

Untersuchungen zur Bedeutung endosomal/lysosomaler
Proteasen in subzellulären Kompartimenten
antigenpräsentierender Zellen

Dissertation

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2002

vorgelegt von
Gerold Schwarz

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Mai 2002

Dekan: Prof. Dr. H. Probst
1. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Weber
2. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Mecke

*„.... nicht nur der Erfolg ist entscheidend, sondern der Geist, aus dem heraus
gehandelt wird.“*

frei nach M. G. Dönhoff

Danksagungen

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Dr. Hubert Kalbacher bedanken, der mir diese Arbeit ermöglicht hat. Aufgrund seiner großen Begeisterung, seines Engagements und seiner außerordentlich großzügigen Unterstützung hat er sehr viel zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen. Stets konnte ich sehr frei und selbständig arbeiten und ausführlich mit ihm diskutieren. Keineswegs geringerer Dank gilt Frau Dr. Heide Schmid, die mir ebenfalls sehr ausgiebig mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch aufgrund Ihrer tatkräftigen Unterstützung konnten Teile dieser Arbeit publiziert werden.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Dieter Mecke, für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit und bei Herrn Prof. Dr. U. Weber für die bereitwillige Übernahme der Berichterstattung dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern im Arbeitskreis Kalbacher bin ich ebenfalls zu großem Dank verpflichtet, denn ohne Ihre Mitarbeit wären Teile dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Insbesondere bedanke ich mich bei Hermann Beck und Christian Schröter. Beide haben mich sehr herzlich im Labor aufgenommen und mich ausführlich mit den nötigen Techniken und Methoden bekannt gemacht. Daniel Baier und Daniela Dressel haben mich ebenfalls bei der Aufreinigung von rekombinantem MBP und der Zellkultivierung erheblich unterstützt. Mein Dank gilt auch Timo Burster, der mir immer sehr aufmunternd in sämtlichen Lebenslagen Hilfe zukommen ließ.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch an Thomas Flad aussprechen. Er konnte mir immer sehr anschaulich Sachverhalte erklären und hat außerdem viele FACS-Analysen für mich durchgeführt. Christoph Driessen danke ich für die kritische Hinterfragung meiner Ergebnisse, die hervorragende Unterstützung bei Publikationen und Vorträgen und die Erlernung neuer Methoden.

Jens Brandenburg und Michael Reich danke ich ebenfalls für Ihre Unterstützung. Sie haben mir durch die Übernahme der Zellkultur und anderer Aufgaben die Verfassung dieser Dissertation wesentlich erleichtert.

Simone Pöschel, Martin Deeg, Alexander Cansier, Katja Lehnert und Jasmin Schnaut danke ich für die Unterstützung bei der Bewältigung „alltäglicher“ Aufgaben.

Dr. Stefan Stevanovic danke ich für die Einführung in die MALDI-Massenspektrometrie und die Möglichkeit, immer wieder an seinem Gerät messen zu dürfen.

Frau Angelika Stähle und Herr Lothar Eiche haben für den reibungslosen Ablauf wichtiger „Kleinigkeiten“ gesorgt, wofür ich Ihnen ebenfalls zu Dank verpflichtet bin.

Weiterhin möchte ich mich noch bei Alexander Bachmann für sehr ausführliche Diskussionen und Gespräche bedanken. Ein herzliches Dankeschön an Johanna Bayer, Claudia Willy, Peter Benöhr, Uwe Schulte, Annette Hambrock und

Jens, Thomas, Daniela, Ingrid & Ingrid und Alexandra danke ich für die Hilfe bei der Überwindung von „Tiefphasen“. Sie zeigten mir außerdem, dass das Leben nicht nur aus Biochemie besteht.

Justine Rehbronn und Almut Müller danke ich für die kritische Lektüre dieser Dissertation. Christoph Rehbronn verdanke ich die Wiederentdeckung von Phantasie und Kreativität.

Der DFG und dem SFB 510 (Stammzellbiologie und Antigenprozessierung) danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Dissertation.

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	1
2. Abkürzungsverzeichnis	4
3. Einleitung	6
3.1. Das Immunsystem des Menschen	6
3.2. MHC Klasse I und II	7
3.3. Struktur von MHC Klasse II-Molekülen	8
3.4. Prozessierung der invarianten Kette	9
3.5. Austausch von CLIP gegen antigene Peptide	10
3.6. Überblick über Proteasen, die an der Antigenprozessierung beteiligt sind	11
3.7. Die Asparaginyldopeptidase (AEP)	12
3.8. Fehlregulation des Immunsystems	13
3.9. Fragestellung	15
4. Material und Methoden	16
4.1. Zellbiologische Techniken	16
4.1.1. Zelllinien.....	16
4.1.2. Verwendete wichtige Antikörper.....	16
4.1.3. Herstellung des Kulturmediums	16
4.2. Zellkultivierung	17
4.2.1. Suspensionszellen.....	17
4.2.2. Adherent wachsende Keratinozyten	17
4.2.3. Isolierung primärer Keratinozyten.....	18
4.2.4. Gefrierkonservierung von Zellen.....	18
4.2.5. Rekultivierung eingefrorener Zellen	19
4.2.6. Pulsexperimente.....	19
4.3. HPLC	19
4.3.1. Semipräparative Aufreinigung	20
4.3.2. Analytik	20
4.4. Peptidsynthese	20
4.5. Proteinbestimmung	21
4.5.1. Roti-Nanoquant	21
4.5.2. BCA-Microassay	21
4.6. Reinigung von Antikörpern mit Protein A-Sepharose	22
4.7. Immunoaffinitätsreinigung von Antikörpern	22
4.8. SDS-PAGE	23
4.9. Immunoblot	23
4.9.1. Wiederholte Immundetektion.....	24
4.10. ELISA	25
4.11. Produktion von rekombinantem MBP	25

4.12.	Subzelluläre Fraktionierung mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation....	25
4.12.1.	Isolierung der lysosomalen Fraktion	26
4.12.2.	Charakterisierung der Fraktionen	27
4.13.	Subzelluläre Fraktionierung mit Hilfe der trägerfreien Elektrophorese.....	27
4.13.1.	Präparation der Probe	28
4.13.2.	Trennung.....	28
4.14.	Subzelluläre Fraktionierung mit Percolllichtgradienten-Zentrifugation... 	29
4.15.	Bestimmung der Cathepsin B-, L- und S-Aktivität	29
4.16.	Bestimmung der AEP Aktivitäten.....	30
4.16.1.	Kompetitionsassay mit AEP	30
4.17.	Isolierung von MHC Klasse I- und II-präsentierten Peptiden.....	31
4.17.1.	Immobilisierung von mAk an OSu-Sepharose.....	31
4.17.2.	Präparation des Zelllysates	31
4.17.3.	Immunoaffinitätschromatographie	31
4.17.4.	Isolierung von MHC-Peptidkomplex	32
4.17.5.	Isolierung von MHC-Peptidliganden.....	32
4.17.6.	Trennung der freigesetzten Peptide	33
4.18.	RT-PCR humanes Cathepsin S	33
5.	Ergebnisse.....	35
5.1.	Subzelluläre Fraktionierung mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation.....	35
5.2.	Subzelluläre Fraktionierung mit Hilfe der Percolllichtgradienten-Zentrifugation	36
5.2.1.	Enzymaktivitäten in mit Percollgradienten fraktionierten B-Zellen	37
5.2.2.	Enzymaktivitäten in mit Percollgradienten fraktionierten PBMCs	39
5.3.	Trägerfreie Elektrophorese	40
5.3.1.	Enzymaktivitäten in FFE Fraktionen.....	42
5.3.2.	Isolierung einer cytosolischen Protease mit der FFE	42
5.4.	Immortalisierte Keratinozyten und Keratinozyten in Primärkultur	43
5.4.1.	Aktivitäten der Cathepsine B, L und S in HaCaT-Keratinozyten	43
5.4.2.	Aktivitäten der Cathepsine B, L und S in primären Keratinozyten.....	44
5.4.3.	Stimulation der Keratinozyten mit Interferon- γ	46
5.4.4.	RT-PCR der stimulierten Keratinozyten	47
5.4.5.	Cathepsin S Western Blot.....	48
5.4.6.	MHC Klasse I und II Isolierung von Interferon- γ stimulierten HaCaT-Keratinozyten	49
5.5.	Untersuchungen zur Spaltspezifität von AEP.....	53
5.5.1.	Verdau der Peptidbibliothek.....	53
5.5.2.	Verdau der Peptidbibliothek im Kompetitionsassay	54
5.5.3.	AEP-Verdau intakter Proteine	54
5.5.4.	AEP Aktivitäten in subzellulären Kompartimenten verschiedener APCs.....	56
5.5.5.	AEP Aktivitäten in Percollfraktionen.....	57
5.6.	Prozessierung von MBP und Myoglobin	57
6.	Diskussion.....	61
6.1.	Methoden der subzellulären Fraktionierung.....	61
6.1.1.	Differentielle Zentrifugation.....	61

6.1.2.	Trägerfreie Elektrophorese	62
6.1.3.	Percolllichtegradienten-Zentrifugation	63
6.1.4.	Zusammenfassung	64
6.2.	Enzymaktivitäten in Fraktionen aus Percolllichtegradienten.....	65
6.2.1.	Ergebnisse der Percollfraktionierung	65
6.3.	Enzymaktivitäten in FFE Fraktionen.....	66
6.4.	Keratinocyten: Cathepsin B-, L- und S-Aktivitäten.....	67
6.5.	HaCaT-Keratinocyten: Identifizierung von präsentierten Antigenen	70
6.6.	Untersuchungen zur Spaltspezifität der AEP	71
6.6.1.	Spaltexperimente mit Peptiden	71
6.6.2.	Spaltexperimente mit Proteinen.....	73
6.6.3.	AEP-Aktivitäten	76
7.	<i>Zusammenfassung</i>.....	78
8.	<i>Literatur</i>	79
9.	<i>Veröffentlichungen</i>.....	89
9.1.	Publikationen	89
9.2.	Vorträge auf internationalen Kongressen.....	89
9.3.	Abstracts und Poster	89
10.	<i>Verzeichnis der akademischen Lehrer</i>.....	90

2. Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz
AEP	Asparaginylendopeptidase
Ak	Antikörper
AMC	7-Amino-4-methyl-cumarin
AMCA	7-Amino-4-methyl-cumarin-3-essigsäure
APC	antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BCR	B-Zellrezeptor
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin
CIIV	engl. „class II vesicles“
CD	engl. „cluster of differentiation“
CLIP	engl. „class II associated invariant chain peptides“
DC	dendritische Zellen
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	1,4-Dithioerythrol
DTT	1,4-Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	engl. „enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ELISA	engl. „enzyme-linked immunosorbent assay“
engl.	englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	engl. „electrospray ionisation mass spectrometry“
FACS	engl. „fluorescence activated cell sorter/scanner“
FCS	Fötales Kälberserum (engl. „fetal calf serum“)
FFE	trägerfreie Elektrophorese (engl. „free-flow electrophoresis“)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
HEL	Hühnereiweißlysozym
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HLA	engl. „human leukocyte antigen“
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	engl. „high performance liquid chromatography“
HPSEC	engl. „high performance size exclusion chromatography“
HSP	Hitzeschockprotein
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
Ii	invariante Kette (engl. „invariant chain“)
IU	Internationale Einheiten (Penicillin)
kDa	Kilodalton
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI-MS	engl. „matrix assisted laser desorption ionisation mass spectrometry“
MBP	engl. „myelin basic protein“
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. „major histocompatibility complex“)
MIIC	MHC Klasse II-Beladungskompartiment

MW	Molekulargewicht
NADH	Nicotinamidadenosindinucleotid, reduzierte Form
NAG	N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (manchmal auch β -AGA)
n.n.	nicht nachweisbar
NMM	N-Methylmorpholin
OSu	Succinimidester
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	engl. „peripheral blood mononuclear cells“
PBS	engl. „phosphate buffered saline“
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. „rotations per minute“)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	engl. „Tris-buffered saline“
TBST	TBS mit Tween 20
TBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
tBu	tertiäres Butyl
TCA	Trichloressigsäure
TCR	T-Zellrezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
tert.	Tertiär
Tf	Transferrin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymeinheit (= μ mol umgesetztes Substrat pro min)
UG	Einheiten für Streptomycin
V	Volt
W	Watt
wt	wildtyp
Z	Benzyloxycarbonyl

Zur Abkürzung der Aminosäuren werden die international gebräuchlichen Ein- und Drei-Buchstaben-Codes verwendet.

3. Einleitung

3.1. Das Immunsystem des Menschen

Das Immunsystem des Menschen ist ein komplexes, großes Organsystem, das Angriffe von außen und innen auf die Integrität des Körpers abwehren muss. Diese Abwehr muss gewährleistet sein, ohne dass normale körpereigene Bestandteile geschädigt oder zerstört werden, d.h. das Immunsystem muss selbsttolerant sein. Funktioniert die Selbsttoleranz nicht mehr fehlerfrei, können einerseits Autoimmunerkrankungen entstehen (Multiple Sklerose, Diabetes Typ I, Rheumatoide Arthritis u.a.) oder aber Tumore, weil diese nicht als entartete Zellen erkannt und beseitigt werden. Für das Verständnis dieser Funktionen, ist es von enormer Bedeutung und Wichtigkeit, grundlegende Mechanismen der Immunabwehr und Selbsttoleranz zu verstehen.

Ein „einfacher“ Schutz wird beim Menschen wie bei niederen Wirbeltieren und Wirbellosen durch die sogenannte angeborene oder unspezifische Immunität gewährleistet. Neben der natürlichen Abgrenzung eines Organismus nach außen wie zum Beispiel der Haut-Schleimhaut-Barriere spielen hier die Bestandteile des Komplementsystems im Zusammenspiel mit phagozytisch hochaktiven Makrophagen eine entscheidende Rolle: Die Proteine des Komplementsystems erkennen und perforieren eingedrungene Mikroorganismen und aktivieren so die Makrophagen. Außerdem können natürliche Killerzellen virusinfizierte Zellen erkennen und abtöten. Bereits dieses einfache System kann zwischen Selbst und Nicht-Selbst unterscheiden. Körpereigene Zellen verfügen nämlich über Proteine, die Komplement-Faktoren inaktivieren können.

Die angeborene unspezifische Immunabwehr kann jedoch nicht vor allen Infektionen schützen, weil Mikroorganismen sich beispielsweise schnell veränderten Umweltbedingungen anpassen können. Deshalb verfügen höhere Wirbeltiere über erworbene, adaptive Mechanismen innerhalb ihres Immunsystems, die eine spezifische Abwehr bestimmter Antigene und ein immunologisches Gedächtnis ermöglichen, selbst wenn sie noch niemals vorher damit Kontakt hatten. Grundlage dieser spezifischen Immunität ist immer eine Wechselwirkung zwischen einem Lymphocyten und einer infizierten oder entarteten Zelle bzw. einer antigenpräsentierenden Zelle (APC). Bei einer solchen Wechselwirkung werden nach dem Prinzip der klonalen Selektion aus der Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren jeweils diejenigen ausgewählt, die das Antigen effektiv binden.

Bei den Lymphocyten unterscheidet man B- und T-Lymphocyten, die sehr verschiedene Aufgaben haben. Beide Zell-Typen sind imstande, auf ihrer Oberfläche Rezeptoren zu exprimieren, die Fremdstoffe hochspezifisch erkennen. B-Lymphocyten oder auch B-Zellen vermitteln die humorale Immunantwort, während T-Lymphocyten (T-Zellen) für die zelluläre Immunantwort aufkommen. B-Zellen, die spezifisch ein extrazelluläres Antigen erkannt und gebunden haben, internalisieren den Rezeptor-Antigen-Komplex, prozessieren das Antigen und präsentieren antigene Peptide auf MHC Klasse II-Molekülen. Wird der MHC-Peptid-Komplex von T-Zellen, den T-Helferzellen oder inflammatorischen T-Zellen erkannt, erfolgt einerseits eine Aktivierung von Makrophagen und damit eine Verstärkung der unspezifischen Abwehr und andererseits erfolgt eine Umwandlung von B-Zellen in Plasmazellen (durch die Helferzellen; Prinzip der klonalen Selektion). Diese produzieren und sezernieren jetzt den

ursprünglich membranständigen B-Zellrezeptor als spezifischen Antikörper und ermöglichen somit eine Inaktivierung der entsprechenden Antigene. Die Inaktivierung kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Erstens kann eine Bindung des Ak ein Eindringen eines Krankheitserregers in seine Zielzelle verhindern. Zweitens können mehrere Ak Antigene vernetzen und durch Opsonierung oder Aggregation neutralisieren und phagozytierenden Zellen zugänglich machen. Alternativ kann durch Antikörperbindung die Komplementkaskade ausgelöst werden. Welche Mechanismen jeweils zum Tragen kommen, wird durch die einzelnen Immunglobulinklassen bestimmt. Ein Teil der aktivierten B-Zellen wird zu Gedächtniszellen, die bei einer wiederholten Infektion mit dem gleichen Erreger eine schnellere Immunantwort auslösen bzw. dann für die „Immunität“ sorgen. Bei einer Erstinfektion kommt die Immunantwort mit Ak nach etwa 3-5 Tagen zum Tragen.

T-Zellen reifen im Thymus und lassen sich im wesentlichen in drei Klassen zusammenfassen. Cytotoxische (CD8) T-Zellen sezernieren nach Aktivierung porenbildende Proteine und Enzyme und zerstören damit die Membran ihrer Zielzelle. Inflammatorische (CD4) T-Zellen bilden verschiedene Cytokine, wie IFN- γ oder TNF- β und aktivieren damit Makrophagen oder töten direkt infizierte Zellen. Helfer (CD4) T-Zellen sind für die Aktivierung von B-Zellen notwendig, damit sie wie oben beschrieben Ak gegen Pathogene bilden und sezernieren können. T-Zellen erkennen mit ihren T-Zellrezeptoren nur Antigenfragmente, die von MHC-Molekülen präsentiert werden (= „MHC-Restriktion“; Zinkernagel & Doherty, 1974). CD8-T-Zellen reagieren in der Regel auf Antigene, die auf MHC Klasse I-Molekülen präsentiert werden und eliminieren meistens virusinfizierte und entartete körpereigene Zellen, während CD4-T-Zellen MHC Klasse II-restringiert sind, um ihre beschriebene Funktion auszufüllen.

3.2. MHC Klasse I und II

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) nimmt eine zentrale Funktion bei immunologischen Abwehrmechanismen und der Selbsttoleranz ein. Er wurde erstmalig bei der Abstoßung von Gewebetransplantaten entdeckt (Ceppelino et al., 1969). Seine wichtigste Funktion liegt in der Präsentation von Peptidfragmenten aus zellulären Proteinen. Werden aufgrund von Infektionen, Mutationen oder anderen Mechanismen veränderte oder Fremdproteinfragmente präsentiert, so sollten die erwähnten Mechanismen der Immunabwehr greifen.

Die Gene, die für den MHC kodieren, liegen außer dem β 2-Mikroglobulin (Chromosom 15 beim Menschen) auf den Chromosom 6. Man spricht im menschlichen System auch von HLA-System, da die dort kodierten Proteine zuerst auf Leukozyten gefunden wurden (Dausset, 1954). Man kann drei Hauptklassen an MHC-Molekülen unterscheiden:

MHC Klasse I-Moleküle sind auf der Oberfläche nahezu jeder kernhaltigen Zelle exprimiert und präsentieren CD8 positiven T-Zellen endogene Peptide (Rammensee et al., 1997). Diese Genregion lässt sich beim Menschen in HLA-A, -B und -C unterteilen.

Die MHC Klasse II-Moleküle kommen nur auf bestimmten Zellen mit immunologischer Funktion vor und werden auch als antigenpräsentierende Zellen (APCs) bezeichnet. Dazu gehören B-Zellen und Makrophagen (Unanue & Askonas, 1968; Schmidtke & Unanue, 1972; Chesnut et al., 1982), dendritische Zellen (Crowley et al., 1990), Langerhanszellen der Haut

(Stingl et al., 1978), bestimmte Gliazellen (Fontana et al., 1984) und Thymusepithelzellen (aus Cortex und Medulla). Unter Stressbedingungen (IFN- γ , u.a. Cytokine, Verletzung) zeigen einige epitheliale Zellen wie Keratinozyten oder Fibroblasten eine Expression von MHC Klasse II-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche (Steimle et al., 1993; Germain, 1994).

Die MHC Klasse III Region unterscheidet sich funktionell von den beiden vorigen. Hier sind unter anderem Strukturgene des Komplementsystems, die HSP70-Genfamilie (Trowsdale, 1993) und die Tumornekrosefaktoren alpha und beta codiert.

Fast alle MHC Klasse I- und II-Moleküle liegen hochpolymorph vor. Außer dem hochkonservierten DR α Gen-Locus, der nur monomorph vorkommt, kommen die restlichen MHC-Gen Loci teilweise in über 200 Allelen vor (DR β in 239, DP β in 80, HLA-C in 50 Allelen ; Janeway-Travers, 1999). Für die anderen Hauptgruppen liegen ähnlich viele Variationen vor, so dass insgesamt eine hohe genetische Variabilität zustande kommt. Einige Autoimmunerkrankungen sind signifikant mit einem bestimmten Allel assoziiert (HLA-DR2 mit Goodpasture Syndrom, Multipler Sklerose; HLA-DR3 mit chronisch aggressiver Hepatitis, Lupus erythematoses, Morbus Basedow; HLA-DR4 mit Diabetes mellitus Typ I, Rheumatoider Arthritis).

In der Regel sind die Peptide, die von MHC Klasse I Molekülen präsentiert werden, 8-11 AS lang und stammen von Proteinen aus dem Cytosol oder Nucleoplasma (Rammensee et al., 1993; Townsend et al., 1989). MHC Klasse II Moleküle binden Peptide mit einer Länge von 7-25 AS, die von in endosomalen Kompartimenten degradierten Proteinen stammen (Rudensky et al., 1992; Hunt et al., 1992). Einige exogen aufgenommene Proteine bzw. deren Prozessierungsprodukte können aber auch auf MHC Klasse I präsentiert werden.

T-Zellen, die den CD8 Rezeptor tragen, erkennen antigene Fragmente, die im Kontext von MHC Klasse I präsentiert werden, und sind für die durch T-Zellen vermittelte Cytotoxizität verantwortlich, während T-Zellen mit dem CD4 Rezeptor MHC Klasse II präsentierte Peptide erkennen (Germain und Margulies, 1993; Germain 1994; Cresswell 1994). T-Zellen mit CD4-Rezeptor (T-Helferzellen und inflammatorische T-Zellen) modulieren die lokale Immunantwort durch die Produktion und Freisetzung von Cytokinen (Paul et al., 1994).

3.3. Struktur von MHC Klasse II-Molekülen

MHC Klasse II Moleküle bestehen aus zwei transmembranären Glykoproteinen, der α -Kette und der β -Kette, die nichtkovalent miteinander verbunden sind und zusammen die Peptidbindungsgrube bilden (Shakelford et al., 1982). Im Unterschied zu MHC I sind diese offen und können deshalb längere Peptide aber auch ganze Proteine mit geeigneten exponierten Abschnitten binden (Castellino et al., 1998). Jede Kette besteht aus vier Domänen, einer sehr kleinen cytoplasmatischen Domäne, einer Transmembrandomäne, sowie zwei extrazellulären Domänen (Brown et al., 1993). Die α -Kette hat ein apparentes Molekulargewicht von 33-35 kDa und die β -Kette zwischen 25-30 kDa. An den Aminotermini beider Ketten sind Signalsequenzen vorhanden, die sowohl für die Zielsteuerung ins ER verantwortlich sind als auch für die Membran-Translokation. Die Carboxytermini enthalten die Transmembranregion, wobei etwa 12-15 AS cytoplasmatisch exponiert werden.

Die Klasse II-Heterodimere assoziieren im ER sehr schnell mit einem dritten Polypeptid, der invarianten Kette (Ii oder CD74; Machamer et al., 1982; Kvist et al., 1982). Dieses nicht polymorphe Typ II-Transmembran Glykoprotein kann in mehreren Formen vorkommen (O'Sullivan et al., 1987; McKnight et al., 1989). Die invariante Kette hat mehrere Funktionen. Erstens fungiert sie als Chaperon, weil sie die MHC-Faltung unterstützt und stabilisiert (mit Hilfe eines weiteren Chaperons, dem Calnexin, Shaiff et al., 1992; Schreiber et al., 1994). Ein Teil des N-Terminus wird ebenfalls cytosolisch exponiert. Das Molekulargewicht liegt bei etwa 31-33 kDa. Menschen, Mäuse und Ratten können eine Splice-Variante exprimieren, die zusätzliche 64 AS in der Nähe des C-Terminus enthält (Koch, 1988). Die nach der Synthese schnell geformten Trimere können alle Varianten der Ii einbeziehen (Arunachalam et al., 1994). Über eine Trimerisierungsdomäne der Ii werden weitere MHC II- und Ii Kette-Komplexe assoziiert, wodurch Nonamere entstehen.

Zweitens enthält die Ii eine zentrale Region (CLIP = class II associated invariant chain peptide, AS 83-109), welche die peptidbindende Region der Klasse II Moleküle besetzt und so eine frühzeitige Beladung mit Peptiden im ER verhindert (Gosh et al., 1995; Teyton et al., 1990). Drittens sorgen Sortierungssignale der Ii dafür, dass die Nonamere via Golgi-Komplex in endosomale Kompartimente geschleust werden (Odorizzi et al., 1994; Neefjes et al., 1990). Allerdings können MHC-Ii-Komplexe auch auf der Zelloberfläche detektiert werden, wobei aufgrund der nach wie vor vorhandenen Sortierungssignale ein Rücktransport in endosomale Kompartimente beobachtet wird. Die essentielle Rolle der Ii für die Funktionalität der MHC Klasse II-Moleküle wird durch das entsprechende Knock-out-System in der Maus dokumentiert. Diese Mäuse zeigen sowohl reduzierte periphere Blut- und Milz-Lymphozyten, als auch um den Faktor 4-8 fach geringere MHC Klasse II-Moleküle auf der Zelloberfläche, sowie unvollständigen bzw. veränderten Transport (Elliott et al., 1994) und eine unvollständige Prozessierung und Präsentation einiger Antigene (Bikoff et al., 1995).

3.4. Prozessierung der invarianten Kette

Für eine effektive Beladung der Klasse II-Moleküle und anschließender Präsentation der Peptide/Antigene muss die Ii degradiert werden. Mit Reagenzien, die den endosomal/lysosomalen pH-Wert erhöhen, oder Proteaseinhibitoren wurde ein Abbau der Ii verhindert, wodurch MHC II-Ii-Komplexe intrazellulär akkumulieren und weniger MHC II-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimiert werden (Roche und Cresswell, 1991; Blum und Cresswell 1988). Mindestens zwei verschiedene Proteaseklassen, Cystein- und Aspartat-Proteasen, sind an der Prozessierung des luminalen Teils der Ii beteiligt (Maric et al., 1994). Aspartat-Proteasen, wie Cathepsin D oder E, können die 21 und 11-14 kDa Fragmente der Ii generieren. Diese Intermediärfragmente akkumulieren, sobald Leupeptin eingesetzt wird, und zeigen damit eine Beteiligung von Cysteinproteasen an den finalen Abbauschritten (Stebbins et al., 1995). Eine spezifische Inhibition von Cathepsin S führt zur Anhäufung vom p10-Fragment der Ii (Riese et al., 1998). Dasselbe Resultat wird folglich auch bei Cathepsin-S-knock-out-Mäusen beobachtet, was konsequenterweise eine veränderte Antigenpräsentation zur Folge hat (Shi et al., 1999; Nakagawa et al., 1999). Interessanterweise hat Cathepsin S ein breites pH-Optimum und kann durch IFN- γ induziert werden (Chapman 1998; die MHC Klasse II Transkription wird ebenfalls durch IFN- γ aktiviert). Die bereits erwähnte p41-Ii

Splice-Variante kann mit dem aktiven Zentrum von Cathepsin L assoziieren und es dadurch inhibieren (Guncar et al., 1999; Bevec et al., 1996). Cathepsin-L-knock-out-Mäuse haben allerdings nur in kortikalen Thymusepithelzellen entsprechende Defekte, die in einer veränderten positiven Selektion resultieren (Nakagawa et al., 1998). Cathepsin D- und B-knock-out-Mäuse zeigen dagegen keinerlei Effekte hinsichtlich der *in vivo* Degradation von Ii und Klasse II-vermittelter Immunantwort, woraus zumindest teilweise auf eine Redundanz bestimmter Proteasen in APCs zu schließen ist (Deussing et al., 1998).

Insgesamt gesehen werden die ersten Schritte der Prozessierung der Ii durch mehrere (redundante) Proteasen bewerkstelligt. Der finale Schritt, der das CLIP-Fragment generiert und dadurch erst den Austausch mit antigenen Fragmenten erlaubt, wird durch Cathepsin S im peripheren Lymphsystem, durch Cathepsin L in kortikalen Thymuszellen der Maus und durch Cathepsin V im humanen Thymus übernommen (Brömme et al., 1999). Neben diesen drei Cathepsinen schreibt eine erst kürzlich erschienene Veröffentlichung auch dem Cathepsin F eine wesentliche Rolle bei der Prozessierung der Ii bei Makrophagen zu (Shi et al., 2000). Colin Watts schlägt sogar eine Reihe weiterer Proteasen für diesen wichtigen Prozess vor (Watts, 2001).

3.5. Austausch von CLIP gegen antigene Peptide

Damit in einem MHC Klasse II-Beladungskompartiment antigene Peptide gegen das CLIP-Fragment ausgetauscht werden können, ist mindestens ein weiteres Hilfsmolekül notwendig: HLA-DM. Es ist ein Heterodimer, hat eine sehr große Homologie zur MHC Klasse II und besteht aus einer 33-35 kDa schweren α -Kette und einer 30-31 kDa schweren β -Kette (Denzin et al., 1994; Cho et al., 1991). Seine Struktur ist dem anderer MHC-Moleküle sehr ähnlich, hat aber eine sehr kleine Bindungsgrube bzw. kann keine Peptide binden (Mosyak et al., 1998). Ein Sortierungssignal mit Tyrosin-Motiv sorgt für den Transport in endosomale Kompartimente. Durch *in vitro* Experimente konnte bei pH 5,0 gezeigt werden, dass HLA-DM die Dissoziation einiger Peptide einschließlich CLIP induzieren und somit die Bindung exogener Peptide begünstigen kann (Sloan et al., 1995). Eine Stabilisierung peptidfreier MHC Klasse II-Moleküle durch DM wird vorgeschlagen. Ob tatsächlich „leere“ Klasse II-Moleküle vorkommen oder nur solche mit schwach bindenden Peptiden, die während der Isolierung verloren gehen, wird kontrovers diskutiert. In leicht saurer Umgebung exponieren sowohl HLA-DM- als auch Klasse II-Moleküle mehr hydrophobe Regionen, die eine Interaktion möglicherweise erleichtern (Ulrich et al., 1997).

Offensichtlich ist die Funktionalität von HLA-DM unter sauren Bedingungen optimal, weshalb es eher in späteren endosomalen Kompartimenten agieren dürfte. Wiederum wurde durch HLA-DM-defiziente Mäuse eine essentielle Beteiligung an der Präsentation bestimmter Antigene demonstriert (Miyazaki et al., 1996), wobei einige endogene Antigene unabhängig von HLA-DM präsentiert werden können. Folglich könnte man HLA-DM auch als Peptid Editor bezeichnen, welcher Peptide mit geringer Affinität gegen solche mit hoher austauscht. Darüber hinaus wird die Funktion von HLA-DM-Molekülen durch ein weiteres, ähnlich aufgebautes Molekül HLA-DO reguliert (Jensen et al., 1998). Allerdings kommt HLA-DO nur in bestimmten, nicht aktivierten APCs vor und scheint die Aktivität von HLA-DM in Abhängigkeit vom pH-Wert negativ zu regulieren (Van Ham et al., 1997). B-Zellen von

HLA-DO-defizienten Mäusen enthalten funktionelle, stabile MHC II-Peptidkomplexe und zeigen eine leicht reduzierte Präsentation von Peptiden, die kaum prozessiert werden müssen (Liljedahl et al., 1998). Als Regulator von HLA-DM könnten HLA-DO-Moleküle das zu präsentierende Peptidrepertoire bestimmter Zellpopulationen modifizieren, indem sie die Bindung konkreter Peptide ermöglichen bzw. die Bindung nur auf bestimmte Kompartimente beschränken.

3.6. Überblick über Proteasen, die an der Antigenprozessierung beteiligt sind

Damit eine effektive Präsentation möglichst vieler Proteine gewährleistet wird, müssen nicht nur Proteasen vorhanden sein, welche die Ii prozessieren. Die Zelle verfügt über ein sehr großes Arsenal an Proteasen, um endosomalen/lysosomalen Proteinumsatz zu gewährleisten. Der folgende Abschnitt versucht einen Überblick über dieses Thema zu geben (Nakagawa & Rudensky, 1999).

Es gibt im wesentlichen vier große Gruppen von proteolytischen Enzymen, die sich durch die aktive Gruppe im Katalyse-Zentrum klassifizieren lassen: Aspartat-, Cystein-, Serin- und Metallo-Proteasen. Der Großteil der lysosomalen Proteasen gehört zur Gruppe der Aspartat- oder Cystein-Endoproteasen. Das Cathepsin B zeigt überwiegend Carboxydipeptidase-Aktivität, die Cathepsine C und H zeigen Aminopeptidase-Aktivität (Turk et al., 1997), Cathepsin X ist eine Carboxy-mono- oder -dipeptidase (Klemencic et al., 2000). Die Cathepsine B und H haben auch Endopeptidase-Aktivität (Barrett et al., 1998). Mit Hilfe neuer Klonierungsverfahren sind viele neue Cathepsine entdeckt worden. Neben Cathepsin D und E (Aspartatproteasen) sind das die Thiolproteasen Cathepsin B, C, F, H, K, L, N, S, T, U, V, W und Z (Chapman et al., 1997; Wex et al., 1999). Die lysosomalen Cysteinproteasen zeichnen sich durch eine gewisse Homologie innerhalb der Familie der Papain-ähnlichen Proteasen aus, weshalb sie vermutlich durch Divergenz aus einem früheren gemeinsamen Gen entstanden sein dürften. Beispielsweise liegt das humane Cathepsin K- neben dem Cathepsin S-Gen. Dem könnte eine Genduplikation während der Evolution zugrunde liegen (Chapman et al., 1997). Eine ähnlich große Übereinstimmung ergibt sich beim Cathepsin V, einer Thymus- und Testis-spezifischen humanen Cysteinprotease, und dem Cathepsin L. Beide Genloci befinden sich auf Chromosom 9 in benachbarten Regionen (Brömme et al., 1999).

Die Hauptfunktion lysosomaler Proteasen ist primär darin zu sehen, alle Proteine bis auf ihre einzelnen Aminosäuren abzubauen, damit ein genereller Proteinumsatz und damit die Zellintegrität gewährleistet wird (Überalterung, Zellregulation; Bohley & Seglen, 1992).

Wie fast alle sezernierten Proteasen, werden die Cathepsine am ER synthetisiert und eingeschleust. Die Molekulargewichte der Proenzyme liegen zwischen 25 und 50 kDa (Fineschi und Miller, 1997). Nach Transport in den Golgi-Komplex erfolgen bei den meisten Enzymen Glykosilierungen und Phosphorylierungen terminaler Mannoseketten (Lingeman et al., 1998) und eine Einschleusung in saure endosomale Kompartimente über Vermittlung von Mannose-6-Phosphatrezeptoren (Kasper et al., 1996).

Da der genaue Mechanismus der intrazellulären „Wanderung“ der Cathepsine nicht bekannt ist, wird deren Aktivierung durch das Entfernen der Prodomäne als wichtiger Schritt angesehen (Nishimura und Kato, 1987). Sobald die Proformen in ein saures Milieu kommen, erfolgt meistens autokatalytisch oder aber auch durch andere Proteasen eine Abspaltung des

Propeptides. Die Cathepsine X und C benötigen zur Aktivierung Endopeptidasen, wie Cathepsin L oder S (Nägler et al., 1999; Dahl et al., 2001). Die Aktivität kann dann nur noch durch pH-Modulation, eine reduzierende Umgebung oder Interaktion mit endogenen Inhibitoren reguliert werden (Chapman et al., 1997). Man unterscheidet zwei Gruppen von Inhibitoren, welche sehr gut und reversibel an Cysteinproteasen binden, die Cystatine und Thyreoglobulin Typ1-Inhibitoren (Lenarcic et al., 1998). Die molekulare Basis der Regulation der Cathepsin-Expression wird noch nicht ganz verstanden. Die Cathepsin B-ähnlichen Proteasen werden transkriptionell über entsprechende Bindungsdomänen reguliert, wie sie für „housekeeping“ Gene üblich sind (Qian et al., 1991). Darüber hinaus kann die Aktivität neben den bereits erwähnten endogenen Cystatinen auch durch die Aktivität anderer Proteasen lokal variiert werden. Cathepsin D spaltet z. B. denaturiertes, nicht aktives Cathepsin L, so dass *in vivo* eine lysosomale Regulation durch Umsetzung von Cathepsinen denkbar ist (Turk et al., 1999).

Obwohl ein Großteil dieser lysosomalen Proteasen ubiquitär exprimiert wird, kommen einige wenige nur in bestimmten Geweben vor und unterstreichen damit ihre individuelle, spezifische Funktion. Die Gewebespezifität von Cathepsin S, L und V wurde bereits erwähnt. Cathepsin K wird nur in Osteoklasten exprimiert und ist in der Regulation der Knochenresorption involviert. Ein Defekt dieser Protease äußert sich in einer autosomal rezessiv vererbten Knochenkrankheit (Saftig et al., 1998; Gelb et al., 1996). Die ebenfalls unterschiedliche Expression von Cathepsin S, L und V in verschiedenen APCs des Immunsystems dürfte bezüglich der Antigenpräsentation eine nicht unerhebliche Rolle spielen (siehe positive Selektion im Thymus beispielsweise).

3.7. Die Asparaginyldopeptidase (AEP)

Die Asparaginyldopeptidase wurde vor ungefähr zehn Jahren in Samen der Leguminosen entdeckt (Kembhavi et al., 1993). Daher erhielt das Enzym auch seine ursprüngliche Bezeichnung als Legumain.

1997 haben Alan Barrett und Mitarbeiter erstmals humanes AEP mit Hilfe einer Plazenta-Bibliothek kloniert und sequenziert. Weiterhin haben sie dieses Enzym aus dem Nierencortex von Schweinen isoliert und charakterisiert (Chen et al., 1997). Während die Cathepsine B, H, L, S und andere zu der Familie der Papain-ähnlichen Proteasen gehören (C1), wird AEP der C13-Familie der Cysteinendopeptidasen zugeordnet. Davor wurde AEP nur in Pflanzen und bei bestimmten Parasiten beschrieben. Das humane AEP zeigt eine klare Homologie zu den Enzymen anderer Spezies. Aus Schweineniere isoliertes AEP hat ein Molekulargewicht von ungefähr 34 kDa, nach Deglykosylierung etwa 31 kDa. Es spaltet hochspezifisch nach Asparaginen, sofern sie nicht glykosyliert sind, es hydrolysiert sehr effektiv das fluorogene Substrat Z-Ala-Ala-Asn-AMC (Z-Val-Ala-Asn-AMC weniger effektiv) und zeigt bei leicht reduzierenden Bedingungen bei pH 5,8 seine maximale Aktivität. Ab pH 6 und darüber wird es relativ schnell irreversibel denaturiert. Obwohl hier eine Thiolprotease vorliegt, wird es nicht durch E64 inhibiert, sehr wohl aber durch Jodacetamid. Durch humanes Cystatin C kann es hoch spezifisch inhibiert werden mit einem K_i -Wert < 5 nM.

Seit 1998 in einer Nature-Veröffentlichung erstmals AEP als wichtige Protease für die Prozessierung und Präsentation eines bakteriellen Antigens im Kontext der MHC Klasse II

beschrieben wurde (Manoury et al., 1998), sind einige Arbeitsgruppen mit der Charakterisierung von AEP beschäftigt und versuchen seine Rolle vor allem bei der Prozessierung und Generierung möglicher Antigene in endosomal/lysosomalen Kompartimenten von verschiedenen APCs zu ergründen. Dabei stellt sich die Frage, ob AEP hierbei tatsächlich als Schlüsselprotease fungieren kann.

3.8. Fehlregulation des Immunsystems

Unser Organismus vermag, wie anfangs beschrieben, Eindringlinge auf vielerlei Weise zu entdecken und zu zerstören. Dabei muss sowohl die unspezifische wie auch die spezifische Immunabwehr effektiv Fremdartige von eigenen Selbstantigenen unterscheiden können. Diesem Prinzip der Selbsttoleranz liegen komplexe Mechanismen bei der B- und T-Zell-Reifung zu Grunde. Bei einem Versagen der Selbsttoleranz richtet sich das Immunsystem gegen körpereigene Proteine. Etwa 5% aller Erwachsenen in Europa und Nordamerika leiden an einer Autoimmunerkrankung.

Je nach betroffenen Geweben ergeben sich typische Krankheitsbilder. Bei der Multiplen Sklerose sind Proteine der Mark- und Myelinscheiden im ZNS betroffen, im Falle der rheumatoiden Arthritis die Synovialmembranen der Gelenkkapseln, beim insulinabhängigen Diabetes mellitus die insulinproduzierenden Zellen der Bauchspeicheldrüse, bei der Myasthenia gravis sind die Acetylcholinrezeptoren der motorischen Endplatten im Muskel betroffen und beim systemischen Lupus erythematodes können DNA der Haut, Nieren sowie verschiedener anderer Organe betroffen sein (und in schweren Fällen zu Multi-Organversagen führen). Das sind nur einige Beispiele. Die Ursachen der Fehlregulation sind wahrscheinlich multifaktoriell: Umweltfaktoren, Infektionserreger, möglicherweise auch Stress und hormonelle Einflüsse. Einige der Autoimmunerkrankungen sind, wie schon erwähnt wurde, mit bestimmten MHC-Allelen assoziiert.

Eine gängige Hypothese zur Induktion von Autoimmunerkrankungen beruht auf der Möglichkeit, dass Proteinstrukturen viralen oder bakteriellen Ursprungs körpereigenen Strukturen sehr ähnlich sein können und mit der normalen (zunächst auch gewollten) Immunantwort sekundär eine Autoimmunität auslösen (Molekulare Mimikry).

Eine zweite sehr weit verbreitete Fehlregulation des Immunsystems beruht auf der „Übersteuerung“ der Abwehr gegen an sich harmlose Substanzen. Allergische Reaktionen treten bei schätzungsweise 20% der Bevölkerung der Industrieländer auf und lösen eine ganze Bandbreite an Folgereaktionen aus bis hin zu lebensbedrohlichen Zuständen. In der Regel erfolgt nach einer vorangegangenen Sensibilisierung gegen ein entsprechendes Allergen nach erneutem Kontakt eine Überreaktion des Immunsystems. Im wesentlichen unterscheidet man vier verschiedene Arten an allergischen Reaktionen, die durch verschiedene Immunglobulin-Subklassen (verschiedene IgE und IgG; Typ I-III) und bestimmte Lymphozyten (Typ IV) vermittelt werden. Die IgE-vermittelte Allergie führt zu Mastzellendegranulation, bei der Entzündungsmediatoren freigesetzt werden. Die Typ II- und III-Reaktionen führen, je nach beteiligter IgG-Subklasse, zur Auslösung der Komplement-Kaskade und unterschiedlicher Aktivierung phagozytischer Zellen sowie zu veränderten Zellsignalwegen. Bei Typ IV-Reaktionen können verschiedene Makrophagen aktiviert oder sogar cytotoxische Reaktionen ausgelöst werden. Je nach Erfolgsorgan des Allergens können die Reaktionen unterschiedlich

heftig verlaufen. Polleninhalation führt zu Heuschnupfen oder Asthma, orale Aufnahme zu Erbrechen, Durchfall oder Hautreaktionen, während intravenöse Gaben (Medikamente u.a.) leicht zu einem anaphylaktischen Schock führen können. Die Neigung zu allergischen Reaktionen scheint ebenfalls mit bestimmten MHC-Isoformen einherzugehen (atopische Diathese). Warum bestimmte Personen zu allergischen Reaktionen neigen und andere nicht, ist nicht geklärt.

Das Gegenteil einer Übersteuerung des Immunsystems liegt bei der Tumorentstehung vor. Hier toleriert die Immunabwehr entartete Zellen, die eigentlich beseitigt werden sollten. Die Mechanismen der Entstehung von Tumoren bzw. des Versagens der Zellkontrolle (durch Immunsystem und Zellzykluskontrolle) sind allerdings äußerst vielfältig und einige wenige sollen hier nur ganz kurz angeführt werden. Die Komplexität dieses Themas führte sogar zur Bildung einer eigenen Forschungsdisziplin, der Tumorummunologie.

Zunächst führen initiale Schritte, wie Mutationen, noch nicht oder kaum zu Zellveränderungen, so dass die Immunabwehr noch gar nicht zum Einsatz kommen kann. Möglicherweise treten zu einem späteren Zeitpunkt gravierende Veränderungen auf, die dann nicht mehr komplett erfasst werden können. Desweiteren verfügen Tumorzellen über Mechanismen mit denen sie ihre MHC Klasse I- und II-Oberflächenexpression verändern und sogar herunterregulieren können, wodurch sie der T-Zellerkennung entgehen (Luboldt et al., 1996). Offensichtlich sind einige Tumoren auch in der Lage Faktoren abzugeben, die eine lokale (evtl. auch systemische) Immunantwort blockieren können (Kolenko et al., 1997). Eines der großen Ziele der Tumorummunologen besteht deshalb darin, tumorspezifische Antigene identifizieren zu können, mit deren Hilfe dann eine gezielte Stimulation des Immunsystems ermöglicht werden könnte (Immuntherapie).

Veränderungen in der Prozessierungsmaschinerie der Zelle (Tumorzelle) wurden vielfach nachgewiesen, wobei hauptsächlich Komponenten der MHC Klasse I-Präsentation betroffen sind (Seliger et al., 2000; Ritz et al., 2001). Interessanterweise mehren sich auch Hinweise auf veränderte Expression von Hitzeschockproteinen bei Tumoren und daraus resultierende Modulationen der Immuntoleranz.

3.9. Fragestellung

Wegen der hohen medizinischen Relevanz wurde in den letzten 10-20 Jahren sehr viel über die Prozessierung von Antigenen und deren anschließende Präsentation auf MHC Klasse II-Molekülen geforscht und veröffentlicht. Jedoch ist unser Wissen über die zugrunde liegenden Mechanismen noch sehr unvollständig. Innerhalb kurzer Zeit sind eine Reihe neuer Proteasen identifiziert worden, die bei der Prozessierung solcher Antigene in endosomal/lysosomalen Kompartimenten eine Rolle spielen. Die Möglichkeit im Maus-Modell gezielt einzelne Proteasen auszuschalten (knock-out) eröffnete neue Wege, deren Einfluss zu untersuchen. Ziel der vorliegenden Arbeit sind folgende Fragestellungen:

Erstens sollten unterschiedliche Fraktionierungsmethoden zur Generierung verschiedener endosomal/lysosomaler Kompartimente eingesetzt und hinsichtlich ihrer Cathepsin BLS-Gesamtaktivität und AEP-Aktivität untersucht werden. Die Charakterisierung dieser Fraktionen mit weiteren Methoden sollte eine gezielte Isolierung potentieller Beladungskompartimente ermöglichen. Durch die Präparation lysosomaler Fraktionen verschiedener APCs und anschließenden *in vitro* Verdauexperimenten immunologisch relevanter Proteine (myelin basic protein als Autoantigen bei Multipler Sklerose, Myoglobin) sollten Spaltstellen in diesen Proteinen identifiziert werden.

Zweitens sollten mit Hilfe des fluorogenen Substrates Z-Phe-Arg-AMC die Cathepsin B-, L-, und S-Aktivitäten in subzellulären Kompartimenten von Keratinozyten, B-Zellen und anderen APCs untersucht werden. Unter IFN- γ Einfluss exprimieren Keratinozyten MHC Klasse II-Moleküle und zeigen möglicherweise eine veränderte Prozessierung von Antigenen. Deswegen sollten einerseits mögliche Modulationen der Cathepsin-Aktivitäten in Keratinozyten durch Behandlung mit IFN- γ untersucht und aufgrund der genannten MHC Klasse II-Expression Peptide, die von stimulierten Keratinozyten präsentiert werden, isoliert und identifiziert werden. Ziel dieser Untersuchungen ist die Charakterisierung möglicher Autoantigene bei Psoriasis vulgaris. Hier führt eine massive Immunstimulation unter anderem durch IFN- γ zu einer Hyperproliferation der Haut.

Drittens sollte die erst vor kurzem im humanen endosomal/lysosomalen System beschriebene Asparaginylendopeptidase mit Hilfe einer Peptidbibliothek und komplexer Proteine als Modellsubstrat näher charakterisiert werden. Eine Reihe interessanter Arbeiten rücken diese Protease bei der initialen Spaltung von Proteinen in endozytotischen Vesikeln in den Mittelpunkt und schreiben ihr im Kontext der Prozessierung und Präsentation auf MHC Klasse II eine bestimmende Funktion zu.

4. Material und Methoden

4.1. Zellbiologische Techniken

4.1.1. Zelllinien

Die folgenden verwendeten EBV-transformierten B-Zelllinien sind humanen Ursprungs. Die entsprechenden Angaben zur HLA-Klassifizierung, Ursprung etc. finden sich bei der ECACC (European Collection of Cell Culture; www.ecacc.org). Diese Zelllinien wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. C.A. Müller (Medizinische Klinik der Universität Tübingen) zu Verfügung gestellt.

WT51, BSM, COX, WT100, Boleth, Steinlin

U937 entsprechen einer Monozytenzelllinie und wurden ebenfalls von Frau Prof. Dr. C.A. Müller zur Verfügung gestellt; die HaCaT-Zelllinie entsprechen adherent wachsenden, spontan immortalisierten Keratinozyten (Prof. Fusenig, DKFZ Heidelberg).

4.1.2. Verwendete wichtige Antikörper

Folgende Antikörper wurden für die Charakterisierung oder Affinitätsreinigung eingesetzt:

- L243 erkennt ein komplexes Epitop auf reifen HLA-DR-Dimeren (Klohe et al., 1988)
- Tü22 erkennt ein komplexes Epitop auf HLA-DQ-Dimeren (Ziegler et al., 1986, Klohe et al., 1988)
- Tü39 erkennt lineares Epitop auf HLA-DP α und β , als auch ein Epitop auf HLA-DR β (Klohe et al., 1988)
- Tü36 erkennt ein Epitop auf HLA-DR mit oder ohne invarianter Kette (Klohe et al., 1988)
- W6/32 erkennt HLA, B und C (ATCC, Manassas, VA)
- SD₃253.74 IgG1; erkennt ein einfaches Epitop auf der invarianten Kette im Bereich Ii (192-211) (Max et al., 1993)

4.1.3. Herstellung des Kulturmediums

Für die Kultivierung der Suspensionzellkulturen sowie der adherent wachsenden HaCaT-Keratinozyten wurde RPMI 1640 verwendet. Das verwendete Kulturmedium setzt sich wie folgt zusammen:

RPMI 1640 mit 25 mM HEPES und 2mM L-Glutamin (Gibco), 10 mM NaHCO₃, 5-10% hitzeinaktiviertes FCS (Gibco), 10 000 IU/ml Penicillin, 10 000 UG/ml Streptomycin (Gibco) oder 50 µg/ml Gentamycin (Gibco). Entweder wurde das Medium entsprechend folgender Angaben hergestellt oder aber als Fertigmilieu (Gibco) bezogen.

Das RPMI 1640-Pulver mit 25 mM HEPES und 2 mM L-Glutamin in Aqua demin. gelöst und 0,85 g/L NaHCO₃ zugegeben. Mit NaOH wird auf pH 7,4 eingestellt. Mittels einer Schlauchpumpe (Masterflex, Millipore) wird die Lösung unter der Sterilbank (Clean Air MSC II FSS, Woerden) über einen 0,2 µm Sterilfilter (Sartolab-P plus, Sartorius) in autoklavierte

500 ml Glasflaschen (Schott) abgefüllt. Das RPMI-Medium kann nun bei 4°C im Dunkeln gelagert werden (begrenzt: Halbwertszeit der AS beachten). Zur Verwendung in der Zellkultur werden dem RPMI-Medium hitzeinaktiviertes FCS und Antibiotika zugesetzt.

Zur Hitzeinaktivierung wird tiefgefrorenes FCS (Gibco) bei 4°C aufgetaut und 30 min bei 56°C inkubiert.

Für die adherent wachsenden primären Keratinozytenkulturen wurde teilweise Fertigmedium (PromoCell) eingesetzt oder Medium nach folgender Rezeptur hergestellt (Hautklinik der Universität Tübingen; Meier et al., 2000):

Sigma MCDB 153 Medium-Pulver für 1 Liter wird in 900 ml dest. H₂O gelöst, mit 1,176 g Natriumbikarbonat, 0,05 g Histidin, 0,098 g Isoleucin, 0,013 g Methionin, 0,015 g Phenylalanin, 0,009 g Tryptophan, 0,017 g Tyrosin versetzt, mit NaOH auf pH 7,6 eingestellt und auf 1 Liter aufgefüllt. Nach dem Sterilfiltrieren können Aliquots eingefroren werden. Unmittelbar vor Verwendung werden Ethanolamin, Phosphoethanolamin (je 0,1 mM), Hydrocortison (5×10^{-7} M), Insulin (5 µg/ml), rec.h. EGF (5 ng/ml) und BPE (100 µg/ml) supplementiert.

4.2. Zellkultivierung

4.2.1. Suspensionszellen

Alle verwendeten EBV-transformierten B-Zelllinien werden in Kulturmedium mit 5-10% hitzeinaktiviertem FCS (Gibco) in Suspensionskultur bei 37°C kultiviert. Zellmengen bis ca. 1×10^9 Zellen werden in Zellkulturflaschen (T25, T75, T175, Greiner/Nunc) in einem 200 L Begasungsbrutschrank (Heraeus) gezogen. Größere Zellmengen werden in autoklavierten 1 oder 2 Liter Glasflaschen (Schott) in einem 200 l Rollerkulturschrank (Heraeus) bei 2-3 rpm kultiviert. Die Begasung mit CO₂ ist bei HEPES- und NaHCO₃-haltigem Kulturmedium nicht notwendig bzw. eher ungünstig. Die Zelldichte sollte zwischen $0,4-1 \times 10^6$ Zellen/ml betragen und wird durch Mediumzusatz konstant gehalten. Von Zeit zu Zeit sollte totes Zellmaterial entfernt bzw. proliferierende Zellcluster in eine neue Flasche mit frischem Medium umgesetzt werden.

4.2.2. Adherent wachsende Keratinozyten

Adherent wachsende primäre Keratinozyten werden mit speziellem serumfreiem Keratinozytenmedium (siehe 4.1.3.), HaCaT-Keratinozyten mit üblichem RPMI 1640 mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (siehe oben) im Begasungsbrutschrank bei 10% CO₂ und 37°C kultiviert. Während HaCaT Kulturen durchaus konfluent werden dürfen, müssen primäre Keratinozyten vor der Konfluenz passagiert werden, da sie sonst nicht mehr wachsen. Prinzipiell können beide Zellarten mit dem folgenden beschriebenen Verfahren passagiert werden. Da die Primärzellen aber wesentlich empfindlicher sind, wird hier anstatt PBS, eine sog. Solution A (10 mM Glucose, 3 mM KCl, 130 mM NaCl, 1 mM Na₂HPO₄, 10 mM HEPES, pH 7,2) eingesetzt.

Zum Passagieren wird das Medium unter der Sterilbank abgesaugt, der Zellrasen einmal mit warmer Solution A gewaschen, einmal für etwa 5 min mit 0,05% EDTA in Solution A im Brutschrank inkubiert (verkürzt die Trypsinierungszeit) und nach Absaugen der EDTA-

Lösung wird mit 0,05% Trypsin (in 0,05% EDTA) für etwa 3-5 min im Brutschrank inkubiert. Unter dem Mikroskop wird das Ablösen der Zellen kontrolliert. Sollten sich nach mehrfachem Klopfen gegen die Flasche die Zellen nicht ablösen, so werden sie nochmals in den Brutschrank gestellt. Insgesamt sollte aber nicht länger als 10 min trypsiniert werden (wird 0,1% Trypsinlösung eingesetzt, so darf höchstens 4 min trypsiniert werden!). Sobald sich die Zellen weitgehend abgelöst haben, werden sie mit Trypsinstopplösung (Solution A mit 2% FCS) aus dem Kulturgefäß herausgespült, in ein steriles Falconröhrchen überführt und bei Raumtemperatur bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird mit dem entsprechenden Medium aufgenommen und je nach Zellzahl in neuen Flaschen ausgesät.

Es ist darauf zu achten, dass pro Fläche nicht zu wenig Zellen ausgesät werden (Minimum 2500 Zellen/cm²), da sie sonst nicht mehr proliferieren. Anstelle von Solution A kann auch PBS verwendet werden. Aus Sterilitätsgründen kann PBS oder Solution A mit Antibiotikum supplementiert werden. Ein Medienwechsel erfolgt alle 2-3 Tage.

4.2.3. Isolierung primärer Keratinozyten

Primäre humane Keratinozyten wurden aus Hautmaterial von Patienten der Universitäts-hautklinik Tübingen nach Rheinwald und Green (1975) isoliert und kultiviert. Dazu wurden die Hautpräparate (maximal 2 Tage nach OP; Material von jüngeren Patienten ist besser) mit Schere und Pinzette von Unterhautgewebe und Blutgefäßen befreit, in kleine 0,5 x 0,5 cm Stücke geschnitten, mit der Epidermis nach unten in einer Petrischale platziert und für ungefähr 18-19h mit Lösung B (30 mM Hepes, 4 mM Glucose, 3 mM KCl, 130 mM NaCl, 1 mM Na₂HPO₄ x 7H₂O, 0,25% Trypsin, pH 7,4; mit 0,2 µm Filter sterilfiltriert) über Nacht bei 4°C inkubiert. Alle Präparationschritte erfolgten unter der Sterilbank und mit sterilen Materialien. Nach Zugabe des gleichen Volumens an Lösung A (Trypsinstopplösung; 30 mM Hepes, 10 mM Glucose, 3 mM KCl, 130 mM NaCl, 1 mM Na₂HPO₄ x 7H₂O, pH 7,4, 2% dialysiertes FCS; mit 0,2 µm Filter sterilfiltriert) wurde die Epidermisschicht abgezogen und sowohl die Epidermis als auch die oberste Dermissschicht vorsichtig abgeschabt.

Dieses jetzt Keratinozyten (Melanozyten) enthaltende abgeschabte Material wurde durch vielfaches Aufziehen (bis zu 60 x) mit der Pipette suspendiert, möglichst ohne verbleibende große Zellverbände abgezogen, bei 1000 rpm für 5 min abzentrifugiert, mit supplementiertem Keratinozytenmedium aufgenommen und in Kollagen beschichteten Kulturflaschen in geeigneter Zelldichte ausgesät (hier sollte eher zu dicht ausgesät werden, selbst wenn nach 2 Tagen passagiert werden muss). Der Erfolg der Isolierung ist innerhalb von 2-3 Tagen an den wachsenden Zellverbänden zu erkennen. Die Passage erfolgt im subkonfluenten Zustand wie beschrieben (4.2.1.). Kollagen beschichtete Flaschen sind dann nicht mehr nötig, sondern eher hinderlich, weil sich die Keratinozyten wesentlich schlechter „abtrypsiniieren“ lassen.

4.2.4. Gefrierkonservierung von Zellen

Zur späteren Wiederanzucht vorgesehene Zellen werden 5 min bei 4°C mit 1000 rpm (Minifuge T, Heraeus) pelletiert und mit eiskaltem Einfriermedium (90% FCS 10% DMSO) resuspendiert. Die Kryotubes werden vorher beschriftet und auf Eis gestellt. Theoretisch sollten je Kryotube 1 Million Zellen in 1 ml Einfriermedium eingefroren werden. Es hat sich

jedoch für die Rekultivierung als vorteilhaft erwiesen, mehrere Millionen Zellen je ml Einfriermedium zu konservieren. Da DMSO die Zellen schädigt, ist darauf zu achten, dass sowohl die Kryogefäße als auch das Einfriermedium frühzeitig vorbereitet und auf Eis gekühlt werden sowie zügig gearbeitet wird. Die Röhrchen werden dann sofort verschlossen und für 2-4 h im Gefrierschrank bei -20°C eingefroren. Nach vollständigem Durchfrieren des Röhrcheninhaltes werden die Zellen über Nacht (evtl. auch mehrere Tage) bei -80°C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff zur endgültigen Lagerung überführt. Auf diese Weise behandelte Zellen können in der Regel problemlos auch nach mehreren Jahren wieder angezüchtet werden.

4.2.5. Rekultivierung eingefrorener Zellen

Die tiefgefrorenen Zellen werden bei 37°C möglichst schnell aufgetaut, in ein Zentrifugenröhrchen mit 50 ml RPMI 1640 (Raumtemperatur, Gibco) pipettiert und anschließend pelletiert (1000 rpm, 5 min, Minifuge T, Heraeus). Der DMSO-haltige Überstand wird verworfen, das Zellpellet mit $20-37^{\circ}\text{C}$ warmem 20%-igem Komplettmedium resuspendiert und in eine 50 ml Kulturflasche überführt.

In der frühen Phase des Anwachsens sollten die Zellen in hoher Zelldichte kultiviert werden. Nach leichter Gelbfärbung des Mediums wird zunächst ohne Mediumwechsel etwa 1/3 bis 2/3 frisches Medium zugegeben. Wachsen die Zellen dann so rasch, dass innerhalb kurzer Zeit wieder eine Gelbfärbung auftritt, kann auf das 2-3-fache Volumen aufgefüllt werden. Im Weiteren können die Zellen wie beschrieben in Suspensionskultur gezogen werden, wobei die FCS-Konzentration sukzessive nach Bedarf angepasst werden kann.

4.2.6. Pulsexperimente

Etwa 1 Milliarde EBV-transformierte B-Zellen werden durch Zentrifugation geerntet (15 min 1000 rpm, 4°C , Beckman-Rotor JA-10), einmal mit 50 ml Kulturmedium gewaschen (800 rpm, 4 min, Minifuge T, Heraeus), in 10-20 ml 37°C -warmem Kulturmedium mit 0-10 % FCS resuspendiert (optional mit 5 mg/ml BSA) und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nun werden die gewünschten, entsprechend markierten Proteine/Peptide, gelöst in RPMI 1640 oder PBS in gewünschter Konzentration zugefügt und in einem Roller Kulturschrank mit 10 rpm bei 37°C inkubiert. Die Pulszeiten variieren zwischen wenigen Minuten und maximal 30 Minuten. Ist die gewünschte Pulszeit erreicht, wird das 50 ml Zentrifugenröhrchen mit eiskaltem PBS aufgefüllt und 5 min bei 1500 rpm, 4°C , zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und aufbewahrt (Analyse möglicher Abbauprodukte) und das Zellmaterial zweimal mit je 50 ml eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellpellets werden nach nochmaligem Waschen mit Fraktionierungspuffer einer subzellulären Fraktionierung unterzogen (Kapitel 4.13, 4.15).

4.3. HPLC

Sämtliche Arbeitsschritte wurden bei sauren Acetonitril-Gradienten durchgeführt. Die Gradienten wurden entsprechend der Trennproblematik eingesetzt.

System A: 0,055% (v/v) TFA in Millipore H_2O

System B: 0,05% (v/v) TFA in 80% (v/v) Acetonitril

Die Proben werden, wenn nicht in H₂O oder System A löslich, in DMSO, DMF, Essigsäure oder verdünnter NH₃-Lösung gelöst und appliziert.

4.3.1. Semipräparative Aufreinigung

Zur semipräparativen Aufreinigung von Proteinen und Peptiden wurde folgende HPLC-Anlage eingesetzt:

Pumpe	L-6200 Intelligent Pump (Merck-Hitachi)
Steuerung	LC Organizer (Merck-Hitachi)
Detektion	L-4000A UV-Detektor
Dokumentation	D-2500 Mega-Integrator (Merck-Hitachi)

4.3.2. Analytik

Die analytische Bestimmung von Proteinen und Peptiden wurde an verschiedenen HPLC-Anlagen durchgeführt:

Merck microbore HPLC bestehend aus: L-6200 Intelligent Pump (Merck-Hitachi), LC Organizer (Merck-Hitachi), UV-VIS Diodenarray-Detektor (Applied Biosystems, 190-350 nm), D-2500 Mega-Integrator (Merck-Hitachi).

Teilautomatisierte Merck-HPLC bestehend aus: L-6200 Intelligent Pump (Merck-Hitachi), L-4000A UV-Detektor, Abimed Auto Injector, PC mit D 7000 HPLC-System-Manager

Vollautomatisierte Shimadzu-HPLC bestehend aus folgenden Modulen: 2x LC 10 AD Liquid Chromatograph, SCL-10 A System Controller, SIL-10 AD Auto Injector, SPD-10 AV UV-Vis Detector, RF-10 A Fluorescence Detector, PC mit Shimadzu Class VP 5.0

Die verwendeten Säulen wurden den jeweiligen Trennproblemen angepasst und sind an den entsprechenden Stellen aufgeführt.

4.4. Peptidsynthese

Die zur Charakterisierung von Asparaginyldopeptidase hergestellten Peptide wurden durch Merrifield-Festphasensynthese (Merrifield, 1963) nach der Fmoc/TBTU-Strategie im Batch-Verfahren hergestellt (Multipler Peptidsynthesizer, MultisynTech). Es wurden 21 Peptide mit folgender Aminosäuresequenz hergestellt: Z-AENXAEK-NH₂, wobei X für sämtliche 20 proteinogene Aminosäuren steht und ein sog. Kontrollpeptid Z-AEQIAE-NH₂. Die Fmoc-AS (Alexis, Novabiochem) und das Kupplungsreagenz TBTU wurden in 4-8-fachem molarem Überschuss relativ zur Harzbeladung eingesetzt. Es wurden modifizierte Harze verwendet (Fmoc-Amid-Harze, Rapp Polymere, Tübingen), da der C-Terminus als Amid vorliegen soll. Zur Fmoc-Abspaltung wird 20% (v/v) Piperidin in DMF eingesetzt. Nach Abspaltung vom Harz und der Entfernung aller Seitenschutzgruppen mit 95% TFA/H₂O mit Phenol bei Raumtemperatur für 3-4 Stunden, wurden die Peptide in eiskaltem Ether ausgefällt und abzentrifugiert. Anschließend wurde noch zweimal mit Ether gewaschen, mit tertiärem

Butanol/Wasser (4:1) aufgenommen und lyophilisiert. Die Peptide wurden mit präparativer RP-HPLC (Säule: RP18-, 250 x 8 mm; 2 ml/min Fluß) auf über 95% Reinheit gereinigt und im ESI-Massenspektrometer überprüft.

4.5. Proteinbestimmung

4.5.1. Roti-Nanoquant

Der von der Firma Roth vertriebene Test Roti-Nanoquant, beruht auf einer modifizierten Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976). Die Arbeitslösung wird durch Verdünnen des gekauften Konzentrates hergestellt und kann mehrere Monate bei Raumtemperatur gelagert werden. Der Test eignet sich aufgrund seiner relativ einfachen und schnellen Durchführung recht gut für das Messen einer großen Probenzahl. Er ist sensitiver als der ursprüngliche Bradford-Test und zeigt im Bereich von 0,1-20 µg Protein einen linearen Verlauf. Allerdings ist dieser Test anfällig gegenüber Detergenzien und vor allem gegenüber Percollresten.

Zur Bestimmung werden 200 µl Arbeitslösung vorgelegt, 0,1-20 µg Protein in 50 µl zugegeben und gut gemischt. Anschließend werden bei 620 nm und 450 nm im Microplate Reader (Tecan, SpectraFluor) die Absorptionen gemessen und die 620 nm Messwerte durch die 450 nm Messwerte geteilt. Die Farbreaktion bleibt bei Raumtemperatur mindestens 1 h lang stabil. Über eine entsprechende Eichung mit BSA kann dann ausgewertet werden. Sollen die Proteinkonzentrationen von isolierten Immunglobulinen bestimmt werden, so ist eine Eichung mit IgG durchzuführen. Die Unterschiede beider Eichgeraden sind durchaus beträchtlich, d.h. gegebenenfalls muss je nach Protein ein „geeigneter“ Eichstandard eingesetzt werden.

4.5.2. BCA-Microassay

Bei der Fraktionierung im Percollgradienten zurückbleibende Percollreste stören bei der BCA-Methode nicht. Der gut lösliche Farbkomplex erlaubt problemlos das Abtrennen störender Percolltrübungen. Der Test eignet sich auch für in detergenzhaltigen Puffern gelöste Proteine (bis 1 % Triton X-100 oder SDS). Besonders vorteilhaft ist der sehr breite Konzentrationsbereich (0,25 µg –80 µg). Der Test ist für Proben, welche Kupferchelatoren wie EDTA enthalten, ungeeignet.

Lösung A:	8 % (w/v)	Na ₂ CO ₃ x H ₂ O	Merck
	1,6 % (w/v)	NaOH	Merck
	1,6 % (w/v)	Na ₂ -tartrat	Merck

Die Lösung wird mit gesättigter NaHCO₃-Lösung auf pH 11,25 eingestellt.

Lösung B:	4 % (w/v)	Bicinchoninin-Säure (BCA), Na ₂ -Salz	Sigma
Lösung C:	4 % (w/v)	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	Merck
Lösung D:	Mischung von 1 Volumen C mit 25 Volumen B		

Reaktionslösung: Mischung von 1 Volumen A mit 1 Volumen D
Alle Lösungen können bei -20°C gelagert werden.

In 1,5 ml Eppendorf-Cups werden je 100 µl Reaktionslösung vorgelegt, 1 bis 80 µg Protein in 100 µl zugegeben, gut durchgemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach werden störende Niederschläge durch Zentrifugieren abgetrennt, der Überstand in eine Mikrotiterplatte überführt und die Absorption bei 590 nm (Optimum: 562 nm) gemessen (Microplate Reader Tecan SpectraFluor, Tecan). Die Eichung erfolgt mit BSA.

4.6. Reinigung von Antikörpern mit Protein A-Sepharose

Zur Antikörperreinigung werden 2-5 ml Protein A Sepharose CL-4B (Pharmacia) in einer 10 ml Säule verwendet. Wurde bereits mehrmals damit Ak isoliert, wird die Sepharose nochmals mit 10-20 ml 0,1M Citratpuffer pH 3,0 gespült und mit PBS reichlich gewaschen bzw. äquilibriert. Zusätzlich kann auch mit 20% Ethanol (kurzzeitig mit 70%) mehrfach gespült und wieder mit PBS äquilibriert werden. 1 Volumenteil Serum wird mit einem Volumenteil PBS verdünnt, mit 1 M Tris pH 8 der pH-Wert auf etwa 7,5-8,0 eingestellt und anschließend über Nacht im Kühlraum mit etwa 1-2 ml/min über einen Kreislauf mehrfach über die Säule gepumpt (Peristaltikpumpe, Pharmacia). Sollte das Serum/PBS-Gemisch nicht klar sein, so wird es zentrifugiert oder aber über einen 0,45 µm Filter gedrückt, bevor die Säule beladen wird. Pro ml Säulenbett können laut Hersteller bis zu 20 mg humanes IgG isoliert werden. Erfahrungsgemäß isolieren wir bei etwa 3 ml Säulenbett 5-20 mg an IgG. Nach diesem Prozess wird die restliche Lösung entfernt (evtl. nochmals verwendet), die Säule an einen UV-Detektor mit Schreiber angeschlossen (UV-Monitor 2138 Uvicord S, 278 nm Filter, LKB; Recorder 2210, LKB) und bis zum Erreichen einer konstanten UV-Absorption mit PBS gewaschen. In Abhängigkeit von der Fragestellung erfolgt die Elution mit 100 mM Citrat pH 3,0/pH 3,4 oder bei noch höherem pH und wird über die UV-Absorption verfolgt. Um die Antikörper zu schonen, wird das Eluat in vorgelegten 1M Tris-Puffer pH 8,0 eingeleitet. Die so erhaltene Lösung wird über Ultrafiltration (20 kDa-Membran, Sartorius; 50 ml Rührzelle Amicon) aufkonzentriert, auf PBS umgepuffert, bis auf 1 oder 2 ml eingengt und gegebenenfalls mit Azid versetzt. Soll der Ak aliquotiert und eingefroren werden, muss erst überprüft werden, ob er nach dieser Prozedur noch funktionsfähig vorliegt.

4.7. Immunoaffinitätsreinigung von Antikörpern

Erzielt die Protein A-Reinigung eine nicht zufriedenstellende Qualität des Ak, so kann eine spezifische Reinigung mit dem entsprechenden Antigen erfolgen. Dazu muss zuerst das Antigen an OSu-Sepharose gekoppelt werden. 1-1,5 g an CH-Sepharose 4B (OSu-Sepharose, Pharmacia, auf Haltbarkeit achten!) werden in eine Schüttelente eingewogen und schubweise mit 200 ml 1 mM HCL versetzt (1-2 h quellen lassen). Die Sepharose wird einmal mit Millipore-Wasser und einmal mit Kupplungspuffer (100 mM NaHCO₃, 500 mM NaCl, pH 8,0) gewaschen. Die Schüttelente wird zu 2/3 mit Kupplungspuffer befüllt und anschließend werden rasch 10-15 mg Antigen in Kupplungspuffer oder PBS zugegeben und 2-3 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Es ist darauf zu achten, dass die Antigenlösung keine Amin-

oder Azid-haltigen Puffer enthält, da die Kupplung an OSu-Sepharose über freie Aminogruppen erfolgt. Die Kupplungseffizienz wird über eine Proteinbestimmung des Überstandes kontrolliert. Danach wird abgesaugt, die Sepharose für 1h mit Desaktivierungspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0) geschüttelt, mit je 100 ml Waschpuffer I (50 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, pH 8,0) und Waschpuffer II (50 mM Ameisensäure, 500 mM NaCl, pH 4,0) gewaschen. Schließlich wird das Material in eine 10 ml Säule eingefüllt und mit PBS äquilibriert. Jetzt wird, wie oben bei der Protein A-Reinigung beschrieben, vorgegangen. Im Unterschied dazu muss die Elution aber unter extremeren Bedingungen erfolgen.

Es wird hier mit 100 mM Glycinpuffer oder 50 mM Glycinpuffer mit 140 mM NaCl jeweils pH 2,5 (evtl. 2,8) eluiert. Das Eluat wird dann wie beschrieben weiter aufgearbeitet. Sollten die eluierten Ak säurelabil sein, besteht auch die Möglichkeit die Ak basisch mit 100 mM Triethylamin pH 11,5 zu eluieren.

4.8. SDS-PAGE

Zur Charakterisierung der Proteine wird ein modifiziertes Verfahren nach Laemmli (Laemmli, 1970) angewendet. Dabei wurden unterschiedliche Polyacrylamidgele eingesetzt. Zum einen kamen 10% BisTris-Fertig-Gele der Firma (Novex-Invitrogen) zum Einsatz, die je nach verwendetem Puffer (MES- oder MOPS-Puffer, Invitrogen) 35 min oder 50 min bei 200 Volt konstant (ca. 120 mA am Anfang der Trennung, sinkend auf etwa 70 mA) entwickelt wurden. Zum anderen wurden 10-15% Minigele nach einem Standardprotokoll (Current Protocols in Protein Science, Kapitel 10.1) selbst gegossen. 15-30 µg Protein in 20 µl wurden mit 8 µl reduzierendem Probenpuffer (6-fach nach Kapitel 10.1.28, anstatt DTT wurde Mercaptoethanol verwendet) 5 min gekocht und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wird mit Elektrodenlaufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS) bei 100-200 V und 20-50 mA durchgeführt. Nach 1-2h ist die Trennung beendet und das Gel kann gefärbt oder geblottet werden. Zur Größenbestimmung werden entsprechende Marker-gemische mit aufgetrennt. Die Färbung der Gele erfolgte in der Regel mit 0,05% Coomassie Brilliant Blue R250- Lösung (Serva; 25% Isopropanol, 10% Essigsäure) für 30-40 min. Anschließend wird unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung (10% Essigsäure) der unspezifische Hintergrund entfernt (kann bei dieser Methode, bei der auf Methanol verzichtet wird, mehrere Stunden dauern). Jetzt kann das Gel dokumentiert (FluorS-Geldokumentation, Biorad) oder/und optional getrocknet und eingeschweißt werden.

4.9. Immunoblot

Für den Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran (Immobilon P, Millipore u.a.) wird ein Verfahren nach Gershoni & Palade (1983) und Towbin et al. (1979) verwendet. Das Transfer-Sandwich wird in einer mit Transferpuffer (192 mM Glycin, 12,5 mM Tris, pH 8,3; 10 %-15 % (v/v) Methanol, 0,01 % (w/v) SDS) gefüllten Wanne zusammengesetzt (Tank Blot Verfahren). Der Elektrobplot wird bei 35 V und 200 mA (Novex-Gel-Blotsystem, Power Ease 500) 2-3 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Wegen der Wärmeentwicklung sollte das Blotsystem fast vollständig befüllt sein. Bei Verwendung von PVDF-Blotmembranen müssen diese vorher für mindestens 30 sec in Methanol aktiviert werden. Die Verwendung eines

Prestain-Markern erlaubt die Beurteilung der Bloteffizienz und erleichtert die Orientierung. Zusätzlich kann die Vollständigkeit des Proteintransfers durch Färben des Gels überprüft werden.

Die Blotmembran wird in 2% Milchpulver in TBST (10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) für 2h blockiert (sollte nach Detektion unspezifischer Hintergrundprobleme machen, so kann eine Blockierung über Nacht bei 4°C von Vorteil sein), mehrmals mit TBST gewaschen und mit dem Erstantikörper in geeigneter Verdünnung in TBST bei Raumtemperatur unter Schütteln für 1-2h inkubiert (alternativ über Nacht bei 4°C). Bei manchen polyklonalen Antikörpern kann eine unspezifische Bindung minimiert werden, indem mit 0,2% Milchpulver in TBST inkubiert wird. Nach Abdekantieren der Erstantikörperlösung wird mindestens dreimal je 5-10 min mit TBST-Puffer gewaschen und je nach verwendetem Detektionssystem wird mit Peroxidase- oder mit Alkalischer Phosphatasegekoppeltem Zweitantikörper in der entsprechenden Verdünnung in TBST für 1h inkubiert. Nach nochmaligem intensivem Waschen wird eine ECL-Entwicklung durchgeführt. Dazu nimmt man den 70-100 cm² großen Blot mit der Flachpinzette aus der Pufferlösung, lässt ihn abtropfen, legt ihn auf eine Folie und gibt 600-800 µl an frisch hergestelltem ECL-Reagenz auf die Membran (ECL-Plus Detektionskit, Amersham-Pharmacia oder Biorad; Reagenz nach Herstellerangaben zusammengeben). Danach nimmt man eine zweite Folie, legt sie auf die Blotmembran, drückt ggf. vorhandene Luftblasen heraus und exponiert in einer Filmkassette in der Dunkelkammer einen entsprechenden ECL-Film (Hyperfilm ECL, Amersham-Pharmacia). Die Filme werden mit einer Entwicklermaschine (Filmentwickler X-Ray Film Processor RG II; Fuji) entwickelt.

Sollen keine weiteren Immun-Detektionen durchgeführt werden, kann die Membran mit Coomassie-Färbelösung ca. 3 min angefärbt werden. Mit Blotentfärbelösung (50 % Methanol, 10 % Essigsäure) können die Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Wenn kein Prestain-Marker verwendet wurde, kann über die angefärbten Markerbanden eine Größenordnung gemacht werden.

4.9.1. Wiederholte Immundetektion

Für weitere Nachweise auf der Blotmembran, können Primär- und Sekundär-Antikörper von der Membran abgelöst und anschließend wie oben beschrieben neu detektiert werden. Der Blot wird dazu für 20-30 min in *Stripping buffer* (62,5 mM Tris/HCl, 100 mM Mercaptoethanol, 2% SDS, pH 6,7) bei 50°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Danach muss mit viel TBST ausreichend gewaschen werden. Es dürfen keine Mercaptoethanol- und SDS-Reste vorhanden sein. Es hat sich bewährt, nach mehrmaligem Waschen mit TBST, 3-5x mit 2% Milchpulver in TBST über mehrere Stunden zu waschen bzw. gleich wieder zu blockieren. Allerdings erkennen manche Antikörper nach einer solchen Behandlung nicht mehr ihr Antigen, andere wiederum funktionieren sogar noch besser.

4.10. ELISA

Zur Immobilisierung werden 0,1-20 µg Antigen in 100 µl PBS über Nacht bei 4°C in einer Maxisorb Immunoplate (Nunc) vorgelegt. Der Überstand wird verworfen und alle beschichteten Kavitäten dreimal mit Waschpuffer (PBS pH 7,5, 0,05% Tween 20) gewaschen. Die Blockierung freier Bindungsstellen erfolgt mit 200 µl 2% BSA in Waschpuffer bei 37°C für 1h. Nach dreimaligem Waschen, wird mit dem Erstantikörper in geeigneter Verdünnung in Verdünnungspuffer (Waschpuffer mit 0,5% BSA) 1-2 h bei 37°C inkubiert, wieder dreimal gewaschen und dann mit Peroxidase gekoppeltem Zweitantikörper in entsprechender Verdünnung in Verdünnungspuffer 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wird fünfmal gewaschen und mit 100 µl Substratlösung (1 mg/ml ABTS, 0,03% H₂O₂, in 0,1 M Citratpuffer pH 5,0) detektiert. Die Platte wird dann im Dunkeln belassen und je nach einsetzender Farbreaktion (5-120 min) bei 405 nm im Microplate Reader (Tecan, SpectraFluor) gemessen.

4.11. Produktion von rekombinantem MBP

Zur Expression von humanem MBP wird ein E. coli Stamm host BL21(DE, Novagene) verwendet, der das Plasmid (pET21, Novagene) mit der für die 18,5 kDa-Form kodierenden cDNA Sequenz enthält. Zur effizienten Produktion von rekombinantem MBP werden die in LB-Medium mit 50 µg/ml Carbenicillin (Calbiochem) kultivierten E. coli zuerst bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 expandiert und dann mit IPTG (1 mM Endkonzentration, Sigma) induziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten werden 1 ml Kulturproben genommen, um später die Produktion von MBP im SDS-Gel überprüfen zu können. Nach maximal 2,5 h Fermentationsdauer werden die Zellen geerntet (in 50 ml Tubes bei 3000 rpm für 15 min), einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 1/10 Volumen (Gesamtkulturvolumen) Lysepuffer (50 mM Tris, 2 mM EDTA, 0,1% Triton-X100, pH 8,0) vollständig resuspendiert und mit Lysozym/DNase (100 µg/ml; 50 µg/ml) für 20-30 min bei 37°C lysiert. Anschließend wird das Lysat im Ti 60-Rotor für 20 min bei 35000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet sollte jetzt die Inclusion bodies (aggregiertes MBP) enthalten, welches bei -20°C gelagert werden kann.

Die Inclusion bodies werden in 1/10 Volumen (Lysevolumen) 0,5 N HCl resuspendiert, für 5-10 min im Ultraschallbad beschallt und nach 30 min Zentrifugation (Eppendorffzentrifuge im Kühlraum maximale rpm) kann der Überstand zur HPLC-Reinigung eingesetzt oder wieder eingefroren werden. Als Säulen können präparative C4- oder Cyanopropyl-Säulen verwendet werden. Alternativ kann eine Reinigung auch über Ionenaustauschchromatographie mit CM-Sephadex erfolgen.

4.12. Subzelluläre Fraktionierung mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation

Die im folgenden beschriebene Methode wurde von C.J. Schröter etabliert und veröffentlicht (Schröter et al., 1999).

Bei adherent wachsenden Zellkulturen werden 30-100 Millionen, bei Suspensionskulturen ein bis mehrere Milliarden Zellen geerntet, zweimal mit PBS, einmal mit Fraktionierungspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,0-7,5, 250 mM Sucrose) gewaschen, mit 2-4 ml eiskaltem Fraktionierungspuffer aufgenommen und in einem Elvehjem-Potter mit 60 µm Spaltbreite bei 500 rpm mit 10-14 Hüben homogenisiert. Da später Enzymaktivitäten gemessen werden

sollen, wird auf Inhibitoren verzichtet, weshalb sämtliche Arbeitsschritte auf Eis oder bei 4°C erfolgen und möglichst rasch weitergearbeitet wird. Zunächst wird bei 4000 g 2 min in einer Beckman TL100 Ultrazentrifuge zentrifugiert, um unzerstörte Zellen, Zellfragmente und Zellkerne abzutrennen (Kernfraktion, Zelltrümmer; K1). Bei einigen Zellfraktionierungen wurde ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt mit 8000 g für 2 min angewendet, um Plasmamembranreste und Kernreste nahezu vollständig zu entfernen. Diese Fraktion wurde dann K2 genannt. Der Überstand wird in einem neuen Zentrifugenröhrchen bei 100 000 g für 2 min zentrifugiert und man erhält im Pellet eine Mitochondrien, Endosomen und Lysosomen Mischfraktion (Organellenfraktion). Schließlich wird der Überstand 12 min bei 400 000 g zentrifugiert um Mikrosomen (Mi) vom Cytosol (Cyt) zu trennen.

4.12.1. Isolierung der lysosomalen Fraktion

Aus der Organellenfraktion kann durch hypotone Lyse lysosomales Material angereichert werden (Bohley et al. 1969). Dazu wird das Organellenpellet von EBV-transformierten B-Zellen mit dem fünffachen Pelletgewicht an destilliertem Wasser für 15 min auf Eis inkubiert (bei den Keratinozyten das 2,5 fache) und bei 100000 g erneut für 2 (4) min zentrifugiert.

Im Überstand befindet sich jetzt die lysosomale Fraktion, während Mitochondrien und Endosomen im Pellet verbleiben. Werden andere Zellen eingesetzt, muss die zur Lyse der Lysosomen optimale Wassermenge ermittelt werden. Endosomale und lysosomale Fraktionen sind dann mit geeigneten Markern zu untersuchen (Leitenzyme etc.).

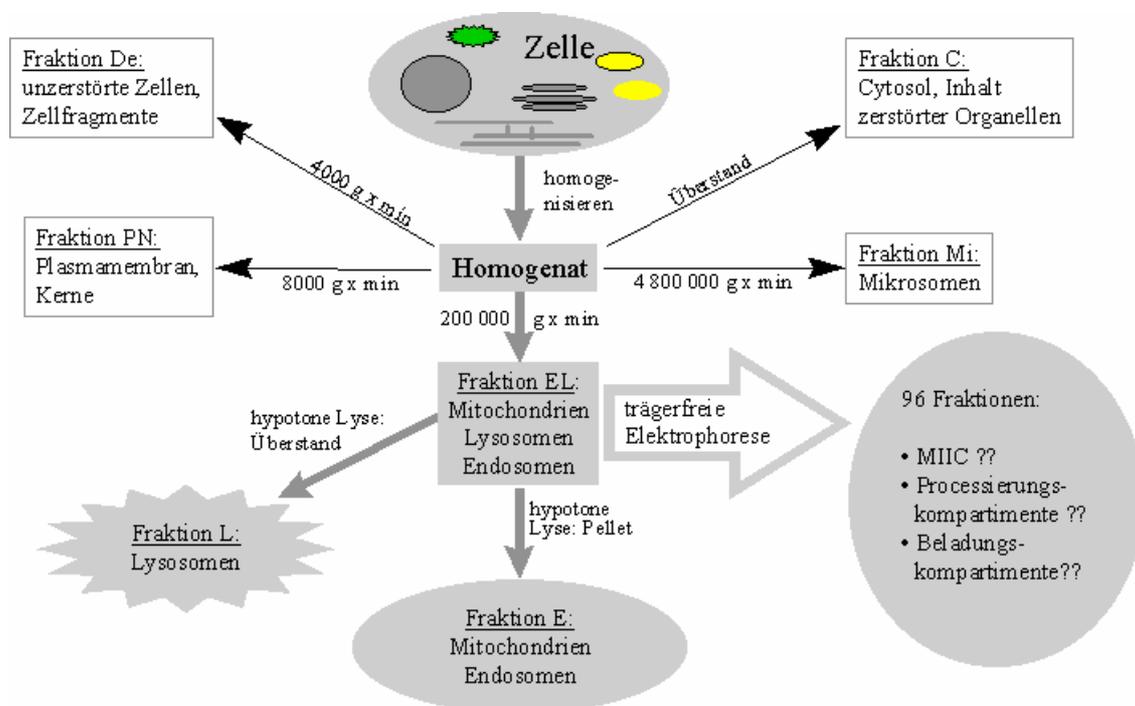


Abb. 1: Schematische Darstellung der differentiellen subzellulären Fraktionierung (nach Christian Schröter).

4.12.2. Charakterisierung der Fraktionen

Die Qualität der Fraktionierung wurde in der Regel durch Enzymaktivitätsmessungen überprüft. Als lysosomaler Marker wurde die Aktivität von N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAG) mit 4-Methylumbeliferyl-N-Acetyl- β -D-Glucosaminid (Sigma) fluorometrisch nach Schmid et al. (1993) bestimmt. Die NAG-Aktivität sollte überwiegend in terminalen Lysosomen zu finden sein (Casciola-Rosen & Hubbard, 1991). Für die Quantifizierung wurde 4-Methylumbelliferon verwendet. Zusätzlich wurde in der Regel die Cathepsin BLS Gesamtaktivität bestimmt. Diese lysosomalen Proteasen sind zwar auch in Endosomen aktiv, entfalten ihre höchste Aktivität jedoch in lysosomalen Kompartimenten. Nach der hypotonen Lyse befindet sich deswegen der Großteil an Aktivität im Überstand, während in Endosomen Aktivitäten gemessen werden, die in etwa denen im Gesamtzellhomogenat entsprechen. Teilweise wurden frühe endosomale Kompartimente durch Pulsversuche mit Peroxidase und FITC-markiertem Transferrin identifiziert.

4.13. Subzelluläre Fraktionierung mit Hilfe der trägerfreien Elektrophorese

Trägerfreie Elektrophoresen (engl.: free flow electrophoresis oder FFE) werden schon seit längerem für Proteinaufreinigungen eingesetzt. Subzelluläre Fraktionierungen mittels FFE wurden erstmals zur Identifikation und Charakterisierung eines speziellen endosomal-lysosomalen Kompartiments in der Mauszelllinie A20, dem CIIV, das bei der MHC Klasse II-Antigenpräsentation eine Rolle spielt (Amigorena et al., 1994; Amigorena et al., 1995), beschrieben. Das Trennprinzip dieser Elektrophoresetechnik besteht darin, dass die eingebrachte Probe im Pufferstrom senkrecht zur Laufrichtung des Puffers abgelenkt wird. Die folgende Abbildung verdeutlicht das Trennprinzip:

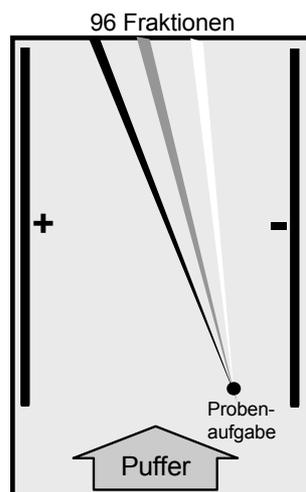


Abb. 2: Schematische Darstellung der trägerfreien Elektrophorese.

Die Trennkammer ist 50 cm lang, 10 cm breit und 0,5 mm tief. Sie wird begrenzt durch einen verspiegelten, gekühlten Aluminiumblock auf der Rückseite und eine Plexiglasscheibe auf der Vorderseite, die über 12 Klammern mit einem 0,5 mm dicken Spacer fest auf den Aluminiumblock gespannt wird. Senkrecht zur Laufrichtung des Trennpuffers liegt die Spannung an. Am Ende der Trennkammer werden senkrecht zur Laufrichtung auf den 10 cm Breite der Kammer 96 Fraktionen direkt in Mikrotiterplatten abgeführt. Zu Details bezüglich

Aufbau und Technik des Gerätes soll hier nicht eingegangen, sondern auf das ausführliche Gerätehandbuch verwiesen werden (Weber, 1997).

Der entscheidende Vorteil dieser Methode liegt darin, dass keine stationäre Phase nötig ist wie zum Beispiel bei der Gelelektrophorese, weshalb auch große Partikel wie intakte Zellorganellen getrennt werden können. Die Trennung erfolgt kontinuierlich, das heißt in den fließenden Pufferstrom wird ununterbrochen Probe eingebracht (z. B. das Organellenpellet aus der differentiellen Zentrifugation). Die Trennung der Partikel erfolgt nun aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität im elektrischen Feld, d.h. sie werden verschieden stark aus ihrer geraden Fließrichtung abgelenkt. So können die verschiedenen Organellen am Ende der Trennkammer an unterschiedlichen Punkten aus dem System entnommen werden. Organellen zeigen in der Summe eine negative Oberflächenladung, so dass sie immer in Richtung zur positiv geladenen Elektrode abgelenkt werden.

4.13.1. Präparation der Probe

Zunächst wird mit der differentiellen Zentrifugation ein Organellenpellet präpariert. Danach wird es vor der Elektrophorese kurz mit Trypsin behandelt, da sonst Cytoskelettproteine die Oberflächenladung von Endosomen und Lysosomen maskieren (Marsh et al., 1987; Schmid et al., 1988). Der Verdau wird mit 5 µl Trypsinlösung (0,2 mg/ml in Trennpuffer (10 mM Tris/Essigsäure, pH 6,9, 250 mM Sucrose)) pro µg Organellenpellet 10 min bei 37°C im Heizblock durchgeführt und mit dem 10-fachen Überschuss an Sojabohntrypsininhibitor gestoppt. Der Verdauansatz wird bei 100 000 g für 2 min zentrifugiert, in 5 µl Trennpuffer pro mg Pellet aufgenommen und auf Eis gekühlt zur elektrophoretischen Trennung eingesetzt.

4.13.2. Trennung

Alle Experimente werden bei 10°C in der waagrecht liegenden Trennkammer durchgeführt. Die eigentliche Trennung erfolgt im Trennpuffer (10 mM Tris/Essigsäure, pH 6,9, 250 mM Sucrose), der an beiden Seiten in der Elektrophoresekammer durch die bezüglich der Puffersubstanz 10-fach konzentrierten Randstabilisierung (100 mM Tris/Essigsäure, pH 6,9, 220 mM Sucrose) vor Verarmung an Ionen geschützt wird. In den Elektrodenräumen läuft Elektrodenpuffer (100 mM Tris/Essigsäure, pH 6,9). In verschiedenen Experimenten wurden von Christian Schröter die geeigneten Trennparameter etabliert (Spannungen zwischen 700-1000 V, pH-Variationen im Puffer, unterschiedlicher Flow u.a.). Für eine gute Trennung haben sich 800 V als ausreichend erwiesen (bei etwa 100-110 mA Strom und einer Leistung von 80-88 W). Alle folgenden Trennungen wurden bei diesen Bedingungen gefahren. Sowohl die Kontrolle der Stromstärke ist wichtig, weil deren Veränderungen auf Leckströme oder auf zu hohe Leitfähigkeit der Puffer hinweisen, als auch die Kontrolle der Kühlung (Trennungen über 900 V überforderten z. B. die Systemkühlung), wodurch insgesamt geringe oder stark veränderte Trennungen resultieren können.

Für die Cytosolauftrennung wurden bis auf den geringfügig reduzierten Pufferfluss identische Trennbedingungen verwendet. Der Pufferfluss betrug etwa 1 l/h und die Probe wurde mit etwa 1 ml/h eingebracht.

Nach der Trennung ist darauf zu achten, dass wegen der hohen Sucrosekonzentration das komplette System mit reichlich destilliertem Wasser gespült wird. Ansonsten können vor allem die feinen Schläuche der Probenentnahme leicht verkleben.

4.14. Subzelluläre Fraktionierung mit Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation

Das durch differentielle Zentrifugation erhaltene Endosomen/Lysosomen/Mitochondrien-Mischpellet („Organellenpellet“) kann über einen Percoll-Dichtegradienten weiter aufgetrennt werden. Dazu wird das Organellenpellet in ca. 200 µl Fraktionierungspuffer aufgenommen und auf eine 20%-ige Percoll-Fraktionierungspufferlösung geschichtet und im SW 28 Rotor bei 16700 rpm 45 min zentrifugiert. Diese Art der Fraktionierung erlaubt eine verfeinerte Auftrennung der Organellenfraktion in verschiedene Endosomen/Lysosomen-Stadien.

Danach wird das Zentrifugenröhrchen (10 ml) in einem Stativ fixiert und am Boden ganz vorsichtig mit einer Nadel perforiert, so dass die aufgetrennten Fraktionen verwirbelungsfrei in Eppendorfcups aufgefangen werden können (jeweils 1ml/cup). Die Fraktionen werden mit dem 2-3 fachen Volumen an Fraktionierungspuffer verdünnt und 10 min in der UZ bei 100000 rpm (400 000g) zentrifugiert. Das auf einer Art Percollkissen aufschwimmende Protein kann konzentriert in etwa 100 µl Puffer oder H₂O aufgenommen werden. Die so erhaltenen (8) 10 Fraktionen wurden aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

4.15. Bestimmung der Cathepsin B-, L- und S-Aktivität

Die Cathepsine B, L und S sind Thiolproteasen, die alle drei mit dem fluorogenen Substrat Z-Phe-Arg-AMC (Morita et al., 1977) umgesetzt werden können. Für alle drei Cathepsine sind auch jeweils spezifische Substrate beschrieben. Allerdings ist ein Vergleich der Aktivitäten einfacher, wenn sie mit dem gleichen Substrat (unter Substratsättigung) gemessen werden. Alle Messungen wurden mit 500 µM Z-Phe-Arg-AMC nach einem modifizierten Verfahren (Schmid et al., 1997) durchgeführt. Zunächst wird die Cathepsin B, L, S Gesamtaktivität in 100 µl 0,1 M Citratpuffer pH 5,0 (4 mM DTT, 4 mM EDTA, 6 µM Aprotinin, optional 0,01% Triton) bestimmt. Nach Zugabe der Probe (ca. 0,05-1 µg Protein; richtige Proteinmenge über mehrere Verdünnungen überprüfen!) wird die Reaktion mit 10 µl Substratzugabe (6,25 mM in DMSO) gestartet und die freigesetzte Fluoreszenz im Fluoreszenzreader (Tecan SpectraFlour, Crailsheim; 360 nm Anregung, 465 nm Emission) bei 37°C alle 10 min gemessen. Alle Enzymaktivitäten werden mittels linearer Regression aus mindestens 4 Messpunkten ermittelt. Der entsprechende Korrelationskoeffizient gibt Auskunft über die Zuverlässigkeit der Messung.

Wird dem gleichen Reaktionsansatz der spezifische Inhibitor CA074 (10 µM; Towatari et al., 1991) zugesetzt, so entspricht die inhibierte Aktivität Cathepsin B. Die verbleibende Aktivität sollte der Cathepsin L-Aktivität entsprechen, was durch ein weiteres Experiment mit 0,5 µM Z-Phe-Phe-CHN₂ (in dieser Konzentration spezifischer Cathepsin L Inhibitor) überprüft werden kann.

Zur Cathepsin S-Aktivitätsbestimmung wird ein Probenaliquot (1-10 µg Protein; siehe oben) in 100 µl 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5 (4 mM DTT, 4 mM EDTA, 6 µM Aprotinin, optional 0,01% Triton) 1 h bei 37°C vorinkubiert, um eine vollständige Cathepsin B und L Inhibition

zu erzielen (Schmid et al., 1997; Kirschke et al., 1989). Nach Substratzugabe wird wie oben beschrieben für eine weitere Stunde im Fluoreszenzreader gemessen und analog ausgewertet. Bei geringen Cathepsin S Aktivitäten kann mit dem Tecan-Fluoreszenzreader nicht mehr zuverlässig gemessen werden. Die folgenden Cathepsin S-Aktivitätsmessungen der Keratinozyten (Schwarz et al., 2002) wurden deshalb von Frau Dr. Heide Schmid mit einem anderen Fluoreszenzmessgerät (Spektralfluorometer MARK I, Farrand) zusätzlich gemessen sowie durch Inhibition mit dem spezifischen Inhibitor LHVS (5 nM; Palmer et al., 1995) als Cathepsin S-Aktivität bestätigt.

Nur die durch den Cysteinproteaseninhibitor E64 (10 μ M; Hanada et al., 1978) inhibierbaren Enzymaktivitäten wurden zur Berechnung herangezogen. AMC wurde zur Kalibrierung verwendet.

4.16. Bestimmung der AEP Aktivitäten

Die 1997 erstmals als lysosomale humane Cysteinendoprotease beschriebene Asparaginylendopeptidase (AEP; Chen et al.; 1997) ist nicht durch E64 inhibierbar. Zur Aktivitätsbestimmung wird das fluorogene Substrat Z-Val-Ala-Asn-AMC (ZVAN-AMC, 100 μ M) eingesetzt und nur die durch den im Überschuss zugegebenen Inhibitor Z-Ala-Glu-Asn-Lys-NH₂ (ZAENK, 2 mM) kompetierbare Aktivität wird zur Auswertung herangezogen. Ein Probenaliquot (1-20 μ g) wird in 130 μ l 40 mM Citrat-, 120 mM Na₂HPO₄-Puffer, pH 5,8 (10 μ M E64, 4 mM EDTA, 6 μ M Aprotinin, 4 mM Mercaptoethanol, 0,01% TritonX100) 5 min vorinkubiert. Im folgenden wird dieser Puffer als AEP-Verdaupuffer bezeichnet.

Die Reaktion wird durch 10 μ l Substratzugabe (1 mM in DMSO) gestartet und bei 37°C im Fluoreszenzreader verfolgt. Die Quantifizierung erfolgt ebenfalls wie oben beschrieben durch lineare Regression von mindestens 4 Messpunkten und Kalibrierung mit AMC.

4.16.1. Kompetitionsassay mit AEP

Mit Hilfe desselben fluorogenen Substrates wurde ein Kompetitionsassay etabliert, bei dem das fluorogene Substrat (5 μ l 1 mM ZVAN-AMC in DMSO) mit 50 μ l Peptid (2 mM in H₂O) vorgelegt wird. Dann wird die Reaktion mit der Zugabe von 100 μ l AEP Verdaupuffer mit 0,5 μ l AEP gestartet und bei 37°C im Fluoreszenzreader verfolgt (360 nm Anregung, 465 nm Emission). Der Substratumsatz wurde wie beschrieben über lineare Regression von mindestens 6 aufeinanderfolgenden Messpunkten bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Substratumsätze aller eingesetzten Peptide auf das Kontrollpeptid normiert (maximale Fluoreszenz = 100% Substratumsatz). Es wurden in etwa 0,2 Units an AEP-Aktivität eingesetzt (0,5 μ l AEP; Isolierung Christian 11.10.01), so dass bei gain 60 im Fluoreszenzreader nach 60-70 min ungefähr 20 000 relative Fluoreszenzeinheiten generiert wurden. Bei über 20 000 Einheiten war die Kinetik nicht mehr linear, weil im K_m-Bereich von AEP gearbeitet wurde (~50 μ M) und dann die Substratkonzentration zu stark abfiel.

4.17. Isolierung von MHC Klasse I- und II-präsentierten Peptiden

Für die Isolierung werden folgende Puffer benötigt:

Lysepuffer (Grundpuffer):	10 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl, pH 8,0
Waschpuffer:	50 mM Na-Phosphat, 150 mM NaCl, 0,1 % (w/v) Zwittergent 3-12, pH 8,0
Elutionspuffer pH 8:	100 mM Na-Phosphat, 0,1 % (w/v) Zwittergent 3-12, pH 8,0
Elutionspuffer pH 2:	HPLC-H ₂ O/TFA (~ 0,1 %), pH 2,0
Elutionspuffer pH 11,2:	100 mM Na-Phosphat, 0,1 % (w/v) Zwittergent 3-12, pH 11,2
Säulenaufbewahrungspuffer:	Waschpuffer mit 0,05 % NaN ₃

Die pH-Werte aller Puffer sollten bei 4°C überprüft werden. Als Proteaseninhibitor wurde „Complete Mini“ (Böhringer Mannheim, 1 Tablette für 10 ml Lysevolumen) eingesetzt.

4.17.1. Immobilisierung von mAk an OSu-Sepharose

Für die folgenden Isolierungen wurden 2 neue L243-Säulen präpariert (L243 = anti HLA-DR, siehe 4.1.2.). Die Immobilisierung von mAk an OSu-Sepharose läuft analog der Kopplung eines Antigens und wurde in Kapitel 4.7. ausführlich beschrieben. Da die L243-Ak in Azidhaltigem Puffer vorlagen, sind sie vor der Kopplung mit Hilfe der Amicon-Filtrationskammer auf PBS umgepuffert worden.

4.17.2. Präparation des Zellysates

Alle Präparationsschritte erfolgen möglichst auf Eis oder bei 4°C. Die von etwa 30-50 Millionen HaCaT gesammelten, eingefrorenen Pellets (~20g) werden im 4-5-fachen Volumen Lysepuffer (etwa 60 ml) aufgenommen und mit 6 „Complete Mini“-Tabletten versetzt.

Auf einer Waage wird NP40 (Sigma) bis zu einer Konzentration von 2% (w/w) zugegeben und im Becherglas mit einem genau passenden, schweren Rührfisch für mindestens 3h im Kühlraum langsam gerührt (Schaumbildung vermeiden). Zunächst wird der Großteil an Zellbestandteilen für 15 min bei 3000 rpm und 4°C (Minifuge) zentrifugiert. Der Überstand wird durch Ultrazentrifugation (Ti 60-Rotor, 35 000 rpm, 30-40 min, 4°C) geklärt, danach mit einer Pipette vorsichtig abgenommen (flottierende Lipide möglichst zurücklassen) und über einen 45 µm-Filter (Sartorius) von evtl. noch vorhandenen Bestandteilen befreit. Jetzt sollte unbedingt nochmals der pH-Wert des Lysates überprüft werden und gegebenenfalls mit 1 M Trispuffer pH 8 auf einen pH-Wert von etwa 8 eingestellt werden. Die jeweiligen Zellpellets werden vereinigt und nochmals über Nacht lysiert.

4.17.3. Immunoaffinitätschromatographie

Alle nachfolgenden Schritte werden sofern nicht anderweitig beschrieben bei 4°C in einem Kühlraum durchgeführt. Die verwendeten Säulen werden alle zunächst mit Lysepuffer (mit 0,5% Triton oder auch ohne Triton) ausreichend gewaschen.

Das Zellysate wird in eine Probenschleife eingefüllt und bei 4°C (Kühlraum) mindestens 30 min über eine Vorsäule (CH-Sepharose 4B) mit einer Flussrate von ca. 5ml/min über einen

Kreislauf über die Säule gepumpt (Peristaltikpumpe P1, Pharmacia). Das so von unspezifisch an die Gelmatrix bindenden Bestandteilen befreite Lysat wird über Nacht mit 2-4 ml/min über einen „Zyklus“ bestehend aus Vorsäule und 2 Affinitätssäulen (L243-Sepharose-Säulen für HLA-DR; HL oder W6/32 für HLA-A, -B, -C; Tü22 für HLA-DQ) gepumpt.

Anschließend werden die Säulen einzeln vom Zyklus entkoppelt, der Überstand abgenommen und das sich im Gelbett befindende Restlysat durch Spülen mit dem 2-fachen Säulenvolumen an Lysepuffer mit 0,5% Triton X-100 (w/v) entfernt. Das Lysat wird aufbewahrt und mindestens noch einmal zyklisiert. Die Säule wird an einen UV-Detektor mit Schreiber angeschlossen (UV-Monitor 2138 Uvicord S, 278 nm Filter, LKB; Recorder 2210, LKB) und nun wird mit Waschpuffer pH 8 solange gewaschen, bis eine konstante UV-Absorption bei 278 nm erreicht ist. Sollen intakte MHC-Moleküle isoliert werden, erfolgt jetzt eine alkalische Elution mit dem Elutionspuffer pH 11,2. Wenn dagegen die MHC gebundenen Peptide gewünscht werden, erfolgt eine saure Elution mit dem Elutionspuffer pH 2,0. In den nachfolgenden Abschnitten werden beide Verfahren beschrieben.

4.17.4. Isolierung von MHC-Peptidkomplex

Die auf Waschpuffer umgepufferten Säulen werden mit Elutionspuffer pH 8 bis zur konstanten UV-Absorption bei 278 nm gewaschen. Meistens ändert sich die Baseline nur minimal. Die Elution erfolgt unter UV-Detektion bei 278 nm mit Elutionspuffer pH 11,2 bis zum Erreichen einer Baseline. Durch vorsichtiges „Aufschlännen“ der Sepharose wird in der Regel eine vollständigere und auch schnellere Elution erreicht, wodurch die Kontaktzeit des Affinitätsmaterials mit extremen pH-Werten zusätzlich verkürzt wird. Dadurch und durch unmittelbares Neutralisieren der Säule nach der Elution können die Säulen mehrfach genutzt werden. Das Eluat wird direkt in vorgelegte 1 M Tris/HCl pH 8 eingebracht, der pH überprüft (gegebenenfalls mit Tris/HCL auf pH 8 einstellen) und über Ultrafiltration (20 kDa-Membran, Sartorius; 50 ml Rührzelle Amicon) aufkonzentriert. Es wird auf Waschpuffer umgepuffert und anschließend auf ungefähr 500 µl eingengt. Zur Lagerung der MHC-Komplexe wird das Isolat auf 0,05% NaN₃ (w/v) eingestellt, mit EDTA und Proteaseninhibitoren versetzt und bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die Bestimmung der Protein-Konzentration erfolgt mit dem Roti-Nanoquant Reagenz (siehe 4.5.). Eine Auftrennung im SDS-PAGE (siehe 4.8.) ermöglicht die Beurteilung der Reinheit der Isolierung. Die MHC-Komplexe können jetzt für Bindungsassays oder andere Versuche eingesetzt werden.

4.17.5. Isolierung von MHC-Peptidliganden

Die auf Waschpuffer umgepufferten Säulen aus Abschnitt 4.17.3 werden mit mindestens 100 ml Waschpuffer gewaschen und die UV-Absorption aufgezeichnet, wobei nach etwa 30 ml eine konstante Absorption auftritt. Danach wird mit etwa 200-300 ml HPLC-H₂O gewaschen (die UV-Absorption weiter verfolgt), wobei die ersten 80 ml verworfen werden und der Rest aufgefangen und eingefroren wird (könnte schon erste Peptide enthalten). Mögliche Detergenzienreste (Schaumbildung) sollten soweit wie möglich sofort entfernt werden. Die Elution erfolgt unter UV-Detektion bei 278 nm mit Elutionspuffer pH 2,0. Auch hier kann ein vorsichtiges „Aufschlännen“ des Säulenmaterials angebracht sein.

Die Säule wird unmittelbar anschließend neutralisiert. Die Eluate werden in einem extrasauberen Glasgefäß aufgefangen und über eine 20 kDa-Membran (Sartorius) bis zur Trockene ultrafiltriert (50 ml Rührzelle, Amicon). Auch die Amiconkammer sollte nochmals extra mit Millipore-Wasser gereinigt werden. Die Filtrate werden anschließend in einem Glasrundkolben eingefroren und lyophilisiert. Das auf der Membran zurückbleibende Protein wird mit Waschpuffer von der Membran gelöst, der Proteingehalt bestimmt und mittels SDS-PAGE charakterisiert. Die Lyophilisate werden abwechselnd mit je 100-200 µl System A, System B und Methanol in ein Eppendorf-Cup überführt (mehrmals wiederholen) und in der Speedvac auf 200-300 µl eingeengt. Alle mit den sauren Eluaten in Kontakt kommenden Gefäße müssen vorher intensiv gereinigt und mit Millipore-Wasser gespült werden.

4.17.6. Trennung der freigesetzten Peptide

Zur Auftrennung der erhaltenen Peptidsammelfraktionen wird die Microbore Merck HPLC eingesetzt (Säule: C8, 125x2 mm, 5 µm; 0,2 ml/min Fluß, VYDAC). Die eingeengte Fraktion wird mit 3 Injektionen ohne Starten des Gradienten auf die Säule gebracht. Nach 10 min bei 100% System A wird ein linearer Gradient gestartet, der bis Minute 70 auf 60% System B ansteigt. Von da an steigt der Gradient auf 80% System B innerhalb von 10 Minuten. Ab Starten des Gradienten werden sämtliche Fraktionen gesammelt (auch wenn noch keine Peaks detektiert werden). Wenn möglich werden aufgetrennte Peaks in je einem Cup gesammelt. Alle gesammelten Fraktionen werden sofort mittels flüssigem N₂ eingefroren und bei -80°C gelagert. Für die weitere Identifizierung mit Hilfe der Massenspektrometrie werden einige Fraktionen bis auf wenige µl mit der Speedvac aufkonzentriert. Einige Proben wurden von Hermann Beck mit MALDI-PSD (Voyager, Applied Biosystems) sowie von Stefan Stevanovic (ESI-MS, Micromass) untersucht.

4.18. RT-PCR humanes Cathepsin S

Die RT-PCR wurde mit freundlicher Unterstützung von Timo Burster durchgeführt. Alle Materialien wurden, wenn nicht explizit erwähnt, von Peqlab, Erlangen bezogen. Die Gesamt-RNA von Kontroll-Keratinocyten, sowie von für 24 h mit IFN-γ stimulierten Keratinocyten wurden mit E.Z.N.A. total RNA kit isoliert. In beiden Fällen wurden 1 µg Gesamt-RNA mit 250 ng oligo (dt)-primer (Stratagene, Amsterdam) in einem Endvolumen von 10 µl DEPC-behandeltem Wasser gemixt, für 10 min auf 65°C erhitzt und auf Eis gekühlt. Die Reverse Transkription wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl 10x RT-Puffer (2,5 mM DTT, 1,25 mM dNTP) mit 25 Units an AMV RT durchgeführt. Die Proben wurden 1h bei 42°C inkubiert und auf Eis gekühlt. Die PCR wurde mit 2-6 µl an cDNA (100-500 ng), 10x Tag Puffer (0,2 mM dNTP), 50 pmol an forward-und reverse-primer, 2 Units an Tag Polymerase mit sterilem Wasser auf 50 µl Endvolumen zusammen pipettiert und über 35 Zyklen mit einem Thermal Cycler (Applied Biosystems 9700, Norwalk, CT) amplifiziert. Folgende Zyklusschritte wurden angewendet: Denaturierung bei 94°C, Annealing bei 56°C und Extension bei 72°C für jeweils 30 sec. Die PCR Produkte wurden mittels 2%-iger Agarose-Gelelektrophorese identifiziert.

Zur Amplifikation der cDNA wurden folgende Oligonukleotid Primer eingesetzt:

Humanes Cathepsin-S 5`CAGGAAAGCTGGTGACTCTCAG3` und
5`TCTGGGTAAGAGGGAAAGCTAGC3` (Genbank#XM-002028), humanes β -Aktin
5`TCAGAAGGATTCCTATGTGGGC3` und 5`CCATCACGATGCCAGTGGTA3`
(Genbank #NM-001101). Die Länge des zu amplifizierenden Cathepsin S DNA Segmentes
betrug 500 Basenpaare und das zur Positiv-Kontrolle der RT eingesetzten β -Aktin Gens 300
Basenpaare.

5. Ergebnisse

5.1. Subzelluläre Fraktionierung mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation

Das Ziel einer jeden Zellfraktionierung besteht darin, schonend mit einem geeigneten Homogenisierungsverfahren die Zellmembran der Zellen möglichst vollständig zu zerstören, die einzelnen Organellen aber intakt zu lassen, damit nicht vorzeitig lysosomale Enzyme freigesetzt werden. Homogenisierungen mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator haben sich hier sehr gut bewährt. Für die EBV transformierten Zelllinien und die adherent wachsenden Keratinozyten (HaCaT und Primärkulturen) sind in einem 5 ml-Homogenisator mit 60 µm Spalt zwischen Stempel und Homogenisationsgefäß 10-15 Hübe bei 500 rpm optimal. Die Gewinnung der lysosomalen Fraktion durch hypotone Lyse hat sich für die eingesetzten Zellarten bewährt. In aller Regel lassen sich lysosomale Proteasen um ein Mehrfaches in der lysosomalen Fraktion anreichern, wie die entsprechenden Enzymaktivitätsmessungen (NAG, Cathepsin B, L und S) zeigen. Für die NAG-Aktivitäten von B-Zellen liegen sie im Bereich von etwa 8 (lysosomale Fraktion gegenüber Gesamtzellhomogenat), für Cathepsin B, L, S zwischen 10 und 20 (Abb.3)

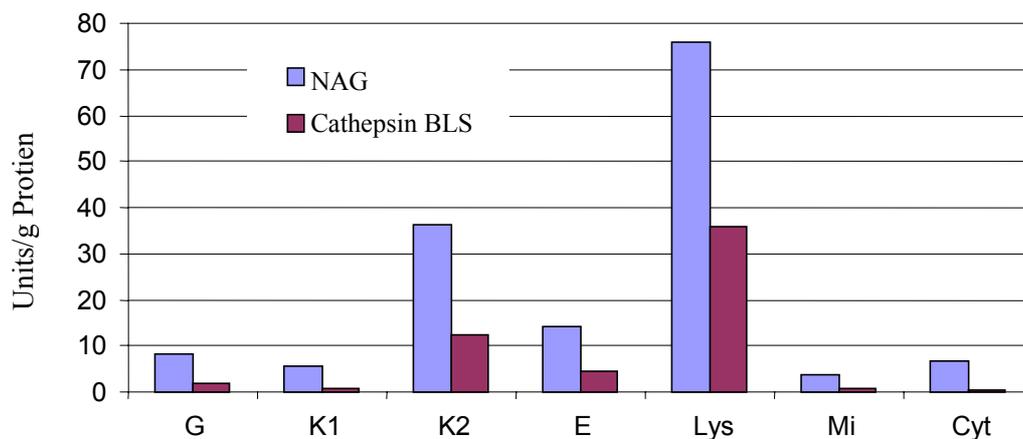


Abb. 3: Beispiel einer Fraktionierung von B-Zellen (WT51). Die Cathepsin BLS- und NAG-Aktivitäten sind in Units/g Protein angegeben. G = Gesamtzellhomogenat, K1 = Debris/Kernfraktion, K2 = Kernfraktion 2, E = endosomale Fraktion, Lys = lysosomale Fraktion, Mi = Mikrosomen, Cyt = Cytosol.

Da die K2 Fraktion bereits höhere Aktivitäten zeigte, wurde diese Fraktion in folgenden Fraktionierungen nicht mehr gewonnen. Bei großen Zellmengen musste trotzdem zur Sicherheit ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt eingesetzt werden, der dann aber noch einmal bei gleichen Bedingungen wie für die K1 Fraktion durchgeführt wurde.

Je nach Zellart können sich die Enzymaktivitäten um mehrere Größenordnungen unterscheiden. Beispielsweise finden wir bei primären Keratinozyten (siehe 5.4.2.) rund das zehnfache an NAG- und Cathepsin BLS-Aktivität (Abb. 4). Die Anreicherungsfaktoren in der lysosomalen Fraktion (gegenüber dem Gesamtzellhomogenat) lagen aber im gleichen Bereich

wie bei den B-Zellen, so dass von einer erfolgreichen Fraktionierung ausgegangen werden kann. Vergleicht man das Verhältnis der Aktivitäten von endosomaler zu lysosomaler Fraktion bei den Keratinozyten, so zeigte die NAG-Aktivität im Endosom ungefähr 2/3 der lysosomalen Aktivität und die Cathepsin BLS-Aktivität etwas mehr als 1/3, d.h. wir haben hier im Verhältnis wesentlich höhere endosomale Aktivitäten vorliegen. Vergleiche mit anderen primären Keratinozyten und HaCaTs ergaben ebenfalls relativ hohe endosomale Enzymaktivitäten.

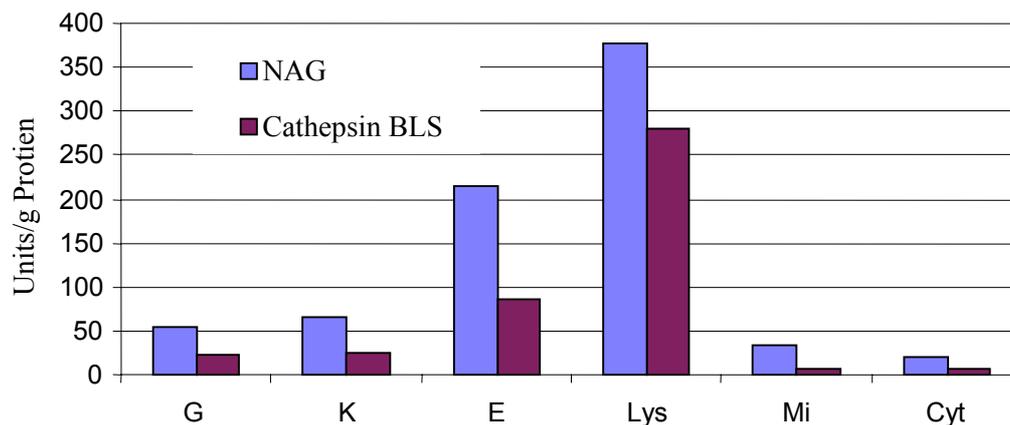


Abb. 4: Cathepsin BLS- und NAG-Aktivitäten der Fraktionierung von primären Keratinozyten. Aktivitäten sind in Units/g Protein angegeben. G = Gesamtzellhomogenat, K1 = Debris/Kernfraktion, E = endosomale Fraktion, Lys = lysosomale Fraktion, Mi = Mikrosomen, Cyt = Cytosol.

5.2. Subzelluläre Fraktionierung mit Hilfe der Percoll-dichtegradienten-Zentrifugation

Zur Isolierung verschiedener endosomaler und lysosomaler Fraktionen wurde das Organellen-pellet in einem 20%-igen Percollgradienten in 10 Fraktionen aufgetrennt. Während in einem früheren Experiment (Dissertation Hermann Beck, 8 Fraktionen) zwischen zwei relativ dichten Banden im unteren und oberen Bereich eine zusätzliche deutliche Bänderung zwischen diesen beiden Zonen auftrat, zeigten spätere Experimente nicht mehr diese deutliche Bänderung. Beim Aufkonzentrieren war von Fraktion 3-7 Protein sichtbar, allerdings waren die Proteinkonzentrationen gegenüber den Hauptfraktionen um ein mehrfaches geringer (Faktor 6-10). Die am tiefsten Punkt aufgetretene Bande (Fraktion 1) entspricht einem Organell mit der größten Dichte und hat damit lysosomalen Charakter, während die leichteste Bande einem frühen Endosom entsprechen dürfte (Fraktion 10). Somit erhält man zwischen Fraktion 1 und 10 eine graduelle Abstufung der Organellen über verschiedene Lysosomenstadien bis zu unterschiedlichen Endosomenstadien. Die später noch aufgeführten Ergebnisse der Enzymaktivitäten können dies teilweise bestätigen.

Percollreste stören sehr stark bei der Proteinbestimmung mittels Bradford- oder Roti-Nanoquant-Reagenz, wie entsprechende Versuche mit Proteinstandards zeigten. Der Proteingehalt wurde daher über BCA-Mikroassay ermittelt. Bei dieser Methode lassen sich,

ohne merkliche Verluste an Protein, Percollreste gut ausfällen und abzentrifugieren. Die Markierung früher endosomaler Kompartimente bzw. eine entsprechende Zuordnung im Gradienten erfolgte durch einen fünfminütigen Peroxidasepuls und durch Nachweis von MHC Klasse II und invarianter Kette im Westernblot (Dissertation Hermann Beck). Demnach konnten für diesen Versuch frühe endosomale Kompartimente Fraktion 6/7 zugeordnet werden (höchste POD-Konzentration), Fraktion 1 und 2 ergaben lysosomalen Charakter (höchste NAG-Aktivität, kein bzw. wenig MHC II und Ii) und Fraktion 3 und 4 könnten einem Beladungskompartiment zugeordnet werden (viel MHC II und Ii).

5.2.1. Enzymaktivitäten in mit Percollgradienten fraktionierten B-Zellen

Die Percollfraktionierung ist im Vergleich zur differentiellen Fraktionierungsmethode eine relativ aufwändige Methode, weil wesentlich mehr Zeit, vor allem wegen der langen Zentrifugationsschritte aufgebracht werden muss. Im übrigen bleiben immer mehr oder weniger Percollreste zurück, welche die Enzymaktivitäten stören können. In Zusammenarbeit mit Hermann Beck konnte an EBV-transformierten B-Zellen gezeigt werden, dass durchaus nach Percollfraktionierung noch brauchbare Enzymaktivitäten vorhanden bzw. messbar waren. Hier kam ein 20%-iger Percollgradient zur Anwendung, mit dem ein Organellenpellet von BSM-Zellen mit einem Festwinkelrotor fraktioniert wurde (Ti-60, 45 min 50 000 g). Es wurden 8 Fraktionen gewonnen und bezüglich Ihrer Cathepsin (BLS)- und AEP-Aktivität untersucht. Die maximalen Aktivitäten für diese Enzyme wurden in Fraktion 2 und somit in lysosomalen Kompartimenten gemessen (Die ebenfalls gemessene NAG-Aktivität bestätigte dies). In Fraktion 1 waren zu viele störende Percollreste vorhanden, so dass die Ergebnisse dieser Fraktion nicht oder nur eingeschränkt berücksichtigt wurden.

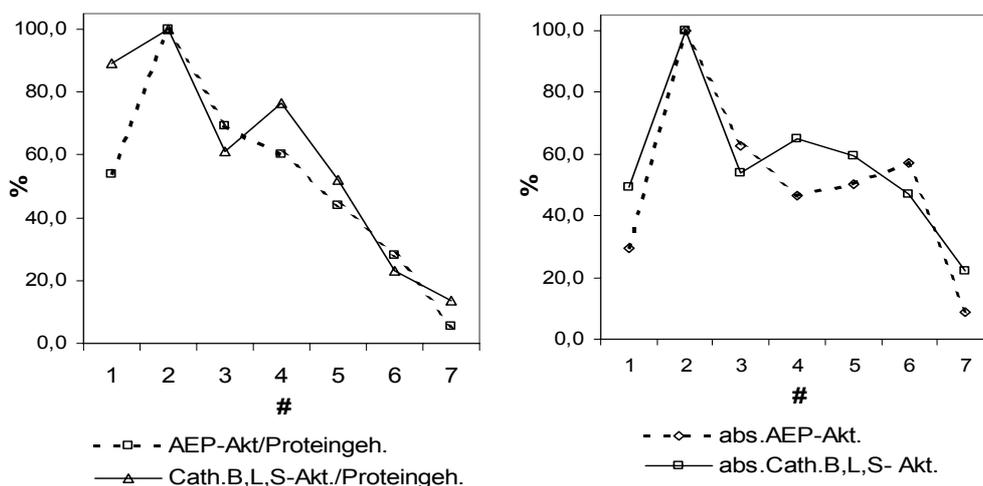


Abb. 5: AEP- und Cathepsin B-, L-, S-Aktivität in den Sammelfractionen 1-7 nach Auftrennung einer B-Zellen-Organellenfraktion (BSM) über einen 20%-igen Percollgradienten. Alle Werte sind relativ zu dem auf 100% normierten Maximalwert angegeben (Quelle: Dissertation Hermann Beck).

Die Fraktionen, die eher früheren endosomalen Kompartimenten entsprechen sollten (Fraktion 5, 6 und 7 bzw. siehe oben), zeigten noch deutlich hohe Enzymaktivitäten, die noch ungefähr der Hälfte der maximalen Aktivität in Fraktion 2 entsprachen. Die Aktivitäten in Fraktion 8 wurden nicht dargestellt. Sie entsprechen wahrscheinlich dem durch Platzen von Organellen verursachten Hintergrund.

Mit derselben, wieder aufgegriffenen Percollfraktionierungsmethode wurden B-Zellen und frisch isolierte PBMCs, die für mehrere Tage kultiviert worden sind, in zehn Fraktionen aufgetrennt. Anstelle des Festwinkelrotors wurde allerdings ein Ausschwingrotor (SW28, 45min 16 700 rpm) und kleinere Zentrifugenröhrchen verwendet (10 ml).

Im Falle der B-Zellen wurde mit AMCA markiertem- und biotinyliertem-MBP und FITC-Transferrin für 30 min gepulst. Zwar konnte das Transferrin in der HPSEC sehr gut nachgewiesen werden, trat aber in allen Fraktionen auf, womit keine eindeutige Zuordnung in frühe (Transferrinrezeptor-Recycling-) Kompartimente möglich war (In Fraktion 4-7 fand sich die höchste Intensität, etwa doppelt so hoch. Diese Fraktionen dürften aber eher nicht mehr früheren Endosomen entsprechen). Das AMCA-MBP war zu schwach markiert und nicht detektierbar, während das biotinylierte-MBP, ähnlich dem Transferrin, in sämtlichen Fraktionen im ELISA deutlich positiv in Fraktion 10 sogar mit der höchsten Intensität vorlag. Im Westernblot ergaben sich relativ hohe MHC II-Gehalte ($DR\alpha$) von Fraktion 9-4 (in Fraktion 9 am deutlichsten \Rightarrow frühes Endosom) und die invariante Kette zeigte in Fraktion 4, 5, 6 und 9 die höchsten Signale, d.h. bei Fraktion 4, 5 und 6 könnten Beladungskompartimente vorliegen.

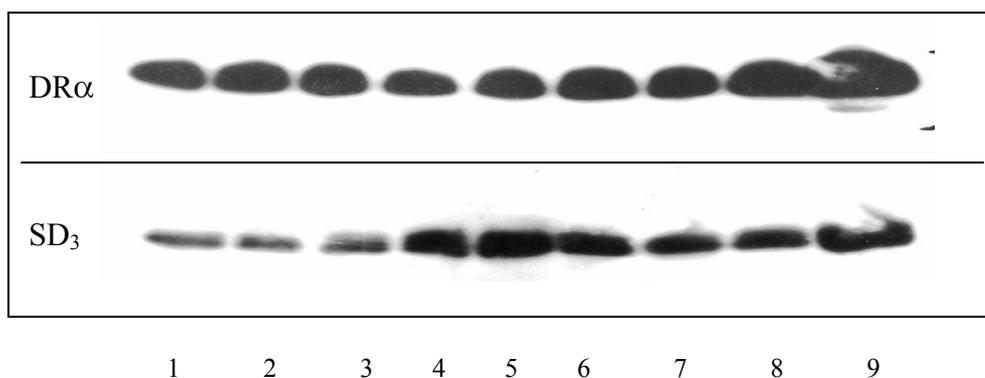


Abb. 6: Western Blot von 9 Percoll Fraktionen aus B-Zellen (WT51) deren Organellenpellet über einen 20%-igen Percollgradienten in 10 Fraktionen aufgetrennt wurde. Mit $DR\alpha$ (29 kDa) wurde MHC II und mit SD_3 (31 kDa) die invariante Kette detektiert.

Wie bereits erwähnt, war trotz gleichem Percollgradienten die Proteinbänderung leicht verändert. Die tiefste Bande (= Fraktion 1) sollte wiederum lysosomalen Charakter aufweisen und die oberste (= Fraktion 10) eher endosomalen Charakter. Die NAG- und Cathepsin BLS-Aktivitäten zeigten zwar für Fraktion 1 die höchsten Werte, aber vor allem die NAG-Werte der folgenden Fraktionen 2-9 blieben mit etwa 30% geringerer Aktivität unverändert hoch und ließen keine Tendenz erkennen. Nach Bestimmung der Cathepsin BLS-Gesamtaktivität

ergab sich ein etwas differenzierteres Bild. In Fraktion 9 fanden sich in etwa 6-fach geringere Cathepsin BLS-Gesamtaktivitäten. Aufgrund von wahrscheinlich Plasmamembran-Verunreinigungen wurde Fraktion 10 nicht berücksichtigt. Die Cathepsin Aktivitäten zeigten in Fraktion 4 ein kurzes Ansteigen auf etwa 2/3 der Fraktion 1 und fielen dann über Fraktion 5, 7 und 8 auf etwa die Hälfte ab. Ob die Aktivität in Fraktion 6 tatsächlichen Werten entspricht konnte nicht gezeigt werden. Die NAG-Aktivitäten zeigten bei dieser Fraktion keine Auffälligkeiten.

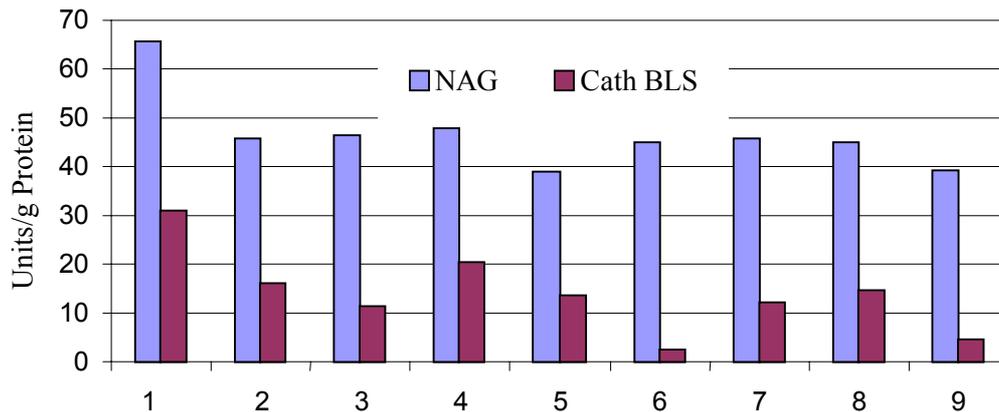


Abb. 7: Cathepsin BLS- und NAG-Aktivitäten in B-Zellen (WT51) deren Organellenpellet über einen 20%-igen Percollgradienten in 10 Fraktionen aufgetrennt wurde. Die Aktivitäten für die NAG-Aktivität sind in Units/g Protein angegeben und für Cathepsin BLS in Fluoreszenzeinheiten/min * μ g Protein. Fraktion 10 wurde nicht berücksichtigt.

Wie erwähnt, gelangen beim Aufkonzentrieren der Probe mehr oder weniger Percollreste in die Fraktionen, welche die Analysen stören können. Alle Fraktionen wurden auch auf ihre AEP-Aktivitäten überprüft. Allerdings waren diese außerordentlich gering. Selbst nach 24h und relativ viel eingesetztem Protein (5-10 μ g) konnten nur minimale Aktivitäten nachgewiesen werden, weshalb keine quantitativen Angaben gemacht wurden. Außer in Fraktion 5 und 7 lagen die relativen Fluoreszenzeinheiten zwischen 180 und 460 (Umsatz an ZVAN-AMC, bei gain 60 im Tecan SpectraFluor), so dass von einer zumindest durch ZAENK kompetierbaren Aktivität ausgegangen werden konnte.

5.2.2. Enzymaktivitäten in mit Percollgradienten fraktionierten PBMCs

Mit derselben Methodik wurden frisch isolierte und mehrere Tage kultivierte PBMCs aufgearbeitet (ca. 10% dendritische Zellen konnten generiert werden). Hier wurde allerdings kein Puls durchgeführt, sondern nur die Enzymaktivitäten in den 10 Percollfraktionen gemessen. In Abb. 8 ist zu erkennen, dass wir in diesem Falle eine konträre Situation vorliegen haben. Fraktion 1 entsprach dem dichtesten Organell (unterste Percollfraktion \Rightarrow lysosomaler Charakter) und Fraktion 10 dem leichtesten (oberste Percollfraktion \Rightarrow frühes endosomales Kompartiment).

Die Bedingungen waren genau dieselben wie bei den WT51-Zellen und es trat in etwa die gleiche Bänderung auf. In Fraktion 9 trat die höchste Proteinkonzentration auf, 8 und 10 hatten etwa $\frac{1}{4}$ und die restlichen Fraktionen etwa $\frac{1}{10}$ bis $\frac{1}{20}$.

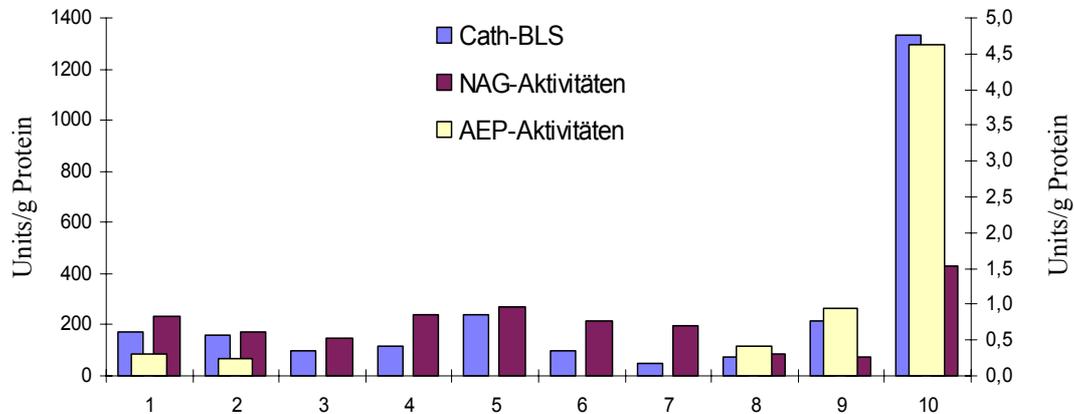


Abb. 8: Cathepsin BLS-, AEP- und NAG-Aktivitäten in PBMCs, deren Organellenpellet über einen 20%-igen Percollgradienten in 10 Fraktionen aufgetrennt wurde. Alle Aktivitäten sind in Units/g Protein angegeben. Die AEP-Aktivitäten sind auf die Sekundärachse bezogen.

Zunächst bleibt festzuhalten, dass im Vergleich zu den WT51-Zellen insgesamt relativ hohe Enzymaktivitäten gemessen wurden. Sowohl die NAG- als auch die Cathepsin BLS- und AEP-Aktivitäten lagen um ein mehrfaches höher. Die NAG-Werte bewegten sich von Fraktion 1-7 in einem Bereich von etwa 200 U/g (Units/g Protein) fielen in Fraktion 8/9 auf die Hälfte ab und lagen in Fraktion 10 bei 430 U/g. Die Cathepsin BLS-Aktivitäten zeigten in Fraktion 3/4 (ca. 100 U/g) und 7/8 (50/70 U/g) die geringsten Werte stiegen über Fraktion 4 bis zu 5 auf etwa das doppelte an und zeigten in Fraktion 10 mit über 1000 U/g ein mehrfaches an Aktivität. In Fraktion 3-7 konnten keine AEP-Aktivitäten nachgewiesen werden, während in Fraktion 1, 2 und 9 etwa 0,3 bis 0,9 U/g und in Fraktion 10 4,6 U/g gemessen wurden. Somit waren in der leichtesten Percollfraktion und damit in frühen endosomalen Kompartimenten die höchsten Aktivitäten gemessen worden.

5.3. Trägerfreie Elektrophorese

Die trägerfreie Elektrophorese (engl.: free flow electrophoresis oder FFE) erlaubt eine sehr schonende Trennung verschiedener endosomal/lysosomaler Kompartimente. Ausgehend von einer Publikation in Nature (Amigorena et al., 1994) etablierte Christian Schröter an einem solchen Gerät (Anschaffung durch SFB 510, Stammzellbiologie und Antigenprozessierung) eine Methode, mit der das Organellenpellet einer Zellfraktionierung ohne Anwendung eines Percollgradienten in mehrere Fraktionen aufgetrennt werden konnte. Ziel war die Isolierung eines MHC Klasse II-Beladungskompartiments bzw. die Auftrennung in verschiedene prozessierungsrelevante Organellen.

In der Regel wurden mehrere Milliarden frisch geernteter Zellen eingesetzt. Die Methoden-etablierung war (ist) sehr zeitaufwendig, da die Charakterisierung aller wichtigen Parameter durch Enzymaktivitätsbestimmungen und ELISA oder weiterer Methoden etwa eine Woche und mehr Zeit in Anspruch nimmt. Zunächst wurde wiederum mit der differentiellen Zentrifugation ein Organellenpellet präpariert, welches nach tryptischer Vorbehandlung über die Probenpumpe in die Kammer eingebracht wurde. Da kontinuierlich Puffer und Probe durch die Kammer gepumpt werden, kann praktisch beliebig viel Material getrennt werden. Die Zugabegeschwindigkeit der Probe muss allerdings angepasst sein, weil je nach Art der Probe Protein präzipitieren kann. Dass diese Methode prinzipiell die Auftrennung in verschiedene Kompartimente erlaubt zeigt folgende Abbildung:

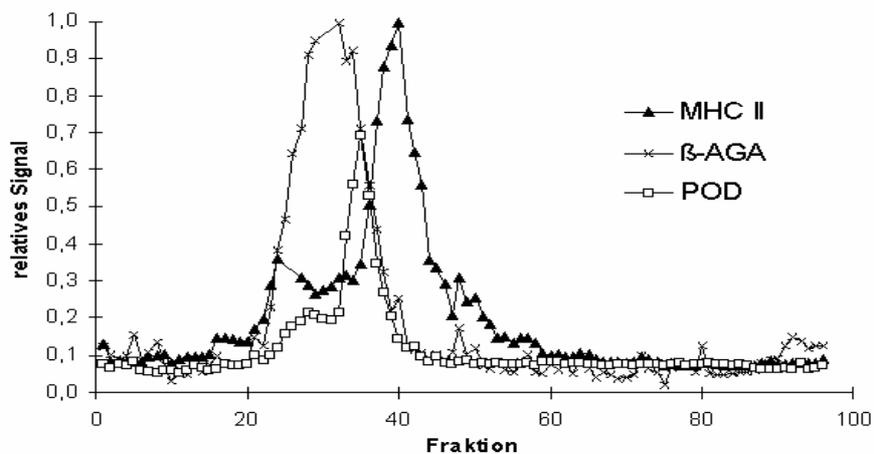


Abb. 9: FFE Auftrennung eines Organellenpellets (nach tryptischer Vorbehandlung) von B-Zellen. MHC Klasse II wurde mit ELISA, NAG über fluorogenes Substrat und POD direkt über POD-Substratlösung nachgewiesen.

Wie in Material und Methoden erwähnt, war die Überwachung der Stromstärke wichtig. Erstens war die Reproduzierbarkeit aufeinander folgender Experimente, ähnlich einer HPLC, überraschend hoch, wenn mit saubersten Chemikalien und sauberstem Wasser eine auf das Minimum reduzierte Leitfähigkeit der Puffer gewährleistet wurde. Zweitens waren bei gleichbleibender Stromstärke Trennungen über mehrere Stunden problemlos möglich. Insgesamt gelang eine Auftrennung über ungefähr 30 Fraktionen. Mit Hilfe eines POD-Pulses (5 min) wurde versucht frühe endosomale Kompartimente zu definieren. Man sieht zwischen den Hauptsignalen von MHC Klasse II und NAG Organellen, die schnell für POD zugänglich sind (Fraktion 32 bis 38). Diese Organellen enthalten sowohl MHC Klasse II-Moleküle als auch NAG-Aktivitäten. Wurde die POD Pulszeit auf 30 min erhöht, so konnten alle NAG-haltigen Organellen markiert werden (Dissertation Christian Schröter).

5.3.1. Enzymaktivitäten in FFE Fraktionen

Aufgrund der schonenden Auftrennungsmethode sollten Enzymaktivitäten in FFE Fraktionen relativ gut messbar sein. In Abb. 3 sind bereits über die NAG-Aktivitäten lysosomale Kompartimente charakterisiert worden, und es zeigte sich, dass die Aktivitäten in diesem Fall außerordentlich gut messbar waren. Aufgrund der Pufferbedingungen (250 mM Sucrose, 10 mM Triethanolamin, pH 7,1) und eines ziemlich großen Verdünnungseffektes (ca. 100-200 μ l Probe wurden in 10-15 Mikrotiterplatten aufgefangen!) war dies nicht unbedingt zu erwarten. Im Falle der Cathepsin BLS-Aktivitäten wurden deshalb jeweils 50 μ l Probe Minimum eingesetzt. Es wurden nur relative Aktivitäten bestimmt, weil einerseits das fluorogene Substrat Z-Phe-Arg-AMC nur noch 50 μ M eingesetzt wurde (nicht mehr sättigend für Cathepsin B) und andererseits nur die relative Aktivitätsverteilung innerhalb einer Auftrennung von Interesse war. In Abb. 10 zeigt sich, dass mit dieser Methode auch Cathepsin BLS-Aktivitäten recht gut messbar waren. Messungen mit anderem Zellmaterial bestätigten dies (mit teilweise weit höheren Messwerten). Für geringe Enzymaktivitäten wie im Falle von Cathepsin S (oder AEP) wäre wahrscheinlich nur noch ein Nachweis möglich, indem man über Nacht bei 37°C inkubiert.

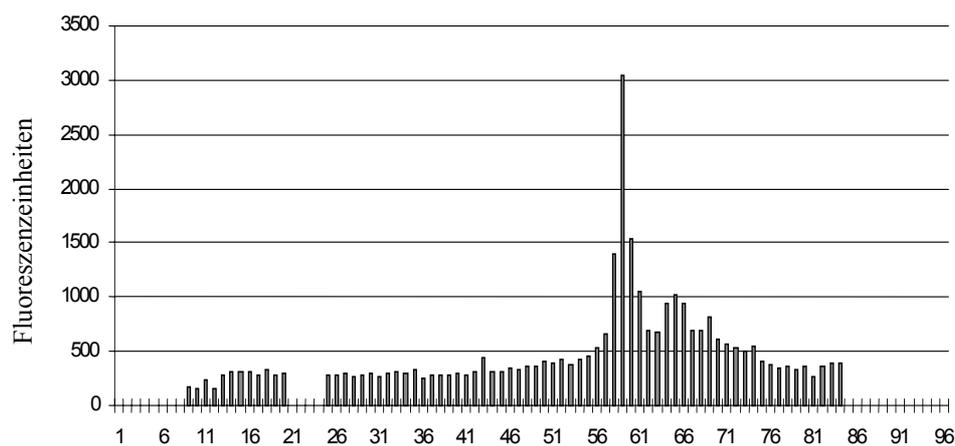


Abb. 10: Cathepsin BLS-Messung in durch FFE eines Organellenpellets (WT51-Zellen) aufgetrennten Fraktionen mit 50 μ M Z-Phe-Arg-AMC nach 2h Inkubation bei 37°C. Es sind nur die Fluoreszenzeinheiten angegeben.

Ein Messversuch mit dem AEP Substrat ZVAN-AMC über mehr als 12h ergab ein ähnliches Bild wie Abb. 10 mit allerdings wesentlich geringeren Substratumsätzen (sie lagen bei etwa 1500 Fl.-Einheiten bei gain 60; Zellmaterial Maus-T-Zellen) zeigte aber, dass bei geringen Enzymmengen durch ein Verlängern der Messzeit zumindest ein Aktivitätsnachweis möglich war. Da aber keine Kompetitoren und keine Inhibitoren eingesetzt wurden, können andere Proteaseaktivitäten nicht ausgeschlossen werden.

5.3.2. Isolierung einer cytosolischen Protease mit der FFE

Die FFE erlaubt außer der beschriebenen Organellen-Auftrennung jede Art von Proteinisolierung. Für die Aufreinigung einer cytosolischen Protease, die bei der MHC Klasse I-

Prozessierung eine Rolle spielt, wurde mittels differentieller Zentrifugation von B-Zellen (COX) Cytosol präpariert und anschließend in der FFE aufgetrennt. Die aufgefängenen 96 Fraktionen wurden mit spezifischen Fluoreszenzsubstraten und Inhibitoren analysiert und anschließend die gewünschten Fraktionen aufgefangen. Etwa 2-3 ml Cytosol konnten so kontinuierlich bis zu 4h aufgearbeitet werden. Weitere Aufreinigungsschritte (Lars Stoltze) führten zur einer schon lange bekannten Protease, deren Rolle bei der Antigenprozessierung bisher aber nicht bekannt war (Stoltze et al., 2000).

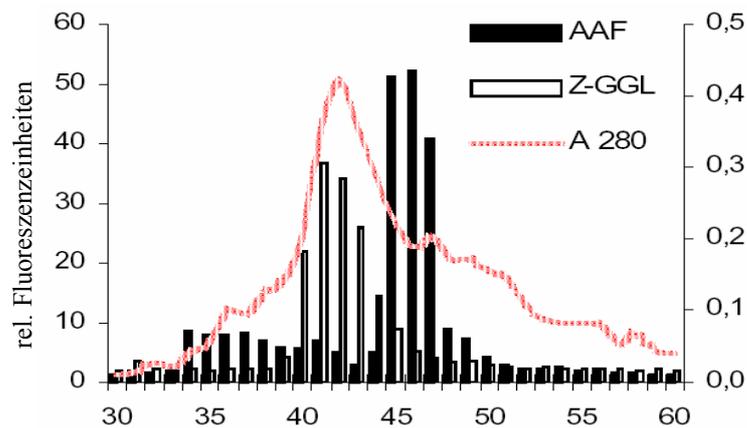


Abb. 11: Ergebnis der FFE-Auftrennung von Cytosol von COX-Zellen. Mit Z-GGL-AMC wurde eine Endoproteaseaktivität, mit AAF-AMC eine Aminoproteaseaktivität getestet. Die AAF-Fluoreszenz, die selektiv inhibiert werden konnte, wurde als zu isolierende Fraktion ausgewählt (44 und 45). Die y-Achse entspricht Fluoreszenzeinheiten. (Quelle: Stoltze et al., 2000).

Dies Beispiel soll zeigen, dass die FFE für unterschiedliche Fragestellungen erfolgreich eingesetzt werden kann.

5.4. Immortalisierte Keratinozyten und Keratinozyten in Primärkultur

5.4.1. Aktivitäten der Cathepsine B, L und S in HaCaT-Keratinozyten

Die Gesamtaktivitätsbestimmungen (B, L und S) in den einzelnen, mittels differentieller Zentrifugation gewonnenen Subkompartimenten im Tecan Fluoreszenzreader hat sich als zuverlässig erwiesen. Die Modifizierung des Assays nach Heide Schmid (Schmid et al., 1997) erlaubt es nun direkt, die im Reaktionsansatz freigesetzte Fluoreszenz zu messen. Da allerdings teilweise Eintrübungen der Ansätze auftreten können, vor allem wenn hohe Proteinkonzentrationen eingesetzt werden, muss über mehrere Proteinverdünnungen und Messungen die Richtigkeit der Werte überprüft werden. Deshalb wurde das Verfahren von mir nochmals leicht abgeändert. Der jetzt auf 150 µl Gesamtvolumen angesetzte Reaktionsansatz (130 µl Puffer mit 0,01% Triton, 10 µl Proteinaliquot und 10 µl Substrat) setzt zwar die Substratkonzentration auf ca. 450 µM herunter, verringert aber die oben erwähnte Gefahr, wodurch zuverlässigere Messwerte erzielt werden.

Bei sehr geringen Enzymaktivitäten, wie z. B. beim Cathepsin S, ist trotzdem Vorsicht angebracht. Deshalb wurden die folgenden Cathepsin S-Aktivitäten zusätzlich mit der ursprünglichen Methode gemessen. Zunächst wurden Enzymaktivitäten in HaCaT-Keratinocyten gemessen (Tab. 1).

	Cathepsin B	Cathepsin L	Cathepsin S	NAG
H	32.1 ±2.6	2.1 ±0.8	0.03 ±0.01	19.9 ±3.5
D	47.7 ±1.4	1.1 ±0.1	0.07 ±0.05	19.5 ±3.4
E	65.5 ±7.0	8.3 ±3.1	0.12 ±0.09	36.6 ±4.0
L	348.1 ±40.2	52.7 ±1.9	0.60 ±0.06	149.1 ±14.6
M	8.4 ±0.9	0.4 ±0.4	0.06 ±0.01	6.4 ±2.5
C	6.8 ±0.8	1.0 ±1.0	0.02 ±0.02	6.9 ±1.2

Tab. 1: Enzymaktivitäten in subzellulären Fraktionen von HaCaT-Keratinocyten. Angaben in Units/g protein, Mittelwert von 2 unabhängigen Experimenten aus jeweils 2 Bestimmungen. H = Gesamtzellhomogenat, D = Debris, E = endosomale Fraktion, L = lysosomale Fraktion, M = Mikrosomen, C = Cytosol.

Die Cathepsin B-Aktivitäten tragen in allen Fraktionen zu etwa 90% an den Cathepsin-Gesamtaktivitäten bei. Während Cathepsin L noch zu ca. 10% dazu beiträgt, liegen die Cathepsin S-Anteile unter 0,2% und damit fast an der Detektionsgrenze. In Analogie zum endosomal/lysosomalen Markerenzym NAG, wurde die höchste Aktivität aller drei Cathepsine in endosomalen bzw. lysosomalen Fraktionen gefunden. Dabei war das Verhältnis der lysosomalen zur endosomalen Aktivität aller vier Enzyme ähnlich (ca. 5-fach höher in der lysosomalen Fraktion).

5.4.2. Aktivitäten der Cathepsine B, L und S in primären Keratinocyten

Da die HaCaT-Keratinocyten eine immortalisierte Zelllinie darstellen, stellte sich die Frage, ob wir vergleichbare Aktivitäten in humanen Keratinocyten in Primärkultur finden. Die Untersuchungen an aus Patientenmaterial isolierten und kultivierten Keratinocyten ergaben Cathepsinaktivitäten in ähnlicher Größenordnung (Tab. 2). Wiederum waren die höchsten Proteaseaktivitäten dem Cathepsin B zuzuschreiben, gefolgt von Cathepsin L und wesentlich geringeren Cathepsin S-Aktivitäten.

	Cathepsin B		Cathepsin L	
	KC	B	KC	B
H	21.8 ±2.5	1.9 ±0.3	0.2 ±0.0	1.8 ±0.1
D	24.9 ±0.9	2.3 ±0.1	0.6 ±0.1	1.4 ±0.0
E	73.0 ±5.5	4.4 ±0.4	13.3 ±3.3	3.2 ± 0.7
L	269.0 ±1.0	34.7 ±2.1	11.6 ±1.7	23.0 ±5.0
M	7.3 ±0.3	2.1 ±0.9	0.3 ±0.2	0.9 ±0.3
C	5.6 ±0.3	2.0 ±0.5	0.2 ±0.2	0.6 ±0.0

	Cathepsin S		NAG	
	KC	B	KC	B
H	0.01 ±0.00	0.03 ±0.00	44.6 ±10.4	12.9 ±0.5
D	0.01 ±0.00	0.01 ±0.00	89.2 ±23.0	12.1 ±0.1
E	0.06 ±0.03	0.39 ±0.10	130.9 ±83.9	23.5 ±2.1
L	0.15 ±0.03	0.78 ±0.21	247.7 ±128.9	147.3 ±26.6
M	n.d.	0.04 ±0.00	24.4 ±9.7	5.6 ±0.5
C	n.d.	0.05 ±0.01	20.3 ±0.8	2.0 ±0.1

Tab. 2: Endosomal/lysosomale Enzymaktivitäten in subzellulären Fraktionen von humanen Keratinozyten in Primärkultur (KC) und syngenen EBV-transformierten B-Zellen (B), welche von einem Patienten stammen. Die Angaben entsprechen Units/g Protein (Mittelwert von zwei Messwerten). Im Falle der B-Zellen wurden 2 Experimente für die Berechnung benutzt, für die Keratinozyten 1 Experiment mit 2 Bestimmungen. H = Gesamtzellhomogenat, D = Debris, E = endosomale Fraktion, L = lysosomale Fraktion, M = Mikrosomen, C = Cytosol.

Im Gegensatz zu den HaCaTs waren die NAG-Aktivitäten der primären Keratinozyten in etwa doppelt so hoch. Um die Cathepsinaktivitäten mit professionellen APCs vergleichen zu können, wurden vom selben Patienten (von dem Keratinozyten isoliert wurden), aus peripheren mononukleären Zellen, eine EBV-transformierte B-Zelllinie etabliert. In Tab. 2 sind die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen direkt vergleichend dargestellt.

Interessanterweise, zeigten die syngenen B-Zellen nur etwa 10% der Cathepsin B-Aktivitäten in allen Fraktionen, als die entsprechenden Keratinozyten, während die Cathepsin L-Aktivitäten vergleichbar waren. Zwar waren wiederum die Cathepsin S-Aktivitäten die geringsten aber in der endosomal/lysosomalen Fraktion deutlich höher als bei den Keratinozyten, wobei in der endosomal B-Zellfraktion auffallend hohe Cathepsin S-Werte vorhanden waren. Diese endosomale Aktivität entspricht ungefähr 50% der lysosomalen

Cathepsin S-Aktivität, während dasselbe Verhältnis bei den HaCaT- und primären Keratinozyten nicht so ausgeprägt ausfällt.

5.4.3. Stimulation der Keratinozyten mit Interferon- γ

Nach IFN- γ Stimulation exprimieren Keratinozyten MHC Klasse II-Moleküle und werden dadurch zu APCs. Deshalb wurde der Einfluss eines pro-inflammatorischen Cytokines, nämlich IFN- γ , sowohl auf die MHC Klasse I- und II-Expression, als auch auf die Cathepsinaktivitäten humaner Keratinozyten in Primärkultur im Vergleich zu der permanenten Keratinozytenzelllinie HaCaT untersucht.

Die konstitutive Expression von MHC Klasse I wurde nach Stimulation mit 1000 Units/ml über 72h verstärkt. Während HLA-DQ und HLA-DP schwach induziert wurden, war die Neu-Expression von HLA-DR stark ausgeprägt (Abb. 12). Darüber hinaus zeigte sich auch eine klare Induktion der intrazellulär detektierten invarianten Kette.

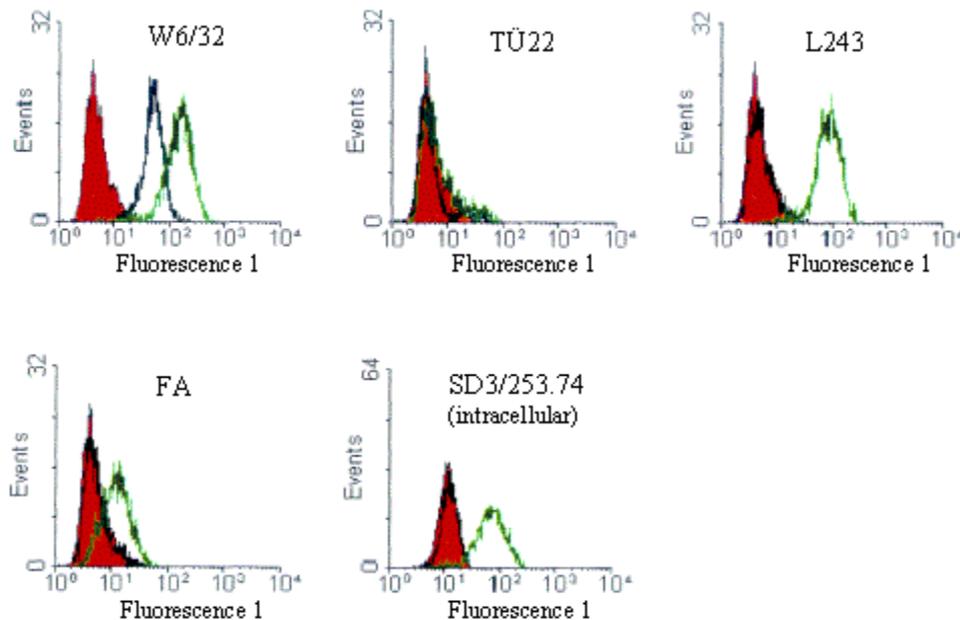


Abb. 12: Effekt der IFN- γ Stimulation (1000 Units/ml, 72h) auf die Expression der MHC Klasse I- und II-Moleküle sowie der invarianten Kette frisch isolierter Keratinozyten. Volles Profil = Negativ Kontrolle, dunkle Linie = ohne IFN- γ , graue Linie = Stimulation mit IFN- γ .

Die Auswirkung der IFN- γ Behandlung auf einen Teil der untersuchten Enzymaktivitäten war moderat. In beiden Keratinozyten Kulturen (HaCaT und Primärkultur) waren im Vergleich zu den Kontrollzellen die Cathepsin B- und NAG-Aktivitäten im Gesamtzellhomogenat leicht erhöht, während sie in den endosomal/lysosomalen Fraktionen leicht erniedrigt waren. Die gleiche Tendenz wurde auch bei den Cathepsin L-Aktivitäten beobachtet. Wenn wir uns nun den Cathepsin S-Werten zuwenden ergibt sich ein eindeutig anderes Bild (Tab. 3).

Cathepsin B			Cathepsin L	
	KC	HaCat	KC	HaCaT
H	154.7 ±18.1	133.7 ±4.1	231.5 ±31.5	92.7 ±47.4
E	96.2 ±18.5	67.3 ±15.8	78.6 ±52.9	29.7 ±30.6
L	111.5 ±6.9	65.5 ±3.0	156.5 ±37.7	25.6 ±35.6

Cathepsin S			NAG	
	KC	HaCat	KC	HaCaT
H	1364.3 ±1235.7	480.0 ±41.7	116.9 ±1.0	103.3 ±21.5
E	282.5 ±71.1	217.4 ±48.0	75.6 ±5.3	63.2 ±20.3
L	255.1 ±142.8	210.8 ±48.6	86.2 ±8.8	69.3 ±25.8

Tab. 3: Auswirkung der IFN- γ Stimulation (1000 Units/ml, 72h) auf endosomal/lysosomale Enzymaktivitäten in subzellulären Fraktionen von humanen Keratinozyten in Primärkultur und HaCaTs. Die Angaben entsprechen der prozentualen stimulierten Aktivität gegenüber den Kontrollen. Der Mittelwert wurde aus zwei Experimenten und jeweils zwei Bestimmungen errechnet. Die Keratinozyten im zweiten Experiment stammten von 4 Patienten. H = Gesamtzellhomogenat, E = endosomale Fraktion, L = lysosomale Fraktion.

Bei beiden stimulierten Keratinozytenkulturen wurde eine signifikante Zunahme der Cathepsin S-Aktivität gemessen. Interessanterweise nahm die Aktivität im Gesamtzellhomogenat (Faktor 13 bei den KC mit allerdings großer Streuung, Faktor 5 bei den HaCaT) wesentlich mehr zu, als in den endosomalen und lysosomalen Fraktionen (etwa 2-3 fach). Die Steigerung der Cathepsin S-Aktivitäten gegenüber den anderen lysosomalen Proteasen, parallel zur verstärkten MHC Klasse II- und invarianter Kette-Expression, unterstreicht die Bedeutung von Cathepsin S. Außerdem wird angedeutet, dass die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT als mögliches Modell für die Untersuchung immunologischer Aspekte humaner Keratinozyten dienen kann.

5.4.4. RT-PCR der stimulierten Keratinozyten

Um mögliche Mechanismen der gesteigerten Cathepsin S-Aktivität zu klären, wurde die Gesamt-RNA von stimulierten primären Keratinozyten (für 24h mit 1000 Units/ml) und den entsprechenden Kontrollzellen isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse der RT-PCR (Abb. 13) ergaben eine deutliche Induktion der Cathepsin S-Information (bei 100 ng cDNA deutliches Signal), während in den Kontrollzellen so gut wie keine Information nachzuweisen war (selbst bei 500 ng cDNA).

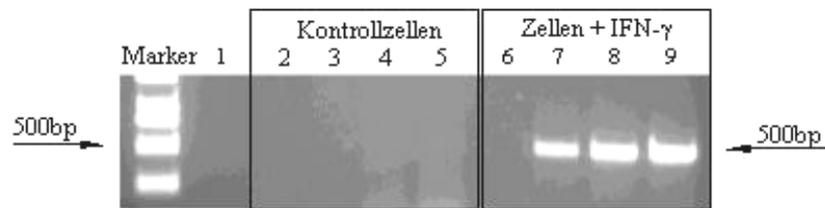


Abb. 13: RT-PCR von Cathepsin S. 1 = Negativkontrolle ohne RNA, 2 = Negativkontrolle mit 300 ng RNA/ohne RT, 3-5 = 100, 200, 500 ng cDNA, 6 = Negativkontrolle mit 300 ng RNA/ohne RT, 7-9 = 100, 200, 500 ng cDNA.

Das Kontrollexperiment mit β -Aktin zeigte, dass erfolgreich RNA isoliert wurde bzw. korrekt in cDNA umgeschrieben wurde (Ergebnis nicht gezeigt).

5.4.5. Cathepsin S Western Blot

Nachdem sowohl auf Aktivitätsebene als auch auf mRNA-Ebene eine Cathepsin S-Induktion nachweisbar war, sollte auch auf Proteinebene ein Nachweis gelingen. Wie wir anhand der Aktivitätsmessungen gesehen haben, ist Cathepsin S in sehr geringen Mengen vorhanden, und war deshalb im Immunoblot nur unter Schwierigkeiten nachzuweisen. Durch den Einsatz maximal möglicher Proteinmengen konnte schließlich der Nachweis im Immunoblot gezeigt werden (Abb. 14). Während in endosomal/lysosomalen Fraktionen der Kontrollzellen (Primärkultur) aber immer noch zu wenig Protein vorhanden war, so dass hier kein Cathepsin S-Signal zu detektieren war, konnte es in der nicht stimulierten Organellenfraktion der HaCaT nachgewiesen werden.

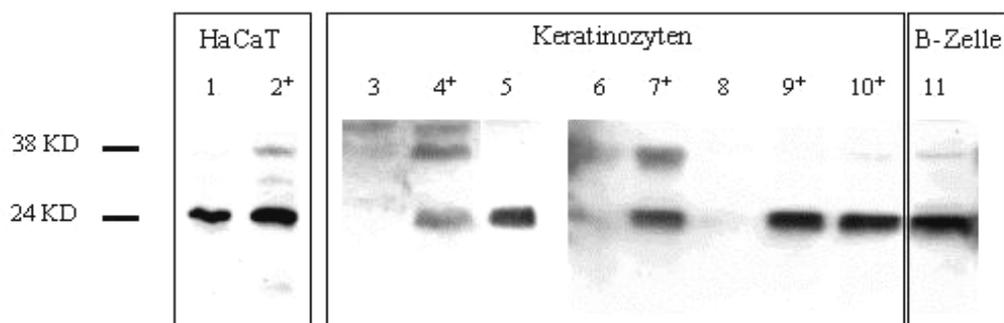


Abb. 14: Western Blot von humanem Cathepsin S. Zum Vergleich sind HaCaT- und primäre Keratinozyten sowie EBV-transformierte B-Zellen (WT51) aufgetragen. 1 = Kontroll-Organellen, 2⁺ = Organellen + IFN- γ , 3/6 = endosomale Fraktion der Kontrolle, 4⁺/7⁺ = endosomale Fraktion + IFN- γ , 5 = Cathepsin S, 8 = lysosomale Fraktion der Kontrolle, 9⁺/10⁺ = lysosomale Fraktion + IFN- γ , 11 = lysosomale Fraktion von WT51.

Unter IFN- γ Stimulation (72h) jedoch konnte sowohl bei den HaCaT als auch bei den primären Keratinozyten eine deutliche Cathepsin S-Zunahme beobachtet werden. Wie

erwartet zeigten die lysosomalen Fraktionen keine Proform von Cathepsin S (37 kD), während in den stimulierten endosomalen Fraktionen die enzymatisch inaktive Proform nachweisbar war.

5.4.6. MHC Klasse I und II Isolierung von Interferon- γ stimulierten HaCaT-Keratinocyten

Es wurden wie in Material und Methoden beschrieben 30-50 Millionen adherent wachsender HaCaT-Keratinocyten zur Lyse und entsprechender Affinitätschromatographie eingesetzt. Nach IFN- γ Stimulation für 72 h exprimierten die HaCaTs das HLA-DR-Allel sehr ausgeprägt, während die DQ- und DP-Allele nur schwach induziert wurden (ähnlich den frisch isolierten Keratinocyten; vergleiche Abb. 12). Allerdings zeigten die nicht stimulierten HaCaT bereits eine konstitutive HLA-DR Expression (Abb. 15).

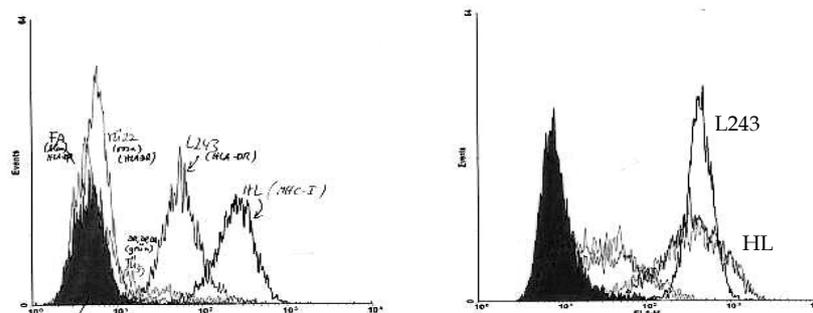


Abb. 15: FACS der HaCaT-Keratinocyten vor (links) und nach Stimulation mit 1000 Units/ml IFN- γ für 72h (rechts).

Auch die Induktion der invarianten Kette war intrazellulär nachweisbar. Die konstitutiv exprimierten MHC Klasse I-Moleküle wurden kaum beeinflusst. Die jeweils sauer eluierten Peptidpools wurden nach Lyophilisation in ein Eppendorf-Cup überführt, eingengt und anschließend auf einer analytischen RP8 Säule an der Microbore HPLC fraktioniert. Ein Teil der von der L243 Säule (DR-MHC) eluierte Peptidpool wurde in der AG Rammensee an einer Smart-Anlage aufgetrennt (Pharmacia C2/18 Material). Ein Vergleich der Auftrennung mit der bei uns an der Microbore HPLC durchgeführten ergab zumindest von der optischen Beurteilung des Chromatogrammes keine Vorteile (Im Gegenteil: die automatische Fraktionierung der Smartanlage hatte einen Teil der Fraktionen nicht gesammelt).

Die Auftrennung des MHC Klasse I-Pools bestätigte, dass diese Isolierung ausgezeichnet funktioniert hatte. Es wurden ca. 50-60 Fraktionen gesammelt und bei -80°C eingefroren. Da in unserer AG kein entsprechendes Massenspektrometer zur Sequenzierung zur Verfügung stand, konnte nur ein Teil der Proben analysiert werden. Übersichtsspektren sowohl von den DR-Allelen als auch von den MHC Klasse I zeigten bei einigen Fraktionen Massen in der Größenordnung zwischen 900 und vielleicht maximal 2000 Dalton mit 3-5 dominanten Massen, deren Sequenzierung möglich sein sollte. Folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der HPLC-Läufe:

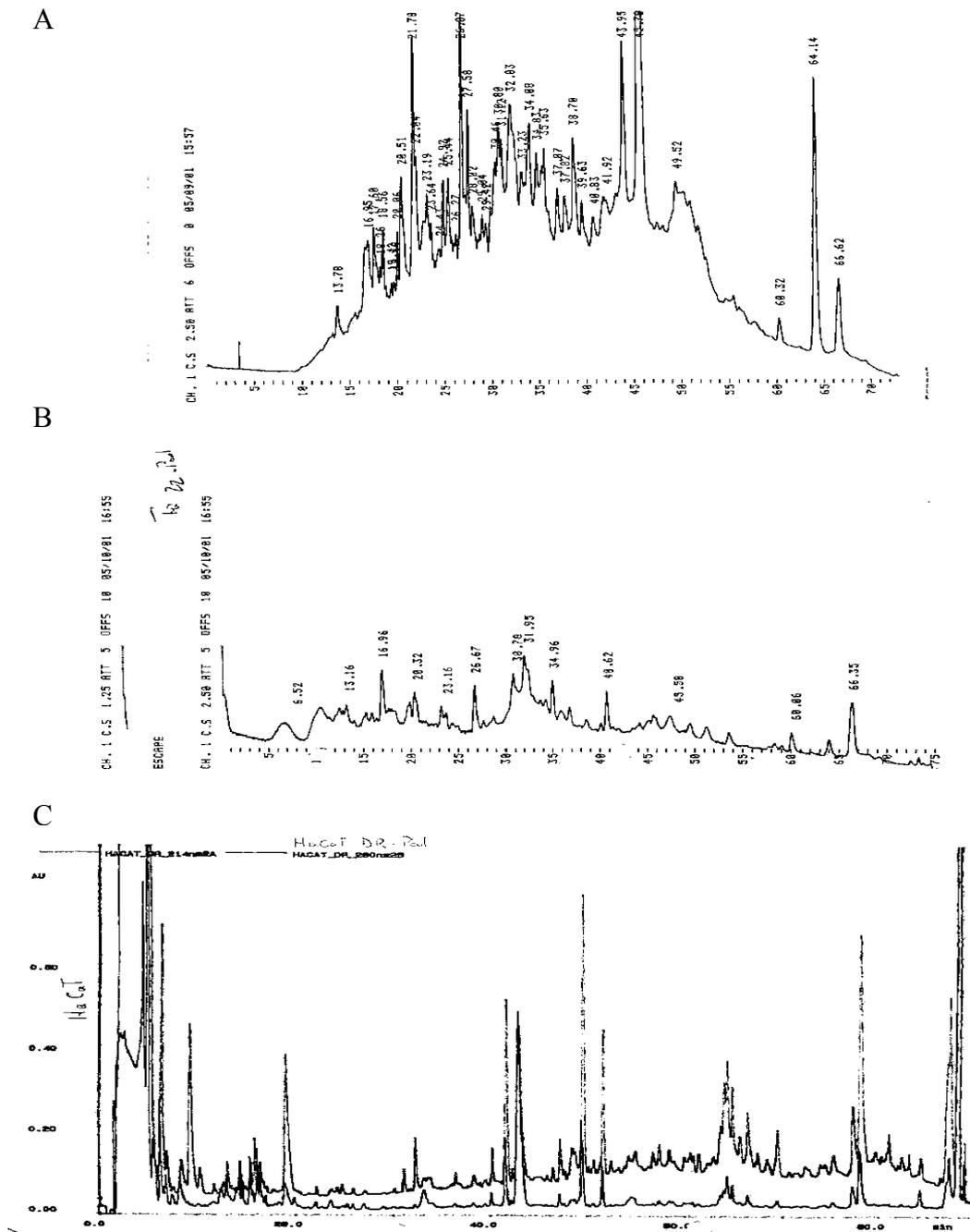


Abb. 16: HPLC-Chromatogramme der von HaCaT-Keratinocyten isolierten und aufgetrennten Peptide. A = Peptide von MHC Klasse I-Molekülen, B = Peptide von DQ-Molekülen, C = Peptide von DR-Molekülen. A und B wurden mit einer C8-Säule an der Microbore-HPLC aufgetrennt. C wurde mit einer C2/18-Säule (Pharmacia-Smart-Anlage, AG-Rammensee) aufgetrennt.

In der AG Nordheim wurden von Martin Priemer 4 Fraktionen (zwischen Bereich 20 und 35 min) aus dem HL-Peptid-Pool mittels MALDI- (Bruker, Reflex III) bzw. ESI-Massenspektrometrie (Applied Biosystems) untersucht. Dabei sind folgende 17 Peptidsequenzen aufgeklärt worden, wovon einige nicht eindeutig zugeordnet werden können:

GEDQTQDTEL	humanes Leukozyten Antigen A
KVKGPALSR	ähnlich zu IFN- γ induzierbares Protein 16
DAEMTTRM _{ox} V	Proteasom Untereinheit, beta typ 10; Proteasom Untereinheit MECL1
RTSEIYVHR	unbekannt oder DEAD/H box Polypeptid 24
TVRDHLVGR	Glycogen Phosphorylase
KTITGKTFSSR	actin related protein 2/3 Komplex, Untereinheit 2; ARP2/3 Protein Komplex Untereinheit 34
LINNKIANR	Proteasom 26S Untereinheit, Proteasom 25S Untereinheit
NPYDSVKKI	ähnlich Diubiquitin
DGYSGVEV oder TAYSGVPN	Ribosomales Protein oder BRCA1-interacting Protein1; BRCA1 binding Helicase like protein BACH1; BRCA1-associated C-terminal Helicase 1
LPNAVITRI oder IPGGALVLVAS	DNA Polymerase epsilon p17 Untereinheit oder Polymerase epsilon 3, Histone fold protein CHRAC17 oder Polymerase epsilon p17 Untereinheit
TPVRLPSI oder TPAALIPEA	interferon regulatory factor 1 oder hypothetisches Protein B
YAYDGKDYIAL	MHC Klasse I Antigen
DAFRVNVI	unbekannt bzw. Assembly protein 50
YPFKPPM _{ox} I	ubiquitin-conjugating enzyme E2-18 kDa UBCH8 oder ubiquitin-conjugating enzyme E2L6
VMAPRTLIL oder VMAPRTLIL	HLA-A11 human oder HLA-Cw*0702
AEFPLDPQL	DEAD/H box Polypeptid 15
FIVDPVSNL	Desmoplakin

Da mit dem HL- oder W6/32-Ak alle HLA-, B- und C-Allele isoliert wurden, ist die Zuordnung zu einzelnen Allelen über die bekannten Bindungsmotive nur unzureichend möglich. Dazu wäre eine genaue Charakterisierung der HaCaT-Zellen notwendig.

Insgesamt gesehen befinden sich unter den 17 Peptiden zwei typische Hautpeptide: Das Aktin related Protein 2/3 (ARP2/3) und das Desmoplakin. ARP 2/3 ist ein regulatorisches Protein, welches die Organisation des Aktin-Filament-Netzwerkes beeinflusst. Desmoplakin ist ein wichtiger Bestandteil der Desmosomen, die Zell-Zellkontakte herstellen und als Anheftungspunkte für Intermediärfilamente dienen. Alle anderen Proteine kommen ubiquitär vor und sind im wesentlichen dem Proteasomkomplex und den MHC Klasse I-Proteinen zuzuordnen.

5.5. Untersuchungen zur Spaltspezifität von AEP

5.5.1. Verdau der Peptidbibliothek

Erst kürzlich wurde AEP als lysosomale Protease im Säuger beschrieben (Chen et al., 1997). Das Enzym gehört zur Familie der Cysteinendopeptidasen (C13) und kann unter anderem nicht wie der Großteil der anderen Thiolproteasen durch E64 gehemmt werden.

Um die Substratspezifität von aus Schweineniere isoliertem (partiell aufgereinigt nach Chen et al.) AEP zu untersuchen, wurden die bereits beschriebenen Peptidsubstrate synthetisiert und mit AEP verdaut. Alle 21 Peptide ($Z\text{-AENXAEK-NH}_2$ + $Z\text{-AEQIAE-NH}_2$) wurden unterschiedlich lange mit AEP inkubiert und anschließend mittels HPLC (Merck Microbore und Shimadzu) analysiert. In Abb. 17 ist nur eine Auswahl von 13 Peptiden eines repräsentativen Experiments dargestellt.

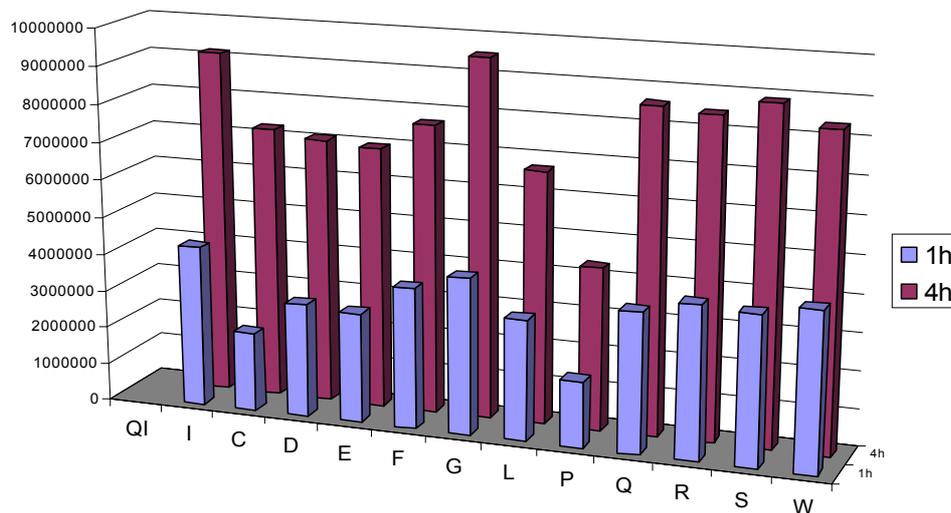


Abb. 17: Ergebnis der HPLC-Analytik. 2 mM an Peptid wurden bei 37°C in AEP-Verdaupuffer mit 0,5 µl AEP-Extrakt (partiell gereinigt) inkubiert. Nach 1 und 4 h wurde die Reaktion mit 0.5% TFA gestoppt und auf einer RP18-Säule (125 x 2 mm, 5 µm; Fluß 0,2 ml/min; Detektion 214 nm; linearer Gradient) aufgetrennt. Die Ergebnisse entsprechen den integrierten Peakflächen (Software Shimadzu) des Spaltproduktes ZAEN (y-Achse). QI entspricht dem Kontrollpeptid, die Buchstaben I bis W der AS in P1' Position.

Es bleibt zunächst festzuhalten, dass alle Peptide, mit Ausnahme des Kontrollpeptids, gespalten werden (für die 8 nicht gezeigten Peptide ergaben sich gleiche Verdauraten wie beispielsweise für D, E oder F). Während 19 Peptide mit in etwa gleichen Umsatzraten verdaut wurden und somit keine Prävalenz für eine AS in P1' Position erkennbar war, war das Prolin Peptid eindeutig ein „schlechtes“ Substrat.

5.5.2. Verdau der Peptidbibliothek im Wettbewerbsassay

Alle bereits erwähnten Peptide wurden in einem alternativen Verfahren wieder mit AEP verdaut (siehe Material und Methoden: Wettbewerbsassay). Da das Kontrollpeptid nicht mit dem fluorogenen Substrat konkurriert, wird hier die maximale Fluoreszenz generiert (= 100% Substratumsatz in Abb. 18), d.h. „schlechte“ Substrate können das fluorogene Substrat weniger gut kompetieren und generieren somit mehr Fluoreszenz. Auch hier bestätigte sich eindeutig, dass das Prolin-Peptid im Vergleich zu den 19 anderen Peptiden der Bibliothek am wenigsten sensitiv gegenüber AEP war (= ca. 90% Fluoreszenz). Überraschenderweise, stellte sich das Cystein-Peptid als bester Kompetitor heraus (ca. 15% Fluoreszenz).

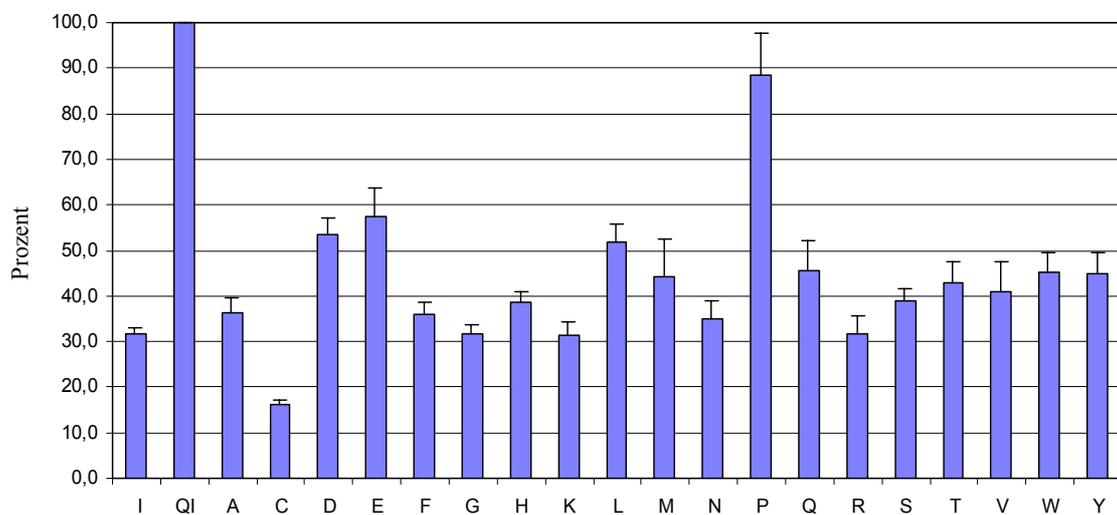


Abb. 18: Wettbewerbsassay mit dem fluorogenen Substrat ZVAN-AMC. 0,5 μ l AEP wurde zu 2mM Peptid und 45 μ M ZVAN-AMC in AEP-Verdaupuffer gegeben und bei 37°C gemessen (n = 3). Die freigesetzte Fluoreszenz wurde im Fluoreszenzreader (Tecan SpectraFluor, 360 nm Anregung, 465 nm Emission) gemessen. Der Substratumsatz wurde durch lineare Regression mit mindestens 6 aufeinander folgenden Messpunkten bestimmt. Der Substratumsatz des Kontrollpeptides (QI) wurde auf 100% normalisiert (Mittelwert \pm Standardabweichung). Die Buchstaben I-Y entsprechen den AS in P1' Position.

Die Peptidsubstrate mit D, E, L an P1' Position kompetierten weniger gut (ca. 50% Fluoreszenz) als die M-, Q-, T-, V-, W- und Y-Peptide (ca. 40% Fluoreszenz). Der Großteil der restlichen AS setzte in etwa 30% Fluoreszenz frei und fungierte damit als besserer Kompetitor.

5.5.3. AEP-Verdau intakter Proteine

Die bereits von Chen et al. (1997) beobachtete Tatsache, dass AEP von 47 Asn im Tetanus-Toxoid Fragment nur drei Asn-Bindungen spaltet, ließ die Frage nach weiteren Faktoren und

Substratmotiven aufkommen. Das entsprechende pflanzliche Enzym, das Legumain, wurde schon wesentlich früher beschrieben und detailliert auf seine Spezifität hin untersucht (Ishii, 1994). Es erwies sich als ebenfalls hoch spezifische Asparaginylendopeptidase, zeigte aber in der P1' Position keinerlei Unterschiede bezüglich der AS Besetzung und des Substratumsatzes (Jung et al., 1998).

Daher wurden drei immunologisch relevante, komplexe Proteine MBP, MBP* (N92 \Rightarrow Q92) und Myoglobin mit AEP verdaut und mit HPLC und Massenspektroskopie analysiert. Das Wildtyp-MBP (wtMBP) besitzt zwei potentielle AEP Spaltstellen (N84P und N92I). Die durch AEP generierten Hauptspaltprodukte ergaben aber nur eine Schnittstelle, die den Fragmenten 1-92 und 93-170 entsprachen. Weitere Spaltprodukte entsprechend der N84P Bindung konnten nicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde mit MBP* keine Spaltung nach Position 92 beobachtet (in Übereinstimmung mit der N-Spezifität von AEP). Statt dessen wurden die Fragmente 1-84 und 85-170 generiert. Der Substratumsatz war allerdings wesentlich geringer, was aber wiederum mit den Ergebnissen der Peptidverdaus übereinstimmt.

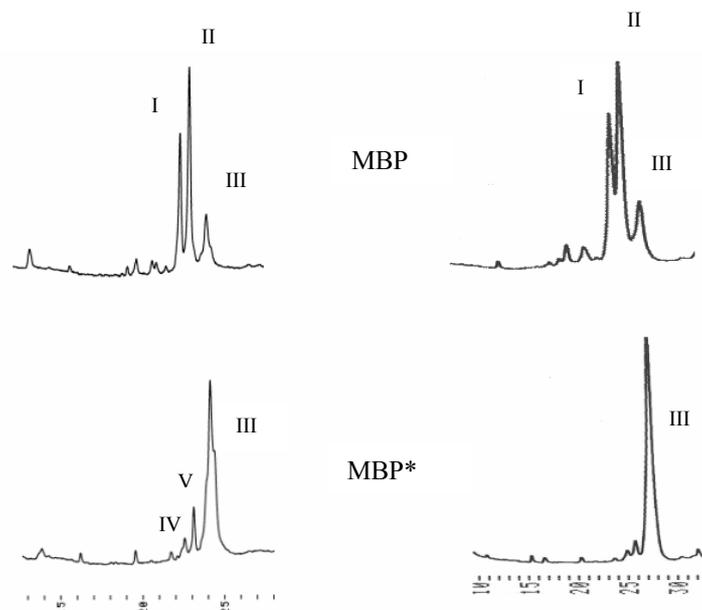


Abb. 19: HPLC von wtMBP und MBP* nach 1h Verdau mit 0,1 μ l AEP (RP8-Säule 125x2 mm, 0,2 ml/min Fluß, linearer Gradient, 214 nm). Die linke Seite entspricht einem Verdau von 2 μ g Substrat bei dem mit 0,25 M Citratpuffer pH 5,4 (2,5 mM DTT) ohne Inhibitoren gearbeitet wurde. Rechts wurden 3 μ g Substrat in 0,1 M Citrat/Phosphatpuffer pH 5,6 (10 μ M E64, 30 μ M Pepstatin, 4 mM EDTA, 4 mM DTT) verdaut. Die entstandenen Fragmente entsprechen: I = Fragment 93-170, II = Fragment 1-92, III = MBP/MBP*, IV = Fragment 1-84, V = Fragment 85-170. Die Fragmente wurden über MALDI-MS identifiziert.

Das mit AEP umgesetzte Myoglobin enthält ebenfalls zwei theoretische AEP-Schnittstellen (N12V und N140D). Beide müssten nach den Ergebnissen der Peptidexperimente gute Substrate für AEP sein. Nach einem einstündigen Verdau mit AEP (das vergleichbare

Experiment mit wtMBP führt zum nahezu kompletten Abbau des Ausgangsproduktes) waren keinerlei Spaltprodukte zu erkennen, selbst als über 2h verdaut wurde. Im Gegensatz dazu führt ein Verdau von Myoglobin mit Cathepsin D oder mit einer lysosomalen Fraktion von B-Zellen zu einer relativ schnellen Degradation mit zahlreichen Spaltprodukten (Abb. 20) und zeigt eindeutig, dass Myoglobin nicht per se Proteasen-resistent ist.

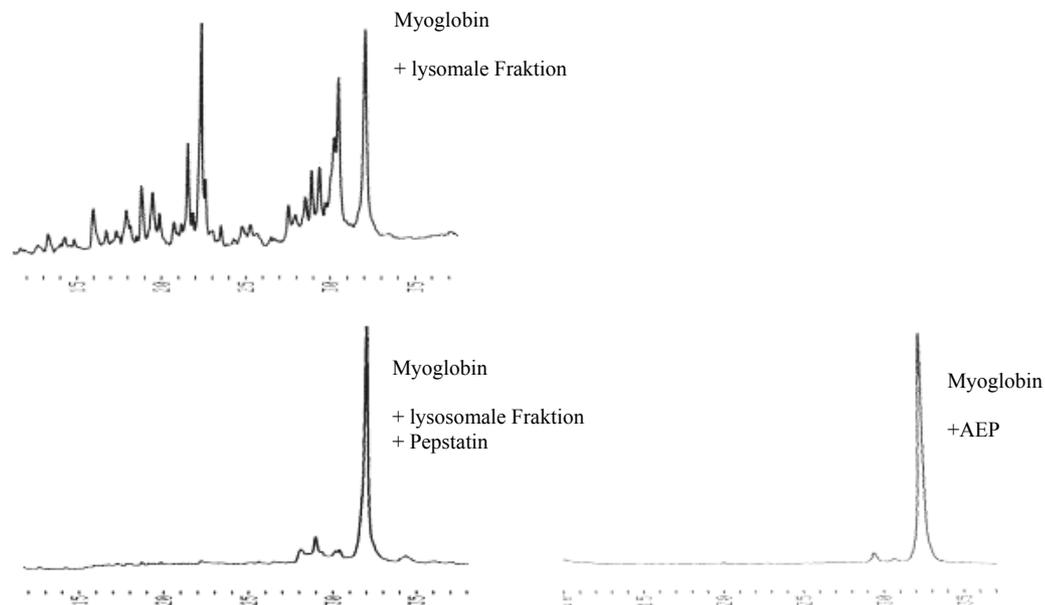


Abb. 20: HPLC von Myoglobin nach Verdau mit lysosomaler Fraktion von B-Zellen mit und ohne Pepstatin und AEP (RP 8 Säule 125x2 mm, 0,2 ml/min Fluß, linearer Gradient, 214 nm)

5.5.4. AEP Aktivitäten in subzellulären Kompartimenten verschiedener APCs

Es wurden AEP Aktivitäten in subzellulären Kompartimenten verschiedener APCs gemessen, die sowohl aus der differentiellen Zentrifugation als auch aus einer Percollfraktionierung stammten. Für die Aktivitätsbestimmungen wurde das bereits erwähnte Substrat ZVAN-AMC und der kompetitive Inhibitor ZAENK eingesetzt. Wie zu erwarten war, fanden wir in den lysosomalen Fraktionen von EBV-transformierten B-Zellen die höchsten AEP-Aktivitäten, wobei zwischen den zwei untersuchten Zelllinien relativ große Unterschiede auftraten. So zeigten die lysosomalen Fraktionen der COX-Zellen rund 1 Unit an Aktivität und damit mehr als das fünffache gegenüber der entsprechenden WT51 Fraktion.

In der Monozytenzelllinie THP1 lagen die AEP-Aktivitäten in der lysosomalen Fraktion bei etwa 5-10% gegenüber den B-Zellen. Sowohl reife als auch unreife DCs zeigten bemerkenswerte Aktivitäten in endosomal/lysosomalen Kompartimenten (~ 0,5 Units). Dies weist darauf hin, dass AEP in professionellen APCs von Bedeutung sein könnte.

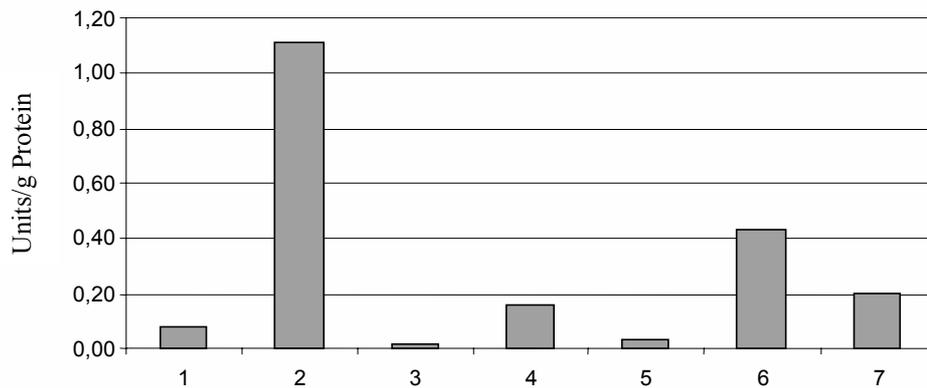


Abb. 21: Spezifische Aktivität (U/g) von AEP in verschiedenen APCs. 50 μ M ZVAN-AMC wurden in AEP-Verdaupuffer mit den einzelnen Fraktionen inkubiert und im Fluoreszenzreader (Tecan SpectraFluor, 360 nm Anregung, 465 nm Emission) gemessen. 1 = endosomale Fr. COX, 2 = lysosomale Fr. COX, 3 = endosomale Fr. WT51, 4 = lysosomale Fr. WT51, 5 = lysosomale Fr. THP1, 6 = endosomal/lysosomale Fr. unreife DC, 7 = endosomal/lysosomale Fr. reife DC. THP1 ist eine Monozytenvorläuferzelllinie. DCs wurden aus PBMCs mit GM-CSF und IL4 generiert und mit TNF- α zur Reife stimuliert.

5.5.5. AEP Aktivitäten in Percollfraktionen

Bereits in Kapitel 5.2 sind AEP-Aktivitäten in mit Percolldichtegradientenzentrifugation präparierten Zellfraktionen beschrieben worden, weshalb an dieser Stelle nicht mehr ausführlich auf einzelne Werte eingegangen werden soll. Jedenfalls konnte gezeigt werden, dass mit dieser Methode trotz erwähnter Problematik (lange Zentrifugationszeiten, Percollreste, geringe Aktivitäten) brauchbare Aktivitäten gemessen wurden.

In den Kompartimenten, in denen die höchsten NAG- und Cathepsin BLS-Aktivitäten vorkamen, fanden sich auch die höchsten AEP-Aktivitäten (siehe Abb. 5 und 8). Bei den PBMCs waren dies, im Unterschied zu den B-Zellen, Kompartimente mit mehr endosomalem Charakter. Eine Verlagerung proteolytischer Aktivitäten in endosomale Kompartimente dürfte für diese Zellen (APCs, DCs) von besonderer immunologischer Relevanz hinsichtlich der Prozessierung und Präsentation von Antigenen sein.

Nach dem derzeitigen Wissensstand sollten die mit ZVAN-AMC und durch den Kompetitor ZAENK inhibierten Aktivitäten der AEP zugeordnet werden können, zumal durch weitere Inhibitoren (E64, Aprotinin, EDTA) der Großteil anderer Proteasen ausgeschaltet sein sollte.

5.6. Prozessierung von MBP und Myoglobin

Die *in vitro* Prozessierung von wtMBP mit lysosomalen Fraktionen von B-Zellen und mit Cathepsin B, L, D und S ist von Hermann Beck (Diss. 2000) und Christian Schröter (Diss. 1999) ausführlich untersucht und beschrieben worden. Hermann Beck konnte zeigen, dass bei

Verwendung von lysosomaler Fraktion von BSM die initialen Schnittstellen eindeutig von AEP und Cathepsin S dominiert werden, wobei AEP das immunodominante Epitop 85-99 spaltet und Cathepsin S ein weiteres 110-129 generiert (Beck et al., 2001).

Das für die Verdauexperimente eingesetzte rekombinante wtMBP wurde wie in Material und Methoden beschrieben hergestellt. Teilweise war eine Rechromatographie mittels HPLC notwendig. Die Rohausbeute an „Inclusion bodies“ nach Expression in *E. coli* war in der Regel recht gut und lag bei etwa 2-3 mg/l Kultur. Abb. 22 zeigt ein SDS-Gel, bei dem zu bestimmten Zeitpunkten nach Induktion mit IPTG Kulturproben entnommen und analysiert wurden. Schon nach etwa 30 min ist eine schwache MBP-Expression zu erkennen, die nach 2 h ihr Maximum erreicht.

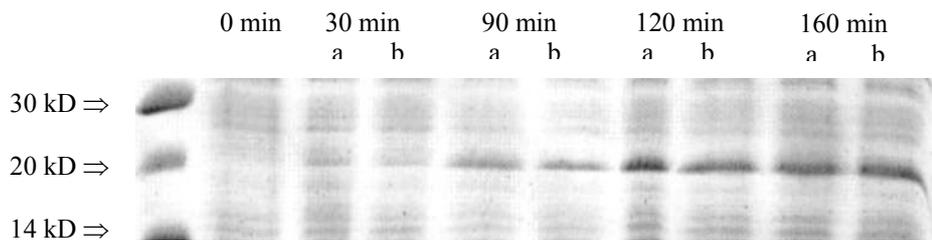


Abb. 22: SDS-Gel einer *E. coli* Kultur nach Induktion mit 1 mM IPTG. 1 ml Kultur wurde zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen, Zellen pelletiert, mit reduzierendem Probenpuffer versetzt, gekocht und auf das Gel aufgetragen. Störende DNA wurde möglichst verworfen.

Nach der HPLC-Reinigung von MBP blieben ungefähr 500 µg oder weniger Material übrig. Die Säulenbelastung insgesamt ist bei direkter HPLC des Rohproduktes nicht unerheblich, so dass eine Vorreinigung mit einem Ionenaustauscher vorzuziehen ist.

Wird wtMBP mit endosomal/lysosomalen Fraktionen von anderen APCs verdaut (z.B. DCs), so sehen die initialen Schnittstellen anders aus und sind nicht von AEP dominiert (Daten nicht gezeigt). Verdaut man wtMBP mit AEP (AEP-Extrakt aus Schweineniere), so entstehen exakt die Fragmente, die der N92-Schnittstelle entsprechen, während das mutante MBP diese Fragmente nicht mehr zeigt, dafür aber die beim wtMBP nicht beobachtete N84-Spaltstelle (siehe Abb. 19). In Übereinstimmung mit Beck et al. (2001) kann deshalb AEP als die Protease in lysosomalen Fraktionen von B-Zellen identifiziert werden, die nach N92 im wtMBP schneidet.

Als Spezifitätskontrolle wurde ein AEP-Verdau mit dem synthetischen MBP-Peptid 83-99 durchgeführt, welches Schnittstellen für die Cathepsine B, L, S, D und AEP besitzt. Jedes erzeugte Fragment zeigt einen charakteristischen Peak im Chromatogramm, der über die Masse eindeutig zugeordnet werden kann. Das isolierte AEP zeigte die gewünschte Spezifität, bei längeren Verdauzeiten traten aber auch Nebenprodukte auf, die auf andere Protease-Aktivitäten schließen lassen. Deshalb sollte, wie im Kapitel Untersuchungen der Spaltspezifität von AEP beschrieben (siehe 5.5), mit Inhibitoren gearbeitet werden, falls mit noch nicht näher untersuchten Proteinen Verdauexperimente durchgeführt werden.

Als weiteres immunologisch relevantes Protein wurde Myoglobin für Verdauexperimente eingesetzt. Das von Sigma bezogene, aus Pferdeherz isolierte Myoglobin wurde vorher HPLC

gereinigt. Über Verdauexperimente mit lysosomalen Fraktionen von B-Zellen sollten die entstandenen Abbauprodukte identifiziert und bestimmten Proteasen zugeordnet werden. Abb. 20 zeigt ein Ergebnis eines 3h-Verdau von 6 μg Myoglobin mit 2 μl lysosomaler Fraktion von WT51-Zellen. Man erhält auf der HPLC gut trennbare Degradationsprodukte, die in der Maldi zwar konkrete Massen ergeben, sich aber nicht bestimmten Spaltstellen zuordnen lassen, weil die Massengenauigkeit nicht ausreicht. Führt man genau das gleiche Experiment allerdings mit 30 μM Pepstatin durch, so erhält man nahezu keine Abbauprodukte (Abb. 20). Somit kamen nur noch Aspartatproteasen in Frage. Als nächstes wurden deshalb Verdauexperimente mit Cathepsin D durchgeführt. Da Cathepsin D Myoglobin relativ zügig degradierte, musste wenig Enzym eingesetzt werden bzw. in kurzen Zeitintervallen die Verdau gestoppt werden, um einen zeitlichen Verlauf des Abbaus verfolgen zu können.

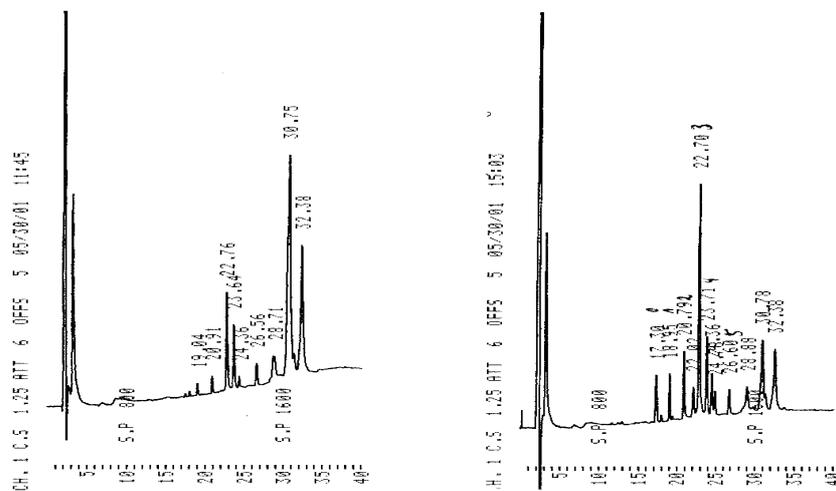
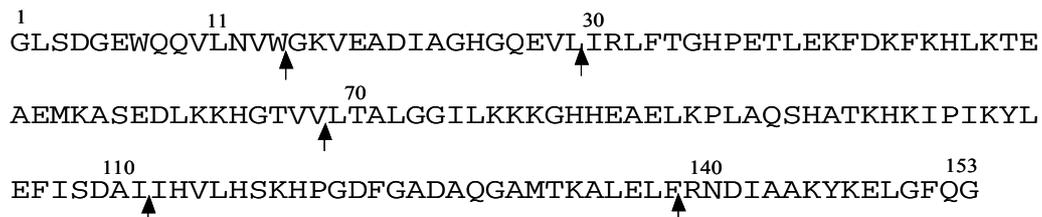


Abb. 23: Verdau von jeweils 3 μg Myoglobin mit 0,1 μl Cathepsin D in 0,1 M Citrat/Phosphat pH 5,2. Links: nach 1 h, rechts: nach 4,5 h (R_t 32,38 = Myoglobin).

Man erkennt, dass in einer initialen Phase zwei Hauptprodukte generiert werden, die ihrerseits aber wieder Cathepsin D Substrate darstellen und deshalb später wieder abgebaut werden (Abb. 23). Die HPLC eines lysosomalen Verdau entspricht im wesentlichen der eines Cathepsin D-Verdau.

Bei Durchsicht der Aminosäuresequenz sind mindestens fünf potentielle Spaltstellen für Cathepsin D erkennbar:



Da sich die Maldi-Massen des lysosomalen Verdau nicht zuordnen ließen, wurden die wichtigsten Verdauprodukte von Stefan Stevanovic ansequenziert. Als initiale Spaltprodukte wurden eindeutig die Fragmente 73-153 und 1-29 gefunden. Eigentlich sollte Cathepsin D

eher an Position 68/69 schneiden. Möglicherweise erfolgt aber eine zügige Einkürzung durch andere Proteasen. Das 73-153 Fragment beinhaltet zwei weitere Schnittstellen und wird deshalb weiter degradiert, wie oben schon angemerkt. Alle Fragmente lassen sich in den MS-Spektren eindeutig wiederfinden. Bei längeren Verdauzeiten mit lysosomaler Fraktion treten allerdings verstärkt Einkürzungen der Hauptfragmente auf, die deren Zuordnung erschweren. Die Ergebnisse entsprechen damit im wesentlichen den von Van Noort et al. (1991) beobachteten Spaltstellen von Pottwalmyoglobin (hat eine etwas andere AS-Sequenz). Abb. 24 gibt eine Zusammenfassung.

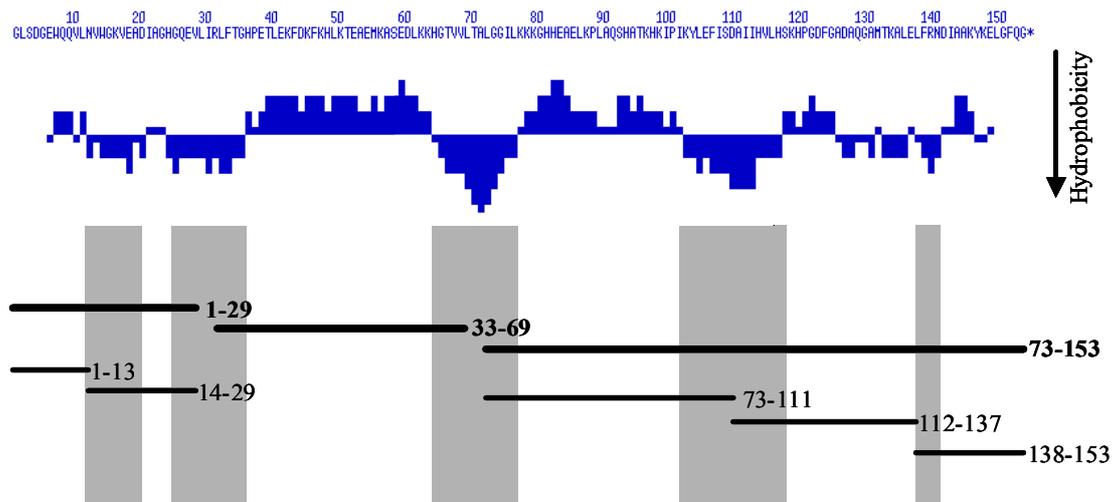


Abb. 24: Hydrophobizitätsplot von Myoglobin (Pferdeherz). Darunter sind die gefundenen Spaltprodukte aufgeführt.

Einzig der Verbleib der AS 70-73 (30-33) bleibt ungeklärt sowie die Frage der Generierung des 73-153 Fragmentes. Der Hydrophobizitätsplot bestätigt ebenfalls Beobachtungen von H. Beck und C. Schröter bei HEL und wtMBP, wonach Proteasen bevorzugt in hydrophoben Regionen eines Proteins spalten.

6. Diskussion

6.1. Methoden der subzellulären Fraktionierung

6.1.1. Differentielle Zentrifugation

Die Prozessierung von Antigenen und ihre anschließende Präsentation auf MHC Klasse II-Molekülen wird trotz intensiver Forschungsbemühungen nur unvollständig verstanden. Für eine Untersuchung der proteolytischen Vorgänge innerhalb der endocytotischen Kompartimente einer Zelle müssen Methoden angewendet werden, mit denen zuverlässig verschiedene endosomal/lysosomale Vesikel aufgetrennt und isoliert werden können.

Das Ziel einer jeden Fraktionierung zur Gewinnung verschiedener Zellkompartimente besteht darin, sowohl möglichst schonend als auch zügig einzelne saubere und funktionell intakte Kompartimente zu erhalten. Die differentielle Zentrifugation als Methode der Zellfraktionierung wurde bereits 1955 von de Duve (de Duve et al., 1955) beschrieben und wird seither in vielen Laboratorien eingesetzt. Wird diese Methode mit der hypotonen Lyse von Lysosomen (Bohley et al., 1969) kombiniert, so kann man relativ schnell und effektiv eine endosomale und eine lysosomale Fraktion gewinnen. Dieses kombinierte Fraktionierungsverfahren wurde von Christian Schröter an EBV-transformierten B-Zellen etabliert (Schröter et al., 1999). Es erlaubt unabhängig von der eingesetzten Zellzahl (wobei mindestens 100 Millionen Zellen eingesetzt werden sollten) innerhalb von ungefähr zwei Stunden eine saubere Fraktionierung in endosomale, lysosomale, mikrosomale Fraktionen und Cytosol. Die dabei anfallenden Kernfraktionen der ersten Zentrifugationsschritte sind mit Plasmamembranfragmenten, Zelltrümmern und nicht aufgeschlossenen Zellen verunreinigt. Es ist jedoch zu beachten, dass die so gewonnenen endosomalen Fraktionen auch die Mitochondrien enthalten. Für die Fragestellung dieser Arbeit bezüglich der Proteaseaktivitäten in endozytotischen Kompartimenten war dies aber unerheblich.

Die Charakterisierung endosomal/lysosomaler Proteasen setzt eine effektive Trennung der hohen proteolytischen Aktivität der lysosomalen Kompartimente von anderen Kompartimenten möglichst ohne Aktivitätsverlust voraus. Wegen ihrer hohen hydrolytischen Aktivität enthalten Lysosomen viele niedermolekulare Hydrolyseprodukte (Aminosäuren, Mono-Disaccharide etc.) und sind deswegen unter hypotonen Bedingungen instabil (de Duve et al., 1955; Park et al., 1988). Bohley und Mitarbeiter nutzten genau diese Eigenschaft und konnten nach hypotoner Lyse und einem Zentrifugationsschritt, lysosomale Fraktionen erfolgreich im Überstand anreichern. Der große Vorteil dieser Methode liegt in ihrer schnellen, günstigen und einfachen Durchführung, sowie der Anwendbarkeit auf verschiedene Zellarten. Im Rahmen der hier durchgeführten Arbeiten ist diese Methode erfolgreich bei Fibroblasten, verschiedenen Keratinozyten und EBV-transformierten B-Zellen eingesetzt worden. An verschiedenen anderen Zellmaterialien (verschiedene Monozyten, Thymozyten, DCs) waren keine so guten Enzymaktivitäts-Anreicherungen in der lysosomalen Fraktion gelungen. Als Ursache hierfür können mehrere Gründe in Frage kommen.

Erstens ist durchaus denkbar, dass diese Zellen nur wenig lysosomale Aktivitäten aufweisen, weil ihre Hauptaufgabe als spezielle APCs darin bestehen könnte, möglichst viel Antigen zu präsentieren, d.h. es darf keine komplette Degradation der Proteine erfolgen (sondern nur der für die Zellintegrität notwendige Proteinumsatz). Zweitens besitzen diese Zellen evtl. osmolytisch weniger sensitive Lysosomen. Drittens könnte ihre Organellenzusammensetzung durchaus wesentlich heterogener sein, so dass bei der differentiellen Zentrifugation keine übliche Trennung in Endosom und Lysosom mehr möglich wird.

Da in den letzten Jahren speziell für die Immunologen die dendritischen Zellen zunehmend an Bedeutung gewinnen (Bancherau & Steinman, 1998; Mellman et al., 2001), haben auch wir für unsere Verdauexperimente versucht, mit der differentiellen Zentrifugation lysosomale Fraktionen von dendritischen Zellen zu generieren. Allerdings waren die Enzymaktivitäten in den „endosomal Kompartimenten“ teilweise höher (wahrscheinlich haben wir hier komplexe, heterogene Organellen vorliegen), d.h. für die Gewinnung endosomal/lysosomaler Kompartimente von DCs ist diese Methode nicht optimal einsetzbar, weil eine klassische Zuordnung in endosomale und lysosomale Fraktion nicht mehr möglich ist. Ein weiterer Nachteil besteht darin, keine zusätzlichen endosomal oder lysosomalen Fraktionen entsprechend ihrem Reifestatus isolieren zu können.

6.1.2. Trägerfreie Elektrophorese

Speziell die Untersuchung prozessierungsrelevanter Organellen für die Antigenpräsentation auf MHC Klasse II-Molekülen erfordert eine effektivere Auftrennung endozytotischer Vesikel. Hierfür wurden mindestens zwei weitere Methoden zum Teil in Kombination mit der klassischen differentiellen Zentrifugation eingesetzt.

Mit Hilfe der trägerfreien Elektrophorese können Organellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Mobilitäten im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Amigorena und Mitarbeiter (Amigorena et al., 1994) gelang mit dieser Methode die „Isolierung“ eines MHC Klasse II-haltigen Kompartimentes in B-Lymphozyten (A20-Mauszellen). Basierend auf dieser Methode etablierte Christian Schröter die FFE für die Auftrennung von Organellenmaterial aus EBV-transformierten B-Zellen. Zunächst wurde wieder unter Standardbedingungen wie beschrieben ein Organellenpellet präpariert. Vor der anschließenden FFE muss das Pellet aber tryptisch vorbehandelt werden, weil wahrscheinlich anhaftende Proteine vom Cytoskelett und Cytosol die Oberflächenladung maskieren (Marsh et al., 1987; Schmid et al., 1988; Fuchs et al., 1989). Werden alle Trennbedingungen eingehalten, kann zuverlässig und reproduzierbar eine Auftrennung in etwa 30 Fraktionen erfolgen. Dabei kommen letztendlich nur einige wenige Fraktionen als Prozessierungs- bzw. Beladungskompartimente in Frage (Abb. 9).

Diese Kompartimente müssen hydrolytische Aktivitäten aufweisen (NAG-Aktivitäten), MHC Klasse II-Moleküle und invariante Kette enthalten und sollten von außen zugänglich sein (POD-Puls; Neefjes, 1999). Bei den Fraktionen, bei denen diese Bedingungen zutreffen, kann nicht mit letzter Sicherheit ein MHC II-Signal durch Plasmamembranreste ausgeschlossen werden, da minimale Plasmamembranverunreinigungen in der Organellenpräparation verbleiben. Weitere Charakterisierungen z. B. mit einem HLA-DM Antikörper wären hier wünschenswert. Möglich wären ferner auch Versuche, bei denen mit Hilfe modifizierter

Antikörper einzelne Kompartimente in ihrer Oberflächenladung verändert werden könnten, woraus eine veränderte Ablenkung im elektrischen Feld und damit eine gezielte Isolierung ermöglicht würde. Die Methode erlaubt darüber hinaus eine kontinuierliche Auftrennung von Zellmaterial (bei konstanten Trennbedingungen) im präparativen Maßstab, so dass ausreichend Material für weitere Untersuchungen bereit gestellt werden kann.

In unserem Labor wurde in einem weiteren Projekt (in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Rammensee) die trägerfreie Elektrophorese für die Isolierung cytosolischer Proteasen eingesetzt. Hier waren nicht die endosomal/lysosomalen Kompartimente von Interesse, sondern es sollten Proteasen im Cytosol identifiziert werden, die bei der Einkürzung proteasomaler Spaltprodukte mitwirken. Als vorbereitender Schritt wurde hier die FFE eingesetzt, nachdem eine Reihe anderer Präparationsschritte keine vernünftigen, vor allem reproduzierbaren Ergebnisse versprach. Dabei gelang bereits eine brauchbare Vorfraktionierung gewünschter Proteaseaktivitäten im mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation aus B-Zellen isolierten Cytosol. Bei diesen Präparationen wurde etwa 3-4 ml Cytosol über ca. 4 Stunden kontinuierlich getrennt, wobei sich die gewünschten und gesammelten Fraktionen nur unwesentlich verschoben. Wurde bei wiederholten Experimenten auf annähernd gleiche Bedingungen geachtet, so konnten teilweise an identischen Sammelpunkten die gleichen Aktivitäten wiedergefunden werden. Bei dieser Arbeit wurden zwei Proteasen identifiziert, die an der Einkürzung durch das Proteasom erzeugter Peptide mitwirken (Puromycin-sensitive-Aminopeptidase und Bleomycin-Hydrolase; Stoltze et al., 2000).

Insgesamt gesehen stellt die FFE eine zwar aufwändige Methode (sowohl bezüglich Zeitaufwand als auch Materialeinsatz) dar, kann aber außerordentlich zuverlässig für Organellen- und Protein-Isolierungen eingesetzt werden. Dabei wurden die Möglichkeiten der FFE noch nicht vollends ausgespielt, wenn man berücksichtigt, dass damit Zonenelektrophorese sowie Isotachophorese durchgeführt werden können (Weber et al., 1998, 2000; Canut et al., 1999).

6.1.3. Percolldichtegradienten-Zentrifugation

Als weitere Methode der Wahl kam die Percolldichtegradienten-Zentrifugation zum Einsatz. In der Regel wurden 20%-ige Percolldichtegradienten angewendet. Es können aber ohne Probleme auch andere Gradienten eingesetzt werden. Mit Hilfe eines 27%-igen Gradienten lassen sich z. B. zuverlässig 2 Proteinbanden voneinander trennen, von denen die schwerere lysosomalen und die leichtere endosomalen Kompartimenten entspricht. Die endosomalen Fraktionen können dann mit einem 10%-igen Gradienten weiter in bis zu 10 verschiedene Kompartimente aufgetrennt werden (Castellino et al., 1995).

Prinzipiell kann homogenisiertes Gesamtzellhomogenat direkt eingesetzt werden. Eine Kombination mit der differentiellen Zentrifugation hat sich jedoch als vorteilhaft erwiesen, weil Kerne und nicht aufgeschlossene Zellen, Mikrosomen und Cytosol effektiv entfernt werden können. Bei Anwendung von Dichtegradienten muss außerdem berücksichtigt werden, dass im Unterschied zu den vorigen Methoden nur begrenzt Protein eingesetzt werden kann. Ein Überladen führt unweigerlich zu nicht exakt definierbaren Fraktionen.

Ein weiterer großer Nachteil sind die relativ langen Zentrifugationszeiten. Da hier vor allem Enzymaktivitäten untersucht wurden, können je nach Pufferbedingungen Proteasen

unterschiedlich aktiviert, deaktiviert oder sogar abgebaut worden sein. Cathepsin L ist z. B. unter sauren Bedingungen über viele Stunden aktiv, während es bei pH 7,5 innerhalb von 10 min inaktiviert wird. Die Inaktivierung von Cathepsin B bei pH 7,5 erfordert weniger als 60 min (Kirschke et al., 1989; Schmid et al., 1997). Cathepsin S hingegen besitzt ein sehr breites pH-Optimum und kann problemlos bei pH 7,5 erfasst werden. AEP wird bei pH-Werten über 6 ebenfalls irreversibel denaturiert.

Ein großer Vorteil dieser Methode liegt darin, außerordentlich scharfe Proteinbanden entsprechend ihrer Dichte zu erhalten, so dass sehr zuverlässig ungefähr 10-15 Fraktionen (bei Kombination mehrerer Gradienten noch mehr) isoliert werden können, die unterschiedliche endosomale und lysosomale Kompartimente repräsentieren. Obwohl eine solche Präparation bis zu 2h oder länger dauert, sind die entsprechenden Kompartimente intakt. Wird bei anschließenden Aktivitätsmessungen (NAG oder andere Enzyme) auf Detergenzien im Reaktionspuffer völlig verzichtet, können keine Aktivitäten gemessen werden. Erst nach Aufschluß der Vesikel mit Detergenz oder durch Ultraschall-Behandlung sind Aktivitäten messbar. Ansonsten ist bei solchen Messungen (vor allem wenn quantitative Aussagen gemacht werden) der Einsatz bzw. die Konzentration der Detergentien kritisch zu bewerten.

Bei NAG- und Cathepsin BLS-Aktivitätsmessungen in lysosomalen Fraktionen von B-Zellen waren bei Einsatz von 1% Triton X100 teilweise Aktivitätsverluste von über 30% zu beobachten. Andererseits erhöhen minimale Detergenzzusätze oft die Löslichkeit von Proteinen. Es muss daher von Fall zu Fall die eingesetzte Proteinmenge mit der Menge an Detergenz korreliert werden (Mizellenbildung etc. siehe hierzu auch: *Methods in Enzymology*, Vol 182 *Guide to Protein Purification, Chapter 18*). Meist sind jedoch Konzentrationen zwischen 0,01% und höchstens 0,5% an Detergenz optimal.

Wie erwähnt können die Proteasen während der Präparation leiden, weil das jeweilige pH-Optimum im Kompartiment nicht aufrechterhalten wird. Trotz dieser Tatsache und womöglich störender Percollreste, konnten zumindest relative Enzymaktivitäten (NAG-, Cathepsin BLS- und AEP-Aktivitäten) in mit Percollgradienten isolierten subzellulären Kompartimenten gemessen werden. Inwieweit eine Aktivierung, Desaktivierung oder Verlust an Enzymaktivitäten dabei tatsächlich stattfindet, konnte mit den hier angewendeten Methoden nicht ohne weiteres geklärt werden. Für spätere Versuche wären gezielte Untersuchungen einzelner problematischer Enzyme sinnvoll.

Ein direkter Vergleich von quantitativ erfassten Enzymaktivitäten in subzellulären Kompartimenten, die mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation generiert wurden, steht noch aus bzw. wurde nur einmal durchgeführt (siehe 6.2.1).

6.1.4. Zusammenfassung

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass die besprochenen Methoden, insbesondere wenn sie sinnvoll miteinander kombiniert werden, eine ausgesprochen zuverlässige Präparation an verschiedenen Kompartimenten zulassen und damit ermöglichen, sich eingehender mit dem Schicksal endocytierter Proteine hinsichtlich Prozessierung und Präsentation auf MHC Klasse II und der daran beteiligten Proteasen (oder anderen Hilfsmolekülen wie Chaperone oder Hitzeschockproteine) zu beschäftigen. Bei Percollfraktionierungen muss allerdings die

Zuverlässigkeit der Methode überwacht werden. Bezüglich der Reproduzierbarkeit sind kleine Abweichungen in Kauf zu nehmen. Anhand der ab Fraktion 3 annähernd gleichbleibenden Enzymaktivitäten der Percollfraktionierung in Abb. 7 (bei folgenden Trennungen unter gleichen Bedingungen kamen ähnliche Aktivitätsverteilungen heraus) und einer späteren Überprüfung des angewendeten Gradienten konnte ein nicht optimal generierter Dichtegradient als Ursache ausgemacht werden. Dies führte vor allem dazu, dass frühe endosomale Kompartimente nur unzureichend aufgetrennt wurden. Um sofort erkennen zu können, ob sich der gewünschte Dichtegradient eingestellt hat, sind in einem zweiten Zentrifugationsröhrchen Dichtemarker mitzuführen. Alternativ dazu können die Fraktionen an der Waage ausgewogen und die Dichte bestimmt werden.

6.2. Enzymaktivitäten in Fraktionen aus Percolldichtegradienten

Wie bereits andiskutiert, konnten in Fraktionen, die mit einem Percolldichtegradienten isoliert wurden, zuverlässige Aktivitätsmessungen für die Cathepsine B, L, S, für NAG und für AEP durchgeführt werden. Sind nur Aktivitätsverteilungen innerhalb einer Fraktionierung von Interesse, erlauben die Messwerte eine recht gute Beurteilung der vorliegenden Fraktionen.

Die Gesamtaktivitäten der Cathepsine B, L und S sowie der NAG-Aktivität waren in der Regel recht hoch, so dass mit geringen Proteinkonzentrationen gearbeitet und damit der störende Einfluss möglicher Percollreste minimiert werden konnte. Außerdem kann durch die Aufnahme einer Kinetik und anschließender Regression (siehe Material und Methoden, 4.15.) die Zuverlässigkeit der Messungen beurteilt werden. Unter diesen Bedingungen wären auch quantitative Aussagen zulässig, wobei jedoch Mehrfachmessungen mit verschiedenen Proteinkonzentrationen notwendig würden. Werden aber nur geringe Aktivitäten wie bei Cathepsin S- und teilweise bei den AEP-Aktivitäten erwartet, müssen die Ergebnisse kritischer bewertet werden. Um überhaupt Fluoreszenzsignale messen zu können, wurde erstens die Messzeit verlängert und zweitens noch zusätzlich die Proteinmenge um ein Mehrfaches erhöht. Dadurch können jetzt teilweise beträchtliche Percoll-Restmengen und zwar recht unterschiedlich in den einzelnen Reaktionsansätzen auftreten. Die resultierenden Trübungen machten beispielsweise bei der Proteinbestimmung Probleme, weswegen hier auf den BCA-Assay zurückgegriffen wurde, und sie haben natürlich Einfluss auf das zu messende Fluoreszenzsignal (Quenching).

Stehen entsprechende Inhibitoren zur Verfügung, können diese Einflüsse teilweise minimiert werden, wenn im Doppelansatz einmal mit und einmal ohne spezifischen Inhibitor gemessen wird und nur die Differenz als Aktivität herangezogen wird (LHVS für Cathepsin S, CA-074 für Cathepsin, ZAENK als kompetitiver Inhibitor für AEP).

6.2.1. Ergebnisse der Percollfraktionierung

Bei allen Aktivitätsmessungen mit Percoll-Fraktionen wurden nur relative Substratumsätze angegeben. Durch Messen mindestens zweier unterschiedlicher Aktivitäten (in Kombination mit ELISA und Western Blot) ergaben sich relativ zuverlässige Daten. Waren einzelne Fraktionen unter anderem wegen obiger Schwierigkeiten auffällig, wurden sie nicht berücksichtigt. In Abb. 5 beispielsweise wurde Fraktion 8 nicht mit einbezogen und Fraktion

1 zeigte geringe Aktivitäten. Die Aktivitäten für NAG, AEP und Cathepsin BLS waren in Fraktion 2 am höchsten, so dass hier eindeutig lysosomale Kompartimente vorlagen. Über die folgenden Fraktionen 3 bis 6 fielen die Aktivitäten zunächst auf etwa die Hälfte ab. In Übereinstimmung mit den Daten aus dem Immunoblot könnten hier Beladungskompartimente vorliegen. Nach Neefjes (1999) müssen solche Kompartimente Protease-Aktivität aufweisen, MHC Klasse II-Moleküle, prozessierte invariante Kette und HLA-DM enthalten. Mindestens drei Bedingungen wären erfüllt. Leider stand uns bis dato kein HLA-DM Antikörper zur Verfügung. Der Nachweis dieses Beladungshelfers wäre ein eindeutiges Indiz für ein Beladungskompartiment.

Weitere Fraktionierungen ergaben ein ähnliches, aber nicht mehr so differenziertes Bild (Abb. 6, 7). Die lysosomalen Fraktionen (Fraktion 1) zeigten wiederum höchste Aktivitäten. Die darauffolgenden Fraktionen zeigten niedrigere, aber fast durchgehend gleich hohe NAG-Aktivitäten. Nur die Cathepsin BLS-Aktivitäten deuteten in etwa den Verlauf der vorigen Fraktionierungen an. Im Immunoblot waren ebenfalls sämtliche Fraktionen MHC-II positiv, wobei Fraktion 8/9 die stärksten Intensitäten aufwiesen und damit erwartungsgemäß frühen endosomalen Charakter. Die Detektion der invarianten Kette lässt Beladungskompartimente in Fraktion 4, 5 und 6 vermuten. Die ebenfalls in derselben Fraktionierung durchgeführten Pulsversuche mit biotinyliertem MBP und FITC-Transferrin erlaubten leider keinen genaueren Aufschluss. Die Pulszeit von 30 min dürfte zu lang gewesen sein.

Obwohl bei Aktivitätsmessungen in mit klassischer differentieller Zentrifugation und hypotoner Lyse isolierten lysosomalen Fraktionen von WT51 Zellen AEP-Aktivitäten von etwa 0,2 Units gemessen wurden, konnten in den Percoll-Fraktionierungen nur sehr geringe Aktivitäten nachgewiesen werden. Auch in Fraktion 1 mit den ansonsten höchsten Aktivitäten waren die AEP-Signale gering. Für AEP wird beschrieben, dass es über pH 6,0 relativ schnell an Stabilität verliert (Chen et al., 1997) und da die Fraktionierung durchweg bei pH 7,2 ablief, könnte dies eine mögliche Ursache sein (siehe oben).

6.3. Enzymaktivitäten in FFE Fraktionen

Bei der erfolgreichen Aufreinigung der cytosolischen Protease und der Fraktionierung von Organellen wurde bereits die schonende Methodik der FFE kurz angesprochen. Allerdings war nicht ohne weiteres zu erwarten, noch Enzymaktivitäten messen zu können, da doch immense Verdünnungseffekte auftraten. Auch hier konnte durch Einsetzen von wesentlich mehr Protein und Verlängerung der Messzeit gute Messwerte erzielt werden. Da die Proben hier in Fraktionierungspuffer vorlagen, waren zudem keine störenden Einflüsse durch den Puffer zu befürchten. Im Falle der cytosolischen Proteasen gelang eine erfolgreiche Vorfraktionierung, nachdem mit spezifischen fluorogenen Substraten die gewünschten Aktivitäten bzw. Fraktionen detektiert waren (Abb. 11).

Bei sämtlichen Messungen sind wiederum nur relative Aktivitäten angegeben. Eine Quantifizierung der Messungen wäre jedoch wegen definierter Pufferbedingungen problemlos möglich. Sehr zuverlässige Messwerte konnten bei den NAG-Messungen erzielt werden und auch die Gesamt-Cathepsin-BLS-Aktivitäten ergaben je nach Zellmaterial aussagekräftige Daten, so dass eine eindeutige Charakterisierung der FFE Fraktionen bezüglich ihrer

proteolytischen Aktivität möglich war. Bei sehr geringen Enzymaktivitäten, wie bei AEP oder Cathepsin S, konnte oft nur noch durch 12-24 h Inkubation überhaupt Signale erhalten werden (da wegen der großen Verdünnung schon von vornherein 50 oder 100 µl an Probe eingesetzt wurde, konnte nicht noch mehr verwendet werden, ohne dass schonend aufkonzentriert würde). Nach langen Inkubationszeiten und niederen Substratumsätzen können jedoch keine sicheren Aktivitäten mehr angegeben werden, und man kann deshalb allenfalls noch von Aktivitätsnachweis sprechen. Die FFE-Auftrennungen wurden ebenfalls zwischen pH 7,0 und pH 7,5 durchgeführt, weshalb wie mehrfach angeführt, Inaktivierungen einzelner Enzyme (AEP über pH 6,0 instabil) auftreten können.

Mit Hilfe der FFE können somit proteolytische Kompartimente sehr schonend und zuverlässig getrennt und untersucht werden. Nachteilig wirken sich allerdings die großen Probenvolumina nach der Trennung aus. Daher müssen weitere effektive Schritte zur Aufreinigung oder Analyse eingesetzt werden, ohne dass Aktivitäten verloren gehen.

6.4. Keratinozyten: Cathepsin B-, L- und S-Aktivitäten

Wie am Anfang beschrieben, können Fehlregulationen des Immunsystems zu Autoimmunerkrankungen führen. Eine Autoimmunerkrankung der Haut, die Psoriasis, war teilweise Ausgangsbasis für diese Dissertation. Ursprünglich war beabsichtigt, MHC Klasse I und II gebundene Peptide bei *psoriasis vulgaris* zu charakterisieren, um potentielle Autoantigene identifizieren zu können. Als ein potentielles Autoantigen bei Psoriasis wird ein Epitop aus dem Cytokeratin 17 diskutiert (Bonnekoh et al., 2001). Unter IFN- γ Stimulation sowie bei Hyperproliferation exprimieren Keratinozyten verstärkt bestimmte Cytokeratine, unter anderem Cytokeratin 17. Diese ungewöhnliche Expression findet man ebenfalls in psoriatischer Haut. Zunehmend an Bedeutung gewinnen auch mögliche Einflüsse durch bakterielle Infektionen, bei denen Superantigene von Streptokokken oder Staphylokokken eine wesentliche Rolle sowohl bei der Entstehung als auch bei der Fortdauer der Psoriasis spielen können (Travers et al., 1999).

Als Modell dafür wurden zunächst die HaCaT-Keratinozyten und später Keratinozyten in Primärkultur eingesetzt. IFN- γ nimmt wahrscheinlich bei der Entstehung der Psoriasis eine Schlüsselfunktion ein (Szabo et al., 1998). Psoriatische Keratinozyten zeigen folglich einen MHC Klasse II-positiven Phänotyp (Gottlieb et al., 1986), und in mehreren Studien konnten in psoriatischer Epidermis gesteigerte Protease-Aktivitäten demonstriert werden (Baird et al., 1990; Wiedow et al., 1992). Neben der Isolierung von HLA gebundenen Peptiden von IFN- γ stimulierten HaCaT (siehe 6.5.), wurden deswegen subzelluläre Kompartimente von HaCaT und primären Keratinozyten unter den gleichen Bedingungen sowie unter Kontrollbedingungen präpariert und auf ihre Proteaseaktivitäten untersucht. Kawada und Mitarbeiter (1997) konnten auch eine verstärkte Aktivierung der Proformen von Cathepsin L, B und D in Psoriasis darlegen.

Die Cathepsine B, L und S gehören zu einer großen Familie der Cysteinproteasen, die an der intrazellulären Proteolyse beteiligt sind. Cathepsin B und L sind ubiquitär vorhanden, während Cathepsin S hauptsächlich im lymphatischen Gewebe exprimiert wird (Kirschke et

al., 1986). In diesen Geweben spielt Cathepsin S eine wichtige Rolle bei der Antigenprozessierung, auf die im folgenden noch genauer eingegangen wird.

Es wurden Cathepsin B-, L- und S-Aktivitäten in subzellulären Kompartimenten von spontan immortalisierten Keratinozyten (HaCaT) und Keratinozyten in Primärkultur gemessen. Wie zu erwarten war, zeigten die lysosomalen Kompartimente die höchsten Aktivitäten.

Neben ihrer Rolle bezüglich des allgemeinen Proteinumsatzes, sind die Cathepsine auch an der Generierung und Präsentation antigener Peptide beteiligt (Fineshi and Miller 1997; Villadangos et al., 1999; Nakagawa and Rudensky 1999). Damit solche Antigene mit einer durchschnittlichen Länge von 10 bis 14 Aminosäuren auf MHC Klasse II präsentiert werden können, darf keine komplette Degradation von Proteinen/Peptiden erfolgen. Es wird angenommen, dass eine limitierte Proteolyse in prälysosomalen Kompartimenten stattfindet (Authier et al., 1996). Welche exakte Aufgabe den jeweiligen Cathepsinen dabei zufällt, wird kontrovers diskutiert. Matsunaga und Mitarbeiter konnten z. B. durch Inhibition von Cathepsin B eine primäre Immunantwort blockieren (Matsunaga et al., 1993).

Versuche mit Cathepsin B- und D-defizienten Mäusen dagegen zeigten kaum Veränderungen, weder bei der Antigenprozessierung noch bei der Reifung von MHC Klasse II-Komplexen (Villadangos et al., 1997; Deussing et al., 1998). Diese Knock-out-Studien mit Cathepsinen weisen darauf hin, dass hier ein redundantes, komplexes System an Proteasen vorliegt. Dagegen zeigen Cathepsin-S- oder Cathepsin-L-knock-out-Mäuse ganz klar veränderte Reifungsprozesse der MHC Klasse II-Moleküle. In Cathepsin S negativen Mäusen akkumulieren MHC Klasse II-Moleküle mit einer unvollständig prozessierten invarianten Kette in bestimmten intrazellulären Kompartimenten der meisten MHC II-positiven Zellen (Nakagawa et al., 1999; Shi et al., 1999), insbesondere auch in dendritischen Zellen (Driessen et al., 1999). Da Cathepsin L in kortikalen Thymus-Epithelzellen der Maus die analoge Funktion von Cathepsin S erfüllt, zeigt sich im Thymus-Bereich von Cathepsin L-defizienten-Mäusen ebenfalls eine unvollständige Prozessierung der invarianten Kette (während die restlichen lymphatischen Organe dies nicht zeigen, weil hier Cathepsin S exprimiert wird) und als Folge davon eine veränderte positive Selektion von CD4 positiven T-Zellen (Nakagawa et al., 1998). Darüber hinaus entwickeln diese Mäuse periodische Haarverluste und eine Hyperplasie der Epidermis (Roth et al., 2000).

Keratinozyten sind ein integraler Bestandteil des Immunsystems der Haut. Als fakultativ antigenpräsentierende Zellen sind sie in der Lage, unter immunmodulatorischen Bedingungen, wie beispielsweise IFN- γ Stimulation, MHC Klasse II-Moleküle zu präsentieren (Nickoloff and Turka 1994). Wir haben hohe Cathepsin B Aktivitäten, etwas geringere Cathepsin L- und sehr geringe Cathepsin S-Aktivitäten gemessen. Cathepsin S spielt aber bei der Prozessierung der invarianten Kette (in humanen peripheren Geweben) eine wichtige Rolle, weil es das CLIP-Fragment (class II associated invariant chain peptide) generiert und so erst den Austausch mit anderen antigenen Peptiden (Riese et al., 1996) ermöglicht. Diese wichtige immunologische Funktion spiegelt sich in relativ hohen Cathepsin S-Aktivitäten in den professionell antigenpräsentierenden syngenen B-Zellen. Das relativ hohe Verhältnis endosomaler zu lysosomaler Cathepsin S-Aktivität in diesen B-Zellen stützt diese Vermutung.

Unter IFN- γ Stimulation werden bei Keratinozyten MHC Klasse II-Moleküle neu synthetisiert und es erfolgt eine Steigerung der Cathepsin S-Aktivität, während die Cathepsin B- und L-Aktivitäten kaum moduliert werden. Interessanterweise werden endosomale und lysosomale Cathepsin S-Aktivitäten sowohl in HaCaT als auch in primären Keratinozyten sehr ähnlich verändert. Die fünffache bzw. 13-fache Aktivitätssteigerung im Gesamtzellhomogenat von beiden Zellarten könnte auf eine Verminderung an cytosolischen Protein-Inhibitoren zurückzuführen sein.

Diese cytosolischen Inhibitoren gehören zur Klasse der Cystatine. Es sind potente und teilweise hochspezifische Inhibitoren. Ursprünglich schien ihre Funktion auf das Cytosol beschränkt zu sein (Schutz vor unspezifischer Proteolyse durch freigesetzte oder fehlgeleitete endosomal/lysosomale Proteasen). Neuere Daten belegen jedoch auch ein Vorkommen bestimmter Cystatine in endocytotischen Kompartimenten (Villadangos et al., 2001, Riese and Chapman 2000). Pierre und Mellman (1998) zeigten, dass Cystatin C in Lysosomen von unreifen dendritischen Zellen der Maus exprimiert wird, in reifen dagegen nicht. Sie schlussfolgerten daraus eine Modulation der Proteolyse der invarianten Kette und damit eine Kontrolle der MHC Klasse II-Expression. Neben diesem Cathepsin S abhängigen Regulationsmechanismus (Driessen et al., 1999), gibt es aber auch Hinweise auf eine Cathepsin S unabhängige Regulation der MHC Klasse II-Expression sowohl bei murinen (Villadangos et al., 2001) als auch bei humanen dendritischen Zellen (Fiebiger et al., 2001).

Untermauert wird die Verminderung an Cystatinen im Cytosol durch die leicht erhöhten Cathepsin B- und L-Aktivitäten im Gesamtzellhomogenat nach Stimulation, im Vergleich zu den unveränderten NAG-Aktivitäten. Während die NAG-Aktivitäten nicht von cytosolischen Inhibitoren beeinflusst werden, weiß man, dass deren inhibitorisches Potential gegenüber Cathepsin B und L geringer ist als gegenüber Cathepsin S (Abrahamson, 1994).

Insgesamt ergab die IFN- γ Stimulation von Keratinozyten unterschiedliche Effekte auf die Aktivitäten aller drei Thiolproteasen, die Expression von MHC Klasse I und II sowie potentiell auf ihre cytosolischen (möglicherweise auch endosomalen) Inhibitoren.

Die Ergebnisse der RT-PCR ergaben eine eindeutige Stimulation der Cathepsin S-mRNA Information durch IFN- γ , d.h. die verstärkte Cathepsin S-Aktivität ist unter anderem auf eine erhöhte Neusynthese zurückzuführen. Parallel dazu wurde die Neusynthese von MHC Klasse II-Molekülen und invarianter Kette induziert (Albanesi et al., 1998). Auf DNA-Ebene sind die entsprechenden IFN- γ Bindungsdomänen sehr gut beschrieben und die daraufhin abgelesenen Genregionen sind mehr oder weniger gut bekannt (MHC Klasse I und II, Adhäsions Molekül ICAM-1, Piskurich et al., 1999; TAP-Transporter, bestimmte Proteasom-Untereinheiten etc.). Für den Cathepsin S Promoter wird eine AP1 Bindungsstelle erwähnt (Shi et al., 1994).

Inwiefern diese Region mit den IFN- γ Bindungsdomänen interagiert, ist unzulänglich beschrieben. Im Immunoblot sind in stimulierten endosomalen Fraktionen verschiedene Reifestadien an Cathepsin S zu sehen, die aktive Form von Cathepsin S und die enzymatisch inaktive Proform. Folglich kann relativ schnell aus der Proform aktives Cathepsin S nachgebildet werden, wenn beispielsweise die Prozessierung der invarianten Kette notwendig wird, um MHC Klasse II-Moleküle innerhalb der Endosomen mit antigenen Peptiden beladen

zu können. Welche Mechanismen bei Keratinozyten bei der Regulation der MHC Klasse II-Expression eine Rolle spielen, ist allerdings wenig beschrieben.

Da Cathepsin S an der Prozessierung der invarianten Kette beteiligt ist (Riese et al., 1996), könnte eine Induktion im Kontext der MHC II-Antigenpräsentation von immunologischer Bedeutung sein. Darüber hinaus wäre eine Cathepsin S Hochregulation ein kritischer Punkt bei der Pathogenese von Psoriasis, wenn man berücksichtigt, dass diese Zellen möglicherweise Autoantigene präsentieren und T-Zellen stimulieren (Boehncke 1996; Prinz et al., 1999). Andererseits werden bei psoriatischen Keratinozyten unter anderem der IFN- γ Rezeptor, ein IFN regulatorischer Faktor (IRF-1) und ein Transkriptionsfaktor (STAT-1) unter IFN- γ Einfluss herunterreguliert, während normale Keratinozyten sich gerade umgekehrt verhalten (Chen et al., 2000; Jackson et al., 1999). Andere gegenteilige Effekte sind ebenfalls vielfach belegt (Nickoloff et al., 1984). In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die Expression von Cathepsin S in psoriatischen Keratinozyten in subzellulären Kompartimenten zu untersuchen, weil darüber noch wenig oder keine Daten vorliegen.

6.5. HaCaT-Keratinozyten: Identifizierung von präsentierten Antigenen

Dank der im Labor seit mehreren Jahren etablierten und vielfach durchgeführten zyklischen Affinitätsreinigung konnten, wie die entsprechenden HPLC-Läufe deutlich zeigen, sehr erfolgreich Peptide von HaCaT-Keratinozyten isoliert und fraktioniert werden. Die 4 untersuchten Fraktionen der MHC Klasse I Isolierung enthielten Peptidkonzentrationen, die ohne Aufkonzentrierung direkt sequenziert werden konnten. Die Konzentrationen in den MHC Klasse II-Isolaten liegen um ein mehrfaches darunter. Vorversuche mit der Maldi-PSD (Voyager, Applied Biosystems) zeigten nach Aufkonzentrierung einzelner Fraktionen auf unter 5 μ l zwar eindeutige Peptidmassen, für eine Sequenzierung aber möglicherweise zu geringe Mengen.

Die präsentierten Peptide repräsentieren im wesentlichen cytosolische und teilweise ubiquitär vorkommende Proteine. Auffallend sind auch drei Peptide, die MHC Klasse I-Proteinen entsprechen (MHC Klasse I-Antigen, HLA-A11 oder HLA-Cw), d.h. MHC Klasse I-Moleküle präsentieren sich selbst. Eine weitere Gruppe beinhaltet den äußerst hoch konservierten Proteasomenkomplex sowie Proteine des Ubiquitinierungssystems. Bekanntlich werden Proteine unter Beteiligung mehrerer Enzyme unter ATP-Verbrauch durch Ubiquitinierung dem proteasomalen Abbau zugeführt. Da die HaCaTs mit IFN- γ stimuliert wurden, ist die Präsentation einer Untereinheit des Immunoproteasoms sehr gut vorstellbar (Proteasom Untereinheit, beta typ 10 \Rightarrow durch IFN- γ induzierbar), genauso wie die Induktion der Transkriptionsfaktoren IRF1 und IFN- γ induzierbares Protein 16 (beides sind nukleäre Proteine).

Unter den 17 Peptiden befinden sich zwei Peptide, die hauttypischen Proteinen entsprechen. Sowohl Desmoplakin als auch ARP2/3 wirken bei der Organisation der Zellstruktur mit und sorgen für die Integrität der Epidermis. Desmoplakin ist am Aufbau der Desmosomen beteiligt. Desmosomen stellen Zell-Zell-Verknüpfungen unter Einbeziehung des Cytoskeletts her. Sie dienen der mechanisch stabilen Veknüpung von Zellen zu Gewebsverbänden oder der Befestigung von Zellen auf der extrazellulären Matrix. Im Zusammenspiel mit

desmosomalen Cadherinen unterstützt Desmoplakin die Anheftung von Intermediärfilamenten. Desmoplakin defiziente Mäuse zeigten bei mechanischer Belastung interzelluläre „Zellauffrennungen“ (Vasioukin et al., 2001). ARP 2/3 gehört zu einem Proteinkomplex, der als essentieller Regulator die Polymerisation von Aktin steuert. Durch Aktinpolymerisation und Depolymerisation kann die Struktur der Zelle (Stabilität, Motilität) verändert werden. Aktinfilamente können auch mit Desmosomen wechselwirken bzw. sind an der Ausbildung der Typ II Desmosomen beteiligt.

Die ubiquitär exprimierte Glykogen Phosphorylase katalysiert hauptsächlich den Glykogenabbau in Leber und Muskel. Dabei wird Glucose-1-Phosphat aus Glykogen freigesetzt. Die Zuordnung der noch übrigen ribosomalen Proteine, Helicasen und hypothetischen Proteine ist problematisch (die ribosomalen Proteine sowie die DEAD/H-box Polypeptide sind an der Zellzyklusregulation beteiligt und spielen möglicherweise bei Zelltransformationen eine Rolle).

Die erfolgreich sequenzierten Peptide stellen nur einen Bruchteil der isolierten Peptide dar. Insgesamt sind rund 100 Fraktionen bei den drei Fraktionierungen angefallen, die sicherlich ein mehrfaches an Peptiden beinhalten. Aufgrund der sich stetig weiter entwickelnden Technik der Massenspektrometer, dürften zukünftige Analysen hier eine wesentlich effizientere Sequenzierung ermöglichen. Die umfassende Analytik der von HaCaT-Keratinocyten präsentierten Peptide im Vergleich zu anderen nicht transformierten Keratinocyten könnte sicherlich neue Aspekte der Zelltransformation eröffnen.

6.6. Untersuchungen zur Spaltspezifität der AEP

6.6.1. Spaltexperimente mit Peptiden

Das im Pflanzenbereich schon recht lange bekannte Legumain gehört zu der Großfamilie der Cysteinendopeptidasen. Wegen seiner hohen Spalt-Spezifität gegenüber Asparagin in P1-Position wird es auch Asparaginy Endopeptidase (AEP) genannt. 1997 hat Alan Barrett AEP erstmals als lysosomale Protease im Säuger beschrieben, wobei er AEP aus einer humanen Placenta-Bibliothek kloniert und sequenziert hatte (Chen et al., 1997). Mit aus Nierengewebe des Schweines isoliertem AEP wurden von ihm erste Charakterisierungen durchgeführt. In Verdauexperimenten mit Oligopeptiden und einem bakteriellen Antigen (Tetanus Toxoid C-Fragment = TTCF) konnte gezeigt werden, dass nicht alle Asparagin-Bindungen gespalten werden (nur 3 von 47 Asn-Bindungen im TTCF z. B.).

Da jedoch die initialen proteolytischen Ereignisse für die Antigenprozessierung von großer Bedeutung sind, weil sie nämlich den weiteren Verlauf der Prozessierung hinsichtlich der Generierung möglicher zu präsentierender Peptide determinieren, ist eine genauere Charakterisierung der Spaltspezifität von AEP (und anderen Proteasen oder Hilfsmolekülen) wünschenswert.

Das pflanzliche Legumain wurde sehr umfangreich und detailliert beschrieben. Es spaltet bei ungefähr gleichen Substratumsätzen, unabhängig von der in P1-Position vorkommenden Aminosäure, hochspezifisch nach Asparagin (Ishii, 1994; Jung et al., 1998). Seine Hauptaufgabe besteht in der Mobilisierung von Speicherproteinen während der Keimung und der post translationalen Prozessierung von Keimproteinen (Hara-Nishimura et al., 1995;

Shutov und Vaintraub, 1987). In einer neueren Arbeit wird auch eine Prozessierung anderer Endopeptidasen durch Legumain beschrieben (Okamoto und Minamikawa, 1999).

Das Säugetier-AEP (wird im folgenden von AEP gesprochen, so ist das Säugetier-AEP gemeint) unterscheidet sich in seiner Spezifität vom pflanzlichen Legumain. Wie schon bei Barrett angemerkt, schneidet AEP sowohl in komplexen Proteinen als auch bei einigen Peptiden nicht nach allen Asparaginen. Dando und Mitarbeiter (1999) haben 12 Oktapeptide mit Asparagin an Position 5 synthetisiert (N- und C-terminal mit je einem Alanin erweitert), die einer Sequenz aus dem TTCF entsprechen. An 11 Asparaginpositionen des kompletten TTCF wurde nicht gespalten, während jetzt bei Verdauexperimenten mit AEP 10 der 12 Peptide, mit allerdings stark unterschiedlichen Substratumsätzen, gespalten wurden. Im übrigen konnte dieselbe Arbeitsgruppe an mehreren Proteinen zeigen, dass vor und nach Denaturierung der Proteine durch Kochen in einprozentigem SDS keine Spaltunterschiede bestehen (insgesamt wurden von 163 Asn in Proteinen nur 16 gespalten!).

Ein wichtiger Aspekt bezieht sich auch auf mögliche Glykosylierungen der Asparaginseitenkette. Liegt hier eine Glykosylierung vor, so erfolgt keine AEP-Spaltung. Möglicherweise könnte darin ein Vorteil für die unspezifische Immunabwehr zu sehen sein, weil nicht glykosylierte bakterielle Antigene dadurch bevorzugt der AEP-Prozessierung zugänglich gemacht werden. Umgekehrt könnte sich für virale Hüllproteine (sind in der Regel hoch glykosyliert) evtl. ein Vorteil ergeben, weil vielleicht weniger immunogene Peptide generiert werden können.

Wurde Asparagin durch chemisch ähnliche Aminosäuren oder Strukturen ersetzt, so erfolgte ebenso keine Spaltung (Rotari et al., 2001; Dando et al., 1999). Allerdings gibt es Hinweise auf eine Spaltung von Aspartat-Bindungen. Dies wurde von Rotari und Mitarbeitern (2001) mit Arylsubstraten bestätigt, wobei sie einen um den Faktor 100 geringeren Substratumsatz fanden, sowie eine maximale Aktivität zwischen pH 4,5-4,9 (pH-Optimum für AEP ansonsten bei 5,8).

Warum sind nun bestimmte Asparagine AEP resistent und andere (nicht glykosylierte) nicht? Diese Frage lässt sich noch nicht eindeutig beantworten. Interessanterweise scheinen strukturelle Anordnungen keine so große Rolle zu spielen. Einige der Schnittstellen befinden sich an strukturell anspruchslosen Schleifen und an der Oberfläche von Proteinen, wobei dies Bereiche betrifft, in denen Asparagine bevorzugt vorkommen (Dando et al., 1999). Auch die Tatsache, dass nach Denaturierung keine anderen oder zusätzlichen Asparagine gespalten werden, spricht eher gegen klare strukturelle Anforderungen.

Während die Funktion des pflanzlichen Legumains relativ klar eingeordnet werden kann, ist die biologische Funktion von AEP im Menschen oder Säuger mehr oder weniger ungeklärt. Manoury et al. (1998) konnten zum erstenmal einen Zusammenhang von AEP mit der Prozessierung von TTCF im Kontext der MHC Klasse II-Präsentation zeigen. Ungewöhnlich für eine Cysteinprotease ist, dass sie nicht durch E64 hemmbar ist, selbst wenn höhere Konzentrationen ($>10 \mu\text{M}$) eingesetzt werden.

Umgekehrt ist dies von Vorteil, da bei Enzym-Aktivitätsbestimmungen oder Verdauexperimenten durch Einsatz von E64 (und weiterer Inhibitoren) gezielt auf die AEP Aktivität

abgehoben werden kann. Durch Einsatz von Jodacetamid (~100 mM) kann AEP sicher inhibiert und gleichzeitig noch mal als Thiolprotease bestätigt werden. Mit ZAENK (Manoury et al., 1998) steht zusätzlich ein kompetitiver Inhibitor zur Verfügung, der bei den entsprechenden Versuchen nach dem derzeitigen Wissensstand einen zuverlässigen Hinweis auf eine AEP-Aktivität geben sollte.

In Anlehnung an die Nature Publikation von Manoury et al. (1998) haben wir eine Substratbibliothek synthetisiert, bei der sämtliche P1`Positionen mit den 20 AS besetzt wurden und haben sie mit partiell gereinigtem AEP verdaut. Es wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt, um den Großteil an unspezifischen Proteasen zu inhibieren (EDTA, Aprotinin, E64). Im Verdau mit dem Kontrollpeptid (Asparagin gegen Glutamin ausgetauscht) erfolgte über 4 h keinerlei Abbau, so dass darüber hinaus keine andere Protease aktiv sein sollte.

Bei Dando und Mitarbeitern (1999) wurden 2 Oktapeptide mit Arginin und Histidin an P1`Position nicht gespalten. Im Unterschied dazu wurden unsere Peptidsubstrate alle gespalten. Auffallend war nur der wesentlich geringere Umsatz des Prolin-Peptides. Alle anderen zeigten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Substratumsatzes.

In einem alternativen Ansatz (Kompetitionsassay) wurde mit Hilfe des fluorogenen Substrates zur AEP-Aktivitätsbestimmung versucht, dessen Aktivität zu kompetieren und dadurch vielleicht mehr spezifische Unterschiede der einzelnen Substrate zu erhalten. Überraschenderweise stellte sich das Cystein-Peptid als effektivster Kompetitor heraus, wobei es noch gut doppelt so gut kompetierte wie die nächstbesten Kompetitoren. Über mögliche Ursachen hierfür kann nur spekuliert werden. Eindeutig zeigte sich wieder beim Prolin-Peptid eine signifikant geringere Suszeptibilität gegenüber AEP (sehr geringe Competition). Für die restlichen Aminosäuren ergab sich tatsächlich ein etwas differenzierteres Bild, wobei man auf den ersten Blick keine besonderen gemeinsamen Eigenschaften (hydrophob, basisch) entdecken kann. Als nächste Gruppe „schlechter“ Kompetitoren fanden sich die Peptide mit Aspartat, Glutamat und Leucin an P1`Position. Sie erreichten eine ungefähr 50-prozentige Competition, während die folgende Gruppe (Methionin, Glutamin, Valin, Thryptophan, Tyrosin und Threonin) sich bei etwa 60% Competition einpendelte. Die restlichen 9 Aminosäuren können als relativ gute Kompetitoren gelten (ungefähr 70%).

Eine mögliche Ursache der geringen Sensitivität von Peptiden mit Prolin an P1`Position dürfte in der Ringstruktur von Prolin zu sehen sein, wodurch strukturelle Veränderungen im Peptid auftreten. In der Regel unterbrechen Proline in Proteinen α -Helix- und β -Faltblatt-Strukturen.

6.6.2. Spaltexperimente mit Proteinen

Nachdem die Verdauexperimente mit den Peptiden der Bibliothek zumindest keine Motive für die P1`Position bezüglich der Resistenz gegenüber AEP ergaben, wurden komplexere Proteine eingesetzt. Die Spaltexperimente mit wtMBP und MBP* ergaben nahezu die zu erwartenden Ergebnisse. Das wtMBP enthält zwar zwei potentielle AEP Spaltstellen (N92 und N84), die Asparagin 84-Prolin Bindung stellt aber, wie in den Peptidexperimenten eindeutig zu sehen, das wesentlich schlechtere Substrat dar. Ist gleichzeitig ein anderes

Substrat vorhanden, so dürfte dies bevorzugt gespalten werden (siehe Kompetitionsassay). Die Situation im mutierten MBP dagegen ist eine andere. Jetzt kann nur noch eine vorhandene potentielle Bindung gespalten werden. Wiederum in Übereinstimmung mit den Peptidverdauexperimenten, erfolgte eine bei weitem langsamere Umsetzung, wie durch das entsprechende Chromatogramm belegt wird (siehe Abb. 19).

Als weiteres Modellsubstrat wurde Myoglobin eingesetzt, welches zwei theoretische AEP Spaltstellen besitzt. Obwohl die entsprechenden Peptide (N-V und N-D) der Bibliothek sehr gut gespalten wurden (und auch als relativ gute Kompetitoren fungierten), wurden keine Spaltprodukte detektiert, selbst bei längeren Verdauezeiten. Nach unseren Informationen sind beide Asparagine im Myoglobin nicht glykosiliert, was die einfachste Erklärung wäre. Sie befinden sich in einer Helix-Struktur an der Oberfläche des Proteins.

Für die Verdauexperimente wurde Myoglobin in Harnstoff denaturiert, über HPLC gereinigt und lyophilisiert (nicht gekocht). Allerdings zeigte sich an der noch assoziierten Häm-Gruppe eine strukturelle Ordnung des Myoglobins. Dasselbe Myoglobin wurde jedoch zügig durch andere lysosomale Enzyme, speziell durch Cathepsin D vollständig degradiert, d.h. es ist keineswegs gegenüber Proteasen resistent. Im Hydrophobizitätsblot sieht man, dass sich die initialen Schnittstellen (alles Cathepsin D Schnittstellen) überwiegend in hydrophoben Bereichen befinden. Dieselben Beobachtungen wurden bereits von Hermann Beck und Christian Schröter bei *in vitro* Spaltexperimenten mit wtMBP und HEL gemacht. Sie leiteten deshalb eine allgemeine Regel ab, nach der hydrophobe Protein-Bereiche eher proteasesensitiv und Bereiche mit hydrophilem Charakter eher proteaseresistent sind.

Interessanterweise sind hydrophobe Bereiche im Protein teilweise sowohl bevorzugte Bindungsbereiche für einige MHC Klasse II-Allele (in Abhängigkeit der Ankerpositionen) als auch für Hitzeschock Proteine. Diese Proteinklasse ist bei Faltungs- und Entfaltungsprozessen von Proteinen beteiligt, kann auf unterschiedliche Weise in die Antigenprozessierung eingreifen (Bindung immunogener Peptide, Aktivierung von APCs, etc.) und dadurch die Immunantwort modulieren (Schreiber et al., 2000; Singh-Jasuja et al., 2001; Menoret and Srivastava, 2002).

Insgesamt gesehen konnte in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten eine hohe Spezifität gegenüber Asparagin in P1 Position beobachtet werden. Substrate mit Aspartat in derselben Position wurden nicht getestet, sollten aber zumindest bei weiteren Versuchen ebenfalls mit einbezogen werden. Hingegen fanden sich bei Peptidsubstraten keine AEP-resistenten N-X-Bindungen. Welche Faktoren darüber hinaus als mögliche Bindungs- bzw. Spalt-Motive in Frage kommen, konnte nicht näher geklärt werden. Dazu müssten weitere Peptid-Bibliotheken geschaffen werden, die weitere Positionen N- und C-terminal von Asparagin miteinbeziehen. Für die Antigenprozessierung sind die initialen proteolytischen Ereignisse aus beschriebenen Gründen von großem Interesse.

Manoury und Mitarbeiter (1998) haben zum erstenmal (im Kontext der MHC Klasse II-Präsentation) die Beteiligung von AEP an der initialen Spaltung eines Protein-Antigens gezeigt. Für dieses frühe Stadium der Antigen-Prozessierung wäre eine limitierte Proteolyse durch eine oder mehrere Proteasen mit einer hochspezifischen Substratspezifität zu fordern, so dass nur ein bestimmtes eingeschränktes Set an intermediären Fragmenten generiert werden könnte. Während einerseits für diese limitierte Proteolyse eine gewisse Spezifität zu

fordern ist, sollte andererseits auch eine unspezifische (zufällige) Spaltaktivität vorhanden sein, um möglichst viele Proteine weiterer Prozessierung zugänglich zu machen.

Entsprechend unseren Ergebnissen ist AEP prädestiniert für diese Aufgabe. Es generiert zwei zunächst stabile Fragmente des Autoantigens MBP, welche dann als Substrate für andere Proteasen dienen. AEP verbindet eine enge Substratspezifität in P1 Position mit einer nahezu nicht restringierten Spezifität, die sämtliche Aminosäuren in P1-Position zulässt, im Unterschied zu beispielsweise Cathepsinen, bei denen die Spaltmotive vorgegeben sind. Zusätzlich konnten in endosomal/lysosomalen Kompartimenten der hochspezialisierten professionell antigenpräsentierenden dendritischen Zellen beachtliche AEP-Aktivitäten gemessen werden, was seine mögliche Schlüsselfunktion zusätzlich stützen könnte.

Dass eine solch eminent wichtige Aufgabe in der Zelle auf eine einzelne Protease beschränkt sein sollte, war bisher eher unwahrscheinlich. Verschiedene bereits bei den Cathepsin-Aktivitäten angesprochene Maus knock-out-Systeme zeigten ein teilweise redundantes System an endosomal/lysosomalen Proteasen. Im Falle der TTCF Prozessierung konnte allerdings erst kürzlich eine Kontrolle der Präsentation von T-Zell Epitopen durch AEP gezeigt werden (Antoniou et al., 2000). Hier wurden alle drei bekannten AEP-Spaltstellen im TTCF mutiert, wodurch keine bzw. eine stark reduzierte Prozessierung und Präsentation der entsprechenden T-Zell Epitope statt fand. Es stellte sich sogar heraus, dass für die optimale T-Zell Präsentation die Spaltung an nur einer einzigen Asparagin-Position ausreichte.

In diesem Zusammenhang sind wir noch nicht auf den Einfluss von Disulfidbrücken auf die Stabilität von Proteinen eingegangen. Proteine mit einer und mehreren Disulfidbrücken gelten als äußerst proteaseresistent (sowohl *in vitro* als auch *in vivo*). Um solche Proteine in der Zelle einer Prozessierung und Präsentation zugänglich zu machen, muss eine Reduktion der Disulfide erfolgen. In endosomal/lysosomalen Kompartimenten ist ein reduzierendes Milieu vorhanden. Durch welche Faktoren eine reduzierende Umgebung geschaffen wird, ist nicht exakt definierbar. Man nimmt an, dass hohe Cystein- und Gluthathion-Konzentrationen in den Kompartimenten geschaffen werden. Für das lysosomale System in murinen Makrophagen konnte bereits 1990 ein effektiver Eintransport von Cysteinen nachgewiesen werden (Pisoni et al., 1990), während Gainey und Mitarbeiter (1996) später dasselbe für Endosomen und Lysosomen bei einer murinen B-Zelllinie beschrieben haben.

Zusätzlich dürften enzymatische Reaktionen eine Reduktion beschleunigen. Erst kürzlich wurde eine solche IFN- γ induzierbare Thiol-Reduktase in endocytotischen Kompartimenten beschrieben (\Rightarrow GILT; Phan et al., 2000). Dieses Enzym wird in APCs konstitutiv exprimiert, in anderen Zelltypen nur nach IFN- γ Stimulation und über das Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-System als 35 kDa schwere Proform in endosomal/lysosomale Kompartimente einsortiert. Bereits die nicht prozessierte Proform kann die Reduktion von Disulfidbrücken katalysieren. Interessanterweise bindet die Proform über ihr N-terminales Propeptid auch an bestimmte HLA-DR-Allele (Arunachalam et al., 1998), wobei diese Funktion bisher nicht näher untersucht wurde.

Eine essentielle Bedeutung von GILT bei der Antigenprozessierung konnte vor kurzem durch GILT-defiziente Mäuse gezeigt werden. Diese zeigten gegenüber dem Modellsubstrat HEL eine stark verringerte Präsentation einiger HEL-Epitope, andere Epitope blieben dagegen unbeeinflusst (Maric et al., 2001).

Beobachtungen wonach AEP in der Lage sein sollte, komplexe nicht reduzierte Proteine zu spalten, konnten von Christian Schröter und Hermann Beck mit *in vitro* Spaltexperimenten nicht bestätigt werden. Nicht reduziertes HEL (4 Disulfidbrücken) konnte beispielsweise mit lysosomalen Fraktionen von B-Zellen oder einzelnen Proteasen nicht gespalten werden. Aus unserer Sicht ist deswegen zuerst eine Reduktion in endosomalen/lysosomalen Vesikeln zu fordern, bevor Proteasen überhaupt solche Proteine prozessieren können. In einer erst kürzlich erschienenen Veröffentlichung wurde intaktes HEL (mit korrekten Disulfidbrücken) nicht nur *in vivo* sondern auch *in vitro* mit endosomalem/lysosomalem Extrakt von murinen dendritischen Zellen verdaut (Plüger et al., 2002). Hier kommen die Autoren zu einem anderen Ergebnis. Erstens wurde HEL (rekombinantes radioaktiv markiertes HEL) *in vivo* komplett degradiert, ohne dass irgendwelche intermediären Spaltprodukte zu sehen waren, d.h. es kam nicht zu initialen Spaltungen, die einer bestimmten Protease zuzuordnen waren. Zweitens wurde das gleiche intakte HEL nach Inkubation mit erwähntem Extrakt ebenfalls ohne Intermediärprodukte degradiert. Drittens ergaben Verdauexperimente mit den Cathepsinen S, L, D oder B bei pH 5,0 und moderaten reduzierenden Bedingungen jeweils entsprechende Abbauprodukte. In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen zeigte sich jedoch kein Unterschied hinsichtlich des Abbaus von HEL, wenn B-Zellen von Cathepsin B-, L- oder S-defizienten Mäusen verwendet wurden. Dies spricht wieder für eine redundante Ausstattung an Proteasen mit überlappender Spezifität.

Am Beispiel von HEL zeigt sich somit ein konträres Bild im Vergleich zur TTCF-Prozessierung. Initiale Spaltungen durch eine bestimmte Protease sind hier nicht notwendig. Ob somit AEP generell bei der Kontrolle der Prozessierung im Kontext der MHC Klasse II-Präsentation eine Schlüsselposition einnimmt oder eher die Ausnahme darstellt, bedarf noch intensiverer Untersuchungen.

6.6.3. AEP-Aktivitäten

Alle hier angeführten Aktivitätsmessungen beruhen wie bei den Cathepsinen (oder auch anderen Proteasen) auf der Messung mit mehr oder weniger spezifischen fluorogenen Substraten. Die Spezifitäten können sich überschneiden und oft stellt sich bei der Messung von Aktivitäten die Frage, inwiefern mit einem kleinen Substrat, bei dem endständig das AMC abgespalten wird, eine Endoproteaseaktivität erfasst werden kann. Cathepsin D kann beispielsweise nur schneiden, wenn links und rechts mehrere AS vorhanden sind, weshalb für Cathepsin D nicht die üblichen AMC-Substrate eingesetzt werden können.

Für AEP gilt allerdings als gesichert, dass es an einer Asn-Bindung noch sehr gut spalten kann, wenn C-terminal nur noch zwei Aminosäuren vorliegen oder eine amidierete Aminosäure vorliegt. Ähnlich verhält es sich mit dem N-Terminus. Entweder reichen zwei ungeschützte Aminosäuren oder eine geschützte Aminosäure (Dando et al., 1999). Das für die AEP Aktivitäten eingesetzte Substrat wurde, mit Variationen in P3-Position bereits von Alan Barrett als Substrat für die Standardisierung eingesetzt (Chen et al., 1997).

Der $K_{\text{kat}}/K_{\text{m}}$ -Wert für Z-Val-Ala-Asn-AMC beträgt $75 (10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ und für Z-Ala-Ala-Asn-AMC $90 (10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$. Bei „gut“ hydrolysierbaren Asparagin-Peptiden liegen diese Werte zwischen 5 und 35 (Dando et al., 1999).

Die beschriebenen Fluoreszenzmessungen sind, wie mehrfach angemerkt, mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Vor allem bei quantitativen Aussagen müssen die Messungen mehrfach überprüft und kritisch bewertet werden. Geringe AEP-Aktivitäten, wie wir sie (mit Ausnahmen) mehr oder weniger bei den meisten untersuchten Zellen vorfinden, erfordern den Einsatz von mehreren μg an Protein pro Messung und führen dann zu den beschriebenen Problemen von störenden Percollresten oder Eintrübung des Reaktionsansatzes. Durch den Einsatz der gängigen Proteaseinhibitoren einschließlich des Einsatzes von E64, das nach derzeitigem Wissen alle anderen Cysteinproteasen hemmt, und die Möglichkeit den spezifischen Kompetitor ZAENK zu verwenden, können meines Erachtens trotzdem relativ sichere Messungen gemacht werden. Sind allerdings Messzeiten von mehr als 12 Stunden nötig, um minimale Substratumsätze zu erhalten, ist die Angabe exakter Aktivitäten nicht mehr sinnvoll, kann aber mit Sicherheit noch als Nachweis einer AEP-Aktivität gelten. Mit empfindlicheren Messgeräten dürfte die Nachweisgrenze weiter gesenkt werden können (wobei Störungen wiederum dann noch gravierender zum Tragen kommen!).

Ein Nachweis von AEP in endocytotischen Kompartimenten verschiedener APCs im Immunoblot wäre wünschenswert und könnte evtl. unterschiedliche AEP-Aktivitäten untermauern. Leider war ein in unserem Labor generierter polyklonaler Ak nicht geeignet, um AEP im Immunoblot nachzuweisen.

Mit Hilfe der quantitativen PCR konnte jedoch die unterschiedliche Expression von AEP in verschiedenen APCs demonstriert werden (Dissertation Wolfgang Wienhold, 2000). Direkte Vergleiche aller drei Methoden an gleichem Zellmaterial dürfte die Beurteilung der Zuverlässigkeit von Aktivitätsmessungen wesentlich erleichtern.

7. Zusammenfassung

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die subzelluläre Fraktionierung verschiedener antigen-präsentierender Zellen mit Hilfe von differentieller Zentrifugation, Percolldichtegradienten-Zentrifugation und trägerfreier Elektrophorese. Die Kombination dieser Methoden erlaubte eine Auftrennung in verschiedene endosomale- lysosomale-Kompartimente, die mit fluorogenen Substraten (Cathepsin B, L, S, AEP, NAG), Immunoblot, ELISA und wenn möglich mit HPLC ausführlich charakterisiert wurden.

In isolierten Zellkompartimenten von Keratinozyten wurden die Aktivitäten der Cathepsine B, L und S gemessen. Dabei konnten beachtliche Aktivitätsunterschiede zwischen HaCaT-, primären Keratinozyten im Vergleich zu syngenen B-Zellen gemessen werden. Eine Interferon- γ Stimulation führte bei den Keratinozyten zur Expression von MHC Klasse II-Molekülen und invarianter Kette, sowie zu einer gesteigerten Cathepsin S-Aktivität, während die anderen Cathepsin Aktivitäten nur geringfügig moduliert wurden. Auf RNA-Ebene ergab sich dabei eine stark induzierte Cathepsin S-Information im Vergleich zur Kontrolle. Auf Proteinebene konnte dies bestätigt werden, wobei Cathepsin S nur in stimulierten primären Keratinozyten nachzuweisen war. Bei den HaCaT-Keratinozyten zeigte bereits die nicht stimulierte Kontrolle Cathepsin S, welches nach Stimulation noch verstärkt wurde. Die Hochregulation von Cathepsin S bei gleichzeitiger MHC Klasse II-Expression durch IFN- γ unterstreicht die immunologische Relevanz dieses Enzyms. Da HaCaT-Keratinozyten prinzipiell die gleichen Effekte zeigten, können sie als Modellzelllinie für Untersuchungen der Haut dienen.

Von mit Interferon- γ stimulierten HaCaT-Keratinozyten wurden MHC Klasse I- und II-präsentierte Peptide isoliert und mit Hilfe von HPLC und Massenspektrometrie konnten 15 Peptide analysiert und identifiziert werden.

Als weiterer Schwerpunkt wurde die Asparaginylendopeptidase (AEP) durch Spaltexperimente mit einer selbst synthetisierten Peptidbibliothek näher untersucht. Dazu wurden 20 Hexapeptide mit allen 20 natürlichen Aminosäuren in P1`Position, sowie ein Kontrollpeptid synthetisiert (Austausch von Asn gegen Gln in P1 Position) und mit aus Schweineiere isoliertem AEP verdaut. Die Analyse mit HPLC und Kompetitionsassay ergab eine Spaltung aller Peptide der Bibliothek. Mit Ausnahme des Peptides mit Pro in P1`Position fungierten alle anderen als relativ gute Substrate für AEP, d.h. nur mit Asn an der P1 Position wird hochspezifisch gespalten, während die P1`Position mit allen 20 Aminosäuren besetzt sein kann. In komplexen Proteinen sind die Substratmotive für AEP unbekannt. Im Durchschnitt werden bei Proteinen nur ungefähr zehn Prozent der Asn-Bindungen gespalten. Bei Verdauexperimenten mit Myoglobin, das zwei potentielle AEP-Spaltstellen besitzt, wurde keine Spaltung beobachtet, während beim Wildtyp-Myelin-basischen-Protein mit ebenfalls zwei Spaltstellen bevorzugt eine Position (N92) hydrolysiert wurde. Ein Austausch von N92 gegen Glutamin ergab an dieser Position eine Resistenz gegenüber AEP, während eine Spaltung der N84P-Bindung, bei wesentlich geringerem Substratumsatz (in Übereinstimmung mit den Peptidspaltungen), beobachtet wurde.

Diese Ergebnisse zeigen, dass hinsichtlich der Spaltspezifität von AEP bei Proteinen noch keine allgemeingültigen Aussagen getroffen werden können.

8. Literatur

- Abrahamson M: Cystatins (1994). *Methods Enzymol* 244: 685-700.
- Albanesi C, Cavani A, Girolomini G (1998). Interferon-g-stimulated human keratinocytes express the genes necessary for the production of peptide-loaded MHC class II molecules. *J Invest Dermatol* 110: 138-142.
- Amigorena S, Drake JR, Webster P and Mellman I. (1994) Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. *Nature* 369: 113-120.
- Amigorena S, Webster P, Drake JR, Newcomb JR, Cresswell P and Mellman I. (1995) Invariant chain cleavage and peptide loading in major histocompatibility complex class II vesicles. *J. Exp. Med.* 181: 1729-1741.
- Antoniou AN, Blackwood SL, Mazzeo D, and Watts C. (2000). Control of antigen presentation by a single protease cleavage site. *Immunity* 12, 391-398.
- Arunachalam B, Lamb CA, Cresswell P (1994). Transport properties of free and MHC class II-associated oligomers containing different isoforms of human invariant chain. *Int Immunol.* 6: 439-451.
- Arunachalam B, Phan UT, Geuze HJ, Cresswell P (2000). Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: characterization of a gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). *Proc Natl Acad Sci USA* 97:745-750.
- Authier F, Posner BI, Bergeron JJM (1996). Endosomal proteolysis of internalized proteins. *FEBS Lett* 389: 55-60.
- Baird J, Lazarus GS, Belip D, Vassejli JD, Busso N, Gubler P, Jensen PJ (1990). mRNA for tissue-type plasminogen activator is present in lesional epidermis from patients with psoriasis, pemphigus, or bullous pemphigoid, but is not detected in normal epidermis. *J Invest Dermatol* 95: 548-552.
- Banchereau J, Steinman RM (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252. Review.
- Barrett AJ, Rawlings ND, and Woessner JF (1998). *Handbook of proteolytic enzymes*. Academic press, London, UK.
- Beck H (2000). Untersuchungen zur Prozessierung von Peptid- und Proteinantigenen im Kontext von MHC Klasse II. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Bevec T, Stoka V, Pungercic G, Dolenc I, Turk V (1996). Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L. *J Exp Med.* 183:1331-1338.
- Bikoff EK, Germain RN, Robertson EJ (1995). Allelic differences affecting invariant chain dependency of MHC class II subunit assembly. *Immunity* 2: 301-310.
- Blum JS, Cresswell P (1988). Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 3975-3979.
- Boehncke W-H (1996). Psoriasis and bacterial superantigens - formal or causal correlation? *Trends Microbiol* 4: 485-489.
- Bohley P, Seglen PO (1992). Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia.* 48: 151-157. Review.
- Bohley P, Kirschke H, Langner J and Ansorge S. (1969) Präparative Gewinnung hochgereinigter Lysosomenenzyme aus Rattenlebern. *FEBS Lett.* 5: 233-236.

- Bonnekoh B, Bockelmann R, Ambach A, Gollnick H (2001). Dithranol and dimethylfumarate suppress the interferon-gamma-induced up-regulation of cytokeratin 17 as a putative psoriasis autoantigen in vitro. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 14: 217-225.
- Bos JD, Kapsenberg ML (1986). The skin immune system. *Immunol today* 7: 235-240.
- Boucamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106: 761-771.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bromme D, Li Z, Barnes M, Mehler E (1999). Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potential, enzymatic characterization, and chromosomal localization. *Biochemistry* 38: 2377-2385.
- Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL and Wiley DC. (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364: 33-39.
- Canut H, Bauer J, Weber G (1999). Separation of plant membranes by electromigration techniques. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 722: 121-139. Review.
- Casciola-Rosen LA and Hubbard AL (1991). Hydrolases in intracellular compartments of rat liver cells. Evidence for selective activation and/or delivery. *J. Biol. Chem.* 266: 4341-4347.
- Castellino F, Germain RN (1995). Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. *Immunity* 2: 73-88.
- Castellino F, Zappacosta F, Coligan JE and Germain RN (1998). Large protein fragments as substrates for endocytic antigen capture by MHC class II molecules. *J. Immunol.* 161: 4048-4057.
- Cepellini R, Mattinz PL, Scudeller G and Viseti M (1969). Experimental allotransplantation in man. *Transplant. Proc.* 1: 385-389.
- Chapman HA (1998). Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Curr Opin Immunol.* 10: 93-102. Review.
- Chapman HA, Riese RJ, Shi GP (1997). Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol.* 59: 63-88. Review.
- Chen SH, Arany I, Apisarnthanarax N, Rajaraman S, Tyring SK, Horikoshi T, Brysk H, Brysk MM (2000). Response of keratinocytes from normal and psoriatic epidermis to interferon-gamma differs in the expression of zinc-alpha(2)-glycoprotein and cathepsin D. *FASEB J.* 14: 565-571.
- Chen JM, Dando PM, Rawlings ND, Brown MA, Young NE, Stevens RA, Hewitt E, Watts C and Barrett AJ (1997). Cloning, Isolation and Characterization of Mammalian Legumain, an Asparaginyl Endopeptidase. *J. Biol. Chem.* 272, 8090-8098.
- Chestnut RW, Grey HM and Colon SM (1982). Antigen presentation by normal B cells, B cell tumors and macrophages: function and biochemical comparison. *J. Immunol.* 128: 779-788.
- Cho SG, Attaya M, Monaco JJ (1991). New class II-like genes in the murine MHC. *Nature* 353:573-576.
- Choi SJ, Reddy SV, Devlin RD, Menea C, Chung H, Boyce BF, Roodman GD (1999). Identification of human asparaginyl endopeptidase (legumain) as an inhibitor of osteoclast formation and bone resorption. *J. Biol. Chem.* 274(39):27747-53.
- Cresswell P (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 259-293.

- Crowley M, Inaba K and Steinman RM (1990). Dendritic cells are the principal cells in mouse spleen bearing immunologic fragments of foreign proteins. *J. Exp. Med.* 172: 383-389.
- Dahl SW, Halkier T, Lauritzen C, Dolenc I, Pedersen J, Turk V, Turk B (2001). Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing. *Biochemistry* 40: 1671-1678.
- Dando, P.M., Fortunato, M., Smith, L., Knight, C.G., McKendrick, J.E., and Barrett, A.J. (1999). Pig kidney legumain: an asparaginyl endopeptidase with restricted specificity. *Biochem. J.* 339, 743-749.
- Dausset, J. (1954) Leuco-agglutinins. *Vox Sang.* 4: 190-198.
- de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F. (1955) Tissue fractionation studies 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* 60: 604-617.
- Denzin LK, Robbins NF, Carboy-Newcomb C, Cresswell P (1994). Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* 1: 595-606.
- Deussing J, Roth W, Saftig P, Peters C, Ploegh HL, Villadangos JA (1998). Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4516-4521.
- Diment S (1990). Different roles for thiol and aspartyl proteases in antigen presentation of ovalbumin. *J Immunol* 145: 417-422.
- Driessen C, Bryant RA, Lennon-Dumenil AM, Villadangos JA, Bryant PW, Shi GP, Chapman HA, Ploegh HL (1999). Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells. *J Cell Biol.* 147: 775-790.
- Elliott EA, Drake JR, Amigorena S, Elsemore J, Webster P, Mellman I, Flavell RA (1994). The invariant chain is required for intracellular transport and function of major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med.* 179 :681-694.
- Fiebiger E, Meraner P, Weber E, Fang IF, Stingl G, Ploegh H, Maurer D (2001). Cytokines regulate proteolysis in major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by dendritic cells. *J Exp Med.* 193: 881-892.
- Fineschi B, Miller J (1997). Endosomal proteases and antigen processing. *TIBS* 22: 377-382.
- Fontana, A., Fierz, W. and Weckerle, H. (1984) Astrocytes present myelin basic protein to encephalogenic T-cells. *Nature* 307: 273-275.
- Fuchs, R., Male, P. and Mellman, I. (1989) Acidification and ion permeabilities of highly purified rat liver endosomes. *J. Biol. Chem.* 264: 2212-2220.
- Gainey D, Short S, McCoy KL (1996). Intracellular location of cysteine transport activity correlates with productive processing of antigen disulfide. *J Cell Physiol.* 168: 248-254.
- Gelb BD, Moissoglu K, Zhang J, Martignetti JA, Bromme D, Desnick RJ (1996). Cathepsin K: isolation and characterization of the murine cDNA and genomic sequence, the homologue of the human pycnodysostosis gene. *Biochem Mol Med.* 59: 200-206.
- Germain RN (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76: 287-299.
- Germain, R.N. and Margulies, D.H. (1993) The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 403-450.
- Gershoni, J.M. and Palade, C.E. (1983) Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochem.* 131: 1-5.

- Ghosh P, Amaya M, Mellins E, Wiley DC (1995). The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 378: 457-462.
- Gottlieb AB, Lifshitz B, Fu SM, Staiano-Coico L, Wang CY, Carter DM (1986). Expression of HLA-DR molecules by keratinocytes, and presence of Langerhans cells in the dermal infiltrate of active psoriatic plaques. *J Exp Med* 164: 1013-1028.
- Guncar G, Pungercic G, Klemencic I, Turk V, Turk D (1999). Crystal structure of MHC class II-associated p41 Ii fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. *EMBO J.* 18: 793-803.
- Hanada K, Tamai M, Ohmura S, Sawada J, Seki T, Tanaka I (1978). Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* 42: 523-528.
- Hara-Nishimura, I., Shimada, T., Hiraiwa, N., and Nishimura, M. (1995). Vacuolar processing enzyme responsible for maturation of seed proteins. *J. Plant Physiol.* 145, 632-640.
- Hunt DF, Michel H, Dickinson TA, Shabanowitz J, Cox AL, Sakaguchi K, Apelle E, Grey HM and Sette A (1992). Peptides presented to the immune system by the murine class II histocompatibility complex molecule I-Ad. *Science* 256: 1817-1820.
- Ishii SI (1994). Legumain: Asparaginyl endopeptidase. *Methods Enzymol.* 244, 604-615.
- Jackson M, Howie SE, Weller R, Sabin E, Hunter JA, McKenzie RC (1999). Psoriatic keratinocytes show reduced IRF-1 and STAT-1alpha activation in response to gamma-IFN. *FASEB J.* 13: 495-502.
- Janeway Travers (1999). *Immunobiology*, 4th edition.
- Jensen PE (1998). Antigen processing: HLA-DO--a hitchhiking inhibitor of HLA-DM. *Curr Biol.* 8: 128-131. Review.
- Jung, R., Scott, M.P., Nam, Y.W., Beaman, T.W., Bassuner, R., Saalbach, I., Muntz, K., and Nielsen, N.C., (1998). The role of proteolysis in the processing and assembly of 11s seed globulins. *Plant Cell* 10, 343-357.
- Kasper D, Dittmer F, von Figura K, Pohlmann R (1996). Neither type of mannose 6-phosphate receptor is sufficient for targeting of lysosomal enzymes along intracellular routes. *J Cell Biol.* 134: 615-623.
- Kawada A, Hara K, Kominami E, Hiruma M, Noguchi H, Ishibashi A (1997). Processing of cathepsins L, B and D in psoriatic epidermis. *Arch Dermatol Res* 289: 87-93.
- Kembhavi AA, Buttle DJ, Knight CG, Barrett AJ (1993). The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific fluorometric assays. *Arch Biochem Biophys.* 303: 208-213.
- Kerr L-AP, Navsaria HA, Barker JNWN, Sakkas LI, Leigh IM, Mac Donald DM, Welsh KI (1990). Interferon-gamma activates co-ordinate transcription of HLA-DR, DQ, and DP genes in cultured keratinocytes and requires de novo protein synthesis. *J Invest Dermatol* 95: 653-656.
- Kirschke H, Schmidt I, Wiederanders B: Cathepsin S (1986). The cysteine proteinase from bovine lymphoid tissue is distinct from cathepsin L (EC 3.4.22.15). *Biochem J* 240: 455-459.
- Kirschke H, Wiederanders B, Brömme D, Rinne A (1989). Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochem J* 264: 467-473.
- Klemencic I, Carmona AK, Cezari MH, Juliano MA, Juliano L, Guncar G, Turk D, Krizaj I, Turk V, Turk B (2000). Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase. *Eur J Biochem.* 267: 5404-5412.

- Klohe EH, Watts R, Bahl M, Alber C, Yu WY, Anderson R, Silver J, Gregersen PK, Karr RW (1988). Analysis of the molecular specificities of anti-class II monoclonal antibodies by using L cell transfectants expressing HLA class II molecules. *J. Immunol.* 141: 2158-2164.
- Koch N (1988). Posttranslational modifications of the Ia-associated invariant protein p41 after gene transfer. *Biochemistry.* 27: 4097-4102.
- Kolenko V, Wang Q, Riedy MC, O'Shea J, Ritz J, Cathcart MK, Rayman P, Tubbs R, Edinger M, Novick A, Bukowski R, Finke J (1997). Tumor-induced suppression of T lymphocyte proliferation coincides with inhibition of Jak3 expression and IL-2 receptor signaling: role of soluble products from human renal cell carcinomas. *J Immunol.* 159: 3057-3067.
- Kvist S, Wiman K, Claesson L, Peterson PA, Dobberstein B (1982). Membrane insertion and oligomeric assembly of HLA-DR histocompatibility antigens. *Cell* 29: 61-69.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-695.
- Lenarcic B, Bevec T (1998). Thyropins--new structurally related proteinase inhibitors. *Biol Chem.* 379: 105-111. Review.
- Li Z, Menoret A, Srivastava P (2002). Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr Opin Immunol.* 14: 45-51. Review.
- Liljedahl M, Winqvist O, Surh CD, Wong P, Ngo K, Teyton L, Peterson PA, Brunmark A, Rudensky AY, Fung-Leung WP, Karlsson L (1998). Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity* 8: 233-243.
- Lingeman RG, Joy DS, Sherman MA, Kane SE (1998). Effect of carbohydrate position on lysosomal transport of procathepsin L. *Mol Biol Cell* 9: 1135-1147.
- Luboldt HJ, Kubens BS, Rubben H, Grosse-Wilde H (1996). Selective loss of human leukocyte antigen class I allele expression in advanced renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 56: 826-830.
- Machamer CE, Cresswell P (1982). Biosynthesis and glycosylation of the invariant chain associated with HLA-DR antigens. *J Immunol* 129: 2564-2569.
- Manoury, B., Hewitt, E., Morrice, N., Dando, P.M., Barrett A.J., and Watts, C. (1998). An aspariginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation. *Nature* 396, 695-699.
- Maric M, Arunachalam B, Phan UT, Dong C, Garrett WS, Cannon KS, Alfonso C, Karlsson L, Flavell RA, Cresswell P (2001). Defective antigen processing in GILT-free mice. *Science* 294: 1361-1365.
- Maric MA, Taylor MD, Blum JS (1994). Endosomal aspartic proteinases are required for invariant-chain processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2171-2175.
- Marsh M, Schmid SL, Kern H, Harms E, Male P, Mellman I and Helenius A (1987). Rapid analytical and preparative isolation of functional endosomes by free flow electrophoresis. *J. Cell Biol.* 104: 875-886.
- Matsunaga Y, Saibara T, Kido H, Katunuma N (1993). Participation of cathepsin B in processing of antigen presentation to MHC class II. *FEBS Lett* 324: 325-330.
- Max H, Halder T, Kalbus M, Gnau V, Jung G, Kalbacher H (1993). Charakterization of peptides bound to extracellular and intracellular HLA-DR1 molecules. *Hum. Immunol.* 38: 193-200.
- McKnight AJ, Mason DW, Barclay AN (1989). Sequence of a rat MHC class II-associated invariant chain cDNA clone containing a 64 amino acid thyroglobulin-like domain. *Nucleic Acids Res.* 17 (10): 3983-4.
- Meier F, Nebit M, Hsu MY, Martin B, Van Belle P, Elder DE, Schaumburg-Lever G, Garbe C, Walz TM, Donatien P, Crombleholme TM, Herlyn M (2000). Human Melanoma Progression in Skin Reconstructs. *Am J Path* 156: 193-200.

- Mellman I, Steinman RM (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106: 255-258. Review.
- Miyazaki T, Wolf P, Tourne S, Waltzinger C, Dierich A, Barois N, Ploegh H, Benoist C, Mathis D (1996). Mice lacking H2-M complexes, enigmatic elements of the MHC class II peptide-loading pathway. *Cell* 84: 531-541.
- Morita T, Kato H, Iwanaga S, Takada K, Kimura T, Sakakibara S (1977). New fluorogenic substrates for a-thrombin, factor Xa, kallikreins and urokinase. *J Biochem* 82: 1495-1498.
- Mosyak L, Zaller DM, Wiley DC (1998). The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity* 9: 377-383.
- Nägler DK, Zhang R, Tam W, Sulea T, Purisima EO, Menard R (1999). Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochemistry* 38: 12648-12654.
- Nakagawa T, Roth W, Wong P, Nelson A, Farr A, Deussing J, Villadangos JA, Ploegh H, Peters C, Rudensky AY (1998). Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* 280: 450-453.
- Nakagawa TY, Brissette WH, Lira PD, Griffiths RJ, Petrushova N, Stock J, McNeish JD, Eastman SE, Howard ED, Clarke SR, Rosloniec EF, Elliott EA, Rudensky AY (1999). Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* 10: 207-217.
- Nakagawa TY, Rudensky AY (1999). The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol Rev* 172: 121-129.
- Neefjes JJ, Stollorz V, Peters PJ, Geuze HJ, Ploegh HL (1990). The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell* 61: 171-183.
- Neefjes JJ (1999). CIIV, MIIC and other compartments for MHC class II loading. *Eur. J. Immunol.* 29: 1421-1425.
- Nickoloff BJ (1999). Skin innate immune system in psoriasis: friend or foe? *J Clin Invest.* 104: 1161-1164. Review.
- Nickoloff BJ, Turka LA (1994). Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol today* 15: 464-469.
- Nishimura Y, Kato K (1987). Intracellular transport and processing of lysosomal cathepsin B. *Biochem Biophys Res Commun.* 148: 254-259.
- Odorizzi CG, Trowbridge IS, Xue L, Hopkins CR, Davis CD, Collawn JF (1994). Sorting signals in the MHC class II invariant chain cytoplasmic tail and transmembrane region determine trafficking to an endocytic processing compartment. *J Cell Biol.* 126 :317-330.
- Okamoto T, Minamikawa T (1999). Molecular cloning and characterization of Vigna mungo processing enzyme 1 (VmPE-1), an asparaginyl endopeptidase possibly involved in post-translational processing of a vacuolar cysteine endopeptidase (SH-EP). *Plant Mol Biol.* 39: 63-73.
- O'Sullivan DM, Noonan D, Quaranta V (1987). Four Ia invariant chain forms derive from a single gene by alternate splicing and alternate initiation of transcription/translation. *J Exp Med.* 166 (2): 444-60.
- Palmer JT, Rasnick D, Klaus JL, Brömme D (1995). Vinyl sulfones as mechanism-based cysteine protease inhibitors. *J Med Chem* 38: 3193-3196.
- Park RD, Sullivan PC and Storrie B (1988). Hypertonic sucrose inhibition of endocytic transport suggests multiple early endocytic compartments. *J. Cell. Physiol.* 135: 443-450.
- Paul WE, Seder RA (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76: 214-251.

- Phan UT, Arunachalam B, Cresswell P. Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT) (2000). Maturation, activity, and mechanism of action. *J Biol Chem.* 275: 25907-25914.
- Pierre P, Mellman I (1998). Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell* 93: 1135-1145.
- Piskurich JF, Linhoff MW, Wang Y, Ting JP (1999). Two distinct gamma interferon-inducible promoters of the major histocompatibility complex class II transactivator gene are differentially regulated by STAT1, interferon regulatory factor 1, and transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol.* 19: 431-440.
- Pisoni RL, Acker TL, Lisowski KM, Lemons RM, Thoene JG (1990). A cysteine-specific lysosomal transport system provides a major route for the delivery of thiol to human fibroblast lysosomes: possible role in supporting lysosomal proteolysis. *J Cell Biol.* 110: 327-335.
- Plüger EB, Boes M, Alfonso C, Schroter CJ, Kalbacher H, Ploegh HL, Driessen C (2002). Specific role for cathepsin S in the generation of antigenic peptides in vivo. *Eur J Immunol.* 32: 467-476.
- Prinz J-C, Vollmer S, Boehncke W-H, Menssen A, Laisney I, Trommler P (1999). Selection of conserved TCR-VDJ-rearrangements in chronic psoriatic plaques indicates a common antigen in psoriasis vulgaris. *Eur J Immunol* 29:3360-3368.
- Qian F, Frankfater A, Chan SJ, Steiner DF (1991). The structure of the mouse cathepsin B gene and its putative promoter. *DNA Cell Biol.* 10: 159-168.
- Rammensee HG, Falk K, Rotzschke O (1993). MHC molecules as peptide receptors. *Curr Opin Immunol.* Feb;5(1): 35-44. Review.
- Rammensee HG, Bachmann J and Stefanovic' S (1997). MHC ligands and peptide motifs. Landes Bioscience Publishers, Austin, Texas.
- Rawlings ND, O'Brien E, Barrett AJ (2002). MEROPS: the protease database. *Nucleic Acids Res.* 30: 343-346.
- Rheinwald JG, Green H (1975). Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell* 6: 331-344.
- Riese JR, Wolf PR, Brömme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL, Chapman HA (1996). Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 4: 357-366.
- Riese RJ, Chapman HA (2000). Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr Opin Immunol.* 12: 107-113. Review.
- Riese RJ, Mitchell RN, Villadangos JA, Shi GP, Palmer JT, Karp ER, De Sanctis GT, Ploegh HL, Chapman HA (1998). Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *J Clin Invest.* 101: 2351-2363.
- Ritz U, Momburg F, Pilch H, Huber C, Maeurer MJ, Seliger B (2001). Deficient expression of components of the MHC class I antigen processing machinery in human cervical carcinoma. *Int J Oncol.* 19: 1211-1120.
- Roche PA, Cresswell P (1991). Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 :3150-3154.
- Rotari, V.I., Dando, P.M., Barrett, A.J. (2001). Legumain forms from plants and animals differ in their specificity. *Biol. Chem.* 382(6): 953-9.
- Roth W, Deussing J, Botchkarev VA, Pauly-Evers M, Saftig P, Hafner A, Schmidt P, Schmahl W, Scherer J, Anton-Lamprecht I, Von Figura K, Paus R, Peters C (2000). Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J.* 14: 2075-2086.

- Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, al-Ramadi BK, Rothbart J, Janeway CA Jr. (1992). Truncation variants of peptides isolated from MHC class II molecules suggest sequence motifs. *Nature* 358: 764-778.
- Saftig P, Hunziker E, Everts V, Jones S, Boyde A, Wehmeyer O, Suter A, von Figura K (2000). Functions of cathepsin K in bone resorption. Lessons from cathepsin K deficient mice. *Adv Exp Med Biol.* 477: 293-303.
- Schaff WT, Hruska KA Jr, McCourt DW, Green M, Schwartz BD (1992). HLA-DR associates with specific stress proteins and is retained in the endoplasmic reticulum in invariant chain negative cells. *J Exp Med.* 176(3): 657-66.
- Schmid H, Koop M, Utermann S, Lambacher L, Mayer P, Schaefer L (1997). Specific catalytic activity of cathepsin S in comparison to cathepsins B and L along the rat nephron. *Biol Chem* 378: 61-69.
- Schmid H, Lindmeier I, Schmitt H, Eissele R, Neuhaus G, Wehrmann M (1993). Nephrotoxicity of cyclosporin A in the rat: II. Reversible changes in intranephronal and urinary activities of N-acetyl- β -D-glucosaminidase. *Renal Physiol Biochem* 16: 222-232.
- Schmid SL, Fuchs R, Male P and Mellman I (1988). Two distinct subpopulations of endosomes involved in membrane recycling and transport to lysosomes. *Cell* 52: 73-83.
- Schmidtke JR and Unanue ER (1972). Macrophage-antigen interaction: uptake, metabolism and immunogenicity of foreign albumin. *J. Immunol.* 107: 331-345.
- Schreiber J, Stahn R, Schenk JA, Karsten U, Pecher G (2000). Binding of tumor antigen mucin (MUC1) derived peptides to the heat shock protein DnaK. *Anticancer Res.* 20: 3093-3098.
- Schreiber KL, Bell MP, Huntoon CJ, Rajagopalan S, Brenner MB, McKean DJ (1994). Class II histocompatibility molecules associate with calnexin during assembly in the endoplasmic reticulum. *Int Immunol.* 6(1):101-111.
- Schröter JC (1999). Die Rolle endosomal-lysosomaler Proteasen bei der Prozessierung MHC Klasse II-präsentierter Antigene. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Schröter, C.J., Braun, M., Englert, J., Beck, H., Schmid, H. and Kalbacher, H. (1999). A rapid method to separate endosomes from lysosomal contents using differential centrifugation and hypotonic lysis of lysosomes. *J. Immunol. Meth.* 227: 161-168.
- Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S (2000). Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today* 21: 455-464. Review.
- Shackelford DA, Kaufman JF, Korman AJ and Strominger JL (1982). HLA-DR antigens: structure, separation of subpopulations, gene cloning and function. *Immunol. Rev.* 66: 133-187.
- Shi GP, Bryant RA, Riese R, Verhelst S, Driessen C, Li Z, Bromme D, Ploegh HL, Chapman HA (2000). Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages. *J Exp Med.* 191: 1177-1186.
- Shi GP, Villadangos JA, Dranoff G, Small C, Gu L, Haley KJ, Riese R, Ploegh HL, Chapman HA (1999). Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* 10: 197-206.
- Shi G-P, Webb AC, Foster KE, Knoll JHM, Lemere CA, Munger JS, Chapman HA (1994). Human cathepsin S: chromosomal localization, gene structure, and tissue distribution. *J Biol Chem* 269: 11530-11536.
- Shutov, A.D., and Vaintraub, I.A. (1987). Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry* 26, 1557-1566.
- Singh-Jasuja H, Hilf N, Arnold-Schild D, Schild H (2001). The role of heat shock proteins and their receptors in the activation of the immune system. *Biol Chem.* 382: 629-636. Review.

- Sloan VS, Cameron P, Porter G, Gammon M, Amaya M, Mellins E, Zaller DM (1995). Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* 375: 802-806.
- Stebbins CC, Loss GE Jr, Elias CG, Chervonsky A, Sant AJ (1995). The requirement for DM in class II-restricted antigen presentation and SDS-stable dimer formation is allele and species dependent. *J Exp Med.* 181: 223-234.
- Steimle V, Otten JA, Zufferey M and Mach B (1993). Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* 75: 135-146.
- Stingl G, Katz SI, Clement L, Green I and Shevach EM (1978). Immunologic function of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. *J. Immunol.* 121: 2005-2013.
- Stoltze L, Schirle M, Schwarz G, Schröter C, Thompson MW, Hersh LB, Kalbacher H, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H, (2000). Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nature Immunol.* 1, 413-418.
- Szabo SK, Hammerberg C, Yoshida Y, Bata-Csorgo Z, Cooper KD (1998). Identification and quantification of interferon-g producing T cells in psoriatic lesions: localization to both CD4+ and CD8+ subsets. *J Invest Dermatol* 111: 1072-1078.
- Takahashi H, Cease KB, Berzofsky JA (1989). Identification of proteases that process distinct epitopes on the same protein. *J Immunol* 142: 2221-2229.
- Teyton L, O'Sullivan D, Dickson PW, Lotteau V, Sette A, Fink P, Peterson PA (1990). Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature* 348: 39-44.
- Towatari T, Nikawa T, Murata M, Yokoo C, Tamai M, Hanada K, Katunuma N (1991). Novel epoxysuccinyl peptides. A selective inhibitor of cathepsin B in vivo. *FEBS Lett.* 280: 311-315.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4356.
- Townsend A, Bodmer H (1989). Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 7: 601-24. Review.
- Travers JB, Hamid QA, Norris DA, Kuhn C, Giorno RC, Schlievert PM, Farmer ER, Leung DY (1999). Epidermal HLA-DR and the enhancement of cutaneous reactivity to superantigenic toxins in psoriasis. *J Clin Invest.* 104: 1181-1189.
- Trowsdale J (1993). Genomic structure and function in the MHC. *Trends Genet.* 9: 117-122.
- Turk B, Dolenc I, Lenarcic B, Krizaj I, Turk V, Bieth JG, Bjork I (1999). Acidic pH as a physiological regulator of human cathepsin L activity. *Eur J Biochem.* 259: 926-932.
- Turk B, Turk V, Turk D (1997). Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol Chem.* 378: 141-150. Review.
- Ullrich HJ, Doring K, Gruneberg U, Jahnig F, Trowsdale J, van Ham SM (1997). Interaction between HLA-DM and HLA-DR involves regions that undergo conformational changes at lysosomal pH. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13163-13168.
- Unanue ER and Askonas BA (1968). Persistence of immunogenicity of antigen after uptake by macrophages. *J. Exp. Med.* 127: 915-923.
- Van Ham SM, Tjin EP, Lillemeier BF, Gruneberg U, van Meijgaarden KE, Pastoors L, Verwoerd D, Tulp A, Canas B, Rahman D, Ottenhoff TH, Pappin DJ, Trowsdale J, Neeffjes J (1997). HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr Biol.* 7: 950-957.
- Van Noort JM, van der Drift ACM (1989). The selectivity of cathepsin D suggests an involvement of the enzyme in the generation of T-cell epitopes. *J Biol Chem* 264: 14159-14164.

- Van Noort, J.M., Boon, J., Van der Drift, A.C.M., Wagenaar, J.P.A., Boots, A.M.H., and Boog, J.P.G. (1991). Antigen processing by endosomal proteases determines which sites of sperm-whale myoglobin are eventually recognized by T cells. *Eur. J. Immunol.* 21 1989-1996.
- Vasioukhin V, Bowers E, Bauer C, Degenstein L, Fuchs E (2001). Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation. *Nat Cell Biol* 3: 1076-1085.
- Villadangos JA, Bryant RAR, Deussing J, Driessen C, Lennon-Dumenil A-M, Riese RJ, Roth W, Saftig P, Shi G-P, Chapman HA, Peters C, Ploegh HL (1999). Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev* 172: 109-120.
- Villadangos JA, Cardoso M, Steptoe RJ, van Berkel D, Pooley J, Carbone FR, Shortman K (2001). MHC class II expression is regulated in dendritic cells independently of invariant chain degradation. *Immunity* 14: 739-749.
- Villadangos JA, Riese RJ, Peters C, Chapman HA, Ploegh HL (1997). Degradation of mouse invariant chain: roles of cathepsins S and D and the influence of major histocompatibility complex polymorphism. *J Exp Med* 186: 549-560.
- Watts C (2001). Antigen processing in the endocytic compartment. *Curr Opin Immunol.* 13: 26-31. Review.
- Weber G, Bauer J (1998). Counterbalancing hydrodynamic sample distortion effects increases resolution of free-flow zone electrophoresis. *Electrophoresis* 19: 1104-1109.
- Weber G, Grimm D, Bauer J (2000). Application of binary buffer systems to free flow cell electrophoresis. *Electrophoresis* 21: 325-328.
- Weber G (1997). Bedienungsanleitung: OCTOPUS - universal - modular. Benutzerhandbuch, Dr. Weber GmbH, Kirchheim-Heimstetten.
- Wex T, Levy B, Wex H, Bromme D (1999). Human cathepsins F and W: A new subgroup of cathepsins. *Biochem Biophys Res Commun.* 259: 401-407.
- Wiedow O, Wiese F, Streit V, Kalm C, Christophers E (1992). Lesional elastase activity in psoriasis, contact dermatitis and atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 99: 306-309.
- Wienhold W (2000). Molekulare Analyse der MHC Klasse II-Antigenprozessierung und strukturelle Untersuchungen zur Antigenerkennung durch CD4+ T-Zellen im humanen Immunsystem. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Ziegler A, Heinig J, Müller CA, Götz H, Thinnes FP, Uchanska-Ziegler B, Wernet P (1986). Analysis by sequential immunoprecipitation of the specificities of the monoclonal antibodies TÛ22, 34, 36, 37, 39, 43, 58 and YD1/63.HLK directed against human class II antigens. *Immunobiol.* 171: 77-92.
- Zinkernagel RM and Doherty PC (1974). Restriction of in vitro T-cell mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngenic or semi-allogenic system. *Nature* 248: 701-705.

9. Veröffentlichungen

9.1. Publikationen

Schwarz G, Brandenburg J, Reich M, Burster T, Driessen C and Kalbacher H (2002). Characterisation of Legumain. Biol. Chem. in press.

Schwarz G, Boehncke WH, Braun M, Schröter CJ, Burster T, Flad T, Dressel D, Weber E, Schmid H, and Kalbacher H (2002). Cathepsin S activity is detectable in human keratinocytes and is selectively upregulated upon stimulation with interferon- γ . J. Invest. Dermatol. in press.

Schmid H, Sauerbrei R, Schwarz G, Weber E, Kalbacher H, and Driessen C (2002). Modulation of endosomal and lysosomal distribution of cathepsins B, L and S in human monocytes/macrophages. Biol. Chem. in press.

Stoltze L, Schirle M, Schwarz G, Schröter C, Thompson MW, Hersh LB, Kalbacher H, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H, (2000). Two new proteases in the MHC class I processing pathway. Nature Immunol. 1, 413-418.

9.2. Vorträge auf internationalen Kongressen

2nd General Meeting of the International Proteolysis Society (IPS), Freising 31. Okt- 4. Nov. 2001. Titel: *Characterisation of Asparaginylendopeptidase (AEP)*

9.3. Abstracts und Poster

Schwarz G, Braun M, Boehncke WH, Schröter CJ, Beck H, Kalbacher H and Schmid H. Analysis of cathepsins B, L and S in human keratinocytes facultatively expressing MHC class II molecules, Biol. Chem. 380: S195; Herbsttagung der GBM, Hamburg 5.-8. September 1999.

Schröter CJ, Beck H, Schwarz G, Weber E, Schmid H, Stefanovic S and Kalbacher H: A destructive role of endosomal-lysosomal proteases in processing of the model antigens MBP and HEL for MHC class II presentation. General Meeting of the International Proteolysis Society, Mackinac Island, USA, 25.-30. September 1999.

Schmid H, Günter C, Schwarz G, Dartsch PC: Sodium monochloroacetate (SMCA) causes cytotoxic effects and a preferential decrease of cathepsin B activity in human kidney cells. Abstracts of the First General Meeting of the International Proteolysis Society, Mackinac Island, USA, 25.-30. September 1999.

Sauerbrei R, Driessen C, Schwarz G, Weber E, Kalbacher H, Schmid H: Modulation of endosomal and lysosomal distribution of cathepsins B, L and S in human monocytes/macrophages. Abstracts of the 2nd General Meeting of the International Proteolysis Society (IPS) and the International Conference on Proteinase Inhibitors (ICPI), October 31st-November 4th, 2001, Freising, Germany, Abstract No. p56.

10. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Bayer, Bisswanger, Bock, Bohley, Breyer-Pfaff, Büsen, Duszenko, Eisele, Gauglitz, Günzl, Gebhardt, Hagenmaier, Hamprecht, Hanack, Jung, Kalbacher, Lindner, Mayer, Mecke, Metzner, Nakel, Oberhammer, Oelkrug, Pfeiffer, Pommer, Probst, Rammensee, Reutter, Schmid, Schwarz, Staudt, Stegmann, Strähle, Voelter, Weser, Wiesinger

Lebenslauf

geboren	Gerold Schwarz, am 15. 02. 1968 in Meßkirch (Landkreis Sigmaringen)
1974 – 1978	Grundschule Rohrdorf/Meßkirch
1978 – 1987	Martin Heidegger Gymnasium Meßkirch
1987 – 1990	Ausbildung zum Chemielaboranten an der Chemischen Landesuntersuchungsanstalt Sigmaringen (CLUA)
Juli 90 – Juni 91	Berufstätigkeit an der CLUA Sigmaringen
Juli 91 – Juni 92	Grundwehrdienst
April 92 – Juni 98	Studium der Biochemie an der Universität Tübingen Hauptfächer: Biochemie und Toxikologie Nebenfach: Analytische Chemie
Nov. 97 – Juni 98	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. H. P. Rodemann an der Radiologischen Klinik, Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, Universität Tübingen. <i>Thema: Radioprotektive und antikanzerogene Eigenschaft des Bowman- Birk Protease Inhibitors auf murine und humane Keratinoblasten in vitro.</i>
Sept. 98 – März 02	Promotion unter Anleitung von Dr. Hubert Kalbacher/ Prof. Dr. Dieter Mecke im Med. Nat. Forschungszentrum der Universität Tübingen im Rahmen des DFG-Projektes „Identifizierung HLA gebundener Peptide bei psoriasis vulgaris“ und des SFB 510 „Stammzellbiologie und Antigenprozessierung“. <i>Titel: Untersuchungen zur Bedeutung endosomal/lysosomaler Proteasen in subzellulären Kompartimenten antigenpräsentierender Zellen.</i>