit einer statistisch signifikanten Korrelation von $p < 0,01$ sind mit einem Sternchen markiert.

Für die Berechnung des mit der Position d assoziierten Aminopeptidasescores $S_{AP}(d)$ wurden zuerst die experimentell bestimmten Umsatzraten der Aminosäuren an Position d logarithmisiert, um eher einer Normalverteilung zu entsprechen, damit sich die Standardabweichungen berechnen lassen. Außerdem ist dies auch für den weiteren Vergleich sinnvoller, da die proteasomalen Schnitt- und die TAP-Transportvorhersagescores auf logarithmisierten Werten basieren. Nun wurde für jedes Epitop die Häufigkeit der Aminosäuren an jeder einzelnen Position mit der Spezifität der Aminopeptidasen im Cytosol, im ER und im ER gegenüber dem Cytosol verglichen und daraus die Aminopeptidasescores $s_{AP}(d)$ berechnet. Im Anschluss wurde für jede Position d über alle Epitope und damit über alle Scores $s_{AP}(d)$ gemittelt, wobei man den Wert $S_{AP}(d)$ erhält. Dabei handelt es sich um die Durchschnittsscore an einer festen Position. Um eine Aussage über die Signifikanz dieser Werte machen zu können, wurde auch noch der Wert $s_{AP}*$, der Durchschnittsscore an einer zufälligen Position im selben Proteinsatz, bestimmt, der auf dieselbe Weise wie $s_{AP}(d)$ berechnet wurde, nur dass hier keine festen, sondern zufällige Positionen gewählt wurden.

Zur Bestimmung des Mittelwerts S_{AP}* und der Standardabweichung stdev(S_{AP}*) wurde die Berechnung von s_{AP}* 1000fach wiederholt. In dem entsprechenden Plot stellt dann die x-Achse verschiedene Werte für die Position d dar, während die y-Achse den Unterschied zwischen dem Durchschnittsscore an einer festen Position S_{AP}(d) und dem Durchschnittsscore an zufälligen Positionen S_{AP}* in Einheiten der Standardabweichung stdev(S_{AP}*) beschreibt: (S_{AP}(d) - S_{AP}*)/stdev(S_{AP}*).

In Worte gefasst berechnet man also die relative Differenz in den Abbauraten für jede Position eines Peptids, welche abhängig ist von den Aminopeptidasespezifitäten und den Aminosäurehäufigkeiten an dieser Position, und vergleicht sie mit zufälligen Schwankungen im selben Proteinsatz, woraus sich die Signifikanz der Werte schlussfolgern lässt.

Beim Vergleich dieser Werte kann für die Positionen -2 und -1 eine stark signifikant höhere Umsatzrate im ER verglichen mit dem Cytosol gefunden werden ($p < 0{,}0001$). Eine hohe Umsatzrate im ER bedeutet eine effiziente Befreiung des endgültigen Epitops, während eine niedrige Umsatzrate im Cytosol die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass ein Peptid von TAP transportiert wird. Diese Beobachtung legt nahe, dass das letzte Zurechtschneiden der MHC-Klasse I-Ligandenvorläufer an den Positionen -2 and -1 hauptsächlich im ER stattfindet.

Ein weiterer Hinweis für den Einfluss des endoplasmatischen Trimmings auf das Prozessierungsmotiv stammt von der oben genannten Analyse, aus der abgeleitet wurde, dass die Aminosäuren W, I and V, welche weniger häufig an Position -1 vorkommen (Abbildung 7B), nicht effizient getrimmt werden können. Diese drei Aminosäuren sind unter den vier am wenigsten bevorzugten Aminosäuren für Trimming im ER (Abbildung 14) und noch wichtiger, alle drei, aber besonders W, sind nicht bevorzugt im ER im Vergleich zum Cytosol (Abbildung 15).

Von Position -3 an lässt sich kein Einfluss der Aminopeptidasepräferenz auf die Auswahl von Aminosäuren mehr feststellen (Abbildung 16). Zwei Effekte könnten dazu beitragen: Erstens, die Aminopeptidasen in beiden Kompartimenten könnten gleichermaßen für den Abbau von Vorläufern dieser Länge verantwortlich sein. Dies wäre vereinbar mit der Tatsache, dass die TAP-Spezifität das ganze Prozessierungsmotiv abdeckt. Eine zweite mögliche Erklärung ist, dass Endopeptidasen für die Verarbeitung längerer Vorläufer verantwortlich sind, was mit diesem Ansatz nicht erkannt werden kann. Wie oben gezeigt kann das Proteasom irgendwo im N-terminalen Prozessierungsmotiv schneiden und dasselbe gilt wahrscheinlich auch für TPPII (basierend auf seiner Peptidlängenpräferenz). Deshalb ist es weniger wichtig, dass Aminopeptidasen Aminosäuren im Prozessierungsmotiv abschneiden, die weiter entfernt sind vom N-Terminus. Daraus ergibt sich eine verringerte Notwendigkeit für die Selektion von passenden Aminosäuren an diesen Stellen.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Bevorzugung für gewisse Aminosäuren im Prozessierungsmotiv nicht nur auf der Proteasom- und TAP-Spezifität beruht. Aminopeptidasen beeinflussen ebenso seine Zusammensetzung. Dies ist besonders offensichtlich für die letzten zwei Positionen, die dem Liganden-N-Terminus vorangehen, welche eine Präferenz für endoplasmatisches Trimming zeigen.

Interessanterweise lässt sich eine signifikant negative Korrelation des Cytosols und eine signifikant positive Korrelation des ERs gegenüber dem Cytosol mit dem Liganden-N-Terminus feststellen (Abbildung 16). Mögliche Gründe dafür werden im Abschnitt Diskussion erörtert.

3.6 Aminopeptidasen im ER: Ist es nur ERAP1?

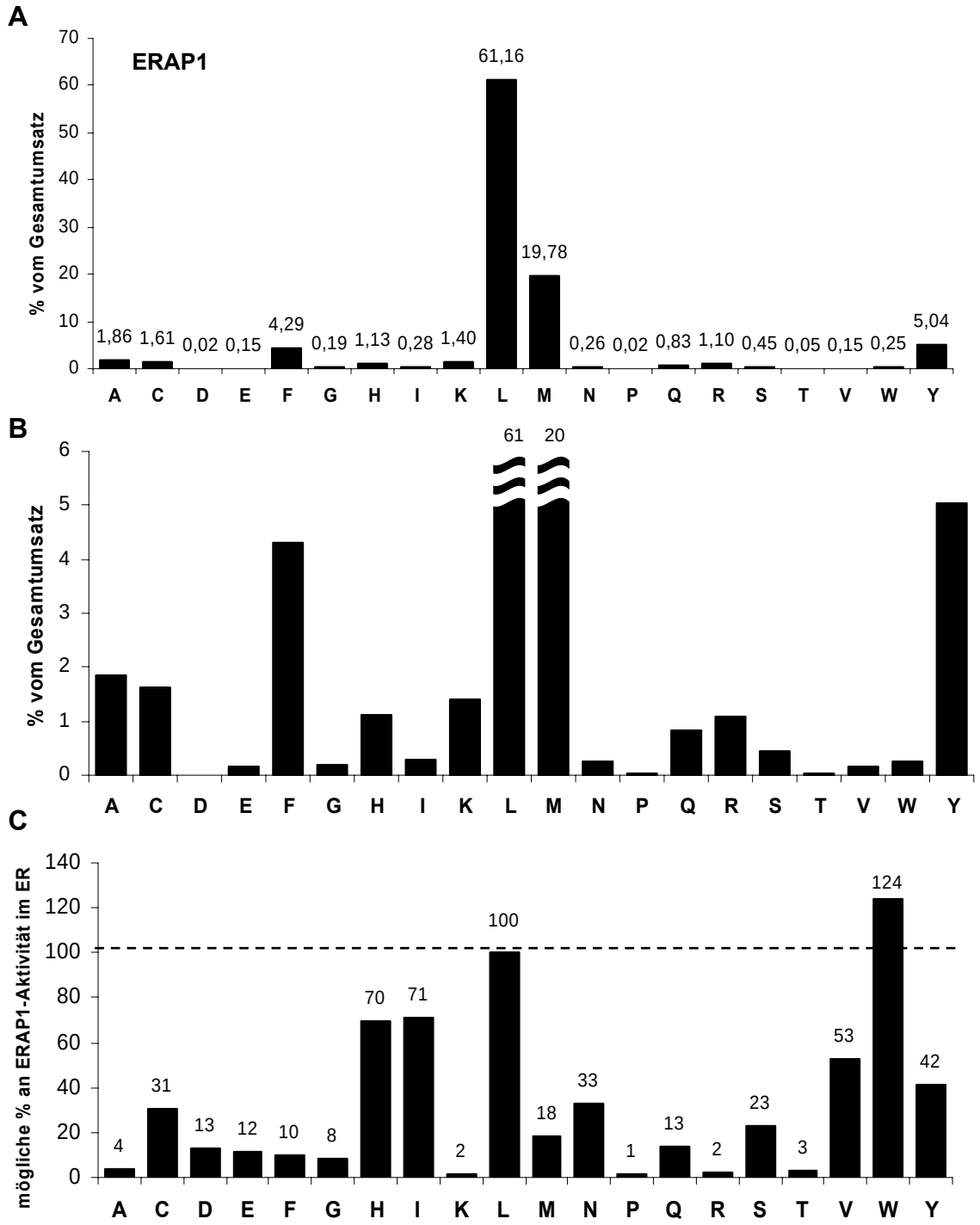


Abbildung 17: ERAP1-Spezifität. A,B) ERAP1-Umsatzraten für alle 20 Aminosäuren. Die Umsatzrate für jede individuelle Aminosäure ist dargestellt als Prozent des Gesamtumsatzes, bestehend aus allen 20 addierten einzelnen Aktivitäten eines Satzes. Die genaue Berechnung ist im Methoden-Teil beschrieben. Aminosäuren sind alphabetisch nach dem Ein-Buchstaben-Code sortiert. In (B) ist dasselbe wie in (A) dargestellt, nur dass die Skala verschoben wurde, um Unterschiede in den kleineren Umsatzbereichen noch erkennen zu können. **C)** ERAP1-Aktivität als Teil der Gesamt-ER-Aktivität in %. Zum Vergleich wurden die ERAP1-Umsatzraten auf der Annahme normalisiert, dass ERAP1 die gesamte Leucin-Aktivität im ER darstellt (Leucin = 100%). Falls es andere Aminopeptidasen geben sollte, die auch Leucin schneiden, dann würde die prozentuale ERAP1-Aktivität im ER für jede Aminosäure dementsprechend niedriger liegen.

Um die Frage nach den relevanten Trimmaktivitäten im ER zu klären, wurde der Anteil von ERAP1, einer endoplasmatischen Aminopeptidase für die als erstes gezeigt werden konnte, dass sie bei der MHC-Klasse I-Liganden-Bildung eine Rolle spielt, näher untersucht. Zur Analyse ihrer Spezifität wurden die Umsatzraten aller 20 Aminosäuren in derselben Art und Weise wie für das Cytosol oder ER gemessen (Abbildung 17A,B). Dieser Datensatz wurde dann mit dem des ERs verglichen, wofür beide Aktivitäten auf die höchste Umsatzrate von ERAP1 (Leucin) normalisiert wurden (Abbildung 17C).

Eindeutigerweise sind diverse Aktivitäten im ER vorhanden, die ERAP1 nicht abdeckt. Falls ERAP1 nicht die einzige Aminopeptidase im ER ist, die Leucin schneiden kann, dann wären die Aktivitäten für die anderen Aminosäuren sogar noch niedriger. Diese Daten liefern einen starken Hinweis auf die Existenz von anderen Aminopeptidasen im ER. Um die Relevanz dieser Aktivitäten für die Antigenprozessierung zu testen, wurde untersucht wie häufig Aminosäuren, die zu diesen zusätzlichen Aktivitäten passen, an der Stelle -1 auftreten. Tatsächlich kann man vier herausragende Aminosäuren in Position -1 finden (Abbildung 7B), für die ERAP1 eine geringe Aktivität im Vergleich zum ER zeigt (Aspartat, Glycin, Glutamin und Arginin) (Abbildung 17C). Diese Beobachtung legt nahe, dass ERAP1 nicht die einzig relevante Aminopeptidase im ER ist, die für das Trimming von MHC-Klasse I-Liganden zu ihrer endgültigen Länge verantwortlich ist. Daraus lässt sich folgern, dass die Spezifität von ERAP1 nicht alleine den selektiven Einfluss des ERs auf das Prozessierungsmotiv bedingt.

Ein weiteres endoplasmatisches Protein, das mit Immunfunktionen verknüpft ist und unter anderem eine Aminopeptidaseaktivität besitzen soll, ist das eher als Chaperon bekannte gp96 (Menoret et al., 2001). Da die Peptidasefunktion wohl nur eine untergeordnete Rolle spielt, wurde diese auch nicht näher untersucht. Abbildung 18 zeigt jedoch, dass gp96 tatsächlich Aminosäuren abbauen kann, wobei es sich in diesem Falle nicht sicher ausschließen lässt, dass die Aktivität auf Verunreinigungen in der Präparation beruht.

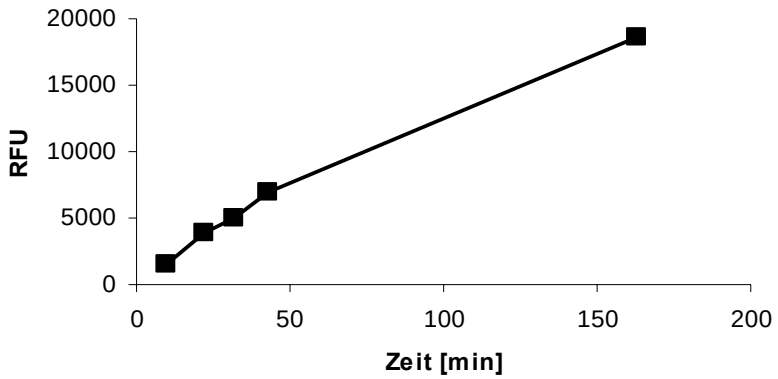


Abbildung 18: Aminopeptidaseaktivität von gp96. Umsatz des Fluoreszenz-Substrates Ala-Ala-Phe-AMC durch gp96 über die Zeit.

3.7 Vergleich der Breitspektrenanalyse mit experimentellen Daten am Beispiel der Prozessierung des murinen Cytomegalovirus pp89 immunodominanten H-2L^d Epitops

Zum Vergleich des kombinierten statistischen und biochemischen Ansatzes mit der Situation *in vivo* wurden die verfügbaren Daten für die Präsentation des murinen Cytomegalovirus pp89 immunodominanten H-2L^d Epitops YPHFMPTNL herangezogen, wofür der exakte Prozessierungsweg bekannt ist. Experimente von Knuehl *et al.* und Peters *et al.* (Knuehl et al., 2001; Peters et al., 2002) zeigen, dass der hauptsächlich vom Proteasom gebildete Vorläufer ein 11-mer ist, welcher als solcher ins ER transportiert wird. Dies passt zum Model vom proteasomalen Schnitt und TAP-Transport innerhalb des Prozessierungsmotivs. Danach wird der 11-mer-Vorläufer weiter im ER verkürzt bis zum endgültigen 9-mer-Epitop. Dies wiederum passt ebenfalls zur Vorhersage vom finalen Trimming der letzten beiden Positionen im ER. Der Vergleich der Primärstruktur des Vorläufers DMYPHFMPTNL mit den entsprechenden Umsatzraten zeigt, dass die letzten zwei Aminosäuren vor dem Epitop (Aspartat und Methionin) bevorzugte Substrate für endoplasmatische verglichen mit cytosolischen Aminopeptidasen darstellen (Abbildung 15):

	← Vorläufer		← Epitop	
	Y	**D**	**M**	**Y**	**PHFMPTNL**
relative Präferenz fürs ER in %	**-15%**	**75%**	**51%**	**-15%**	
bevorzugt im ER prozessiert	**–**	**+++**	**++**	**–**	

Ein weiteres prominentes Beispiel ist das Ovalbumin-K^b-Epitop SIINFEKL. Hier kann man mit ziemlicher Sicherheit davon ausgehen, dass der Vorläufer ESIINFEKL vom Proteasom generiert wird bevor ihn TAP ins ER transportiert. Hier wird ebenfalls im Prozessierungsmotiv geschnitten und die Verlängerung von TAP transportiert. Ebenso wird die letzte Aminosäure im ER geschnitten, wobei sie laut den Aminopeptidase-Daten auch vom ER bevorzugt wird.

Bei diversen anderen Epitopen, bei denen der proteasomale Schnitt nicht bekannt ist und auch nicht der transportierte Vorläufer, lässt sich zumindest zeigen, dass die letzten beiden Positionen auch hier vom ER bevorzugt werden.

Auf weitere Beispiele soll verzichtet werden, da sich die entsprechenden Effekte in der Analyse selbst widerspiegeln.

4 Diskussion

Um einen Einblick in die Bildung des Epitop-N-Terminus im MHC-Klasse I-Prozessierungsweg zu erhalten und damit den Effekt der Prozessierung auf die Ligandenselektion, wurden die Sequenzen von möglichen N-terminalen Verlängerungen von 885 MHC-Klasse I-Liganden analysiert. Dabei wurde ein N-terminales Prozessierungsmotiv mit einer Länge von ungefähr 7 Aminosäuren identifiziert. Dies wiederum stimmt mit schon vormals publizierten Vorläufer-Längenbereichen überein: In einer Studie von Cascio *et al.* (Cascio et al., 2001) wurde das Ovalbuminepitop SIINFEKL hauptsächlich als N-verlängerter Vorläufer mit 1 bis 7 zusätzlichen Aminosäuren nachgewiesen. Reits *et al.* (Reits et al., 2004) zeigte, dass TPPII eine Spezifität für Oligopeptide über 15 Aminosäuren besitzt, woraus sich schließen lässt, dass es Epitope oder Vorläufer erzeugt mit weniger als 16 Aminosäuren, und folglich N-terminale Verlängerungen von bis zu 7 Aminosäuren generiert, wenn man bedenkt, dass der kürzeste MHC-Klasse I-Ligand ein 8-mer ist. Gefunden wurde eine signifikante Anreicherung an vorhergesagten proteasomalen Schnitten bis zu 5 Positionen entfernt vom MHC-Klasse I-Liganden-N-Terminus und eine signifikant bessere vorhergesagte TAP-Transportrate von Vorläufern, die eine Verlängerung von bis zu 8 Aminosäuren besitzen. Letzteres stimmt überein mit der genannten maximalen Länge von Peptiden, die noch effizient von TAP transportiert werden können. Die Bestimmung der Aminopeptidaseaktivitäten gegenüber fluoreszierenden Ein-Aminosäure-Substraten und der Transfer dieser Ergebnisse zum schrittweisen Schnitt von Aminosäuren während der N-terminalen Prozessierung führte zu der Schlussfolgerung, dass endoplasmatische Aminopeptidasen sehr viel effizienter als ihre cytosolischen Gegenspieler im Abtrennen der zwei Aminosäuren direkt vor dem N-Terminus eines MHC-Klasse I-Liganden sind. Dies deutet klar darauf hin, dass die finalen Schritte beim Ligandentrimming im ER stattfinden. Die nichtsignifikanten Werte der Aminopeptidaseaktivität für die Positionen jenseits -2 lassen sich entweder durch die gemeinsame Beteiligung der cytosolischen und endoplasmatischen Aminopeptidasen am Abbau dieser Aminosäuren und/oder durch den Verdau längerer Vorläufer mittels Endopeptidasen erklären.

Die Breitspektrenanalyse ermöglicht auch weitere Einblicke in die Frage, ob MHC-Klasse I-Moleküle zum Schutz des finalen Liganden vor weiterem Abbau notwendig sind. Diverse Studien belegen diesen schützenden Effekt (Falk et al., 1990; Fruci et al., 2001; Brouwenstijn et al., 2001; Paz et al., 1999; Ojcius et al., 1994). Der Vergleich der absoluten cytosolischen und endoplasmatischen Aminopeptidaseaktivitäten mit dem N-Terminus des endgültigen MHC-Klasse I-Liganden (Abbildung 16) zeigt, dass die Aminopeptidasen im Cytosol nicht die N-terminale Aminosäure des MHC-Klasse I-Liganden bevorzugen, womit das Risiko reduziert wird, den Liganden zu zerstören, was gleichzeitig die Chance erhöht, dass dieser das ER durch TAP erreichen kann. Solch ein Effekt lässt sich jedoch im ER nicht feststellen. Eher im Gegensatz dazu zeigt sich, dass die N-terminalen Aminosäuren der Liganden sehr viel stärker von den endoplasmatischen im Vergleich zu cytosolischen Aminopeptidasen bevorzugt werden. Diese Beobachtung unterstützt die Notwendigkeit des Schutzes des Liganden durch MHC-Klasse I-Moleküle. Bei diesem Effekt scheint es sich um eine Art von Qualitätskontrolle für die Selektion von Liganden zu handeln: Aminosäuren, die allgemein am N-Terminus bevorzugt sind, liefern kein effektives Stoppsignal für die Aminopeptidasen im ER. Dieses Stoppsignal könnte stattdessen mittels zweier Mechanismen bereitgestellt werden: Eine Möglichkeit ist die schützende Bindung des fertigen Liganden an das MHC-Molekül. Falls dies nicht schnell vonstatten geht, wird der Ligand zerstört, womit die starke Bindung eines Liganden zu einer Voraussetzung für seine Präsentation wird. Eine andere Möglichkeit ist das Trimming des Vorläufers zu seiner korrekten Größe während der

Ligandenteil schon in der Bindungsgrube des MHC-Moleküls eingebettet ist, wie von Falk *et al.* (Falk et al., 1990) vorgeschlagen wurde. In dieser Schablonenhypothese gibt es keine Notwendigkeit für einen endoplasmatischen, Aminopeptidase-spezifischen Schutz des N-Terminus, da nach der Bindung des Vorläufers das Trimming nicht über einen bestimmten Punkt fortschreiten kann, der alleine durch das MHC-Molekül selbst definiert ist.

Das Ziel dieser Analyse war die Bestimmung der Gesamtaminopeptidaseaktivität des Cytosols und des ERs in verschiedenen Zelltypen. Nun ist weitere Arbeit erforderlich, um die Rolle und den Anteil individueller Proteasen aufzuklären. Während das Proteasom schon sehr gut charakterisiert ist und die Rolle von TPPII immer besser verstanden wird, sind die Substratspezifitäten anderer Proteasen im Cytosol, wie PSA, BH, LAP und TOP, noch weitgehend unbekannt. Dasselbe gilt auch für die Proteasen im ER. Viel Mühe wurde in die Untersuchung von ERAP1 investiert und Studien im Hinblick auf die mögliche Rolle von ERAP2 sind in Arbeit. Die beachtliche Lücke zwischen totaler und ERAP1-spezifischer Aminopeptidaseaktivität legt nahe, dass außer ERAP1 noch andere Peptidasen zum N-terminalen Trimming von MHC-Klasse I-Liganden im ER notwendig sind. Diese Rolle könnte ERAP2 einnehmen, aber auch andere noch nicht identifizierte Aminopeptidasen könnten hierfür verantwortlich sein.

Die Kombination der Ergebnisse dieser Studie mit den gesammelten Daten vieler vorheriger Publikationen führt zu folgendem verbesserten Model für die MHC-Klasse I-Antigenprozessierung (Abbildung 19): Der erste Schritt ist der Abbau von Proteinen durch das Proteasom zu Oligopeptiden mit einer Länge von bis zu 25 Aminosäuren, welche bereits in den meisten Fällen den korrekten C-Terminus besitzen. Proteasomale Schnittstellen können innerhalb oder außerhalb des N-terminalen Prozessierungsmotivs liegen, das durch die Sequenzregion -7 bis -1 vor dem N-Terminus des MHC-Klasse I-Liganden gebildet wird. Oligopeptide mit mehr als 15 Aminosäuren werden wahrscheinlich weiter durch TPPII verkürzt. Somit generiert entweder das Proteasom selbst oder das Proteasom in Zusammenarbeit mit TPPII MHC-Klasse I-Ligandenvorläufer mit N-terminalen Verlängerungen von bis zu 7 Aminosäuren. Vorläufer dieser Länge und darunter können mittels TAP ins ER transportiert werden. Trimming an den Positionen -7 bis -3 kann in beiden Kompartimenten und somit durch cytosolische oder endoplasmatische Aminopeptidasen erfolgen. Aminosäuren an den Positionen -2 und -1 werden hauptsächlich im ER entfernt. Auf diesen letzten Schritt der Prozessierung folgt unverzüglich oder geht einher die MHC-Klasse I-Bindung des Liganden zu dessen Schutz vor weiterem Abbau.

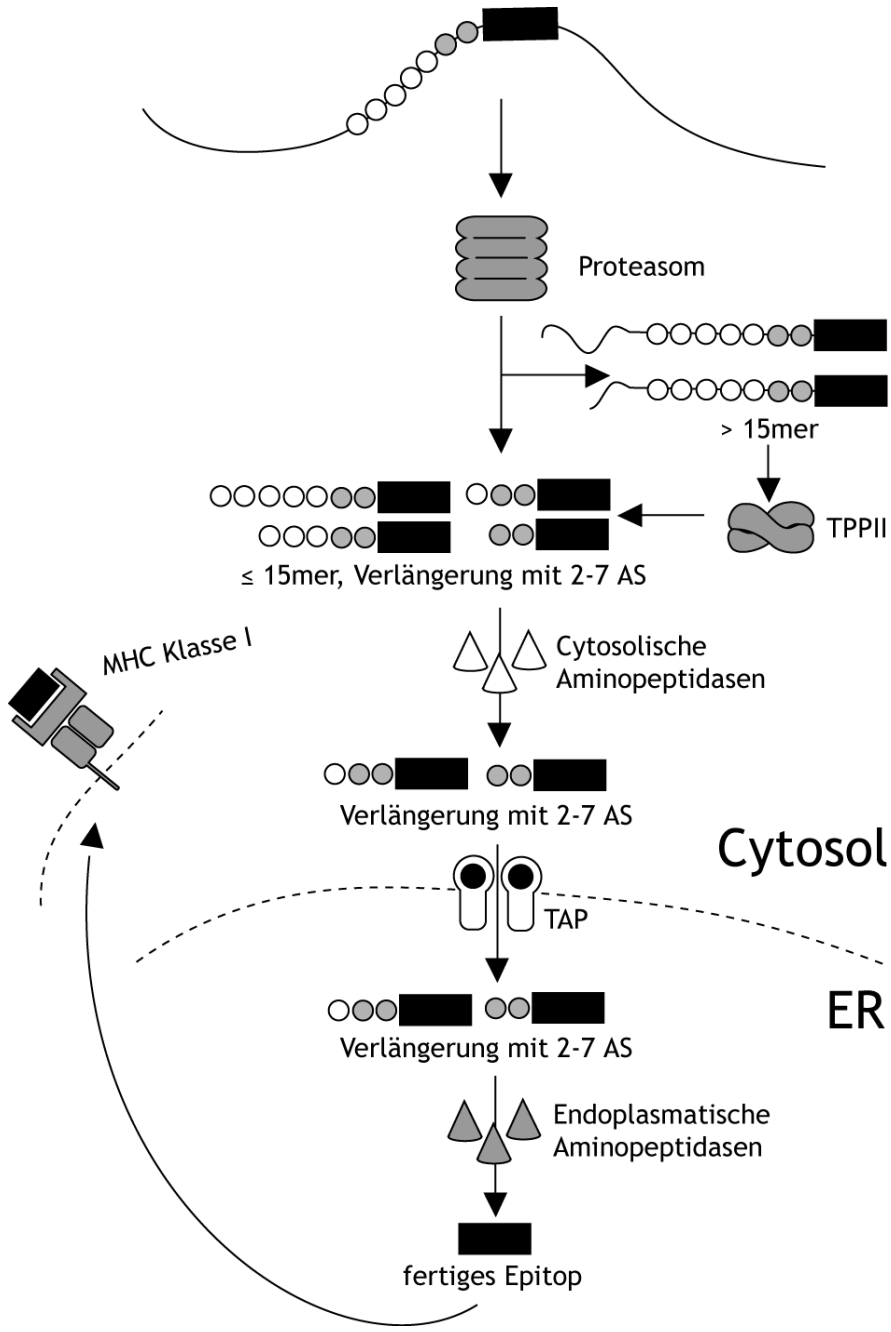


Abbildung 19: Ein Model für den MHC-Klasse I-Antigenprozessierungsweg. Der erste Schritt bei der MHC-Klasse I-Antigenprozessierung ist der Abbau von Proteinen zu kleinern Fragmenten durch das Proteasom mit der Bildung des korrekten C-Terminus. Der N-terminale Schnitt findet innerhalb des Prozessierungsmotivs entweder durch das Proteasom allein oder mit Hilfe von TPPII statt, wobei Vorläufer mit einer Länge von bis zu 15 Aminosäuren und folglich N-terminalen Verlängerungen von bis zu 7 Aminosäuren gebildet werden, wenn man davon ausgeht, dass der kürzeste MHC-Klasse I-Ligand ein 8-mer ist. Weiteres Trimming im Cytosol kann in Abhängigkeit von der Vorläuferlänge und -aminosäurezusammensetzung notwendig sein. Nach dem TAP-Transport ins ER ist Trimming diesmal durch endoplasmatische Aminopeptidasen möglich, was wiederum von den Eigenschaften des Peptids abhängt. In Anbetracht der bisherigen Ergebnisse sollten die Positionen für die Schnittstelle von Endopeptidasen, das Trimming durch Aminopeptidasen und den Transport durch TAP hauptsächlich innerhalb des Prozessierungsmotivs liegen. Die exakte Stelle jedoch ist für jedes individuelle Epitop unterschiedlich. Bei der Mehrzahl der Liganden werden die letzten zwei Aminosäuren vor dem N-Terminus durch endoplasmatische Aminopeptidasen entfernt. Nach oder sogar während den letzten Trimmschritten entgehen die Liganden weiterem Abbau durch Bindung an MHC-Klasse I-Moleküle bevor sie aus dem ER transportiert und an der Zelloberfläche präsentiert werden.

Mit dem Wissen über die Prozessierung des Epitops lässt sich nun eine Optimierung in der Gestaltung eines effektiven Epitopvorläufers erreichen. Obwohl dies ein gewisses Maß an Flexibilität zulässt, sollten einige Regeln befolgt werden (Abbildung 20):

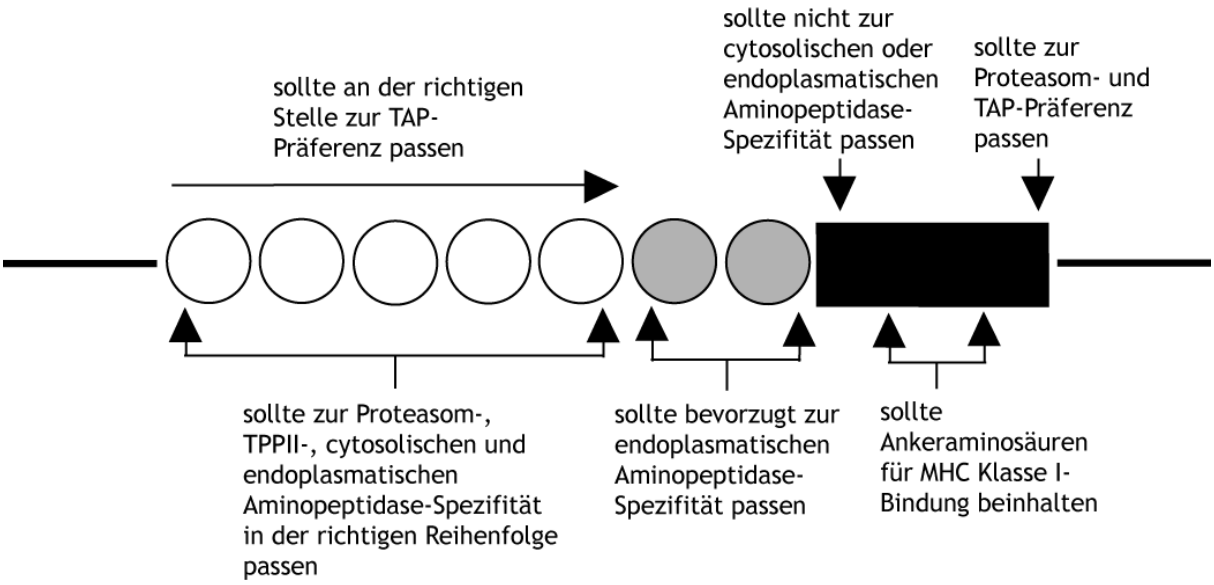


Abbildung 20: Leitfaden zum effektiven Epitopvorläuferdesign. Der schwarze Kasten symbolisiert das finale Epitop, die schwarzen Linien die Aminosäuren vor dem Prozessierungsmotiv und nach dem Epitop. Jede der sieben Aminosäure innerhalb des Prozessierungsmotivs ist als Kreis dargestellt, wobei weiße Kreise Positionen repräsentieren, die gleichermaßen vom Proteasom, von TPPII und von Aminopeptidasen im Cytosol oder ER prozessiert werden und graue Kreise, welche bevorzugt von endoplasmatischen Aminopeptidasen geschnitten werden.

Das letztendliche Epitop betreffend müssen erstens passende Ankeraminosäuren für das korrekte MHC-Klasse I-Allelprodukt vorhanden sein; zweitens muss der C-Terminus gemäß der Proteasom- und TAP-Spezifität ausgewählt werden; und drittens sollte der N-Terminus weder von cytosolischen noch von endoplasmatischen Aminopeptidasen bevorzugt werden, um das Epitope vor schnellem Abbau zu schützen. Die N-terminale Verlängerung betreffend sollten die Aminosäuren an den Positionen -2 und -1 bevorzugt im ER entfernt werden. Die TAP-Spezifität könnte ebenfalls die Auswahl an diesen beiden Positionen beeinflussen wegen deren Abhängigkeit von den ersten zwei bis drei Aminosäuren am N-Terminus. Allerdings kann auch ein stark bevorzugter C-Terminus für einen weniger bevorzugten N-Terminus kompensieren, der geeigneter für endoplasmatische Aminopeptidasen ist. Eine andere Möglichkeit ist die Trennung der TAP- und ER-Aminopeptidase-Spezifität durch den Entwurf eines Vorläufers mit einer TAP-Bindungssequenz weiter oberhalb im Prozessierungsmotiv. Die folgenden Positionen -7 bis -3 sollten im Einklang mit der Idee des Prozessierungsmotivs mit einer bevorzugten Schnittstelle für Proteasom und/oder TPPII erstellt werden. Dann könnten Aminosäuren passend zur cytosolischen Aktivität einbezogen werden mit einer TAP-spezifischen Stelle für den Transport und danach passenden endoplasmatisch-abbaubaren Aminosäuren.

Die Kenntnisse, die mittels der Breitspektrenanalyse gewonnen wurden, sind von Wichtigkeit für die weitere Entwicklung der *in silico*-Identifikation von MHC-Klasse I-Liganden in frei wählbaren Proteinsequenzen. Für einige Schritte des MHC-Klasse I-Präsentationsweges sind sequenzbasierte Vorhersagemodelle schon verfügbar. Dies beinhaltet proteasomale Schnitte

(Holzhutter et al., 1999; Nussbaum et al., 2001; Kesmir et al., 2002), TAP-Transport (Daniel et al., 1998; Brusic et al., 1999; Peters et al., 2003a; Bhasin and Raghava, 2004) und zahlreiche Vorhersagen für MHC-Klasse I-Bindungen (reviewed in (Lund et al., 2002; Nussbaum et al., 2003)). Ein mathematisches Model für die mögliche Beteiligung von Trimmpeptidasen fehlt noch. Die Aminopeptidasedaten könnten helfen diese Lücke zu schließen durch die Erstellung neuer Algorithmen, die die Prozessierung des N-Terminus beinhalten. Dies wäre für das Design von Poly-Epitop-Impfstoffen extrem hilfreich. Die Bedeutung der flankierenden Sequenzen von CTL-Epitopen in einem Multi-Epitop-Vakzin wurde kürzlich von Velders *et al.* (Velders et al., 2001) demonstriert. Hier ist der Vakzin-induzierte Schutz gegen Tumore in Mäusen stark reduziert, wenn keine spezifischen Platzhalter zwischen die einzelnen Epitope gesetzt werden. Die Daten von den Spezifitäten der Trimmproteasen könnte helfen das Design der Linker zwischen den verschiedenen Epitopen zu optimieren, um eine optimale Prozessierung und damit auch eine optimale Epitoppräsentierung zu fördern.

Überleitung

Die Breitspektrenanalyse ermöglicht durch Kombination von biochemischen und biostatistischen Methoden einen gewissen Überblick über die MHC-Klasse I-Antigenprozessierung. Insbesondere die gezeigten Spezifitäten der cytosolischen und endoplasmatischen Aminopeptidasen und deren Einfluss auf die Aminosäurezusammensetzung möglicher Epitopvorläuferpositionen gibt einen detaillierten Einblick in die letzten Trimmschritte eines Standardepitops. Nach dieser Untersuchung der relevanten Trimmspezifitäten durch Mittelung über alle Aktivitäten im Cytosol und ER wäre es nun interessant herauszufinden, aus welchen Komponenten diese zusammengesetzt sind. Somit stellt sich die Frage, wie viele Aminopeptidasen sich in den beiden Kompartimenten an der Prozessierung beteiligen, welche dies im Einzelnen sind und natürlich auch welche dieser Proteasen in bestimmten Fällen für das Trimming verantwortlich sind. Dies lässt sich beantworten durch die Bestimmung aller relevanten Aminopeptidasen, die Charakterisierung ihrer Spezifität und die daraus bestimmbare Möglichkeit zur Vorhersage, ob und von was ein Epitopvorläufer schließlich getrimmt werden kann. Mit diesem Wissen ließe sich relativ einfach mittels spezifischer Aminopeptidaseinhibitoren die Immunantwort beeinflussen. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollen für das Cytosol und auch teilweise für das ER diese Fragen beantwortet werden.

B) Bestimmung aller relevanten Aminopeptidasen im Cytosol und deren Rolle bei der Antigenprozessierung

5 Ergebnisse

5.1 Das Fehlen der beiden cytosolischen Aminopeptidasen PSA und BH im Maussystem ist letal

Verschiedene Aminopeptidasen sind im Cytosol beschrieben worden. Zwei davon sind die Puromycin-sensitive Aminopeptidase (PSA) und die Bleomycin-Hydrolase (BH) für die beide eine mögliche Rolle bei der Antigenprozessierung im MHC-Klasse I-Weg beschrieben wurde. Für beide existieren auch Maus-Knockout-Modelle, die für sich jeweils überlebensfähig sind. Um eine Doppelknockout zu erhalten, wurden die jeweiligen Einzelknockout-Mäuse miteinander gekreuzt (Abbildung 21).

		Anzahl Mäuse	**gefundene Ratio**	**erwartete Ratio**
BH-Zucht				
BH +/- x BH -/- (12)	+/-	7	1,0	1
	-/-	5	0,7	1
BH +/- x BH +/- (28)	+/+	5	1,0	1
	+/-	15	3,0	2
	-/-	8	1,6	1
PSA-Zucht				
PSA +/- x PSA +/- (58)	+/+	24	1,0	1
	+/-	21	0,9	2
	-/-	13	0,5	1
BH/PSA-Doppel-Knockout-Zucht				
BH -/- PSA +/- x BH -/- PSA +/- (64)				
BH -/- PSA	+/+	23	1,0	1
BH -/- PSA	+/-	41	1,8	2
BH -/- PSA	-/-	0	0,0	1
BH +/- PSA -/- x BH +/- PSA -/- (13)				
PSA -/- BH	+/+	3	1,0	1
PSA -/- BH	+/-	10	3,3	2
PSA -/- BH	-/-	0	0,0	1

Abbildung 21: Statistische Verteilung bei der PSA/BH-Doppelknockout-Zucht. Zucht im BH-Knockout-Model mit C57BL/6 BH+/- und BH-/- Mäusen. Zucht im PSA-Knockout-Model mit BALB/c PSA+/- Mäusen. Für die Doppelknockout-Zucht wurden beide Mausstämme miteinander gekreuzt. Zum Erlangen der Doppelknockout-Maus wurden entweder zuerst BH-/- PSA+/- oder BH+/- PSA-/- Mäuse generiert, die dann untereinander gekreuzt wurden. Die Zahl hinter der Zuchtbezeichnung gibt die Anzahl der generierten Mäuse an, die in die jeweilige Statistik eingeflossen sind. In der Tabelle ist zuerst die Anzahl der Mäuse mit dem jeweiligen Genotyp angegeben (bestimmt durch PCR), danach das Verhältnis normiert auf den Wildtyp und schließlich das rechnerisch erwartete Verhältnis.

Für die Einzelknockouts ergibt sich dabei die erwartete Mendelsche Verteilung, eventuell ist bei PSA der Wildtyp bevorzugt. Es scheint jedoch keinerlei Probleme für das Überleben der Mäuse zu geben. Zur Generierung der Doppelknockout-Maus wurden nun entweder zuerst BH-/- PSA+/- Mäuse oder zuerst BH+/- PSA-/- generiert. Diese wurden dann jeweils mit Mäusen desselben Genotyps gekreuzt, womit eine 25% Chance für eine Doppelknockout-Maus besteht. Während das Verhältnis vom Hetero- zum Wildtypgenotyp der Mendelschen Verteilung entspricht, fehlt der Doppelknockout jedoch gänzlich. Dies deutet stark darauf hin, dass die PSA/BH-Doppelknockout-Variante letal ist. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass das Fehlen beider Aminopeptidasen einem Zusammenbruch des Peptidabbaus in den Zellen gleichkommt. Damit akkumulieren Abfallprodukte, die schließlich zum Tod der Zellen führen. PSA und BH könnten hierbei zwei alternative Wege darstellen, die jeweils für den Verlust des anderen kompensieren. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass der letale Effekt im Maussystem auf der Prozessierung einzelner für die Embryonalentwicklung wichtiger Substrate beruht, die alternativ von PSA oder von BH übernommen werden kann.

5.2 Bedeutung der Aminopeptidasen PSA und BH für den cytosolischen Aminosäureabbau

Um nun den tatsächlichen Anteil beider Aminopeptidasen am Peptidabbau zu untersuchen, wurde zu aufgereinigtem Cytosol jeweils eines von 20 fluorogenen Aminosäuresubstraten gegeben und der Umsatz dieser Substrate mit und ohne vorheriger Inhibierung durch Puromycin und E64 in einem Fluoreszenzmeßgerät untersucht (Abbildung 22).

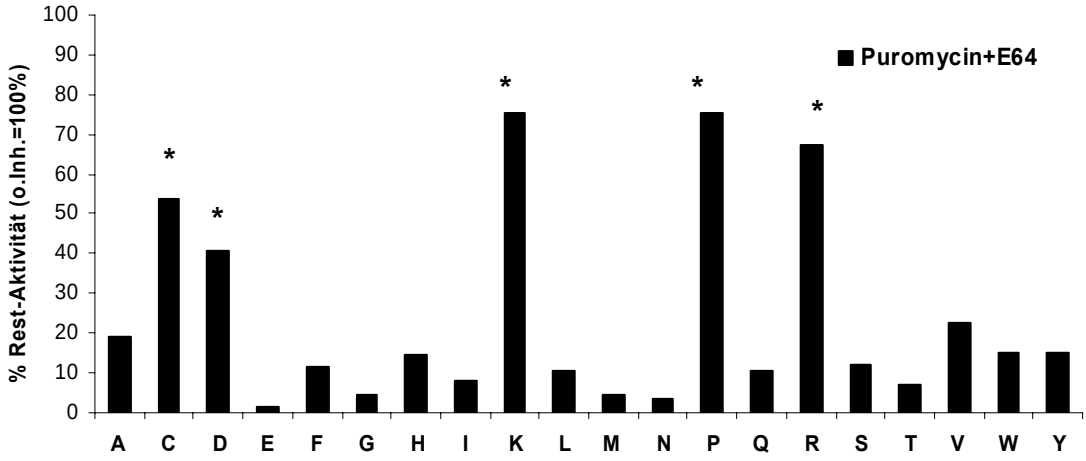


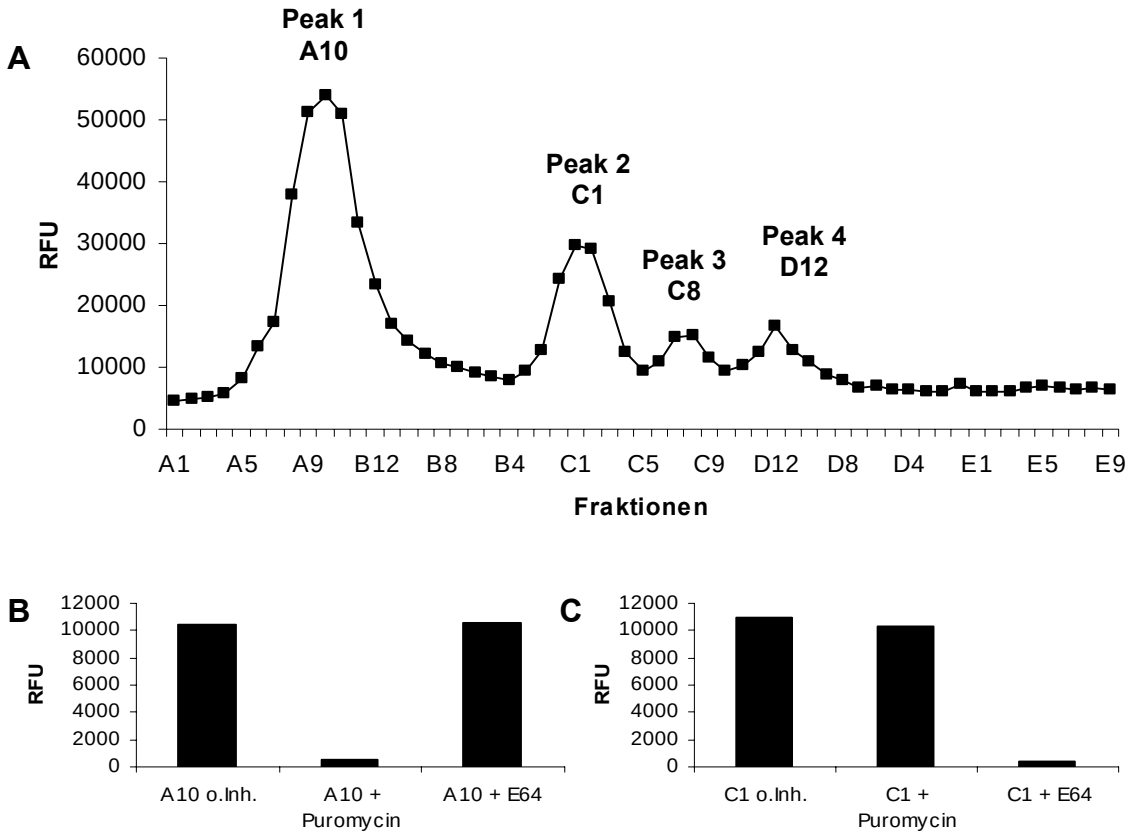
Abbildung 22: Inhibierung der cytosolischen Aktivität durch Puromycin und E64 für alle 20 Ein-Aminosäure-Fluoreszenz-Substrate. Die Umsatzraten aller 20 Ein-Aminosäure-Substrate mit und ohne Puromycin/E64 durch das Cytosol wurden gemessen. Angegeben ist die prozentuale Restaktivität nach der Inhibitorzugabe in Bezug auf jede einzelne Aminosäure. Aktivitäten mit einer Inhibierung von weniger als 75% sind mit einem Sternchen gekennzeichnet. Die Aminosäuren sind alphabetisch nach dem Ein-Buchstaben-Code sortiert.

An dieser Stelle soll nicht näher auf die Spezifität beider Inhibitoren eingegangen werden, da dies in einem späteren Kapitel im Detail geklärt wird, nur soviel, dass Puromycin hauptsächlich die PSA aber auch die BH etwas inhibiert, während E64 hier ausschließlich die BH hemmt. Erstaunlicherweise zeigt sich bei diesem Ansatz, dass PSA und BH tatsächlich den Aminosäureabbau fast vollständig abdecken. Gemittelt über alle Aminosäuren ergibt sich eine Inhibierung von 76%! Einzige Ausnahmen, die sich nicht auf diese Art hemmen lassen,

sind Cystein, Aspartat, Lysin, Prolin und Arginin. Für diese fünf Aminosäuren muss es demnach eine oder mehrere andere Aminopeptidasen im Cytosol geben. Ohne Einbeziehung dieser fünf Aminosäuren ergibt sich sogar eine Hemmung von 89% durch Puromycin und E64. Insgesamt lässt sich aus diesem Ergebnis schließen, dass ohne PSA und BH der Peptidabbau deutlich und im Hinblick auf einzelne Aminosäuren zum Teil fast vollständig eingeschränkt ist. Dies zeigt die große Bedeutung, die diese beiden Proteasen im Cytosol zu haben scheinen.

5.3 Entdeckung von vier Hauptaminopeptidaseaktivitäten im Cytosol

Zur Auftrennung verschiedener Aminopeptidasen wurde zuerst Cytosol aufgereinigt und dieses dann mittels „Hydrophober Interaktions-Chromatographie“ aufgetrennt. Die Aktivitäten in den gesammelten Fraktionen wurden mittels des fluorogenen Substrats Leucin-AMC, welches von vielen Aminopeptidasen bevorzugt wird, visualisiert (Abbildung 23A). Diese Analyse ergab vier klar erkennbare Peaks, von denen Peak 1 durch das entsprechende Inhibitorprofil PSA (inhibiert durch Puromycin) und Peak 2 BH (inhibiert durch E64) zugeordnet werden kann (Abbildung 23B,C). Peak 3 und 4 stellen bisher unbekannte Proteasen dar (Abbildung 23D,E).



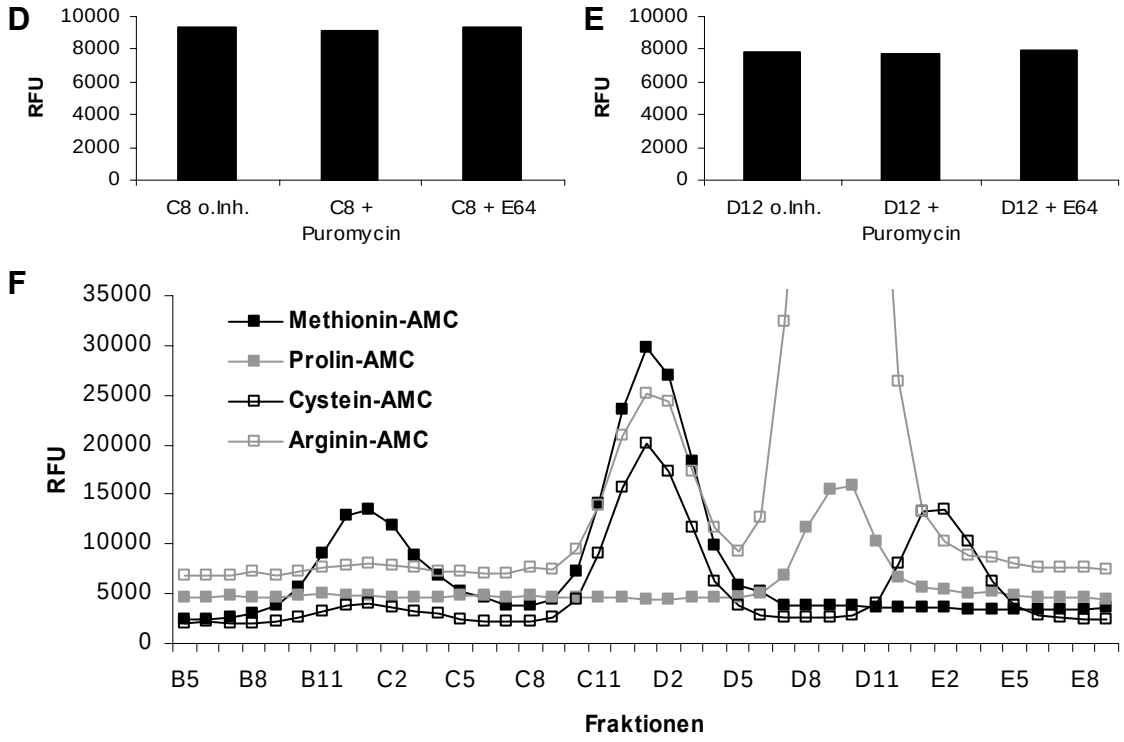
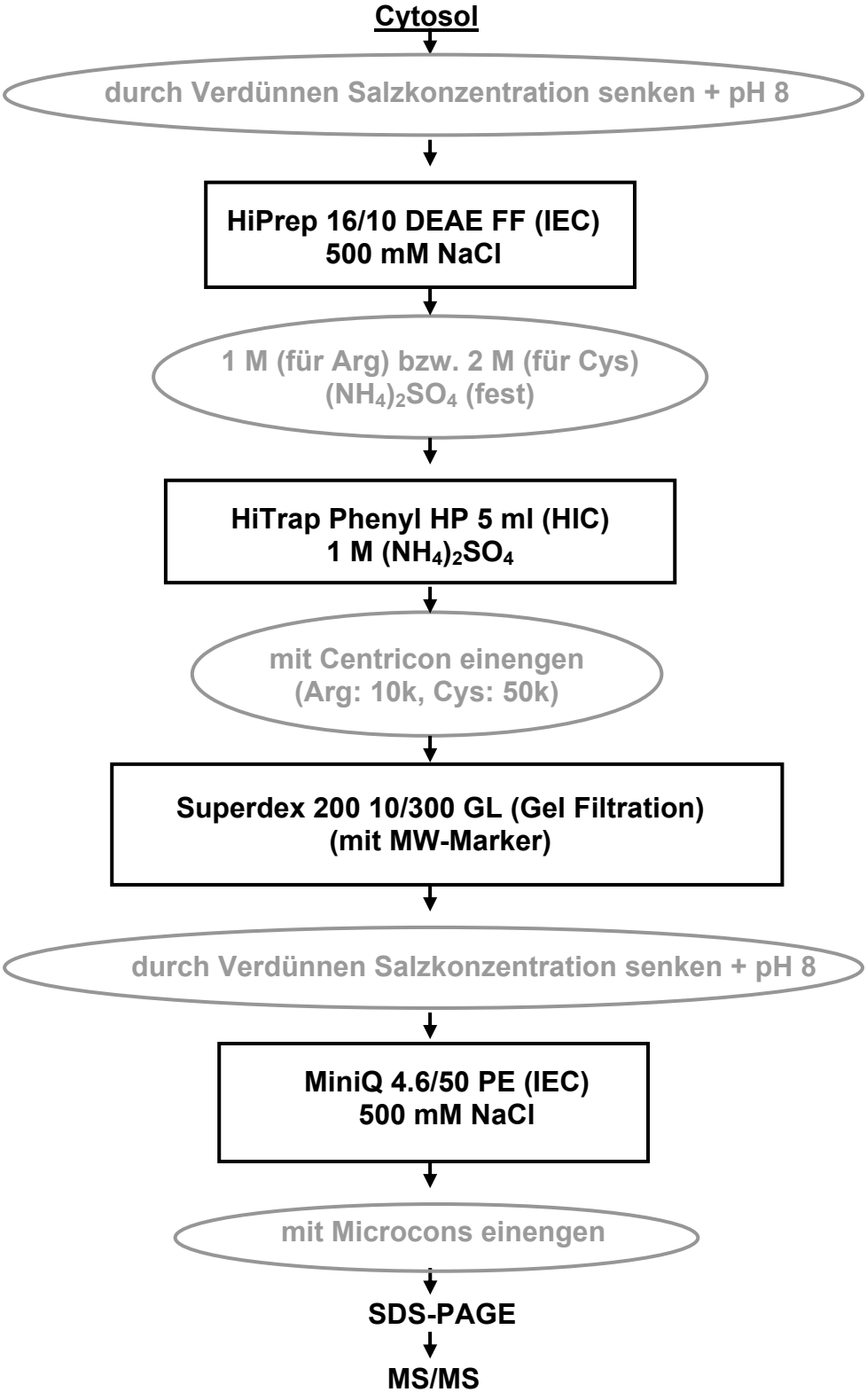


Abbildung 23: Aminopeptidasen nach HIC-Fraktionierung visualisiert mit AMC-Substraten. A) Aufgereinigtes EL4-Cytosol wurde über eine HIC-Säule fraktioniert und die jeweiligen Fraktionen durch Zugabe von Leu-AMC und Fluoreszenzmessung auf ihre Aminopeptidaseaktivität hin untersucht. **B-E)** Analyse der 4 Aktivitätspeaks mit Puromycin und E64 als Inhibitoren für PSA und BH. **F)** Visualisierung der 4 Peaks von einer weiteren HIC-Aufreinigung mit Met-, Pro-, Cys- und Arg-AMC.

Zur weiteren Untersuchung der jeweiligen Aktivitäten wurde Aspartat aufgrund des extrem geringen Umsatzes dieser Aminosäure im Cytosol vorerst vernachlässigt. Zur Analysierung der bisher fehlenden Cystein-, Lysin-, Prolin- und Arginin-Aktivität im Hinblick auf die vier gefundenen Peaks wurde zuerst auf Methionin (als Substrat für PSA und/oder BH, wie aus Abbildung 22 erkennbar) getestet und konnte dem PSA- und BH-Peak zugeordnet werden (Abbildung 23F). Auch hier wurde das Ergebnis noch mal mittels Inhibitorassays bestätigt (Daten nicht gezeigt). Für Cystein stellte sich heraus, dass dies von PSA und BH umgesetzt werden kann, jedoch zu einem großen Teil auch von der Peak 4-Aktivität, die noch zu bestimmen ist. Für Arginin, das hier auch stellvertretend für die ähnliche Aminosäure Lysin verwendet wurde, zeigt sich der Hauptumsatz bei Peak 3. Dasselbe gilt überraschenderweise auch für Prolin. Daraus lässt sich schließen, dass Arginin, Lysin und Prolin fast ausschließlich durch eine gemeinsame Aminopeptidase (Peak 3) abgebaut werden, während Cystein von verschiedenen, aber unter anderem eben auch von einer für sich speziellen Protease (Peak 4) geschnitten wird. Die Fraktionierung über andere Säulen (zwei verschiedene Anionenaustauscher und eine Gelfiltration) lieferten dieselben Ergebnisse im Hinblick auf die gemeinsame Eluierung der Arginin-, Lysin- und Prolin-Aktivität, so dass man sicher von einer gemeinsamen Aminopeptidase ausgehen kann (Daten nicht gezeigt).

5.4 Aufreinigung und Charakterisierung der zwei bisher unbekannten Hauptaminopeptidaseaktivitäten im Cytosol

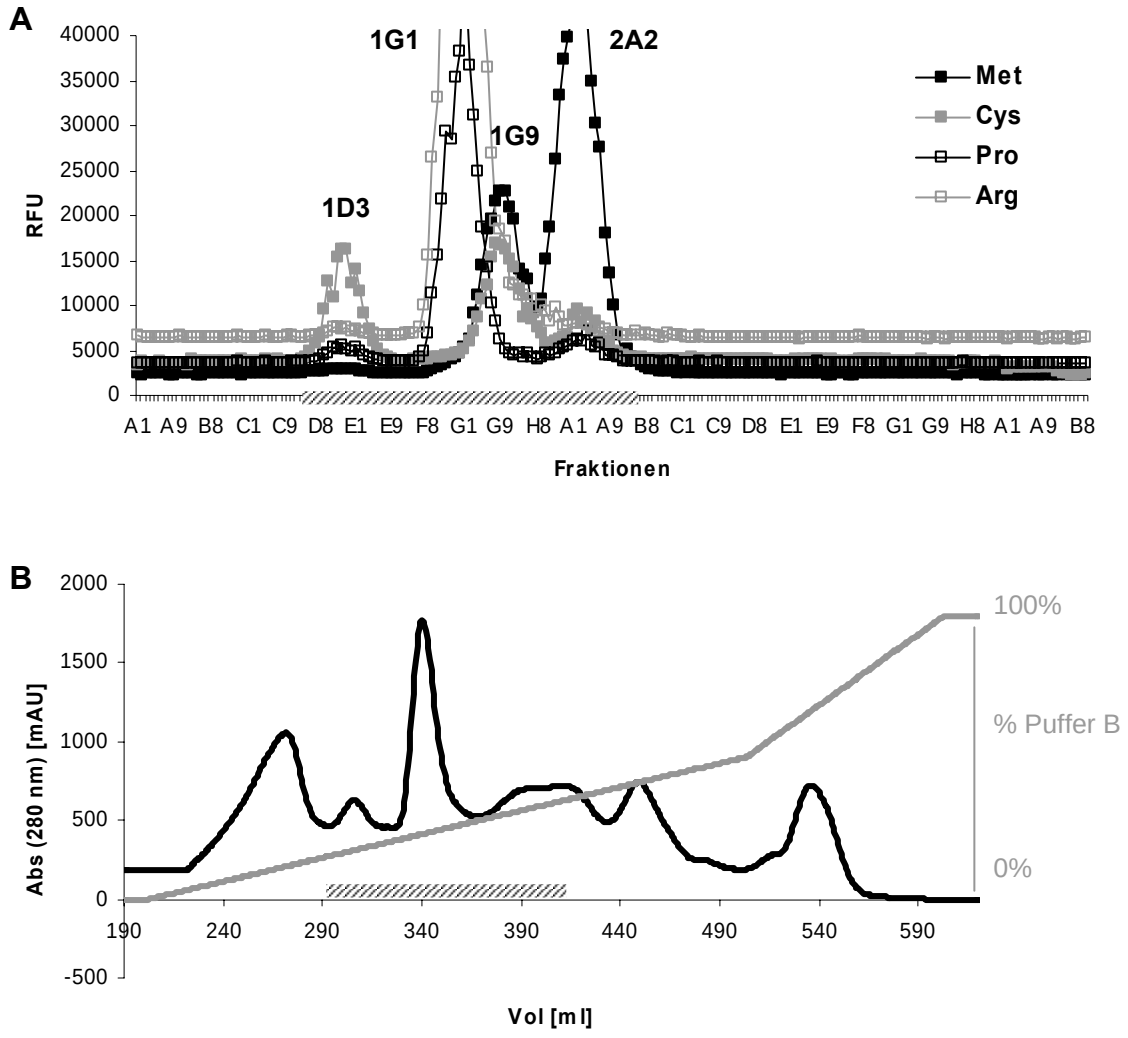
5.4.1 Aufreinigungsstrategie



5.4.2 Aufreinigung der für Arginin, Lysin und Prolin spezifischen Aminopeptidase

5.4.2.1 Anionenaustauscher (DEAE)

Angefangen wurde mit der Aufreinigung des Cytosol wie im Methoden-Teil im Detail erläutert. Dieses wurde dann über einen Anionenaustauscher (DEAE) aufgetrennt (Abbildung 24).



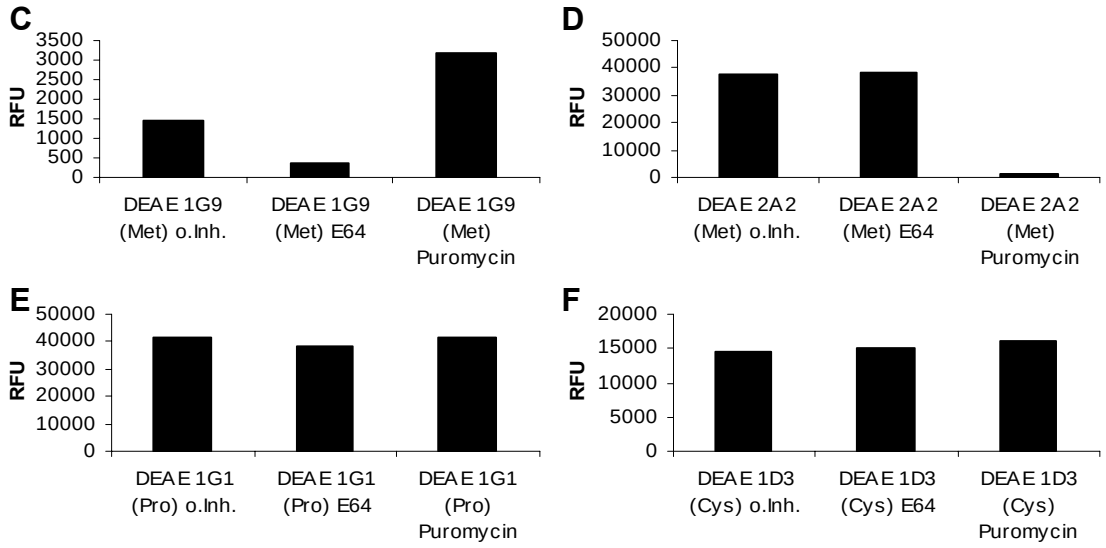


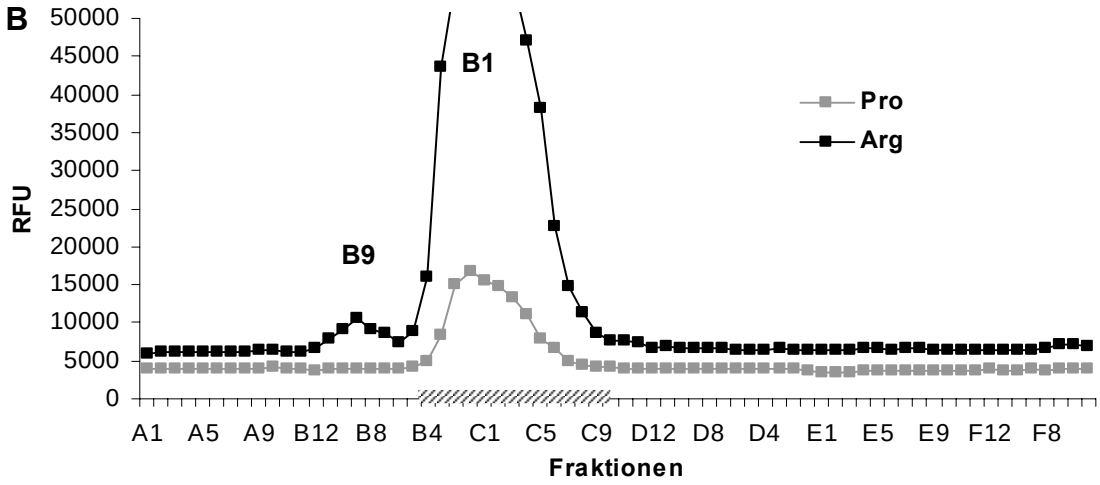
Abbildung 24: IEC (Ion Exchange Chromatography) mit DEAE als Säulenmaterial zur Aufreinigung der Arg/Lys/Pro-Aminopeptidaseaktivität. A) Visualisierung verschiedener Aktivitäten nach der Fraktionierung mit den Fluoreszenz-Substraten Met-AMC, Cys-AMC, Pro-AMC und Arg-AMC. Die vier verschiedenen Peaks sind nach ihren zugehörigen Fraktionen benannt (1D3, 1G1, 1G9, 2A2). **B)** Die schwarze Linie zeigt das Elutionsprofil, gemessen als Absorption bei 280 nm zur Visualisierung von Proteinen. Die graue Linie zeigt den angelegten Gradienten an Puffer B in %. Die geriffelte Linie auf der x-Achse entspricht der geriffelten Linie auf der x-Achse in (A). **C-F)** Inhibitorprofile der vier Peaks zur möglichen Identifizierung der zugehörigen Aminopeptidase.

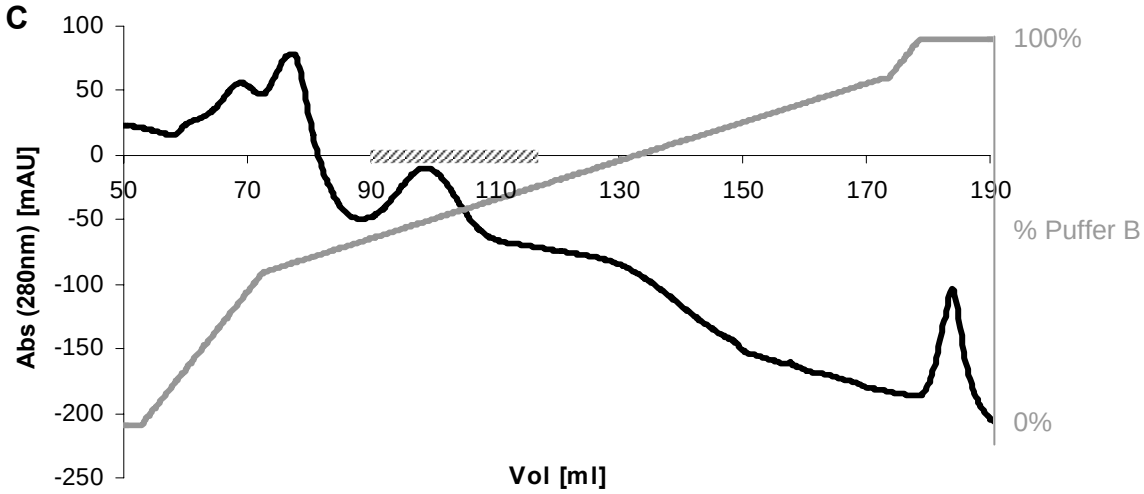
Die entsprechenden Fraktionen wurden mittels verschiedener Substrate auf die Anwesenheit von Aminopeptidasen überprüft (Abbildung 24A). Durch die DEAE-Säule konnte die Cystein-Aktivität (Peak 1 bei 1D3) von allen anderen Proteasen abgetrennt werden. Die folgende Aufreinigung dieser Aminopeptidase wird im nächsten Abschnitt besprochen. Die Aktivität, welche dem Arg/Lys/Pro-Peak entspricht, konnte ebenfalls weitestgehend von den anderen cytosolischen Aktivitäten abgetrennt werden (Peak 2 bei 1G1). Allerdings befindet sich in den entsprechenden Fraktionen noch eine leichte Verunreinigung durch Peak 3 (1G9), der sich durch Inhibitorassays (Abbildung 24C) als BH herausstellte. Der 4. Peak (2A2) entspricht PSA, was ebenfalls durch den entsprechenden Inhibitor nachgewiesen werden konnte (Abbildung 24D). Bei den interessanten Peaks 1 und 2 lässt sich durch Hemmversuche klar ausschließen, dass es sich hierbei um PSA oder BH handelt (Abbildung 24E,F). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide relevanten Aminopeptidasen schon in diesem Schritt sehr gut von anderen Proteasen abgetrennt vorliegen und, wie aus Abbildung 24B erkennbar, auch von vielen anderen Zellproteinen abgetrennt sind.

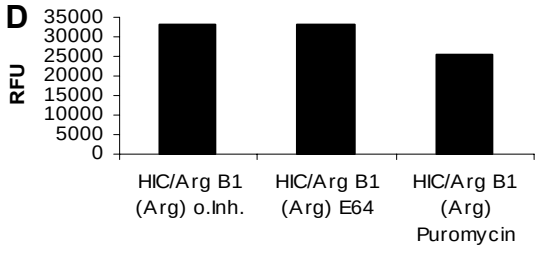
5.4.2.2 Hydrophobe Wechselwirkungs-Chromatographie (Phenyl-Sepharose)

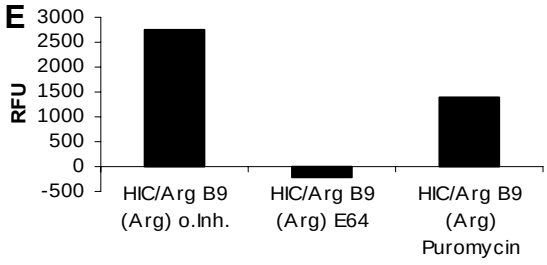
Anschließend an die erste IEC wurden die Fraktionen mit Arg/Pro/Lys-Aktivität vereinigt und mit 1 M Ammoniumsulfat gefällt, so dass die Protease im Überstand zu finden ist und Verunreinigungen im Pellet (Abbildung 25A). Der Überstand wurde dann über Hydrophobe Wechselwirkungs-Chromatographie (Phenyl-Sepharose) weiter aufgereinigt (Abbildung 25).

A
RFU
25000
20000
15000
10000
5000
0
Pellet
Überstand


B
RFU
50000
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
B1
B9
Pro
Arg
A1 A5 A9 B12 B8 B4 C1 C5 C9 D12 D8 D4 E1 E5 E9 F12 F8
Fraktionen


C
Abs (280nm) [mAU]
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-250
50 70 90 110 130 150 170 190
Vol [ml]
100%
% Puffer B
0%


D
RFU
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
HIC/Arg B1 (Arg) o.Inh.
HIC/Arg B1 (Arg) E64
HIC/Arg B1 (Arg) Puromycin


E
RFU
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-500
HIC/Arg B9 (Arg) o.Inh.
HIC/Arg B9 (Arg) E64
HIC/Arg B9 (Arg) Puromycin

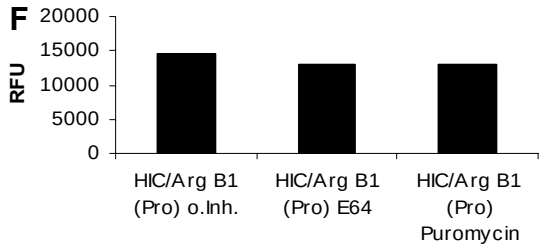
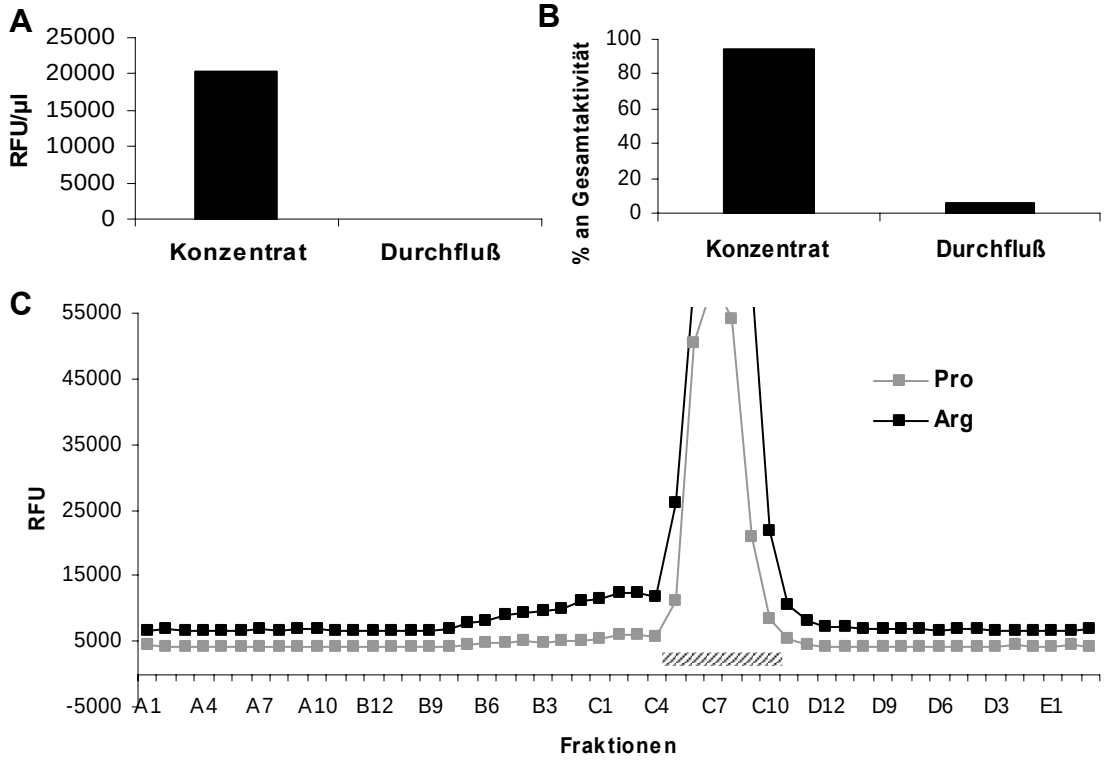


Abbildung 25: HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography) mit Phenyl-Sepharose als Säulenmaterial zur Aufreinigung der Arg/Lys/Pro-Aminopeptidaseaktivität. A) Ammoniumsulfatfällung (1 M) der vereinigten Fraktionen. Messung der Prolin-Aktivität im Überstand und Pellet. **B)** Visualisierung verschiedener Aktivitäten nach der Fraktionierung mit den Fluoreszenz-Substraten Pro-AMC und Arg-AMC. **C)** Die schwarze Linie zeigt das Elutionsprofil, gemessen als Absorption bei 280 nm zur Visualisierung von Proteinen. Die graue Linie zeigt den angelegten Gradienten an Puffer B in %. Die geriffelte Linie auf der x-Achse entspricht der geriffelten Linie auf der x-Achse in (B). **D-F)** Inhibitorprofile des Haupt- (B1) und Nebenpeaks (B9).

Dadurch lässt sich auch noch der letzte Rest an BH von der Arg/Lys/Pro-Aminopeptidase abtrennen, wie aus dem Aktivitätsprofil (Abbildung 25B) und den zugehörigen Inhibitortests (Abbildung 25D-F) erkennbar ist.

5.4.2.3 Gelfiltration

Die vereinigten und dann mittels Centricon aufkonzentrierten Fraktionen aus dem vorigen Schritt (Abbildung 26A,B) wurden jeweils einer Gelfiltration (Superdex 200) unterzogen (Abbildung 26).



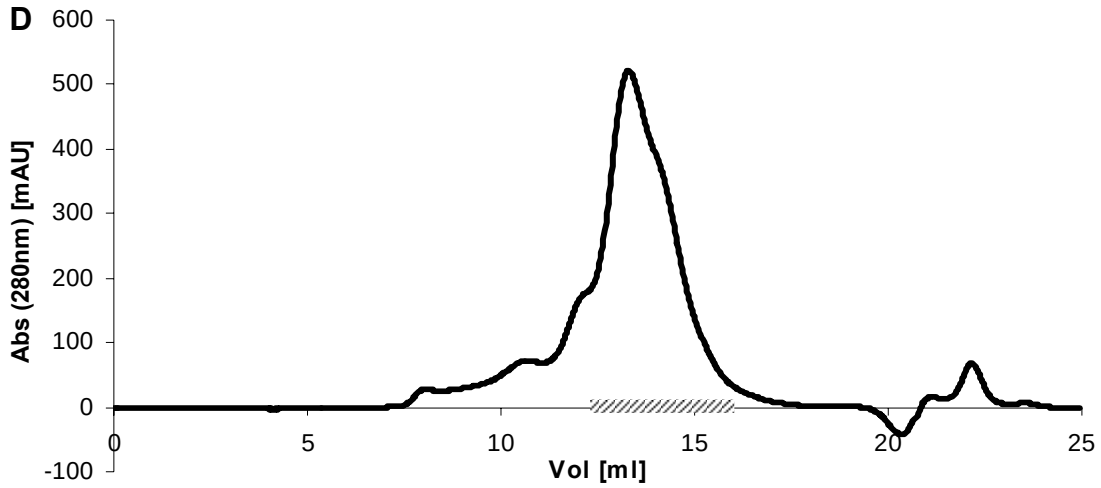
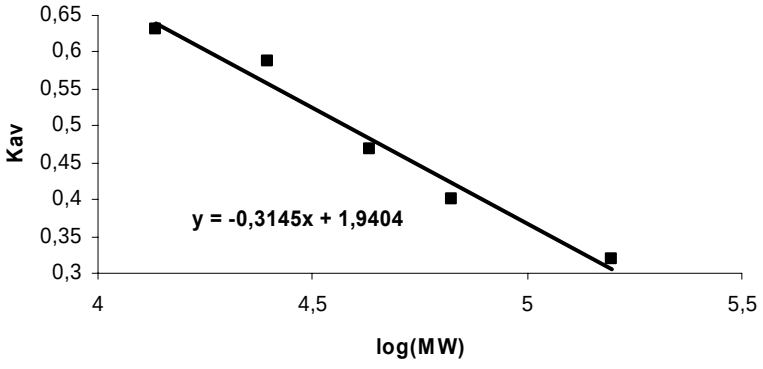


Abbildung 26: Gelfiltration mit einer Superdex 200 - Säule zur Aufreinigung der Arg/Lys/Pro-Aminopeptidaseaktivität. A) Aufkonzentration der relevanten vereinigten Fraktionen aus dem vorigen Schritt mittels eines 10 kD-Centricons. Messung der Aktivität durch Pro-AMC im Konzentrat und Durchfluss. **B)** Prozentuale Menge der Arg/Lys/Pro-Aminopeptidase im Konzentrat und Durchfluss. **C)** Visualisierung verschiedener Aktivitäten nach der Fraktionierung mit den Fluoreszenz-Substraten Pro-AMC und Arg-AMC. **D)** Die schwarze Linie zeigt das Elutionsprofil, gemessen als Absorption bei 280 nm zur Visualisierung von Proteinen. Die geriffelte Linie auf der x-Achse entspricht der geriffelten Linie auf der x-Achse in (C).

Ein Vorteil der Gelfiltration besteht darin, dass dadurch nicht nur ein Protein weiter aufgereinigt, sondern auch noch dessen ungefähres Massengewicht bestimmt werden kann. Dies lässt sich erreichen durch entsprechende Läufe mit verschiedenen Massenmarkern. Dabei ergibt sich für die Arg/Lys/Pro-Aminopeptidase eine geschätzte Masse von ungefähr 75 kDa (Abbildung 27).

	MW [Da]	Ve [ml]	Kav	log(MW)
Aldolase	158000	12,83	0,32	5,20
Albumin	67000	14,13	0,40	4,83
Ovalbumin	43000	15,20	0,47	4,63
Chymotrypsinogen A	25000	17,05	0,59	4,40
Ribonuclease A	13700	17,77	0,63	4,14

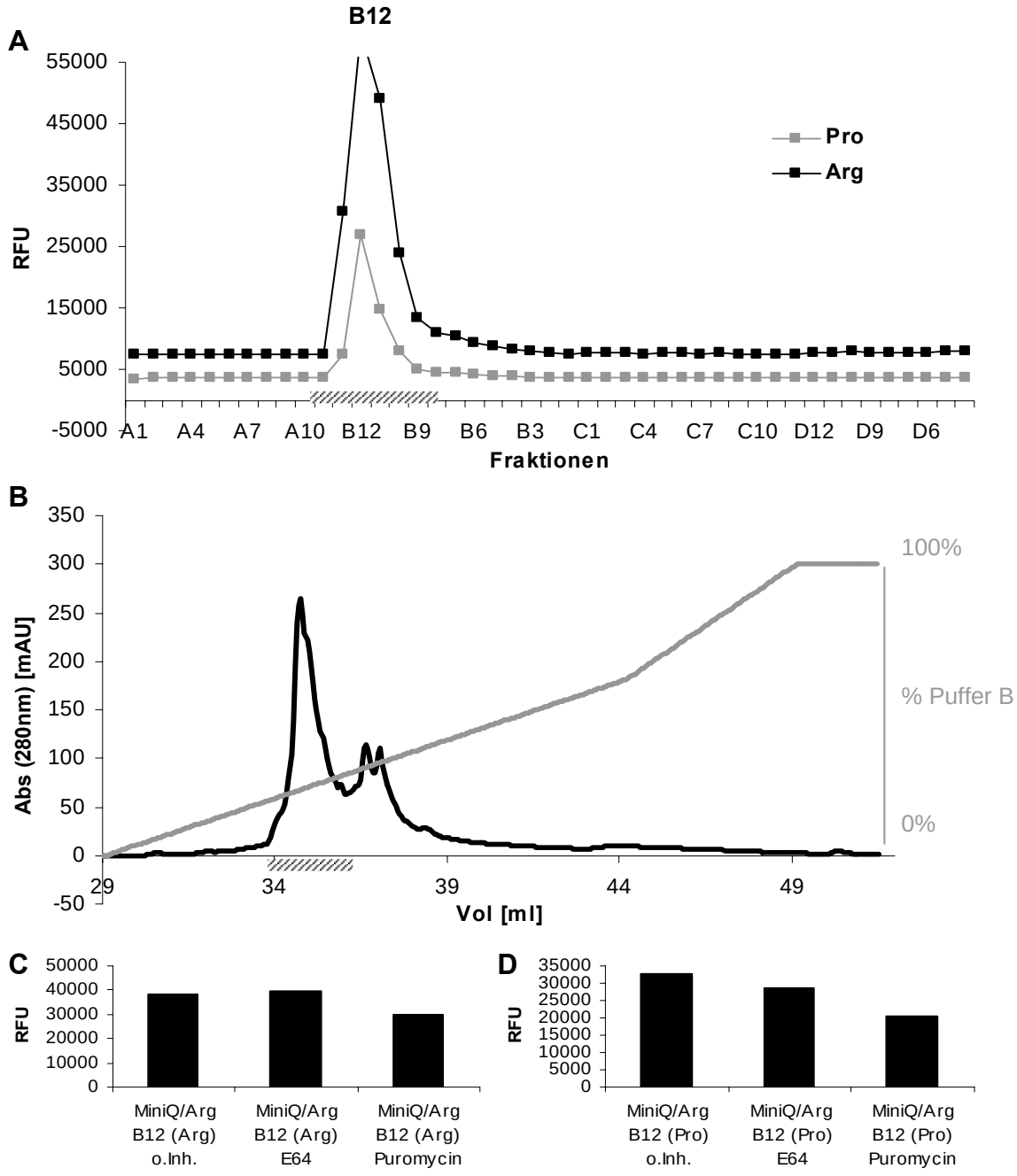


	Ve [ml]	Kav	log(MW)	MW (Da)	MW (kDa)
Arg/Lys/Pro-Aminopeptidase	14,25	0,41	4,87	74103	74

Abbildung 27: Massengewichtsbestimmung der nativen Arg/Lys/Pro-Aminopeptidaseaktivität durch Gelfiltration. Als Marker wurden Aldolase (158 kD), Albumin (67 kD), Ovalbumin (43 kD), Chymotrypsinogen A (25 kD) und Ribonuclease A (13,7 kD) verwendet und deren Elutionsvolumen (Ve) gemessen. Über die Formel Kav = (Ve-Vo)/(Vt-Vo) und das entsprechende Kav/log(MW)-Diagramm lässt sich dann die Masse der Aminopeptidase ungefähr bestimmen. Festwerte der S200-Säule: Vo = 7,81 ml und Vt = 23,562 ml.

5.4.2.4 Anionenaustauscher (Q)

Als letzter Reinigungsschritt wurde eine sehr hoch auflösende Anionenaustauscher-Säule (MiniQ) verwendet (Abbildung 28).



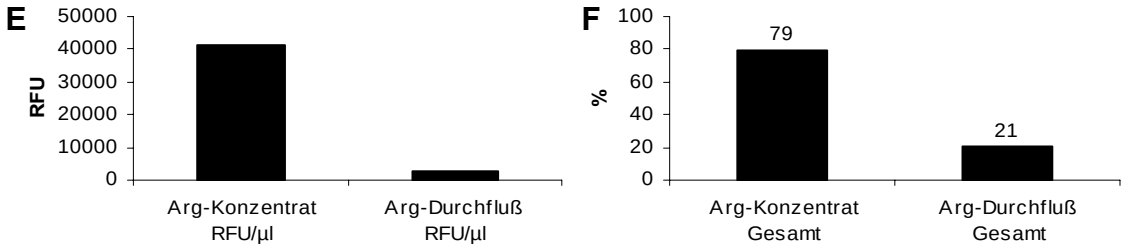


Abbildung 28: IEC (Ion Exchange Chromatography) mit Q als Säulenmaterial und hochauflösenden Mini-Beads (MiniQ) zur Aufreinigung der Arg/Lys/Pro-Aminopeptidaseaktivität. A) Visualisierung verschiedener Aktivitäten nach der Fraktionierung mit den Fluoreszenz-Substraten Pro-AMC und Arg-AMC. **B)** Die schwarze Linie zeigt das Elutionsprofil, gemessen als Absorption bei 280 nm zur Visualisierung von Proteinen. Die graue Linie zeigt den angelegten Gradienten an Puffer B in %. Die geriffelte Linie auf der x-Achse entspricht der geriffelten Linie auf der x-Achse in (A). **C,D)** Inhibitorprofil des Peaks. **E)** Aufkonzentration der relevanten vereinigten Fraktionen mittels eines YM-10 Microcons. Messung der Aktivität durch Arg-AMC im Konzentrat und Durchfluss. **F)** Prozentuale Menge der Arg/Lys/Pro-Aminopeptidase im Konzentrat und Durchfluss.

Für die Arg/Lys/Pro-Aminopeptidase wurde der Aktivitätspeak und umliegende Fraktionen getrennt vereinigt und mittels eines YM-10 Microcons aufkonzentriert (Abbildung 28E,F).

5.4.2.5 SDS-PAGE und Zink-Färbung

Ein Teil dieser vereinigten Fraktionen wurde auf ein Gel aufgetragen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Zn-Färbung sichtbar gemacht (Abbildung 29).

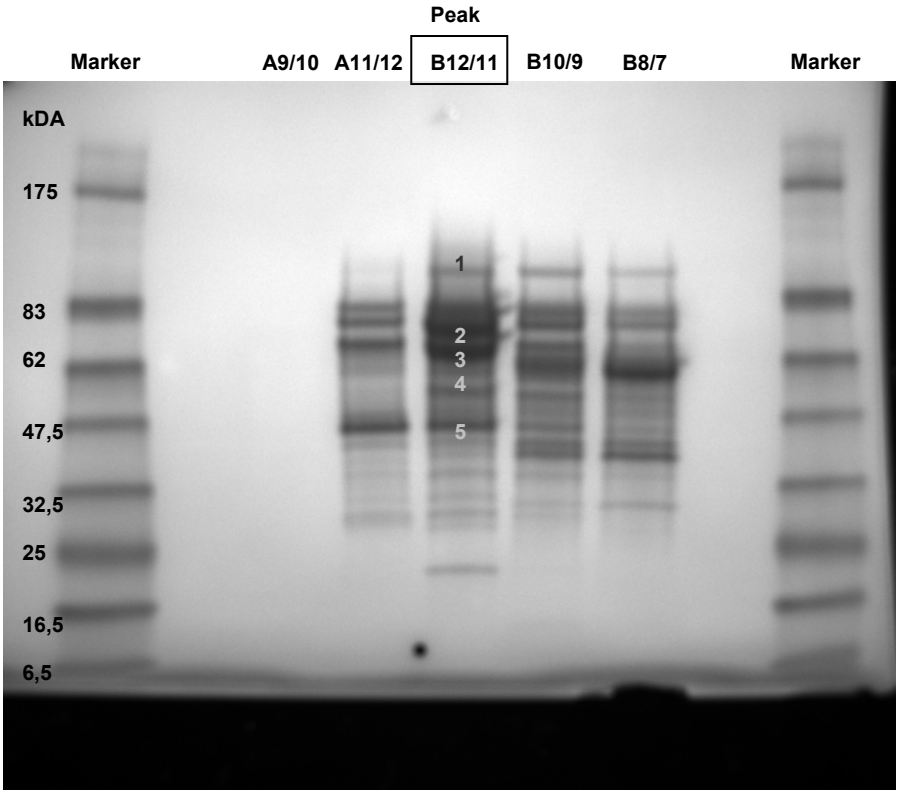


Abbildung 29: SDS-PAGE mit anschließender Zink-Färbung von verschiedenen MiniQ-Fraktionen mit der Arg/Lys/Pro-Aminopeptidase. Über dem Gel stehen jeweils die vereinigten und aufkonzentrierten Fraktionen der MiniQ-Säule mit dem Peak bei B12/11. Links und rechts ist jeweils Marker aufgetragen zur Identifizierung der Molekülmasse. Die grauen Nummern auf dem Gel beziehen sich jeweils auf eine mittels Massenspektrometrie identifizierte Bande.

Die Aufreinigung führt zu zwei Banden, die prominent in der Peakfraktion und weniger in den Nachbarfraktionen vertreten sind. Diese und der Vollständigkeit halber auch andere mittelstarke Banden wurden nun jeweils auf ihr zugehöriges Protein mittels Massenspektrometrie untersucht.

5.4.2.6 Identifizierung der Banden durch MALDI/Tandem-MS

Dazu wurden die entsprechend nummerierten Banden (Abbildung 29) ausgeschnitten, entfärbt, durch Trypsin verdaut und dann mittels MALDI/Tandem-MS und dem Datenbankprogramm Proteinprospektor nachgewiesen (Abbildung 30).

Bande 1	Eukaryotic Translation Elongation Factor 2 (ETEF 2)
Bande 2*	Aminopeptidase B (Arginyl Aminopeptidase)
Bande 3*	5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleotide Formyltransferase / IMP Cyclohydrolase
Bande 4	Notchless Gene Homolog
Bande 5	Melanocyte Proliferating Gene 1

Abbildung 30: Bestimmung der Proteine in den jeweiligen Gel-Banden. Die Nummern beziehen sich jeweils auf die SDS-Gel-Banden von Abbildung 29. In der rechten Spalte befinden sich die über Massenspektrometrie identifizierten Proteine. Stark prominente Banden sind mit einem Sternchen gekennzeichnet und gefundene Aminopeptidasen grau unterlegt.

Während in den schwächeren Banden keine Proteasen zu finden sind, ist eine der beiden prominenten Peak-Banden tatsächlich eine Aminopeptidase, nämlich die Aminopeptidase B, welche auch unter dem Namen Arginyl-Aminopeptidase bekannt ist. Beschrieben ist sie als Exopeptidase, die selektiv Arginin und Lysin vom N-Terminus verschiedener Peptid-Substrate schneiden kann. Dies passt hervorragend zu den bisherigen Ergebnissen. Der bevorzugte Prolin-Abbau jedoch wurde für diese Protease noch nicht gezeigt. Als Cofaktor dieser Metalloprotease dient Zink und sie liegt als Monomer mit ca. 72 kD vor. Ein Vergleich der Massen zeigt, dass die Aminopeptidase B mit 72 kDa fast identisch mit dem berechneten Wert von 75 kDa bei der Gelfiltration und auch bei der SDS-PAGE ist. Zusammenfassend kann man sagen, dass es sich bei der Aminopeptidase B um die gesuchte Hauptaktivität für den Abbau der Aminosäuren Arginin, Lysin und Prolin im Cytosol handelt.

5.4.3 Aufreinigung der für Cystein spezifischen Aminopeptidase

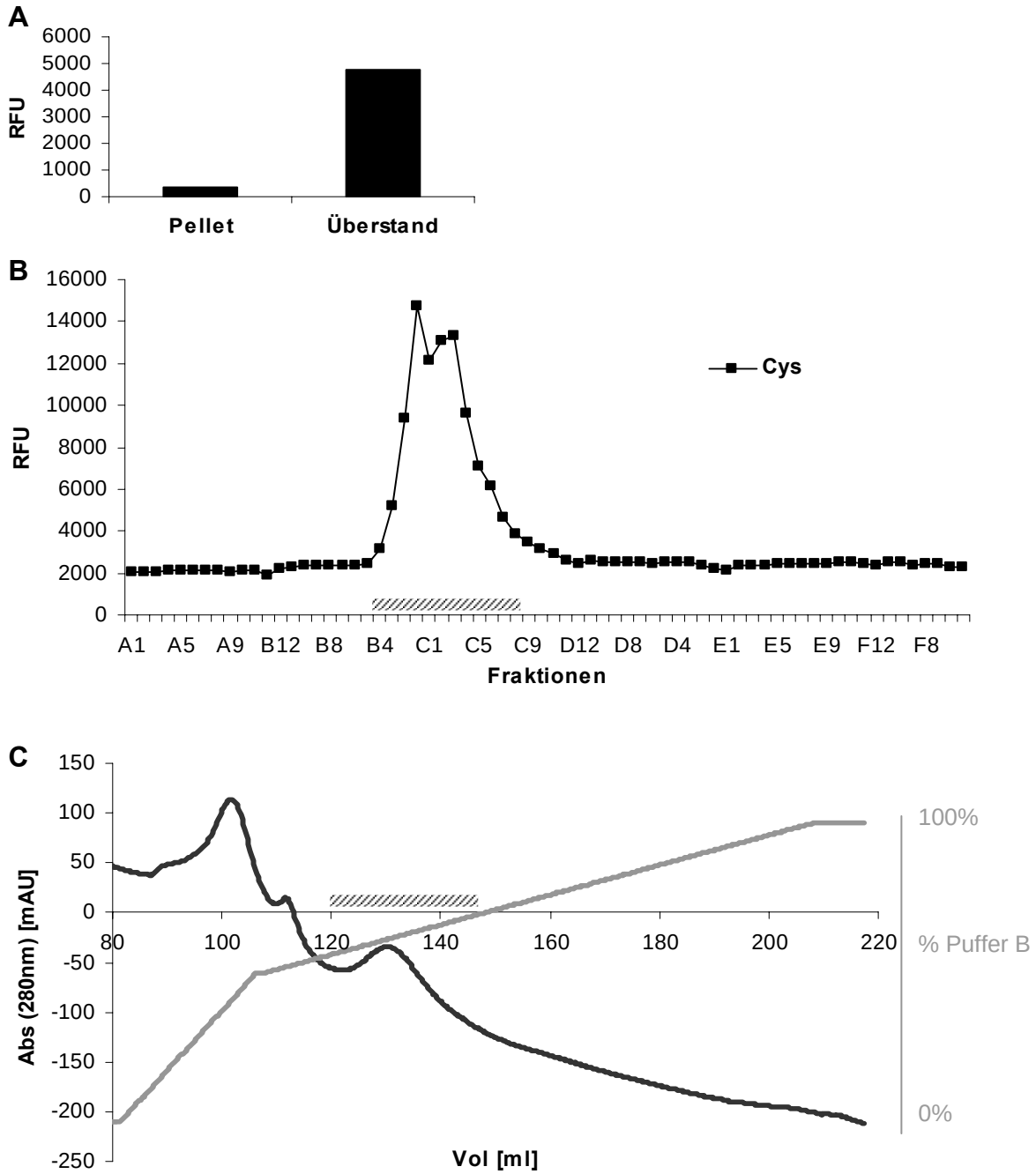
Die Aufreinigung der Cystein-spezifischen Aminopeptidase verlief in etwa identisch mit der besprochen Aufreinigung der Arg/Lys/Pro-spezifischen Aminopeptidase B mit wenigen Unterschieden, wie z.B. dem Verlauf des jeweiligen Gradienten oder der Ammoniumsulfatkonzentration bei der Fällung.

5.4.3.1 Anionenaustauscher (DEAE)

Wie in Abbildung 24 gezeigt, konnte die Cys-Protease schon sehr gut von den anderen Aminopeptidasen mittels des Anionenaustauschers DEAE abgetrennt werden. Das zugehörige Inhibitorprofil (Abbildung 24F) zeigt noch mal, dass es sich bei diesem Peak weder um PSA noch um BH handelt.

5.4.3.2 Hydrophobe Wechselwirkungs-Chromatographie (Phenyl-Sepharose)

Die entsprechenden Peakfraktionen wurden vereinigt und mit 2 M Ammoniumsulfat gefällt, wobei sich die Protease im Überstand befindet (Abbildung 31A). Die weitere Aufreinigung erfolgte über Hydrophobe Wechselwirkungs-Chromatographie (Phenyl-Sepharose) (Abbildung 31).



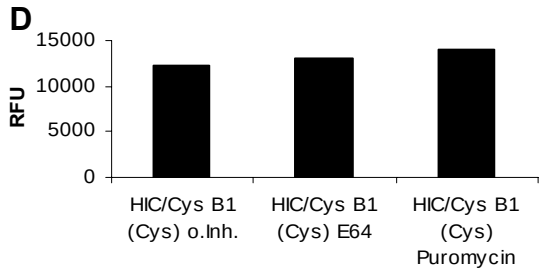
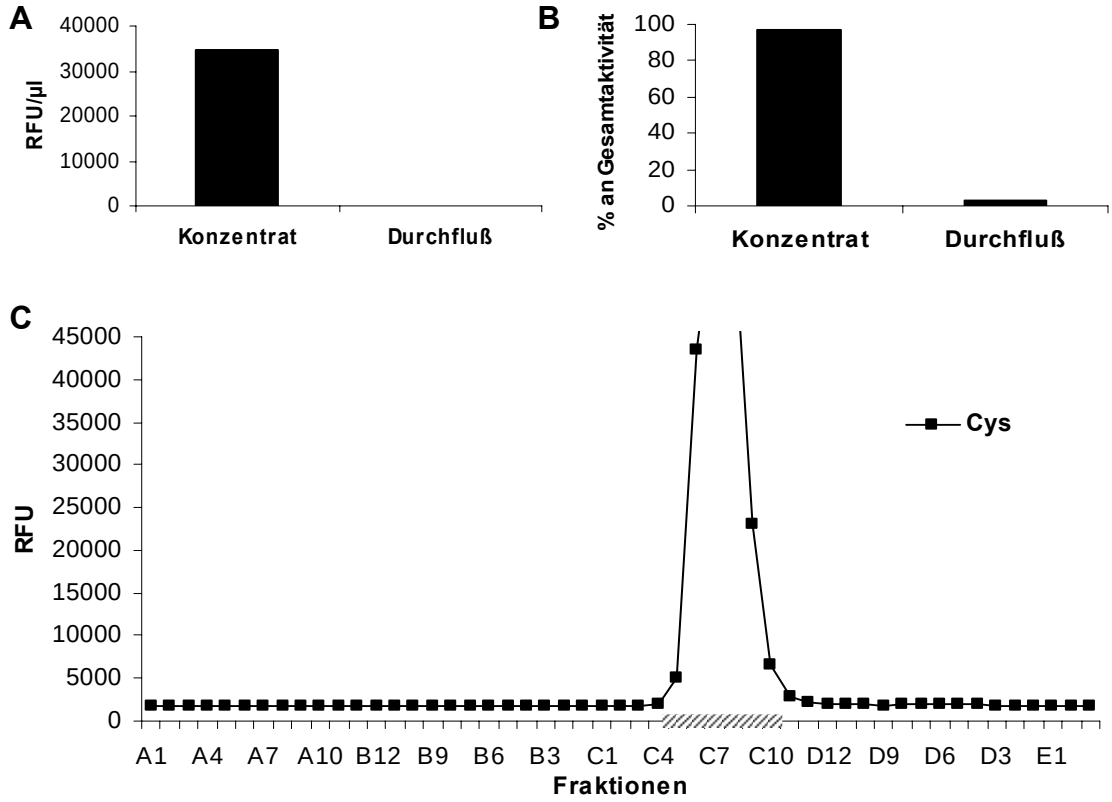


Abbildung 31: HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography) mit Phenyl-Sepharose als Säulenmaterial zur Aufreinigung der Cys-Aminopeptidaseaktivität. A) Ammoniumsulfatfällung (2 M) der vereinigten Fraktionen. Messung der Cystein-Aktivität im Überstand und Pellet. **B)** Visualisierung der Aktivitäten nach der Fraktionierung mit dem Fluoreszenz-Substrat Cys-AMC. **C)** Die schwarze Linie zeigt das Elutionsprofil, gemessen als Absorption bei 280 nm zur Visualisierung von Proteinen. Die graue Linie zeigt den angelegten Gradienten an Puffer B in %. Die geriffelte Linie auf der x-Achse entspricht der geriffelten Linie auf der x-Achse in (B). **D)** Inhibitorprofil des Cystein-Peaks (B1).

5.4.3.3 Gelfiltration

Anschließend wurden zuerst die aktiven Fraktionen vereinigt und mittels Centricon aufkonzentriert (Abbildung 32A,B) und danach durch Gelfiltration (Superdex 200) weiter aufgereinigt (Abbildung 32).



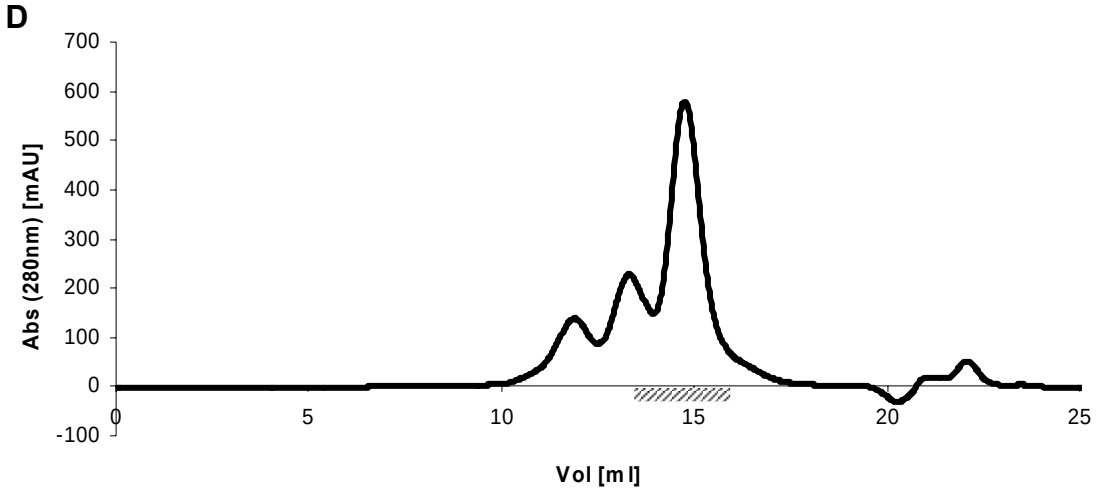


Abbildung 32: Gelfiltration mit einer Superdex 200 - Säule zur Aufreinigung der Cys-Aminopeptidaseaktivität. A) Aufkonzentration der relevanten vereinigten Fraktionen aus dem vorigen Schritt mittels eines 50 kD-Centricons. Messung der Aktivität durch Cys-AMC im Konzentrat und Durchfluss. **B)** Prozentuale Menge der Cys-Aminopeptidase im Konzentrat und Durchfluss. **C)** Visualisierung der Aktivität nach der Fraktionierung mit dem Fluoreszenz-Substrat Cys-AMC. **D)** Die schwarze Linie zeigt das Elutionsprofil, gemessen als Absorption bei 280 nm zur Visualisierung von Proteinen. Die geriffelte Linie auf der x-Achse entspricht der geriffelten Linie auf der x-Achse in (C).

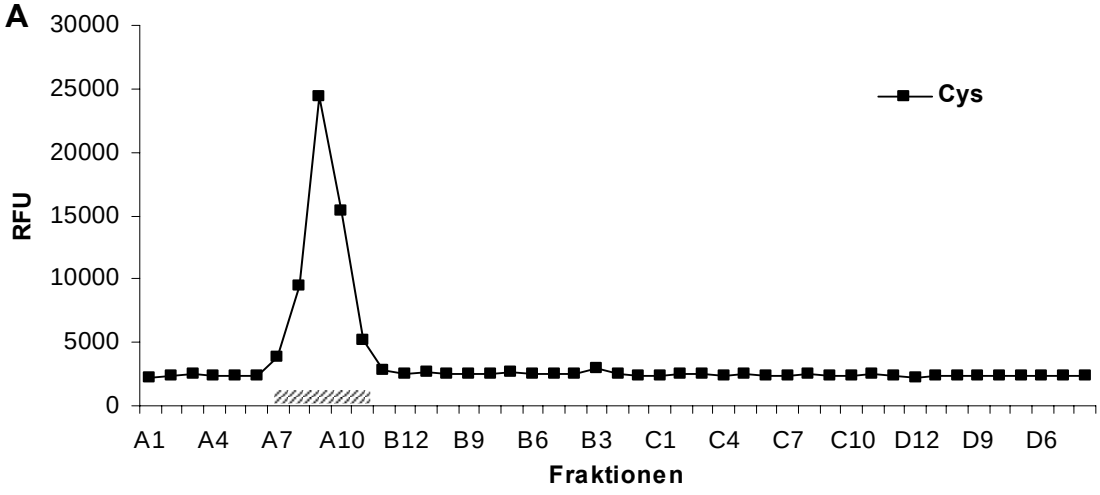
Bei der Bestimmung des Gewichts ergibt sich für die Cys-Aminopeptidase eine geschätzte Masse von 60 kDa (Abbildung 33). Marker inklusive Berechnung sind identisch mit denen in Abbildung 27.

	Ve [ml]	Kav	log(MW)	MW (Da)	MW (kDa)
Cys-Aminopeptidase	14,75	0,44	4,77	58736	59

Abbildung 33: Massengewichtsbestimmung der nativen Cys-Aminopeptidaseaktivität durch Gelfiltration. Für Marker und Berechnung: siehe Abbildung 27.

5.4.3.4 Anionenaustauscher (Q)

Der letzte Reinigungsschritt ist eine hochauflösende MiniBeads-Säule mit dem Anionenaustauscher Q (MiniQ) (Abbildung 34).



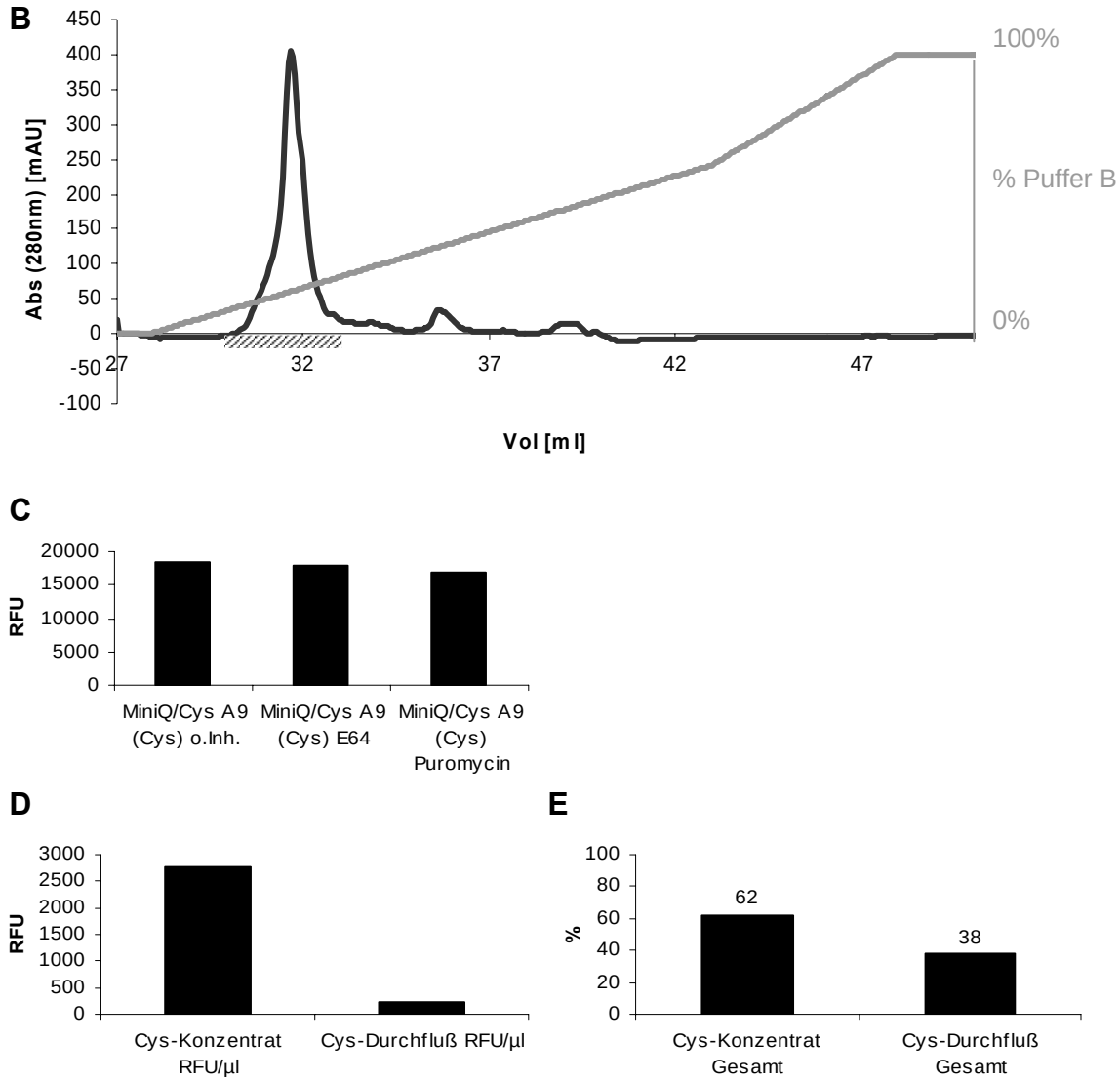


Abbildung 34: IEC (Ion Exchange Chromatography) mit Q als Säulenmaterial und hochauflösenden Mini-Beads (MiniQ) zur Aufreinigung der Cys-Aminopeptidaseaktivität. **A)** Visualisierung der Aktivität nach der Fraktionierung mit dem Fluoreszenz-Substrat Cys-AMC. **B)** Die schwarze Linie zeigt das Elutionsprofil, gemessen als Absorption bei 280 nm zur Visualisierung von Proteinen. Die graue Linie zeigt den angelegten Gradienten an Puffer B in %. Die geriffelte Linie auf der x-Achse entspricht der geriffelten Linie auf der x-Achse in (A). **C)** Inhibitorprofil des Peaks. **D)** Aufkonzentration der relevanten vereinigten Fraktionen mittels eines YM-10 Microcons. Messung der Aktivität durch Cys-AMC im Konzentrat und Durchfluss. **E)** Prozentuale Menge der Cys-Aminopeptidase im Konzentrat und Durchfluss.

Die Peak-Fraktionen mit der Cys-Aktivität wurden genauso vereinigt wie die umliegenden Fraktionen und danach mit einem YM-10 Microcon aufkonzentriert (Abbildung 34D,E).

5.4.3.5 SDS-PAGE und Zink-Färbung

Ein Teil wurde dann jeweils auf ein Gel aufgetragen und durch SDS-PAGE mit Zink-Färbung auf seine Reinheit überprüft (Abbildung 35).

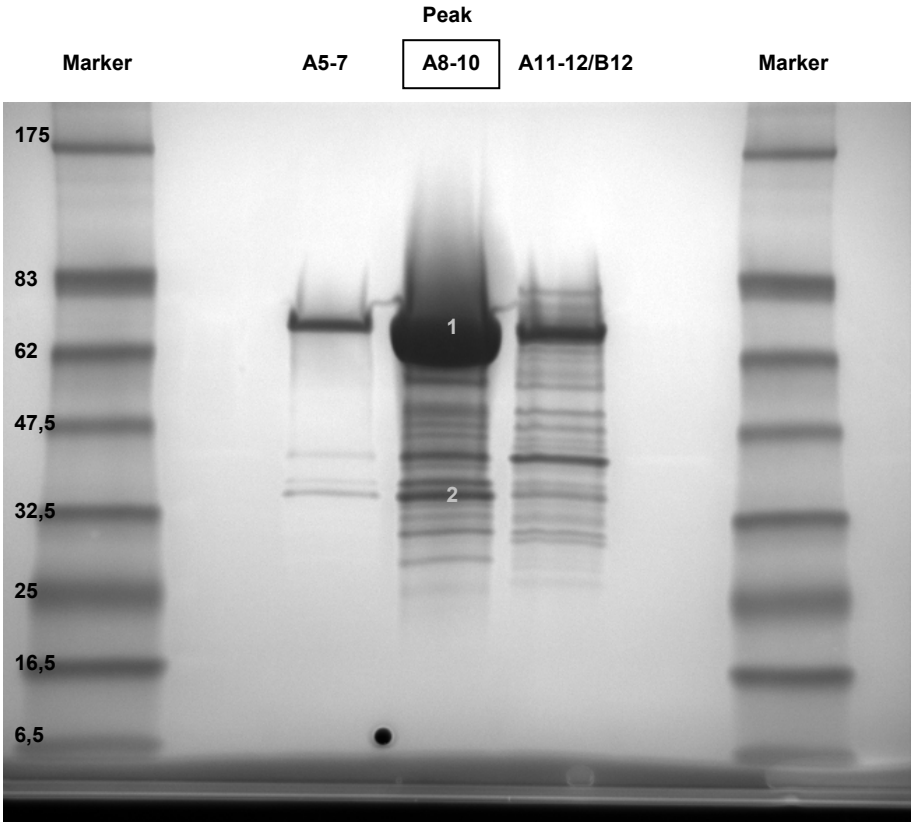


Abbildung 35: SDS-PAGE mit anschließender Zink-Färbung von verschiedenen MiniQ-Fraktionen mit der Cys-Aminopeptidase. Über dem Gel stehen jeweils die vereinigten und aufkonzentrierten Fraktionen der MiniQ-Säule mit dem Peak bei A8-10. Links und rechts ist jeweils Marker aufgetragen zur Identifizierung der Molekülmasse. Die grauen Nummern auf dem Gel beziehen sich jeweils auf eine mittels Massenspektrometrie identifizierte Bande.

Nach der Aufreinigung ist nur noch eine prominente Bande zu finden. Von dieser und von einer anderen sehr viel schwächeren Bande wurden nun jeweils die zugehörigen Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert.

5.4.3.6 Identifizierung der Banden durch MALDI/Tandem-MS

Dafür müssen die entsprechenden nummerierten Banden (Abbildung 35) zuerst ausgeschnitten, dann entfärbt und durch Trypsin verdaut werden. Schließlich kann man sie über MALDI/Tandem-MS mit dem Datenbankprogramm Proteinprospektor identifizieren (Abbildung 36).

Bande 1*	Leukotriene A4 hydrolase
Bande 2	Ldh1 protein (Lactate Dehydrogenase 1)

Abbildung 36: Bestimmung der Proteine in den jeweiligen Gel-Banden. Die Nummern beziehen sich jeweils auf die SDS-Gel-Banden von Abbildung 35. In der rechten Spalte befinden sich die über Massenspektrometrie identifizierten Proteine. Die stark prominente Bande ist mit einem Sternchen gekennzeichnet und gefundene Aminopeptidasen sind grau unterlegt.

In den vereinigten Peak-Fraktionen der Cys-Protease ist nur noch ein stark prominentes Protein zu finden, wobei es sich tatsächlich um eine Aminopeptidase handelt und zwar die Leukotrien A-4 Hydrolase. Beschrieben ist diese als relevantes Enzym im dritten Schritt der

Leukotrien-Biosynthese. Allerdings ist auch bekannt, dass sie Peptidase-Aktivität besitzt. Eine relevante Rolle im Aminosäureabbau des Cytosols ist jedoch noch nicht beschrieben. Kofaktor dieser Metalloprotease mit einem Massengewicht von 69 kD ist Zink. Zum Gewicht passen auch gut die aus der Gelfiltration (ca. 60 kD) und SDS-PAGE (ca. 70 kD) gefundenen Werte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Leukotrien A-4 Hydrolase zumindest am cytosolischen Cystein-Abbau entscheidend mitwirkt.

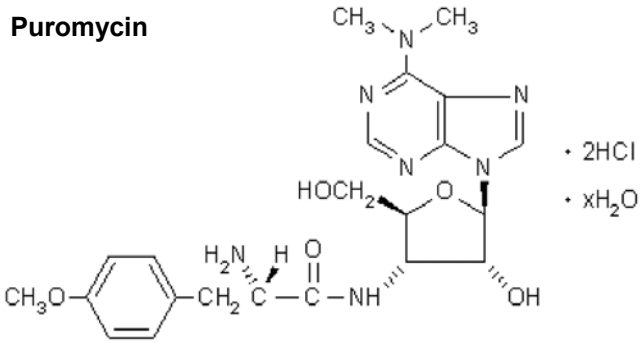
5.5 Einstellung der Inhibitoren für alle vier Aminopeptidasen

Um die vier nun identifizierten relevanten cytosolischen Aminopeptidasen (PSA, BH, AP B, LTA4H) auseinander halten zu können, mussten spezifische Inhibitoren gefunden und diese in einer Konzentration eingesetzt werden, die eine Hemmung der anderen Aktivitäten ausschließt oder sehr gering hält.

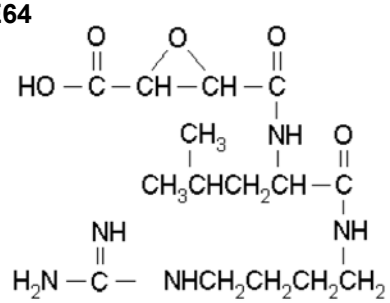
5.5.1 Inhibitoren

Als Inhibitoren wurden eingesetzt: Puromycin für PSA, E64 für BH, Arphamenin A für AP B und Captopril für LTA4H.

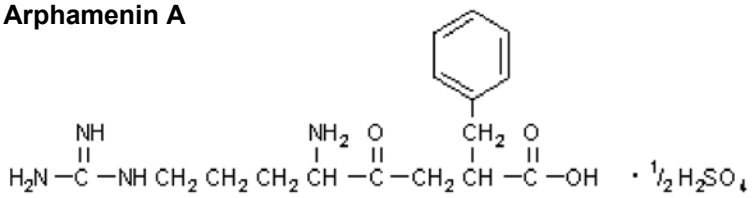
Puromycin



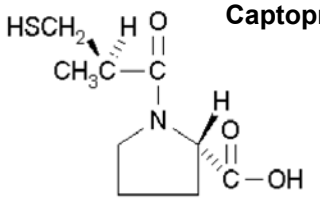
E64



Arphamenin A



Captopril



Abbildungen entnommen aus dem Katalog der Firma Sigma-Aldrich.

Zuerst wurden durch Titration der jeweiligen Inhibitoren in Gegenwart der einen spezifischen und der restlichen drei nicht-spezifischen Aminopeptidasen die optimalen Konzentrationen gesucht (Abbildungen 38-42). Dazu wurden zum einen rekombinante PSA und rekombinante BH (benötigt DTT zur Aktivierung) und zum anderen die aus dem Cytosol aufgereinigte LTA4H verwendet. Schließlich wurde auch noch Cytosol mit vier Aminosäuresubstraten eingesetzt, von denen jedes fast exklusiv von einer der vier Aminopeptidasen umgesetzt wird. Wie aus dem Inhibitorprofil (Abbildung 37) ersichtlich ist, wird der Abbau von Phenylalanin

fast komplett durch Puromycin gehemmt, welches, wie später noch nachgewiesen wird, spezifisch für PSA ist, wenn man die Inhibierung der BH beachtet. Dasselbe gilt für Glutamat und BH. Die Spezifität von AP B für Lysin ergibt sich zum einen daraus, dass PSA und BH hier offensichtlich keine Rolle spielen und zum anderen, dass AP B nach seiner Spezifität für Lysin aufgereinigt wurde. Genauso verhält es sich auch bei 50% der Cystein-Aktivität, die LTA4H zuzuschreiben ist. Somit ergibt sich als Test auf PSA im Cytosol der Umsatz an Phenylalanin, für BH an Glutamat, für AP B an Lysin und für LTA4H 50% des Cysteinumsatzes.

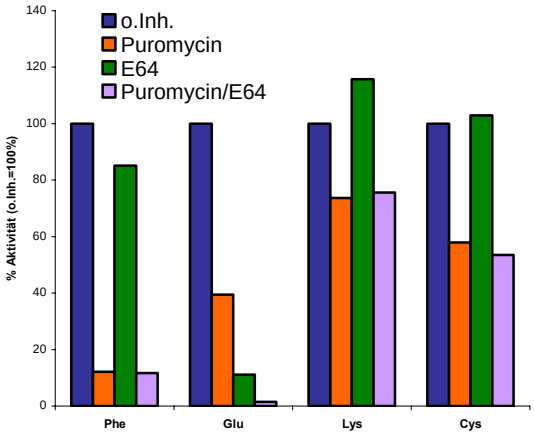
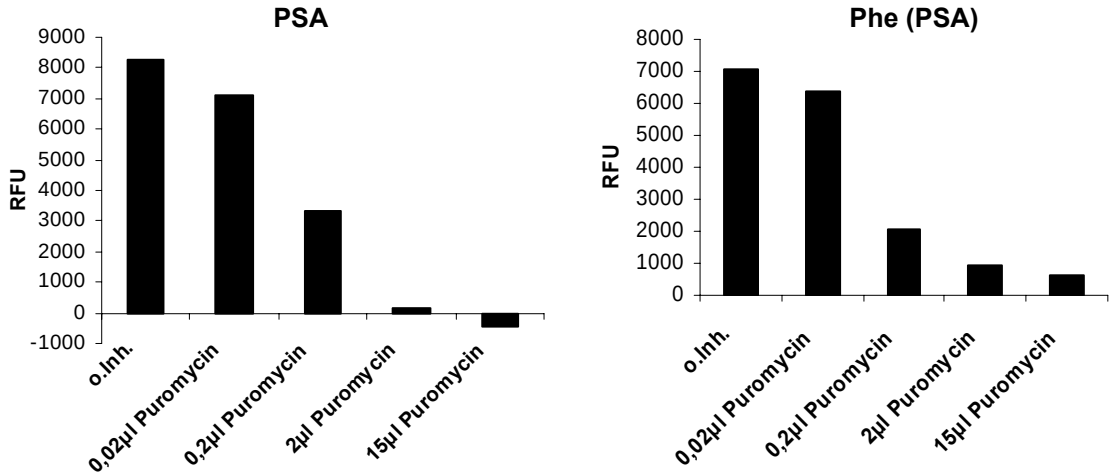


Abbildung 37: Zuordnung der vier cytosolischen Hauptaminopeptidasen zu Aminosäuresubstraten. Hierbei wurde Cytosol mit dem jeweiligen Inhibitor inkubiert und danach mit dem entsprechenden Fluoreszenzsubstrat auf Aktivität überprüft. Dabei lässt sich Phenylalanin PSA und Glutamat BH zuordnen. Die Zuordnung von Lysin zu AP B und 50% Cystein zu LTA4H erfolgt indirekt hieraus und aus der entsprechenden Aufreinigung.

5.5.2 Titration von Puromycin



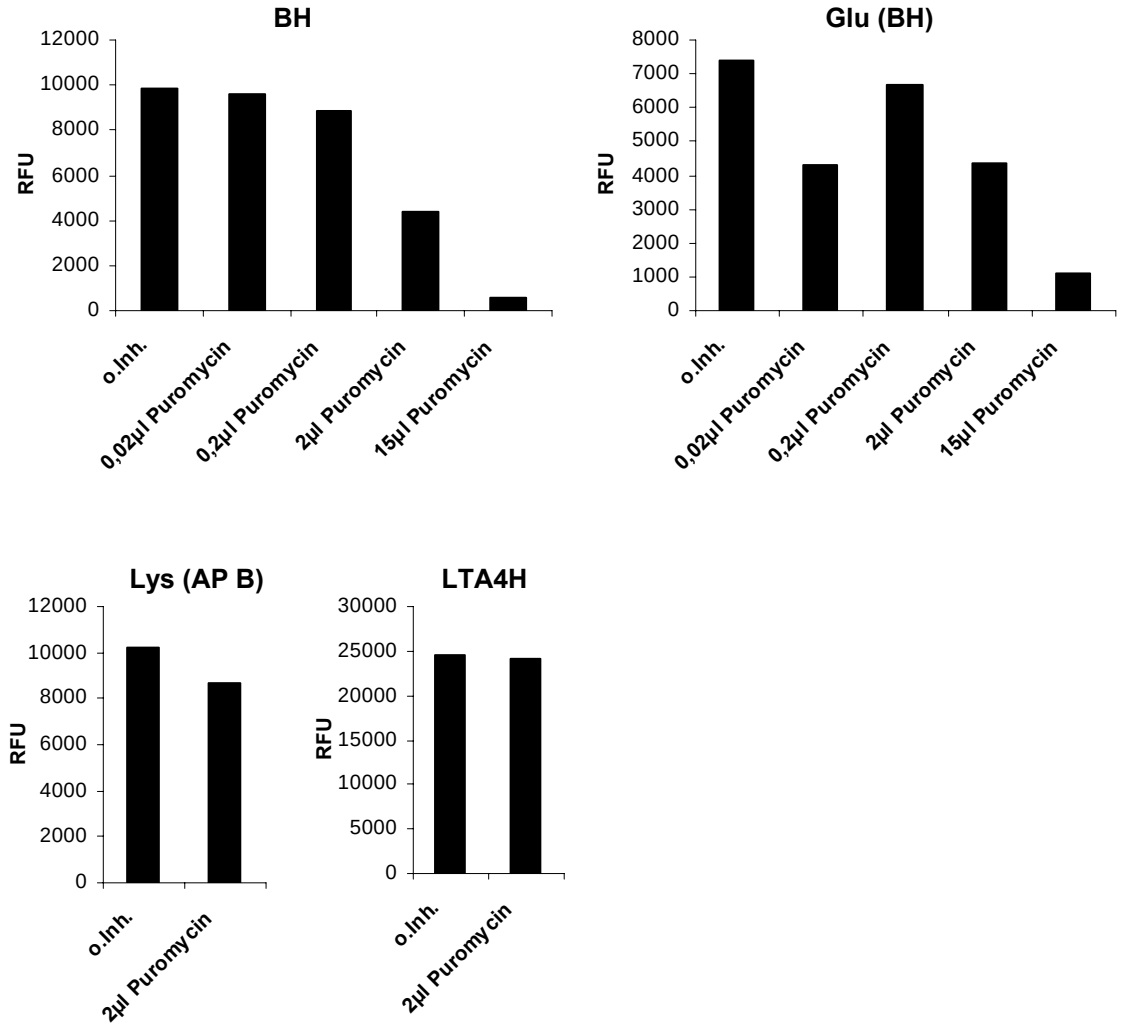


Abbildung 38: Titration zur Bestimmung der optimalen Menge des PSA-spezifischen Inhibitors Puromycin. Die Titration von Puromycin für PSA wurde mit rekombinanter PSA und mit cytosolischer PSA-Aktivität (dargestellt durch den Umsatz von Phenylalanin) durchgeführt. Die optimale Inhibitorkonzentration ergibt sich aus einer möglichst hohen Hemmung der PSA und möglichst niedrigen der drei anderen Proteasen. Für die Messung wurden die jeweiligen Volumina einer 10 mM Puromycin-Lösung zu 200 µl der Probenlösung gegeben.

Als optimale Endkonzentration von Puromycin wurde 100 µM bestimmt, was 2 µl der 10 mM Ausgangslösung entspricht bei einem Testvolumen von 200 µl. Hierbei zeigt sich eine 100% Inhibierung von PSA, jedoch auch eine 50% Hemmung der BH, ein Umstand, der bei den späteren Ansätzen beachtet werden muss. Auf die AP B und LTA4H hat Puromycin unter diesen Bedingungen keinen oder nur sehr geringen Einfluss.

5.5.3 Titration von E64

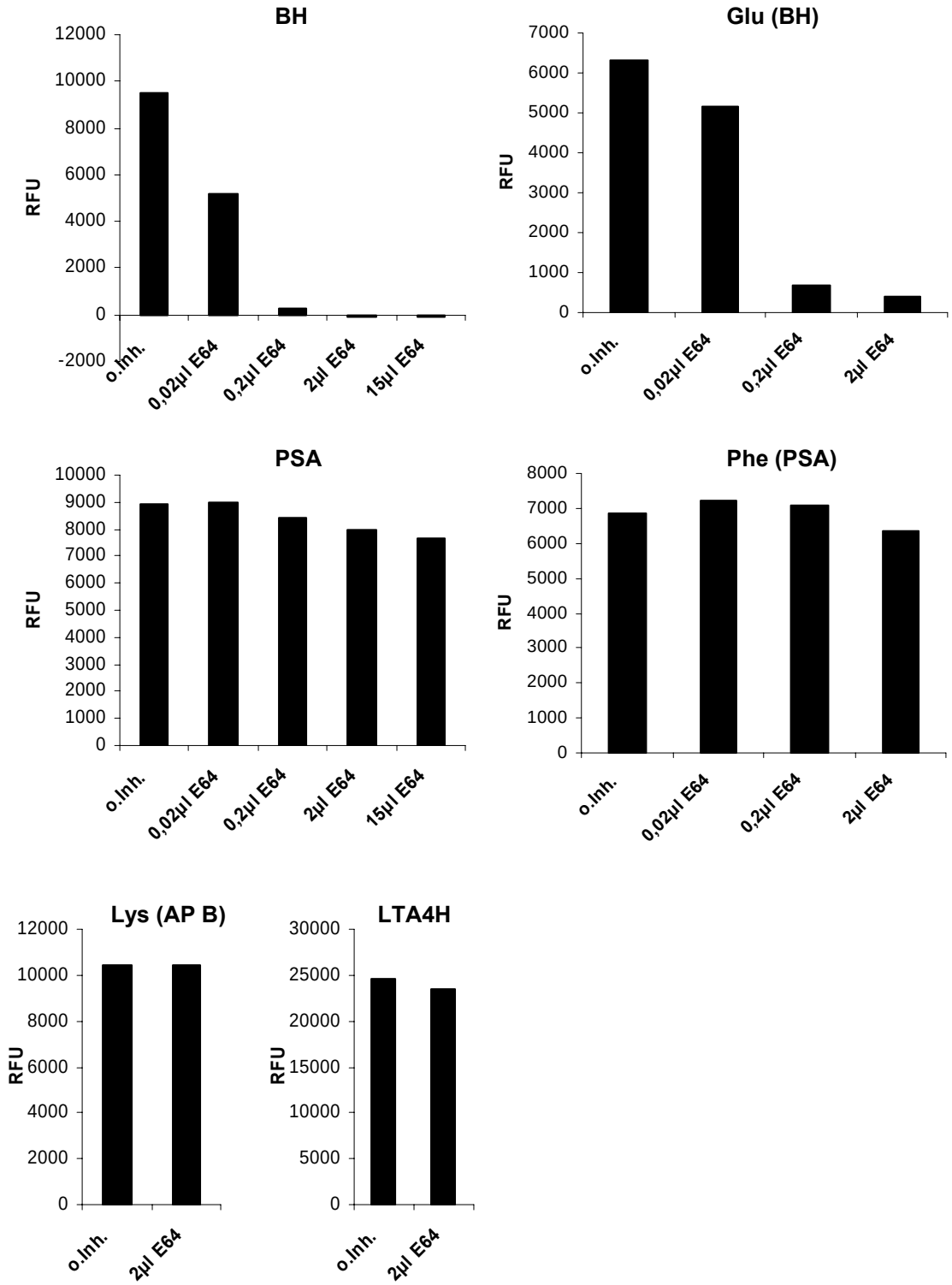


Abbildung 39: Titration zur Bestimmung der optimalen Menge des BH-spezifischen Inhibitors E64. Die Titration von E64 für BH wurde mit rekombinanter BH und mit cytosolischer BH-Aktivität (dargestellt durch den Umsatz von Glutamat) durchgeführt. Die optimale Inhibitorkonzentration ergibt sich aus einer möglichst hohen Hemmung der BH und möglichst niedrigen der drei anderen Proteasen. Für die Messung wurden die jeweiligen Volumina einer 10 mM E64-Lösung zu 200 µl der Probenlösung gegeben.

Die beste Endkonzentration von E64 ist 100 µM, was 2 µl der 10 mM Ausgangslösung entspricht bei eine Testvolumen von 200 µl. Damit zeigt sich eine 100% Inhibierung von BH und kein oder nur ein sehr geringer Effekt auf PSA, AP B und LTA4H.

5.5.4 Titration von Arphamenin A

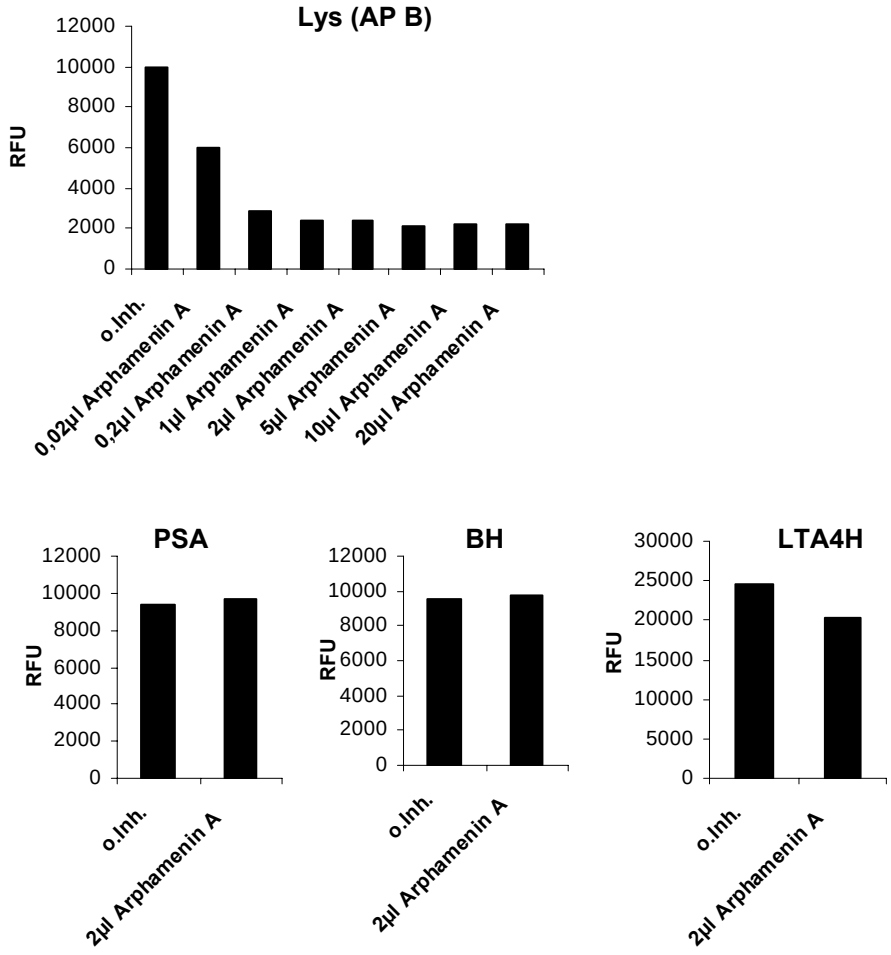


Abbildung 40: Titration zur Bestimmung der optimalen Menge des AP B-spezifischen Inhibitors Arphamenin A. Die Titration von Arphamenin A für AP B wurde mit der cytosolischen AP B-Aktivität (dargestellt durch den Umsatz von Lysin) durchgeführt. Die optimale Inhibitorkonzentration ergibt sich aus einer möglichst hohen Hemmung der AP B und möglichst niedrigen der drei anderen Proteasen. Für die Messung wurden die jeweiligen Volumina einer 100 µM Arphamenin A-Lösung zu 200 µl der Probenlösung gegeben.

Die ideale Endkonzentration für Arphamenin A ist 1 µM, wobei sich eine 100% Hemmung der AP B zeigt und keinerlei oder nur ein sehr geringer Effekt auf PSA, BH und LTA4H. Die Endkonzentration entspricht 2 µl der 100 µM Ausgangslösung bei einem Testvolumen von 200 µl.

5.5.5 Titration von Captopril

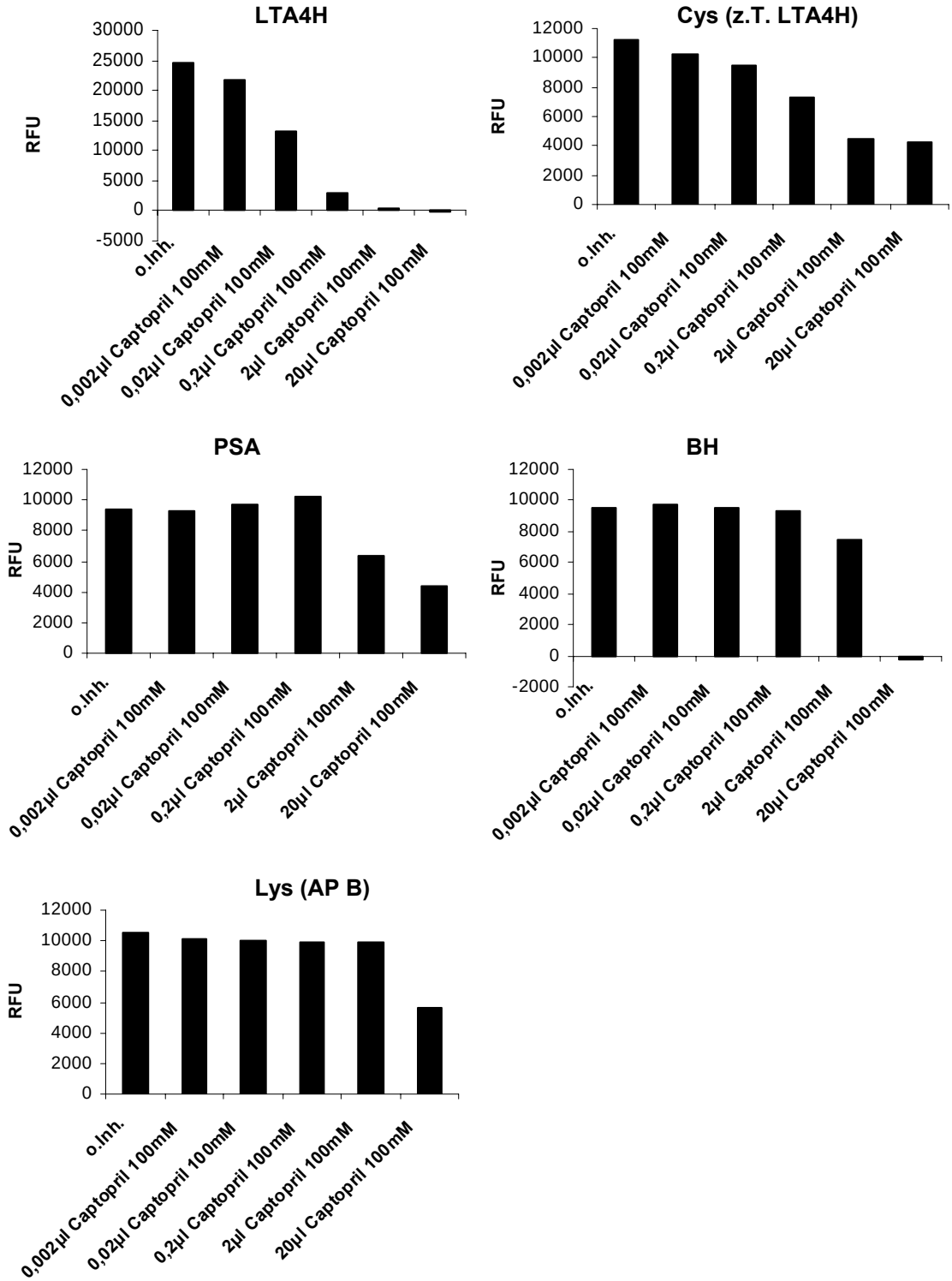


Abbildung 41: Titration zur Bestimmung der optimalen Menge des LTA4H-spezifischen Inhibitors Captopril. Die Titration von Captopril für LTA4H wurde mit aus dem Cytosol aufgereinigter LTA4H durchgeführt. Die optimale Inhibitorkonzentration ergibt sich aus einer möglichst hohen Hemmung der LTA4H und möglichst niedrigen der drei anderen Proteasen. Für die Messung wurden die jeweiligen Volumina einer 100 mM Captopril-Lösung zu 200 µl der Probenlösung gegeben.

Die ideale Endkonzentration für Captopril ist 100 µM (entspricht 0,2 µl einer 100 mM oder 2 µl einer 10 mM Ausgangslösung bei einem Testvolumen von 200 µl). Unter diesen Bedingungen erhält man eine fast vollständige Hemmung der LTA4H und keinerlei Effekt auf PSA, BH und AP B.

5.5.6 Inhibitorprofil aller relevanten Aminopeptidasen

Die so getesteten Inhibitoren werden von nun an in den folgenden Endkonzentrationen eingesetzt, die wie man aus Abbildung 42 entnehmen kann, hochspezifisch sind mit Ausnahme von Puromycin, das auch BH teilweise inhibiert: Puromycin 100 µM, E64 100 µM, Arphamenin A 1 µM und Captopril 100 µM.

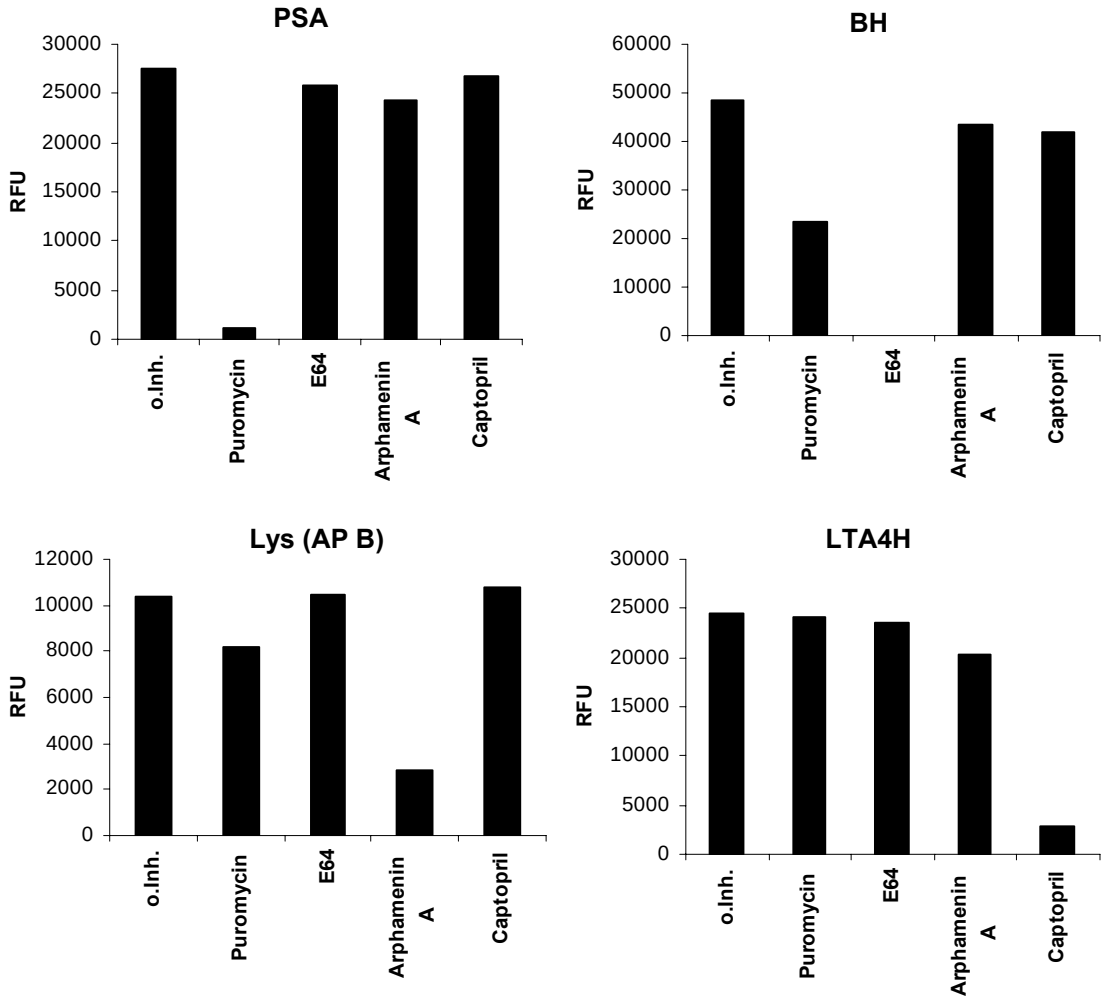


Abbildung 42: Spezifitätsnachweis der vier Inhibitoren für alle relevanten Aminopeptidasen. Die Inhibitoren wurden in den zuvor optimal bestimmten Konzentrationen eingesetzt und vor der Substratzugabe mit der jeweiligen Protease bzw. mit dem Cytosol inkubiert. Die Substrate waren für diesen Ansatz bei PSA Leu-AMC, bei BH Leu-AMC, bei Lys (AP B) Lys-AMC und bei LTA4H Cys-AMC.

An dieser Stelle muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass für Puromycin auch noch andere Zielproteasen beschrieben sind. Für E64 gibt es sogar noch sehr viel mehr Möglichkeiten, da es sich hierbei um einen Cystein-Proteasen-Inhibitor handelt, der somit alle Aktivitäten dieser Spezifität hemmt. Für diese Arbeit sind jedoch ausschließlich die dominanten cytosolischen Aktivitäten relevant. Falls es nun keine andere hervorstechende

Puromycin- bzw. E64-hemmbare Aminopeptidase im Cytosol gibt, kann man beide Inhibitoren für die Zwecke dieser Arbeit als spezifisch ansehen. Um dies zu untersuchen, wurde im Folgenden die cytosolische Aminopeptidaseaktivität von Zellen aus wt-Mäusen mit der aus PSA-K.O.- bzw. BH-K.O.-Mäusen nach Inkubation mit oder ohne dem entsprechenden Inhibitor verglichen.

5.6 Nachweis der Inhibitorspezifität anhand von Maus-Knockout-Modellen

5.6.1 Nachweis der Spezifität von E64 für BH am Maus-Knockout-Modell

Bisher konnte noch nicht hundertprozentig geklärt werden, ob E64 auch andere Aminopeptidasen als BH inhibiert. Um dies auszuschließen, wurden Milzzellen von BH-K.O.-Mäusen im C57BL/6-Hintergrund und Milzzellen von Wildtyp-C57BL/6-Mäusen als Kontrolle (nach Abtrennung der Erythrocyten durch ACK-Lyse) durch dreimaliges Schockfrieren/Auftauen lysiert. Grobe Zellbestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation entfernt. Das Zell-Lysat beider Mäuse wurde nun mit oder ohne E64 inkubiert und die Aktivität mit verschiedenen Substraten gemessen. Normalisiert wurden die beiden Zell-Lysate auf den Prolin-Wert, da dieser von E64 nicht beeinflusst wird (Abbildung 43).

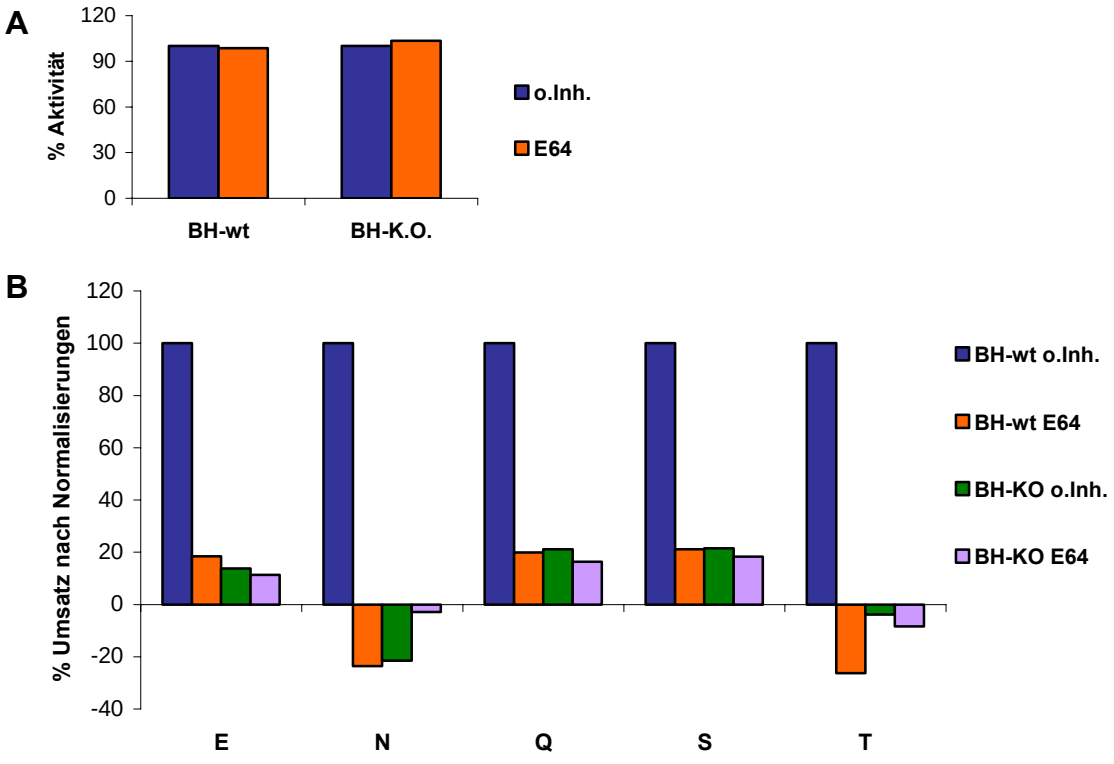


Abbildung 43: Bestimmung der Spezifität von E64. A) Das BH-wt- und BH-K.O.-Lysat wurde mit E64 inkubiert, danach mit Pro-AMC versetzt und der Umsatz bestimmt. Zur besseren Darstellung wurde jeweils auf den Wert ohne Inhibitor normalisiert. **B)** Die jeweiligen Lysate wurden nach Inkubation mit E64 mit den E64-hemmbaren Substraten versetzt und anschließend gemessen. Zur besseren Darstellung wurden die Werte so normalisiert, dass zuerst der Prolinumsatz für wt und K.O. ohne Inhibitor identisch ist und danach ein BH-wt-Umsatz von 100% erreicht wird.

Wenn man nun die Werte der BH-wt- und der BH-K.O.-Lysate miteinander vergleicht, lässt sich feststellen, dass die K.O.-Werte auf demselben Level liegen wie die wt-Werte nach Inkubation mit E64. Des Weiteren lässt sich beim Wildtyp deutlich eine Inhibierung durch E64 erkennen, während dies beim K.O. nicht mehr der Fall ist. Dies zeigt, dass E64 keine andere Hauptaktivität als BH im Cytosol hemmt und somit lässt sich dieser Inhibitor für die Zwecke dieser Arbeit als BH-spezifisch ansehen.

5.6.2 Nachweis der Spezifität von Puromycin für PSA am Maus-Knockout-Modell

Für Puromycin wurde alles genauso durchgeführt wie im vorigen Abschnitt beschrieben. Hierbei wurden PSA-K.O.-Mäuse im BALB/c-Hintergrund verwendet, weshalb als Kontrolle auch Wildtyp-BALB/c-Mäuse dienten. Da die BH jedoch auch von Puromycin inhibiert wird, wurden die Zell-Lysate beider Mäuse einmal mit Puromycin/E64 und einmal mit E64 alleine versetzt. Wie im vorigen Abschnitt gezeigt, wird durch die Zugabe von E64 ausschließlich BH gehemmt. Somit ergibt sich aus dem Unterschied des Umsatzes nach Puromycin/E64- und E64-Zugabe die Aktivität aller Puromycin-inhibierbaren Proteasen mit Ausnahme der BH. Bei diesem Ansatz wurde ebenfalls auf Prolin normiert, dessen Umsatz auch hier weder von Puromycin noch von E64 beeinflusst wird (Abbildung 44).

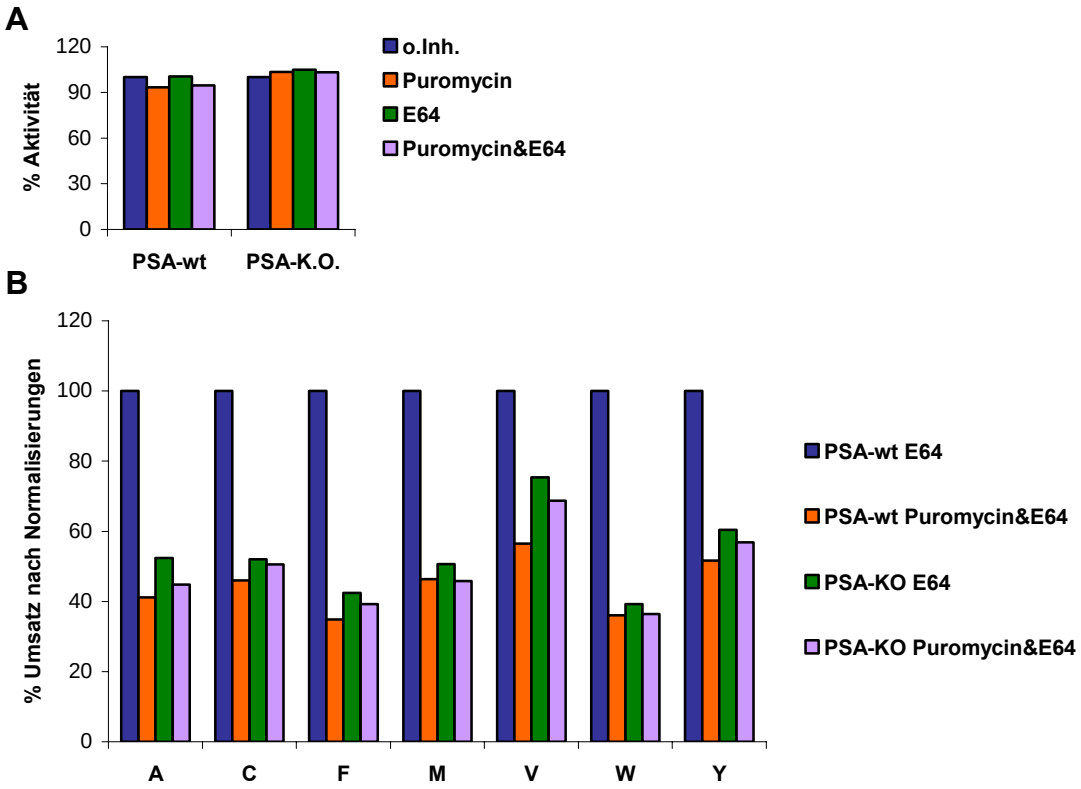
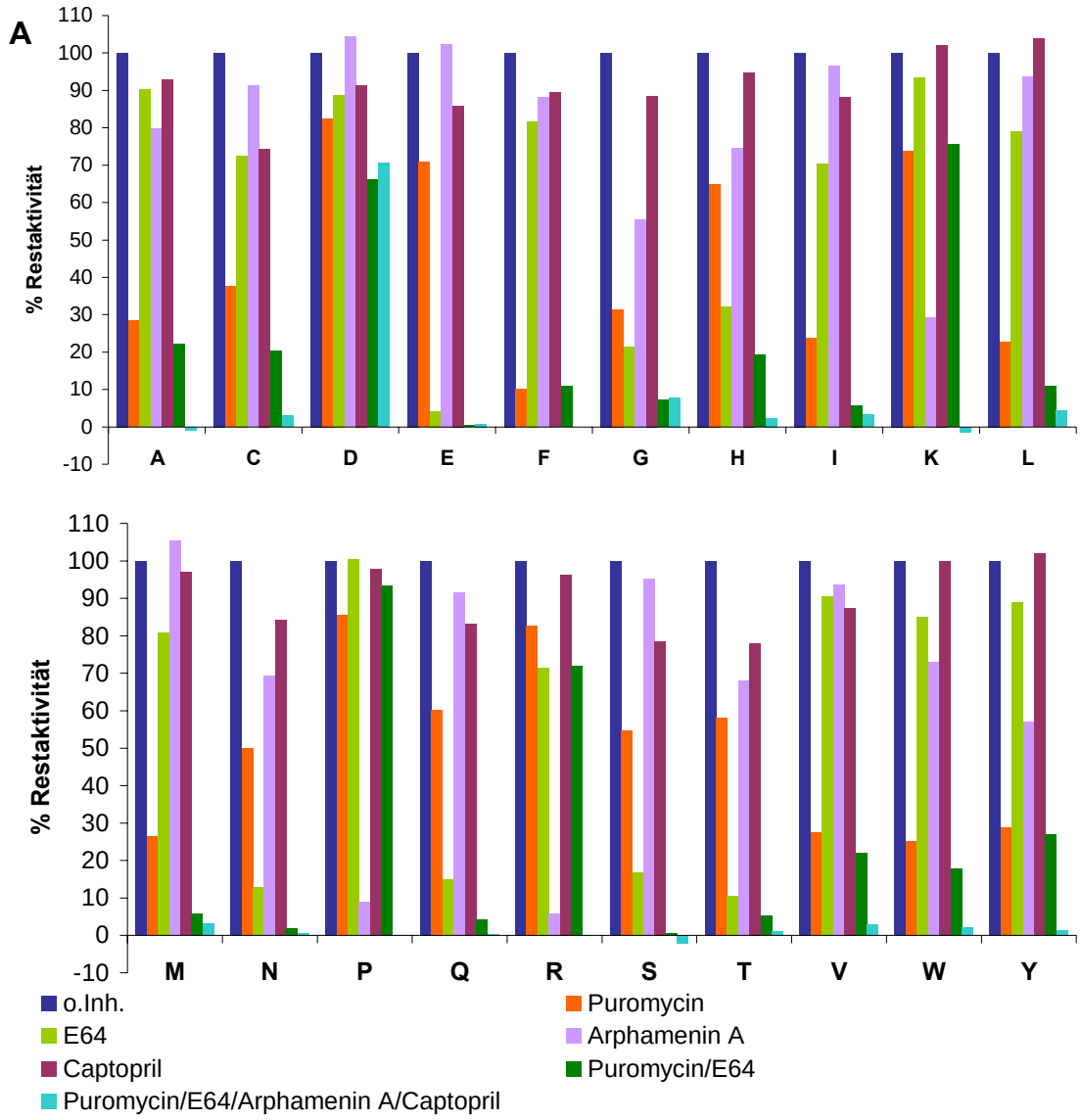


Abbildung 44: Bestimmung der Spezifität von Puromycin. A) Das PSA-wt- und PSA-K.O.-Lysat wurde mit Puromycin, E64 oder Puromycin&E64 inkubiert, danach mit Pro-AMC versetzt und der Umsatz bestimmt. Zur besseren Darstellung wurde jeweils auf den Wert ohne Inhibitor normalisiert. **B)** Nach Inkubation mit den Inhibitoren wurden die jeweiligen Lysate mit den Puromycin-hemmbaren Substraten versetzt und anschließend gemessen. Zur besseren Darstellung wurden die Werte so normalisiert, dass zuerst der Prolinumsatz für wt und K.O. ohne Inhibitor identisch ist und danach ein PSA wt / E64-Umsatz von 100% erreicht wird.

Die resultierenden Werte zeigen, dass auch hier die K.O.-Umsätze auf dem Level der wt-Umsätze mit Inhibitor, hier mit Puromycin, liegen. Ebenso wird das PSA-wt-Lysat bei den entsprechenden Aminosäuren durch Puromycin stark inhibiert, während beim PSA-K.O.-Lysat keinerlei Hemmung mehr nachgewiesen werden kann. Dies zeigt deutlich, dass Puromycin mit Ausnahme des bekannten Effekts auf BH keine andere Hauptaktivität als PSA im Cytosol hemmt und somit kann es als spezifischer Inhibitor für die Zwecke dieser Arbeit verwendet werden, wenn man den Einfluss auf BH beachtet.

5.7 Bestimmung des Anteils der dominanten Aminopeptidasen am Abbau aller 20 Aminosäuren im Cytosol

Für diesen Versuch wurden, wie vorher schon für das Cytosol beschrieben, die Umsatzraten aller 20 fluorogenen Aminosäuresubstrate einzeln gemessen. Wenn man dies nun wiederum als prozentualen Anteil am Gesamtumsatz darstellt, ergibt sich ein Diagramm wie in Abbildung 45B. Um nun den Anteil der Aminopeptidasen für jede einzelne Aminosäure zu bestimmen, wurde das Cytosol vorher mit den entsprechenden Inhibitoren inkubiert. Wenn man nun in einem Diagramm die Aktivität nach Inhibitorzugabe als prozentualen Anteil der Aktivität ohne Inhibitor darstellt, ergibt sich die Abbildung 45A.



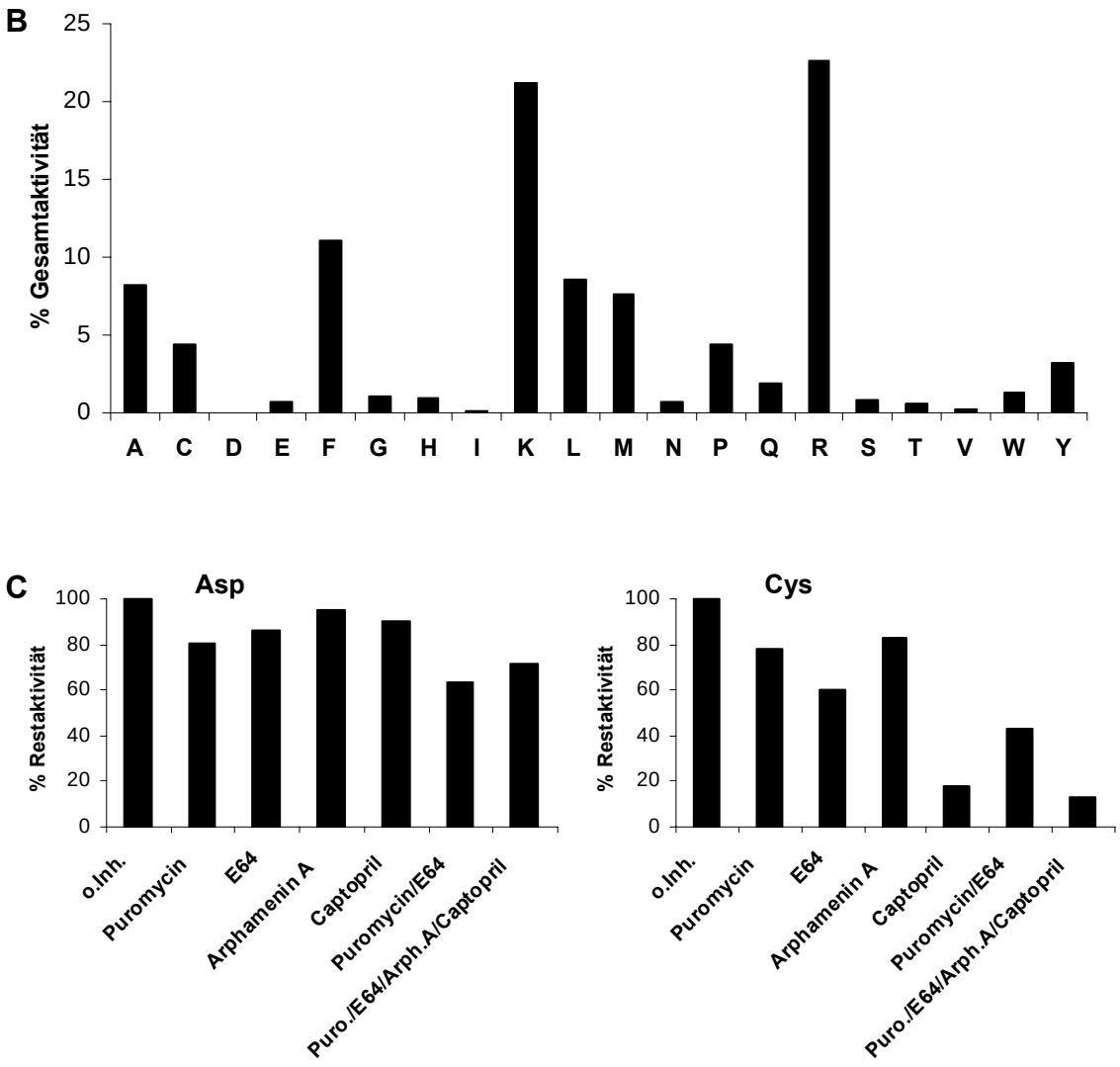


Abbildung 45: Bestimmung des Anteils jeder einzelnen Aminopeptidase an der cytosolischen Gesamtaktivität für alle 20 Aminosäuren. A) Aminopeptidase-Aktivität im Cytosol von EL4-Zellen (gemessen mittels Fluoreszenzsubstraten) nach vorheriger Inkubation mit Puromycin, E64, Arphamenin A, Captopril oder verschiedenen Kombinationen, dargestellt als prozentuale Restaktivität im Vergleich zum Umsatz ohne Inhibitor. Aminosäuren sind alphabetisch nach dem Ein-Buchstaben-Code sortiert. **B)** Cytosolische Umsatzraten für alle 20 Aminosäuren, welche die Aminopeptidasespezifität widerspiegeln. Die Umsatzrate für jede individuelle Aminosäure ist dargestellt als Prozent des Gesamtumsatzes, bestehend aus allen 20 addierten einzelnen Aktivitäten eines Satzes. Die genaue Berechnung ist im Methoden-Teil beschrieben. **C)** Selber Versuch wie in (A), aber entweder ausschließlich mit Aspartat oder mit Cystein.

Aus dem Inhibitorprofil lässt sich nun für jede einzelne Aminosäure vorhersagen, von welcher Aminopeptidase diese bevorzugt im Cytosol geschnitten wird. Für BH ist dies durch die E64-, für AP B durch die Arphamenin A- und für LTA4H durch die Captopril-Inhibierung klar erkennbar. Um PSA mittels Puromycin, das eben auch zu einem beträchtlichen Anteil die BH hemmt, bestimmen zu können, gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen kann man die Puromycin-Inhibierung gleich der PSA-Aktivität setzen für den Fall, dass der entsprechende

Aminosäureumsatz von E64 nicht gehemmt wird. Zum anderen lässt sich die PSA-spezifische Puromycin-Inhibierung aus dem Unterschied der Hemmung von Puromycin/E64 und E64 ablesen, da in diesem Falle die BH schon durch den ihr spezifischen Inhibitor E64 unterdrückt wurde.

Unter Beachtung dieser Regeln lässt sich aus dem Profil erkennen dass es eine ganze Reihe von Aminosäuren gibt, die fast ausschließlich von PSA abgebaut werden (Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Val, Trp, Tyr). Auf der anderen Seite gibt es Aminosäuren für die die BH von größter Bedeutung ist (Glu, Gly, His, Asn, Gln, Ser, Thr). Die vorhergesagte Spezifität der AP B schlägt sich nun auch in diesem Assay nieder. Sie ist fast ausschließlich für Lys, Arg und Pro zuständig. LTA4H scheint keine allzu große Rolle zu spielen, man findet jedoch einen gewissen Anteil z. B. am Cys-Abbau. Die Relevanz dieser vier Aminopeptidasen zeigt sich sehr beeindruckend, wenn man alle Inhibitoren zusammengibt, womit mit Ausnahme von Aspartat jegliche Aktivität im Cytosol komplett verschwindet. Ein weiterer Versuch mit Aspartat und Cystein alleine ergab ein ähnliches Bild für Aspartat, jedoch hemmte in diesem Fall nun Captopril zum Großteil den Cystein-Abbau (Abbildung 45C). Dieser Effekt könnte auf einer eventuellen Oxidierung des Cys-AMC-Substrates bei verschiedenartiger Behandlung vor oder während des Experiments beruhen. Eine andere Möglichkeit diesen Unterschied zu erklären, ist das Vorhandensein einer Benzyl-Schutzgruppe im Substrat, die eventuell einen Einfluss auf den Umsatz ausüben könnte. Da jedoch Cys(Bzl)-AMC als sensitives Substrat für die Serum-Cystyl-Aminopeptidase (Oxytocinase) für klinische Untersuchungen verwendet wird, sollte dies nicht der Fall sein.

Mittels dieses Ansatzes lässt sich somit nicht nur jede Aminosäure einer oder mehreren Aminopeptidasen zuordnen, sondern es lässt sich auch feststellen, dass bis auf den Aspartat-Abbau die gesamte quantifizierbare Aminopeptidase-Aktivität im Cytosol einzelnen benennbaren Proteasen zugeordnet werden kann.

5.8 Bestimmung der Aktivität relevanter Aminopeptidasen

Bisher wurden die Aktivitäten jeder einzelnen Aminopeptidase nur indirekt durch die Zugabe von Inhibitoren zum Cytosol bestimmt. Von Interesse ist jedoch auch, wie das direkte Spezifitätsprofil jeder einzelnen Aminopeptidase aussieht, gemessen durch die Umsatzraten der jeweiligen Enzyme.

Die jeweiligen Werte wurden auf exakt die gleiche Weise bestimmt wie vorher für das Cytosol. Als Proteasen wurden die zwei cytosolischen Hauptaktivitäten Puromycin-sensitive Aminopeptidase und Bleomycin-Hydrolase als rekombinante Enzyme eingesetzt. Darüber hinaus wurde auch noch das Profil einer anderen als immunologisch relevant beschriebenen Aminopeptidase bestimmt, der cytosolischen Leucin-Aminopeptidase (LAP) (Abbildung 46).

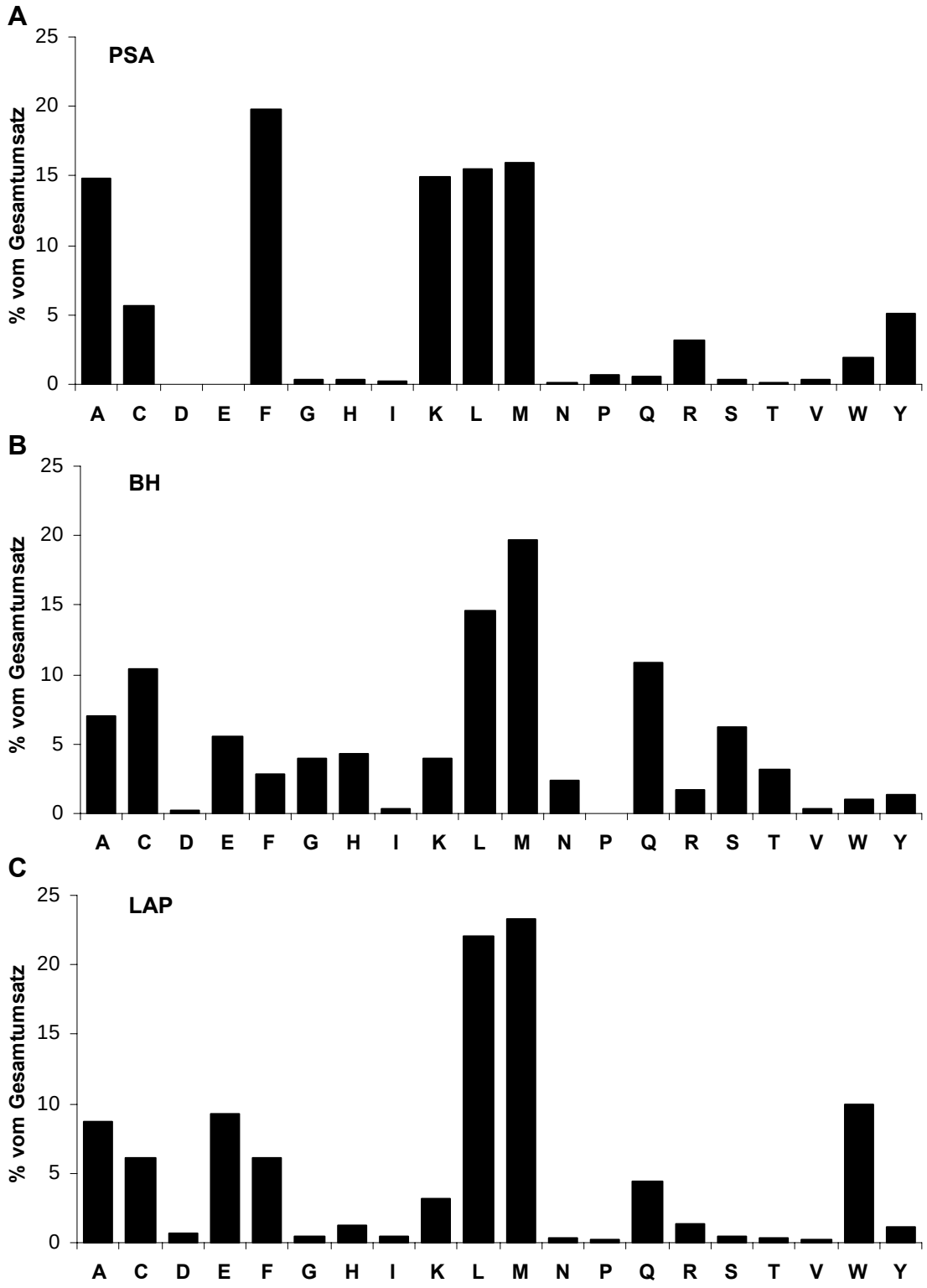


Abbildung 46: Aktivitätsprofil von PSA, BH und LAP. A) PSA-Spezifität, ermittelt über die Umsatzraten aller 20 Aminosäuresubstrate durch rekombinante PSA. **B)** BH-Spezifität, ermittelt über die Umsatzraten aller 20 Aminosäuresubstrate durch rekombinante BH. **C)** LAP-Spezifität, ermittelt über die Umsatzraten aller 20 Aminosäuresubstrate durch LAP.

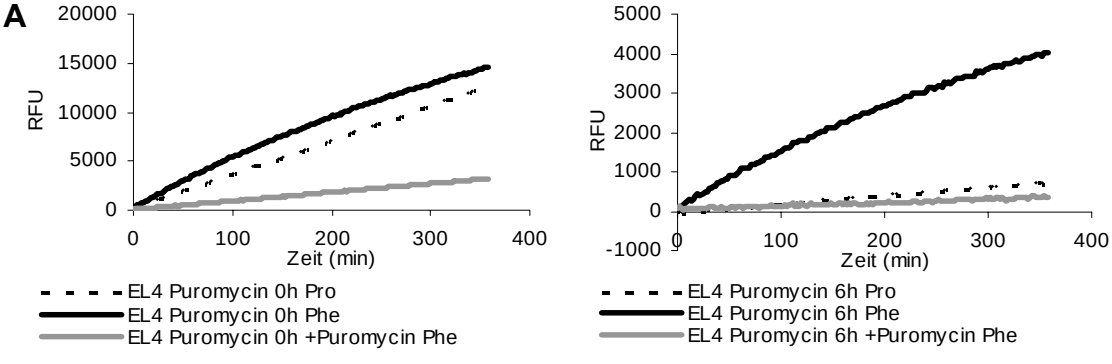
Dabei lässt sich erkennen, dass jede Aminopeptidase für sich deutliche Spezifitätsunterschiede gegenüber den verschiedenen Aminosäuren aufweist. Bei PSA lässt sich eine klare Bevorzugung gegenüber A, F, K, L, M, aber auch noch für C, R, W, Y erkennen. BH wiederum ist nicht so hochspezifisch und setzt viele Aminosäuren mit

ähnlichen Raten um. LAP bevorzugt ganz klar L und M, aber auch A, C, E, F, Q, W. Durch diese extremen Unterschiede lässt sich dann schließlich auch das Profil des Cytosols erklären.

Beim Vergleich des PSA-Profils aus Abbildung 46A mit den Werten, die aus dem Inhibitorprofil Cytosol + Puromycin (Abbildung 45A) erhalten wurden, lässt sich klar erkennen, dass sich viele der PSA-Hauptaktivitäten mit einer stark Puromycin-inhibierbaren Cytosolaktivität decken, z.B. bei A, C, F, L, M, W, Y. Dies trifft nicht zu auf K und R, was nicht weiter verwunderlich ist, da für diese beiden Aminosäuren die AP B die Hauptaktivität im Cytosol darstellt. Bei der BH decken sich nur die Hauptaktivitäten Q und S mit einer E64-inhibierbaren Aktivität im Cytosol. Dies hängt damit zusammen, dass bei der BH im Gegensatz zur PSA eher die geringeren Aktivitäten, wie E, T und N die geringeren cytosolischen Aktivitäten komplett abdecken. Da LAP in keinem der cytosolischen Assays gefunden wurde, kann man davon ausgehen, dass es entweder nur in einer sehr geringen Menge in der Zelle vorkommt oder nur unter bestimmten Bedingungen produziert wird. Da LAP jedoch mit der Generierung bestimmter Epitope in Zusammenhang gebracht wurde, könnte auch dieses Profil unter bestimmten Bedingungen von Interesse sein.

5.9 Test auf Membrangängigkeit der Inhibitoren

Um Studien über die vier Aminopeptidasen in der lebendigen Zelle durchführen zu können, ist es entscheidend, dass die einzelnen Inhibitoren auch membrangängig sind. Um dies zu testen, wurden EL4-Zellen 6 h in serumfreien Medium mit einer 10fach höheren Konzentration an Puromycin, E64, Arphamenin A und Captopril als für einen normalen Inhibitortest inkubiert. Um einem eventuellen Fehler durch Zerfall des Inhibitors vorzubeugen, wurde nach 3 h nochmals die gleiche Menge zugegeben. Als Negativkontrolle dienten Zellen, bei denen der Inhibitor zur Stunde null zugesetzt wurde und somit nicht aufgenommen werden konnte. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen abzentrifugiert und mehrmals mit dem Assaypuffer gewaschen, um nicht aufgenommenen Inhibitor vollständig zu entfernen. Nach Lyse der Zellen und Abtrennung grober Bestandteile wurde das eventuell gehemmte Zell-Lysat mit einem entsprechenden Substrat inkubiert. Die Ansätze waren: für PSA Puromycin als Inhibitor und Phenylalanin als Substrat, für BH E64 und Glutamat, für AP B Arphamenin A und Prolin, für LTA4H Captopril und Cystein. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Inhibitor. Zum Vergleich der Werte wurde das Zell-Lysat von mit Inhibitor inkubierten Zellen mit einem durch diesen Inhibitor nicht hemmbaren Substrat (z.B. Prolin bei Puromycin) versetzt und der Umsatz gemessen. Um die noch mögliche Inhibierung der Lysate zu untersuchen, wurde das nicht-gehemmte und das eventuell-gehemmte Lysat mit dem Inhibitor nachträglich versetzt und der jeweilige Substratumsatz bestimmt (Abbildung 47).



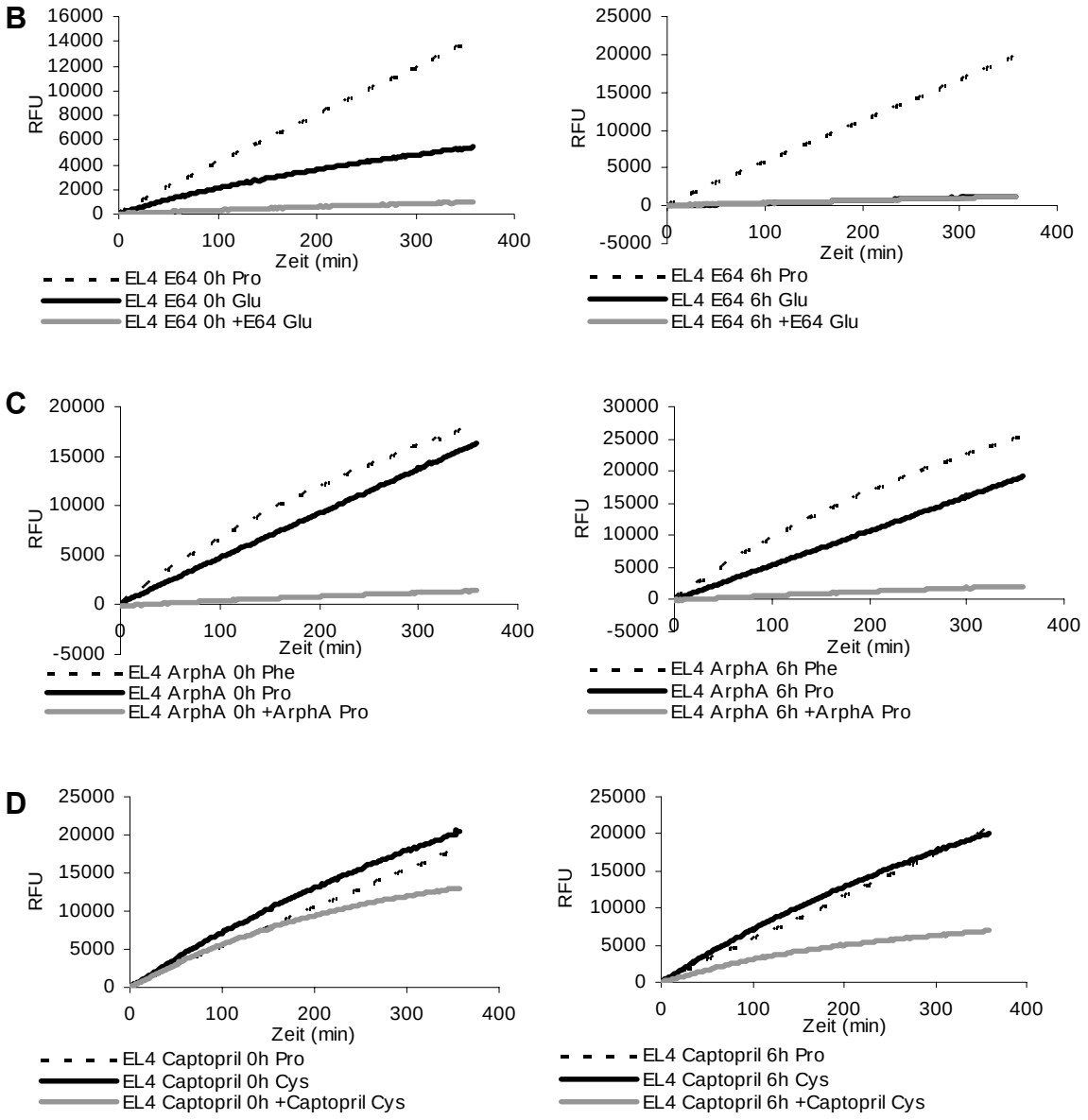


Abbildung 47: Bestimmung der Membrangängigkeit relevanter Inhibitoren. In den jeweils linken Abbildungen sind Null-Stunden-Werte, was bedeutet, dass der entsprechende Inhibitor direkt vor dem Waschschritt zugegeben wurde (0h). Für den eigentlichen Zeitwert wurden die Zellen 6 h lang mit dem entsprechenden Inhibitor inkubiert (6h). In allen Abbildungen stellt die erste Aminosäure eine Kontrolle dar, die in dem entsprechenden Ansatz nicht gehemmt wird. Die jeweilige Aminopeptidase wird dann durch den Umsatz einer von ihr bevorzugten Aminosäure auf ihre Inhibierung hin getestet. Legende: EL4 (Zell-Linie), Inhibitor (Inhibitor, mit dem die Zellen inkubiert wurden), 0/6h (Inkubationszeit), +Inhibitor (nach der Zell-Lyse aber vor dem Assay zugesetzter Inhibitor), Aminosäure (fluorogenes Aminosäure-AMC-Substrat). **A)** Test der Membrangängigkeit von Puromycin, wobei Phe-AMC als Substrat für PSA verwendet wurde. **B)** Test der Membrangängigkeit von E64, wobei Glu-AMC als Substrat für BH verwendet wurde. **C)** Test der Membrangängigkeit von Arphamenin A, wobei Pro-AMC als Substrat für AP B verwendet wurde. **D)** Test der Membrangängigkeit von Captopril, wobei Cys-AMC als Substrat für LTA4H verwendet wurde.

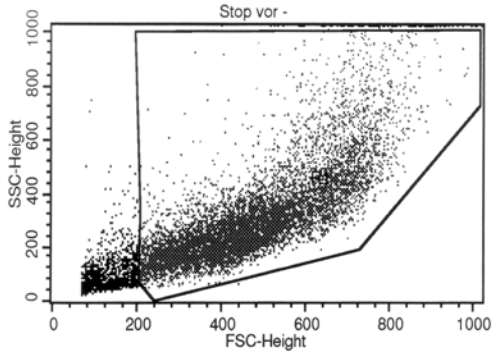
Puromycin ist dabei ein Problemkandidat, da es cytotoxisch ist und damit eigentlich von vornherein ausscheidet, was man auch an der sehr viel niedrigeren Umsatzrate im entsprechenden Diagramm nach 6 h erkennen kann. Zudem zeigt sich, dass die inkubierten

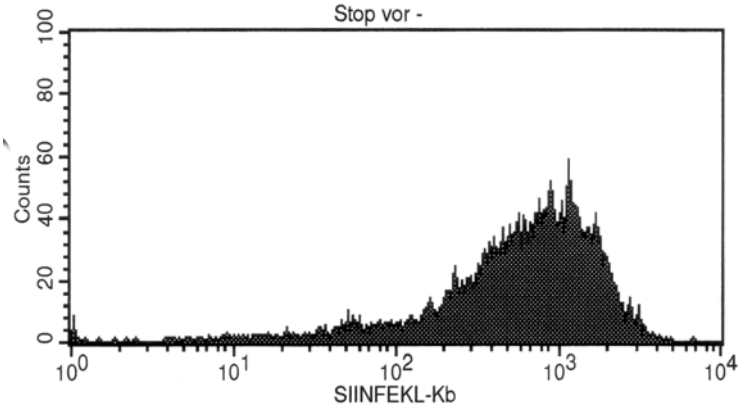
Zellen noch deutlich nachträglich hemmbar sind. Somit ist es nicht für diese Studien geeignet. Bei E64 ist eindeutig zu erkennen, dass nach der Inkubation keine weitere Hemmung auftritt. Damit ist das membrangängige E64 ideal zur Inhibierung von BH in der lebendigen Zelle. Bei der gleichen Analyse lässt sich erkennen, dass beide Inhibitoren, Arphamenin A und Captopril, nicht membrangängig sind und damit ausscheiden. Dies zeigt sich wiederum an der starken nachträglichen Hemmung und dem im Vergleich zur nicht gehemmten Aminosäure unveränderten Umsatz. Somit bleibt als direkt einsetzbarer Inhibitor bei Studien im Zell-System nur E64 übrig. Puromycin, Arphamenin A und Captopril sind nicht membrangängig und können somit nicht verwendet werden. Für weiterführende *in vivo*-Studien wird es deswegen nötig sein auf das siRNA-System umzusteigen anstatt mit Inhibitoren zu arbeiten. Insbesondere bei der Bestimmung des Anteils jeder einzelnen Aminopeptidase an den tatsächlichen Prozessierungsvorgängen von Epitopen in der Zelle wird der Einsatz der für jede Hauptaktivität spezifischen siRNA viele neue Erkenntnisse liefern.

5.10 Nachweis des finalen Trimmings im ER am Beispiel des Ovalbumin-H2-K^b-Epitops SIINFEKL

Da nun die Hauptaktivität für den Glutamat-Abbau im Cytosol bekannt ist, nämlich die Bleomycin-Hydrolase, und mit E64 ein guter Inhibitor für das Zell-System vorhanden ist, kann man den bevorzugten Abbau der letzten Aminosäuren vor einem Epitop im ER zumindest in einem beispielhaften Fall nachweisen. Hierbei bietet sich das Ovalbumin-H2-K^b-Epitop SIINFEKL (Carbone et al., 1988; Rotzschke et al., 1991; Falk et al., 1993) an, das vom Proteasom zu einem Großteil als N-terminal verlängerter Vorläufer gebildet wird und deshalb von Aminopeptidasen nachträglich noch weiter getrimmt werden muss. Der unmittelbare Vorläufer (ESIINFEKL) ist um ein Glutamat verlängert und sollte somit im Falle eines cytosolischen Trimmings zu einem Großteil von der BH abhängig sein. Falls der letzte Schritt jedoch im ER abläuft, sollte die BH keine Rolle spielen.

In diesem Versuch wurde nun durch das membrangängige E64 spezifisch die cytosolische Glutamat-abbauende BH inhibiert und die Effizienz der Epitop-Generierung untersucht. Falls nun die Abspaltung im Cytosol geschieht, dann sollte die SIINFEKL-Bildung stark vermindert sein. Falls sie ausschließlich im ER stattfindet, dann sollte die Inhibierung keinerlei Effekt haben. Für diesen Nachweis wurden spezielle 293-Zellen, die zudem noch mit H2-K^b transfiziert wurden, über das Flp-In-System der Firma Invitrogen mit dem Konstrukt Ubiquitin-RASNEMMETMLEQLE-SIINFEKL-Stop stabil transfiziert. Diese wurden bis zu einer fast vollständigen Inhibierung der BH mit E64 inkubiert. Danach wurde ein Acid-Wash durchgeführt, um jegliches Peptid, das vor der Hemmung gebildet wurde, von der Oberfläche zu entfernen. Durch einen K^b-SIINFEKL-spezifischen Antikörper konnte dann mittels FACS-Analyse die Menge an neu gebildetem Epitop auf der Zelloberfläche gemessen werden (Abbildung 48).

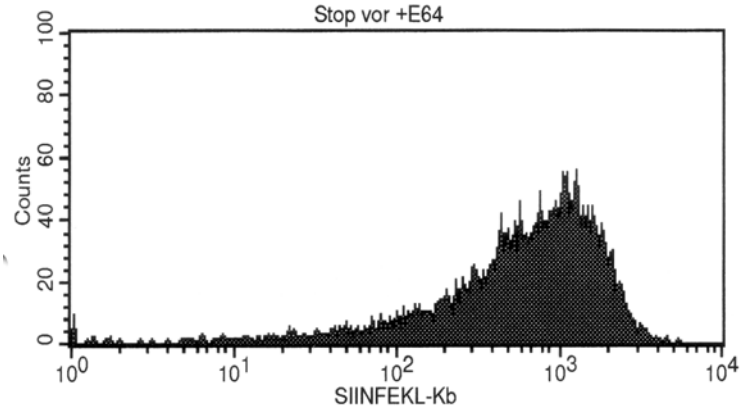




Sample ID: Stop vor -

% Total	Mean	Median
85.45	837.86	697.83

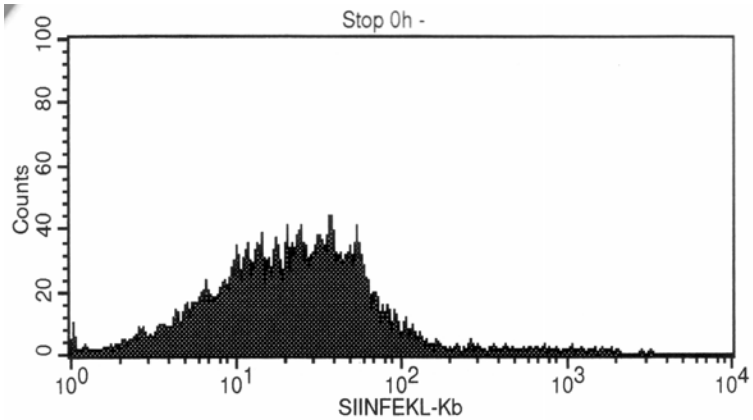
vor Acid-Wash
ohne E64



Sample ID: Stop vor +E64

% Total	Mean	Median
86.39	848.58	716.92

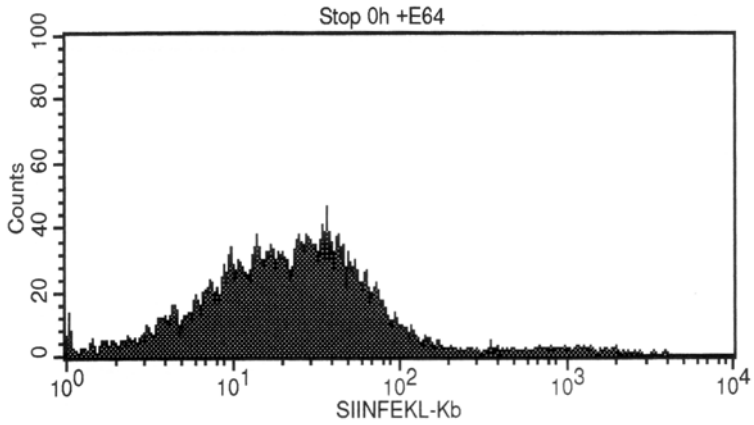
vor Acid-Wash
mit E64



Sample ID: Stop 0h -

% Total	Mean	Median
79.96	41.70	22.07

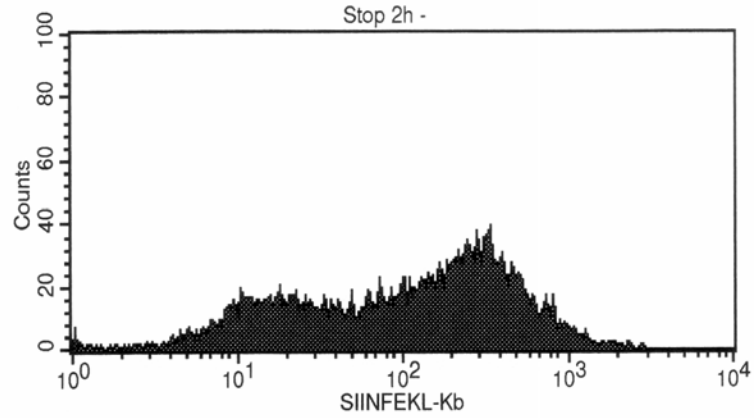
direkt nach Acid-Wash
ohne E64



Sample ID: Stop 0h +E64

% Total	Mean	Median
79.61	51.24	22.27

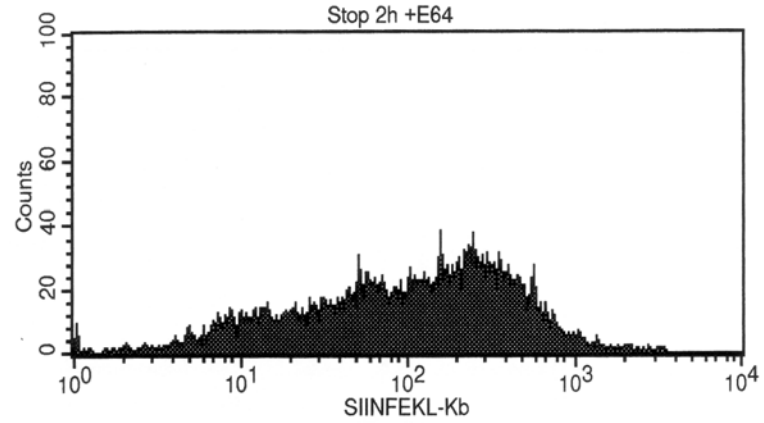
direkt nach Acid-Wash mit E64



Sample ID: Stop 2h -

% Total	Mean	Median
81.92	211.86	135.77

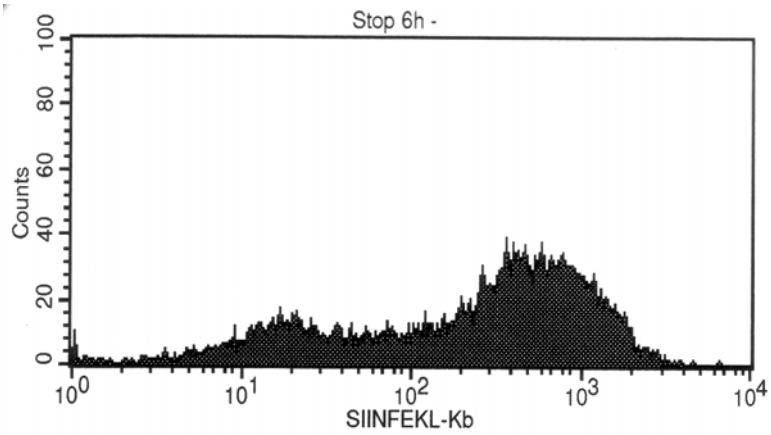
2 h nach Acid-Wash ohne E64



Sample ID: Stop 2h +E64

% Total	Mean	Median
80.83	198.55	118.64

2 h nach Acid-Wash mit E64



Sample ID: Stop 6h -

% Total	Mean	Median
84.65	488.92	355.45

6 h nach Acid-Wash ohne E64

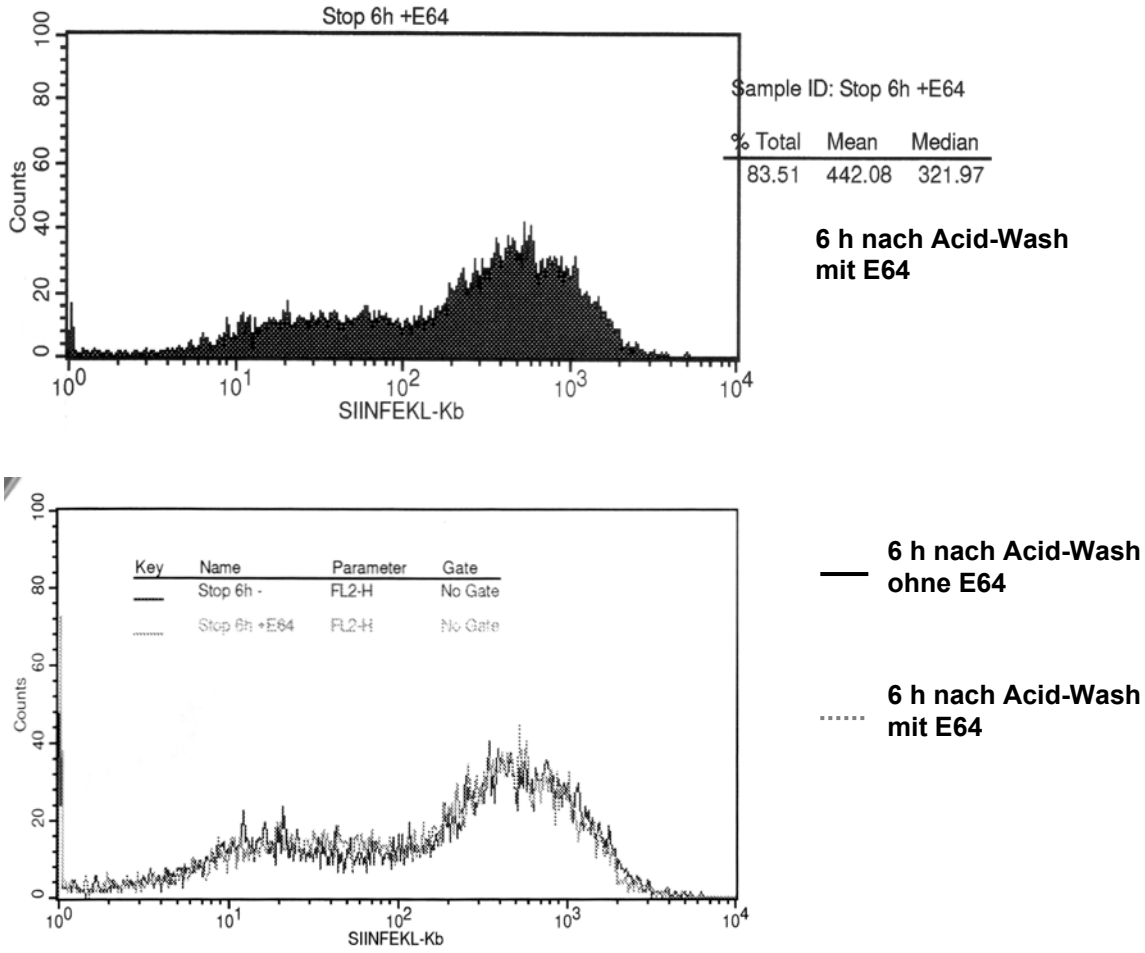


Abbildung 48: Bestimmung der Abhängigkeit der SIINFEKL-Prozessierung von der cytosolischen oder endoplasmatischen Aminopeptidase-Aktivität. Durch Inhibierung der relevanten cytosolischen Aminopeptidase-Aktivität für Glutamat lässt sich der Einfluss des Cytosols und ERs auf die Prozessierung des SIINFEKL-Vorläufers ESIINFEKL untersuchen. Dazu wurde nach der Hemmung ein Acid-Wash durchgeführt und mittels eines SIINFEKL-K^b-Antikörpers in der FACS-Analyse die Geschwindigkeit der Prozessierung durch die Menge an neu präsentiertem SIINFEKL nachgewiesen. Als Messpunkte wurden Proben vor dem Acid-Wash und 0 h, 2 h, 6 h nach dem Acid-Wash jeweils von Zellen mit und ohne E64-Inhibierung genommen.

Es lässt sich zu keiner Zeit ein Unterschied zwischen inhibierten und nicht-inhibierten Zellen bei der SIINFEKL-Prozessierung feststellen. Dies deutet darauf hin, dass für das finale Trimming von ESIINFEKL nicht die Aminopeptidase BH und damit auch nicht das Cytosol zuständig ist, sondern dies von endoplasmatischen Proteasen übernommen wird. Dieser Fund unterstützt die Ergebnisse aus dem ersten Teil dieser Arbeit, wo gezeigt werden konnte, dass die letzten 1-2 Aminosäuren eines Vorläufers im ER geschnitten werden.

6 Diskussion

Während im ersten Teil dieser Arbeit das Augenmerk auf eine Quantifizierung des Prozessierungsvorganges gerichtet war, sollte diese nun im zweiten Teil aufgelöst und im Detail analysiert werden. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit für die cytosolische Aminopeptidaseaktivität durchgeführt, wobei alle relevanten Aminopeptidasen identifiziert werden konnten. Der Unterschied zu vielen anderen Proteasenstudien liegt in dem komplett neuen Ansatz. Während gewöhnlich eine einzelne Protease für ein einzelnes Epitop untersucht wird, sollte in dieser Arbeit die Aufmerksamkeit auf das Zusammenspiel aller Aktivitäten und im Anschluss daran auf die Zerlegung der Gesamtaktivität in ihre Bestandteile mit Untersuchung der einzelnen Aminopeptidasen gerichtet werden. Dies setzt voraus, dass für die meisten Epitope auch die Hauptaktivitäten verantwortlich sind. Diese Annahme ist gerechtfertigt, da das Epitoptrimming wohl als Nebenweg des Proteinabbaus angesehen werden kann und somit wohl die aktivsten Abbauenzyme auch die aktivsten Trimmingenzyme sein sollten. Diese Hypothese wird unterstützt durch den schon vielfachen Nachweis für eine Prozessierung durch PSA, welche eine der Hauptaktivitäten im Cytosol darstellt. Ein weiteres Indiz liefert die Beobachtung, dass die PSA/BH-Doppel-Knockout-Mutante im Mausmodell letal ist, während die Einzel-Knockouts überlebensfähig sind. Daraus lässt sich auf die wichtige Bedeutung dieser beiden cytosolischen Hauptaktivitäten schließen und, dass sie zwei alternative Wege darstellen, die füreinander kompensieren können. Im Inhibitorassay zeigt sich deutlich, welche große Rolle PSA und BH zusammen spielen. Dies ist eine Tatsache, die durch den fast vollständigen Verlust der Aktivität bei der Hemmung beider Proteasen klar erkennbar ist. Was sich jedoch auch herausstellt ist, dass häufig eine kleine Restaktivität bestehen bleibt, so dass in manchen Fällen eventuell AP B oder LTA4H die Prozessierung, wenn auch mit reduzierter Geschwindigkeit, übernehmen können. Die Untersuchung der cytosolischen Aminopeptidasen im Hinblick auf den Umsatz aller 20 Aminosäuren legt offen, dass es hierfür nur drei Hauptaktivitäten gibt (PSA, BH und AP B), eine Nebenaktivität (LTA4H) und eine sehr spezifische Protease (für Aspartat), die im Folgenden nun näher beschrieben werden sollen:

Die Puromycin-sensitive Aminopeptidase (PSA) (EC 3.4.11.-) lässt sich klassifizieren als Aminopeptidase bzw. mit Bezug auf das aktive Zentrum als Metalloprotease/Zinkprotease. Das humane Enzym liegt als Monomer im Cytosol vor mit einer Länge von 919 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 103 276 Da. Eine immunohistochemische Analyse zeigt eine Lokalisation von PSA im Cytoplasma und im Nukleus und ein Assoziation mit den Mikrotubuli des Spindelapparats während der Mitose. Darüber hinaus arretieren Puromycin und Bestatin den Zellzyklus und führen zur Apoptose, was auf eine Rolle bei Zellwachstum und -überlebensfähigkeit hindeutet (Constam et al., 1995). Außerdem scheint sie als Regulator der Neuropeptidaseaktivität zu dienen, da sie Anteil am Abbau von Enkephalinen hat (Thompson and Hersh, 2003) und die häufigste Aminopeptidase im Gehirn darstellt. Sie wird jedoch auch in anderen Organen exprimiert (Tobler et al., 1997). Anhand eines PSA-K.O.-Modells konnte an Mäusen gezeigt werden, dass diese Aminopeptidase zum normalen Wachstum notwendig ist und deren Fehlen zu Zwergenwuchs führt. Des Weiteren treten Verhaltensstörungen auf, die mit Angst und Schmerz assoziiert sind (Osada et al., 1999). Ein weiterer Effekt ist die aus dem Fehlen der PSA resultierende Unfruchtbarkeit der K.O.-Mäuse (Osada et al., 2001b; Osada et al., 2001a). Als allgemeine Funktion der PSA wurde die Katalyse der Hydrolyse N-terminaler Aminosäuren von Oligo- oder Polypeptiden beschrieben. Die Wichtigkeit dieser Funktion wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass im K.O.-Modell die Aminopeptidase-Aktivität drastisch reduziert ist (Osada et al., 1999). Daraus hervorgehend ist anhand einiger Beispiele gezeigt worden, dass die PSA an der Bildung von

manchen Epitopen aus Vorläufern im MHC-Klasse I-Antigenprozessierungsweg verantwortlich ist (Stoltze et al., 2000; Levy et al., 2002).

Die Bleomycin-Hydrolase (BH) (EC 3.4.22.40), welche zur Kategorie der Aminopeptidasen, insbesondere Thiolproteasen/Cysteinproteasen, gezählt wird, hat eine Länge von 455 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 52 562 Da beim Menschen. Sie liegt als Homohexamer im Cytosol vor. Gefunden wurde sie aufgrund der Tatsache, dass sie das cytotoxische Bleomycin, welches als Medikament in der Krebsbehandlung eingesetzt wird, durch Hydrolyse einer Carboxamidbindung von β-Aminoalanin inaktiviert (Akiyama et al., 1981; Sebti and Lazo, 1988). Im Zusammenhang damit hat sich herausgestellt, dass sich die BH nicht nur löslich im Cytosol befindet, sondern auch an DNA gebunden vorliegen kann (Xu and Johnston, 1994). Eine immunohistochemische Analyse zeigt, dass diese Protease ubiquitär in den verschiedensten Geweben vorkommt (Takeda et al., 1996), was auf eine Rolle im zellulären Proteinabbau und -umsatz hindeutet (Ferrando et al., 1996). Mittels eines Hefe-zwei-Hybrid-Systems konnte auch noch ein Bindungspartner der BH in der Zelle gefunden werden. Dabei handelt es sich um das humane Analog des Hefe-Ubiquitin-konjugierenden Enzyms 9 (UBC9) (Koldamova et al., 1998a). Diese Tatsache deutet ebenfalls auf eine Rolle im intrazellulären Proteinabbau hin. Auch für diese Protease gibt es ein Maus-K.O.-Modell. Die entsprechenden Mäuse sind überlebensfähig und können sich reproduzieren, allerdings überleben nur 65% die neonatale Periode. Des Weiteren zeigen die Mäuse eine Krümmung des Schwanzes mit einer Histopathologie, die auf einem Defekt in der epidermalen Integrität beruht (Schwartz et al., 1999). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym nicht nur eine allgemeine Aminopeptidaseaktivität besitzt, sondern auch speziell eine Rolle beim Trimming von Epitopen im MHC-Klasse I-Antigenprozessierungsweg spielen könnte (Stoltze et al., 2000). Interessanterweise scheint es auch als Endopeptidase fungieren zu können (Koldamova et al., 1998b), wobei die Bedeutung dieser Funktion noch nicht geklärt ist.

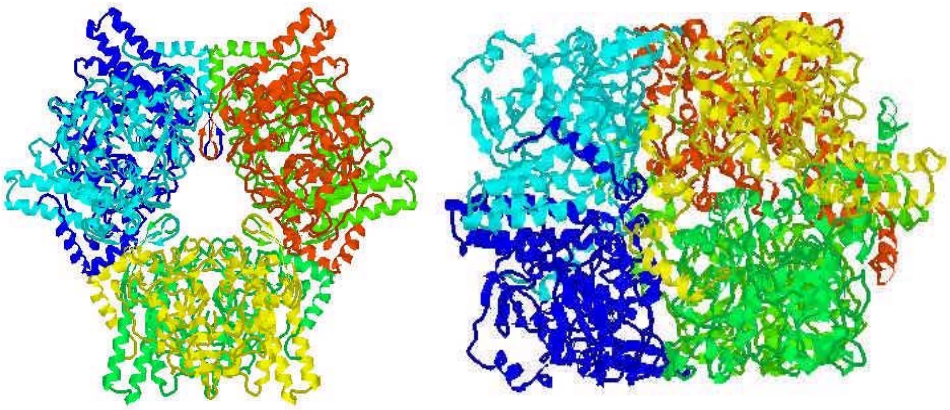


Abbildung 49: Aufbau der Bleomycin-Hydrolase.

Die Aminopeptidase B (AP B) (EC 3.4.11.6), wie der Name schon sagt eine Aminopeptidase, ist Teil der Familie der Metalloproteasen/Zinkproteasen. Das humane Enzym hat eine Länge von 650 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 72 596 Da. Beschrieben ist sie als ubiquitär vorkommende Exopeptidase, die selektiv Arginine und Lysine vom N-Terminus vieler Peptidsubstrate entfernt und damit auch eine Rolle bei der Epitopprozessierung spielen könnte (Balogh et al., 1998; Foulon et al., 1999). Diese Aktivität deckt sich mit der gefundenen Spezifität in dieser Studie. Darüber hinaus muss hinzugefügt werden, dass es sich bei dem Enzym, laut den Ergebnissen dieser Arbeit, auch um die Hauptaktivität für den

Prolin-Abbau handelt, was bisher noch nicht beschrieben wurde. Als speziellere Aufgabe wurde der AP B eine Rolle bei Prozessen, die die retinale neuronale Zelldifferenzierung begleiten (Piesse et al., 2004) und bei der Glucagonprozessierung zu Miniglucagon (Fontes et al., 2005) zugeschrieben.

Die in dieser Arbeit mit einem eher geringen aber dennoch merklichen Anteil am cytosolischen Abbau beteiligten Leukotrien A-4 Hydrolase (LTA4H) (EC 3.3.2.6) ist eine Metalloprotease/Zinkprotease, die ubiquitär im Gewebe verteilt ist (Izumi et al., 1986). Die Länge des cytosolischen Enzyms beträgt 610 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 69 154 Da beim Menschen. Beschrieben ist sie vornehmlich nicht im Zusammenhang mit dem Abbau von Peptiden, sondern als relevantes Enzym im dritten Schritt der Leukotrien-Biosynthese. Dabei wird ein Epoxidrest von Leukotrien A-4 (LTA-4) hydrolysiert, wobei Leukotrien B-4 (LTB-4) entsteht (Haeggstrom et al., 1985; Yokomizo et al., 1995; Chen et al., 2004). LTB-4 ist ein potentes Chemoattraktant für Leukocyten und somit stark an der Entzündungsbildung und auch bei Allergien beteiligt (Haeggstrom et al., 2002). Die Relevanz dieses Enzyms im Krankheitsfalle zeigt sich auch durch die Hochregulierung in mit SV40 transformierten Zellen (Medina et al., 1990) und dessen erwiesene Rolle bei der Pathogenese von Psoriasis (Iversen et al., 1997). Dabei hängt die Stärke der LTA4H-Expression von der Art und Weise der Immunantwort ab. IFN-γ (ein Th1-Cytokin) erhöht signifikant die LTA4H-mRNA-Expression, während IL-4 und IL-13 (Th2-Cytokine) diese vermindert (Montero et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass in einem Tiermodell für ösophageales Adenokarzinom LTA4H im Vergleich zum Normalgewebe überexprimiert war und somit stellt sie bei solchen Krebsfällen ein interessantes Behandlungsziel dar (Chen et al., 2004). Allerdings ist auch bekannt, dass die LTA4H eine Aminopeptidaseaktivität besitzt (Minami et al., 1990; Habib et al., 1999). Das Aufgabenrepertoir dieses Enzyms kann nun mit Hilfe dieser Arbeit erweitert werden. Sie spielt eine Rolle beim Abbau mancher Aminosäuren und könnte für den Verlust bzw. bei der Hemmung anderer Aminopeptidasen kompensatorische Aufgaben übernehmen. Interessanterweise gibt es zwei Isoformen, die auf zwei alternativ gespleißten mRNA-Formen beruhen (Jendraschak et al., 1996). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die LTA4H zwei Rollen im Immunsystem übernimmt. Zum einen startet sie als LTA-4-Hydrolase eine Entzündungsreaktion und initiiert somit eine lokale Immunantwort, zum anderen kann sie als Aminopeptidase aktiv an der Prozessierung von Epitopen teilnehmen.

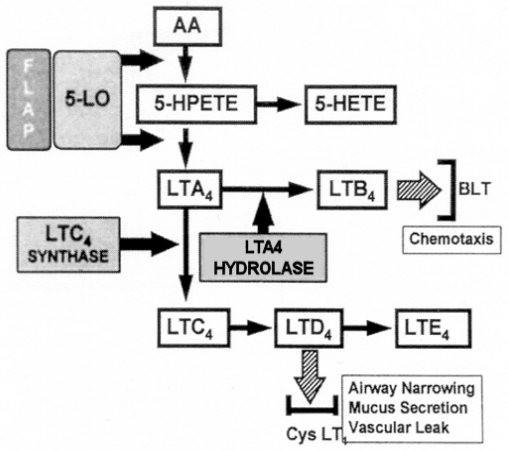


Abbildung 50: Leukotrien-Biosynthese. (Partners Asthma Center Grand Rounds, Jeffrey M. Drazen, M.D., Leukotrienes and Asthma; The Partners Asthma Center is a collaboration among allergists and pulmonologists at the Brigham and Women's, Massachusetts General, Faulkner, Newton-Wellesley Hospitals, and the North Shore Medical Center)

Die letzte Aminopeptidase bezieht sich auf die bisher fehlende Aspartat-abbauende Aktivität. Da das Enzym nicht identifiziert ist, kann über einen möglichen Kandidaten nur spekuliert werden. Die am wahrscheinlichsten erscheinendste Protease für diese Aufgabe ist die Aspartyl Aminopeptidase (EC 3.4.11.21), die als cytosolische Aminopeptidase, speziell als Metalloprotease/Zinkprotease beschrieben ist. Das Enzym liegt wahrscheinlich als Homooctamer vor, wobei die Monomere beim Menschen eine Länge von 475 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 52 428 Da besitzen. Das Enzym ist in einer relativ hohen Konzentration in allen Geweben zu finden und als Funktion wurde eine Rolle im intrazellulären Protein- und Peptidmetabolismus vorgeschlagen. Dabei zeigt es eine Spezifität für Aspartat und Glutamat mit Präferenz für Aspartat (Wilk et al., 1998). Mittels der Inhibitorstudien konnte zwar in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Glutamatabbau fast ausschließlich von der BH übernommen wird, die betonte Präferenz der Aspartyl Aminopeptidase für Aspartat legt es dennoch nahe, dass dieses Enzym für die noch fehlende Aktivität verantwortlich ist. Diese Protease wurde zudem mit dem menschlichen Alterungsprozess, insbesondere mit alterungsbedingten Modifikationen des cerebralen Proteasesystems, in Verbindung gebracht. Es wurde ein signifikanter alterungsabhängiger Rückgang der Aspartyl Aminopeptidase-Aktivität in den frontalen, parietalen und occipitalen Cortices nachgewiesen, was zu einer Modifikation der Konzentration an den cytotoxischen Aminosäuren Glutamat und Aspartat führen könnte (Iribar et al., 1997).

Mit der in dieser Arbeit gewonnenen Kenntnisse über die relevanten Aminopeptidaseaktivitäten sollte es nun möglich sein, das N-terminale Epitoptrimming im Cytosol mit den zugehörigen Aktivitäten nicht nur beschreiben, sondern auch vorhersagen zu können. Anhand der N-terminalen Aminosäuresequenz lässt sich nun leicht abschätzen, welches die relevanten Aktivitäten für das Trimming sind. Jedoch sollte nicht vergessen werden, dass nicht nur cytosolische Aminopeptidasen eine Rolle bei der Prozessierung spielen, sondern auch Endopeptidasen, endoplasmatische Aminopeptidasen und natürlich die TAP-Spezifität. Da, wie im ersten Teil der Arbeit gezeigt, das finale Trimming häufig im ER stattfindet, muss der Anteil der cytosolischen Aminopeptidasen wohl eher weiter vorne gesucht werden. Diese Tatsache wurde noch einmal in dem letzten Versuch dieser Arbeit mit dem nicht-cytosolischen Trimming von einem N-terminal verlängerten SIINFEKL verdeutlicht. Daher wäre es nun interessant auch noch die endoplasmatischen Hauptaktivitäten zu charakterisieren. Mit Hilfe dieser und den schon vorhandenen Daten über Proteasom, TAP und Aminopeptidasen ließe sich dann die aminoterminale Prozessierung eines beliebigen Epitops einzelnen Proteasen in der Zelle zuordnen.

Obwohl viele Aminopeptidasen ihre Spezifität auch bei Einfachsubstraten offen legen, wäre es als nächster Schritt wichtig zu zeigen, dass die identifizierten Aminopeptidasen auch tatsächlich *in vivo* eine Rolle spielen. Da viele Inhibitoren nicht membrangängig sind, würde sich das siRNA-System hierzu anbieten, das zudem noch eine höhere Spezifität aufweist. Hierbei sollte jeweils eine Protease oder eine Kombination von mehreren durch spezifische siRNAs transient ausgeschaltet und der Einfluss des Fehlens auf die Prozessierung verschiedener Epitope untersucht werden. Damit ließen sich die Versuche mit den Einfachsubstraten bestätigen und eine *in vivo*-Relevanz nachweisen.

Bisher wurde die proteolytische Aktivität nur im Hinblick auf ihre Generierung von Epitopen betrachtet. Es muss jedoch auch bedacht werden, dass diese nicht nur Epitope bilden, sondern genauso auch zerstören kann. Endopeptidasen können Epitope in der Mitte zerschneiden und Exopeptidasen das fertige Epitop einfach weiter abbauen. Diese Tatsache ist auch von Belang in der medizinischen Anwendung. Durch gezielte Inhibierung verschiedener Aminopeptidasen ließe sich in Epitop-Verhältnisse eingreifen, wobei manche mehr und

manche weniger präsentiert würden bzw. eventuell auch manche komplett verschwinden und neue entstehen könnten. Unabhängig von der Prozessierung kann es auch medizinisch interessant sein in den Peptidabbau selbst einzugreifen. Im Mai 2004 wurde das neue Medikament Bortezomib (Velcade®) zur Behandlung von Patienten mit Multiplem Myelom (MM) in Europa zugelassen, wobei es sich um den ersten Vertreter der neuen Substanzklasse der Proteasom-Hemmer handelt. Von der Inhibierung des Proteinabbaus sind natürlich insbesondere Zellen mit hohem Umsatz betroffen. Dies trifft gerade auf Krebszellen zu, weshalb bei einer Hemmung des Proteasoms die Zelle durch eigene Abfallprodukte vergiftet wird und stirbt. Die Wirksamkeit eines solchen Medikaments könnte eventuell durch die Hemmung anderer am Proteinabbau beteiligter Enzyme weiter gesteigert werden. Die durch diese Arbeit identifizierten dominanten Aminopeptidasen könnten durchaus ein mögliches Ziel für solch einen Inhibitor sein.

7 Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden immer mehr Kenntnisse über den MHC-Klasse I-Antigenprozessierungsweg gesammelt und viele Einzelheiten im Detail untersucht. Damit ist es nun nicht nur möglich die einzelnen Schritte nachzuverfolgen, sondern auch einige von ihnen vorherzusagen. Besonderes Augenmerk wurde auf den proteasomalen Abbau, den TAP-Transport und die Bindung an das MHC-Molekül gelegt, von denen auch Vorhersagealgorithmen existieren. Da das Proteasom in den meisten Fällen für den Schnitt am C-Terminus des Epitops verantwortlich ist, lässt sich auch dieser schon sehr gut beschreiben. Die großen Unbekannten bei der Klasse I-Prozessierung sind jedoch immer noch die Aminopeptidasen, die im Cytosol wie auch im ER das Epitop schließlich auf die endgültige Größe trimmen können. Dabei wird auch der N-Terminus des Epitops generiert und ließe sich somit zu einem gewissen Prozentsatz über die Spezifität der Peptidasen beschreiben. Im Laufe dieser Arbeit sollten die Aminopeptidasen und damit auch die Generierung des Epitop-N-Terminus untersucht und damit die letzte große Lücke bei der MHC-Klasse I-Antigenprozessierung geschlossen werden.

Im ersten Teil des Projekts wurde dabei die Breitspektrenanalyse, eine Kombination von biostatistischer und biochemischer Analyse verwendet, um die allgemeinen Vorgänge bei der Prozessierung des N-Terminus zu untersuchen und der Einfluss von cytosolischen und endoplasmatischen Aminopeptidasen auf dessen Generierung nachzuweisen. Wichtig war hierbei, dass nicht der Weg eines individuellen Epitops, sondern der eines Durchschnittsepitops verfolgt wurde, was nur diese Art von Analyse ermöglicht. Da keinerlei Daten zur cytosolischen und endoplasmatischen Aminopeptidaseaktivität existierten, wurden diese zuerst durch Aufreinigung der jeweiligen Kompartimente und anschließendem Umsatz eines Satzes bestehend aus allen 20 fluorogenen Ein-Aminosäure-AMC-Substraten gewonnen. Die bestehenden Daten über das Proteasom und TAP und die neu generierten über cytosolische und endoplasmatische Aminopeptidasen konnten nun mit den Aminosäuren N-terminal von um die 900 Epitopen aus der SYFPEITHI-Datenbank verglichen werden. Schon bei der Untersuchung möglicher Epitopvorläufer hat sich gezeigt, dass in einer ungefähr 7 Aminosäure-langen Sequenz upstream des N-Terminus von Epitopen die Aminosäuren nicht zufällig vorkommen, sondern es gewisse Bevorzugungen gibt. Diese Sequenz soll nun als N-terminales Prozessierungsmotiv bezeichnet werden. Bei dem Vergleich mit der Proteasom- und TAP-Spezifität stellte sich heraus, dass innerhalb dieses Motivs nicht nur präferenziell geschnitten, sondern auch diese Vorläufer bevorzugt transportiert werden. Damit lässt sich das Vorhandensein des Prozessierungsmotivs zum Teil auf die Spezifitäten von Proteasom und TAP zurückführen. Wenn man nun die Längenpräferenz von TPPII in Betracht zieht, die bei Peptiden unter 16 Aminosäuren liegt, kann man erkennen, dass auch diese Protease innerhalb des Prozessierungsmotivs schneiden muss. Bei einem genauen Vergleich zeigt sich jedoch, dass es auch Aminosäurebevorzugungen an bestimmten Positionen gibt, die sich nicht durch das Proteasom oder TAP begründen lassen. Diese jedoch lassen sich erklären, wenn man die Spezifitäten der Aminopeptidasen in Betracht zieht. Bei diesem Vergleich stellt sich heraus, dass die letzten beiden Aminosäuren direkt vor dem N-Terminus eines Epitops eine deutliche Bevorzugung für ein Trimming durch endoplasmatische Aminopeptidasen zeigen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die letzten beiden Positionen vieler MHC-Klasse I-Liganden-Vorläufer im ER durch Aminopeptidasen geschnitten werden. Dieser Fund wird bestätigt zum einen durch die im Detail bekannte Prozessierung des murinen Cytomegalovirus pp89 immunodominanten H-2L^d Epitops YPHFMPTNL und zum anderen durch eine in dieser

Arbeit durchgeführte Analyse der Prozessierung des Ovalbumin-H-2K^b-Epitops SIINFEKL. Um mehr Informationen über diese Prozessierung im ER zu erhalten, wurde die einzige bisher bewiesenermaßen mit Antigenprozessierung in Verbindung gebrachte endoplasmatische Aminopeptidase ERAP1 untersucht. Dabei zeigte sich, dass diese nicht alle Aktivitäten im ER, die eine gewisse Relevanz für die Spezifität des Prozessierungsmotivs besitzen, abdeckt. Hieraus lässt sich schließen, dass es noch andere Aminopeptidasen im ER geben muss, die sehr wahrscheinlich auch eine Rolle bei den letzten Trimmschritten von Epitopvorläufern spielen.

Während im ersten Teil dieser Arbeit nun die allgemeinen Prozessierungsvorgänge, insbesondere im Hinblick auf Aminopeptidasen, untersucht wurden, sollte im zweiten Teil die Gesamtaminopeptidaseaktivität in ihre Einzelteile zerlegt und diese im Detail analysiert werden. Dazu wurde Cytosol zuerst aufgereinigt und dann über einen Anionenaustauscher aufgetrennt. Anschließend wurde eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt und der aktive Überstand mit einer Phenyl-Sepharose-Säule durch hydrophobe Wechselwirkungen weiter aufgereinigt. Als nächster Schritte wurden die entsprechenden Fraktionen aufkonzentriert und über eine Gelfiltration von Verunreinigungen abgetrennt, während hierbei auch gleichzeitig noch die ungefähre Molekülmasse bestimmt werden konnte. Bei der letzten Säule handelt es sich um einen hochauflösenden Anionenaustauscher, nach dem die entsprechenden Aminopeptidaseaktivitäten auf ein Gel geladen und nach SDS-PAGE durch MALDI/Tandem-MS identifiziert wurden. Relevante Aktivitäten wurden zum einen über Tests mit allen 20 Ein-Aminosäure-Substraten und zum anderen durch verschiedene Inhibitoren bestimmt. Dabei hat sich herausgestellt, dass es im Cytosol drei Hauptaktivitäten und zwei Nebenaktivitäten gibt. Zu den drei wichtigsten Aminopeptidasen zählen die Puromycin-sensitive Aminopeptidase (PSA) und die Bleomycin-Hydrolase (BH), die zusammen schon einen Großteil abdecken. Die dritte Aminopeptidase ist die Aminopeptidase B (AP B), die fast exklusiv für Lysin, Arginin und Prolin zuständig ist. Die zwei kleineren cytosolischen Aktivitäten sind die Leukotrien A-4 Hydrolase (LTA4H), mit einem beträchtlichen Anteil am Cystein-Umsatz und einem kleineren an dem anderer Aminosäuren, und eine Aspartat-abbauende Aminopeptidase, bei der es sich um die Aspartyl Aminopeptidase handeln könnte. Um nun den Einfluss *in vivo* untersuchen zu können, wurden die als spezifisch im Sinne ihrer Verwendung getesteten Inhibitoren Puromycin für PSA, E64 für BH, Arphamenin A für AP B und Captopril für LTA4H auf ihre Membrangängigkeit hin analysiert. Da hierbei nur E64 positiv war, muss für weitere Versuche auf das siRNA-System ausgewichen werden. Damit sollte es möglich sein, den Einfluss dieser fünf Proteasen auf die Prozessierung von verschiedenen Epitopen in der Zelle selbst zu bestimmen. Interessant wäre es nun auch die Aminopeptidasen im ER weiter zu untersuchen, wobei erst zwei davon, ERAP1 und L-RAP (ERAP2) bekannt sind. Mit diesem Wissen ließe sich das Bild der MHC-Klasse I-Antigenprozessierung komplettieren. Damit wäre es auch möglich, die Entstehung des N-Terminus von Epitopen individuell vorhersagen zu können, ein Aspekt der für die Immunisierung und Krankheitsbehandlung gleichermaßen von Interesse wäre.

8 Abkürzungen

ABC	ATP-binding Cassette
A-LAP	Adipocyte-derived Leucine Aminopeptidase
AMC	7-Amido-4-methylcoumarin
AP B	Aminopeptidase B
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BH	Bleomycin-Hydrolase
BSA	Bovines Serumalbumin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CLIP	Class II-associated Invariant Chain Peptide
CTL	Cytotoxische T-Lymphocyte
CV	Column Volume
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRiPs	Defective Ribosomal Products
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAAP	ER-associated Aminopeptidase
ERAP1	ER Aminopeptidase 1
ERAP2	ER Aminopeptidase 2
FACS	Fluorescence-assisted Cell Sorting
FCS	Fötales Kälberserum
GF	Gelfiltration
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HIC	Hydrophobic Interaction Chromatography
HLA	Human Leukocyte Antigen
IEC	Ion Exchange Chromatography
IFN	Interferon
Ii	Invariante Kette
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl ß-D-1-thiogalactopyranosid
LAP	Leucin-Aminopeptidase
LMP	Low Molecular Weight Protein
LPS	Lipopolysaccharid
L-RAP	Leukocyte-derived Arginine Aminopeptidase
LTA4H	Leukotrien A-4 Hydrolase
MALDI	Matrix-assisted Desorption Ionization
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIIC	MHC Class II Compartment
MS	Massenspektrometrie
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMs	Pathogen-associated Molecular Patterns
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction

PFA	Paraformaldehyd
PILS-AP	Puromycin-insensitive Leucyl-specific Aminopeptidase
PSA	Puromycin-sensitive Aminopeptidase
RFU	Real Fluorescence Unit
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ß-NA	ß-Naphthylamid
TAP	Transporter associated with Antigen Processing
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TOP	Thimet Oligopeptidase
TPPII	Tripeptidylpeptidase II
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
β_2m	β_2-Mikroglobulin

9 Literatur

Akiyama,S., Ikezaki,K., Kuramochi,H., Takahashi,K., and Kuwano,M. (1981). Bleomycin-resistant cells contain increased bleomycin-hydrolase activities. Biochem. Biophys. Res. Commun. *101*, 55-60.

Altuvia,Y. and Margalit,H. (2000). Sequence signals for generation of antigenic peptides by the proteasome: implications for proteasomal cleavage mechanism. J. Mol. Biol. *295*, 879-890.

Balogh,A., Cadel,S., Foulon,T., Picart,R., Der,G.A., Rousselet,A., Tougard,C., and Cohen,P. (1998). Aminopeptidase B: a processing enzyme secreted and associated with the plasma membrane of rat pheochromocytoma (PC12) cells. J. Cell Sci. *111 (Pt 2)*, 161-169.

Beninga,J., Rock,K.L., and Goldberg,A.L. (1998). Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. J. Biol. Chem. *273*, 18734-18742.

Bhasin,M. and Raghava,G.P. (2004). Analysis and prediction of affinity of TAP binding peptides using cascade SVM. Protein Sci. *13*, 596-607.

Boes,B., Hengel,H., Ruppert,T., Multhaup,G., Koszinowski,U.H., and Kloetzel,P.M. (1994). Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. J. Exp. Med. *179*, 901-909.

Brouwenstijn,N., Serwold,T., and Shastri,N. (2001). MHC class I molecules can direct proteolytic cleavage of antigenic precursors in the endoplasmic reticulum. Immunity *15*, 95-104.

Brusic,V., van Endert,P., Zeleznikow,J., Daniel,S., Hammer,J., and Petrovsky,N. (1999). A neural network model approach to the study of human TAP transporter. In Silico. Biol. *1*, 109-121.

Carbone,F.R., Moore,M.W., Sheil,J.M., and Bevan,M.J. (1988). Induction of cytotoxic T lymphocytes by primary in vitro stimulation with peptides. J. Exp. Med. *167*, 1767-1779.

Cascio,P., Hilton,C., Kisselev,A.F., Rock,K.L., and Goldberg,A.L. (2001). 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. Embo Journal *20*, 2357-2366.

Chen,X., Wang,S., Wu,N., and Yang,C.S. (2004). Leukotriene A4 hydrolase as a target for cancer prevention and therapy. Curr. Cancer Drug Targets. *4*, 267-283.

Constam,D.B., Tobler,A.R., Rensing-Ehl,A., Kemler,I., Hersh,L.B., and Fontana,A. (1995). Puromycin-sensitive aminopeptidase. Sequence analysis, expression, and functional characterization. J. Biol. Chem. *270*, 26931-26939.

Craiu,A., Akopian,T., Goldberg,A., and Rock,K.L. (1997). Two distinct proteolytic processes in the generation of a major histocompatibility complex class I-presented peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *94*, 10850-10855.

Daniel,S., Brusic,V., Caillat-Zucman,S., Petrovsky,N., Harrison,L., Riganelli,D., Sinigaglia,F., Gallazzi,F., Hammer,J., and van Endert,P.M. (1998). Relationship between peptide selectivities of human transporters associated with antigen processing and HLA class I molecules. J. Immunol. *161*, 617-624.

Del Val,M. and Lopez,D. (2002). Multiple proteases process viral antigens for presentation by MHC class I molecules to CD8(+) T lymphocytes. Mol. Immunol. *39*, 235-247.

Dengjel,J., Schoor,O., Fischer,R., Reich,M., Kraus,M., Muller,M., Kreymborg,K., Altenberend,F., Brandenburg,J., Kalbacher,H., Brock,R., Driessen,C., Rammensee,H.G., and Stevanovic,S. (2005). From the Cover: Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *102*, 7922-7927.

Dick,T.P., Bangia,N., Peaper,D.R., and Cresswell,P. (2002). Disulfide bond isomerization and the assembly of MHC class I-peptide complexes. Immunity *16*, 87-98.

Dubiel,W., Pratt,G., Ferrell,K., and Rechsteiner,M. (1992). Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. J. Biol. Chem. *267*, 22369-22377.

Elliott,T., Willis,A., Cerundolo,V., and Townsend,A. (1995). Processing of major histocompatibility class I-restricted antigens in the endoplasmic reticulum. J. Exp. Med. *181*, 1481-1491.

Emmerich,N.P., Nussbaum,A.K., Stevanovic,S., Priemer,M., Toes,R.E., Rammensee,H.G., and Schild,H. (2000). The human 26 S and 20 S proteasomes generate overlapping but different sets of peptide fragments from a model protein substrate. J. Biol. Chem. *275*, 21140-21148.

Falk,K., Rotzschke,O., Faath,S., Goth,S., Graef,I., Shastri,N., and Rammensee,H.G. (1993). Both human and mouse cells expressing H-2Kb and ovalbumin process the same peptide, SIINFEKL. Cell Immunol. *150*, 447-452.

Falk,K., Rotzschke,O., and Rammensee,H.G. (1990). Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. Nature *348*, 248-251.

Ferrando,A.A., Velasco,G., Campo,E., and Lopez-Otin,C. (1996). Cloning and expression analysis of human bleomycin hydrolase, a cysteine proteinase involved in chemotherapy resistance. Cancer Res. *56*, 1746-1750.

Fontes,G., Lajoix,A.D., Bergeron,F., Cadel,S., Prat,A., Foulon,T., Gross,R., Dalle,S., Le Nguyen,D., Tribillac,F., and Bataille,D. (2005). Miniglucagon (MG)-generating endopeptidase, which processes glucagon into MG, is composed of N-arginine dibasic convertase and aminopeptidase B. Endocrinology *146*, 702-712.

Foulon,T., Cadel,S., and Cohen,P. (1999). Aminopeptidase B (EC 3.4.11.6). Int. J. Biochem. Cell Biol. *31*, 747-750.

Fruci,D., Niedermann,G., Butler,R.H., and van Endert,P.M. (2001). Efficient MHC class I-independent amino-terminal trimming of epitope precursor peptides in the endoplasmic reticulum. Immunity *15*, 467-476.

Geier,E., Pfeifer,G., Wilm,M., Lucchiari-Hartz,M., Baumeister,W., Eichmann,K., and Niedermann,G. (1999). A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. Science *283*, 978-981.

Gil-Torregrosa,B.C., Castano,A.R., Lopez,D., and Del Val,M. (2000). Generation of MHC class I peptide antigens by protein processing in the secretory route by furin. Traffic. *1*, 641-651.

Gil-Torregrosa,B.C., Raul,C.A., and Del Val,M. (1998). Major histocompatibility complex class I viral antigen processing in the secretory pathway defined by the trans-Golgi network protease furin. J. Exp. Med. *188*, 1105-1116.

Groll,M., Ditzel,L., Lowe,J., Stock,D., Bochtler,M., Bartunik,H.D., and Huber,R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 A resolution. Nature *386*, 463-471.

Habib,G.M., Cuevas,A.A., Barrios,R., and Lieberman,M.W. (1999). Mouse leukotriene A4 hydrolase is expressed at high levels in intestinal crypt cells and splenic lymphocytes. Gene *234*, 249-255.

Haeggstrom,J., Radmark,O., and Fitzpatrick,F.A. (1985). Leukotriene A4-hydrolase activity in guinea pig and human liver. Biochim. Biophys. Acta *835*, 378-384.

Haeggstrom,J.Z., Kull,F., Rudberg,P.C., Tholander,F., and Thunnissen,M.M. (2002). Leukotriene A4 hydrolase. Prostaglandins Other Lipid Mediat. *68-69*, 495-510.

Henderson,R.A., Michel,H., Sakaguchi,K., Shabanowitz,J., Appella,E., Hunt,D.F., and Engelhard,V.H. (1992). HLA-A2.1-associated peptides from a mutant cell line: a second pathway of antigen presentation. Science *255*, 1264-1266.

Hershko,A. and Ciechanover,A. (1998). The ubiquitin system. Annu. Rev. Biochem. *67*, 425-479.

Holzhutter,H.G., Frommel,C., and Kloetzel,P.M. (1999). A theoretical approach towards the identification of cleavage-determining amino acid motifs of the 20 S proteasome. Journal of Molecular Biology *286*, 1251-1265.

Iribar,M.C., Esteban,M.J., and Peinado,J.M. (1997). [Age-related changes in the cytolytic activity of aspartyl aminopeptidase in the cerebral cortex of the rat]. Rev. Neurol. *25*, 37-39.

Iversen,L., Kragballe,K., and Ziboh,V.A. (1997). Significance of leukotriene-A4 hydrolase in the pathogenesis of psoriasis. Skin Pharmacol. *10*, 169-177.

Izumi,T., Shimizu,T., Seyama,Y., Ohishi,N., and Takaku,F. (1986). Tissue distribution of leukotriene A4 hydrolase activity in guinea pig. Biochem. Biophys. Res. Commun. *135*, 139-145.

Janeway CA Travers P,W.M.C.J. (2005). Immunobiology: the immune system in health and disease.

Janeway,C.A., Travers,P., Walport,M., and Capra,J.D. (1999). Immunobiology: the immune system in health and disease. Current Biology Publications, Garland Publishing, Churchill Livingstone).

Jendraschak,E., Kaminski,W.E., Kiefl,R., and von Schacky,C. (1996). The human leukotriene A4 hydrolase gene is expressed in two alternatively spliced mRNA forms. Biochem. J. *314 (Pt 3)*, 733-737.

Jentsch,S. and Schlenker,S. (1995). Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. Cell *82*, 881-884.

Kesmir,C., Nussbaum,A.K., Schild,H., Detours,V., and Brunak,S. (2002). Prediction of proteasome cleavage motifs by neural networks. Protein Eng 2002. Apr;15. (4):287. -96. *15*, 287-296.

Kessler,J.H., Beekman,N.J., Bres-Vloemans,S.A., Verdijk,P., van Veelen,P.A., Kloosterman-Joosten,A.M., Vissers,D.C., ten Bosch,G.J., Kester,M.G., Sijts,A., Wouter,D.J., Ossendorp,F., Offringa,R., and Melief,C.J. (2001). Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. J. Exp. Med. *193*, 73-88.

Kim,S.I., Pabon,A., Swanson,T.A., and Glucksman,M.J. (2003). Regulation of cell-surface major histocompatibility complex class I expression by the endopeptidase EC3.4.24.15 (thimet oligopeptidase). Biochem. J. *375*, 111-120.

Kisselev,A.F., Akopian,T.N., Woo,K.M., and Goldberg,A.L. (1999). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. J. Biol. Chem. *274*, 3363-3371.

Kloetzel,P.M. (2004). Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. Nat. Immunol. *5*, 661-669.

Knuehl,C., Spee,P., Ruppert,T., Kuckelkorn,U., Henklein,P., Neefjes,J., and Kloetzel,P.M. (2001). The murine cytomegalovirus pp89 immunodominant H-2Ld epitope is generated and translocated into the endoplasmic reticulum as an 11-mer precursor peptide. J. Immunol. *167*, 1515-1521.

Koldamova,R.P., Lefterov,I.M., DiSabella,M.T., and Lazo,J.S. (1998a). An evolutionarily conserved cysteine protease, human bleomycin hydrolase, binds to the human homologue of ubiquitin-conjugating enzyme 9. Mol. Pharmacol. *54*, 954-961.

Koldamova,R.P., Lefterov,I.M., Gadjeva,V.G., and Lazo,J.S. (1998b). Essential binding and functional domains of human bleomycin hydrolase. Biochemistry *37*, 2282-2290.

Komlosh,A., Momburg,F., Weinschenk,T., Emmerich,N., Schild,H., Nadav,E., Shaked,I., and Reiss,Y. (2001). A role for a novel luminal endoplasmic reticulum aminopeptidase in final trimming of 26 S proteasome-generated major histocompatability complex class I antigenic peptides. J. Biol. Chem. *276*, 30050-30056.

Kopito,R.R. (1997). ER quality control: the cytoplasmic connection. Cell *88*, 427-430.

Lapham,C.K., Bacik,I., Yewdell,J.W., Kane,K.P., and Bennink,J.R. (1993). Class I molecules retained in the endoplasmic reticulum bind antigenic peptides. J. Exp. Med. *177*, 1633-1641.

Levy,F., Burri,L., Morel,S., Peitrequin,A.L., Levy,N., Bachi,A., Hellman,U., Van den Eynde,B.J., and Servis,C. (2002). The final N-terminal trimming of a subaminoterminal proline-containing HLA class I-restricted antigenic peptide in the cytosol is mediated by two peptidases. J. Immunol. *169*, 4161-4171.

Lindquist,J.A., Jensen,O.N., Mann,M., and Hammerling,G.J. (1998). ER-60, a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly. EMBO J. *17*, 2186-2195.

Lobigs,M., Chelvanayagam,G., and Mullbacher,A. (2000). Proteolytic processing of peptides in the lumen of the endoplasmic reticulum for antigen presentation by major histocompatibility class I. Eur. J. Immunol. *30*, 1496-1506.

Lopez,D. and Del Val,M. (1997). Selective involvement of proteasomes and cysteine proteases in MHC class I antigen presentation. J. Immunol. *159*, 5769-5772.

Lopez,D., Gil-Torregrosa,B.C., Bergmann,C., and Del Val,M. (2000). Sequential cleavage by metallopeptidases and proteasomes is involved in processing HIV-1 ENV epitope for endogenous MHC class I antigen presentation. J. Immunol. *164*, 5070-5077.

Lucchiari-Hartz,M., van Endert,P.M., Lauvau,G., Maier,R., Meyerhans,A., Mann,D., Eichmann,K., and Niedermann,G. (2000). Cytotoxic T lymphocyte epitopes of HIV-1 Nef: Generation of multiple definitive major histocompatibility complex class I ligands by proteasomes. Journal of Experimental Medicine *191*, 239-252.

Lund,O., Nielsen,M., Kesmir,C., Christensen,J.K., Lundegaard,C., Worning,P., and Brunak,S. (2002). Web-based Tools for Vaccine Design. In HIV Molecular Immunology 2002, B.T.Korber, C.Brander, B.F.Haynes, R.Koup, C.Kuiken, J.P.Moore, B.D.Walker, and D.Watkins, eds. (Los Alamos, NM, LA-UR 03-5816: Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory), pp. 45-51.

Medina,J.F., Barrios,C., Funk,C.D., Larsson,O., Haeggstrom,J., and Radmark,O. (1990). Human fibroblasts show expression of the leukotriene-A4-hydrolase gene, which is increased after simian-virus-40 transformation. Eur. J. Biochem. *191*, 27-31.

Menoret,A., Li,Z., Niswonger,M.L., Altmeyer,A., and Srivastava,P.K. (2001). An endoplasmic reticulum protein implicated in chaperoning peptides to major histocompatibility of class I is an aminopeptidase. J. Biol. Chem. *276*, 33313-33318.

Minami,M., Ohishi,N., Mutoh,H., Izumi,T., Bito,H., Wada,H., Seyama,Y., Toh,H., and Shimizu,T. (1990). Leukotriene A4 hydrolase is a zinc-containing aminopeptidase. Biochem. Biophys. Res. Commun. *173*, 620-626.

Mo,X.Y., Cascio,P., Lemerise,K., Goldberg,A.L., and Rock,K. (1999). Distinct proteolytic processes generate the C and N termini of MHC class I-binding peptides. Journal of Immunology *163*, 5851-5859.

Montero,A., Nassar,G.M., Uda,S., Munger,K.A., and Badr,K.F. (2000). Reciprocal regulation of LTA(4) hydrolase expression in human monocytes by gamma-interferon and interleukins 4 and 13: potential relevance to leukotriene regulation in glomerular disease. Exp. Nephrol. *8*, 258-265.

Morel,S., Levy,F., Burlet-Schiltz,O., Brasseur,F., Probst-Kepper,M., Peitrequin,A.L., Monsarrat,B., Van Velthoven,R., Cerottini,J.C., Boon,T., Gairin,J.E., and Van den Eynde,B.J. (2000). Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. Immunity *12*, 107-117.

Neefjes,J.J., Momburg,F., and Hammerling,G.J. (1993). Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. Science *261*, 769-771.

Nussbaum,A.K., Kuttler,C., Hadeler,K.P., Rammensee,H.G., and Schild,H. (2001). PAProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW. Immunogenetics *53*, 87-94.

Nussbaum,A.K., Kuttler,C., Tenzer,S., and Schild,H. (2003). Using the World Wide Web for predicting CTL epitopes. Curr. Opin. Immunol. *15*, 69-74.

Ojcius,D.M., Langlade-Demoyen,P., Gachelin,G., and Kourilsky,P. (1994). Role for MHC class I molecules in selecting and protecting high affinity peptides in the presence of proteases. J. Immunol. *152*, 2798-2810.

Osada,T., Ikegami,S., Takiguchi-Hayashi,K., Yamazaki,Y., Katoh-Fukui,Y., Higashinakagawa,T., Sakaki,Y., and Takeuchi,T. (1999). Increased anxiety and impaired pain response in puromycin-sensitive aminopeptidase gene-deficient mice obtained by a mouse gene-trap method. J. Neurosci. *19*, 6068-6078.

Osada,T., Watanabe,G., Kondo,S., Toyoda,M., Sakaki,Y., and Takeuchi,T. (2001a). Male reproductive defects caused by puromycin-sensitive aminopeptidase deficiency in mice. Mol. Endocrinol. *15*, 960-971.

Osada,T., Watanabe,G., Sakaki,Y., and Takeuchi,T. (2001b). Puromycin-sensitive aminopeptidase is essential for the maternal recognition of pregnancy in mice. Mol. Endocrinol. *15*, 882-893.

Pamer,E. and Cresswell,P. (1998). Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. Annu. Rev. Immunol. *16*, 323-358.

Paz,P., Brouwenstijn,N., Perry,R., and Shastri,N. (1999). Discrete proteolytic intermediates in the MHC class I antigen processing pathway and MHC I-dependent peptide trimming in the ER. Immunity. *11*, 241-251.

Peters,B., Bulik,S., Tampe,R., van Endert,P.M., and Holzhutter,H.G. (2003a). Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors. Journal of Immunology *171*, 1741-1749.

Peters,B., Janek,K., Kuckelkorn,U., and Holzhutter,H.G. (2002). Assessment of proteasomal cleavage probabilities from kinetic analysis of time-dependent product formation. Journal of Molecular Biology *318*, 847-862.

Peters,B., Tong,W.W., Sidney,J., Sette,A., and Weng,Z.P. (2003b). Examining the independent binding assumption for binding of peptide epitopes to MHC-1 molecules. Bioinformatics *19*, 1765-1772.

Piesse,C., Cadel,S., Gouzy-Darmon,C., Jeanny,J.C., Carriere,V., Goidin,D., Jonet,L., Gourdji,D., Cohen,P., and Foulon,T. (2004). Expression of aminopeptidase B in the developing and adult rat retina. Exp. Eye Res. *79*, 639-648.

Pieters,J. (1997). MHC class II restricted antigen presentation. Curr. Opin. Immunol. *9*, 89-96.

Rammensee,H.G., Bachmann,J., Emmerich,N.P.N., Bachor,O.A., and Stevanovic,S. (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics *50*, 213-219.

Reits,E., Griekspoor,A., Neijssen,J., Groothuis,T., Jalink,K., van Veelen,P., Janssen,H., Calafat,J., Drijfhout,J.W., and Neefjes,J. (2003). Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. Immunity. *18*, 97-108.

Reits,E., Neijssen,J., Herberts,C., Benckhuijsen,W., Janssen,L., Drijfhout,J.W., and Neefjes,J. (2004). A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. Immunity *20*, 495-506.

Rock,K.L., York,I.A., and Goldberg,A.L. (2004). Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. Nat. Immunol. *5*, 670-677.

Roelse,J., Gromme,M., Momburg,F., Hammerling,G., and Neefjes,J. (1994). Trimming of TAP-translocated peptides in the endoplasmic reticulum and in the cytosol during recycling. J. Exp. Med. *180*, 1591-1597.

Rotzschke,O., Falk,K., Stevanovic,S., Jung,G., Walden,P., and Rammensee,H.G. (1991). Exact prediction of a natural T cell epitope. Eur. J. Immunol. *21*, 2891-2894.

Saric,T., Beninga,J., Graef,C.I., Akopian,T.N., Rock,K.L., and Goldberg,A.L. (2001). Major histocompatibility complex class I-presented antigenic peptides are degraded in cytosolic extracts primarily by thimet oligopeptidase. Journal of Biological Chemistry *276*, 36474-36481.

Saric,T., Chang,S.C., Hattori,A., York,I.A., Markant,S., Rock,K.L., Tsujimoto,M., and Goldberg,A.L. (2002). An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. Nature Immunology *3*, 1169-1176.

Saric,T., Graef,C.I., and Goldberg,A.L. (2004). Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases. J. Biol. Chem. *279*, 46723-46732.

Schubert,U., Anton,L.C., Gibbs,J., Norbury,C.C., Yewdell,J.W., and Bennink,J.R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. Nature *404*, 770-774.

Schwartz,D.R., Homanics,G.E., Hoyt,D.G., Klein,E., Abernethy,J., and Lazo,J.S. (1999). The neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for epidermal integrity and bleomycin resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *96*, 4680-4685.

Sebti,S.M. and Lazo,J.S. (1988). Metabolic inactivation of bleomycin analogs by bleomycin hydrolase. Pharmacol. Ther. *38*, 321-329.

Seifert,U., Maranon,C., Shmueli,A., Desoutter,J.F., Wesoloski,L., Janek,K., Henklein,P., Diescher,S., Andrieu,M., de la,S.H., Weinschenk,T., Schild,H., Laderach,D., Galy,A., Haas,G., Kloetzel,P.M., Reiss,Y., and Hosmalin,A. (2003). An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. Nat. Immunol. *4*, 375-379.

Serwold,T., Gaw,S., and Shastri,N. (2001). ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules. Nat. Immunol. *2*, 644-651.

Serwold,T., Gonzalez,F., Kim,J., Jacob,R., and Shastri,N. (2002). ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. Nature 2002. Oct. 3;419. (6906.):480. -3. *419*, 480-483.

Snyder,H.L., Yewdell,J.W., and Bennink,J.R. (1994). Trimming of antigenic peptides in an early secretory compartment. J. Exp. Med. *180*, 2389-2394.

Stoltze,L., Dick,T.P., Deeg,M., Pommerl,B., Rammensee,H.G., and Schild,H. (1998). Generation of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein cytotoxic T lymphocyte epitope requires proteasome-dependent and -independent proteolytic activities. Eur. J. Immunol. *28*, 4029-4036.

Stoltze,L., Schirle,M., Schwarz,G., Schroter,C., Thompson,M.W., Hersh,L.B., Kalbacher,H., Stevanovic,S., Rammensee,H.G., and Schild,H. (2000). Two new proteases in the MHC class I processing pathway. Nat. Immunol. 2000. Nov. ;1(5):413. -8. *1*, 413-418.

Takeda,A., Higuchi,D., Yamamoto,T., Nakamura,Y., Masuda,Y., Hirabayashi,T., and Nakaya,K. (1996). Purification and characterization of bleomycin hydrolase, which represents a new family of cysteine proteases, from rat skin. J. Biochem. (Tokyo) *119*, 29-36.

Tanioka,T., Hattori,A., Masuda,S., Nomura,Y., Nakayama,H., Mizutani,S., and Tsujimoto,M. (2003). Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. J. Biol. Chem. *278*, 32275-32283.

Tenzer,S., Peters,B., Bulik,S., Schoor,O., Lemmel,C., Schatz,M.M., Kloetzel,P.M., Rammensee,H.G., Schild,H., and Holzhutter,H.G. (2005). Modeling the MHC class I pathway by combining predictions of proteasomal cleavage,TAP transport and MHC class I binding. Cell Mol. Life Sci. *62*, 1025-1037.

Tenzer,S., Stoltze,L., Schonfisch,B., Dengjel,J., Muller,M., Stevanovic,S., Rammensee,H.G., and Schild,H. (2004). Quantitative analysis of prion-protein degradation by constitutive and immuno-20S proteasomes indicates differences correlated with disease susceptibility. J. Immunol. *172*, 1083-1091.

Thompson,M.W. and Hersh,L.B. (2003). Analysis of conserved residues of the human puromycin-sensitive aminopeptidase. Peptides *24*, 1359-1365.

Tobler,A.R., Constam,D.B., Schmitt-Graff,A., Malipiero,U., Schlapbach,R., and Fontana,A. (1997). Cloning of the human puromycin-sensitive aminopeptidase and evidence for expression in neurons. J. Neurochem. *68*, 889-897.

Toes,R.E., Nussbaum,A.K., Degermann,S., Schirle,M., Emmerich,N.P., Kraft,M., Laplace,C., Zwinderman,A., Dick,T.P., Muller,J., Schonfisch,B., Schmid,C., Fehling,H.J., Stevanovic,S., Rammensee,H.G., and Schild,H. (2001). Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. J. Exp. Med. *194*, 1-12.

Tomkinson,B. (1999). Tripeptidyl peptidases: enzymes that count. Trends Biochem. Sci. *24*, 355-359.

van Ham,M., van Lith,M., Lillemeier,B., Tjin,E., Gruneberg,U., Rahman,D., Pastoors,L., van Meijgaarden,K., Roucard,C., Trowsdale,J., Ottenhoff,T., Pappin,D., and Neefjes,J. (2000). Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO. J. Exp. Med. *191*, 1127-1136.

Van Kaer,L. (2002). Major histocompatibility complex class I-restricted antigen processing and presentation. Tissue Antigens *60*, 1-9.

Velders,M.P., Weijzen,S., Eiben,G.L., Elmishad,A.G., Kloetzel,P.M., Higgins,T., Ciccarelli,R.B., Evans,M., Man,S., Smith,L., and Kast,W.M. (2001). Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. J. Immunol. *166*, 5366-5373.

Walter,P. and Blobel,G. (1983). Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. Methods Enzymol. *96*, 84-93.

Wang,Y., Guttoh,D.S., and Androlewicz,M.J. (1998). TAP prefers to transport melanoma antigenic peptides which are longer than the optimal T-cell epitope: evidence for further processing in the endoplasmic reticulum. Melanoma Res. *8*, 345-353.

Wei,M.L. and Cresswell,P. (1992). HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides. Nature *356*, 443-446.

Werner,E.D., Brodsky,J.L., and McCracken,A.A. (1996). Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *93*, 13797-13801.

Wilk,S., Wilk,E., and Magnusson,R.P. (1998). Purification, characterization, and cloning of a cytosolic aspartyl aminopeptidase. J. Biol. Chem. *273*, 15961-15970.

Xu,H.E. and Johnston,S.A. (1994). Yeast bleomycin hydrolase is a DNA-binding cysteine protease. Identification, purification, biochemical characterization. J. Biol. Chem. *269*, 21177-21183.

Yewdell,J. (2002). To DRiP or not to DRiP: generating peptide ligands for MHC class I molecules from biosynthesized proteins. Molecular Immunology *39*, 139-146.

Yewdell,J.W. (2001). Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. Trends in Cell Biology *11*, 294-297.

Yewdell,J.W., Schubert,U., and Bennink,J.R. (2001). At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. Journal of Cell Science *114*, 845-851.

Yokomizo,T., Uozumi,N., Takahashi,T., Kume,K., Izumi,T., and Shimizu,T. (1995). Leukotriene A4 hydrolase and leukotriene B4 metabolism. J. Lipid Mediat. Cell Signal. *12*, 321-332.

York,I.A., Chang,S.C., Saric,T., Keys,J.A., Favreau,J.M., Goldberg,A.L., and Rock,K.L. (2002). The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. Nature Immunology *3*, 1177-1184.

York,I.A., Mo,A.X.Y., Lemerise,K., Zeng,W.Y., Shen,Y.L., Abraham,C.R., Saric,T., Goldberg,A.L., and Rock,K.L. (2003). The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. Immunity *18*, 429-440.

10 Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen

Schatz,M.M., Peters,B., Tenzer, S., Carroll, O., van Endert, P., Rammensee, H.G., Holzhütter, H., Schild, H. (2005). Discovery of an N-terminal processing motif for MHC class I ligands. (submitted).

Schatz,M.M., Rammensee, H.G., Schild, H. (2005). Identification and characterization of all cytosolic aminopeptidases relevant for MHC class I antigen processing. (in preparation).

Tenzer,S., Peters,B., Bulik,S., Schoor,O., Lemmel,C., Schatz,M.M., Kloetzel,P.M., Rammensee,H.G., Schild,H., and Holzhutter,H.G. (2005). Modeling the MHC class I pathway by combining predictions of proteasomal cleavage,TAP transport and MHC class I binding. Cell Mol. Life Sci. *62*, 1025-1037.

Broad spectrum analysis of N-terminal epitope trimming in the cell. Oral presentation. Workshop: Antigen processing and presentation. (2004). Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies for Immunology (JAMI), Maastricht, the Netherlands.

Schatz, M., Peters, B., Tenzer, S., Rammensee, H.G., Holzhütter, H., Schild, H. (2004). Broad spectrum analysis of N-terminal epitope trimming in the cell. Immunobiology *209*, 405.

Schatz, M.M., Schild, H., Editor: Vohr, H.W., Editorial board: Dean, J., Germolec, D., Holsapple, M., House, R., Luster, M.I., Ulrich, P., van Loveren, H., White, K.L. (2005). MHC class I antigen presentation. Encyclopedic Reference of Immunotoxicology. Springer Verlag Heidelberg.

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee danken. Er hat durch seinen Führungsstil einem viele Freiheiten gelassen und einen dennoch durch seine kritische Analyse gleichzeitig angespornt sein Bestes zu geben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Hansjörg Schild, der mit Rat und Tat zur Seite stand, wenn ich mal wieder in seinem Büro eingefallen bin und einen immer durch ein kräftiges „Hau rein!“ angetrieben hat.

Besonders zu erwähnen ist auch Björn Peters, der durch sein Interesse an dieser Arbeit und durch die daraus resultierende Kooperation zu einem beträchtlichen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beitrug. Auf diverse Eyetoy- und 24-Abende und die gute Gastfreundschaft in Berlin soll hier nicht weiter eingegangen werden...

Mein Dank gilt auch der Gruppe um und Prof. Dr. Stefan Stevanovic selbst, der durch diverse Peptidsynthesen und Hilfe bei allen möglichen Problemen um Peptide und MHC-Moleküle dieses Projekt unterstützt hat. Hierbei muss auch insbesondere Jörn Dengjel erwähnt werden, der Mann für die Proteinidentifizierung an MALDI und Tandem-MS, aufgrund dessen Email-Scherzen ich fast einen Herzinfarkt erlitten hätte.

Ein Dank auch an Stefan Tenzer, mit dem man immer herrlich über Proteasen, Äkta-Probleme und diverse andere Themen diskutieren konnte und dessen Ruder- und Wein-Kenntnisse immer sehr gelegen kamen.

Vielen Dank auch an Beate Pömmerl, die Spezialistin für Molekularbiologie. Wem Beate die Klonierung beigebracht hat, wird sie auch in 100 Jahren noch beherrschen. Außerdem war sie auch eine große Hilfe bei diversen Katzenproblemen. Danke auch an Ludger Grosse-Hovest, der immer Zeit hatte endlose DNA-Sequenzen mit einem durchzugehen.

Ein dickes Dankschön auch an Matthias Hofmann für diverse Diskussionen und die langjährige Freundschaft.

Danke auch an Sylvia Herter, unsere Laborrennmaus, für nette Gespräche, Beate Schmid für Kaffee- und Stückchenpausen und Markus Radsak für seine Hilfe und Unterhaltungen in den Nicht-Raucher-Pausen und die anderen, die ich hier nicht alle aufzählen kann für viele schöne Labor- und auch Nichtlabor-Stunden.

Besonderen Dank an alle in der Tübinger und/oder Mainzer Arbeitsgruppe für die großartige Atmosphäre im Labor und die vielen schönen Abende auch abseits der Chemikalien.

Vielen Dank auch an meine Frau Hazel, die mich zuerst aus der Ferne und dann schließlich auch aus der Nähe in allen Lebenslagen immer unterstützt und aufgebaut hat. Sie hat wohl am ehesten Frust und Freuden des Laboralltags abbekommen.

Einen besonderen Dank auch an meine Eltern, die immer ein offenes Ohr hatten und mir während der guten und der schlechten Phasen immer hilfreich zur Seite standen. Sie waren eine große Stütze während des ganzen Studiums.

12 Akademische Lehrer

Albert, Bisswanger, Bohley, Braun, Breyer-Pfaff, Eisele, Epand, Gauglitz, Ghosh, Gönnenwein, Götz, Grabmayr, Günzl, Gupta, Häfelinger, Hagenmaier, Hamprecht, Hanack, Hartmann, Jäger, Jung, Kaiser, Kissling, Lichtenthaler, Lindner, Mayer, Mecke, Nakel, Oberhammer, Pfeiffer, Pommer, Probst, Rammensee, Reutter, Schild, Schrenk, Siebert, Snider, Stevanovic, Stegmann, Voelter, Wegmann, Weser, Wiesinger, Wohlleben, Yu

13 Tabellarischer Lebenslauf

Name:	Schatz	Vorname:	Mark
Geburtstag:	17.08.1973	Geburtsort:	Heilbronn

November 2003 bis Oktober 2005	Fortsetzung der Doktorarbeit am Institut für Immunologie, Universität Mainz, im Labor von Prof. Dr. H. Schild
Mai 2001 bis Oktober 2003	Doktorarbeit am Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Universität Tübingen, im Arbeitskreis von Dr. H. Schild, im Labor von Prof. Dr. H.-G. Rammensee
Mai 2001 bis Oktober 2005	Anfertigung der Doktorarbeit "Der Einfluss von Aminopeptidasen auf die Antigenprozessierung" unter Anleitung von Prof. Dr. H.-G. Rammensee am Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie der Universität Tübingen und am Institut für Immunologie der Universität Mainz
05.03.2001	Diplom in Biochemie an der Universität Tübingen
Juli 2000 bis März 2001	Diplomarbeit am Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie, Universität Tübingen, im Labor von Prof. Dr. H.-G. Rammensee
September 1997 bis September 1998	Studium an der McMaster University, Hamilton, Ontario, Kanada
02.10.1996	Vordiplom in Biochemie an der Universität Tübingen
März 1994 bis September 2001	Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Oktober 1993 bis März 1994	Studium der Chemie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
15.05.1993	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
1984 bis 1993	Hohen-Staufen-Gymnasium, Bad Wimpfen
1980 bis 1984	Grundschule, Bad Wimpfen