

**Einsatz synthetischer Affinitätsverbindungen  
zur Analyse der MHC Klasse II-assoziierten  
Antigenprozessierung**

**Dissertation**

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2006

vorgelegt von  
Michael Reich



Tag der mündlichen Prüfung: 19. September 2006

Dekan: Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Probst

2. Berichterstatter: PD C. Driessen



Meiner Familie

*It's better to burn out*

*Than to fade away*

*Neil Young (1979)*



## Danksagungen

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei PD Christoph Driessen für die äußerst interessante Themenstellung, die sehr guten Arbeitsbedingungen und für das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Durch sein immerwährendes Interesse, seine überaus hilfreichen Ideen und durch die mir gewährten wissenschaftlichen Freiheiten wurde die Durchführung dieser Arbeit erst ermöglicht.

Bei Dr. Hubert Kalbacher bedanke ich mich besonders für seine unermüdliche Unterstützung, seine Kooperationsbereitschaft und seine immer hilfreichen Gespräche.

Weiterhin gebührt mein Dank Prof. Dr. Hansgeorg Probst für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Herzlich möchte ich mich bei Dr. Jens Brandenburg für die sehr freundschaftliche und produktive Zusammenarbeit bedanken.

Allen meinen Kolleginnen und Kollegen im Arbeitskreis Driessen, Dr. Timo Burster, Diplombiologin Marianne Kraus, Dr. Alfred Lautwein, Diplombiochemiker Thomas Rückrich, Jeanette Gogel, PhD Vinod Sommandas und Sarah Bodner bin ich zu großem Dank verpflichtet, denn ohne ihre Hilfsbereitschaft wären Teile dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Außerdem gilt mein Dank für ihre bereitwillige Zusammenarbeit Dr. Gerold Schwarz, Elke Malenke, Alexander Cansier, Daniel Bächle, Jürgen Beck, Andreas Dittmar und Florian Kramer.

Bei Prof. Herman Overkleeft, Paul van Swieten, Dr. Michiel Leeuwenburgh, Rian van den Nieuwendijk, Prof. Gijs van der Marel und Prof. Jacques van Boom bedanke ich mich sehr herzlich für ihre freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft während meiner Zeit in Leiden.

Unseren zahlreichen Kooperationspartnern der Universität Tübingen gebührt selbstverständlich besonderer Dank, da durch ihr Entgegenkommen und die fruchtbare Zusammenarbeit Teile dieser Arbeit erst ermöglicht wurden: Diplombiologie Tobias Kessler, Dr. Susanne Riegler und Prof. Gerhard Jahn vom virologischen Institut; Dr. Rainer Fischer und Prof. Roland Brock vom Institut für Zellbiologie; Diplomchemikerin Stella Erfurth, Dani Gunst und Prof. Ingo B. Autenrieth vom Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene; PD Eva Tolosa und Simone Pöschel, PD Robert Weissert, Dr. Nicolas Fissolo und Dr. Bernhard Greve vom Hertie-Institut; Diplombiochemiker Jörn Dengjel und Prof. Stefan Stevanović vom Institut für Immunologie und Zellbiologie; und Dr. Alexander Beck.

Weiterhin gehört mein Dank Frau Prof. Claudia Müller und PD Heide Schmid; ferner der Arbeitsgruppe Brossart und der Blutbank für die Bereitsstellung von Blutkonserven.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Angelika Stähle und Lothar Eiche für ihre allseits bereitwillige Hilfe in Alltagssituationen.

Dem IZKF Tübingen danke ich für die finanzielle Unterstützung während dieser Dissertation.

Zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank Nilgün Artunç für die bereitwillige Durchsicht dieser Arbeit.





# Inhaltsverzeichnis

<b>Verzeichnis der Abkürzungen.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einführung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Immunsystem - natürliche und adaptive Immunität .....	1
1.2 Antigenpräsentierende Zellen .....	1
1.3 MHC Klasse I und MHC Klasse II .....	3
1.4 MHC Klasse I-vermittelte Antigenpräsentation.....	4
1.5 MHC Klasse II-vermittelte Antigenpräsentation .....	4
1.6 Das endozytische Kompartiment in APC.....	6
1.6.1 Proteasen im endozytischen Kompartiment in APC .....	7
1.6.2 Endozytische Proteasen und die Prozessierung von MHC Klasse II-Molekülen....	8
1.6.3 Die Antigeninternalisierung .....	9
1.6.4 <i>Cross presentation</i> versus Autophagie.....	12
1.6.5 Endozytische Proteasen und Antigenprozessierung.....	13
1.7 Reifung Dendritischer Zellen .....	15
1.8 Autoimmunität - Grundlagen MHC II-assoziiierter Autoimmunerkrankungen.....	16
1.9 Immunevasion .....	17
1.10 Proteaseninhibitoren und ihre Anwendung als analytische Werkzeuge .....	18
1.11 Zellpenetrierende Peptide.....	21
1.12 Proteasen als Ziel therapeutischer Intervention bei Autoimmunerkrankungen .....	22
1.13 Fragestellung .....	24
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
2.1 Material .....	25
2.2 Synthese des E-64-Analogons DCG-0N .....	27
2.3 Zellbiologische Techniken .....	33
2.3.1 Zellkultivierung .....	33
2.3.2 Gefrierkonservierung von Zellen.....	33
2.3.3 Rekultivierung eingefrorener Zellen .....	33
2.3.4 Generierung unreifer DC aus <i>buffy coats</i> .....	33
2.3.5 Anreicherung von Monozyten.....	35
2.3.6 Anreicherung von Thrombozyten.....	35
2.3.7 Anreicherung von Granulozyten .....	36
2.4 Durchflusszytometrie .....	36
2.5 Zellpräparationen .....	36
2.5.1 Generierung von Zelllysaten .....	36

2.5.2	Generierung von endozytischen Fraktionen .....	36
2.6	Affinitätsmarkierungen in Lysaten und intakten Zellen .....	37
2.6.1	Affinitätsmarkierungen in Zelllysaten und endozytischen Fraktionen .....	37
2.6.2	Affinitätsmarkierungen mit BAEBFSF .....	38
2.6.3	Puls-Experimente mit Dendritischen Zellen .....	38
2.6.4	<i>Pulse chase</i> -Experimente mit Dendritischen Zellen .....	40
2.6.5	Puls-Experimente mit DCG-0N gekoppelt an Streptavidin-Partikel .....	41
2.7	Proteinbestimmung nach Bradford .....	42
2.8	Immunoblot .....	42
2.8.1	SDS-PAGE .....	42
2.8.2	Western-Immunoblot .....	43
2.8.3	Detektion mit Vectastain <sup>®</sup> .....	44
2.8.4	Densitometrische Quantifizierungen .....	44
2.9	Versuche unter Verwendung von radioaktivem Iod .....	45
2.9.1	Iodierung von Affinitätsverbindungen .....	45
2.9.2	Radioaktive Affinitätsmarkierungen .....	45
2.9.3	Radioaktive Affinitätsmarkierungen für die 2D-SDS-PAGE .....	46
2.10	2D-SDS-PAGE .....	46
2.11	Silberfärbung .....	47
2.12	Metabolische Markierungen, <i>pulse chase</i> und Immunopräzipitation .....	47
2.13	Aktivitätsmessungen mit fluorogenen Substraten .....	49
2.13.1	Bestimmung der Cat BLS-Aktivität .....	49
2.13.2	Bestimmung der AEP-Aktivität .....	49
2.14	<i>In vitro</i> Prozessierungsstudien .....	50
2.14.1	Verdau von Peptiden .....	50
2.14.2	Identifizierung der Prozessierungsprodukte .....	50
2.15	Isolierung und Identifizierung von Cathepsinen .....	50
2.16	Inhibition von Cat S <i>in vivo</i> .....	52
2.16.1	Immunisierung von Mäusen .....	52
2.16.2	Induktion von EAE in Mäusen .....	52
<b>3</b>	<b>Detektion aktiver Proteasen <i>in vitro</i> .....</b>	<b>55</b>
3.1	Synthese der Aktivitätsverbindung DCG-0N .....	55
3.2	Analyse von Cathepsinen in Zelllysaten mittels Affinitätsmarkierungen .....	58
3.2.1	Anwendung von DCG-0N zur Analyse und Identifikation von Cysteinproteasen .....	58
3.2.2	Anwendung von BAEBFSF zur Analyse von Serinproteasen .....	65
3.3	Modulation von Cathepsinaktivitäten bei biologischen Fragestellungen .....	68
3.3.1	Autophagie .....	68
3.3.2	Effekt von HCMV auf die Aktivität endozytischer Proteasen in DC .....	71
3.3.3	Effekt von Yersinien auf die Aktivität endozytischer Proteasen in DC .....	77

---

<b>4</b>	<b>Cathepsinaktivitäten im endozytischen Kompartiment intakter DC .....</b>	<b>81</b>
4.1	Generierung von Dendritischen Zellen .....	81
4.2	Puls-Experimente mit intakten DC .....	84
4.2.1	Puls-Experimente mit unreifen DC .....	89
4.2.2	Puls-Experimente mit LPS-aktivierten DC .....	93
4.3	<i>Pulse chase</i> -Experimente mit intakten DC .....	96
4.4	Relevanz einzelner Endozytosewege in DC.....	100
4.5	Die Verwendung von Streptavidin bei Puls-Experimenten mit intakten DC.....	106
4.6	Zellpenetrierende Peptide verbessern den Transport in intakte DC.....	110
4.7	Puls-Experimente mit primären Monozyten .....	115
<b>5</b>	<b>Der Einsatz von LHVS zur therapeutischen Intervention bei EAE.....</b>	<b>117</b>
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>121</b>
6.1	Detektion aktiver Proteasen <i>in vitro</i> .....	121
6.1.1	Vergleich von DCG-0N mit E-64-Aktivitätsderivaten.....	121
6.1.2	Charakterisierung von DCG-0N zur Affinitätsmarkierung in Zelllysaten .....	123
6.1.3	Untersuchung aktiver Cysteinproteasen in Lysaten verschiedener Zellen.....	125
6.1.4	Untersuchung aktiver Serinproteasen in Lysaten verschiedener Zellen.....	126
6.2	Modulation von Cathepsinaktivitäten bei biologischen Fragestellungen .....	127
6.2.1	Autophagie .....	127
6.2.2	HCMV .....	128
6.2.3	<i>Yersinia enterocolitica</i> .....	129
6.3	Cat S als Schlüsselprotease bei der Prozessierung exogener Antigene .....	131
6.3.1	Affinitätsverbindungen als Modell für die Aufnahme von Antigenen.....	131
6.3.2	In humanen DC gelangt exogenes Material selektiv zu aktivem Cat S.....	132
6.3.3	DC Reifung führt zur Umstrukturierung des endozytischen Kompartiments .....	135
6.3.4	Konjugation an Träger verbessert Transport ins endozytische Kompartiment ...	137
6.3.5	Die Relevanz einzelner Endozytosewege in DC .....	138
6.3.6	Primäre Monozyten lassen eine ähnlich wichtige Rolle für Cat S vermuten .....	139
6.4	Inhibition von Cat S bei Autoimmunerkrankungen .....	141
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>144</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>147</b>
<b>9</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>157</b>
<b>10</b>	<b>Verzeichnis der akademischen Lehrer.....</b>	<b>160</b>



## Verzeichnis der Abkürzungen

AcOH	Essigäure
AEP	Asparaginyln-Endopeptidase
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzolsulfonylfluorid
ASDP	engl. <i>active site-directed probe</i>
$\varepsilon$ Ahx	$\varepsilon$ -Aminocaprinsäure
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AMC	7-Amino-4-methylcumarin
APC	antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ASL	engl. <i>active site-specific labelling</i>
BAEBSF	Biotin- $\varepsilon$ Ahx-AEBSF
BCR	B-Zellrezeptor
BLC	B-lymphoblastoide Zellen
BM-DC	engl. <i>bone marrow-derived dendritic cells</i>
BSA	bovines Serum-Albumin
CA-074	(L-3- <i>trans</i> -(Propylcarbamyl)oxiran-2-carbonyl)-L-iso-leucyl-L-prolin
Cat	Cathepsin
CD	Oberflächenmolekül (engl. <i>cluster of differentiation</i> )
CFA	engl. <i>complete freund's adjuvans</i>
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propansulfonat
CIIV	engl. <i>class II-associated vesicles</i>
CLIP	engl. <i>class II-associated invariant chain peptide</i>
Con B	Concanamycin B
cpm	engl. <i>counts per minute</i>
CPP	zellpenetrierende Peptide
CPZ	Chlorpromazin
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
Cyto D	Cytochalasin D
C-terminal	carboxyterminal
DAP	Diphenyl-1-(N-peptidylamino)alkanphosphonsäureester
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dendritische Zellen
DCM	Dichlormethan
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPO	2,5-Diphenyloxazol
DTT	DL-Dithiothreitol
E-64	[1-[N-[(L-3- <i>trans</i> -carboxyoxiran-2-yl)carbonyl]-L-leucyl]amino]-4-guanidinobutan
E-64d	(2S,3S)- <i>trans</i> -Epoxy succinyl-L-leucylamido-3-methylbutanethylester
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalitis
ECL	engl. <i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	engl. <i>early endosome</i>

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

---

EF	endozytische Fraktion
engl.	englisch
eq	molares Äquivalent
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAP	ER-Aminopeptidase
EIPA	5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amilorid
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FSC	engl. <i>forward scatter</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	engl. <i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
h	Stunde(n)
HLA	engl. <i>human leukocyte antigen</i>
HRP	engl. <i>horse-radish peroxidase</i>
HSP	Hitzeschockprotein
ICAP	engl. <i>isotope-coded affinity probes</i>
IDDM	Typ I-Diabetes
Ig	Immunglobulin
Ii	Invariante Kette
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
JPM-565	N-[(L-3- <i>trans</i> -carboxyoxiran-2-yl)-carbonyl]-L-leucinyl-2-(4'-hydroxyphenyl)-ethanamid
kDa	Kilodalton
L	engl. <i>lysosome</i>
LE	engl. <i>late endosome</i>
LHVS	N-Morpholin-harnstoff-leucin-homophenylalanin-vinylsulfon-phenyl
LHVS-PhOH	N-Morpholin-harnstoff-leucin-homophenylalanin-vinylsulfon-phenol
LIP	engl. <i>leupeptin-induced protein</i>
LP	Latexpartikel
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
mA	Milliampère
MALDI	engl. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
M $\beta$ CD	Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin
MBP	engl. <i>myelin basic protein</i>
Me	Methyl
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex
MIIC	engl. <i>MHC II-containing compartment</i>
min.	Minute(n)
MMR	Makrophagen-Mannose-Rezeptor
MO-DC	engl. <i>monocyte-derived dendritic cells</i>
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MP	Magnetpartikel
MS	Multiple Sklerose oder Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte

---

Mtt	4-Methyltrityl
MW	Molekulargewicht
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NMP	1-Methyl-2-pyrrolidinon
N-terminal	aminoterminal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	PBS mit Tween <sup>®</sup> 20
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
Pip	Piperidin
PIS	Präimmunserum
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
psi	engl. <i>pound-force per square inch</i>
PT	Pertussis Toxin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PyBOP <sup>®</sup>	(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
RP-HPLC	engl. <i>reversed-phase high pressure liquid chromatography</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLIP	engl. <i>small leupeptin-induced peptide</i>
SPPS	engl. <i>solid phase peptide synthesis</i>
SSC	engl. <i>side scatter</i>
TAP	engl. <i>transporter associated with antigen processing</i>
<i>t</i> Bu	<i>tert.</i> Butyl
TEC	Thymusepithelzelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TES	N-[(Tris(hydroxymethyl)methyl)-2-aminoethansulfonsäure
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TIS	Triisopropylsilan
TOF	engl. <i>time of flight</i>
Tosyl/Tos	<i>p</i> -Toluensulfonsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
Trityl/Tr	Triphenylmethyl
UV	ultraviolett
% v/v	Volumenprozent
ZL	Zelllysate
ZNS	Zentrales Nervensystem
Z-Tyr-Ala-CHN <sub>2</sub>	Benzyloxycarbonyl-tyrosin-alanin-diazomethylketon

Zur Abkürzung der Aminosäuren wurden die international gebräuchlichen Ein- und Drei-Buchstaben-Codes gemäß den Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommission für biologische Nomenklatur verwendet [*Eur. J. Biochem.* **138**, 9-37 (1984)]





# 1 Einführung

## 1.1 Das Immunsystem - natürliche und adaptive Immunität

Das Immunsystem des Menschen unterscheidet zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Die angeborene unspezifische Immunabwehr erfolgt humoral über das Komplementsystem, bestehend aus mehr als 20 verschiedenen körpereigenen Serumproteinen, und die damit verbundene zelluläre Aktivierung von Makrophagen, Monozyten, Mastzellen, neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen [Ezekowitz et al. 1996]. Die später in der Evolution entstandene adaptive Immunantwort, welche zur Generierung antigenspezifischer Effektor- und Gedächtniszellen führt, setzt sich aus zwei wesentlichen Komponenten zusammen: B-Lymphozyten (B-Zellen) vermitteln die adaptive humorale Immunantwort, während T-Lymphozyten (T-Zellen) die adaptive zelluläre Reaktion ausbilden. Aktivierte B-Lymphozyten differenzieren einerseits zu Plasmazellen (Prinzip der klonalen Selektion), welche dann antigenspezifische Antikörper sezernieren. Andererseits erfolgt die Aktivierung von phagozytisch hochaktiven Makrophagen und damit eine Verstärkung der unspezifischen Abwehr. T-Lymphozyten werden in zwei wesentliche Klassen unterteilt: Die erste Klasse differenziert in zytotoxische T-Zellen (CTL,  $CD8^+$ -T-Zellen), welche virusinfizierte oder maligne Zellen abtöten. Die zweite Klasse stellen die  $CD4^+$ -T-Zellen. Sie differenzieren nach entsprechendem Stimulus entweder in T-Helferzellen vom Typ 1 ( $T_H1$ ) und lösen eine proinflammatorische Reaktion mit anschließender Aktivierung von Makrophagen und Dendritischen Zellen aus, oder aber in den Typ 2 ( $T_H2$ ), welche einen antiinflammatorischen Zustand und eine humorale Antwort vermitteln [Del Prete et al. 1998].

## 1.2 Antigenpräsentierende Zellen

Antigenpräsentierende Zellen (APC) werden aufgrund ihrer Expression von MHC Klasse II-Molekülen in professionell und fakultativ antigenpräsentierend eingeteilt. B-Zellen, Dendritische Zellen (DC) und Makrophagen zählen zu den professionellen APC, während Thymusepithelzellen, die konstitutiv, oder Keratinozyten und Fibroblasten, die nach Induktion mit  $IFN\gamma$  MHC Klasse II-Komplexe exprimieren, als fakultative APC bezeichnet werden.

Im Verlauf der letzten Jahre wurde zunehmend klar, dass DC eine zentrale Rolle in der Vermittlung der adaptiven Immunantwort einnehmen. Sie induzieren durch die MHC Klasse I- und MHC Klasse II-vermittelte Antigenpräsentation sowohl  $CD4^-$  als auch  $CD8^-$ -T-Zellantworten und sind als einzige bekannte Zellpopulation in der Lage, immunologisch naive T-Zellen zu stimulieren. Aus Vorläuferzellen entstehen unreife DC

(z.B. Langerhanszellen der Haut), die Antigen in der Peripherie internalisieren und von dort ins lymphoide Gewebe migrieren. Im Zuge ihrer terminalen Ausreifung wird das Antigen proteolytisch prozessiert und im Komplex mit MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche exprimiert, um T-Zellen zu stimulieren, welche dann Makrophagen aktivieren und außerdem die Umwandlung von B-Zellen in Plasmazellen induzieren [Watts & Amigorena 2001].

DC sind an der Ausbildung der Toleranz, also der positiven und negativen Selektion von T-Zellen in den zentralen und peripheren lymphatischen Organen beteiligt [Steinman et al. 2003]. Sie kontrollieren die Intensität der Immunantwort durch Suppression aktivierter T-Zellen mit Hilfe regulatorischer T-Zellen, deren Differenzierung sie bewirken. Außerdem greifen DC auch in das angeborene Immunsystem ein, indem sie wichtige Zytokine sezernieren und NK-Zellen und NK-T-Zellen aktivieren [Mellman & Steinman 2001].

Im peripheren Blut kommen zwei unterschiedliche Typen zirkulierender DC vor. Während DC lymphoiden Ursprungs sich aus CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen entwickeln und unter Einfluss von IL-3 zu plasmazytoiden DC differenzieren (DC2 oder BDCA-2-DC), entstehen aus myeloiden CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen mittels GM-CSF, IL-4 und TGF- $\beta$  Langerhans DC (DC1 oder CD1c-DC). Noch ist nur sehr wenig über die funktionelle Beziehung beider Populationen bekannt. Zur Grundlagenforschung und für den Einsatz in der Immuntherapie werden hauptsächlich DC verwendet, die aus nicht proliferierenden primären Monozyten *ex vivo* über 5-7 Tage in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 generiert werden (MO-DC) [Romani et al. 1994, Chapuis et al. 1997]. Die dabei entstehenden CD1a<sup>+</sup>-Zellen zeigen wie die CD1c- und BDCA-2-DC einen unreifen bzw. ruhenden Phänotyp (*immature* DC, iDC), d.h. sie exprimieren nur eine geringe Menge an MHC Klasse II und kostimulatorischen Molekülen (z.B. CD80, CD86) auf der Plasmamembran.

Ihre Differenzierung in reife bzw. aktivierte DC (*mature* DC, mDC) mit einer hohen Expression von MHC Klasse II- und kostimulatorischen Molekülen erfolgt durch exogene Gefährdungssignale, wie z.B. geschädigte Gewebe oder mikrobielle Produkte. Eingeleitet wird dieser Prozess durch Pathogen-assoziierte Moleküle wie Lipopolysacchariden (LPS) [Recigno et al. 1999], bakterieller DNA [Hartmann et al. 1999], viraler doppelsträngiger RNA [Cella et al. 1999] oder aber durch die Stimulation proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 oder TNF- $\alpha$  [Roake et al. 1999, Cumberbatch et al. 1992]. Mit der Reifung geht der Verlust der Antigenaufnahme einher. Während mDC eine Immunantwort induzieren, wird spekuliert, dass iDC durch die Eliminierung autoreaktiver T-Zellen oder die Induktion regulatorischer T-Zellen zur Toleranz führen [Albert et al. 2001, Dhodapkar et al. 2001, Steinman et al. 2003].

### 1.3 MHC Klasse I und MHC Klasse II

Beim Menschen werden zwei Hauptklassen von MHC-Molekülen (Haupthistokompatibilitätskomplex) unterschieden, die als MHC Klasse I und MHC Klasse II bezeichnet werden. Beide ähneln sich in ihren groben strukturellen Merkmalen. MHC Klasse I-Moleküle sind Bestandteil nahezu jeder kernhaltigen Zelle im menschlichen Organismus, mit Ausnahme von Neuronen. Sie erkennen  $CD8^+$ -Zellen, während MHC Klasse II-Moleküle, welche auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimiert werden,  $CD4^+$ -Zellen stimulieren. MHC Klasse I- und MHC Klasse II-Moleküle gehören gemeinsam mit den Immunglobulinen (Ig), T-Zellrezeptoren und CD-Molekülen zur Immunglobulinfamilie [Bodmer et al. 1994]. Beide Moleküle bestehen aus nicht-kovalent verbundenen heterodimeren, transmembranen Glykoproteinen vom Typ 1 (carboxyterminales Ende zytosolständig), welche eine Grube zur Bindung von Peptiden ausbilden. Das MHC Klasse I-Molekül setzt sich aus einer schweren, membranverankerten  $\alpha$ -Kette (drei Domänen  $\alpha 1$ - $\alpha 3$ ), dem zytoplasmatischen Teil und einer löslichen nicht membranverankerten kleinen Kette, dem  $\beta 2$ -Mikroglobulin, zusammen. Die polymorphe schwere Kette trägt allein zur Spezifität der Bindungsgrube bei. Das MHC Klasse II-Molekül besteht dagegen aus zwei nahezu strukturhomologen Transmembranproteinen ( $\alpha$  und  $\beta$ ) mit jeweils zwei Domänen und je einem kurzen zytosolischen Teil. Ein Fehlen der zytosolischen Domäne von  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Kette verhindert die Präsentation der MHC-Moleküle an der Zelloberfläche und eine vesikuläre Rezyklisierung zur Neubeladung [Pinet et al. 1995].

Der wesentliche Unterschied zwischen beiden MHC-Molekülen liegt jedoch im Ursprung der gebundenen Peptide. MHC Klasse I-Moleküle akkumulieren hauptsächlich prozessierte Peptide zytosolischen Ursprungs (Selbstproteine oder virale Proteine), während MHC Klasse II-Moleküle mehrheitlich prozessierte Peptide exogener Herkunft (nach Internalisierung von Pathogenen) präsentieren [Heemels & Ploegh, Wolf & Ploegh 1995]. Während bei MHC Klasse I-Molekülen die Peptidbindungsgrube nach allen Seiten in der Ebene abgeschlossen ist und daher nur Peptiden mit einer Größe von 8-11 Aminosäuren (AS) Platz bietet, ist die Grube bei MHC Klasse II-Molekülen nach beiden Seiten hin offen und kann deshalb auch größere Peptide aufnehmen [Rammensee et al. 1995]. Das Spektrum umfasst relativ kurze Peptide mit 10 AS, einer mittleren Länge von 15-18 AS bis hin zu Peptiden mit über 30 AS [Chicz et al. 1993]. Sogar ganze entfaltete Proteine sind vereinzelt in der Lage, an MHC Klasse II-Moleküle zu binden [Sette et al. 1989].

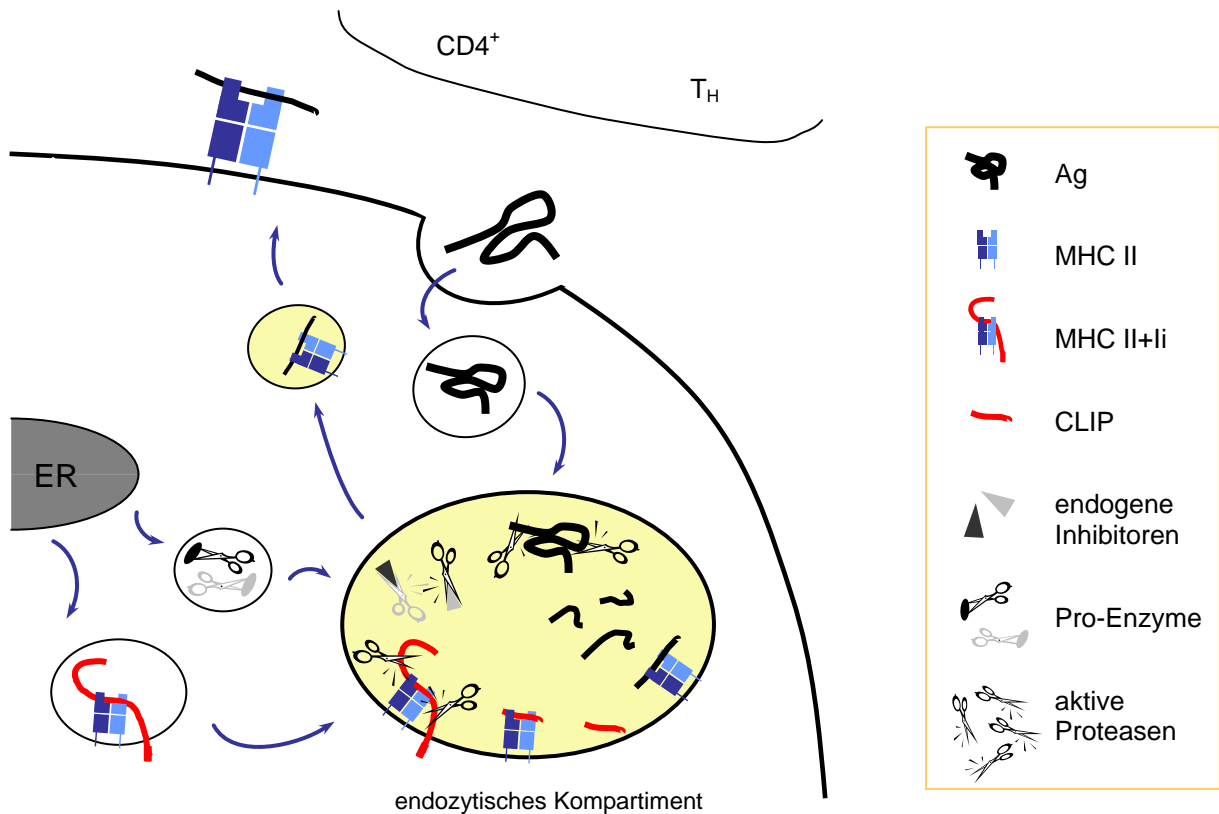
Die Haupthistokompatibilitätsantigene werden von polyallelen Genen kodiert, die innerhalb eines definierten DNA-Abschnitts, dem MHC liegen [Kaufman et al. 1984, Germain et al. 1994]. Dieser Genabschnitt heißt beim Menschen auch HLA-Komplex (*human leukocyte antigen*). Sowohl MHC Klasse I als auch Klasse II sind bis auf den nur monomorph vorkommenden hochkonservierten DR $\alpha$  Gen-Lokus hochpolymorph. Die verschiedenen Klassen von MHC-Genen kodieren Proteine mit unterschiedlichen Peptid-Bindungsspezifitäten. Als Haplotyp bezeichnet man diejenige spezielle Kombination an MHC-Allelen, die sich auf einem individuellen Chromosom befindet. Sie macht die immunologische Individualität eines Menschen aus. Die HLA-Klasse I-Proteine sind beim Menschen in die Genabschnitte HLA-A, -B und -C gegliedert, wogegen Klasse II-Proteine in HLA-DR, -DP, und -DQ unterteilt werden [Marsh et al. 1998]. Das Klasse II-Genprodukt HLA-DM ist aufgrund seiner degenerierten Bindungsgrube nicht in der Lage, Peptide zu präsentieren und dient als Beladungshelfer der anderen MHC Klasse II-Moleküle.

#### **1.4 MHC Klasse I-vermittelte Antigenpräsentation**

Bei der MHC Klasse I-vermittelten Antigenpräsentation werden zytosolische Proteine mit Ubiquitin markiert und vom Proteasom, einem zytosolischen Multienzymkomplex, in Peptidfragmente mit 8 bis 15 AS prozessiert. Manche der 8 bis 11 AS enthaltenden Peptide, die auf MHC Klasse I-Molekülen gefunden werden, können direkt vom Proteasom generiert werden. Andere Fragmente werden hauptsächlich von zytosolischen Peptidasen weiter eingekürzt. Die Peptidfragmente werden mit Hilfe des TAP-Transporters in das endoplasmatische Retikulum transferiert [Heemels & Ploegh 1995] und können durch die Bindung an dort synthetisierte MHC Klasse I-Moleküle vor weiterer Degradierung geschützt werden. Ein kleiner Teil der Peptide wird erst im ER durch ERAP weiter prozessiert und dann auf MHC Klasse I-Moleküle geladen [Saric et al. 2002, York et al. 2002]. Nach dem Transport an die Zelloberfläche induzieren diese MHC Klasse I:Peptid-Komplexe die Aktivierung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen [Rammensee et al. 2002].

#### **1.5 MHC Klasse II-vermittelte Antigenpräsentation**

Zum einwandfreien Ablauf der MHC Klasse II-vermittelten Antigenpräsentation bedarf es der komplexen räumlichen und zeitlichen Koordination von Synthese, intrazellulärem Transport und Prozessierung von MHC Klasse II-Molekülen auf der einen sowie der Aufnahme und dem Abbau von exogenem Antigen auf der anderen Seite. Die Prozessierung von MHC und Antigen erfolgt im dafür funktionell ausgerüsteten endozytischen Zellkompartiment.



**Abb. 1-1:** Transport, Prozessierung und Beladung von MHC Klasse II-Molekülen mit abschließender Expression des MHC Klasse II-Komplexes an der Zelloberfläche

MHC Klasse II $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette werden kotranslational in die ER-Membran eingefügt und dimerisieren dort mit Hilfe der ebenfalls membranständigen invarianten Kette (Ii, auch Ii p31). Der zytoplasmatische N-Terminus von Ii enthält Signalsequenzen für den Transport zum endozytischen Zellkompartiment (Abb. 1-1, vereinfacht). Ihr größerer Teil befindet sich im ER-Lumen, wo dieser mit einem definierten Abschnitt namens CLIP (*Class II invariant chain-associated peptide*) die Peptidbindungsgrube des  $\alpha\beta$ -Dimers belegt. Dadurch wird der MHC stabilisiert und eine frühzeitige Anlagerung von im ER residenten Selbstpeptiden und Proteinen an den MHC verhindert. Über den C-terminalen Bereich trimerisiert Ii, und es entstehen nonamere Komplexe aus drei Ii mit je einem  $\alpha\beta$ -Dimer [Cresswell et al. 1996]. Dieser Komplex wird mittels des Sortierungssignals nach Transit des Golgi mehrheitlich in das endozytische Kompartiment auf Höhe des Übergangs zwischen dem frühen zum späten Endosom befördert. Ein je nach Zelltyp variabler Anteil erreicht nach Verlassen des Trans-Golgi-Netzwerkes direkt die Plasmamembran und wird dort mittels Endozytose in das endozytische Kompartiment internalisiert [Wolf & Ploegh 1995]. Dort wird Ii von lokalen Proteasen proteolytisch abgebaut, bis nur noch CLIP in der Bindungsgrube verbleibt [Villadangos et al. 1999]. Der Austausch von CLIP gegen antigene Peptide wird durch HLA-

DM katalysiert und über HLA-DO reguliert [Kropshofer et al. 1999, Denzin et al. 1997]. DM stabilisiert außerdem leere  $\alpha\beta$ -Komplexe und kann Peptide mit niedriger Affinität gegen hochaffine Peptide austauschen. Diese neu gebildeten MHC Klasse II:Peptid-Komplexe werden an die Zelloberfläche transportiert, wo deren Expression zur spezifischen Aktivierung von  $CD4^+$ -T-Zellen führt. Endozytische Proteasen, insbesondere Cathepsine, nehmen eine Schlüsselrolle beim Transport und der Prozessierung von MHC Klasse II-Molekülen und Antigen ein [Villadangos et al. 2000] und machen sie zu attraktiven Zielmolekülen für die therapeutische Manipulation der Antigenpräsentation bei MHC Klasse II-assoziierten Autoimmunerkrankungen.

### **1.6 Das endozytische Kompartiment in APC**

Das MHC Klasse II-assoziierte endozytische Kompartiment wird klassisch in vesikuläre frühe und späte Endosomen und in multilamelläre Lysosomen unterteilt (EE, LE, L). Aus frühen Endosomen entstehen durch Reifung späte Endosomen und zuletzt Lysosomen. Im Zuge dieser Reifung kommt es zu einer Absenkung des intravesikulären pH-Wertes, Transportvesikel fusionieren mit dem endozytischen Kompartiment oder geben ihren Inhalt weiter (*kiss and run*). Dadurch ändern sich auch die Morphologie dieser Organellen und die Expression charakteristischer Markerproteine. Die einzelnen distinkten Stufen unterscheiden sich in ihren zellulären Aufgaben. Im EE spielt das so genannte Rezeptorrecycling eine wichtige Rolle, bei dem ein Teil der an der Antigenaufnahme beteiligten Rezeptoren nach Ablösung des Liganden in Recyclingendosomen voll funktionstüchtig zur Plasmamembran zurücktransportiert wird, während die Prozessierung der Antigene, denaturierter Rezeptoren und MHC Klasse II-Moleküle entlang der Reifung vom EE zum LE erfolgt. Komponenten, die ins Lysosom gelangen, werden final bis auf einfache organische Verbindungen proteolytisch degradiert und können der Zelle für ihre Stoffwechselfunktionen wieder bereitgestellt werden.

Neben dieser klassischen Einteilung sind in APC alternative endozytische Kompartimente charakterisiert worden. Das Beladungskompartiment MIIC (*MHC II-containing compartment*) und CIIV (*class II-associated vesicles*) wurden sowohl in DC als auch in B-Zellen beschrieben [Neefjes et al. 1990, Peters et al. 1995], aber letztlich ist unklar, ob es sich um distinkte Zellorganellen handelt oder nur um morphologische Variationen konventioneller endozytischer Kompartimente, wobei dann MIIC dem Äquivalent von LE oder Prälysosomen entsprechen würde, in denen vor allem die Peptidbeladung der MHC Klasse II-Moleküle erfolgt, während CIIV eher dem Transport von MHC Klasse II:Peptid-Komplexen auf die Zellmembran dienen könnten [Turley et al. 2000].

### 1.6.1 Proteasen im endozytischen Kompartiment in APC

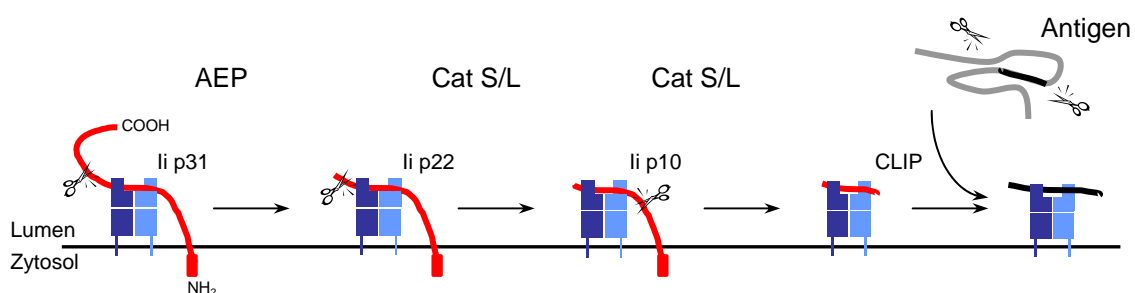
Während der zytosolische Weg der MHC Klasse I-assoziierten Antigenprozessierung vom Proteasom dominiert wird, enthält das endozytische Kompartiment eine Vielzahl an Proteasen, die in ihrer aktiven Form eine Rolle bei der Degradierung von Antigenen und/oder Ii spielen können. Damit keine vollständige Degradierung bis zu einzelnen AS erfolgt, ist ein gut balancierter proteolytischer Apparat die Voraussetzung für die Funktionalität der MHC Klasse II-assoziierten Antigenprozessierung [Villadangos & Ploegh 2000].

Die Mehrzahl der endozytischen Proteasen werden im ER als inaktive Zymogene oder Pro-Enzyme synthetisiert [Mc Grath et al. 1999]. Die am *N*-Terminus lokalisierte, in ihrer Größe variierende Pro-Enzymkette erleichtert die korrekte Faltung des Pro-Enzyms und verhindert durch das Blockieren des aktiven Zentrums dessen frühzeitige Aktivierung [Tao et al. 1994]. Die meisten Pro-Enzyme gelangen im Golgi über den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR) durch anschließenden Transport in geeigneten Vesikeln ins endozytische Kompartiment und werden dort in der sauren Umgebung autokatalytisch oder über andere Proteasen durch Abspaltung der inhibitorischen Pro-Region aktiviert [Chapman & Riese 1997]. Der weitaus größte Teil der endozytischen Proteasen zählt zur Familie der Cathepsine (Cat), deren Mitglieder wiederum mehrheitlich die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen teilen (Cat S, B, H, L, Z, C, V, K, F, W). Cat D und E gehören zu den Pepsin-ähnlichen Aspartatproteasen, während Cat G und A Serinproteasen sind. Namensgebend sind hierbei der Mechanismus der Spaltung oder aber die AS im katalytischen Zentrum. Im Gegensatz zu der relativ geringen und überlappenden Substratspezifität der meisten Cathepsine welche auf teilweise Redundanz schließen lässt [Chapman et al. 1998, Turk et al. 2000], schneidet die funktionell wahrscheinlich genauso wichtige Asparagin-spezifische Endopeptidase AEP ausschließlich nach Asparagin [Manoury et al. 1998]. Endozytische Proteasen unterscheiden sich gemäß ihres Reifestadiums, im pH-Optimum sowie in ihrer Affinität gegenüber reversiblen endogenen Inhibitoren. Zu diesen Inhibitoren zählen neben der Gruppe der Cystatine [Turk et al. 1997] die p41-Isoform von Ii [Bevec et al. 1996] und die Thyreoglobulin Typ 1-Inhibitoren [Lenarcic et al. 1998]. Die Aktivität der einzelnen Cathepsine unterliegt ferner teilweise gegenseitiger Regulation. Der lokale pH und die Redoxbedingungen ändern sich während der Reifung des endozytischen Kompartiments graduell und deshalb ist es wahrscheinlich, dass zu verschiedenen Zeitpunkten ein unterschiedliches Muster an Proteasenaktivität und eine variierende Substratspezifität einzelner Proteasen auftreten. Dies stellt möglicherweise ein wichtiges Prinzip in der Regulation der MHC Klasse II-Funktion dar. Nicht alle Cathepsine sind gleichermaßen in

allen Arten von APC aktiv, jedoch sind Untersuchungen bezüglich der differentiellen Aktivität und Funktion einzelner Cathepsine erst in ihren Anfängen. Cat B und Cat D sind ubiquitär in allen Zellen und nicht nur in APC aktiv. Während Cat L in murinen B-Lymphozyten, in Thymusepithelzellen (TEC), Thymozyten und Makrophagen vorkommt, wurde in B-Zellen und DC bis jetzt noch keine Aktivität nachgewiesen [Hsing et al. 2005]. Verhältnismäßig konträr zu Cat L wird Cat S im Wesentlichen nur von professionellen APC (B-Zellen, DC, Makrophagen) exprimiert [McGrath et al. 1999] oder durch IFN- $\gamma$  in fakultativen APC induziert [Shi et al. 1994]. Die Expression von Cat F (murine peritoneale und alveoläre Makrophagen), Cat Z (murine Monozyten und DC), Cat K (Osteoklasten), Cat V (Thymus und Testis) und Cat W (NK-Zellen und CTL) sind sehr gewebsspezifisch. Die Gründe und funktionellen Konsequenzen dieser unterschiedlichen Expression sind derzeit noch unklar, ebenso ist noch wenig darüber bekannt, welche Cathepsine in humanen APC und insbesondere in primären APC aktiv sind. Während B-lymphoblastoide Zellen Cat B, S, D, H, Z, C und AEP, aber kein Cat L enthalten [Fiebiger et al. 2001, Manoury et al. 2002, Beck et al. 2001, Lautwein et al. 2004], wurden in MO-DC bisher Cat B, S, L, D, H und AEP gefunden [Maurer et al. 1998, Manoury et al. 2002, Lautwein et al. 2002].

### 1.6.2 Endozytische Proteasen und die Prozessierung von MHC Klasse II-Molekülen

Nach dem Transport der MHC Klasse II-Moleküle ins endozytische Kompartiment erfolgt die Degradierung von Ii im murinen Modell im spätendosomalalen Bereich unter Bildung verschiedener definierter Zwischenprodukte. Zuerst wird am C-Terminus wahrscheinlich durch Aspartatproteasen oder AEP der die Trimerisierungsdomäne enthaltende Abschnitt entfernt und p22 (auch LIP von *leupeptin-induced protein*) gebildet. Alle weiteren Einkürzungen werden durch Cysteinproteasen vorgenommen und führen zum Zwischenprodukt p10 (auch SLIP von *small leupeptin-induced protein*), bis dann am N-Terminus die transmembranständige Transportsequenz abgetrennt wird und CLIP entsteht (Abb. 1-2).



**Abb. 1-2:** Prozessierung der Invarianten Kette im endozytischen Kompartiment



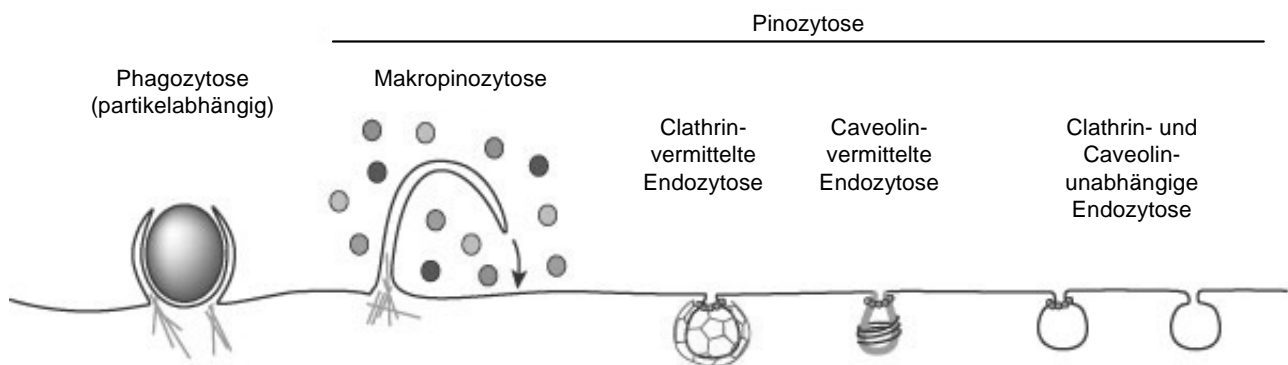
Dieser finale Schritt wird in B-Zellen und DC von Cat S [Shi et al. 1999], in murinen Monozyten von Cat S und/oder Cat L [Nakagawa et al. 1999], in murinen Makrophagen von jedem der Cathepsine B, L, F [Shi et al. 2000] und in murinen TEC von Cat L [Nakagawa et al. 1998] bzw. in humanen TEC von Cat V katalysiert [Tolosa et al. 2003]. Wird er durch Elimination der entsprechenden Proteasenaktivität(en) blockiert, akkumulieren  $\alpha\beta$ :Ii p10-Komplexe aufgrund ihres noch vorhandenen Transportsignales im lysosomalen Kompartiment und die Expression der MHC Klasse II-Moleküle an der Zelloberfläche nimmt ab [Driessen et al. 1999, Fiebiger et al. 2001]. In murinen DC wurde außerdem demonstriert, dass eine differentielle Regulation der Cat S-Aktivität in unreifen/reifen DC für die unterschiedliche Prozessierungs- und Transporteffizienz von MHC Klasse II-Molekülen verantwortlich ist [Pierre et al. 1997, Pierre et al. 1998, Villadangos et al. 2001]. Frühere *in vitro* Studien, die sich auf Cat B, D, E, F, K, L und S bezogen, zeigten deren Beteiligung an der Prozessierung von Ii, lassen aber die Frage ihrer Bedeutung *in vivo* weitgehend offen [Blum et al. 1988, Lennon-Duménil et al. 2002, Maric et al. 1994]. Die Redundanz einzelner Proteasen beim initialen Prozessierungsschritt von Ii zeigt sich durch die Schwierigkeit, diesen frühen Schritt vermöge Proteaseninhibitoren zu blockieren [Villadangos et al. 2000, Lennon-Duménil et al. 2002, Honey et al. 2003, Driessen et al. 2001]. Die inzwischen eindeutig belegte Schlüsselrolle von Cat S und Cat L beim finalen Schnitt zur Generierung von CLIP wirft die Frage auf, wieso die MHC Klasse II-Prozessierung in verschiedenen APC von zwei distinkten Enzymen vermittelt wird. Eine mögliche Antwort lautet, dass sie nicht nur Ii degradieren, sondern auch im zweiten proteolytischen Prozess, der Generierung der Peptidfragmente mit denen MHC Klasse II-Moleküle beladen werden, eine äußerst wichtige Rolle spielen.

### 1.6.3 Die Antigeninternalisierung

Die Akquirierung von Antigenen stellt den ersten Schritt der MHC Klasse II-restringierten Präsentation an der Zelloberfläche dar, wobei verschiedene Zelltypen auf unterschiedliche Aufnahmemechanismen zurückgreifen können, abhängig von der Art des Antigens, der APC bzw. ihrem Status. Die erste Klassifikation erfolgt in spezifische oder Rezeptor-vermittelte und unspezifische Antigenaufnahme [Bakke & Nordeng 1999]. Die spezifische Antigeninternalisierung wird durch die Bindung von Liganden an membranständige Rezeptoren auf der Zelloberfläche von APC und die anschließende Internalisierung des gebildeten Komplexes über Phagozytose oder Endozytose [van Bergen et al. 1999, Watts et al. 1997] ermöglicht. Sie ist um den Faktor 100-1000 effizienter als die unspezifische Aufnahme, aber aufgrund

fehlender Diversität auf wenige Antigene beschränkt [Norbury 2006]. Nahezu jede APC exprimiert ein unterschiedliches Set an Rezeptoren: der B-Zellrezeptor (BCR) wird als monomeres Antikörper des IgM-Typs auf der Plasmamembran von B-Zellen oder B-lymphoblastoiden Zellen exprimiert. B-Zellen, Makrophagen und DC besitzen den  $F_C$ -Rezeptor ( $F_C\gamma R$ ), während verschiedene Mannose-Rezeptoren (MMR, Typ C-Lektine) auf Makrophagen und DC vorkommen. Außerdem exprimieren manche APC Rezeptoren, die an Hitzeschockproteine gebundene antigene Fragmente internalisieren [Berwin et al. 2003, Becker et al. 2002], TLR (*toll-like receptor*) und auch TfnR (Transferrinrezeptor). Die unspezifische Aufnahme geschieht hauptsächlich durch Endozytose des umgebenden Mediums.

Die zweite Einteilung kann aufgrund unterschiedlicher Endozytosemechanismen vorgenommen werden (Abb. 1-3):



**Abb. 1-3:** Endozytosearten zur Internalisierung von Antigenen (mod. nach Conner & Schmid 2003)

Bei der Aktin-abhängigen Phagozytose (*cell eating*) binden große Partikel mit einem Durchmesser von mehr als  $1,0\ \mu\text{m}$  (apoptotische Zellen, Mikroben, inerte Partikel oder auch Liposomen) an spezifische Rezeptoren ( $F_C\gamma R$ , MMR) und werden dann von der Zelle aufgenommen, wobei auch das umgebende Medium in die Zelle gelangt. Phagozytose wird hauptsächlich bei Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Zellen, aber auch in deutlich geringerem Ausmaß bei unreifen DC beobachtet [Matsuno et al. 1996]. B-Zellen phagozytieren dagegen sehr schlecht [Stockinger et al. 1992].

Die Pinozytose (*cell drinking*) kann in mindestens vier weitere Arten unterteilt werden: Bei der ebenfalls Aktin-abhängigen unspezifischen Makropinozytose stülpt sich die Plasmamembran mit Hilfe des Zytoskeletts nach außen und schnürt dabei große Mengen extrazellulärer Flüssigkeit und Antigene in gelöster Form in großen Vesikeln, auch Makro-

pinosomen genannt, ein. Makrophagen und unreife DC stellen die wichtigsten Vertreter, B-Zellen dagegen besitzen nur geringe Makropinozytose-Aktivität [Sallusto et al. 1995, Aderem et al. 1999]. Die Aktin-gesteuerte Formation von Phagosomen oder Makropinosomen unterscheidet sich in ihrem Mechanismus von den übrigen Endozytoseformen der selektiveren Plasmamembrandomänen. Gelöste Ligand-Rezeptorkomplexe werden typischerweise von Clathrin-haltigen Vesikeln oder zu einem geringeren Anteil von Caveolin-enthaltenden Einbuchtungen internalisiert. Bei der in allen Säugetierzellen vorkommenden Clathrin-abhängigen Endozytose sind LDL- (*low-density lipoprotein*) und Tfn-Rezeptoren (Transferrin) beteiligt [Norbury 2006]. Caveolae, eine spezielle Form von *lipid raft*, sind flaschenförmige Caveolin-abhängige Einbuchtungen, die Cholesterol- und Lipid-haltige Mikrodomänen der Plasmamembran begrenzen und verschiedene Membrantransporter enthalten [Anderson et al. 1998, Sowa et al. 2001]. Die Caveolin-vermittelte Endozytose kommt in vielen Zellen von Säugetieren vor, bei DC wird ihre Existenz noch diskutiert. Wahrscheinlich verfügen DC aber über eine verwandte Form, die Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose genannt wird. Über diesen Mechanismus ist noch sehr wenig bekannt. Seine Definition erfolgt bis jetzt eher durch die Beobachtung von Endozytose, die keinem der anderen Mechanismen zugeordnet werden kann als über spezielle Charakteristika. Obwohl bei der Makropinozytose bis jetzt noch keine Rezeptorbeteiligung wie bei den einzelnen Formen der Mikropinozytose nachgewiesen werden konnte, verläuft sie viel effizienter [Racoosin et al. 1992], jedoch wird ein nicht zu vernachlässigender Anteil typischer Flüssigphasenmarker in DC durch Bindung an den Mannose-Rezeptor aufgenommen [Sallusto et al. 1995].

Den einfachsten Weg der Antigenaufnahme stellt die direkte Beladung mit Peptiden der auf der Zelloberfläche exponierten MHC Klasse II-Moleküle dar. Dazu muss aber der Peptidligand in ausreichender Konzentration im Medium vorhanden sein. Wahrscheinlich haben diese MHC Klasse II-Peptidkomplexe aber andere Konformationen und T-Zellspezifitäten als mittels intrazellulärer Prozessierung generierte Peptide [Pu et al. 2004]. Die übrigen Internalisierungswege sind dessen ungeachtet vorherrschend und ironischerweise auch effizienter.

Die Mehrheit der bis heute veröffentlichten Studien hat es noch nicht geschafft, zwischen den einzelnen Aufnahmemechanismen zu unterscheiden [Norbury 2006], wobei sich verschiedene Wege der Antigenaufnahme in das MHC Klasse II-Kompartiment von APC möglicherweise auf die ersten und entscheidenden Schritte der Antigenprozessierung auswirken [Aderem et al. 1999].

Zur Differenzierung der einzelnen Mechanismen bedarf es spezifischer Inhibitoren. Phagozytose und Makropinozytose sind Aktin-abhängig und daher durch Cytochalasin D (Cyto D) hemmbar, welches die Aktin-Polymerisation verhindert [Ramachandra et al. 1999, Norbury 2006]. Zur Inhibition der Makropinozytose existieren zwei weitere pharmakologische Ansätze: Der Erste basiert auf der spezifischen Blockierung der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Pumpe mittels Amilorid (EIPA, [West et al. 1989, Meier et al. 2002]). Beim Zweiten werden Inhibitoren der Phosphatidylinositol(PI)-3-kinase verwendet, wie z.B. Wortmannin [Araki et al. 1996, Amyere et al. 2002]. Es gibt aber auch Publikationen, die belegen, dass Wortmannin das Transferrin-Recycling und somit auch die Clathrin-vermittelte Endozytose beeinflusst [Li et al. 1995, Spiro et al. 1996]. Bei der Clathrin-vermittelten Endozytose muss ein AP-2-Adapterkomplex gebildet werden. Chlorpromazin (CPZ) verhindert die Anlagerung von AP-2 und Clathrin [Subtil et al. 1994, Wang et al. 1993]. In weiteren Publikationen wird beschrieben, dass die Caveolin-vermittelte Endozytose unterbunden werden kann, indem man das in der Plasmamembran enthaltene Cholesterol mit Hilfe des zyklischen Heptasaccharides Methyl- $\beta$ -Cyclodextran (M $\beta$ CD) extrahiert [Orlandi et al. 1998, Pike et al. 2002]. Für die Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose sind noch keine Inhibitoren beschrieben.

Partikel und Flüssigkeiten gelangen nach der Internalisierung in Transportvesikeln zu frühen Sortierendosomen und schließlich in das endozytische Kompartiment. Diese werden durch die vakuoläre  $\text{H}^+$ -ATPase, eine Protonenpumpe, kontinuierlich angesäuert und im Zuge der eintretenden Reifung werden die inkooperierten Proteasen aktiviert. Es gibt mehrere Möglichkeiten, die Ansäuerung und somit eine Aktivierung der Proteasen zu verhindern: Bafilomycin A1 (Baf A1) und Concanamycin B (Con B) inhibieren sehr spezifisch die vakuoläre  $\text{H}^+$ -ATPase zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Ansäuerung direkt nach der Bildung der frühen Sortierendosomen [Bowman et al. 1988, Clague et al. 1994]. Chloroquin und Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) sind schwache Basen, sie greifen zu einem späteren Zeitpunkt ein, indem sie in den bereits sauren Vesikeln die freien Protonen binden. Der pH steigt deutlich an und die Proteolyse wird gestoppt [Poole et al. 1981, Potocky et al. 2003].

#### 1.6.4 *Cross presentation* versus Autophagie

Die klassische Trennung, worin MHC Klasse I-Moleküle Peptide intrazellulärer Proteine präsentieren, während MHC Klasse II-Moleküle antigene Peptide extrazellulärer Proteine und Membranproteine binden, gilt nicht mehr streng. Inzwischen ist bekannt, dass auch exogene Antigene insbesondere durch DC im Komplex mit MHC Klasse I-Molekülen an der

Zelloberfläche präsentiert werden [Albert et al. 1998]. In diesem Fall spricht man von *cross presentation*. Die intrazellulären molekularen Mechanismen sind noch unvollständig verstanden. Ein Teil dieser Peptide scheint nach der Prozessierung im endozytischen Kompartiment ins Zytosol auszutreten [Ackerman, Cresswell 2004]. Ein weiterer möglicher Prozess beschreibt den retrograden Transport von internalisierten Antigenen ins ER, von wo sie dann ins Zytosol gelangen und anschließend dem klassischen MHC Klasse I-Weg folgen [Tsai et al. 2002].

Auch der gegenläufige Mechanismus der *cross presentation* wurde beobachtet: Körpereigene Proteine im Zytosol oder in anderen Organellen können mittels Autophagie oder etwa durch den TAP-Transporter in den endozytischen Trakt gelangen und dann nach entsprechender Prozessierung über MHC Klasse II-Moleküle präsentiert werden [Chicz et al. 1993, Wolf & Ploegh 1995]. Bei induzierter Autophagie, ausgelöst durch Mangelernährung, kommt es in Zellen zu einer Änderung des MHC Klasse II-Ligandenrepertoires (Ligandom). Die Präsentation auf MHC Klasse II-Molekülen beinhaltet jetzt vermehrt Peptide intrazellulärer Proteine, die unter Normalbedingungen eigentlich auf MHC Klasse I-Moleküle geladen werden [Nimmerjahn et al. 2003, Dorfel et al. 2005, Paludan et al. 2005]. Peptide von intrazellulären Proteinen und Proteinen aus lysosomaler Quelle werden im Gegensatz zu Peptiden von Membranproteinen und sekretorischen Proteinen deutlich verstärkt präsentiert [Dengjel et al. 2005].

### 1.6.5 Endozytische Proteasen und Antigenprozessierung

Bis heute ist kaum bekannt, welche Proteasen *in vivo* die MHC Klasse II-Liganden generieren [Honey, Rudensky 2003]. Die große Vielfalt der endozytischen Proteasen, ihre relativ geringe und überlappende Substratspezifität, aber auch die nicht überschaubare Anzahl an Antigenen und die verschiedenen Arten der Antigeninternalisierung erschweren eine Aufklärung. Außerdem besteht die Schwierigkeit in der Differenzierung des Einflusses einzelner Proteasen auf die Prozessierung von Ii und Antigen. Der offensichtliche Mangel an spezifischen Anforderungen bei der Prozessierung von Ii kann auch auf die Generierung von MHC Klasse II-Liganden ausgeweitet werden [Trombetta & Mellman 2005].

*In vitro* Studien lassen für Cat D eine Rolle bei der Generierung antigener Peptide vermuten [Rodriguez et al. 1992]. Auch Cat S und Cat B scheinen essentiell für die Präsentation bestimmter Epitope eines Antigens bzw. für die intrazelluläre Degradierung eines Proteinfragments zu sein [Riese et al. 1998, Driessen et al. 2001, Pluger et al. 2002]. Cat B- bzw. Cat D-defiziente murine APC zeigen jedoch eine völlig normale spezifische T-Zellstimulation

gegenüber einer Reihe von Antigenen, Epitopen und H-2 Haplotypen [Deussing et al. 1998]. AEP initiiert und kontrolliert *in vitro* die Generierung von T-Zellepitopen des Tetanus Toxoid C-Fragmentes und von MBP. Daher wird AEP im Moment als das wichtigste Enzym in der MHC Klasse II-assoziierten Antigenpräsentation angesehen [Manoury et al. 1998, Antoniou et al. 2000]. AEP kann jedoch sowohl ein potentielles Epitop generieren als auch es zertören, wie am Beispiel des Autoantigens MBP gezeigt wurde [Manoury et al. 2002]. Im Gegensatz zu EBV-transformierten B-Zellen ist AEP in primären B-Zellen (CD22<sup>+</sup>) jedoch kaum aktiv, stattdessen wird Cat G hier für die Prozessierung von MBP verantwortlich gemacht [Burster et al. 2004].

Über die intrazellulären proteolytischen Vorgänge bei der Antigenprozessierung ist ebenfalls wenig bekannt, wobei im Wesentlichen zwei modellhafte Vorstellungen belegt sind. Wahrscheinlich entspricht die Kombination beider Modelle am ehesten der Realität [Watts et al. 2003]. Beim Protease-unabhängigen Modell des *epitope-guided processing* geht man im Wesentlichen davon aus, dass intakte Antigene nach Internalisierung, Denaturierung und limitierter Proteolyse aufgrund der großen Affinität des immunodominanten Epitopes die MHC Klasse II-Bindungsgrube besetzen, während die N- und C-terminal überhängenden Aminosäuren von Exo- und/oder Endopeptidasen abgebaut werden. Bei diesem Modell sind nur die initialen Prozessierungsschritte von der Spezifität endozytischer Proteasen abhängig. Im *protease-dependent processing*-Modell wird angenommen, dass durch eine kleine Anzahl von Proteasen eine ebenfalls limitierte Proteolyse gemäß ihrer Spezifität stattfindet. Die Degradierungsprodukte gelangen dann im endozytischen Trakt zu weiteren Proteasen anderer Spezifität, bis letztlich ein Peptid entsteht, dessen Translokation in die Peptidbindungsgrube von MHC Klasse II durch HLA-DM katalysiert werden kann. Besitzt dieses Peptid die nötige Bindungsaffinität, verbleibt es dort, während eventuelle Überhänge degradiert werden. Beide Modelle teilen jedoch die Bedeutsamkeit der initialen Schritte bei der proteolytischen Degradierung.

Während in murinen Monozyten Cat Z und Cat B die ersten aktiven Proteasen sind, mit denen phagozytiertes Material in Kontakt kommt, existiert in humanen APC dazu noch keinerlei Information. Das breite pH-Optimum von Cat S und dessen Aktivität im neutralen Bereich lassen eine wichtige Rolle bei den initialen Schritten der Prozessierung von internalisierten Antigenen in DC vermuten.

## 1.7 Reifung Dendritischer Zellen

Eine der komplexesten Spezialisierungen von DC ist der Prozess der Maturation. Unreife DC exprimieren eine relativ kleine Anzahl von MHC Klasse II-Komplexen an der Zelloberfläche, da diese zusammen mit Antigenen in den Lysosomen angereichert werden. Erst im Zuge der Ausreifung von DC wird eine strukturelle Reorganisation induziert, die zu einer effizienten Antigenprozessierung und -präsentation führt [Mellman & Steinman 2001]. Zuerst resultiert daraus ein kurzfristiger Anstieg der Endozytose-Aktivität, gefolgt von einem fast vollständigen Stillstand [West et al. 2004]. Wahrscheinlich sind aber nicht alle Endozytosemechanismen in gleichem Maße betroffen. Während in DC der Hauptteil an gelösten Antigenen mittels Makropinozytose aufgenommen wird, welche in reifen DC fast vollständig zum Erliegen kommt, scheint sich die Aktivierung von DC dagegen nur geringfügig auf die Clathrin-vermittelte Endozytose auszuwirken [Garrett et al. 2000]. Folglich kann wahrscheinlich sogar in reifen DC ein Antigen (zumindest über bestimmte Rezeptoren) internalisiert und nach seiner Prozessierung präsentiert werden.

Ein Maturationstimulus bewirkt die Freisetzung von MHC Klasse II-Komplexen aus den Lysosomen mit anschließendem Transport an die Zelloberfläche, wo es zusätzlich zu einer Anreicherung von kostimulatorischen Molekülen und MHC Klasse I-Komplexen kommt [Chow, Mellman 2005], außerdem verbessert sich die Fähigkeit, MHC Klasse II-Komplexe zu bilden, zu akkumulieren und zu stabilisieren [Trombetta et al. 2003, Cella et al. 1997].

Die endozytische Proteolyseaktivität von DC wird durch die Expression verschiedener Proteaseninhibitoren (p41, Cystatine) begrenzt, wobei vor allem Cystatin C eine wichtige Komponente im endozytischen Kompartiment von unreifen DC darzustellen scheint. Die Induktion der Bildung von MHC Klasse II-Komplexen ist von einer generellen Zunahme der Proteolyseaktivität begleitet. Die Aktivierung der Proteasen erfolgt durch eine Umverteilung in ein früheres Stadium des endozytischen Kompartiments und die Konvertierung zur reifen Form, durch die Absenkung des intravesikulären pH-Wertes. Diese regulierte Aktivierung scheint ein wichtiges Mittel zu sein, um die Antigenpräsentation während der Reifung von DC zu kontrollieren. Dabei wird der pH im endozytischen Kompartiment von 5,5 auf 4,5 abgesenkt, was einen optimalen Wert für Proteolyse und Peptidbeladung darstellt [Trombetta et al. 2003]. Diese Absenkung kommt durch eine gesteigerte Aktivität der Protonen-pumpenden  $H^+$ -ATPase zustande. Neben einer verbesserten Proteolyse wird möglicherweise die Dissoziation von Ii und die Komplexierung auch größerer Peptid-

fragmente erleichtert und die Funktionalität des Beladungshelfers HLA-DM moduliert [Jensen et al. 1991, Avva et al. 1994, Weber et al. 1996].

### **1.8 Autoimmunität - Grundlagen MHC II-assoziiertes Autoimmunerkrankungen**

Die spezifische und unspezifische Immunabwehr muss Fremddantigene effektiv von eigenen Selbstantigenen unterscheiden können. Bei einem Versagen dieses Prinzips der Selbsttoleranz spricht man von Autoimmunität. Dabei greift das Immunsystem die Gewebe und Organe des eigenen Körpers an. Autoimmunerkrankungen können organspezifisch oder systemisch verlaufen und durch humorale (Pemphigus vulgaris, Lambert Eaton-Syndrom) oder auch T-zelluläre Mechanismen (Multiple Sklerose (MS), Typ I-Diabetes (IDDM)) vermittelt sein [Gebe et al. 2002]. Die meisten Autoimmunerkrankungen sind mit einzelnen MHC Klasse II-Allelen assoziiert; diese Assoziation variiert jedoch in einzelnen ethnischen Gruppen. Die Mechanismen sind wahrscheinlich bei den einzelnen Autoimmunerkrankungen unterschiedlich, wie verschiedene murine Modellsysteme implizieren: In der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE), dem Modellsystem für MS, entkommen autoreaktive T-Zellen gegen mit sehr geringer Affinität für den relevanten MHC-Haplotyp bindende Peptide wahrscheinlich der primären Toleranz [Fairchild, Wraith 1996]. Dagegen ist die Stabilität der mit IDDM-assoziierten MHC Klasse II-Komplexe im murinen Modell und auch in der menschlichen Bevölkerung insgesamt reduziert, was letztlich zu einer geringeren Diversität des Peptidrepertoires und zu einer beeinträchtigten zentralen Toleranz führt [Carrasco-Marin et al. 1996, Oono et al. 2001].

Bei der mit HLA-DRB1\*1501, -DRB1\*0101 und -DRB1\*0602-assoziierten MS wandern autoaggressive T-Zellen, die der positiven und negativen Selektion im Thymus entkommen sind, nach ihrer Aktivierung durch APC, insbesondere Mikroglia-Zellen, welche verschiedene Antigene der Myelinscheide, wie z.B. Myelin Basic Protein (MBP) oder Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) präsentieren, in einem mehrstufigen Prozess in das ZNS ein und induzieren dort eine inflammatorische Reaktion. Makrophagen phagozytieren Bestandteile der Myelinscheide und es kommt zu einer Beeinträchtigung der Weiterleitung elektrischer Impulse entlang der Axone [Steinman et al. 1996].



## 1.9 Immunevasion

Mikroorganismen haben eine Vielzahl an Möglichkeiten entwickelt, um der komplexen und vielfältigen Immunität zu entkommen. Neben der Evasion der humoralen unspezifischen Immunabwehr inhibieren sie Signalkaskaden oder manipulieren die Funktionalität der infizierten Zelle. So ist es nicht überraschend, dass auch die MHC Klasse II-assoziierte zelluläre Maschinerie das Ziel von Immunevasionen darstellt. Mit dem Malarioiden *Plasmodium falciparum* infizierte Erythrozyten binden an die Oberfläche von myeliden DC und verhindern die gesteigerte Präsentation von MHC Klasse II- und kostimulatorischen Molekülen an der Zelloberfläche, die mit der Ausreifung von DC einhergeht [Urban et al. 1999]. *Helicobacter pylori* [Molinari et al. 1998] und Mykobakterien [Sturgill-Koszycki et al. 1994] erhöhen nach ihrer Aufnahme den pH in den Phagosomen, die Aktivierung prozessierungsrelevanter Proteasen wird verhindert und folglich auch die Generierung und Präsentation antigener Peptide im Komplex mit MHC Klasse II-Molekülen an der Zelloberfläche.

*Yersinia enterocolitica* (YE), ein gramnegatives pathogenes Bakterium, verfügt über eine Kombination von Pathogenitätsfaktoren, um der Immunabwehr der infizierten Zelle zu entgehen. Diese werden im pYV-Plasmid und chromosomal kodiert. Das pYV-Plasmid, welches das Yop-Virulon beinhaltet, kodiert ein Typ III-Sekretionssystem, wodurch *Yersinia outer proteins* (Yops) ins Zytosol der infizierten Zelle injiziert werden [Cornelis et al. 2002]. YopE, YopT und YopO zerstören das Aktingerüst und verhindern somit die Phagozytose von YE [Black et al. 1997]. Werden murine DC mit YE infiziert, führt dies zu einer reduzierten Präsentation von MHC Klasse II-Komplexen und CD80 an der Oberfläche der befallenen Zelle, begleitet von einer verminderten Fähigkeit zur Aktivierung von T-Zellen [Orth et al. 1999].

Eine Infektion von DC mit HCMV führt zur Suppression der zellulären Immunfunktion. Neben der Reifung von DC werden auch die DC-induzierte T-Zell-Stimulation und die Migration von DC beeinträchtigt [Moutaftsi et al. 2002]. Es kommt zu einer gedrosselten Expression von MHC Klasse I-Molekülen, CD80 und CD40 24 h nach Infektion übereinstimmend mit der frühen Phase der viralen Replikation [Grigoleit et al. 2002]. Zu diesem Zeitpunkt bleibt die Expression von MHC Klasse II-Molekülen noch stabil. 72 h nach Infektion, wenn sich der späte zytopathogene Effekt der produktiven HCMV-Infektion entwickelt hat, ist die Drosselung von MHC Klasse I-Molekülen, CD80 und CD40 noch auffälliger als nach 24 h [Riegler et al. 2000]. Außerdem verringert sich die Oberflächen-

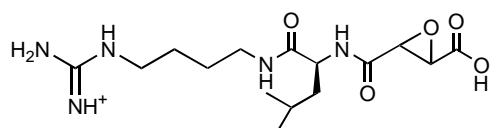
expression von CD86 und MHC Klasse II-Molekülen in der späten Phase der viralen Replikation. Die Menge an totaler zellulärer MHC Klasse II $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette bleibt im *steady state* (bis 72 h nach Infektion) weiterhin gleich. Somit kommt es zu keiner Abnahme an MHC Klasse II-Molekülen während des kompletten replikativen Zyklus der Infektion. Das von HCMV kodierte Glykoprotein US3 behindert die Oberflächenexpression von MHC Klasse II-Molekülen, indem es die invariante Kette von  $\alpha\beta$ -Komplexen im ER austauscht und es deswegen zu einem fehlerhaften intrazellulären Transport kommt [Hegde et al. 2002]. Das phosphorylierte Protein pp 65 induziert die lysosomale Prozessierung der HLA-DR $\alpha$ -Kette. Das Glykoprotein US2, welches erst in der späten Phase der viralen Infektion exprimiert wird, vermittelt einen Export der  $\alpha$ -Kette von HLA-DR und HLA-DM aus dem ER ins Zytosol, wo sie dann durch das Proteasom degradiert wird [Tomazin et al. 1999]. US2 wird erst exprimiert, wenn die Oberflächenexpression von MHC Klasse II-Molekülen bereits gedrosselt wurde. Eine HCMV-Infektion beeinflusst außerdem die Biosynthese von MHC Klasse II-Molekülen, welche während der späten Phase der viralen Replikation zum Erliegen kommt. Insgesamt wird die Generierung funktioneller MHC Klasse II-Moleküle und somit eine wirksame Immunabwehr verhindert.

### **1.10 Proteaseninhibitoren und ihre Anwendung als analytische Werkzeuge**

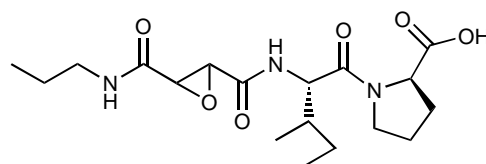
Bei der Analyse des proteolytischen Systems im endozytischen Kompartiment besteht ein wesentliches Problem darin, dass sich die Aktivität der Cathepsine nicht von der RNA- oder Proteinexpression ableiten lässt, da sie entscheidend von weiteren Parametern wie subzellulärem Transport, Aktivierung der Zymogene, pH-Wert, Redoxpotentialen und endogenen Inhibitoren abhängt. Deshalb ist eine Untersuchung in intakten lebenden Zellen erforderlich, da eine Zellyse das System des endozytischen Kompartiments zerstört, obige Regulationsmechanismen außer Kraft setzt und sich zusätzlich die Aktivität von Cathepsinen durch Exposition gegenüber zytosolischen Inhibitoren (Steifinen) verringert. Mit Hilfe des hochkonservierten und im Detail bekannten katalytischen Mechanismus der Proteolyse von Cystein- und Serinproteasen bietet sich die Möglichkeit, die Aktivität von Cathepsinen zu untersuchen und gegebenenfalls auch zu manipulieren. Zu diesem Zweck finden chemisch modifizierte Inhibitoren Verwendung, die neben ihrer inhibitorischen Funktion zusätzlich über eine Detektionsdeterminante zur Darstellung der Aktivität gebundener Proteasen verfügen. Diese Methode wird u.a. Affinitätsmarkierung (*active site-specific labelling*, ASL) genannt.

Es existiert eine Vielzahl von verschiedenen Inhibitorenklassen, neben *active site-directed*, *mechanism-based*, *tight-binding* und *slow-binding* Inhibitoren gibt es *affinity labels*, *suicide substrates*, *transition-state analogs* und *deadend* Inhibitoren [Otto & Schirmeister 1997]. Ihre grundlegende Einteilung basiert darauf, ob der Inhibitor mit dem aktivem Zentrum (*active site-directed*) oder einem anderen Bereich des Enzyms (*allosteric effectors*) interagiert. Inhibitoren, welche im aktiven Zentrum angreifen, können weiter unterteilt werden in kovalente/nicht-kovalente und irreversible/reversible Inhibitoren. Irreversible Inhibitoren (Inaktivatoren) gehen mit dem Enzym immer eine kovalente Bindung ein. Der Begriff *affinity label* oder *active site-directed* Inhibitor steht für ein Reagenz, welches über eine reaktive chemische Gruppe verfügt und das aktive Zentrum des Enzyms irreversibel inhibiert [Page et al. 1990]. Reagiert diese Substanz mit entsprechenden funktionellen Gruppen anderer Moleküle, bezeichnet man sie als *chemically reactive affinity label*. Besitzt das Reagenz jedoch keinerlei Aktivität gegenüber nicht-enzymatischen Molekülen, wird es *quiescent affinity label* genannt. Das übliche strukturelle Schema besteht in einem Peptidsegment aus ein oder zwei Aminosäuren, das ein gutes Enzymsubstrat darstellt, und eine daran gebundene nukleophil substituierbare Gruppe (ein alkylierendes Reagenz), welche im Fall von Papain-ähnlichen Cysteinproteasen mit dem Cysteinrest des aktiven Zentrums reagieren kann. Die Peptidsequenz ist unerlässlich zur Bildung des nicht-kovalenten Enzym-Inhibitorkomplexes, der ersten reversiblen Phase der Inhibition, und für die Stabilität.

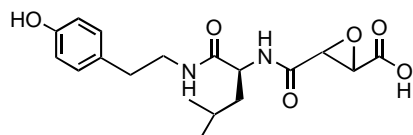
Die gebräuchlichsten Inhibitoren der Papain-ähnlichen Cathepsine werden aufgrund ihres reaktiven Elements u.a. in Epoxide (E-64, CA-074), Vinylsulfone (LHVS) sowie Chloromethylketone und Diazomethane (Z-Tyr-Ala-CHN<sub>2</sub>) unterteilt (Abb. 1-4). Die bedeutendste Gruppe, die Epoxysuccinyl-Derivate, inhibiert zumindest unter physiologischen Bedingungen nur Cysteinproteasen und keine Serinproteasen, da die SH-Gruppe des Cysteins eine größere Nucleophilität besitzt als unter diesen Bedingungen inerte OH-Gruppen. Die Reaktivität der Inhibitoren muss außerdem hinreichend gering sein, damit sie gegenüber katalytisch irrelevanten Thiolgruppen oder essentiellen SH-Gruppen nicht-hydrolytischer Enzyme inert sind, denn geringere Reaktivität resultiert in höherer Selektivität. Da Cysteinproteasen, insbesondere Cathepsine, über sehr ähnliche Spezifitäten verfügen, gibt es bis heute nur sehr wenige Inhibitoren, die selektiv eine einzige individuelle Protease inhibieren, wie z.B. das mit *Molecular Modeling* entwickelte CA-074, ein äußerst spezifischer Inhibitor von Cat B [Sumiya et al. 1992].



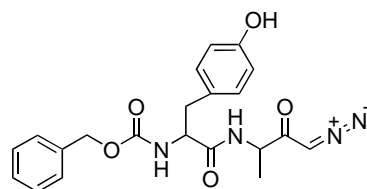
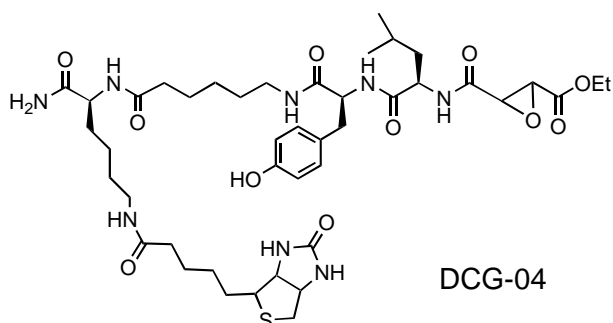
E-64



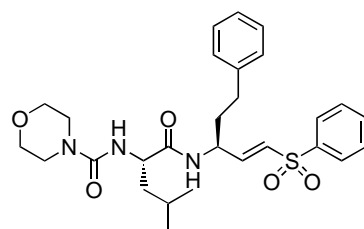
CA-074



JPM-565

Z-Tyr-Ala-CHN<sub>2</sub>

DCG-04



LHVS

**Abb. 1-4:** Verschiedene Inhibitoren Papain-ähnlicher Cathepsine und deren Affinitätsderivate

Dieser Selektivitätsnachteil wird jedoch bei der Verwendung ihrer Derivate (*active site-directed probe*, ASDP) zur Darstellung von Aktivitäten zu einem großen Vorteil: Gerade weil diese Inhibitoren nicht sehr spezifisch sind und die Aktivität verschiedener Cysteinproteasen blockieren, erlaubt dies eine vergleichende Darstellung aller detektierbaren Proteasen einer Probe. Das Vorhandensein einer phenolischen Gruppe bei JPM-565, Z-Tyr-Ala-CHN<sub>2</sub> oder LHVS ermöglicht die Markierung mit [<sup>125</sup>I], wodurch die gebundenen Polypeptide mittels SDS-PAGE und Autoradiographie visualisiert werden können. Im Gegensatz zum Western Blot, bei dem die Detektion über Antikörper erfolgt, welche gegen eine bestimmte Peptidsequenz der Protease gerichtet sind, werden bei dieser Affinitätsmarkierung ausschließlich aktive Proteasen dargestellt. Obwohl AEP ebenfalls eine Cysteinprotease ist, gehört sie nicht zur Familie der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen, wird deshalb durch E-64 nicht gehemmt und ist infolgedessen auch mit Hilfe seiner Affinitätsderivate nicht detektierbar. Zur Detektion der Aktivität von Serinproteasen existieren für die gebräuchlichen Inhibitoren, wie z.B. den Sulfonsäurefluoriden AEBSF und PMSF, bis heute noch keine Modifikationen, jedoch wird die Verwendung der Phosphonsäurederivate DAP oder FP-Peg-

Biotin in der Literatur beschrieben [Abuelyaman et al. 1997, Kidd et al. 2001]. Das biotinylierte E-64-Derivat DCG-04 [Greenbaum et al. 2000] bietet zusätzlich die Möglichkeit der Kopplung an andere Moleküle wie Antikörper oder Proteine oder der Isolierung und somit Identifikation noch unbekannter Proteasen. Folglich ist eine vergleichende Aktivitätsdarstellung verschiedener Lysate oder intakter Zellen möglich. Die Menge an gebundenen ASDP korreliert mit der Signalintensität im Aktivitätsblot. Verschiedene Bandenintensitäten einer einzelnen Protease entsprechen direkt unterschiedlicher Mengen aktiver Proteasen. Dies ermöglicht den direkten semiquantitativen Mengenvergleich aktiver Proteasen in verschiedenen Proben (*functional proteomics*). Die Anwendung verschiedener spezifischer Inhibitoren, rekombinater Proteasen mit gleichen Laufeigenschaften im Gel oder die Identifizierung von Proteasen mittels Immunoprecipitation, anschließender Sequenzierung und Massenspektrometrie garantieren die Zuordnung einzelner Banden des Aktivitätsblots.

Eine bedeutende Anwendungsmöglichkeit der ASDP ist die bereits angesprochene Untersuchung von intakten Zellen. Indem die Moleküle mit dort vorhandenen aktiven Proteasen interagieren und kovalent in das aktive katalytische Zentrum binden, kann Proteasenaktivität auch in einzelnen Subkompartimenten intakter Zellen semiquantitativ dargestellt und analysiert werden [Lennon-Duménil et al. 2002].

### 1.11 Zellpenetrierende Peptide

Eine Gruppe kleiner zellpenetrierender, meist kationischer Peptide (CPP) gelangt in die Zelle, indem sie die Zellmembran direkt passiert. Diese spontane Permeabilisierung erfolgt generell frei von energie- und temperaturabhängigen Aufnahmemechanismen oder Rezeptor-vermittelter Aufnahme [Derossi et al. 1994, Futaki et al. 2001, Thoren et al. 2000]. Aktuelle Publikationen diskutieren, dass der größte Anteil dieser Moleküle, je nach Kategorie, über aktive Endozytose in die Zelle gelangt [Conner, Schmid 2003]. Verschiedene Mechanismen der Penetration bzw. Aufnahme über Endozytose resultieren aber auch in einem unterschiedlichen Transport innerhalb der Zelle. Zu den bekanntesten Vertretern gehören neben Tat aus dem HIV-1 Tat-Protein, das aus *Drosophila antennapedia* gewonnene Penetratin, verschiedene Oligoarginin-Peptide (z.B. R9) und Transportan [Vives et al. 1997, Derossi et al. 1994, Futaki et al. 2001, Pooga et al. 1998]. Ihre Unterteilung erfolgt in verschiedene Kategorien, u.a. in kationische, antimikrobielle, amphiphatische, hydrophobe, prolinreiche oder eben Polyarginin-enthaltende CPP. CPP werden inzwischen immer häufiger als Transportmittel (*carrier*) verwendet, um Peptide oder sogar vollständige Proteine in die Zellen einzuschleusen [Schutze-Redelmaier et al. 1996, Schwarze et al. 1999, Hawiger et al.

1999]. Sie könnten ferner ein Hilfsmittel darstellen, um den Transport von Antigenen oder Inhibitoren in das MHC Klasse II-Kompartiment zu untersuchen und die Rolle dort lokalisierter prozessierungsrelevanter Proteasen offen zu legen.

### **1.12 Proteasen als Ziel therapeutischer Intervention bei Autoimmunerkrankungen**

Ein möglicher Ansatz zur selektiven Eliminierung einer MHC Klasse II-vermittelten Autoimmunreaktion versucht die Induktion von Toleranz gegen das betreffende Epitop zu erreichen. Dies kann *in vivo* jedoch nur bei *natürlichen Epitopen* geschehen, die tatsächlich bei der Prozessierung in primären APC entstehen und folglich auch präsentiert werden, was bei *kryptischen Epitopen* dagegen nicht der Fall ist [Anderton et al. 2002]. Hier stellt das Verständnis der Prozessierung intakter Autoantigene in primären APC den Schlüssel zur Auswahl tolerogener wirkender Peptide zur Induktion von Toleranz bei Autoimmunerkrankungen *in vivo* dar.

Eine weitere Strategie beschäftigt sich mit der selektiven Blockierung der MHC Klasse II-vermittelten Antigenpräsentation. Dies kann entweder unabhängig vom Antigen geschehen, indem die Prozessierung von Ii verhindert und damit die Peptidbeladung und eventuelle Oberflächenexpression von MHC Klasse II-Molekülen unterdrückt wird, vielversprechender scheint aber die Manipulation endozytischer Proteasen *in vivo*. Dazu müssten die für die Generierung des Autoepitopes verantwortlichen Proteasen in einer antigenspezifischen Strategie identifiziert werden, um sie dann mittels pharmakologischer Applikation geeigneter Proteaseninhibitoren gezielt zu inaktivieren. Die dritte Möglichkeit geht unabhängig von der Funktion endozytischer Proteasen vor, indem sie versucht, die Bindung antigener Peptide an den MHC zu verhindern. Dies ist durch die Verwendung von Peptidanaloga vorstellbar, die selbst mit hoher Affinität die Antigen-Bindungsstelle besetzen und das antigene Epitop verdrängen. Eine kombinierte Anwendung solcher Kompetitoren und Cathepsin-Inhibitoren verspricht möglicherweise den größten Erfolg.

Der therapeutische Einsatz von Cathepsin-Inhibitoren bei Autoimmunerkrankungen wäre eine logische Konsequenz aus tierexperimentellen Daten der letzten Jahre: Cat S-k.o. Mäuse bilden keine Keimzentren nach der Immunisierung mit T-zellabhängigen Antigenen [Shi et al. 1999], gleichzeitig sind diese Tiere resistent gegenüber einer Kollagen-induzierten Arthritis, einem Modellsystem der Rheumatoiden Arthritis [Nakagawa et al. 1999] und der experimentellen autoimmunen Myasthenia Gravis (EAMG) [Yang et al. 2005]. In einem anderen Modell wurde durch Inhibition von Cat S *in vivo* eine pulmonale Hypersensibilitätsreaktion blockiert, ohne nachweisbare Toxizitäten zu induzieren [Riese et al. 1998].

Die Inhibition der gleichen Protease konnte im Tiermodell des Sjögren-Syndroms die Erkrankung sogar nach deren Ausbrechen stoppen [Saegusa et al. 2002]. Weder bei den Tiermodellen der Multiplen Sklerose noch der Rheumatoiden Arthritis ist der therapeutische Einsatz von Cathepsininhibitoren bisher getestet worden.

Für den Einsatz von Cathepsininhibitoren, insbesondere Cat S, zur experimentellen Therapie von MHC Klasse II-vermittelten Autoimmunerkrankungen beim Menschen fehlen bisher jedoch noch grundlegende Informationen zu den einzelnen Cathepsinen in Bezug auf Aktivität, Funktion und Biologie in humanen APC.

### 1.13 Fragestellung

Wegen der hohen medizinischen Relevanz wurde in den letzten Jahren sehr viel auf dem Gebiet der Prozessierung von Antigenen und der anschließenden Präsentation generierter Peptide auf MHC Klasse II-Molekülen geforscht. Jedoch ist das Wissen über die zugrunde liegenden Mechanismen noch sehr unvollständig. Auch die Beteiligung und die Abfolge verschiedener endozytischer Proteasen an der Prozessierung internalisierter Antigene sind vor allem in humanen APC, besonders in DC, deren Rolle in diesem Kontext immer wichtiger wird, erst fragmentarisch bekannt. Die im Mausmodell erarbeiteten Grundlagen des Zusammenhangs zwischen der Aktivität endozytischer Proteasen, des subzellulären Transportes im MHC Klasse II-Kompartiment und der MHC Klasse II-assoziierten Antigenprozessierung sollen auf ihre Gültigkeit im Humansystem überprüft und ihr Verständnis vertieft werden. Insbesondere soll die funktionelle Rolle einzelner, nicht-redundanter proteolytischer Aktivitäten für Transport und Prozessierung eines gegebenen MHC Klasse II-abhängigen Antigens im Modell untersucht werden. Dadurch sollen langfristig neue therapeutische Konzepte zur selektiven Beeinflussung MHC Klasse II-vermittelter Autoimmunreaktionen entwickelt werden.

Für diese Arbeit werden folgende Teilziele formuliert:

Ziel 1: Synthese von Affinitätsverbindungen zur Aufklärung der Rolle von Cystein- und Serinproteasen im MHC Klasse II-Kompartiment von humanen APC

Ziel 2: Analyse von Aktivität, Funktion und Regulation von Cystein- und Serinproteasen in APC bei verschiedenen biologischen Fragestellungen

Ziel 3: Ermittlung der sequentiellen Exposition eines Antigens gegenüber endozytischen Proteasen *in vivo*

Ziel 4: Einsatz eines selektiven Inhibitors endozytischer Proteasen zur Therapie von Autoimmunerkrankungen



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### Antikörper

Cat B	rabbit- $\alpha$ -human (1:5000)	Ekkehard Weber (Halle)
Cat L (33/1)	mouse- $\alpha$ -human (1:5000)	Ekkehard Weber (Halle)
Cat S	rabbit- $\alpha$ -human (1:7500)	Ekkehard Weber (Halle)
Cat H	rabbit- $\alpha$ -human (1:5000)	Ekkehard Weber (Halle)
Cat Z	goat- $\alpha$ -human (1:500)	(R&D)
Cat D	rabbit- $\alpha$ -human (1:5000)	Ekkehard Weber (Halle)
Cat C	rabbit- $\alpha$ -human (1:200)	(Santa Cruz)
AEP	sheep- $\alpha$ -human (1:10000)	Collin Watts (Dundee)
LAMP-1	rabbit- $\alpha$ -human (1:5000) LAMP <sub>405-416</sub> (GRKRSHAGYQTI)	AG Kalbacher
GAPDH	rabbit- $\alpha$ -human (1:1000)	Acris
$\beta$ -Aktin	mouse- $\alpha$ -human (1:24000)	Sigma
goat- $\alpha$ -rabbit-F <sub>ab</sub> -POD		Dianova
donkey- $\alpha$ -sheep-POD		Dianova
rabbit- $\alpha$ -goat-POD		Dianova
goat- $\alpha$ -mouse-POD	(alle 1:10000)	Dianova

#### Inhibitoren

Chloroquin	(100 $\mu$ M, MW 515,9 g/mol)	Applichem
NH <sub>4</sub> Cl	(50 mM, MW 53,4 g/mol)	Merck
Con B	(20 nM)	Hidde Ploegh (Boston)
Cyto D	(20 $\mu$ g/ml, MW 507,6 g/mol)	Alexis
EIPA	(100 $\mu$ M, MW 299,8 g/mol)	Sigma
CPZ	(10 $\mu$ g/ml, MW 355,3 g/mol·HCl)	Sigma
M $\beta$ CD	(5 mM, MW 1320 g/mol)	Sigma
Wortmannin	(100 nM, MW 428,4 g/mol)	Sigma
Aprotinin	(6 $\mu$ M, MW 6511,4 g/mol, bovin)	Sigma
EDTA	(4 mM, MW 292,2 g/mol)	Sigma
Leupeptin	(1 mM, MW 663,0 g/mol·HCl)	Serva
Iodacetamid (IAA)	(50 mM, MW 185,0 g/mol)	Applichem
E-64	(10-20 $\mu$ M, MW 357,4 g/mol)	Serva
E-64d	(20 $\mu$ M, MW 342,4 g/mol)	Serva

JPM-565	(10 $\mu$ M, MW 367 g/mol)	Hidde Ploegh (Boston)
CA-074	(1 $\mu$ M, MW 383,4 g/mol)	Hidde Ploegh (Boston)
Z-Tyr-Ala-CHN <sub>2</sub>	(10 $\mu$ M, MW 394 g/mol)	Hidde Ploegh (Boston)
DCG-04	(10 $\mu$ M MW 903,1 g/mol)	Synthese nach [Greenbaum et al. 2000]
LHVS	(20 nM, MW 536 g/mol)	Synthese modifiziert nach [Palmer 1995, Weiberth 1999]
DCG-0N	(10 $\mu$ M, MW 919,1 g/mol)	(s. Methodenteil 2.2)
PS457	(10 $\mu$ M, MW 2421,9 g/mol)	[Reich et al. 2006]
BAEBSF	(10 $\mu$ M, MW 542,7 g/mol)	Paul van Swieten
Z-AENK	(2 mM, MW 593,3 g/mol)	Hubert Kalbacher

**Substrate**

Z-VAN-AMC	(10 $\mu$ M, MW 593,6 g/mol)	Bachem
Z-FR-AMC	(10 $\mu$ M, MW 649,1 g/mol·HCl)	Bachem

**Sonstiges**

Biotin	Sigma
Streptavidin	Jackson Immunoresearch
StreptavidinCy5	Jackson Immunoresearch
Streptavidin-Microbeads	Miltenyi Biotec
Streptavidin-Latexpartikel	Polysciences Inc.
Streptavidin-LatexpartikelYG	Polysciences Inc.
OVA-FITC	Sigma
Staph A	Tobias Kessler

Alle weiteren Chemikalien, Puffer, Materialien und Geräte sind im Methodenteil unter dem jeweiligen Kapitel zu finden. Der Begriff Wasser (H<sub>2</sub>O) wird für deionisiertes Wasser aus einer Millipore-Anlage verwendet.

## 2.2 Synthese des E-64-Analogons DCG-0N

Die verwendeten Lösungsmittel wurden alle im Reinheitsgrad p.a. von der Firma Biosolve bezogen. Die Fmoc-geschützten Aminosäuren und das Rinkamid-MBHA-Harz (0,78 mmol/g) waren von NovaBiochem. Fmoc-Lys(Mtt)-OH war von Senn Chemicals, für die SPPS wurde ein variabler 180°-Schüttler (St. John Associates Inc.) verwendet. LC/MS-Analyse wurde auf einem Jasco HPLC-System mit simultaner Detektion bei 214 und 254 nm durchgeführt. Die HPLC war direkt an ein Massenspektrometer (Perkin Elmer Sciex API 165) mit einem Elektro-Spray-Interface (ESI) gekoppelt. Zur Auftrennung wurde eine analytische Säule (Alltima C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße, Alltech) verwendet. Die Aufreinigung der Peptide wurde an einer automatischen RP-HPLC (Biocad Vision, PerSeptive Biosystems Inc.) unter Verwendung von Puffer A (H<sub>2</sub>O), B (Acetonitril) und C (0,5% TFA in H<sub>2</sub>O) durchgeführt. Zur Synthesekontrolle der Epoxid- und Azidbausteine wurden <sup>1</sup>H-NMR-Spektren an einem 600 MHz-Spektrometer (Bruker DMX 600) mit chemischen Verschiebungen (δ) relativ zu Tetramethylsilan aufgenommen.

Der komplette Syntheseteil der vorliegenden Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Herman Overkleeft am Chemischen Institut der Universiteit Leiden in den Niederlanden durchgeführt.

### Epoxidbaustein BB1

*Komponente (2)*: a) Eine 30%ige HBr-Lösung in 50 ml Essigsäure wurde zu 5,6 ml (33 mmol) Diethyl-D-tartrat (*1*) gegeben und 1 h bei 0°C gerührt (s. Abb. 3-1).

b) Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt, schließlich in 250 ml Eiswasser gegossen und dreimal mit je 250 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden je zweimal mit H<sub>2</sub>O und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, mit MgSO<sub>4</sub> entwässert, filtriert und unter reduziertem Vakuum am Rotationsverdampfer aufkonzentriert.

*Diethyl (2R,3S)-2-bromo-3-hydroxybutandioat (3)*: Zu (*2*) gelöst in 35 ml Diethylether, wurde eine 30%ige HBr-Lösung in 20 ml Essigsäure gegeben und das Reaktionsgemisch 4 h unter Rückfluss erhitzt. Der Reaktionsumsatz wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Anschließend wurde der größte Anteil der Essigsäure mit Hilfe von Toluol am Rotationsverdampfer unter reduziertem Vakuum abgezogen. Das zurückbleibende gelbliche Öl wurde in Ethylacetat (Essigsäureethylester) gelöst, mit H<sub>2</sub>O, gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, mit MgSO<sub>4</sub> entwässert, filtriert und unter reduziertem Vakuum am Rotationsverdampfer aufkonzentriert. Nach Aufreinigung über eine SiO<sub>2</sub>-Säule

(16-25% Ethylacetat-Petrolether) wurden 4,6 g der Komponente (3) erhalten (17,0 mmol, 51,5%).

*Diethyl(2R,3S)-oxiran-2,3-dicarboxylat (4)*: DBU (2,75 ml, 18,4 mmol, 1,1 eq) wurde zu einer Lösung von (3) (4,5 g, 16,7 mmol, 1 eq) in 25 ml Ether getropft. Der Reaktionsumsatz wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach 30 min. wurde das Reaktionsgemisch zur Abtrennung der festen Bestandteile filtriert, das Filtrat zweimal mit Citratpuffer (pH 3) und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die Etherphase wurde mit MgSO<sub>4</sub> entwässert und erneut filtriert. Nach Aufreinigung über eine SiO<sub>2</sub>-Säule (9-13% Ethylacetat-Petrolether) wurden 1,86 g der Komponente (4) erhalten (9,65 mmol, 52,6%).

*Ethyl(2R,3S)-oxiran-2,3-dicarboxylat (5)*: Zu einer Lösung von (4) (0,4 g, 2,1 mmol) in 11 ml Ethanol wurde langsam KOH (2,13 ml, 1 M in Ethanol) bei 4°C zugegeben. Nach 3 h wurde das Reaktionsgemisch eine weitere Stunde bei RT gerührt, bis die komplette Hydrolyse des Diethylesters mittels Dünnschichtchromatographie nachweisbar war. Nun wurde das Ethanol am Rotationsverdampfer unter reduziertem Vakuum abgezogen, der Rückstand in H<sub>2</sub>O gelöst und zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 3 M HCl angesäuert (pH 1-2) und viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einem 1:1 Gemisch aus gesättigter Kochsalzlösung und 1 M HCl extrahiert, mit MgSO<sub>4</sub> entwässert, filtriert und im Vakuum am Rotationsverdampfer aufkonzentriert. Das zurückgebliebene farblose Öl (357 mg, 2,1 mmol, quantitativ) wurde ohne Aufreinigung weiterverwendet [modifiziert nach Mori et al. 1980].

### **Azidbaustein BB2**

*4-(Trityloxy)-butan-1-ol (7)*: Zu einer Mischung aus 1,4-Butandiol (6) (555 mmol, 50 g, 2 eq) und wasserfreiem Triethylamin (156 mmol, 21,7 ml) wurde Tritylchlorid (TrCl, 100 mmol, 28 g) zugegeben, das Reaktionsgemisch anschließend auf 50°C erhitzt und über Nacht unter Verwendung eines CaCl<sub>2</sub>-Trockenrohrs gerührt (s. Abb. 3-2). Nach Beendigung der Reaktion (Kontrolle mittels Dünnschichtchromatographie) wurden zu dem auf RT abgekühlten Reaktionsgemisch 500 ml Ethylacetat gegeben und das Ganze schließlich in 500 ml H<sub>2</sub>O gegossen. Die organische Phase wurde von der wässrigen Phase abgetrennt, welche zweimal mit Ethylacetat (700 ml) extrahiert wurde. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen zweimal mit H<sub>2</sub>O (700 ml), einmal mit NaHCO<sub>3</sub> (500 ml) gewaschen, mit MgSO<sub>4</sub> entwässert, filtriert und unter reduziertem Vakuum am Rotationsverdampfer aufkonzentriert. Das Rohprodukt wurde mit Ammoniak trituriert, unter geringem Vakuum am Rotations-

verdampfer aufkonzentriert und über eine SiO<sub>2</sub>-Säule (17% Ethylacetat-Petrolether) aufgereinigt (30,3 g, 93,7 mmol, 91%).

*4-Trityloxybutyl-(4-methylbenzol)sulfonat (8)*: Zu einer Mischung aus **(7)** (14 mmol, 5 g) in Triethylamin (495 mmol, 69 ml) wurde eine Lösung mit einer katalytischen Menge DMAP und DIPEA (je 23,5 mmol, 4 ml) gegeben. Eine Lösung von Tosylchlorid (TosCl, 18 mmol, 3,43 g) in DCM (57 ml) wurde bei 0°C zugetropft (Trockenrohr mit CaCl<sub>2</sub>). Nach Beendigung der Reaktion (Kontrolle mittels Dünnschichtchromatographie) wurden Triethylamin, DMAP und DIPEA unter reduziertem Vakuum am Rotationsverdampfer abgezogen. Das Rohprodukt wurde in 150 ml Ethylacetat gelöst und die organische Phase wurde mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden zweimal mit Ethylacetat gewaschen (100 ml). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO<sub>4</sub> entwässert, filtriert und unter reduziertem Vakuum am Rotationsverdampfer aufkonzentriert. Nach Aufreinigung über eine SiO<sub>2</sub>-Säule (11% Ethylacetat-Petrolether) wurden 6,4 g der Komponente **(8)** erhalten (13,3 mmol, 95%).

*4-Azidobutyl-tritylether (9)*: Zu einer Mischung aus **(8)** (0,72 mmol, 0,35 g) in 5 ml DMF wurde bei 0°C NaN<sub>3</sub> (0,94 mmol, 61 mg) gegeben. Nach Beendigung der Reaktion (Kontrolle mittels Dünnschichtchromatographie) wurde das DMF am Rotationsverdampfer abgezogen. Das Rohprodukt wurde in 20 ml Diethylether gelöst und in 15 ml H<sub>2</sub>O gegossen. Die organische Phase wurde dreimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen, dann wurden die vereinigten wässrigen Phasen zweimal mit Diethylether gewaschen (15 ml), mit MgSO<sub>4</sub> entwässert, filtriert und unter reduziertem Vakuum am Rotationsverdampfer aufkonzentriert (0,71 mmol, 0,26 g, quantitativ).

*4-Azidobutan-1-ol (10)*: Zu einer Mischung aus **(9)** (0,59 mmol, 0,21 g) in 10 ml DCM wurde unter Rühren bei RT TES und TFA (je 1,3 mmol, 0,1 ml) gegeben. Die Lösung wurde unter Schütteln durch Zugabe von wässriger NaHCO<sub>3</sub> neutralisiert. Die organische Phase wurde abgetrennt und dreimal mit wässriger NaHCO<sub>3</sub> gewaschen, dann wurden die vereinigten wässrigen Phasen zweimal mit Ethylacetat gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit MgSO<sub>4</sub> entwässert, filtriert und unter reduziertem Vakuum am Rotationsverdampfer aufkonzentriert. Nach Aufreinigung über eine SiO<sub>2</sub>-Säule (Ethylacetat-Petrolether) wurden 56 mg der Komponente **(10)** erhalten (0,49 mmol, 83%).

*tButyl-(4-azidobutoxy)acetat (11)*: Die Komponente **(10)** (0,33 mmol, 38 mg) wurde in 3 ml Toluol aufgenommen. Dann wurde *t*Butylbromoacetat (1,32 mmol, 0,19 ml), eine Lösung aus 50%iger NaOH (0,8 ml), Tetrabutylammoniumbromid (Bu<sub>4</sub>NBr, 0,033 mmol, 11 mg) und

einer katalytischen Menge Tetrabutylammoniumiodid ( $\text{Bu}_4\text{NI}$ ) unter Rühren bei RT zugegeben. Nachdem die Durchführung wiederholter Dünnschichtchromatographie eine komplette Umsetzung von (**10**) bestätigte, wurde die Reaktion durch die Zugabe von 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöscht. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Toluol (5 ml) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Ammoniumchloridlösung, gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen (jeweils 10 ml), mit  $\text{MgSO}_4$  entwässert, filtriert und unter reduziertem Vakuum am Rotationsverdampfer aufkonzentriert. Nach Aufreinigung über eine  $\text{SiO}_2$ -Säule (Toluol) wurden 46 mg der Komponente (**11**) erhalten (0,2 mmol, 61%).

*4-Azidobutoxyessigsäure (12)*: Die Komponente (**11**) (2,28 mmol, 0,52 g) wurde in 8 ml DCM gelöst und 1,7 ml TFA (23 mmol) unter Rühren bei RT zugegeben. Nach der Umsetzung von (**11**) wurden DCM und TFA im Vakuum abgezogen. Verbliebenes DCM und TFA wurden mit Hilfe von Toluol (2x 10 ml), Ethylacetat (2x 15 ml) und Diethylether (2x 20 ml) abgezogen. Nach Aufreinigung über eine  $\text{SiO}_2$ -Säule (20% Ethylacetat-Petrolether, anschließend 2% Essigsäure-Ethylacetat) wurden 0,32 g der Komponente (**12**) erhalten (1,84 mmol, 81%) [modifiziert nach Alewood & Benn 1974].

### **Festphasensynthese von DCG-0N**

#### **A**

0,64 g RinkNH-Fmoc-Harz (0,5 mmol, Beladung 0,78 mmol/g) wurde zur Quellung 1 h in 5 ml NMP geschüttelt und anschließend fünfmal mit NMP gewaschen (s. Abb. 3-3).

1. 5 ml einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF wurden zu dem gequollenen Harz in das Reaktionsgefäß gegeben und 20 min. geschüttelt. Das Harz wurde fünfmal mit NMP gewaschen. Die Durchführung des Kaisertests (s. unten) bestätigte die Anwesenheit freier Aminogruppen infolge der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe.

2. Fmoc-Lys(Mtt)-OH (624,8 mg, 1 mmol, 2 eq), PyBOP<sup>®</sup> (442,3 mg, 1 mmol, 2 eq) und DIPEA (196,3  $\mu\text{l}$ , 1,2 mmol, 2,4 eq) wurden 5 min. in 4 ml NMP voraktiviert und dann zum Harz gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h geschüttelt, bis der Kaisertest die Vollständigkeit der Kupplung bestätigte.

3. Das Harz wurde mit DCM und anschließend mit Methanol gewaschen. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Dann wurde das Harz mit DCM und anschließend mit Diethylether gewaschen. Auch dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. 10 ml einer 1%igen TFA-Lösung in DCM wurden zum Harz gegeben und 10 min. geschüttelt. Dieser

Schritt wurde solange wiederholt, bis die Lösung farblos blieb. Nun wurde das Harz zweimal mit 5 ml 10% DIPEA in NMP gewaschen.

4. Biotin (244 mg, 1 mmol, 2 eq), PyBOP<sup>®</sup> (442,3 mg, 1 mmol, 2 eq) und DIPEA (196,3  $\mu$ l, 1,2 mmol, 2,4 eq) wurden 5 min. in 4 ml NMP voraktiviert und dann zum Harz gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht geschüttelt. Der am nächsten Tag durchgeführte Kaisertest bestätigte die Vollständigkeit der Kupplung.

## B

1. 5 ml einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF wurden zum Harz in das Reaktionsgefäß gegeben und 20 min. geschüttelt. Das Harz wurde fünfmal mit NMP gewaschen.

2. Der Azidbaustein BB2 (117 mg, 1 mmol, 2 eq), PyBOP<sup>®</sup> (442,3 mg, 1 mmol, 2 eq) und DIPEA (196,3  $\mu$ l, 1,2 mmol, 2,4 eq) wurden 5 min. in 4 ml NMP voraktiviert und dann zum Harz gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht geschüttelt. Der am nächsten Tag durchgeführte Kaisertest bestätigte die Vollständigkeit der Kupplung.

## C

Das Harz wurde fünfmal mit 1,4-Dioxan gewaschen. Ein Gemisch aus H<sub>2</sub>O (2ml) und Dioxan (8 ml) mit (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>P (3 ml, 6 eq) wurde zum Harz gegeben und 45 min. geschüttelt. Das Harz wurde dreimal mit 1,4-Dioxan gewaschen, dann je dreimal abwechselnd mit DCM und Methanol. Schließlich wurde das Harz dreimal mit DMF gewaschen. Die Durchführung des Kaisertests bestätigte die Anwesenheit freier Aminogruppen.

## D

1. Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH (459,6 mg, 1 mmol, 2 eq), PyBOP<sup>®</sup> (442,3 mg, 1 mmol, 2 eq) und DIPEA (196,3  $\mu$ l, 1,2 mmol, 2,4 eq) wurden 5 min. in 4 ml NMP voraktiviert und dann zum Harz gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht geschüttelt. Der am nächsten Tag durchgeführte Kaisertest bestätigte die Vollständigkeit der Kupplung.

2. 5 ml einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF wurden zum Harz in das Reaktionsgefäß gegeben und 20 min. geschüttelt. Das Harz wurde fünfmal mit NMP gewaschen.

3. Fmoc-Leu-OH (353,4 mg, 1 mmol, 2 eq), PyBOP<sup>®</sup> (442,3 mg, 1 mmol, 2eq) und DIPEA (196,3  $\mu$ l, 1,2 mmol, 2,4 eq) wurden 5 min. in 4 ml NMP voraktiviert und dann zum Harz gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h geschüttelt, bis der Kaisertest die Vollständigkeit der Kupplung bestätigte.

4. 5 ml einer 20%igen Lösung von Piperidin in DMF wurden zum Harz in das Reaktionsgefäß gegeben und 20 min. geschüttelt. Das Harz wurde fünfmal mit NMP gewaschen.

5. Der Epoxidbaustein BB1 (Ethyl-(2S,3S)-oxiran-2,3-dicarboxylat, 160 mg, 1 mmol, 2 eq), PyBOP® (442,3 mg, 1 mmol, 2 eq) und DIPEA (196,3 µl, 1,2 mmol, 2,4 eq) wurden 5 min. in 4 ml NMP voraktiviert und dann zum Harz gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h geschüttelt, bis der Kaisertest die Vollständigkeit der Kupplung bestätigte. Das Harz wurde mit DCM und anschließend mit Methanol gewaschen. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Dann wurde das Harz mit DCM und anschließend mit Diethylether gewaschen. Auch dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Das Harz wurde über Nacht getrocknet.

## E

I. Das trockene Harz wurde in 6 ml DCM resuspendiert und in ein sauberes Glasgefäß transferiert. 3 ml TFA, 330 µl TIS und 330 µl H<sub>2</sub>O wurden zugegeben und das Abspaltungsgemisch 2 h horizontal bewegt. Das Gemisch wurde filtriert und das Harz zweimal mit 5 ml TFA gewaschen. Das Filtrat wurde mit der gleichen Menge Toluol (20 ml) einrotiert und das erhaltene Öl in eiskaltem Diethylether gefällt. Das Präzipitat wurde mit Diethylether gewaschen und in einer geringen Menge Methanol gelöst. Diethylether wurde bis zur Fällung des Peptides zugegeben. Das Präzipitat wurde erneut filtriert und mit Diethylether gewaschen. Die Rekristallisierungsprozedur wurde wiederholt und ergab 130 mg Peptid (28,6% Rohprodukt, LC-MS: m/z 919,1 (C<sub>43</sub>H<sub>66</sub>O<sub>12</sub>S)).

**Kaisertest:** Zur Überprüfung der Vollständigkeit einzelner Kupplungen bei der SPPS wurden nach jedem Reaktionsschritt ein paar Harzkörner aus dem Schüttler in ein kleines Reagenzglas gegeben und nach Zugabe von je drei Tropfen der Lösungen A, B und C (A: Phenol in Ethanol; B: Ninhydrin in Ethanol; C: 1 mM KCN in Pyridin) in einem Heizblock auf 60°C erhitzt. Trat innerhalb von 2 min. eine bläulich-braune Färbung der Lösung auf (Hinweis auf primäre Amine), war die Kupplung noch nicht vollständig abgeschlossen und der Schritt wurde wiederholt [Kaiser et al. 1970].



## 2.3 Zellbiologische Techniken

### 2.3.1 Zellkultivierung

Die verwendete EBV-transformierte B-Zelllinie Jesthom und die Monozytenzelllinie U937 wurden in Kulturmedium (RPMI 1640, Gibco) unter Zugabe von 10% hitzeinaktiviertem FCS (Gibco) und Antibiotika in Suspension bei 37°C in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus) mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Falls nötig, wurden die Zellen pelletiert (5 min., 800-1000 rpm, Minifuge T, Heraeus) und in frischem Medium resuspendiert.

### 2.3.2 Gefrierkonservierung von Zellen

Zur späteren Wiederanzucht vorgesehene Zellen wurden bei 4°C pelletiert (5 min., 800-1000 rpm) und pro Kryoröhrchen 1-3x10<sup>7</sup> Zellen mit je 0,5 ml eiskaltem Einfriermedium I und II (I: 20% DMSO und 80% RPMI; II: 40% FCS und 60% RPMI) resuspendiert. Da DMSO die Zellen schädigt, indem es die Zellmembran perforiert, wurden alle Arbeitsschritte zügig auf Eis durchgeführt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 48 h in einer mit Isopropanol befüllten Einfrierbox bei -70°C. Danach wurden die Kryogefäße in flüssigen Stickstoff transferiert.

### 2.3.3 Rekultivierung eingefrorener Zellen

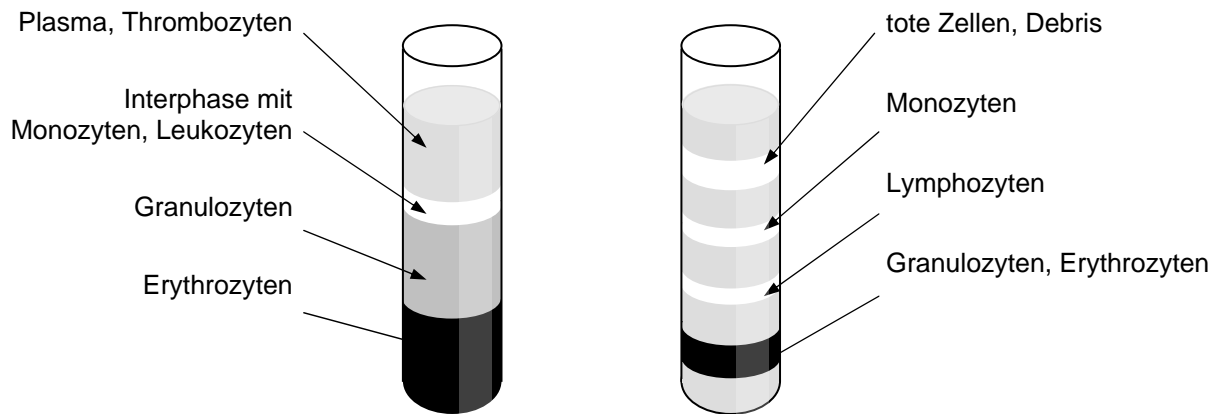
Die Kryoröhrchen wurden so lange bei 37°C belassen, bis sich die eingefrorenen Zellen von der Gefäßwand ablösten. Danach wurden sie sofort in 5 ml Medium (37°C) überführt und bei 1000 rpm 5 min. abzentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in wenigen ml Medium resuspendiert und in eine möglichst kleine Kulturflasche überführt. Mit Trypanblau wurde der Anteil toter Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert. Während der frühen Phase der Kultivierung sollte die Zelldichte relativ groß gehalten werden. Nach leichter Gelbfärbung des Mediums wurden wiederholt 1/3 bis 2/3 frisches Medium zugegeben, bis die Zellen schließlich unter Standardbedingungen kultiviert wurden.

### 2.3.4 Generierung unreifer DC aus *buffy coats*

Zuerst erfolgte die Isolierung von *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) aus *buffy coat*-Konserven gesunder Spender durch Dichtezentrifugation über eine Ficolltrennlösung. Die Dichte des Stufengradienten Ficoll ist mit der von Lymphozyten und Monozyten identisch ( $\rho = 1,077$ ). Deshalb werden diese in der Interphase angereichert und als weißer Ring sichtbar (Abb. 2-1). Ein *buffy* (ca. 30-50 ml) wurde auf zwei 50 ml Falcons verteilt und mit sterilem PBS (RT) auf 40-50 ml aufgefüllt. Bei der gleichzeitigen Bearbeitung zweier

*buffy coats* wurde das Blut nie gemischt und es wurden immer separate serologische Pipetten benutzt. Danach wurden 20 ml Ficoll (RT) in vier 50 ml-Falcons vorgelegt und der Ficoll (Lymphozytenseparationsmedium, dunkel gelagert, PAA) mit 20-25 ml Blutverdünnung langsam überschichtet. Nach der Zentrifugation bei 2000 rpm (20 min., RT, ohne Bremse, Minifuge T, Heraeus) wurde die PBMC-enhaltende Schicht an der Phasengrenze mit einer 5 ml Pipette abgenommen und die Interphase aus zwei Falcons in einem frischem 50 ml Falcon vereinigt (mit der Pipette nicht durch die Interphase stechen, am besten direkt auf der Interphase bleiben). Es wurden jeweils etwa 5 ml PBS zugegeben, das Zellpellet resuspendiert und anschließend mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Nach der Zentrifugation bei 1400-1800 rpm (6 min., 4°C, mit Bremse) wurde der Überstand verworfen. War das Zellpellet noch von einer größeren Anzahl Erythrozyten verunreinigt, so wurden diese anstatt eines zweiten Waschschrittes mittels ACK-Lysepuffer lysiert: Das Pellet wurde mit 5 ml ACK-Lysepuffer (RT, 0,15 M NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,2-7,4; steril filtriert durch 0,2 µm Filter, Millipore) resuspendiert und 5 min. bei RT in leichter Bewegung inkubiert. Danach wurde sofort 20 ml kaltes PBS zugegeben, die Zellen pelletiert und der Überstand verworfen. Der PBS-Waschschritt wurde wiederholt und vor dem abschließenden vierten Waschschritt wurden die Pellets beider Falcons vereinigt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Während der Zentrifugation wurden die Zellen in 10 µl der Suspension gezählt, wobei in der Regel pro *buffy coat* zwischen 4 und 5x10<sup>8</sup> PBMC erhalten wurden.

Nun wurde das Pellet in Medium resuspendiert und so verdünnt, dass max. 0,9x10<sup>8</sup> PBMC pro 8 ml Medium in einer 75 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflasche ausgesät wurden. Nach einer Adhärenz der Monozyten von etwa 90 min. im Begasungsbrutschrank wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und etwa 15 ml PBS (RT) auf die zellfreie Seite der Zellkulturflasche pipettiert. Die Flaschen wurden je zehnmal vorsichtig von vorne nach hinten und von links nach rechts geschwenkt, nach der Wiederholung dieses Schrittes die Waschlösung mit den abgelösten Zellen abgesaugt und der komplette Waschvorgang nach der Kontrolle des Zellrasens unter dem Mikroskop ein- bis zweimal wiederholt, bis keine Verunreinigungen der adhärennten Monozyten mehr zu beobachten waren. Jetzt wurden pro Zellkulturflasche 8 ml Kulturmedium, inklusive GM-CSF (100 ng/ml, Leukine<sup>®</sup>, Sargramostim, Immunex) und IL-4 (40 ng/ml, R&D) pro ml Medium zugegeben. Am zweiten und vierten Tag der Differenzierung wurden die Zytokine erneuert, indem jeweils pro Zellkulturflasche 0,5 ml DC-Medium und die halbe Menge GM-CSF und IL-4 zugegeben wurden. Nach sechs Tagen Differenzierung wurden die unreifen DC geerntet oder durch Zugabe von LPS (1 µg/ml, E. coli, Sigma #22654) innerhalb von 24 Stunden aktiviert.



**Abb. 2-1:** Einzelne Phasen nach Ausbildung von Ficoll (links) und Percoll (rechts)

### 2.3.5 Anreicherung von Monozyten

Das Protokoll stimmt einschließlich des zweiten Waschschruttes mit der Anleitung zur Generierung unreifer DC aus *buffy coats* überein. Statt der ACK-Lyse erfolgte die Abtrennung der Erythrozyten während der abschließenden Dichtegradientenzentrifugation über einen etwa 50%-igen Percoll (Amersham Biosciences). Dieser wurde wie folgt gebildet: 14 ml Percoll wurden in einem großen sterilen UZ-Röhrchen mit 12 ml PBS gemischt und der Gradient bei 15000 rpm (40 min., 4°C, ohne Bremse, Beckmann J2-21 mit Rotor JA-20.2) geformt.

PBMC wurden wie bereits beschrieben aus *buffy coats* angereichert. Nach dem zweiten Waschschrut wurden in einem 15 ml Falcon 3 ml FCS vorgelegt und mit dem in 3 ml PBS resuspendierten Zellpellet vorsichtig überschichtet, so dass zwei Phasen entstanden. Nach der Zentrifugation bei 1200 rpm (15 min., 4°C, ohne Bremse, Minifuge T, Heraeus) wurden die im Überstand angereicherten Thrombozyten abgesaugt, das Zellpellet wieder in etwa 3 ml PBS resuspendiert und vorsichtig auf den Percoll geschichtet, so dass sich wiederum zwei Phasen ausbildeten. Nach der Zentrifugation bei 2400 rpm (20 min., 4°C, ohne Bremse, Beckmann J2-21) wurden die in der zweiten Interphase zu 70-80% angereicherten Monozyten abgesaugt (Abb. 2-1), zweimal mit PBS und den üblichen Zentrifugationsschrutten gewaschen und anschließend gezählt.

### 2.3.6 Anreicherung von Thrombozyten

Thrombozyten wurden während der Gewinnung von PBMC beim Thrombozytenwaschschrut im Überstand angereichert und nach dessen Pelletierung (2500 rpm, 5 min.) und zwei anschließenden Waschschrutten mit PBS gewonnen.

### 2.3.7 Anreicherung von Granulozyten

Granulozyten wurden während der Anreicherung von PBMC gewonnen, indem nach der Ausbildung des Ficolls die Erythrozyten- und Granulozyten-enhaltende Phase 10 min. bei 5000 rpm pelletiert und die Erythrozyten durch Zugabe von fünf Teilen ACK-Puffer (s. Generierung unreifer DC aus *buffy coats*) lysiert wurden. Die Granulozyten wurden bei 1300 rpm (10 min.) pelletiert, ein Thrombozytenwaschschritt angeschlossen und schließlich mehrfach mit PBS gewaschen.

## 2.4 Durchflusszytometrie

Dendritische Zellen und primäre Monozyten wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie charakterisiert. Dazu wurden die Zellen nach einem Standardprotokoll [Current Protocols in Immunology 1995 Kapitel 5.3] unter Verwendung verschiedener Oberflächenmarker präpariert ( $\alpha$ -mouse IgG1-FITC, IgG1-PE, CD11c-FITC;  $\alpha$ -human CD1a-FITC, CD3-PE, CD14-FITC, CD19-FITC, CD80-FITC, CD-83-FITC, CD86-FITC, HLA-DR-PE; alle BD), an einem FACSCalibur<sup>®</sup>-Zytometer (BD) analysiert und mit der Software WinMDI V2.3 (J. Trotter, Scripps Institute, La Jolla, CA) ausgewertet.

## 2.5 Zellpräparationen

### 2.5.1 Generierung von Zelllysaten

Die Zellen wurden pelletiert, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und das Pellet anschließend 30 min. auf Eis im 4-5-fachen Volumen Puffer lysiert (für Affinitätsmarkierungen oder Aktivitätsmessungen mit 100 mM Citrat/Phosphat, 2 mM EDTA, 1% NP-40, pH 5,0; für Immunoblot: 20 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, pH 7,0, Inhibitormix Sigma: PMSF, Leupeptin, Pepstatin A, Chymostatin). Dann wurden Zelltrümmer, intakte Zellen, Plasmamembran und Kerne bei 13000 rpm (10 min., 4°C) pelletiert, der Überstand vor weiterer Verwendung einer Proteinbestimmung nach Bradford unterzogen und anschließend schockgefroren. War der Überstand nach der Zentrifugation noch verunreinigt (ersichtlich durch Eintrübung), so wurde er in ein neues Gefäß transferiert und erneut zentrifugiert.

### 2.5.2 Generierung von endozytischen Fraktionen

Endozytische Fraktionen wurden nach einer leicht modifizierten, von Schröter (1999) publizierten Methode generiert. Die zu verarbeitenden Zellen wurden pelletiert, zweimal mit eiskaltem PBS und Fraktionierungspuffer (10 mM Tris/HCl, 250 mM Sucrose, pH 7,0)

gewaschen und jeweils bis zu  $1 \times 10^8$  Zellen in 2,2 ml Fraktionierungspuffer vorsichtig resuspendiert, so dass keine Zellcluster mehr vorlagen. Die Zellen wurden nun in einem EMBL-Zellcracker (HGM Lab Equipment) mit 8-14 Hüben vorsichtig homogenisiert (Spaltbreite der Kammer  $\varnothing = 8,020$  mm; Balldurchmesser  $\varnothing$ : humane DC 8,002 mm, murine DC 8,006 mm, U937 8,010 mm, Lymphozyten 8,012 mm, Monozyten 8,014 mm) und die Vollständigkeit des Vorgangs durch Anfärbung der Membranbruchstücke mit Trypanblau unter dem Mikroskop kontrolliert. Hierbei sollte bei etwa 90% der Zellen die Zellmembran zerstört sein, während Kerne und endozytische Organellen intakt bleiben. Da später Aktivitäten von Enzymen gemessen werden sollten, wurde auf die Zugabe von Proteaseninhibitoren verzichtet und daher wurden alle Arbeitsschritte auf Eis oder bei 4°C zügig durchgeführt. Intakte Zellen, Zellfragmente und Zellkerne (Kernfraktion oder Debris) wurden bei 3000 rpm (10 min., Eppendorf Zentrifuge 5417R) pelletiert und der Überstand (postnukleärer Überstand, PNS) in einer Ultrazentrifuge (50000 rpm, 5 min., Beckmann TL100, Rotor TLA100.3) zentrifugiert. Der Überstand kann bei Bedarf wiederum zentrifugiert werden (100000 rpm, 12 min.), wodurch sich eine hochreine zytosolische Fraktion gewinnen lässt (Überstand). Die nach dem ersten Ultrazentrifugationsschritt im Pellet enthaltenen endozytischen Fraktionen wurden in 100-200  $\mu$ l 2x Reaktionspuffer (100 mM Citrat/Phosphat, 2 mM EDTA, pH 5,0) oder 2x Lysepuffer (100 mM Citrat/Phosphat, 2 mM EDTA, 1% NP-40, pH 5,0) resuspendiert, vor weiterer Verwendung einer Proteinbestimmung nach Bradford unterzogen und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. In Reaktionspuffer aufgenommene Fraktionen wurden nach dem Auftauen auf Eis vor der weiteren Verwendung noch zusätzlich 1 min. ins Ultraschallbad gestellt.

Die verwendete Kontrolle aus endozytischen Fraktionen primärer Monozyten wurde nach der Methode zur Isolierung von Monozyten und anschließend der Arbeitsweise zur Generierung von endozytischen Fraktionen hergestellt

## **2.6 Affinitätsmarkierungen in Lysaten und intakten Zellen**

### **2.6.1 Affinitätsmarkierungen in Zelllysaten und endozytischen Fraktionen**

Die Bestimmung der Aktivitäten von Cysteinproteasen in verschiedenen Zelllysaten und endozytischen Fraktionen wurde mit der biotinylierten Affinitätsverbindung DCG-0N durchgeführt, indem 2-10  $\mu$ g Protein in insgesamt 20  $\mu$ l Reaktionspuffer (100 mM Citrat/Phosphat, pH 5,0, 1 mM EDTA, 50 mM DTT, 10  $\mu$ M DCG-0N oder PS457) 30 min. bei RT inkubiert wurden. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 4  $\mu$ l 6-fach Probenpuffer und zehnminütigem Kochen bei 95°C gestoppt. Die Proben wurden 1 min. bei voller

Drehzahl zentrifugiert und die gebundenen Polypeptide mittels SPS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit Hilfe von Vectastain<sup>®</sup> und ECL-Plus Detektionskit sichtbar gemacht.

Die Verwendung verschiedener Inhibitoren diente zur Identifizierung der einzelnen Cathepsine im Aktivitätsblot. Dazu wurden die Proben in Reaktionspuffer 45 min. mit E-64 (10  $\mu$ M), Leupeptin (1 mM), CA-074 (1  $\mu$ M) oder LHVS (20 nM) inkubiert, bevor die Zugabe von DTT und DCG-0N erfolgte. Da mit den Affinitätsverbindungen vor allem im höhermolekularen Bereich auch noch nicht identifizierte Thiolproteasen markiert werden, wurden verschiedene Kontrollen addiert, um die Identität der Cathepsine zu gewährleisten. Zum einen wurden zusätzlich endozytische Fraktionen primärer Monozyten mit DCG-0N inkubiert, bei denen die einzelnen Banden bereits sequenziert und identifiziert waren (Cat S, Cat H, Cat B, Cat Z; [Lautwein et al. 2004]). Eine andere Option stellt die Denaturierung der Probe (15 min., 95°C) oder eben die Verwendung von E-64 vor der Inkubation mit DCG-0N dar. Hierbei wird die Detektion aktiver Cysteinproteasen verhindert, weil sie entweder denaturiert sind oder aber deren aktives Zentrum bereits durch E-64 blockiert ist.

### 2.6.2 Affinitätsmarkierungen mit BAEBSF

Die Bestimmung der Aktivitäten von Serinproteasen wurden mit dem biotinylierten Affinitätsverbindung BAEBSF (Biotin- $\epsilon$ Ahx-AEBSF), durchgeführt, indem 5-15  $\mu$ g Zellysate oder 250 ng Enzym in insgesamt 20  $\mu$ l Reaktionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10  $\mu$ M BAEBSF) 30 min. bei RT inkubiert wurden. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 4  $\mu$ l 6-fach Probenpuffer und zehnminütigem Kochen bei 95°C gestoppt. Die Proben wurden 1 min. bei voller Drehzahl zentrifugiert und die gebundenen Polypeptide mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit Hilfe von Vectastain<sup>®</sup> und ECL-Plus Detektionskit sichtbar gemacht.

### 2.6.3 Puls-Experimente mit Dendritischen Zellen

Nach leichtem Klopfen wurden die Zellen vorsichtig von der Gefäßwand der Zellkulturflasche abgespült (Kontrolle unter dem Mikroskop), in 50 ml Falcons vereinigt und bei 1000 rpm (6 min.) zentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS resuspendiert und während erneuter Zentrifugation die Zellmenge bestimmt. Pro Zeitpunkt wurden mindestens  $1 \times 10^6$  Zellen in je 310  $\mu$ l Kulturmedium resuspendiert. Bei Verwendung von Inhibitoren wurde nun die eine Hälfte der Zellen mit der entsprechenden Verdünnung 1 h bei 37°C im Brutschrank rotiert, respektive die übrigen Zellen mit dem gleichen Volumen des jeweiligen Lösungsmittels. Pro

Zeitpunkt (3-30 min., 4°C 30 min.) wurden je 300 µl in eine Mikrotiterplatte (MTP, 24 Loch, Nunc) pipettiert und 15 min. im Brutschrank inkubiert, weitere 300 µl wurden in einer anderen MTP 15 min. bei 4°C inkubiert. Die restlichen Zellen (Kontrolle, etwa 50 µl) wurden bis zur späteren Verwendung auf Eis gelagert. Für den Puls wurde nun in umgekehrter zeitlicher Reihenfolge DCG-0N (sofern nicht explizit erwähnt 25 µM, 10 µM PS457 oder aber Konstrukte mit Streptavidin) pipettiert und nach Ablauf der Zeit 1 ml eiskaltes PBS zugegeben. Ab hier wurden alle Arbeitsschritte bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden in Reaktionsgefäße überführt und inklusive der vorher auf Eis inkubierten Kontrolle bei 2500 rpm (5 min.) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschvorgang dreimal wiederholt. Schließlich wurde das Pellet schockgefroren und später unter Zugabe von 50-80 µl 2x Lysepuffer (pH 7) mit zusätzlich 100 µM JPM-565 30 min. auf Eis lysiert. Die Kontrolle wurde dagegen mit 100-200 µl 2x Lysepuffer (pH 5) ohne Zugabe von JPM-565 lysiert. Nach der Zentrifugation bei 13000 rpm (10 min.) wurde der Überstand einer Proteinbestimmung nach Bradford unterzogen und anschließend schockgefroren. War der Überstand nach der Zentrifugation noch verunreinigt (ersichtlich durch Eintrübung), so wurde er in ein neues Gefäß transferiert und erneut zentrifugiert. Zur Detektion der gebundenen Proteasen wurden 40-50 µg je Probe in PBS oder H<sub>2</sub>O (Gesamtvolumen 20 µl) mit 4 µl 6-fach Probenpuffer 10 min. bei 95°C gekocht, 1 min. bei voller Drehzahl zentrifugiert und die gebundenen Polypeptide mittels SPS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit Hilfe von Vectastain<sup>®</sup> und ECL-Plus Detektionskit sichtbar gemacht. Die Kontrolle jedoch wurde vor dem Aufkochen einer generellen Affinitäts-markierung mit DCG-0N unterzogen (1,5-2 µg Protein, s.o.).

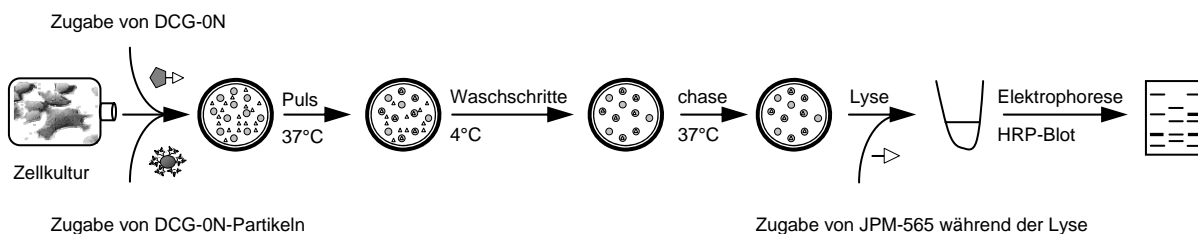
Bei Verwendung von Streptavidin-Konstrukten für die Experimente mit intakten DC wurden diese vor dem Versuch wie folgt hergestellt: Streptavidin (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) wurde im Verhältnis 1:2 bis 1:20 mit 5 µM DCG-0N oder PS457 in PBS (Gesamtvolumen max. 30 µl) 1 h bei RT rotiert und anschließend direkt weiter verwendet. Beim Aufkochen der Proben enthielt der 6-fache Probenpuffer zusätzlich 18 mM Biotin (Sigma), um eine erneute Ausbildung der nicht-kovalenten Wechselwirkung zwischen Streptavidin und der biotinylierten Affinitätsverbindung nach Abkühlen der Probe zu verhindern [Rybak et al. 2004].

Die zum Teil durchgeführte Trypsinierung der Proben erfolgte durch Zugabe von 200 µl Trypsin/EDTA nach dem Waschen (0,05%:0,02%, Biochrom, 5 min. 37°C). Anschließend wurde 1 ml kaltes Kulturmedium zugegeben, um den tryptischen Verdau zu stoppen. Die Proben wurden zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen.

Zur Analyse in der Durchflusszytometrie wurden DC mit OVA-FITC (100 µg/ml Sigma) inkubiert, anschließend an einem FACSCalibur<sup>®</sup>-Zytometer (BD) analysiert und mit der Software WinMDI V2.3 (J. Trotter, Scripps Institute, La Jolla, CA) ausgewertet.

Konfokale Laser Scanning Mikroskopie wurde an einem invertierten LSM510 *laser scanning microscope* (Carl Zeiss) mit einer plan-Apochromat 63 x 1,4 numerischen Blende durchgeführt. Bei der Messung von Streptavidin-Konstrukten wurden lebende und nicht-fixierte Zellen verwendet. Dazu wurden DC in 8-well *chambered cover glasses* (37°C, 1x10<sup>5</sup>/well, Nunc) in serumfreiem Medium ausgesät und nach 1 h mit den jeweiligen StreptavidinCy5-Konstrukten (StreptavidinCy5, Jackson Immunoresearch) inkubiert. Nach 30 min. wurden die Bilder zügig bei RT aufgenommen.

Die Aufnahme von OVA-FITC erfolgte, nachdem DC in MTP (24 Loch, Nunc) auf *coverslips* (37°C, 4x10<sup>5</sup> in 300 µl serumfreiem Medium/well; Poly-L-Lysin, Polysciences Inc.) ausgesät und nach Ablauf von 2 h mit OVA-FITC (100 µg/ml) inkubiert wurden. Dann wurden die Zellen dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen und 30 min. bei 37°C mit 4%iger PFA fixiert. Die fixierten Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, die *coverslips* mit Aqua-Poly/Mount (Polysciences Inc.) auf einem Objektträger eingedeckt und nach dem Trocknen (ca. 30 min. im Trockenschrank) mit Nagellack versiegelt.



**Abb. 2-2:** Arbeitsschema bei *pulse chase*-Experimenten mit intakten Zellen

#### 2.6.4 *Pulse chase*-Experimente mit Dendritischen Zellen

*Pulse chase*-Experimente erfolgten größtenteils analog zu Puls-Experimenten mit Dendritischen Zellen. Der zehnmünütige Puls wurde in 2 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt (260 µl Medium/1x10<sup>6</sup> Zellen pro späteren *chase*-Zeitpunkt), für den analogen Puls bei 4°C wurden 1 ml Reaktionsgefäße verwendet. Nach Durchführung der Waschschriffe wurde ein Teil der Zellen direkt schockgefroren (0 min. und 4°C 0 min *chase*), das verbliebene Pellet mit 300 µl Medium je Zeitwert resuspendiert und in MTP (24 Loch) pipettiert. Die MTP wurde kurz ins Wasserbad gestellt (1 min., 37°C) und dann bis zum Ablauf der einzelnen



Zeiten (5-30 min.) bei 37°C bewegt. Dann wurde 1 ml eiskaltes PBS zugegeben, die Zellen wieder in Reaktionsgefäße überführt, pelletiert und einmal mit PBS gewaschen. Schließlich wurde das Pellet schockgefroren.

#### 2.6.5 Puls-Experimente mit DCG-0N gekoppelt an Streptavidin-Partikel

Zur Beladungsbestimmung der Partikel wurden pro Versuch je 10 µl Streptavidin-Latexpartikel (in PBS, Größe 1 µm, Polysciences Inc.) oder 10 µl Streptavidin-Magnetpartikel (Größe 80 nm, Streptavidin-Microbeads, Miltenyi Biotec) mit verschiedenen Konzentrationen von DCG-0N 1 h bei RT inkubiert. Die Latexpartikel wurden pelletiert (8000 rpm 5 min.) und dreimal mit PBS gewaschen (zwischendurch wiederholt 10 min. schallen). Die Magnetpartikel wurden aufkonzentriert (13000 rpm, Amicon Ultrafree MC 10 kDa, Millipore) und zweimal mit 500 µl PBS gewaschen (evtl. schallen). Die Effizienz der Kupplung und der Waschschrte wurde kontrolliert, indem endozytische Fraktionen von primären Monozyten mit Partikeln und Überstand bzw. Filtrat inkubiert wurden (s. generelle Affinitätsmarkierungen).

Um aktive Cysteinproteasen in intakten DC mit DCG-0N gekoppelt an Streptavidin-Partikel darzustellen, wurden 200 µl Latex- oder Magnetpartikel mit 100 µM DCG-0N 1 h bei RT inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen. DC wurden in MTP ausgesät (24 Loch,  $1 \times 10^7$  DC/well) und 1 h bei 37°C in einem Gesamtvolumen von 300 µl inklusive den Partikeln inkubiert. Nach dem Puls wurden überschüssige Partikel entfernt, indem die Probe vorsichtig auf 1 ml FCS pipettiert und abzentrifugiert (2000 rpm, 2 min.) wurde. Die im Überstand befindlichen Partikel wurden verworfen und der Waschvorgang dreimal wiederholt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 100 µl heißem 6-fach Probenpuffer mit zusätzlich 100 µM JPM-565 lysiert (10 min., 95°C). Die DNS wurde mit Hilfe einer Kanüle und eines Ultraschallbades geschert. Die Proben wurden 1 min. bei voller Drehzahl zentrifugiert und die gebundenen Polypeptide über SPS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mittels Vectastain<sup>®</sup> und eines ECL-Plus Detektionskits sichtbar gemacht.

Zur Analyse in der Durchflusszytometrie wurden DC mit Fluorophor-gekoppelten Streptavidin-Latexpartikeln (YG, Polysciences Inc.) inkubiert, anschließend an einem FACSCalibur<sup>®</sup>-Zytometer (BD) analysiert und mit der Software WinMDI V2.3 (J. Trotter, Scripps Institute, La Jolla, CA) ausgewertet.

## 2.7 Proteinbestimmung nach Bradford

Proteinbestimmungen wurden mit dem von Roth vertriebenen Kit Roti-Nanoquant<sup>®</sup> durchgeführt, einer modifizierten Bestimmung nach Bradford [Bradford, 1976]. Dazu wurden in einer Mikrotiterplatte je 200 µl Roti-Nanoquant<sup>®</sup>-Arbeitslösung vorgelegt, 0,1 bis 20 µg Protein in 50 µl H<sub>2</sub>O zugegeben und gut gemischt. Nach etwa 10 min. wurden die Absorptionen bei 590 nm und 450 nm kolorimetrisch bestimmt (Tecan, Spectrafluor). Nun wurde die Absorption bei 590 nm durch den Wert bei 450 nm geteilt. Die Methode wurde mit IgG oder BSA geeicht und als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Proteinbestimmung beruht auf einer komplexbildenden Farbreaktion von blauen Säurefarbstoffen, die als Coomassie-Brillantblau bezeichnet werden. Der Grund für diese Farbreaktion ist die relativ unspezifische Bindung der unprotonierten, anionischen Sulfonat-Form an kationische und nicht-polare, hydrophobe Seitenketten von Proteinen, vor allem an Arginin. Im Falle des häufig verwendeten Coomassie-Brillantblau G 250 verschiebt sich hierbei das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm.

## 2.8 Immunoblot

### 2.8.1 SDS-PAGE

Zur Charakterisierung von Proteinen wurde ein nach Laemmli modifiziertes Verfahren [Laemmli 1970] angewandt. Für kleine Gelapparaturen wurden nach einem Standardprotokoll 12,5% Tris/HCl Polyacrylamidgele mit einer Dicke von 1 mm hergestellt [Tabelle 2-1, Current protocols in Protein Science, Kapitel 10.1]. 2-50 µg Gesamtprotein in einem Volumen von maximal 20 µl Neutralpuffer wurden mit 4 µl 6-fach reduzierendem Probenpuffer (0,35 M Tris pH 6,8, 30% Glycerin, 10% SDS, 6% β-Mercaptoethanol, Bromphenolblau) 10 min. bei 95°C gekocht, 1 min. bei voller Drehzahl zentrifugiert und anschliessend vorsichtig in die Geltaschen gefüllt. Die Auftrennung der Polypeptide wurde mit Elektrodenlaufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS) in einer Minigel-Apparatur (Invitrogen) in einem bei 14°C temperierten Kühlschrank unter Verwendung eines Proteinstandards zur Größenbestimmung (Full Range Rainbow<sup>™</sup>, Amersham Biosciences) durchgeführt (70 V/30 min., 140 V/90 min.). Bei Bedarf wurde das Gel mit einer Färbelösung nach einem Standardprotokoll angefärbt (Simply Blue<sup>™</sup> Safe Stain, Invitrogen).

4x LT (4x lower Tris, 1,5 M Tris/Base pH 8,8, 0,4% SDS)

4x UT (4x upper Tris, 0,5 M Tris/Base pH 6,8, 0,4% SDS)

Trenngel				Sammelgel		
7,5%	10%	12,5%	15%			
5 ml	4 ml	3,4 ml	2,4 ml	H <sub>2</sub> O		1,3 ml
	2,5 ml			4xLT	4xUT	750 µl
2,5 ml	3,5 ml	4,1 ml	5,1 ml	Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30 (Roth)		520 µl
	10 µl			TEMED <sup>®</sup> (Roth)		5 µl
	60 µl			10% APS in H <sub>2</sub> O (Roth)		40 µl

**Tabelle 2-1:** Pipettierschema verschiedener Polyacrylamidgele

### 2.8.2 Western-Immunoblot

Die aufgetrennten Polypeptide wurden mit Hilfe eines modifizierten Verfahrens [Gershoni & Palade 1983, Towbin et al. 1979] in einer *semidry*-Apparatur (Owl, Nunc) aus dem Gel auf eine PVDF-Blotmembran (Hybond-P, Amersham Biosciences) transferiert. Dazu wurden vor dem Blotten das Gel, die mit Methanol aktivierte Membran und vier Stück Whatman-Filterpapier gleicher Größe kurz in Transferpuffer (12,5 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,3, 0,01% SDS, 20% Methanol) geschwenkt und bei 70 mA 75 min. geblottet. Der Proteinstandard erlaubt die Beurteilung der Bloteffizienz und erleichtert die Orientierung. Zusätzlich kann die Vollständigkeit des Proteintransfers überprüft werden, indem das Gel nach dem Blotten angefärbt wird.

Die Blotmembran wurde anschließend mehrmals kurz in PBS-T (137 mM NaCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1% Tween<sup>®</sup>20, pH 7,4) geschwenkt und über Nacht in PBS-T mit 10% Rotiblock (Roth) im Kühlraum blockiert. Am nächsten Tag wurde der Blot mit einer entsprechenden Verdünnung des Primärantikörpers im Kühlraum etwa 4 h geschüttelt. Die Antikörperlösung wurde dekantiert und die Membran dreimal kurz und dreimal für 10 min. mit PBS-T gewaschen. Jetzt wurde die Membran mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper 45 min. in PBS-T mit 10% Rotiblock geschüttelt. Zuletzt wurde die Antikörperlösung dekantiert, die Membran dreimal kurz und dreimal für 15 min. mit PBS-T gewaschen und die geblotteten Polypeptide mittels eines ECL-Plus Detektionskits und ECL-sensitiven Filmen (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) in einer Entwicklermaschine (X-Ray Film Processor RG II, Fuji) sichtbar gemacht.

Sollte bei einer bereits verwendeten Membran eine weitere Immundetektion durchgeführt werden, wurden zuerst die gebundenen Primär- und Sekundärantikörper wieder abgelöst. Dazu wurde die Membran 30 min. bei 50°C in *stripping buffer* (62,5 mM Tris/HCl, 100 mM

$\beta$ -Mercaptoethanol, 2% SDS, pH 6,7) unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran gründlich mit PBS-T gewaschen und nach erneuter Blockierung mit PBS-T und 10% Rotiblock (1 h bei RT) den bereits beschriebenen Inkubations- und Waschschrritten unterzogen.

Manche Antikörper erkennen nach einer solchen Behandlung nicht mehr ihr Epitop, andere wiederum funktionieren sogar noch besser. Allgemein verliert die Membran durch das Strippen sehr viel Protein, deswegen kann eine wiederholte Detektion gegen ein Protein anderer Größe nach erneuter Blockierung ohne Strippen von Vorteil sein.

### 2.8.3 Detektion mit Vectastain<sup>®</sup>

Bei Vectastain<sup>®</sup> (Vectastain<sup>®</sup> Elite, Vector Laboratories) handelt es sich um ein modifiziertes Biotin/Avidin-System, bei dem die biotinylierte Peroxidase mit Avidin eine vernetzte dreidimensionale Struktur ausbildet und daher eine gesteigerte Sensitivität ermöglicht wird.

Nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE und Blotten auf eine PVDF-Membran wurde die Membran zur Detektion der biotinylierten Polypeptide über Nacht in PBS-T mit 10% Rotiblock (Roth) im Kühlraum blockiert. Am nächsten Tag wurde je ein Tropfen der Vectastain<sup>®</sup>-Komponenten A und B in 20 ml 45 min. bei RT inkubiert. Der Blockierungspuffer wurde dekantiert, die Membran dreimal kurz und dreimal für 5 min. mit PBS-T gewaschen und anschließend mit dem vorbereiteten Vectastain<sup>®</sup>-Reagenz 1 h bei RT geschüttelt. Dann wurde das Vectastain<sup>®</sup>-Reagenz zur weiteren Verwendung (insgesamt bis zu dreimal, bei 4°C etwa 10 Tage haltbar) dekantiert, die Membran dreimal kurz und dreimal für 15 min. mit PBS-T gewaschen und die geblotteten Polypeptide mittels eines ECL-Plus Detektionskits und ECL-sensitiven Filmen in einer Entwicklermaschine sichtbar gemacht.

### 2.8.4 Densitometrische Quantifizierungen

Das Programm NHI ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) wurde für die Quantifizierung der Intensitäten aktiver Polypeptide, die mittels Affinitätsmarkierungen erhalten wurden, verwendet.

## 2.9 Versuche unter Verwendung von radioaktivem Iod

### 2.9.1 Iodierung von Affinitätsverbindungen

Glasröhrchen wurden mit je 100 µg Iodo-gen<sup>®</sup> (Sigma) beschichtet, indem das verwendete Lösungsmittel Chloroform (100 µl) im Vakuum abgezogen wurde. Die Röhrchen wurden mit Parafilm verschlossen und bei -20°C aufbewahrt. 2 mg der zu iodierenden Moleküle (JPM-565, DCG-04, DCG-0N, Z-Tyr-Ala-CHN<sub>2</sub>, LHVS-PhOH) wurden in 100 µl DMSO gelöst (JPM-565 in H<sub>2</sub>O) und in 5 µl Aliquots (= 100 µg) bei -80°C aufbewahrt. Die weiteren Schritte wurden im Isotopenlabor der Universität Tübingen auf der Morgenstelle durchgeführt. Im Abzug wurden zu einem 5 µl Aliquot 15 µl Ethanol und 20 µl Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (50 mM, pH 7,5) pipettiert und das Gemisch in eines der vorbereiteten Glasröhrchen gegeben (auf Eis). Nun wurden 10 µl Na[<sup>125</sup>I] (= 1 mCi oder 37 MBq) dazugegeben und 10 min. inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl gekühltem Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer gestoppt und das Reaktionsgemisch über eine zuvor mit Acetonitril gespülte und mit Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> äquilibrierte Sep-Pak<sup>®</sup>C18-Säule (Waters) aufgereinigt. Nach der Elution mit Acetonitril wurden die entsprechenden Fraktionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und das Lösungsmittel über Nacht in einer Speed-Vac<sup>®</sup> abgezogen. Anschließend wurde die Affinitätsverbindung in 1 ml DMSO aufgenommen, aliquotiert, in einer Szintillationsapparatur (γ-Zähler) ausgemessen und bei -80°C gelagert.

### 2.9.2 Radioaktive Affinitätsmarkierungen

1x10<sup>6</sup> gewaschene Zellen wurden in 50 µl PBS mit 1-2 µl [<sup>125</sup>I]-markierter Affinitätsverbindung 45 min. bei 37°C inkubiert. Die intakten Zellen wurden mit PBS gewaschen und im 4- bis 5-fachen Volumen Neutrallysepuffer inklusive Inhibitormix auf Eis lysiert. Der Detritus wurde bei 13000 rpm (10 min.) pelletiert und der Überstand mit der gleichen Menge 2-fach Probenpuffer bei 95°C 10 min. gekocht. Alternativ wurden 20 µg Protein endozytischer Fraktionen in Reaktionspuffer (100 mM Citrat/Phosphat, pH 5,0, 1 mM EDTA, 50 mM DTT, insgesamt 50 µl) mit 1-2 µl [<sup>125</sup>I]-markierter Affinitätsverbindung 45 min. bei 37°C inkubiert und anschließend mit der gleichen Menge 2-fach Probenpuffer aufgeköcht. Die Proben wurden 1 min. bei voller Drehzahl zentrifugiert und die gebundenen Polypeptide mittels SDS-PAGE in großen Gelapparaturen (Eigenbau) aufgetrennt. Nach Abtrennung der hochradioaktiven Lauffront wurde das Gel jeweils 1 h in DMSO (2x), in 20% DPO/DMSO und in H<sub>2</sub>O bei RT geschüttelt, im Gelrockner getrocknet und mit einem radiosensitiven Film (Kodak X-OMAT<sup>®</sup>, Eastman Kodak Company) in einer Gelkassette mit Verstärkerfolie bei -80°C exponiert und anschließend im Entwickler belichtet.

### 2.9.3 Radioaktive Affinitätsmarkierungen für die 2D-SDS-PAGE

120 µg endozytische Fraktionen wurden in Reaktionspuffer (0,1 M Citrat/Phosphat, pH 5,0, 1 mM EDTA, 50 mM DTT, insgesamt 100 µl) mit 5 µl [<sup>125</sup>I]-DCG-0N 45 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Protein durch Zugabe von 400 µl Aceton bei -20°C gefällt (mindestens 1 h, evtl. 1 µg/µl BSA zugeben) und in der Kühlzentrifuge (13000 rpm, 5 min.) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml 80%igem Aceton resuspendiert und wiederum pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene Aceton bei 37°C verdampft.

### 2.10 2D-SDS-PAGE

120 µg endozytische Fraktionen wurden in 370 µl 2D-Lysepuffer (9 M Harnstoff in H<sub>2</sub>O, 3% CHAPS, 0,4% DTT, 1% Pharmalyte pH 3-10 (Amersham Biosciences) Bromphenolblau) resuspendiert und 10 min. bei RT geschüttelt. 20 µl wurden entnommen und zum späteren Gebrauch in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das restliche Volumen wurde 10 s bei 13000 rpm zentrifugiert und langsam auf einen in einer modifizierten 10 ml Pipette befindlichen IPG-*strip* (pH 4-7, Gelseite nach unten, Amersham Biosciences) blasenfrei pipettiert. Die Pipette wurde luftdicht verschlossen und die Probe zog über Nacht ins Gel ein. Der IPG-*strip* wurde mit H<sub>2</sub>O gespült und vorsichtig mit feuchtem Whatman-Filterpapier abgetupft. Anschließend wurde der IPG-*strip* in einen *strip holder* mit 2-3 ml Mineralöl (*drystrip cover fluid*, Amersham Biosciences) vollständig bedeckt und in einer IPG-Multiphor Apparatur (Amersham Biosciences) isoelektrisch fokussiert (Programm: Rehydration = 0, 50 µA; 500 V 1000 Vhr gradient; 500 V 1500 Vhr step-n-hold; 1000 V 1000 Vhr step-n-hold; 3000 V 1000 Vhr gradient; 3500 V 45000 Vhr step-n-hold; 6000 V 24000 Vhr step-n-hold). Der abgetropfte IGP-*strip* wurde zuerst mit 10 ml Eq-Puffer (1,5 M Tris/HCl, 6 M Harnstoff, 26% Glycerin, 2% SDS, pH 8,8), 100 mg DTT und anschließend mit 10 ml Eq-Puffer und 240 mg Iodacetamid 15 min. unter leichtem Schütteln inkubiert, jeweils mit H<sub>2</sub>O gewaschen und abgetrocknet.

Zur Auftrennung in der zweiten Dimension wurde ein 15%iges großes Trenngel gegossen (19,2 ml H<sub>2</sub>O, 19,75 ml 4xLT, 40 ml Rotiphorese<sup>®</sup>Gel 30, 95 µl TEMED, 3,75 ml 87%iges Glycerin, 950 µl 10%iges APS) und der IPG-*strip* mit der Spitze nach rechts auf das Trenngel gelegt. 5-20 µl Rainbow<sup>™</sup>-Marker (Amersham Biosciences) und/oder die anfangs schockgefrorene Probe wurden auf ein kleines Stück Whatman-Filterpapier pipettiert und rechts vom Strip auf dem Trenngel positioniert. Die Auftrennung der Probe erfolgte über Nacht bei 60-80 V.

## 2.11 Silberfärbung

1. Fixieren:	40% Ethanol, 10% Essigsäure (100 ml pro Gel)	1 h
2. Waschen:	30% Ethanol	2x 20 min.
3. Waschen:	H <sub>2</sub> O	20 min.
4. Inkubieren:	H <sub>2</sub> O mit 0,02% Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (frisch)	genau 1 min.
5. Waschen:	H <sub>2</sub> O	3x 20 s (ggf. länger)
6. Färben:	kaltetes H <sub>2</sub> O mit 0,1% AgNO <sub>3</sub> (frisch)	20 min. 4°C
7. Waschen:	H <sub>2</sub> O	genau 2x 30 s
8. Gelkammer wechseln		
9. Waschen:	H <sub>2</sub> O	1 min.
10. Entwickeln:	H <sub>2</sub> O mit 3% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0,05% 37%iges Formaldehyd (1-2x wechseln, wenn Entwickler gelb)	bis <i>spots</i> erscheinen (je nach gewünschter Intensität 30 s – 20 min.)
11. Waschen:	H <sub>2</sub> O	20 s
12. Stoppen:	5%ige Essigsäure	10-15 min.
13. Waschen:	H <sub>2</sub> O	3x 10 min.

**Tabelle 2-2:** Protokoll für eine modifizierte Silberfärbung nach Blum [Mortz et al. 2001]

Nach Inkubation in 30%-igem Glycerin über Nacht bleibt das Gel auch während der Exposition mit einem radiosensitiven Film (Kodak X-OMAT<sup>®</sup>, Eastman Kodak Company) bei -80°C intakt. Die Aufbewahrung des Gels erfolgt in 1%iger Essigsäure bei 4°C.

## 2.12 Metabolische Markierungen, *pulse chase* und Immunopräzipitation

Dendritische Zellen wurden geerntet, abzentrifugiert (6 min., 1200 rpm) und in 10 ml Mangelmedium (RPMI -Met -Cys -Glu, kein FCS, Sigma) resuspendiert. Während der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen wieder pelletiert und pro Ansatz in 500 µl Mangelmedium resuspendiert (ca.  $1 \times 10^7$  Zellen, 15 ml Falcon). Dann wurden 25 µl [<sup>35</sup>S]-Methionin/Cystein zugegeben (0,5 µCi/ml, Amersham Biosciences) und die Probe bei 37°C 15 min. rotiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 5,5 ml Kulturmedium (zehnfacher

Überschuss) der Puls gestoppt, pro *chase*-Zeitpunkt 1,5 ml in große Reaktionsgefäße überführt und bei 37°C rotiert (0, 30, 60 und 120 min.). Nach Ablauf der jeweiligen Zeitwerte wurden die Zellen in einer Kühlzentrifuge bei 4°C (2000 rpm, 5 min.) pelletiert, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und das Pellet in 1,5 ml Reaktionsgefäße mit 200 µl Lysepuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,4, 1% NP-40, Inhibitormix) 30 min. auf Eis lysiert. Zur Abtrennung der Membranen wurde die Probe 10 min. bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in flüssigem Stickstoff schockgefroren. 2 µl je Probe wurden auf ein Whatman-Filterpapier pipettiert und nach der Trocknung wurde ein Fällungsgang durchgeführt (5% TCA in H<sub>2</sub>O bei 4°C, zweimal Ethanol und anschließend Aceton bei jeweils -20°C; je 5 min.). Nach der Trocknung des Whatman-Filterpapiers wurde die inkorporierte Radioaktivität der Proben in einer Szintillationsapparatur bestimmt (cpm, β-Zähler). Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt.

Formaldehyd-fixierter Staph A (*Staphylococcus aureus*) wurde dreimal mit NET-Puffer (0,5% NP-40, 5 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) gewaschen, resuspendiert und bei 13000 rpm 3 min. zentrifugiert. Für den ersten *preclear* wurden zu je 75 µl Staph A 5 µl Präimmenserum (PIS) und die Probe pipettiert und über Nacht im Kühlraum rotiert. Als Negativkontrolle wurde eine zusätzliche Probe mitgeführt. Am nächsten Tag wurde der erste *preclear* abzentrifugiert (13000 rpm, 3 min.), der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und wiederum mit 75 µl Staph A und 5 µl PIS versetzt (2. *preclear*). Nach 2 h Inkubation wurde der zweite *preclear* abzentrifugiert (13000 rpm, 3 min.), der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nur mit 75 µl Staph A versetzt (3. *preclear*). Nach 2 h Inkubation wurde der dritte *preclear* abzentrifugiert (13000 rpm, 3 min.), der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und für die Immunopräzipitation (IP) mit 75 µl Staph A, 300 µl NET-Puffer und 2 µl Antikörper (Ak) versetzt. Bei der Negativkontrolle wurde für die IP anstatt Antikörper PIS verwendet. Nach 2 h Inkubation wurde die IP abzentrifugiert (13000 rpm, 3 min.), der Überstand verworfen und das Pellet (Staph A mit Ak und Protein!) viermal mit NET-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet im Rücklauf mit 10 µl 6-fach Probenpuffer 10 min. bei 95°C erhitzt, abzentrifugiert und auf ein SDS-Gel geladen. Zur Kontrolle der Effizienz der einzelnen *preclears* wurden diese ebenfalls viermal mit NET-Puffer gewaschen und auf das Gel geladen. Nach der Auftrennung der Polypeptide wurde das fertige Gel in einem Gel-trockner (Biorad Gel Dryer S83) getrocknet und mit Hilfe eines Phosphoimagers (Fujifilm BAS-1800) ausgewertet.



Bei der Verwendung von Hybridom-Kulturüberstand wurden vor der IP 250-500  $\mu\text{l}$  mindestens 2 h mit 75  $\mu\text{l}$  Staph A bei 4°C inkubiert und anschließend einmal mit NET-Puffer gewaschen.

## 2.13 Aktivitätsmessungen mit fluorogenen Substraten

### 2.13.1 Bestimmung der Cat BLS-Aktivität

Bei Cat B, L und S handelt es sich um Thiolproteasen, deren Aktivität mit dem gleichen fluorogenen Substrat gemessen werden kann. Zwar sind für die jeweiligen Cathepsine auch spezifische Substrate beschrieben, aber durch die Verwendung des gleichen Substrates ist der Vergleich der Aktivitäten (unter Substratsättigung) einfacher. Alle Messungen wurden mit dem fluorogenen Substrat Z-FR-AMC (Bachem) nach einem modifizierten Verfahren [Morita et al. 1977, Schmid et al. 1997] durchgeführt, bei dem nach der Proteolyse der Fluorophor 7-Amino-4-methylcumarin (AMC) freigesetzt wird. Dazu wurden in einer Mikrotiterplatte (96 Loch, Nunc) 5  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein aus Zelllysaten oder 2  $\mu\text{g}$  aus endozytischen Fraktionen zu 100  $\mu\text{l}$  BLS-Puffer (0,1 M Citrat pH 5,0, 4 mM DTT, 4 mM EDTA, 6  $\mu\text{M}$  Aprotinin, 0,02% Triton X-100) pipettiert und die Reaktion unter Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  Substrat (10  $\mu\text{M}$ ) gestartet. Die freigesetzte Fluoreszenz wurde bei 37°C alle 3 min. über einen Zeitraum von 30 bis 120 min. gemessen (Tecan, Spectrafluor, Extinktion 360 nm, Emission 465 nm). Alle Enzymaktivitäten wurden mittels linearer Regression aus mindestens 3 Messpunkten ermittelt. Besonders bei langen Inkubationszeiten ist auf Linearität und Fremdaktivität zu achten, deshalb wurden nur die durch den Cysteinproteaseninhibitor E-64 (10  $\mu\text{M}$ ) hemmbaren Enzymaktivitäten zur Berechnung herangezogen.

### 2.13.2 Bestimmung der AEP-Aktivität

Die Messung der AEP-Aktivität wurde analog der Cat BLS-Aktivitätsbestimmung durchgeführt. Dazu wurden 5  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein aus Zelllysaten zu 100  $\mu\text{l}$  AEP-Puffer (40 mM Citrat, 120 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 5,8, 4 mM EDTA, 10  $\mu\text{M}$  E-64, 6  $\mu\text{M}$  Aprotinin, 4 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,02% Triton X-100) pipettiert und die Reaktion unter Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  fluorogenen Substrat Z-VAN-AMC (10  $\mu\text{M}$ , Bachem) gestartet [Schwarz et al. 2002].

Nur die durch den im Überschuss zugegebenen Inhibitor Z-AENK (2 mM) kompetitierbare Aktivität wurde zur Auswertung herangezogen.

## 2.14 *In vitro* Prozessierungsstudien

### 2.14.1 Verdau von Peptiden

*In vitro* Prozessierungsstudien wurden zur Simulation der sauren reduzierenden Verhältnisse in den Lysosomen in 0,2 M Citratpuffer, pH 5,0 (inkl. 4 mM DTT) bei 37°C durchgeführt. Der Standardansatz beinhaltete 25 µl Puffer, 10 µg Peptid und 4 µg Protein aus endozytischen Fraktionen oder Zelllysat und wurde mit H<sub>2</sub>O auf 50 µl aufgefüllt. Als Kontrolle diente eine Probe, bei der kein Protein zugegeben wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeiten (zwischen 1 und 9 h) wurden die Verdauung durch Zugabe von eisgekühlter Stopp-Lösung (1% TFA, 5% Acetonitril) oder durch zehnminütiges Erhitzen bei 95°C beendet. Die Analyse erfolgte durch Auftrennung des Reaktionsansatzes über eine analytische HPLC und anschließende Untersuchung der Prozessierungsprodukte in den einzelnen Fraktionen mittels Nano-Elektrospray-MS und Edman-Abbau.

### 2.14.2 Identifizierung der Prozessierungsprodukte

Die erhaltenen prozessierten Peptide wurden auf einer RP-HPLC-Säule (150 x 0,3 (I.D.) mm Zorbax Extend-C18 capillary, Agilent Technologies) aufgetrennt und bei einer Flussrate von 5 µl/min. eluiert (HP1100 capillary HPLC system, Agilent Technologies). Puffer A war 0,025% TFA in H<sub>2</sub>O, Puffer B 0,023% TFA, 80% Acetonitril in H<sub>2</sub>O. Folgender Gradient wurde verwendet: 5% B (0-10 min.), 5-80% B (10-30 min.). Die Eluierung der Peptide wurde über die UV-Absorption bei 214 nm überprüft. Die HPLC war direkt an eine Elektrospray-Ionisierungsquelle eines Ionenfallen-Massenspektrometers (Esquire3000plus, Bruker Daltonik GmbH) gekoppelt. Die Peptide wurden im positiven Ionenmodus analysiert. Die Trockengastemperatur betrug 275°C (6 l/min), der Druck des Nebulizers 20,0 psi und die Elektrospray-Spannung -3700 V.

Zur aminoterminalen Sequenzierung von Produkten der *in vitro* Prozessierungsstudien diente ein automatisiertes Verfahren nach dem Prinzip des Edman-Abbaus von Peptiden [Edman & Begg 1967]. Die Sequenzierungen wurden im Arbeitskreis von Prof. Stevanović durchgeführt.

## 2.15 Isolierung und Identifizierung von Cathepsinen

8-10 mg Zelllysat der humanen B-Zelllinie Jethom wurden mit 5 µM DCG-0N in Reaktionspuffer (100 mM Citrat/Phosphat, pH 5,0, 1 mM EDTA, 50 mM DTT, 60 min., 37°C) inkubiert [modifiziert nach Baruch et al. 2002]. Eine weitere Probe wurde zur Kontrolle vorher 15 min. bei 95°C gekocht, um Proteasen zu inaktivieren. Anschließend

wurde die Reaktion durch Zugabe von SDS (Endkonzentration 0,5%) und zehnmütiges Erhitzen bei 80°C gestoppt. Die Probe wurde zur Abtrennung von überschüssigem DCG-0N auf eine vorher mit PBS äquilibrierte Gelfiltrationssäule (PD-10 Sephadex G-25M, Amersham Biosciences) gegeben und mit PBS eluiert. Die an DCG-0N gebundenen Polypeptide wurden mit Hilfe einmal mit PBS gewaschener Streptavidin-Sepharose-Partikel (20 µl, 60 min., RT, rotierend; Amersham Biosciences) isoliert, die Partikel fünfmal gewaschen (je 1 ml PBS, 0,1% SDS) und die Polypeptide über SPS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde mit kolloidalem Coomassie angefärbt (Protokoll nach AK Nordheim), die Banden zwischen 25 und 35 kDa ausgeschnitten und mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Danach wurden die Banden mit 50% Acetonitril in H<sub>2</sub>O gewaschen und getrocknet. Nun wurde Trypsin (Sequenzierungsgrad, Promega) zugegeben und die tryptischen Proteinfragmente sequenziell mit 5%iger Ameisensäure und 50%igem Acetonitril mit 5% Ameisensäure aus den Gelbanden extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und in einer Speed Vac<sup>®</sup> aufkonzentriert. Nach der Aufreinigung mit Hilfe von ZipTips (C18-ZipTip, Millipore) wurde eine kleine Menge auf α-Cyano-4-hydroxymizsäure/Nitrocellulose pipettiert und an einer MALDI (MALDI-TOF-MS, Bruker Daltonic) analysiert. Die einzelnen Peptidsequenzen wurden auf einem mit einer Nanoflow-Ionisierungsquelle und Nanoelektronenspraynadeln (BioMedical Instruments, Zoellnitz) ausgestatteten Nanoelektronenspray-Tandem MS (QSTAR Pulsar i, Applied Biosystems/MDS Sciex) analysiert und mit Hilfe der MASCOT-Software (Matrix Science) und der NCBIInr-Datenbank ausgewertet [Perkins et al. 1999]. Bei den folgenden Peptidmassen handelt es sich um monoisotopische, einfachprotonierte Massen: Cat C wurde anhand der Massenfragmente von 1053,56 Da (GIYHHTGLR) und 1338,71 Da (NVHGINFVSPVR) identifiziert (Gelfragment 25 kDa). Die Fragmente von 1089,58 Da (NGIPYWIBK), 1458,63 Da (GIMGEDTYPYQ GK) und das Teilfragment von 1797,95 Da (...VNHAVLAVGYGEK,) führten zu Cat H. Die beiden Massenfragmente von 998,50 Da (YTELPYGR) und 996,50 Da (GPVSVGVDAR) ergaben Cat S (beide im Gelfragment 30 kDa). In einem weiteren Gel wurde außerdem Cat Z aufgrund seiner Massenfragmente von 1010,48 Da (VGDYGSLSGR), 1217,52 Da (NSWGEPWGER) und 1308,62 Da (NVDGVNYASITR) identifiziert.

## 2.16 Inhibition von Cat S *in vivo*

### 2.16.1 Immunisierung von Mäusen

Mäuse wurden mit 500 µl einer LHVS-Lösung i.p. immunisiert (zwischen 0,1 und 100 mg/kg LHVS in DMSO/Neutralöl 1:4, Kontrollgruppe nur DMSO/Neutralöl). Nach verschiedenen Zeiten (1-24 h) wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> betäubt, getötet und Milz, Leber und Gehirn entnommen. Die Organe wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und Leber und Gehirn zur späteren Verwendung schockgefroren. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden im Kühlraum oder auf Eis durchgeführt. Die Milz der Tiere wurde umgehend in ein Teesieb aus Metall gelegt und mit etwas PBS mit Hilfe des Stempels einer 10 ml Spritze zerdrückt. Die in einer Petrischale aufgefangene Zellsuspension wurde auf ein 40 µm Nylonsieb (*cell strainer* 40 µm, BD Falcon) gegossen, mit etwas PBS gespült und dann bei 2000 rpm (4°C, 5 min.) pelletiert. Das Pellet wurde mit 5 ml ACK-Lysepuffer resuspendiert und 5 min. bei RT bewegt. Dann wurden 10 ml kaltes PBS zugegeben und die Suspension bei 1300 rpm 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 ml PBS aufgenommen und während erneuter Zentrifugation die Zellzahl bestimmt. Die gleiche Menge an Zellen wurde in Reaktionspuffer (50 mM Citrat/Phosphat, pH 5,0, 1 mM EDTA, 50 mM DTT, insgesamt 100 µl) mit 1 µl Z-Tyr[<sup>125</sup>I]-Ala-CHN<sub>2</sub> 30 min. bei RT inkubiert. Zur Kontrolle wurde bei der gleichen Anzahl Zellen einer unbehandelten Maus vor der Inkubation mit Z-Tyr[<sup>125</sup>I]-Ala-CHN<sub>2</sub> Cat S *in vitro* 45 min. mit 10 nM LHVS inhibiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 2-fach Probenpuffer und zehnmütigem Kochen bei 95°C gestoppt. Dann wurden die Proben 1 min. bei voller Drehzahl zentrifugiert und die gebundenen Polypeptide über SDS-PAGE in großen Gelapparaturen (Eigenbau) aufgetrennt. Nach Abtrennung der hochradioaktiven Gelfront wurde das Gel jeweils 1 h in DMSO (2x), in 20% DPO/DMSO und in H<sub>2</sub>O bei RT geschüttelt, in den Geltrockner gelegt, mit einem radiosensitiven Film in einer Gelkassette mit Verstärkerfolie bei -80°C exponiert und im Entwickler belichtet.

### 2.16.2 Induktion von EAE in Mäusen

Bei zwei Gruppen bestehend aus je 5 jungen C57BL/6 Mäusen mit einem durchschnittlichen Gewicht von etwa 20 g wurden 2 Tage vor der Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> (Tag -2 i.p.) jeweils 2 mg LHVS (100 mg/kg gelöst in 100 µl DMSO) oder ausschließlich DMSO i.p. appliziert. Weitere Applikationen erfolgten alle 48 h bis einschließlich Tag 14. An Tag 0 wurden die Tiere beider Gruppen mit je 100 µg MOG<sub>35-55</sub> in CFA (s.c.) immunisiert. Zusätzlich wurden zur gleichen Zeit und an Tag 2 je 150 ng PT (i.v.) appliziert. Anschließend wurde der Krankheitsverlauf der einzelnen Tiere täglich anhand eines klinischen Scores

während der nächsten 60 Tage festgehalten (klinischer Score: 0: keine Beeinträchtigung; 1: hängender Schwanz; 2: eingeschränkte Beweglichkeit der Hinterläufe; 3: komplette Hinterlaufparalyse; 4: Tetraplegie oder präfinales Stadium; 5: Tod).



### 3 Detektion aktiver Proteasen *in vitro*

#### 3.1 Synthese der Aktivitätsverbindung DCG-0N

##### Epoxidbaustein BB1

Diethyl-D-tartrat (**1**) wurde mittels HBr in Essigsäure über den zyklischen Übergangszustand (**2**) in zwei Schritten zu 52% bromiert (**3**) (Abb. 3-1). 2-Bromodiethyltartrat wurde mit DBU zu 53% zum Epoxid umgesetzt (**4**). Die alkalische Esterspaltung mittels KOH führte quantitativ zum Monoester (**5**) [Mori et al. 1980].

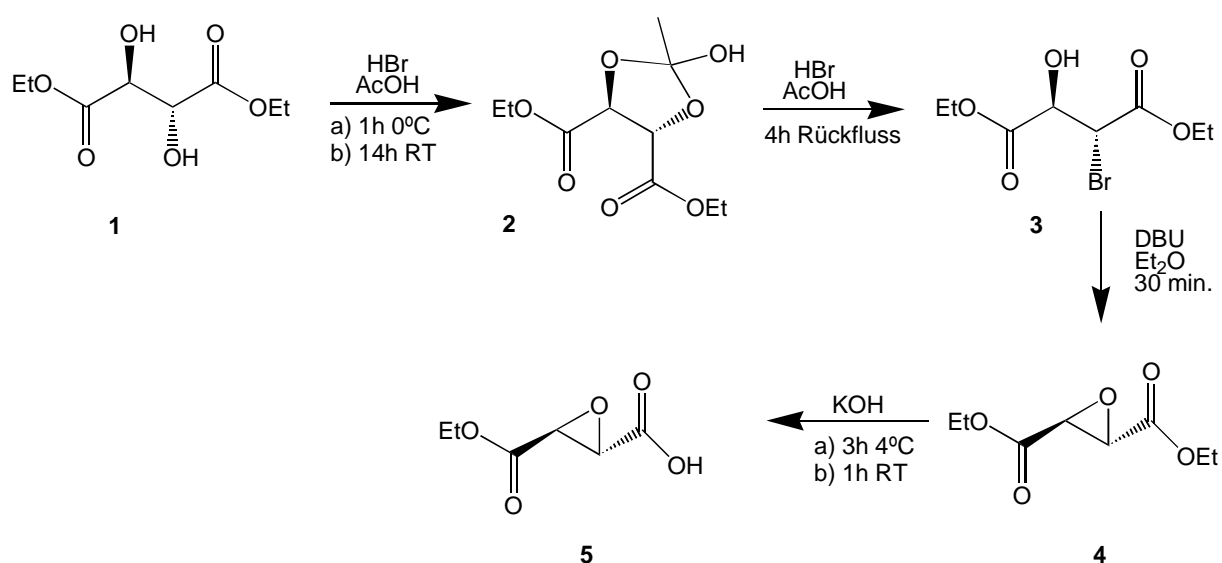
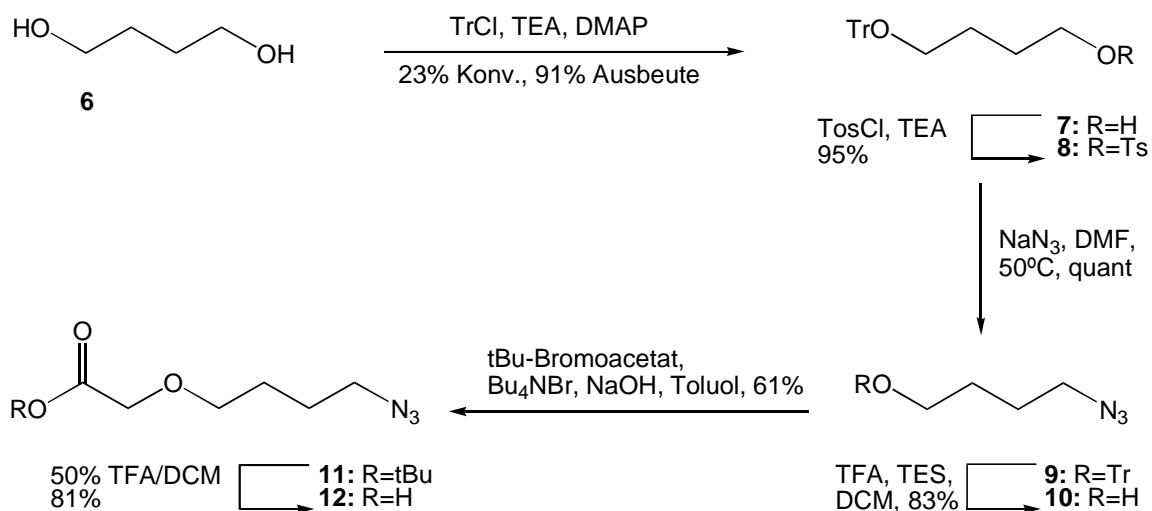


Abb. 3-1: Synthese des Epoxidbausteins BB1

##### Azidbaustein BB2

Nach der Tritylierung von (**6**) wurde der Monotrytilether (**7**) zu 23% erhalten und das Edukt Butandiol zu 68% zurückgewonnen (Abb. 3-2). Die Tosylierung des primären Alkohols, gefolgt vom Austausch des Tosylats durch Azid, führte zum geschützten Azidoalkohol (**9**). Die Entfernung der Tosylschutzgruppe (TFA/TES in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) ergab den Azidoalkohol (**10**). 4-Azido-1-butanol wurde unter Phasentransferbedingungen mit *tert*-Butylbromoacetat alkyliert, um den korrespondierenden *tert*-Butylester (**11**) zu erhalten. Die anschließende saure Hydrolyse des *tert*-Butylesters mit 50% v/v TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ergab in zwei Schritten die Azidosäure zu 49% nach insgesamt sechs Synthesestufen (**12**) [van Swieten et al. 2004].

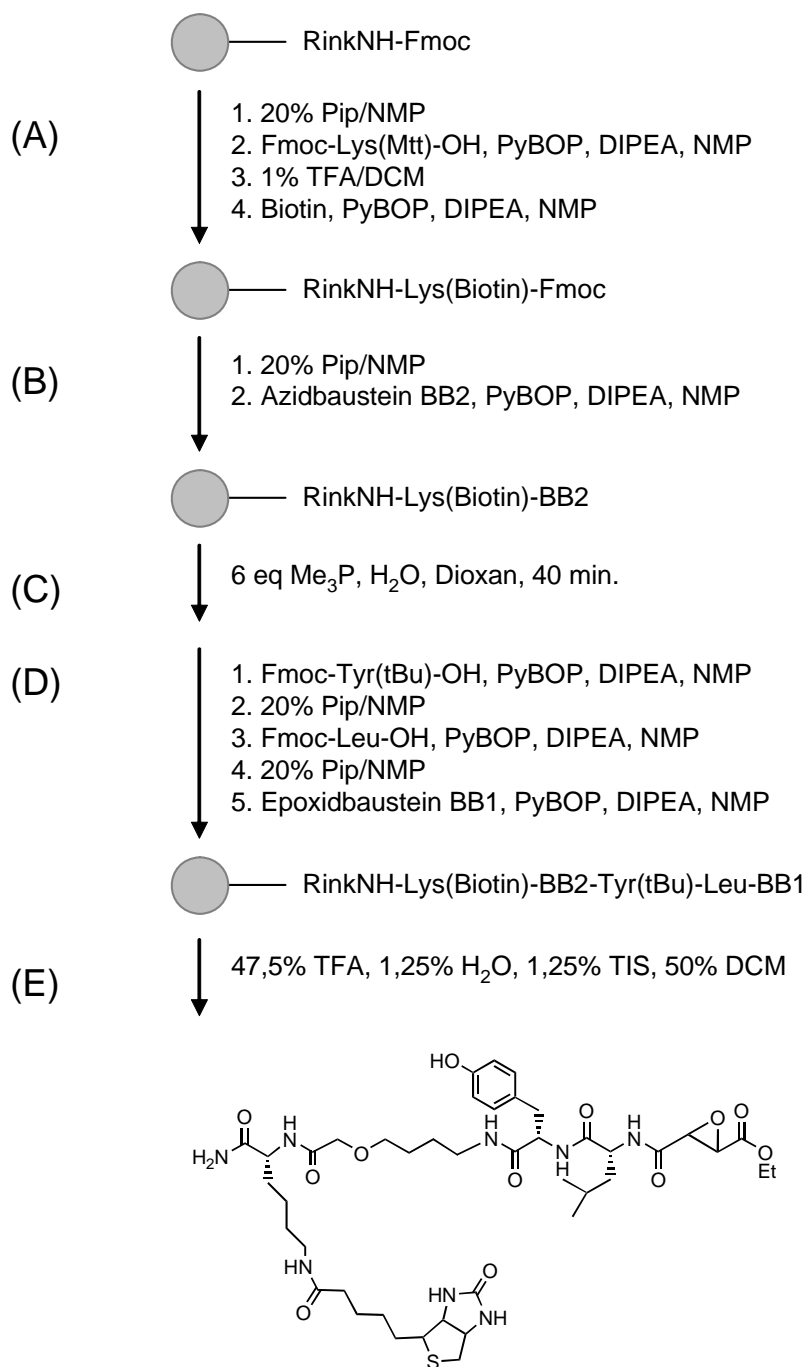


**Abb. 3-2:** Synthese des Azidbausteins BB2

### Festphasensynthese (SPPS) von DCG-0N

Die Synthese von DCG-0N basierte auf einem Rinkamidharz, wobei alle Kupplungsschritte manuell durchgeführt wurden (Abb. 3-3). Nach der Abspaltung vom Harz und der Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen wurde das resultierende Peptid (Ausbeute 29%, Reinheit 60%, Kontrolle mittels LC-MS) zur weiteren Verwendung über HPLC aufgereinigt [van Swieten et al. 2004].





**Abb. 3-3:** Synthese der Affinitätsverbindung DCG-0N. (A) Kupplung von Fmoc-Lys(Mtt)-OH an das Rinkamidharz. Abspaltung der Mtt-Schutzgruppe und Biotinylierung der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin. (B) Einführung des Azidbausteins BB2. (C) Einführung der freien Aminogruppe. (D) Kupplung weiterer Aminosäuren und des Epoxidbausteins BB1. (E) Abspaltung des Peptides vom Harz und Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen

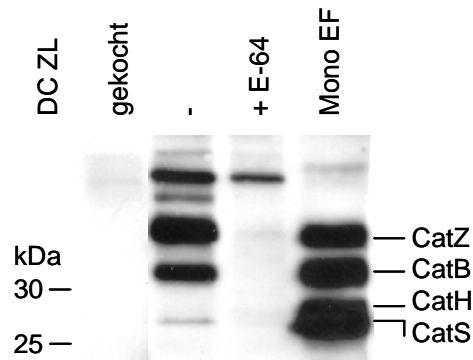
### 3.2 Analyse von Cathepsinen in Zelllysaten mittels Affinitätsmarkierungen

Um die Methode der Affinitätsmarkierung (*active site-specific labelling*, ASL) mit dem Ziel einzusetzen, das *rendez-vous* zwischen internalisiertem Antigen und endozytischen Proteasen in humanen DC zu simulieren, mussten zunächst die grundlegenden methodischen Eigenschaften von ASL in primären humanen APC etabliert werden. Dazu zählten Untersuchungen zur Spezifität, Sensitivität, Zellpermeabilität und pH-Abhängigkeit, die Testung verschiedener Detektionssysteme und die Identifizierung der markierten Spezies.

12,5% Tris/HCl Polyacrylamidgele erwiesen sich als geeignetes Werkzeug, um die relevanten Cathepsine, deren aktive Form sich im Größenbereich zwischen 20-40 kDa bewegt, optimal aufzutrennen. Verschiedene Detektionsmethoden wurden getestet, wobei sich die Anwendung von Streptavidin-Peroxidase aufgrund mangelnder Sensitivität als weniger geeignet erwies. Die Verwendung von radioaktiv markierten Affinitätsverbindungen vergrößerte die mögliche Sensitivität, aber die aufwendige Arbeitsweise und deren Sicherheitsaspekte ließ auch diese Methode nicht als erste Wahl erscheinen. Erst der Einsatz von Avidin (Vectastain<sup>®</sup>) erlaubte eine zufrieden stellende Arbeitsweise. Sowohl große Sensitivität als auch zügige und unkomplizierte Arbeitsschritte gewährleisteten eine sehr empfindliche und vor allen Dingen auch reproduzierbare Darstellung von Proteasenaktivitäten im Aktivitätsblot.

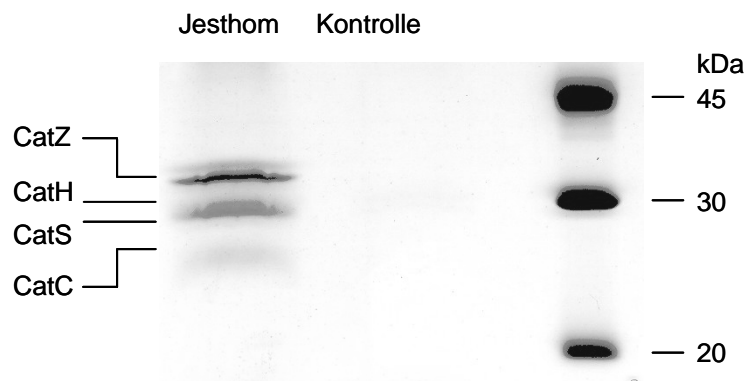
#### 3.2.1 Anwendung von DCG-0N zur Analyse und Identifikation von Cysteinproteasen

Die Inkubation von Zelllysaten generierter DC mit DCG-0N erlaubte die Detektion von Cat Z, B und S, wobei in endozytischen Fraktionen (EF) von primären Monozyten auch noch Cat H dargestellt wurde (Abb. 3-4). Die Vorinkubation mit 20  $\mu$ M E-64 für 45 min. bei RT unterband die Detektion aktiver Cathepsine mittels DCG-0N. Sowohl Cat Z, B und auch S wurden vollständig blockiert und deshalb nicht mehr dargestellt. Die markierten Polypeptide waren in Organellenfraktionen von primären Monozyten als Cat S, H, B und Z identifiziert worden [Greiner et al. 2003]. Interessanterweise wurde die schwache Bande oberhalb von Cat Z ebenfalls inhibiert, d.h. es handelt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls um eine Papain-ähnliche Cysteinprotease. Das Signal bei etwa 37 kDa blieb auch nach Inhibition durch E-64 sichtbar, ist folglich unspezifisch und keine Cysteinprotease vom Papain-Typ. Bei der auf 95°C erhitzten Kontrolle wurden die Proteasen denaturiert und daher keine Signale erhalten.



**Abb. 3-4:** Aktivitätsblot verschiedener Cysteinproteasen in Zellysaten (ZL) von MO-DC. Das Kochen der Probe und die Inhibition aktiver Cathepsine (Cat) mittels E-64 vor der Inkubation mit der Affinitätsverbindung DCG-0N dienten neben der Verwendung endozytischer Fraktionen (EF) primärer Monozyten als Spezifitätskontrolle.

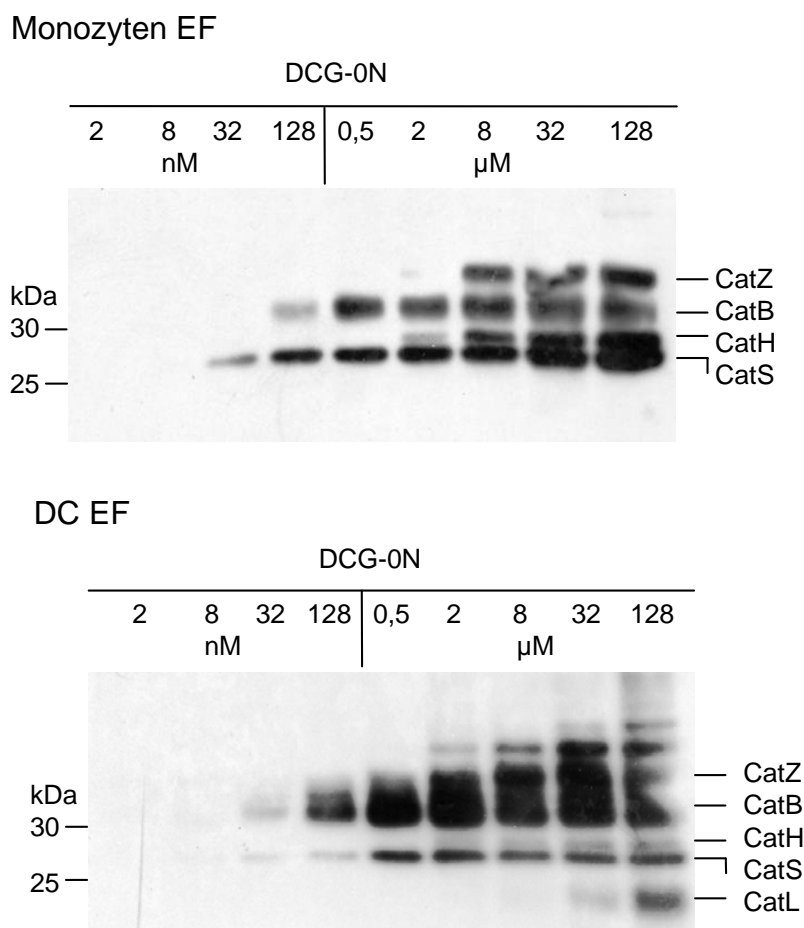
Da humane DC zur Identifizierung einzelner Cathepsine nicht in ausreichender Menge generiert werden konnten, wurden dazu Lysate von humanen B-Zellen verwendet. Diese wurden zusätzlich mit einer vorher inaktivierten Kontrollprobe, bei der durch Erhitzen auf 95°C alle aktiven Proteasen denaturiert wurden, mit DCG-0N inkubiert. Die gebundenen Polypeptide wurden mit Hilfe von Streptavidin-Partikeln isoliert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Anfärbung mit colloidalem Coomassie wurden drei prominente Banden zwischen 25 und 35 kDa isoliert, im Gel verdaut und mittels MS identifiziert. Die Abwesenheit dieser Banden in der denaturierten Probe bestätigte die Spezifität der Detektion und der Isolierung (Abb. 3-5). Die Bande bei 25 kDa wurde als Cat C identifiziert, während das Signal bei 30 kDa Cat S und Cat H enthielt [Lautwein et al. 2004].



**Abb. 3-5:** Identifizierung aktiver Cathepsine in humanen B-Zellen mittels DCG-0N. Die Isolierung gebundener Polypeptide erfolgte mit Hilfe von Streptavidin-Partikeln. Nach der Auftrennung über SDS-Page und Anfärbung mit colloidalem Coomassie wurden die Polypeptide im Gel mit Trypsin verdaut und mittels MS identifiziert. Die Kontrolle wurde vor der Inkubation mit DCG-0N aufgekocht. Abgebildet sind die angefärbten Polypeptide.

Die Bande bei 35 kDa enthielt verschiedene Polypeptide, die nicht eindeutig einer bestimmten Protease zugeordnet werden konnten. In einem weiteren Gel wurde diese Bande als Cat Z identifiziert.

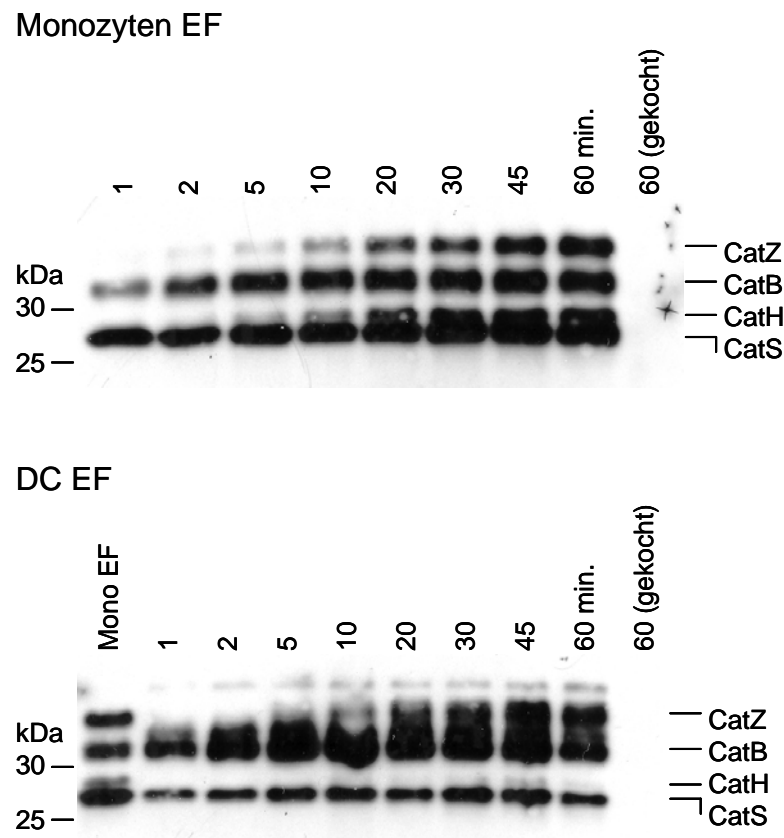
DCG-0N ermöglichte in endozytischen Fraktionen von primären Monozyten die konzentrationsabhängige Darstellung zunächst von Cat S, gefolgt von Cat B und erst bei höheren Konzentrationen von Cat H und schließlich von Cat Z (Abb. 3-6). In endozytischen Fraktionen von generierten DC wurde dagegen zuerst Cat B als Doppelbande detektiert, anschließend Cat S und Cat Z. Zusätzlich wurde noch Cat L detektiert, wogegen Cat H kaum darstellbar war.



**Abb. 3-6:** Aktivitätsblot der Titration von DCG-0N zur Darstellung aktiver Cathepsine in endozytischen Fraktionen (EF) von primären Monozyten und MO-DC.

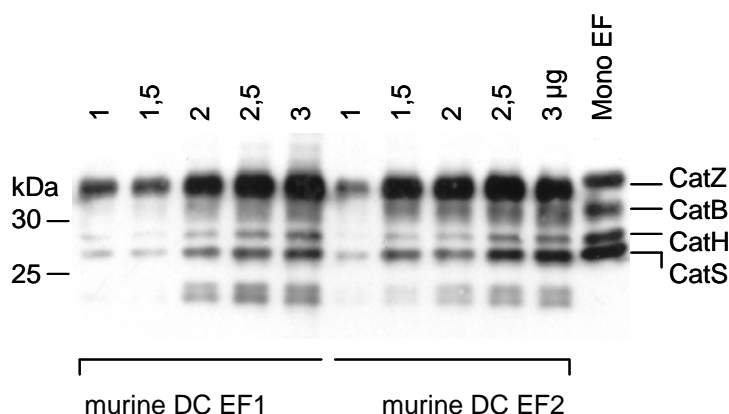
Ein unterschiedliches Detektionslimit der einzelnen Proteasen in denselben Zellfraktionen spiegelt bei gleichen Affinitäten bezüglich DCG-0N unterschiedliche Aktivitäten wieder. Unterschiede zwischen den Zellfraktionen von Monozyten und DC deuten auf Abweichungen

ihrer Proteasenaktivitäten hin. Dies wird vor allem bei der Verwendung geringer Konzentrationen von DCG-0N offensichtlich. Da die Affinität von Cat H bei der Verwendung des E-64-Derivates DCG-0N ebenfalls sehr klein ist und Cat H in DC nur in sehr geringer Menge vorliegt, wird es kaum dargestellt [Barrett et al. 1982]. Besonders klar wird hier, dass in Monozyten deutlich mehr aktives Cat S vorkommt als in DC. Um alle aktiven Cysteineproteasen darzustellen, sollte die Konzentration von DCG-0N in der Probe im Bereich zwischen 8 und 32  $\mu\text{M}$  liegen.



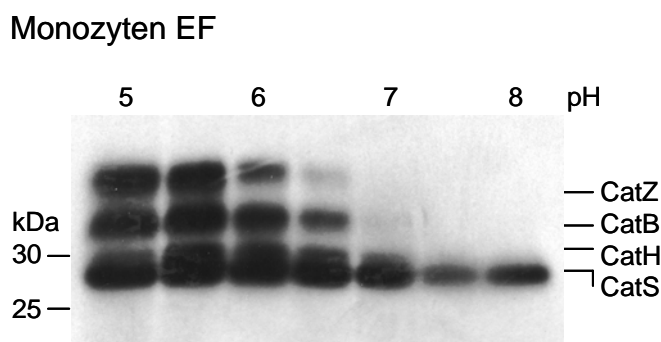
**Abb. 3-7:** Aktivitätsblot verschiedener Inkubationszeiten von DCG-0N zur Darstellung aktiver Cathepsine in endozytischen Fraktionen (EF) von primären Monozyten und MO-DC.

Versuche, bei denen Proteinmenge und Inkubationszeit endozytischer Fraktionen von primären Monozyten und generierten DC variiert wurden, ergaben bei der Verwendung von 10  $\mu\text{M}$  DCG-0N eine zuverlässige Markierung der einzelnen Proteasen ab 30 Minuten Inkubationszeit (Abb. 3-7). Außerdem sollte die eingesetzte Proteinmenge 2  $\mu\text{g}$  nicht unterschreiten, da sonst Informationen über die Aktivität einzelner Proteasen verloren gehen (Abb. 3-8).



**Abb. 3-8:** Aktivitätsblot mit DCG-0N von verschiedenen endozytischen Fraktionen (EF1 und EF2) muriner DC. Die Darstellung aktiver Cathepsine hängt von der eingesetzten Menge an Gesamtprotein ab.

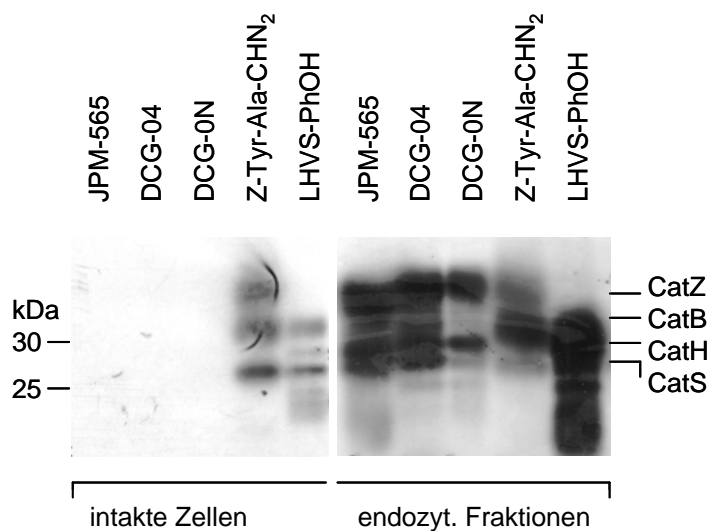
Wurde der pH-Wert des verwendeten Inkubationspuffers variiert, so blieb nur Cat S über den kompletten pH-Bereich von 5 bis 8 aktiv (Abb. 3-9). Dieser Versuch bestätigt bereits publizierte Ergebnisse [Kirschke et al. 1989, Honey & Rudensky 2003], wonach Cat S proteolytische Aktivität über einen weiten pH-Bereich besitzt (Optimum bei pH 6,5), während andere endozytische Cathepsine über einen deutlich eingeschränkten Aktivitätsbereich verfügen. Um die Aktivität aller endozytischen Cathepsine während des Versuches zu gewährleisten, wurden ASL ausnahmslos bei pH 5 durchgeführt.



**Abb. 3-9:** Aktivitätsblot mit DCG-0N von endozytischen Fraktionen (EF) primärer Monozyten. Die Darstellung aktiver Cathepsine ist vom pH-Wert des Inkubationspuffers abhängig.

Um die Frage zu klären, ob die Affinitätsverbindung DCG-0N zellpermeabel ist und damit unabhängig von aktiven, energieabhängigen Aufnahmewegen internalisiert wird, wurden intakte U937, eine humane Monozytenzelllinie, die keine ausgeprägten Endozytosemechanismen außer einer Rezeptor-vermittelten Aufnahme besitzt, mit [<sup>125</sup>I]-markiertem DCG-0N

1 h bei 37°C inkubiert. Während bei der Verwendung von radioaktivem Z-Tyr-Ala-CHN<sub>2</sub> und LHVS-PhOH (jeweils zellpermeabel) einzelne Cathepsine markiert wurden, waren bei DCG-0N genau wie bei radioaktivem JPM-565 und DCG-04 (beide nicht zellpermeabel) keine Cathepsine detektierbar (Abb. 3-10).



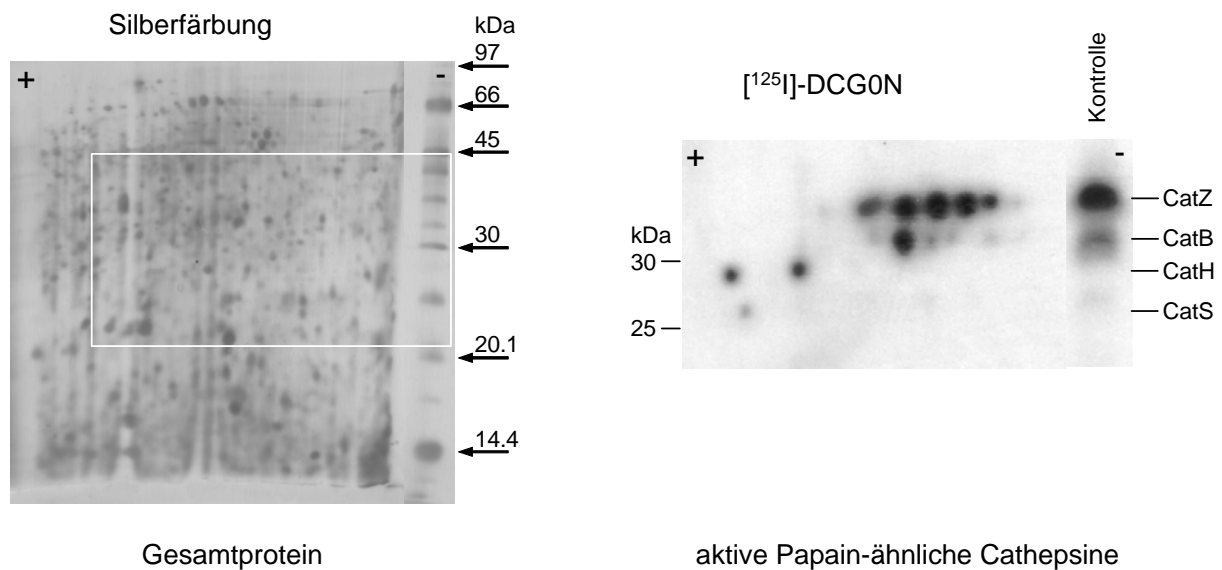
**Abb. 3-10:** Aktivitätsblot mit verschiedenen [<sup>125</sup>I]-markiertem Affinitätsverbindungen zur Untersuchung auf ihre Zellpermeabilität. Verwendet wurden intakte Zellen der Monozytenzelllinie U937 oder endozytische Fraktionen.

Somit ist die Affinitätsverbindung DCG-0N nicht zellpermeabel und wird nur über energieabhängige Aufnahmewege internalisiert. Außerdem bestätigte sich, dass JPM-565 und dessen Derivate DCG-04 und DCG-0N, deren reaktives Element aus einem Epoxid besteht, das gleiche Set an aktiven Proteasen detektieren können und deren Affinität fast identisch sind. Das sehr kleine Diazomethan Z-Tyr-Ala-CHN<sub>2</sub> und das Vinylsulfon LHVS-PhOH dagegen stellen Cat Z Aktivität kaum (Z-Tyr-Ala-CHN<sub>2</sub>) oder überhaupt nicht (LHVS-PhOH) dar.

### Analyse von Cathepsinaktivitäten in der 2D-SDS-PAGE

Die aktiven Polypeptide verschiedener Cathepsine liegen alle zwischen 25 und 35 kDa und besitzen zum Teil eine ähnliche Größe (z.B. Cat S und Cat V). Da eine Überlagerung einzelner Signale in der konventionellen eindimensionalen SDS-PAGE nicht unwahrscheinlich ist, sollte ASL auch in der zweiten Dimension angewendet werden, um eine weitere Auflösung zu erreichen. Deshalb wurden endozytische Fraktionen von U937 mit [<sup>125</sup>I]-markiertem DCG-0N inkubiert und nach der isoelektrischen Fokussierung mittels eines

15% Tris/HCl Polyacrylamidgels in der zweiten Dimension aufgetrennt. Nun wurde eine Silberfärbung nach Blum durchgeführt, um alle aufgetrennten Polypeptide sichtbar zu machen (Abb. 3-11, linke Seite). Die Darstellung aktiver Cysteinproteasen im gleichen Gel ermöglichte die radioaktiv markierte Affinitätsverbindung DCG-0N mittels Autoradiographie (Abb. 3-11, rechte Seite). Mehrere distinkte *spots* wurden dargestellt, bei denen es sich aufgrund ihres Molekulargewichtes wahrscheinlich um Cat Z, Cat B, Cat H und Cat S handelt.

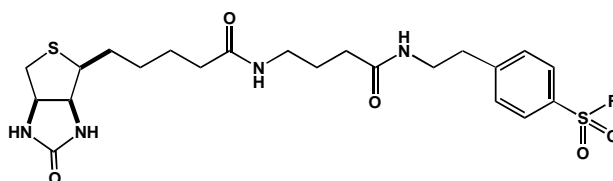


**Abb. 3-11:** Darstellung aktiver Cathepsine in endozytischen Fraktionen von B-Zellen mittels 2D-SDS-PAGE. Links sind die mit einer Silberfärbung sichtbar gemachten Proteine abgebildet. Rechts ist ein daraus vergrößerter Ausschnitt des Aktivitätsblots mit [<sup>125</sup>I]-markiertem DCG-0N zu sehen. Um die Zuordnung der einzelnen Signale zu erleichtern, wurde ein Teil der Probe ohne vorherige isoelektrische Fokussierung nur anhand der Größe der Polypeptide aufgetrennt (Kontrolle).



### 3.2.2 Anwendung von BAEBSF zur Analyse von Serinproteasen

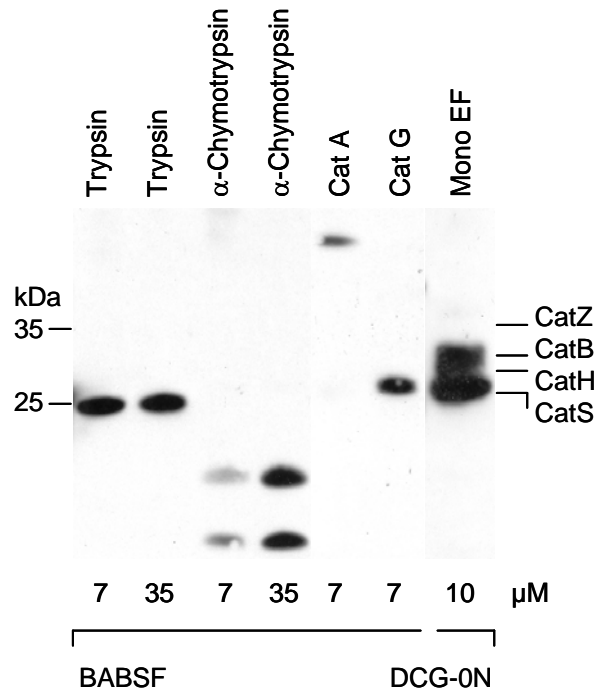
Während Affinitätsverbindungen zur Detektion von Cysteinproteasenaktivitäten seit längerem verwendet werden, ist dieser Ansatz bei den Serinproteasen noch relativ neu. Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, Biotin- $\epsilon$ Ahx-AEBSF (BAEBSF, Abb. 3-12), ein Derivat des Serinproteaseninhibitors AEBSF als Affinitätsverbindung für Serinproteasen zu etablieren, um deren Aktivität, Funktion und Regulation in verschiedenen Zellen zu untersuchen.



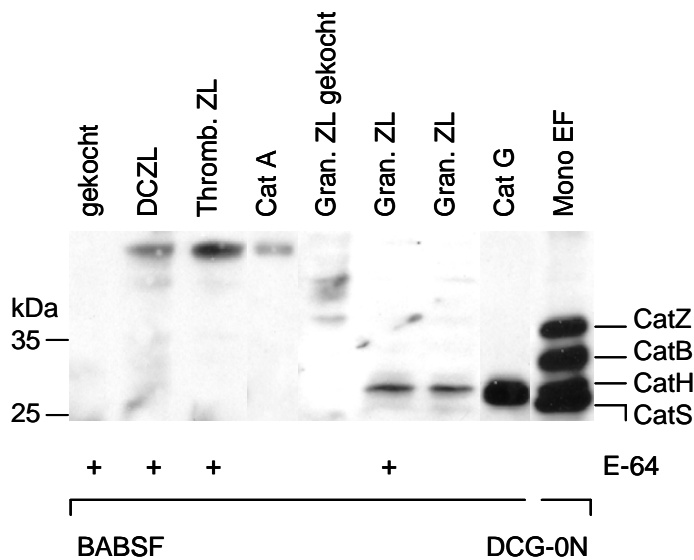
**Abb. 3-12:** Die Affinitätsverbindung Biotin- $\epsilon$ Ahx-AEBSF (BAEBSF) zur Analyse von Serinproteasen

Als Inkubationspuffer wurde 50 mM Tris mit 5 mM EDTA bei pH 8 verwendet, weil das pH-Optimum der zu detektierenden Cathepsine im leicht alkalischen Milieu liegt. Einzelne Proben wurden mit DCG-0N für 30 min. bei RT inkubiert, bei 95°C aufgeköcht und die gebundenen Polypeptide nach der Auftrennung über SDS-PAGE und Western Blot mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

Trypsin,  $\alpha$ -Chymotrypsin (je 5  $\mu$ g), Cat G und Cat A (je 250 ng) wurden mit verschiedenen Konzentrationen BAEBSF inkubiert. Als Kontrolle wurden zusätzlich endozytische Fraktionen von primären Monozyten mit DCG-0N inkubiert. BAEBSF erlaubte die Detektion von Aktivität bei allen verwendeten Serinproteasen (Abb. 3-13). Aktives Trypsin wurde bei 24 kDa dargestellt, zwei Untereinheiten von  $\alpha$ -Chymotrypsin bei 15 bzw. 10 kDa. Die Verwendung verschiedener Konzentrationen BAEBSF führte bei  $\alpha$ -Chymotrypsin zu unterschiedlichen Aktivitätssignalen, wogegen bei Trypsin die Intensitäten der Signale unverändert blieben. Aktives Cat G und Cat A wurden bei 28 bzw. 40 kDa dargestellt.

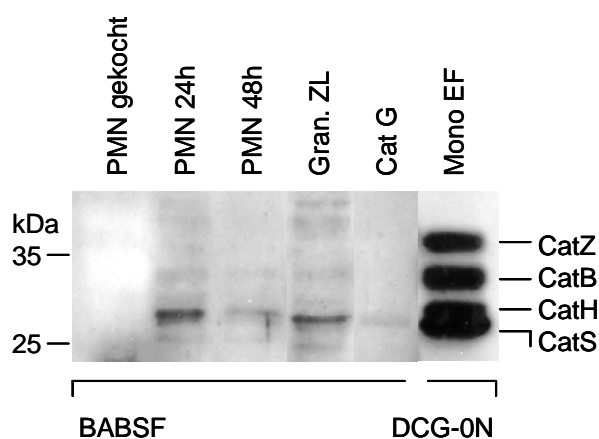


**Abb. 3-13:** Aktivitätsblot mit BAESBF zur Detektion der Proteasenaktivität isolierter Enzyme. Als Kontrolle diente ein Aktivitätsblot mit DCG-0N von endozytischen Fraktionen (EF) primärer Monozyten.



**Abb. 3-14:** Aktivitätsblot mit BAESBF zur Darstellung aktiver Serinproteasen in Zelllysaten (ZL) verschiedener primärer Zellen. Das Kochen der Probe und die Inhibition aktiver Cysteinproteasen mittels E-64 vor der Inkubation mit der Affinitätsverbindung BAESBF dienten neben der Inkubation endozytischer Fraktionen (EF) von primären Monozyten mit DCG-0N zur Darstellung aktiver Cysteinproteasen als Spezifitätskontrolle.

Die Inkubation von Zelllysaten (ZL) aus DC und Thrombozyten mit 10  $\mu$ M BAESBF im nächsten Versuch erlaubte die Detektion einer Bande bei 40 kDa (Abb. 3-14). Die Vorinkubation mit 20  $\mu$ M E-64 für 45 min. bei RT schloss die Detektion aktiver Cysteinproteasen und somit eine Verwechslung von Cystein- und Serinproteasen aus. Wurde die Probe vor der Inkubation auf 95°C erhitzt und damit die Proteasen denaturiert, wurden keine Signale erhalten. Aufgrund dieser Kontrollen und der gleichen Laufeigenschaften der Banden im Gel handelt es sich sehr wahrscheinlich um Cat A. Mit der gleichen Methode konnte in Lysaten von primären Granulozyten eine Bande bei 28 kDa und somit Cat G-Aktivität nachgewiesen werden.



**Abb. 3-15:** Aktivitätsblot mit BAESBF zur Darstellung aktiver Serinproteasen in Zelllysaten (ZL) verschiedener primärer Zellen. Das Kochen der Probe diente neben der Inkubation endozytischer Fraktionen (EF) von primären Monozyten mit DCG-0N zur Darstellung aktiver Cysteinproteasen als Spezifitätskontrolle.

Wurden Zelllysate von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) mit BAESBF inkubiert, so wurde ebenfalls ein Signal für Cat G erhalten (Abb. 3-15). Das Kochen der Probe vor der Inkubation führte zum Verlust des Signals. Vergleicht man PMN 24 und 48 h nach der Isolierung, so ist ein deutlicher Rückgang an Cat G-Aktivität zu beobachten.

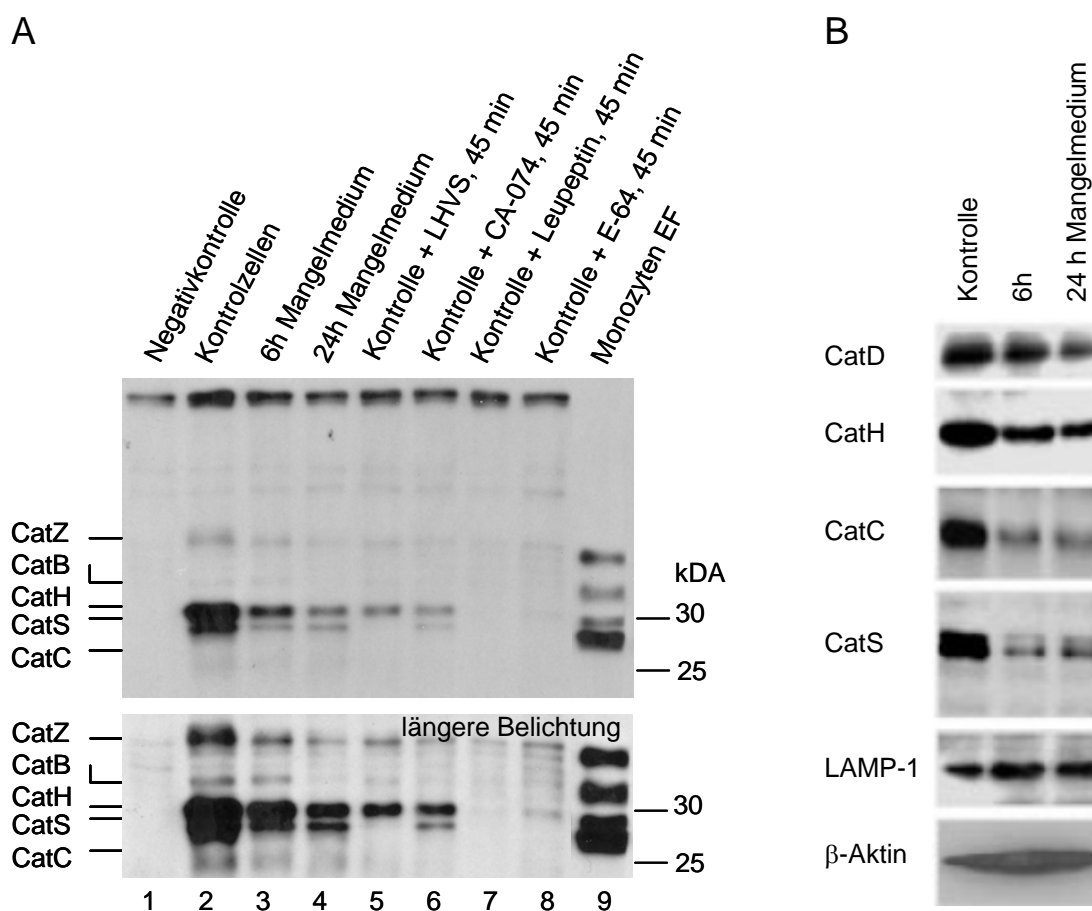
### 3.3 Modulation von Cathepsinaktivitäten bei biologischen Fragestellungen

Die Anwendung von ASL in Zellysaten und endozytischen Fraktionen ermöglicht die Beurteilung der Aktivität MHC Klasse II-assoziiierter Proteasen (Cathepsine) bei verschiedenen biologischen Fragestellungen.

#### 3.3.1 Autophagie

Eine mögliche Ursache der veränderten Antigenpräsentation unter Autophagiebedingungen ist die Beeinflussung der MHC Klasse II-Prozessierungsmaschinerie durch eine Änderung der Aktivitäten endozytischer Proteasen. Um dies zu prüfen, wurden im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Immunologie und Zellbiologie der Universität Tübingen in Zusammenarbeit mit Diplombiochemiker Jörn Dengjel (Arbeitsgruppe Prof. Stefan Stevanović) BLC unter Kontroll- versus Autophagiebedingungen im ASL und im Westernblot untersucht. 5 µg Gesamtprotein aus endozytischen Fraktionen von Kontrollzellen und Zellen nach 6 h bzw. 24 h Kultivierung in Mangelmedium wurden für den Aktivitätsblot 30 min. bei RT mit 10 µM DCG-0N inkubiert. Zur Kontrolle wurde eine Probe vor der Inkubation mit DCG-0N bei 95°C 10 min. gekocht und die Proteasen denaturiert (Spur 1, Abb. 3-16 A). Die Zugabe von 25 nM Cat S-Inhibitor LHVS (Spur 5), 1 µM Cat B-Inhibitor CA-074 (Spur 6) und der Breitband-Cysteinproteaseninhibitoren Leupeptin und E-64 (1 mM bzw. 25 µM, Spur 7-8) dienten zur Spezifitätskontrolle. Aktive Cathepsine wurden nach der Auftrennung über SDS-PAGE und Western Blot mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Bei den Kontrollzellen wurden starke Signale für aktives Cat S und Cat H, nach längerer Exposition auch Signale für Cat Z, B und C detektiert (Spur 2). Die verwendeten Inhibitoren belegten die Identität der einzelnen Signale [Lautwein et al. 2004]. Nach 6 h Mangelernährung nahmen alle Signalintensitäten deutlich ab, wobei keine eindeutige Präferenz für eine individuelle Protease zu erkennen war; 18 h später setzte sich der Trend fort (Spur 3+4).

Zur Darlegung möglicher Unterschiede in der Proteinexpression wurden identische Mengen Gesamtprotein aus endozytischen Fraktionen von Kontrollzellen und Zellen nach 6 bzw. 24 h Kultivierung in Mangelmedium mittels Western Blot gegen Cat D, H, C, S, β-Aktin und LAMP-1 (lysosomales Markerprotein) untersucht. Auch hier war der gleiche Trend zu beobachten: Bei allen Cathepsinen wurden die Signale nach Mangelernährung in einem zeitlichen Verlauf schwächer. Dieser Effekt lag nicht in einer unselektiven Degradierung aller zellulären Proteine per se oder spezieller endozytischer Proteine begründet, da die Signale für β-Aktin und das lysosomale Markerprotein LAMP-1 konstant blieben (Abb. 3-16 B).



**Abb. 3-16:** Veränderung der Zusammensetzung endozytischer Proteasen während Autophagie. (A) Abgebildet ist ein Aktivitätsblot mit DCG-0N. Es wurden endozytische Fraktionen von Kontrollzellen und Zellen nach 6 h bzw. 24 h Kultivierung in Mangelmedium verwendet. Das Kochen der Probe und die Zugabe von 25 nM Cat S-Inhibitor LHVS (Spur 5), 1  $\mu$ M Cat B-Inhibitor CA-074 (Spur 6) und der Breitband-Cysteinproteaseninhibitoren Leupeptin und E-64 (1 mM bzw. 25  $\mu$ M, Spur 7-8) vor der Inkubation mit DCG-0N dienten zur Spezifitätskontrolle. Endozytische Fraktionen (EF) von primären Monozyten wurden als weitere Kontrolle mit DCG-0N inkubiert. (B) Dargestellt ist ein Western Blot mit Antikörpern gegen verschiedene Cathepsine, das lysosomale Markerprotein LAMP-1 und  $\beta$ -Aktin.

Um die Auswirkungen dieser verminderten Proteasenaktivitäten für die Antigenprozessierung zu simulieren, wurde das MBP-Peptid ENPVVHFFKNIVTPRTP (MBP<sub>83-99</sub>), ein gut charakterisiertes Modellpeptid für die MHC Klasse II-Prozessierung mit aktiven endozytischen Extrakten, von Kontrollzellen und Zellen nach 24 h Mangelernährung verdaut [Beck et al. 2001]. Die erhaltenen Degradierungsprodukte wurden mittels RP-HPLC, Maldi-MS und Mikrosequenzierung nach Edman analysiert. Auch hier bestätigte sich, dass die Drosselung der Aktivität endozytischer Proteasen durch Autophagie die Degradierungsprodukte von MBP-Peptid in unterschiedlichem Umfang beeinflusste. Wie erwartet wurde in Zellen, bei denen Autophagie induziert wurde, aufgrund reduzierter Proteasenaktivität weniger Peptid degradiert, in Kontrollzellen dagegen fand man mehr Degradierungsprodukte.

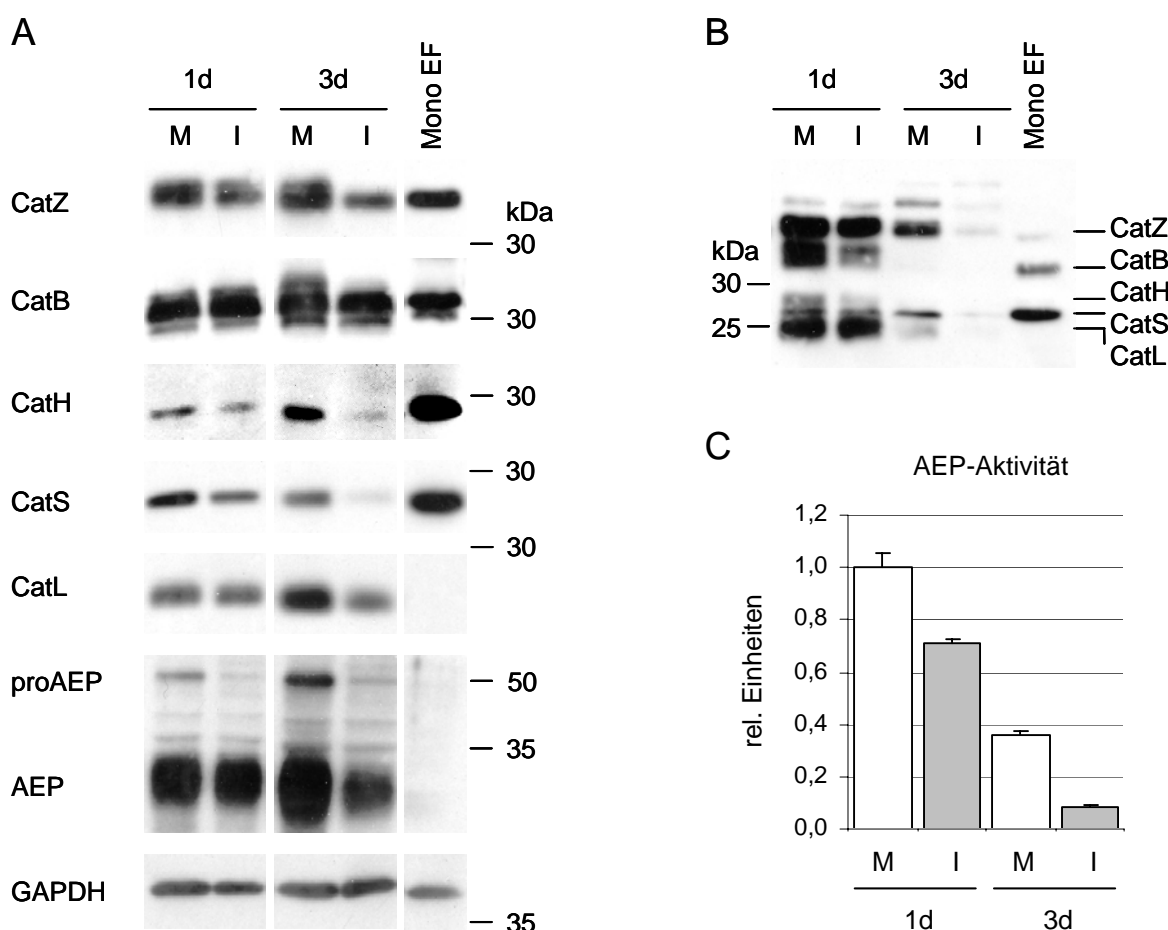
Leicht verminderte Mengen von durch Cat D und Cat S oder L generierten Degradierungsprodukten wurden in Konsistenz mit den Ergebnissen im Affinitäts- und Western Blot gefunden. Bei AEP dagegen war der Einfluss der Autophagie deutlich größer, die von AEP generierten Spaltprodukte traten um 33% vermindert auf [Dengjel et al. 2005]. Somit hat eine allgemeine Drosselung der Aktivität endozytischer Proteasen mit subtilen Unterschieden zwischen einzelnen Schlüsselenzymen dennoch einen deutlichen Einfluss auf die Generierung von MHC Klasse II-Liganden und ist möglicherweise an der Regulation der Präsentation verschiedener Peptide aus der gleichen Proteinquelle beteiligt.

### 3.3.2 Effekt von HCMV auf die Aktivität endozytischer Proteasen in DC

Endozytische Proteasen spielen in der MHC Klasse II-vermittelten Prozessierung eine zentrale Rolle, da sie zum einen die invariante Kette schrittweise zu CLIP degradieren (AEP, Cat S und L) und zum anderen Peptide aus exogenen Antigenen generieren, mit denen anschließend MHC Klasse II-Komplexe beladen werden. HCMV verfügt über eine Reihe von Strategien zur Immunevasion. Der Einfluss von HCMV auf die Antigenprozessierung und die beteiligten endozytischen Proteasen ist bis heute noch unbekannt. Im Rahmen einer Kooperation mit dem virologischen Institut der Universität Tübingen in Zusammenarbeit mit Diplombiologe Tobias Kessler (Arbeitsgruppe Riegler, Prof. G. Jahn) wurde erstmals der Einfluss einer HCMV-Infektion auf die Expression und/oder Aktivität endozytischer Proteasen in DC untersucht (zur Generierung von DC s. Kapitel 4). Unter Verwendung des Endothelzellpropagierten HCMV-Stamms TB40/E wurde bei unreifen DC eine durchschnittliche Infektionseffizienz von 70-90% erreicht [Riegler et al. 2000]. HCMV- und mock-infizierte unreife DC (I bzw. M) wurden einen bzw. drei Tage (d) nach Infektion bei pH 7 lysiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot auf veränderte Proteinexpression analysiert.

Einen Tag nach Infektion war eine deutlich verminderte Expression von Cat S, H und Z zu beobachten, während Cat B und L unverändert exprimiert wurden (Abb. 3-17 A). Bei AEP verringerte sich nur die Expression der Pro-Form. Nach zwei weiteren Tagen war die Expression aller untersuchten Proteasen mit Ausnahme von Cat B deutlich verringert. Dieser Effekt lag nicht in einer unselektiven Degradierung aller zellulären Proteine begründet, da die Expression von GAPDH konstant blieb. Eine veränderte Expression einzelner Proteasen muss sich nicht zwangsläufig auf deren Aktivität auswirken, da diese u.a. auch durch intrazelluläre Inhibitoren wie Cystatine geregelt wird. Um den möglichen Einfluss einer HCMV-Infektion auf die Aktivität endozytischer Proteasen zu ermitteln, wurden HCMV- und mock-infizierte unreife DC einen und drei Tage nach Infektion lysiert und mit der Affinitätsverbindung DCG-0N inkubiert. Nach der Auftrennung über SDS-PAGE und Western Blot wurden die detektierten Polypeptide mittels Chemilumineszenz visualisiert. Einen Tag nach Infektion mit HCMV kam es zu einer Abnahme der Aktivität bei Cat S und Cat B (Abb. 3-17 B). Nach drei Tagen war die Aktivität aller Proteasen deutlich reduziert. Diese Resultate decken sich bis auf Cat B mit den beobachteten Ergebnissen auf der Proteinexpressionsebene. Auffallend ist, dass die Aktivität von Cat B schon einen Tag nach Infektion stark verringert war, obwohl dessen Proteinexpression stabil blieb. Dies deutet auf funktionelle Cat B Regulatoren in DC hin. Da die Aktivität von AEP nicht mit DCG-0N dargestellt werden kann, wurde diese mit Hilfe des

fluorogenen Substrats Z-VAN-AMC bestimmt. Hierbei war ebenfalls eine klare Verringerung der Aktivität aufgrund der HCMV-Infektion sowohl einen als auch drei Tage nach Infektion zu beobachten (Abb. 3-17 C). Zusammenfassend wirkt sich eine HCMV-Infektion auf die Aktivität endozytischer Proteasen aus und verringert die Aktivität der Schlüsselproteasen Cat S und AEP bereits während der frühen Infektionsphase.

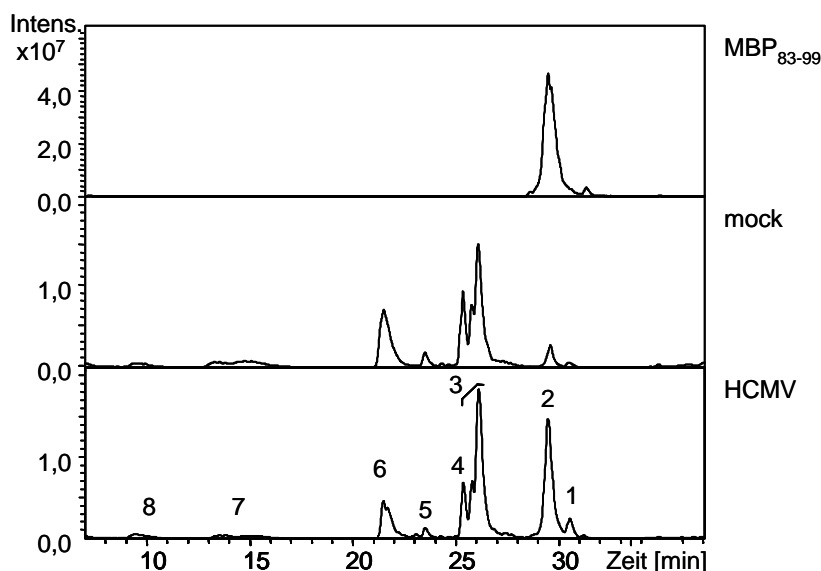


**Abb. 3-17:** Veränderung der Gesamtexpression verschiedener Cathepsine in HCMV-infizierten iDC. Es wurden Zelllysate von HCMV- und mock-infizierten iDC (I bzw. M) einen und drei Tage nach Infektion verwendet. Endozytische Fraktionen (EF) von primären Monozyten dienten als Kontrolle. (A) Western Blot mit Antikörpern gegen verschiedene Cathepsine, AEP und GAPDH. (B) Aktivitätsblot mit DCG-0N zur Darstellung aktiver Cysteinproteasen. (C) Messung der AEP-Aktivität in Zelllysaten von HCMV- und mock-infizierten iDC mit Hilfe des fluorogenen Substrates Z-VAN-AMC.

Um die Auswirkung von veränderter Expression und Aktivität endozytischer Proteasen auf die Prozessierung von Antigenen zu ermitteln, wurden Verdauexperimente mit MBP Peptid ENPVVHFFKNIIVTPRTP (MBP<sub>83-99</sub>) durchgeführt. Da HCMV-infizierte DC nicht in ausreichender Menge generiert werden konnten, um endozytische Fraktionen zu isolieren, wurden Zelllysate bei pH 5 hergestellt. Bei pH 5 sind zytosolische Proteasen weitgehend



inaktiv. Weil aber relevante Restaktivitäten nicht endozytischer Proteasen ausgeschlossen werden sollten, wurde auf das etablierte Modellantigen MBP<sub>83-99</sub> zurückgegriffen, für dessen Degradierung durch endozytische Proteasen ausführliche Voruntersuchungen vorlagen [Burster et al. 2005]. MBP-Peptid wurde mit einen und drei Tage nach Infektion generierten Zelllysaten inkubiert und die erhaltenen Degradierungsprodukte mittels RP-HPLC und ESI-MS analysiert. Wie erwartet war der Anteil an unverdaulichem MBP in HCMV-infizierten DC deutlich größer als in den mock-infizierten Kontrollen. Bereits nach 3 h war in den Kontrollzellen (1 d p.i.) MBP fast vollständig verdaut, während in HCMV-infizierten Zellen noch eine große Menge Edukt vorhanden war (Abb. 3-18). Verdaue von MBP mit Zelllysaten drei Tage nach Infektion führten zu einem vergleichbaren Ergebnis (nicht abgebildet).

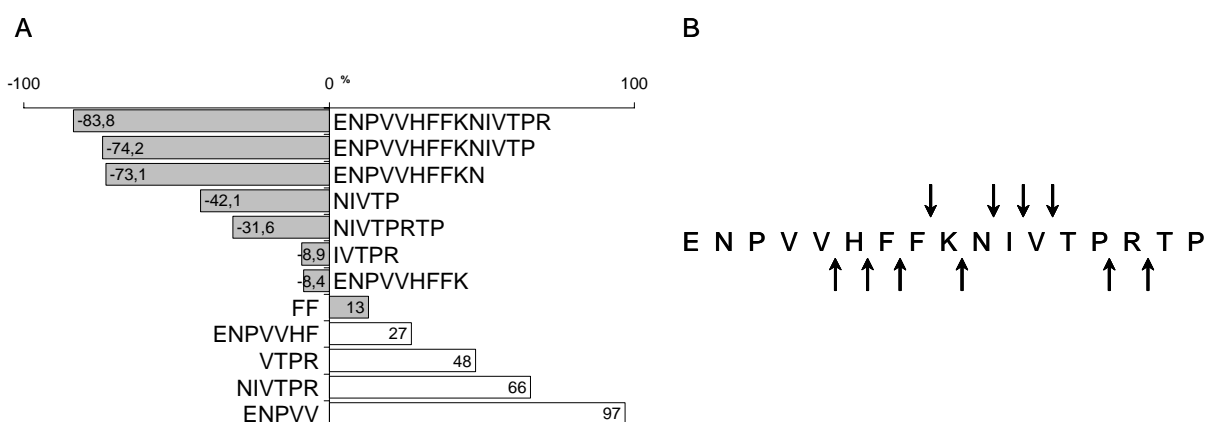


**Abb. 3-18:** Das Peptid MBP<sub>83-99</sub> wurde mit Zelllysaten HCMV- und mock-infizierter iDC einen Tag nach Infektion über 3 h bei 37°C und pH 5 verdaut. Die proteolytischen Peptidfragmente wurden mittels HPLC aufgetrennt. Abgebildet sind die einzelnen Chromatogramme inklusive desjenigen des unverdaulichen Peptides (oben). Die Peaks mit den Nummern 1-8 verweisen auf die folgende Tabelle.

Die Analyse einzelner Fraktionen ergab eine stark verringerte Aktivität einer nicht-identifizierten Serinprotease (Abb. 3-19, Peptidfragment ENPVVHFFKNIVTPR, -84%). Auch die Sequenz N-I (spezifische AEP-Schnittstelle) wurde weniger gespalten (-73%). Eine geringere Aktivität von Cat S oder L belegten die in vermindertem Ausmaß generierten Spaltprodukte NIVTPRTP und NIVTP (-32 bzw. -42%). Da die Stabilität der Cat L-Aktivität einen Tag nach Infektion im Aktivitätsblot belegt wurde, kann der Rückgang der Spaltprodukte wahrscheinlich auf eine verminderte Cat S-Aktivität zurückgeführt werden. Das durch Cat D generierte Peptidfragment ENPVVHF nimmt um 27% zu, was eventuell durch eine verringerte weitere Prozessierung der von Cat D generierten Fragmente erklärt werden kann.

# ERGEBNISSE

Peak	Zeit [min]	gef. Masse	[M+H] <sup>+</sup>	Peptidsequenz	Protease	mock [%]	HCMV [%]	Fläche	mock/HCMV [%]
1	30,1-31,4	666,1 (+3) 998,5 (+2)	1994,03	ENPVVHFFKNIVTPRTP	unverdaut	0,4	2,0	1934702746 (MBP) 5235309 (mock) 36080167 (HCMV)	0,27 mock/MBP 1,86 HCMV/MBP 14,5 mock/HCMV
		599,9 (+3) 899,4 (+2)	1796,13	ENPVVHFFKNIVTPR	-	4,7	24,2	70305590 (mock) 433102946(HCMV)	16,2
		547,8 (+3) 821,4 (+2)	1640,69	ENPVVHFFKNIVTP	-	1,2	3,9	18031048 (mock) 69766232 (HCMV)	25,8
2	28,7-30,2	666,1 (+3) 998,5 (+2)	1994,03	ENPVVHFFKNIVTPRTP	unverdaut	-	-	s.o.	
		599,9 (+3) 899,4 (+2)	1796,13	ENPVVHFFKNIVTPR	-	-	-	s.o.	
3	25,9-27,0	558,9 (+2) 1116,6 (+1)	1115,74	ENPVVHFFK	Cat S/L	28,7	26,0	426052234(mock) 465198007(HCMV)	91,6
		615,9 (+2) 1230,6 (+1)	1229,70	ENPVVHFFKN	AEP	2,0	4,4	29416170(mock) 79034659(HCMV)	26,9
	25,9-27,0	421,1 (+2) 841,5 (+1)	840,43	ENPVVHF	Cat D	12,2	8,0	181607873 (mock) 143340456 (HCMV)	127,0
		313,1 (+1)	312,10	FF	Cat S, Cat G	12,6	9,3	186496474(mock) 165626543 (HCMV)	113,0
4	25,0-25,6	421,1 (+2) 841,5 (+1)	840,43	ENPVVHF	Cat D	-	-	s.o.	
5	23,1-24,1	897,5 (+1) 543,2 (+1)		NIVTPRTP NIVTP	Cat S/L Cat S/L	0,4 1,6	0,5 2,4	5665595 (mock) 8290648 (HCMV) 23851117 (mock) 41996838 (HCMV)	68,4 57,9
6	20,9-22,7	699,4 (+1) 472,2 (+1)		NIVTPR VTPR	Cat S/L -	19,0 7,5	9,5 4,2	282791400 (mock) 170218506 (HCMV) 111582845 (mock) 75509302 (HCMV)	166,0 148,0
7	12,8-16,4	557,2 (+1)		ENPVV	Cat S	6,9	2,9	103170379 (mock) 52344372 (HCMV)	197,0
8	8,9-10,9	585,4 (+1)		IVTPR	AEP	2,8	2,6	41819778 (mock) 45898775 (HCMV)	91,1

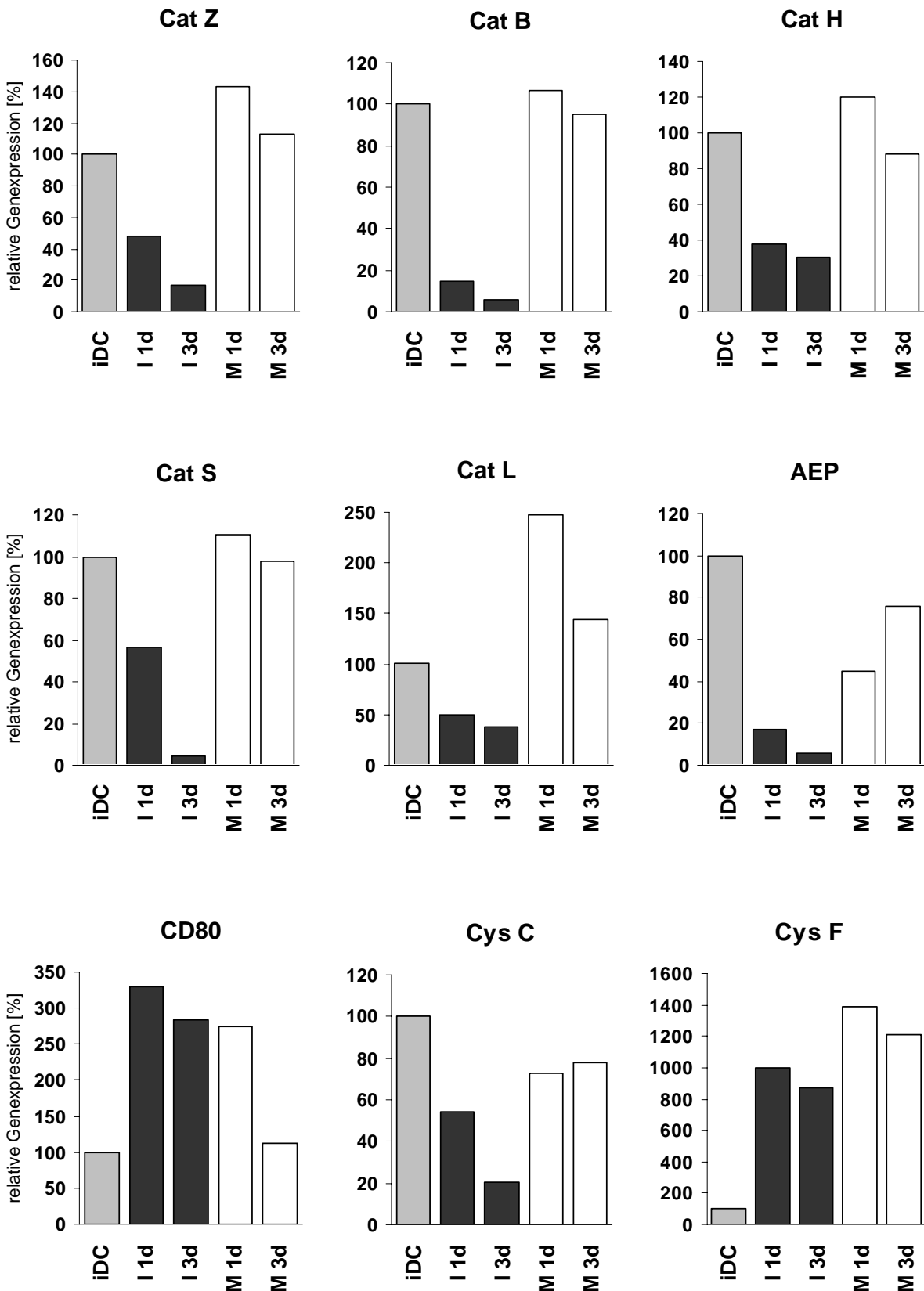


**Abb. 3-19:** Quantitative Verteilung der MBP<sub>83-99</sub>-Fragmente in Zellysaten HCMV- und mock-infizierter iDC. In der Tabelle sind den einzelnen Peaks der Chromatogramme die Retentionszeiten, die gefundenen Massen und die daraus berechnete Monoisotopische Masse [M+H]<sup>+</sup> zugeordnet; außerdem die mittels MS identifizierte Fragmente von MBP<sub>83-99</sub> und die für diesen Schnitt verantwortlichen Proteasen (falls bekannt). In den nächsten beiden Spalten ist der prozentuale Anteil des Fragmentes in der jeweiligen Probe gegenüber dem unverdauten Peptid (=100%) enthalten. Die Berechnung beruht auf den Flächen unter den einzelnen Peaks in der jeweiligen Probe. Die letzte Spalte weist den Quotienten mock/HCMV auf. Werte kleiner 100% bedeuten einen geringeren Anteil des Fragmentes in der mock-infizierten gegenüber der HCMV-infizierten Probe. (A) Relative Häufigkeit der einzelnen Fragmente in HCMV- vs. mock-infizierten iDC. (B) Bevorzugte Spaltstellen bei MBP<sub>83-99</sub>.

Auch die Zunahme von kleinen Peptidfragmenten ist durch verminderte Proteasenaktivität erklärbar (ENPVVHF +27%, NIVTPR +66%, VTPR +48%, ENPVV +97%): Bei mock-infizierten DC ist bereits nach einer Verdauzeit von 3 h der Hauptteil der großen Fragmente zu in der HPLC nicht mehr auftrennbaren sehr kleinen Peptiden degradiert. Die durch eine HCMV-Infektion verursachte Aktivitätsminderung endozytischer Proteasen verlangsamt die terminale Degradierung und deshalb treten vermehrt kleinere Fragmente auf.

Um die Auswirkungen einer HCMV-Infektion auf die Transkription einzelner Gene zu untersuchen, wurde aus HCMV- und mock-infizierten unreifen DC einen und drei Tage nach Infektion Gesamt-RNA gewonnen und in cDNA transkribiert. Mit Hilfe von real time PCR wurde anschließend die relative Expressionsstärke der einzelnen Transkripte im Verhältnis zu unreifen DC bestimmt, die zuvor mittels einer endogenen Kontrolle (18S rRNA) normalisiert worden war. Die Transkription von HLA-DR, des Transaktivators CIITA und der beiden Isoformen der invarianten Kette, Ii p31 und Ii p41 war einen und drei Tage nach HCMV-Infektion deutlich verringert (nicht abgebildet). Mock-infizierte Zellen und unreife DC zeigten ein ähnliches Transkriptionsmuster. Alle untersuchten Cathepsine, einschließlich der an der Degradation der invarianten Kette beteiligten Cathepsine S und L und auch AEP wurden in HCMV-infizierten Zellen stark vermindert transkribiert, während mock-infizierte Zellen im Vergleich zur Kontrolle kaum eine Veränderung zeigten (Abb. 3-20).

Die Aktivität von Cathepsinen wird posttranslational durch Inhibitoren wie die bereits erwähnten Cystatine kontrolliert. Sie inhibieren Endopeptidasen (Cat L, S) im pikomolaren und Exopeptidasen im nanomolaren Bereich (Cat B, C, H, Z). Cystatin C ist der bekannteste Modulator der Cathepsine. Reife DC transkribieren weniger Cystatin C, was zu gesteigerter Cathepsinaktivität und damit zu einer verbesserten Prozessierung von MHC Klasse II-Komplexen führen kann [Pierre & Mellman 1998]. In HCMV-infizierten unreifen DC kam es nach der Infektion zu einer zeitabhängigen deutlich verringerten Transkription von Cystatin C, wogegen die Transkription in mock-infizierten Zellen nur geringfügig absank. Also kann die beobachtete verminderte Aktivität einzelner Cathepsine nicht auf einer erhöhten RNA-Expression von Cystatin C beruhen. Cystatin F wurde vor kurzem als möglicher Inhibitor von Cat H beschrieben [Langerholc et al. 2005], wobei es bisher aber noch keine Daten zur Expressionskinetik in unreifen und reifen DC gibt. Im Gegensatz zu Cystatin C wurde Cystatin F in HCMV- und mock-infizierten Zellen gegenüber unreifen DC deutlich stärker transkribiert. Die ansteigende Expression von CD80 in infizierten Zellen im Vergleich zu unreifen DC schloss zytopathogene Effekte von HCMV aus, die möglicherweise generell in einer unselektiven reduzierten Transkription resultieren.

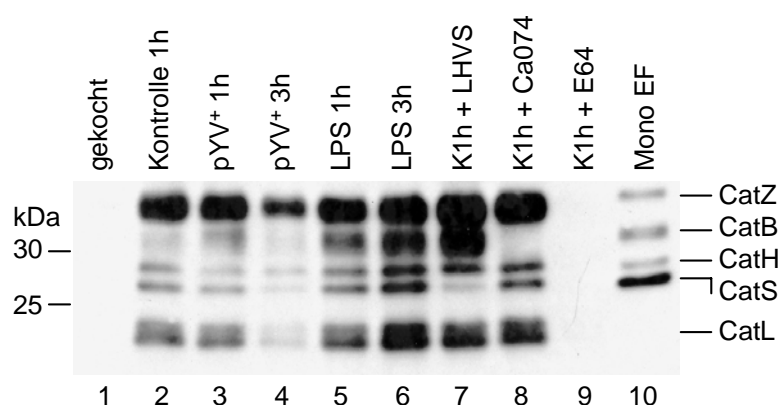


**Abb. 3-20:** Veränderung der relativen Genexpression bei Cysteinproteasen, Cystatinen und CD80. Abgebildet ist die relative Expression der angegebenen Gene in Bezug auf iDC. Aus iDC, sowie HCMV- und mock-infizierten iDC (I bzw. M) wurde RNA gewonnen und in cDNA transkribiert, deren Konzentration mittels real time PCR bestimmt wurde.

### 3.3.3 Effekt von Yersinien auf die Aktivität endozytischer Proteasen in DC

Eine Infektion von murinen DC mit *Yersinia enterocolitica* (YE) führt zu einer reduzierten Präsentation von MHC Klasse II-Komplexen und CD80 an der Zelloberfläche, begleitet von einer verminderten Fähigkeit zur Aktivierung von T-Zellen [Orth et al. 1999]. Eine mögliche Ursache dafür könnte die veränderte Expression oder Aktivität der endozytischen Proteasen darstellen.

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen in Zusammenarbeit mit Diplomchemikerin Stella Erfurth (Arbeitsgruppe Prof. I.B. Autenrieth) wurde erstmals der Einfluss einer YE-Infektion auf die Aktivität endozytischer Proteasen in DC untersucht. Aus infizierten unreifen murinen BM-DC eine und drei Stunden nach Infektion und aus Zellen unter Kontrollbedingungen wurden endozytische Fraktionen gewonnen und im ASL untersucht.

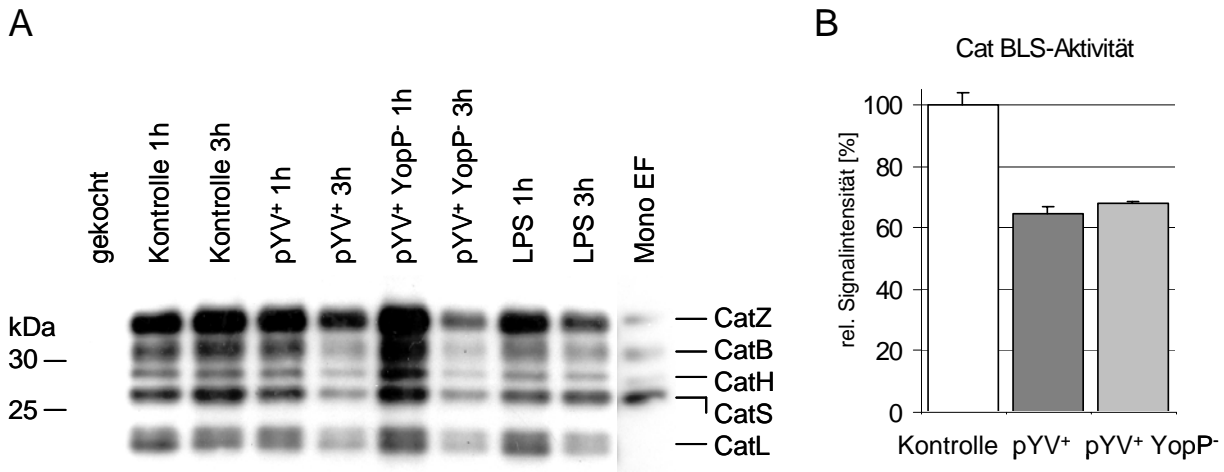


**Abb. 3-21:** Aktivitätsänderung verschiedener Cathepsine in YE-infizierten murinen iDC 1 h und 3 h nach Infektion. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot mit DCG-0N. Es wurden endozytische Fraktionen von Kontrollzellen und mit YE-infizierten Zellen (pYV<sup>+</sup>) verwendet. Das Kochen der Probe (Spur 1) und die Zugabe von 25 nM Cat S-Inhibitor LHVS (Spur 7), 1  $\mu$ M Cat B-Inhibitor CA-074 (Spur 8) und des Breitband-Cysteinproteaseninhibitors E-64 (25  $\mu$ M, Spur 9) diente als Spezifitätskontrolle, ebenso endozytische Fraktionen (EF) von primären Monozyten.

Es wurden je 2  $\mu$ g Gesamtprotein bei RT mit 10  $\mu$ M DCG-0N inkubiert. Zur Kontrolle wurde eine Probe vor der Inkubation mit DCG-0N bei 95°C gekocht und die Proteasen denaturiert (Spur 1 Abb. 3-21). Die Zugabe von 25 nM Cat S-Inhibitor LHVS (Spur 7), 1  $\mu$ M Cat B-Inhibitor CA-074 (Spur 8) und dem Breitband-Cysteinproteaseninhibitor E-64 (25  $\mu$ M, Spur 9) diente als Spezifitätskontrolle. Aktive Cathepsine wurden nach der Auftrennung über SDS-PAGE und Western Blot mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Bei den Kontrollzellen wurde ein starkes Signal für aktives Cat Z und schwächere Signale für Cat B,

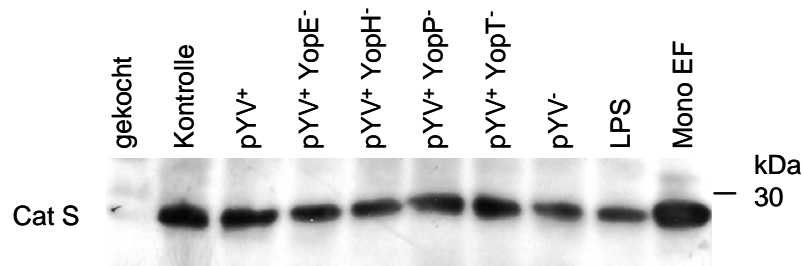
H, S und L detektiert (Spur 2). Die verwendeten Inhibitoren belegten die Identität der einzelnen Signale [Lautwein et al. 2004]. 1 h nach Infektion war kein Aktivitätsunterschied zu beobachten (Spur 3), nach 3 h nahmen alle Signalintensitäten deutlich ab (Spur 4), wobei keine eindeutige Präferenz für eine individuelle Protease zu erkennen war. Eine LPS-induzierte Maturation der murinen DC dagegen führte zu einer Zunahme der Proteasenaktivitäten 1 h bzw. 3 h nach Infektion (Spur 5 und 6).

Das pYV-Plasmid von YE enthält das Yop-Virulon, welches verschiedene *Yersinia outer proteins* (Yop) kodiert, unter denen YopP als wichtigster Vertreter gilt. Im ASL war in endozytischen Fraktionen muriner DC, die mit pYV ohne YopP (pYV<sup>+</sup> YopP<sup>-</sup>) infiziert wurden 1 h nach Infektion eine Zunahme der Proteasenaktivität zu beobachten, während nach 3 h die Aktivität auf das Niveau des vollständigen Virulenzplasmids pYV absank (Abb. 3-22 A).



**Abb. 3-22:** (A) Aktivitätsänderung verschiedener Cathepsine in YE-infizierten murinen iDC 1 h und 3 h nach Infektion. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot mit DCG-0N. Es wurden endozytische Fraktionen von Kontrollzellen und mit YE-infizierten Zellen (pYV<sup>+</sup> oder pYV<sup>+</sup> YopP<sup>-</sup>) verwendet. Das Kochen der Probe vor der Inkubation mit DCG-0N diente zur Spezifitätskontrolle, ebenso die Verwendung endozytischer Fraktionen (EF) von primären Monozyten. (B) Cat BLS-Aktivitäten 3 h nach Infektion mit pYV<sup>+</sup> oder pYV<sup>+</sup> YopP<sup>-</sup> gemessen mit dem fluorogenen Substrat Z-FR-AMC.

ASL ohne YopE, H, T oder mit inaktiviertem pYV (pYV<sup>-</sup>) zeigten keine signifikanten Aktivitätsunterschiede und somit keine eindeutige Präferenz für einzelne Virulenzproteine (nicht abgebildet). Enzymaktivitätsmessungen mit dem fluorogenen Cat BLS-Substrat Z-FR-AMC [Schmidt et al. 1997] bestätigten die Resultate des ASL (Abb. 3-22 B). In murinen DC, die mit dem kompletten Virulenzplasmid pYV (pYV<sup>+</sup>) oder mit pYV ohne YopP (pYV<sup>+</sup> YopP<sup>-</sup>) infiziert wurden, sanken 3 h nach Infektion die Aktivitäten von Cat B, L und S um jeweils ein Drittel.



**Abb. 3-23:** Westernblot mit Antikörpern gegen Cat S zum Vergleich der Gesamtexpression von Cat S in Kontrollzellen und infizierten murinen iDC 3 h nach Infektion mit YE (pYV<sup>+</sup>) und verschiedenen depletierten Plasmiden (pYV<sup>+</sup> Yop<sup>-</sup>).

Zur Darlegung von möglichen Unterschieden in der Proteinexpression wurden identische Mengen Gesamtprotein aus endozytischen Fraktionen von Kontrollzellen und infizierten murinen DC 1 h nach Infektion mittels Western Blot gegen Cat S untersucht. Hierbei war keine Änderung der Proteinexpression feststellbar (Abb. 3-23).



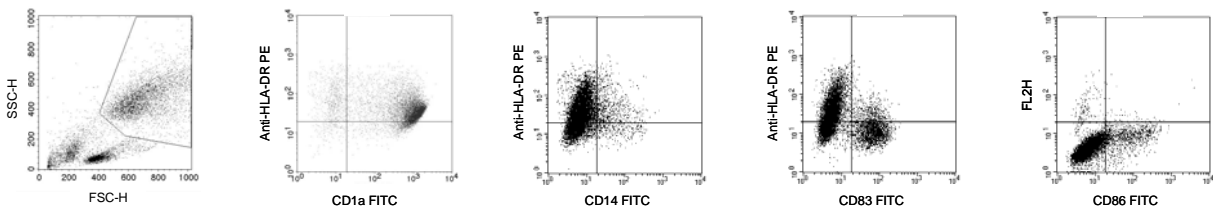


## 4 Cathepsinaktivitäten im endozytischen Kompartiment intakter DC

### 4.1 Generierung von Dendritischen Zellen

In Anlehnung an [Romani et al. 1994] wurde im Arbeitskreis eine Vorschrift zur Generierung von Dendritischen Zellen aus *buffy coats* etabliert. Mononukleäre Zellen wurden aus peripherem Blut (PBMC) mittels Dichtezentrifugation aufkonzentriert und durch Adhäsion in Zellkulturflaschen und anschließendes Waschen von anderen Zelltypen abgetrennt. Die adhären CD14<sup>+</sup>-Monozyten lösten sich nach Stimulation mit Interleukin-4 und GM-CSF von der Gefäßwand ab und wurden weiter in Suspension kultiviert. Nach sechs Tagen Kultivierung bildeten sich unreife Dendritische Zellen aus. Ein Zeichen für die erfolgreiche Generierung von unreifen Dendritischen Zellen ist neben der typischen Form mit ihren baumartigen Ausläufern auch die Ausbildung von Zellclustern, die durch die Aneinanderlagerung einzelner Zellen entstehen.

Die genaue Charakterisierung der Dendritischen Zellen erfolgte durchflusszytometrisch mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen Oberflächenproteine am sechsten Kultivierungstag. Die Expression der einzelnen Oberflächenproteine unterscheidet sich je nach Differenzierungsgrad der Zellen [Hart, Blood 1997].



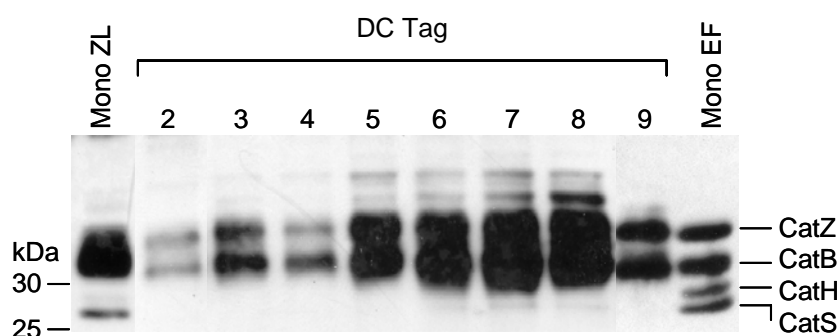
**Abb. 4-1:** Durchflusszytometrische Charakterisierung kultivierter unreifer Dendritischer Zellen anhand der Oberflächenantigene CD1a, HLA-DR, CD14, CD83 und CD86.

CD1a ist der klassische Marker für Dendritische Zellen. In den durchgeführten Experimenten waren etwa 70% aller viablen Zellen CD1a positiv (Abb. 4-1). Die Oberflächenantigene CD83 und CD86, Marker für reife Dendritische Zellen, waren in der ausgewählten Zellpopulation (*gate*) nur geringfügig auf den gemessenen CD1a<sup>+</sup>-Zellen exprimiert. Monozyten tragen auf ihrer Oberfläche das Antigen CD14. Bei den analysierten Zellen konnte es kaum gefunden werden, während HLA-DR in hohem Maße nachweisbar war. CD3 ist spezifisch für T-Zellen, während CD19 hauptsächlich von B-Zellen exprimiert wird. Beide Oberflächenantigene konnten auf den generierten Zellen nicht gefunden werden (nicht

abgebildet). Nach der beschriebenen Methode waren etwa 70% der Zellen in Kultur unreife Dendritische Zellen. Der Rest setzte sich aus einer sehr geringen Monozytenpopulation, Dendritischen Vorläuferzellen, aber auch aus B- und T-Zellen zusammen. Die nur geringe Verunreinigung der Dendritischen Zellen durch T- und B-Zellen erlaubte Pulsversuche mit intakten DC, da T- und B-Zellen die Affinitätsverbindung DCG-0N kaum durch Endozytose aufnehmen.

Die LPS-induzierte Maturation der Dendritischen Zellen wurde ebenfalls im Durchflusszytometer kontrolliert. Während sich der prozentuale Anteil an CD1a- und CD14-positiven Zellen im Zuge der Ausreifung kaum änderte, nahmen die Marker für reife DC CD80, CD83 und CD86 deutlich zu (nicht abgebildet). Auch das Oberflächenprotein HLA-DR, welches infolge der Aktivierung Dendritischer Zellen vermehrt an der Zelloberfläche exponiert wird, wurde durch die LPS-induzierte Maturation im FACS<sup>®</sup> erhöht gemessen.

Die Ausdifferenzierung von Monozyten zu unreifen DC mittels Zytokinen *in vitro* dauert etwa sechs Tage [Romani et al. 1994]. Wie ändert sich die endozytische Proteasenausstattung während dieses Differenzierungsprozesses? Dazu wurden während der *in vitro* Differenzierung Zellen entnommen und Lysate generiert. Die Lysate wurden mit 10 µM DCG-0N 30 min. bei RT inkubiert und detektierte Polypeptide nach der Auftrennung über SDS-PAGE und Aktivitätsblot mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Zum Vergleich wurden Zelllysate und endozytische Fraktionen von primären Monozyten aufgetragen (Abb. 4-2). Im Verlauf der Differenzierung nahmen die Aktivitäten von Cat B und Cat Z deutlich zu. Von Tag 5 bis Tag 8 blieben die Signalintensitäten ziemlich konstant auf einem hohen Niveau und nahmen ab Tag 9 wieder ab.

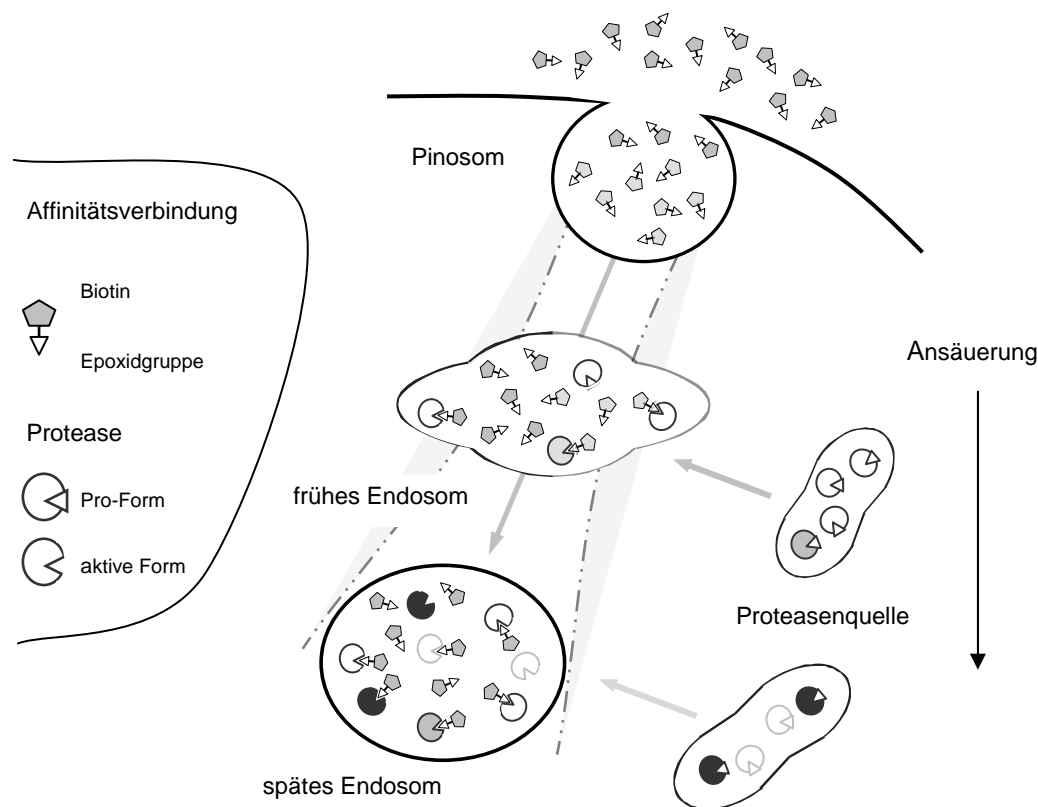


**Abb. 4-2:** Modulation der Cathepsinaktivitäten während der Differenzierung Dendritischer Zellen. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot mit DCG-0N von Zelllysaten MO-DC während verschiedener Zeitpunkte der Differenzierung und von Zelllysaten (ZL) und endozytischen Fraktionen (EF) primärer Monozyten.

Für Cat S und Cat H lassen sich nur eingeschränkte Aussagen treffen, da aufgrund der großen Signalunterschiede zu den anderen Proteasen beide kaum zu sehen waren. Erst deutlich längere Expositionszeiten (nicht abgebildet) lassen ähnliche Schlüsse zu. Es fällt auch auf, dass die Generierung endozytischer Fraktionen von primären Monozyten zu einer deutlichen relativen Anreicherung von aktivem Cat S und Cat H führt. Vergleicht man jedoch endozytische Fraktionen Dendritischer Zellen mit ihren Zelllysaten, so ist hier nur eine Anreicherung von Cat S zu beobachten, weil wie bereits erwähnt, Cat H in DC kaum vorkommt (nicht abgebildet). Aufgrund dieser Beobachtungen wurden Versuche mit intakten DC an Tag 6 bzw. Tag 7 (24 h nach LPS-Stimulierung) ab Beginn der Kultivierung durchgeführt.

## 4.2 Puls-Experimente mit intakten DC

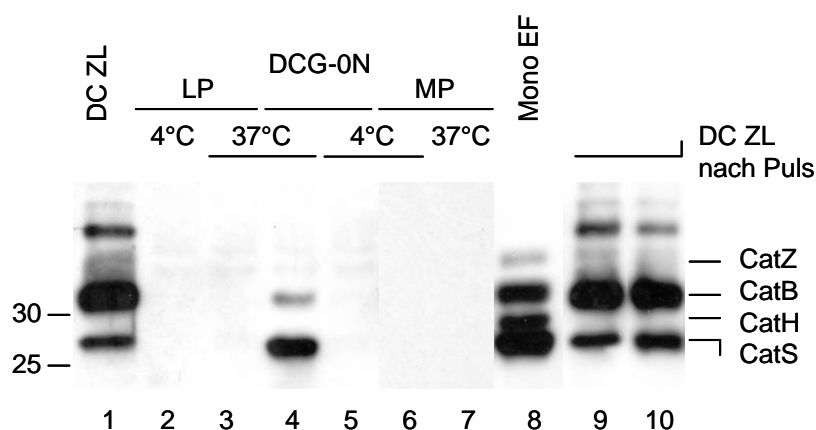
Bis heute ist sehr wenig darüber bekannt, welche Proteasen in APC und vor allen Dingen in DC in welcher Abfolge auf frisch internalisierte Antigene treffen. ASL bei Zelllysaten erlauben nur Aussagen über statische Zustände der untersuchten Zelle. Sie zeigen die durchschnittliche Proteasenaktivität aller Vesikel und Kompartimente und sind als Modell für Prozessierungsstudien nicht geeignet. Auch *in vitro* Verdauexperimente können nur bedingt zur Aufklärung herangezogen werden. Will man aber die Frage klären, welche aktiven Proteasen zuerst mit internalisierten Antigenen in Berührung kommen, so müssen intakte Zellen verwendet werden, weil deren Analyse Aussagen über dynamische Zustände ermöglicht. Die Anwendung von Affinitätsverbindungen wie DCG-0N als Modell für die Antigenaufnahme stellt eine neue Strategie zur Darstellung des *rendez-vous* zwischen individuellen endozytischen Cysteinproteasen und von DC internalisiertem exogenem Material dar (Abb. 4-3). Größere Partikel werden durch Phagozytose von der Zelle aufgenommen, während kleinere Moleküle endozytiert werden. Gelöstes und an Partikel gebundenes DCG-0N diente als Modell für beide Mechanismen.



**Abb. 4-3:** Schema zu Antigenaufnahme und Transport in das endozytische Kompartiment, wo im Zuge der Reifung aktivierte Proteasen an Affinitätsmoleküle binden und anschließend detektiert werden können.



Jetzt sollte geprüft werden, ob Dendritische Zellen die nicht zellpermeable Affinitätsverbindung DCG-0N mittels Endozytose in relevanter Menge in proteasehaltige Kompartimente aufnehmen. Dazu wurden intakte unreife DC mit DCG-0N 1 h bei 37°C inkubiert, um die Aufnahme durch Pinozytose zu ermöglichen. Im Aktivitätsblot ergaben sich anschließend 2 Banden (Abb. 4-5, Spur 4): Ein starkes Signal wurde für Cat S erhalten und ein sehr schwaches für Cat B. Dagegen wurden bei der Inkubation der gleichen Anzahl DC bei 4°C keine Signale detektiert (Spur 5). Da bei 4°C die energieabhängige Aufnahme von Molekülen unterbunden wird, handelt es sich bei den detektierten Banden um eine rein Endozytose-vermittelte Aufnahme mit anschließendem Transport zu aktiven endozytischen Proteasen. Vergleicht man jetzt die Aktivitätsverteilung der Cysteinproteasen im Zelllysate (Spur 1), welches die Mittelung aller Zellkompartimente darstellt, so fällt folgendes auf: Im Zelllysate ist nur sehr wenig aktives Cat S markiert, stattdessen aber sehr viel Cat B. Internalisiertes DCG-0N wird demnach selektiv in Cat S angereicherte Kompartimente befördert.

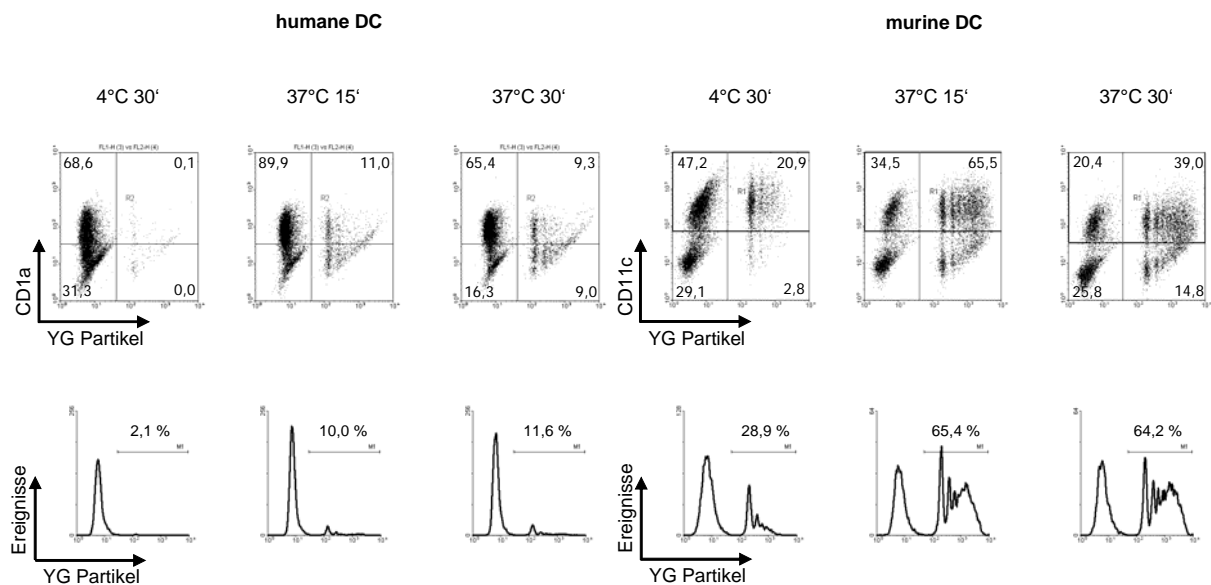


**Abb. 4-5:** Transport von DCG-0N in Kompartimente mit aktiven Cathepsinen. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot eines Versuches bei dem intakte MO-DC 1 h mit DCG-0N oder mit DCG-0N gekoppelt an Latex- oder Magnetpartikel (LP bzw. MP) bei 4°C oder 37°C inkubiert wurden (Spur 2-7). Zusätzlich wurden als Kontrolle vor (Spur 1) und nach dem Versuch (Spur 9 und 10) Zelllysate (ZL) mit DCG-0N inkubiert. Endozytische Fraktionen (EF) von primären Monozyten wurden als weitere Kontrolle mit DCG-0N inkubiert (Spur 8).

Wurde die gleiche Anzahl DC mit an Latex- oder Magnetpartikel gekoppeltem DCG-0N inkubiert (LP bzw. MP), um die Aufnahme mittels Phagozytose nachzuahmen, so wurden weder bei 4°C noch bei 37°C aktive Cathepsine detektiert (Spur 2 und 6, bzw. 3 und 7). Ein Teil aller Puls-Proben wurde nach dem Puls direkt lysiert und das Lysat mit DCG-0N inkubiert. Die Proben 9 und 10 (Puls bei 37°C mit DCG-0N bzw. LP) zeigen repräsentativ für

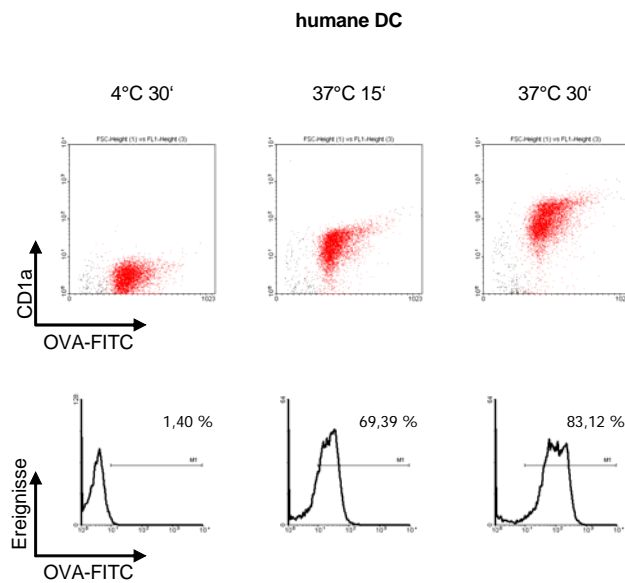
alle anderen, dass die Proteasenaktivität in den Proben identisch ist und der Unterschied zwischen Probe 3 und 4 bzw. 7 und 4 allein auf die Größe des Affinitätsmoleküls zurückgeführt werden kann.

Von Lennon-Duménil et al. wurde 2002 publiziert, dass unreife murine BM-DC Latexpartikel phagozytieren und an die Partikel gekoppeltes DCG-04 aktive Proteasen erreicht. Um unser bei humanen DC erhaltenes Ergebnis zu überprüfen, wurden die gleiche Anzahl humaner (CD1a<sup>+</sup>) und muriner DC (CD11c<sup>+</sup>) am Tag 6 bzw. 7 der Kultivierung mit Fluorophor-gekoppelten Latexpartikeln inkubiert. Die anschließende FACS<sup>®</sup>-Analyse ergab folgendes Ergebnis: Beide Zellpopulationen internalisierten Latexpartikel bei 37°C (Abb. 4-6, 12% vs. 64%). Auch bei 4°C war eine geringe Aufnahme der Partikel zu beobachten. Im Vergleich zu humanen DC internalisierten murine DC jedoch erheblich effektiver Latexpartikel. Der Unterschied wird noch deutlicher, wenn man den Mittelwert der Fluoreszenz vergleicht: Obwohl murine DC kleiner sind, phagozytierte jede positive murine Zelle fast dreimal so viele Partikel wie eine positive humane Dendritische Zelle (mittlere Fluoreszenz 359 vs. 903).



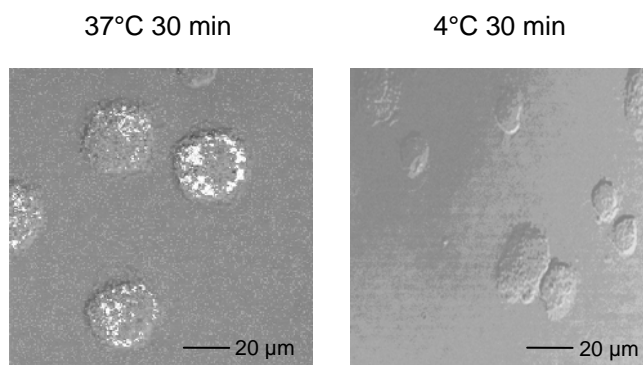
**Abb. 4-6:** Durchflusszytometrische Charakterisierung der Aufnahme von Latexpartikeln durch DC. Die gleiche Anzahl intakter humaner und muriner DC wurde mit Fluorophor-gekoppelten Latexpartikeln (YG) bei 4°C oder 37°C inkubiert, gewaschen, mit PE-markierten Antikörpern gegen CD1a (humane DC) oder CD11c (murine DC) angefärbt und anschließend im FACS quantifiziert.

Die FACS<sup>®</sup>-Analyse von humanen DC nach 30 Minuten Inkubation mit OVA-FITC bei 37°C und anschließendem mehrfachen Waschen ergab über 80% positive Zellen (Abb. 4-7), wogegen bei 4°C kein OVA-FITC in die Zelle gelangte.



**Abb. 4-7:** Durchflusszytometrische Charakterisierung der Aufnahme von OVA-FITC durch DC. Die gleiche Anzahl intakter humaner DC wurde mit OVA-FITC bei 4°C oder 37°C inkubiert, gewaschen, mit PE-markierten Antikörpern gegen CD1a angefärbt und anschließend im FACS quantifiziert.

Auch unter dem Fluoreszenzmikroskop bestätigte sich dieses Ergebnis: Wurden humane DC 30 min. bei 37°C mit OVA-FITC inkubiert und danach mehrfach gewaschen, waren punktförmige Anhäufungen an Fluoreszenz innerhalb der Zelle zu sehen (Abb. 4-8). Bei 4°C ist eine Internalisierung nur in sehr geringem Umfang möglich und deshalb zeigen diese Zellen kaum Fluoreszenz.



**Abb. 4-8:** Aufnahme von OVA-FITC durch DC unter dem konfokalen Mikroskop. Intakte MO-DC wurden mit OVA-FITC 30 min. bei 37 C oder 4°C inkubiert.

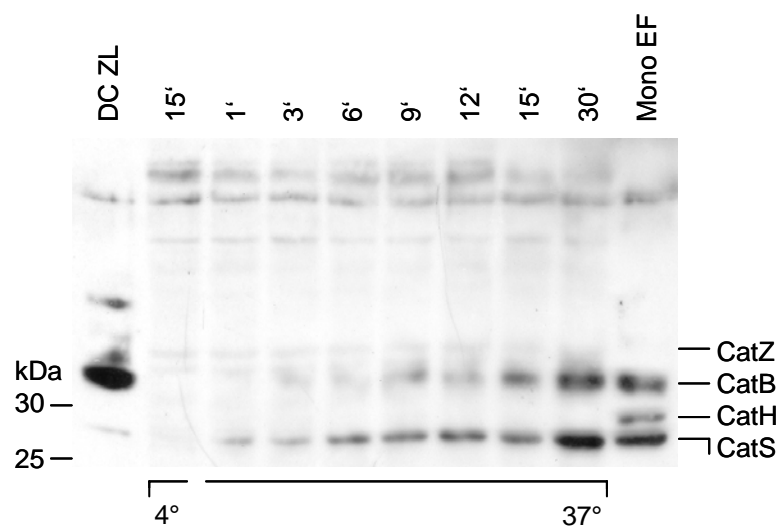
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass unreife humane DC zwar Latexpartikel phagozytieren, aber darin im Vergleich zu murinen DC eine deutlich geringere Effizienz aufweisen. Pinozytose dagegen ist in eindeutig größerem Ausmaß zu beobachten. Da unsere



Fragestellung primär auf die Aufnahme des Modellmoleküls DCG-0N in die Zelle zur Aufklärung der an der Prozessierung internalisierter Antigene beteiligten Proteasen abzielte, wurden weitere Experimente mit gelöstem DCG-0N durchgeführt.

#### 4.2.1 Puls-Experimente mit unreifen DC

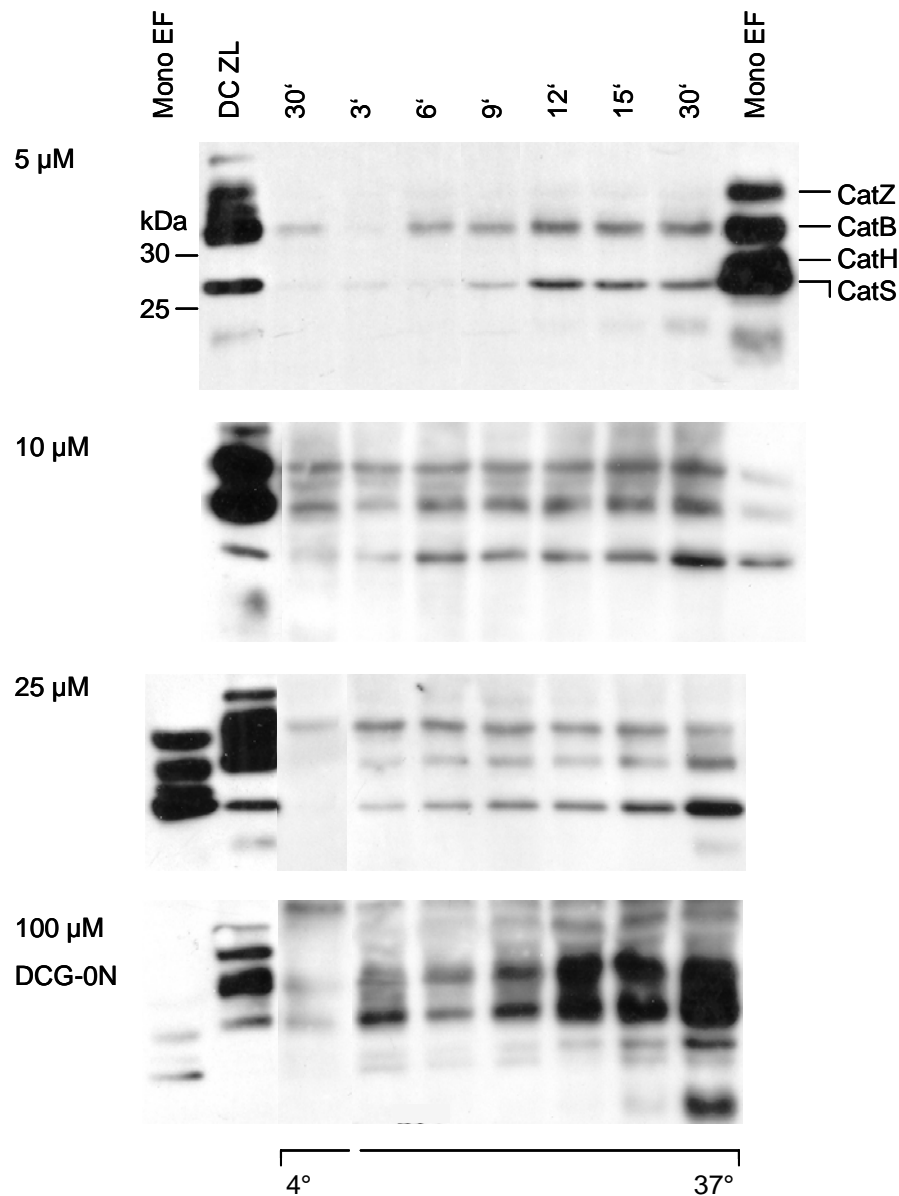
Um die Charakterisierung der Aufnahme und den Transport von DCG-0N in das endozytische Kompartiment zu ermöglichen, mussten zuerst sowohl die adäquate Arbeitskonzentration von DCG-0N als auch die Inkubationszeit ermittelt werden. Beide Parameter beeinflussen die Menge der von der Zelle aufgenommenen Moleküle und folglich auch das Ausmaß der möglicherweise detektierbaren aktiven Proteasen. Dazu wurden intakte DC bei 37°C mit 25 µM DCG-0N inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten mit eiskaltem PBS mehrfach gewaschen. Nach der Lyse mit einem Überschuss an JPM-565 wurden die Lysate gekocht, die detektierten Polypeptide über SDS-PAGE und Westernblot aufgetrennt und mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Als Kontrolle wurde die gleiche Anzahl an Zellen mit DCG-0N bei 4°C inkubiert und dem gleichen weiteren Arbeitsprotokoll unterzogen. Ferner wurden direkt vor dem Versuch aus gleichem Ausgangsmaterial Zelllysate generiert und diese dann mit DCG-0N für 30 min. bei RT inkubiert. Dies sollte als weitere Kontrolle dienen, um zum einen identische Zellen bzw. gleiche Proteasenaktivitäten bei den Versuchen zu gewährleisten und zum anderen einen Vergleich der Proteasenaktivitäten in den Kompartimenten mit derjenigen im totalen Zelllysate zu ermöglichen (Abb. 4-9).



**Abb. 4-9:** Selektiver Transport von DCG-0N in ein Kompartiment mit aktivem Cat S. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot eines Versuches bei dem intakte MO-DC mit 25 µM DCG-0N bei 4°C oder 37°C inkubiert wurden. Zusätzlich wurden als Kontrolle Zelllysate (ZL) von MO-DC und endozytische Fraktionen (EF) primärer Monozyten mit DCG-0N inkubiert.

Bei der Inkubation von DC mit 25  $\mu\text{M}$  DCG-0N erreichte dieses bereits nach einer Minute Puls aktives Cat S. Keine anderen aktiven Proteasen wurden zu diesem Zeitpunkt detektiert. Bei längeren Puls-Zeiten nahm das Signal für Cat S kontinuierlich zu, ohne eine Sättigung zu erreichen. Auch Cat B wurde später detektiert, aber die Signalstärke war viel geringer und erst nach 30 Minuten Puls deutlich zu sehen. Auffällig ist wieder die inverse Verteilung der Signalintensitäten zwischen Pulsprobe und Zellysat. Wurde die energieabhängige Aufnahme bei 4°C unterbunden, waren keine aktiven Proteasen im Blot detektierbar. DCG-0N wird daher über aktive Mechanismen in die Zelle aufgenommen und durchquert die Plasmamembran nicht passiv. Dies impliziert, dass internalisierte Antigene, hier gezeigt am Modell von DCG-0N, mit Cat S als erster aktiver endozytischer Cysteinprotease in Berührung kommen. Cat S wird aufgrund seines großen Aktivitätsbereiches, dessen Maximum nahezu im Neutralen liegt, seit längerem als Schlüsselenzym bei der Prozessierung gehandelt [Hsing, Rudensky 2005]. Ihm scheint folglich nicht nur eine bedeutende Rolle bei der Prozessierung der invarianten Kette zuzukommen [Driessen et al. 1999], auch die äußerst wichtige Rolle von Cat S bei der Antigenprozessierung wird immer deutlicher.

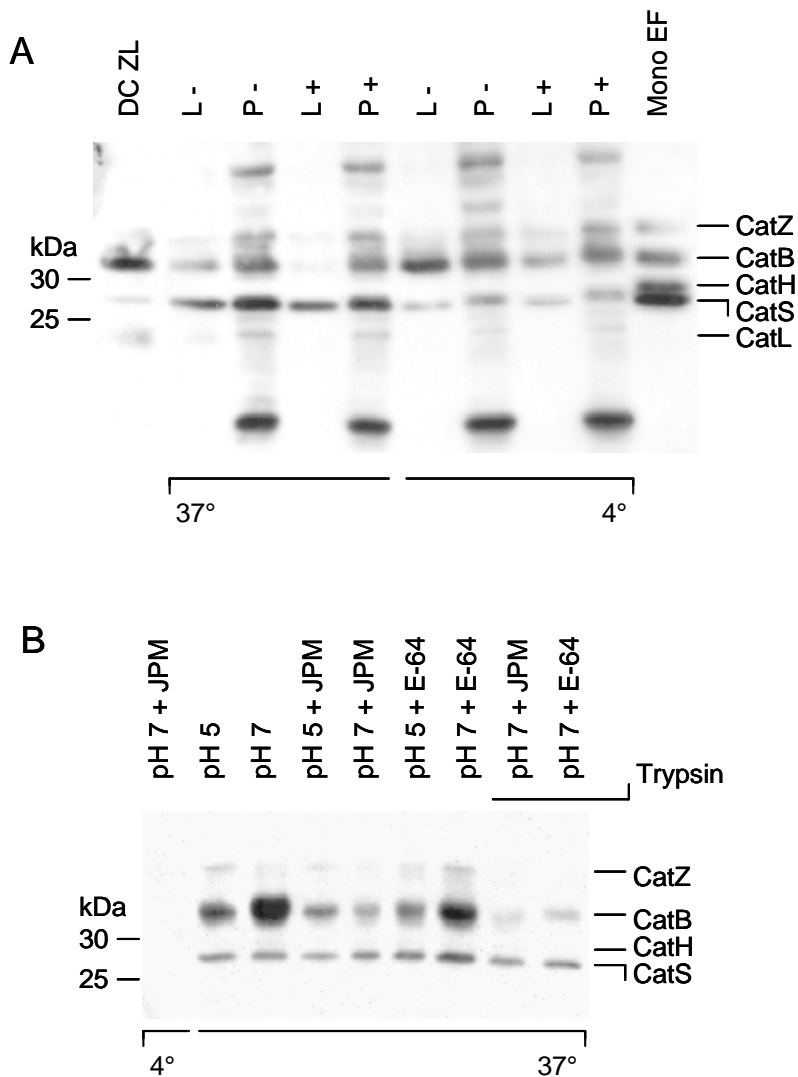
Im nächsten Versuch wurden DC mit verschiedenen Konzentrationen von DCG-0N inkubiert. Hier zeigte sich bei der Verwendung von 5  $\mu\text{M}$  DCG-0N dieselbe spezifische über die Zeit ansteigende Signalintensität von Cat S (Abb. 4-10). Die Cat B-Signale blieben über alle Zeitpunkte hinweg konstant. Es handelt sich hierbei sehr wahrscheinlich nicht um den selektiven Transport zu Kompartimenten mit aktivem Cat B, sondern eher um Lyseartefakte, weil auch bei der 4°-Kontrolle Cat B detektiert wurde. Auffällig ist die gleich bleibende Signalintensität bei Cat S, die ab 12 min. beobachtet werden konnte. Bei der Verwendung von 5  $\mu\text{M}$  DCG-0N im Nährmedium scheint also bereits nach 12 min. Puls der Großteil aller Moleküle an aktive Proteasen gebunden zu haben. Wurden DC mit 10  $\mu\text{M}$  DCG-0N inkubiert, trat diese Sättigung nicht auf. Zwischen 15 und 30 min. Puls-Zeit kam es zu einer klaren Zunahme des Signals für Cat S, wobei die Intensitäten für alle anderen Cathepsine konstant blieben. Beim Gebrauch von 25  $\mu\text{M}$  DCG-0N ergaben sich die deutlichsten Signale für Cat S: ein sehr gleichmäßiger zeitabhängiger Anstieg und geringe, aber konstante Intensitäten für alle anderen Cathepsine. Deshalb wurde diese Konzentration für alle weiteren Versuche beibehalten. Die Verwendung von 100  $\mu\text{M}$  DCG-0N wirkte sich toxisch auf die Zellen aus. Die aktive Aufnahme und der Transport zu mit Cat S angereicherten Kompartimenten ging weitgehend verloren.



**Abb. 4-10:** Der Transport von DCG-0N zu aktivem Cat S in intakten DC ist konzentrationsabhängig. Abgebildet sind Aktivitätsblots mehrerer Versuche bei denen intakte MO-DC mit DCG-0N bei 4°C oder 37°C inkubiert wurden. Zusätzlich wurden als Kontrolle Zelllysate (ZL) von MO-DC und endozytische Fraktionen (EF) von primären Monozyten mit DCG-0N inkubiert.

Nach dem Puls und den anschließenden Waschschritten, die zur Beseitigung von überschüssigem, nicht aufgenommenem DCG-0N nötig sind, kann es bei der anschließenden Lyse (30 min. auf Eis) zu einer Artefaktbildung kommen. Noch nicht an Proteasen gebundene Affinitätsmoleküle können jetzt an frisch aktivierte Proteasen binden und dadurch das Ergebnis des Versuches verfälschen. Um die Bildung von Lyseartefakten zu minimieren, wird während der Lyse ein sehr großer Überschuss des Inhibitors JPM-565 zugegeben, der über kein Detektionsmolekül verfügt. Im nächsten Versuch wurden verschiedene Lysebedingungen

auf die Anwendbarkeit zur Nachbehandlung von *pulse chase*-Versuchen mit intakten DC getestet. Intakte DC wurden mit 25  $\mu$ M DCG-0N 30 min. bei 4°C oder 37°C inkubiert, dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 2x Lysepuffer pH 7 bei 4°C (L) oder mit Probenpuffer bei 95°C (P) jeweils mit und ohne JPM-565 (+/-) lysiert. Bei allem Proben wurde aktives Cat S mit vergleichbarer Intensität bei 37°C detektiert, bei 4°C jeweils mit deutlich geringerer Intensität (Abb. 4-11 A).



**Abb. 4-11:** Eignung verschiedener Lysebedingungen nach *pulse chase*-Experimenten. Abgebildet sind zwei Aktivitätsblots eines Versuches bei dem intakte MO-DC mit 25  $\mu$ M DCG-0N bei 37°C oder 4°C inkubiert wurden. (A) Anschließend wurden die Proben mit Lysepuffer pH 7 bei 4°C (L) oder mit Probenpuffer bei 95°C (P) jeweils mit und ohne JPM-565 (+/-) lysiert. Zusätzlich wurden als Kontrolle Zelllysate (ZL) von MO-DC und endozytische Fraktionen (EF) von primären Monozyten mit DCG-0N inkubiert. (B) Die Proben wurden unter Verwendung verschiedener pH-Werte und JPM-565 oder E-64 lysiert oder vor der Lyse trypsiniert.

Wurde während der Lyse bei pH 7 JPM-565 zugesetzt, waren die Signale für Cat B und Cat Z stark vermindert. Das spricht für eine Aktivierung von Cat B bzw. Cat Z während der Lyse. Das Aufkochen der Proben nach dem Puls führte zu einem starken Anstieg von unspezifischen Signalen im Aktivitätsblot. Außerdem hatte die Verwendung von JPM-565 hier keinen erkennbaren Effekt. Die Lyse der Proben bei pH 7 unter Zusatz von JPM-565 erwies sich als die am besten geeignete Methode zur Minimierung von Lyseartefakten.

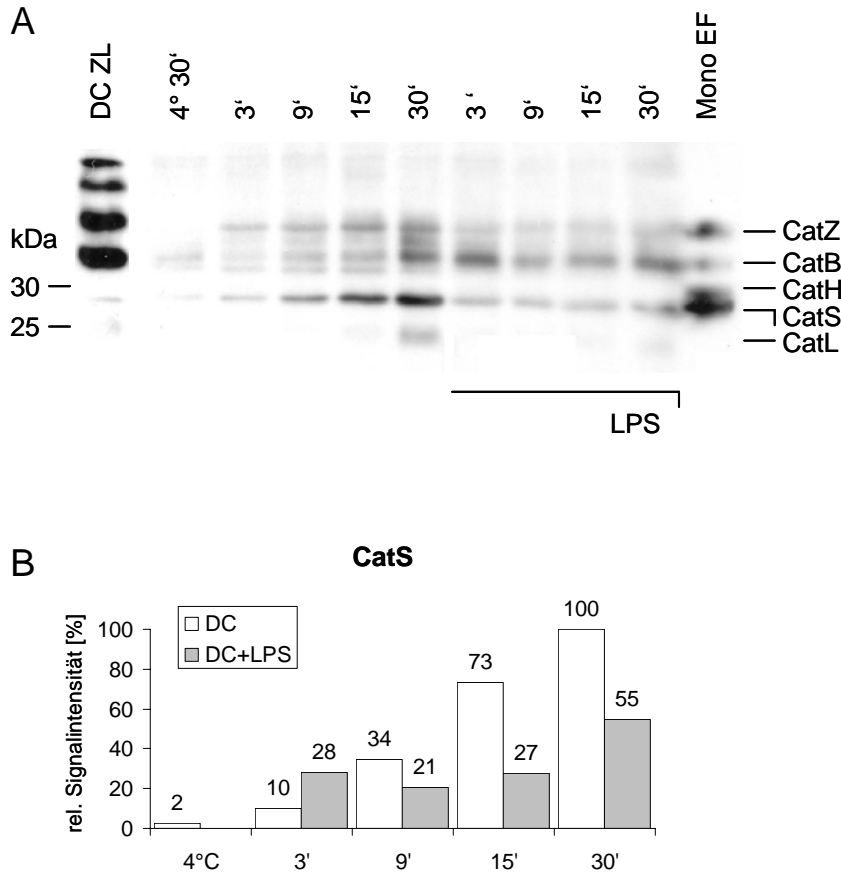
In einem weiteren Experiment wurde die Anwendbarkeit verschiedener Inhibitoren und pH-Werte bei der Lyse der Proben untersucht. Ferner wurde ein Teil der Proben nach dem Waschen zur Beseitigung möglicher membranständiger Cathepsine trypsinisiert. Während der pH-Wert des Lysepuffers nicht wie erwartet die Signalintensität der detektierten Cathepsine beeinflusste, scheint sich JPM-565 besser als E-64 zur Verringerung von Artefakten zu eignen (Abb. 4-11 B). Die Trypsinierung der Probe nach dem Waschen führte zu einer deutlich verminderten Detektion von aktivem Cat B und impliziert, dass Cat B zu einem geringen Anteil gebunden an der Zelloberfläche vorliegen könnte. In allen weiteren Experimenten wurden die Proben nach dem Waschen bei pH 7 mit JPM-565 lysiert.

#### 4.2.2 Puls-Experimente mit LPS-aktivierten DC

Werden Dendritische Zellen aktiviert, das kann z.B. durch Zugabe von LPS als Maturationsstimulus während der Kultivierung unreifer Zellen erfolgen, so führt dies zu einer Umstrukturierung des MHC Klasse II-Kompartiments: Die Aufnahme von exogenen Antigenen wird fast komplett gestoppt und bereits internalisierte Antigene werden schneller und effizienter prozessiert. Einige Gründe dafür sind ein auftretender pH-Shift im endolysosomalen Kompartiment, die damit einhergehende frühere Aktivierung endozytischer Proteasen und auch deren Umverteilung in ein früheres Kompartiment. Ebenso werden mit antigenen Peptiden beladene MHC Klasse II-Moleküle deutlich effizienter an die Zelloberfläche transportiert [Villadangos et al. 2005].

Welche genauen Auswirkungen hat dieser Umstrukturierungsprozess nun auf die Aktivität der bereits untersuchten endozytischen Proteasen? Was ändert sich in der Abfolge des Aufeinandertreffens von internalisiertem Antigen und einzelnen Proteasen? Um eine mögliche Antwort auf diese Fragen zu finden, wurden unreife DC am sechsten Tag der Kultivierung für 24 h mit LPS inkubiert. Diese wurden dann, wie bereits beschrieben, mit DCG-0N für verschiedene Zeitpunkte inkubiert. Der gleiche Versuch wurde mit unreifen DC durchgeführt. Während bei unreifen DC wiederum die selektive zeitabhängige kontinuierliche Zunahme des Cat S-Signals zu beobachten war (Abb. 4-12), ergab sich bei LPS-aktivierten

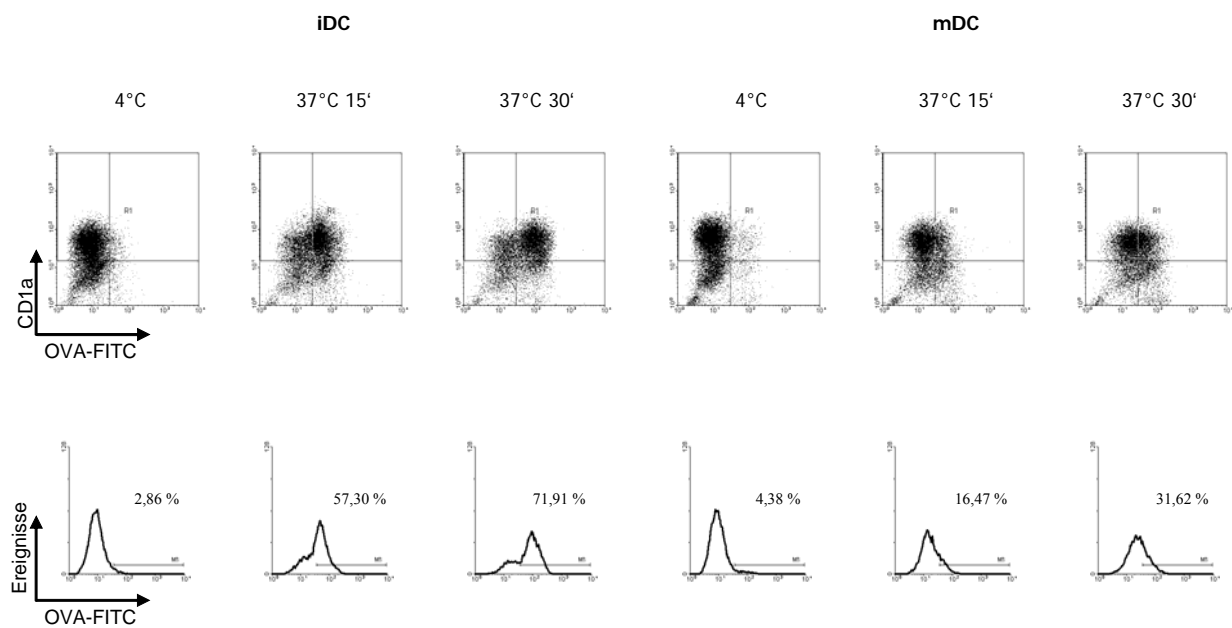
DC ein anderes Ergebnis: Bereits nach 3 min. Puls war ein etwas stärkeres Signal für Cat S zu beobachten. Dieses wurde jedoch bei längeren Puls-Zeiten nicht stärker, sondern sogar wieder schwächer. An den Signalen der anderen Cathepsine änderte sich dagegen nichts. Sie blieben ebenfalls schwach und konstant während der Puls-Zeiten.



**Abb. 4-12:** (A) Der selektive Transport von DCG-0N zu aktivem Cat S ändert sich durch die LPS-induzierte Reifung von DC. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot eines Versuches bei dem MO-DC oder LPS-induzierte MO-DC mit 25  $\mu$ M DCG-0N bei 4°C oder 37°C inkubiert wurden. Zusätzlich wurden als Kontrolle Zelllysate (ZL) von MO-DC und endozytische Fraktionen (EF) von primären Monozyten mit DCG-0N inkubiert. (B) Densitometrische Quantifizierung der Aktivität von Cat S des in (A) abgebildeten Aktivitätsblots.

Die Quantifizierung der Signalintensitäten mittels Densitometrie (Image J) untermauerte das Ergebnis. Das stärkste Signal (Cat S bei unreifen DC nach 30 min.) wurde auf 100 normiert. Die Werte für Cat S stiegen bei unreifen DC kontinuierlich an, während bei reifen DC ein erstes Maximum bereits nach 3 min. Puls erreicht ist. Dieses Signal war fast dreimal so hoch wie in unreifen DC zum gleichen Zeitpunkt. Im Verlaufe des Pulses fiel das Signal leicht ab und stieg erst wieder nach der zehnfachen Puls-Zeit bei 30 min. an.

Um zu untersuchen, ob der beobachtete Unterschied auf einer verminderten Aufnahme von DCG-0N beruhte, wurden unreife und mit LPS-aktivierte DC mit FITC-OVA gepulst und wieder einer FACS<sup>®</sup>-Analyse unterzogen (Abb. 4-13). Bei einer Puls-Zeit von 30 min. waren 72% der unreifen DC positiv, dagegen nur 32% der aktivierten DC. Nach 15 min. war der Unterschied noch deutlicher (57% vs. 16%). Diese Zahlen unterstreichen den in der Densitometrie ermittelten Wert der einzelnen Puls-Zeiten. Auch die mittlere Fluoreszenz (59 vs. 25 bei 30 min. und 36 vs. 18 bei 15 min.) bestätigte, dass nicht nur ein größerer Anteil an unreifen DC OVA-FITC aufnahmen, sondern ebenso eine größere Menge pro Zelle.

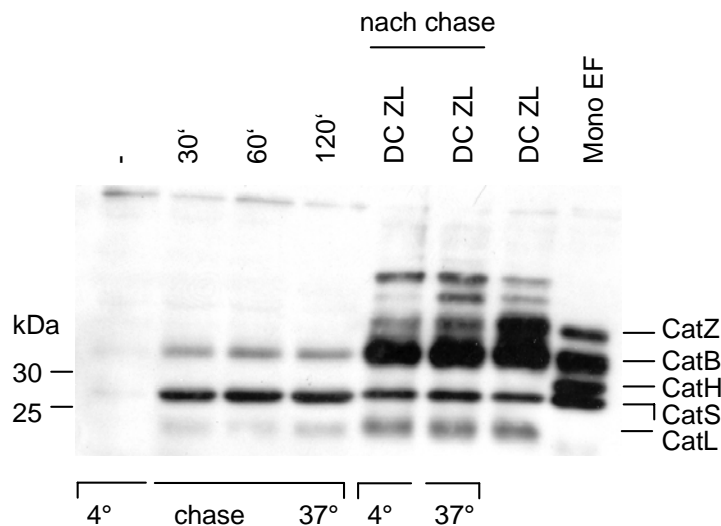


**Abb. 4-13:** Durchflusszytometrische Charakterisierung der Aufnahme von OVA-FITC in DC. Die gleiche Anzahl intakter unreifer oder mit LPS-induzierter DC (iDC bzw. mDC) wurde mit OVA-FITC bei 4°C oder 37°C inkubiert, gewaschen, mit PE-markierten Antikörpern gegen CD1a angefärbt und anschließend im FACS quantifiziert.

### 4.3 Pulse chase-Experimente mit intakten DC

Um die Rekrutierung von aktiven Proteasen in endozytischen Vesikeln nach Antigenaufnahme zu untersuchen, wurden intakte DC bei 37°C und 4°C 30 min. mit 25 µM DCG-0N im Nährmedium gepulst. Nach mehrmaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Zellen bei 37°C mit Nährmedium ohne DCG-0N bis zu 2 h weiter inkubiert, um den Transport des während des Pulses aufgenommenen DCG-0N in das endolysosomale Kompartiment zu ermöglichen. Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen, um den Weitertransport internalisierter Moleküle zu stoppen. Nach der Lyse in Gegenwart eines Überschusses an JPM-565 wurden die Lysate gekocht und die detektierten Polypeptide über SDS-PAGE und Westernblot aufgetrennt und mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

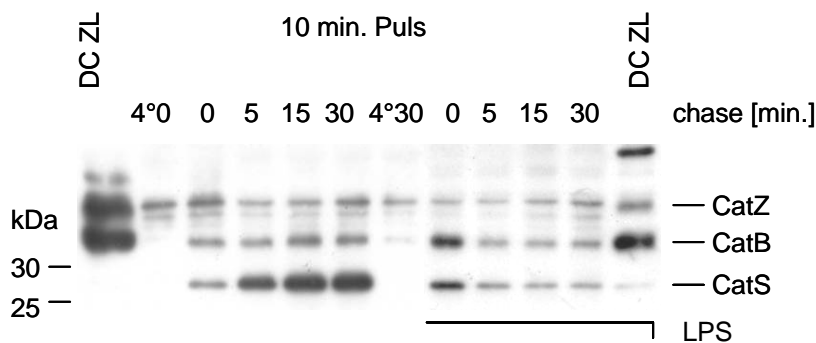
Wiederum wurde der typische temperaturabhängige selektive Transport zu aktivem Cat S beobachtet (Abb. 4-14). Die allgemeine Proteasenaktivität der Zelle änderte sich während dieses langen Versuches nicht, wie der Vergleich vor und nach dem Versuch generierter Lysate belegte. Da die detektierten Signalintensitäten während des gesamten *chase*-Versuches stabil blieben, wurde die Affinitätsverbindung und die gebundene Protease während der gesamten *chase*-Zeit über 2 h nicht von anderen Proteasen prozessiert.



**Abb. 4-14:** Pulse chase-Experiment mit Dendritischen Zellen. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot eines Versuches bei dem MO-DC mit 25 µM DCG-0N 30 min. bei 4°C oder 37°C inkubiert wurden (Puls). Nach mehrmaligem Waschen wurden die Zellen bei 37°C mit Nährmedium ohne DCG-0N bis zu 2 h weiter inkubiert (*chase*). Als Kontrolle wurden vor und nach dem Versuch gewonnene Zelllysate (ZL) von MO-DC und endozytische Fraktionen (EF) von primären Monozyten mit DCG-0N inkubiert.

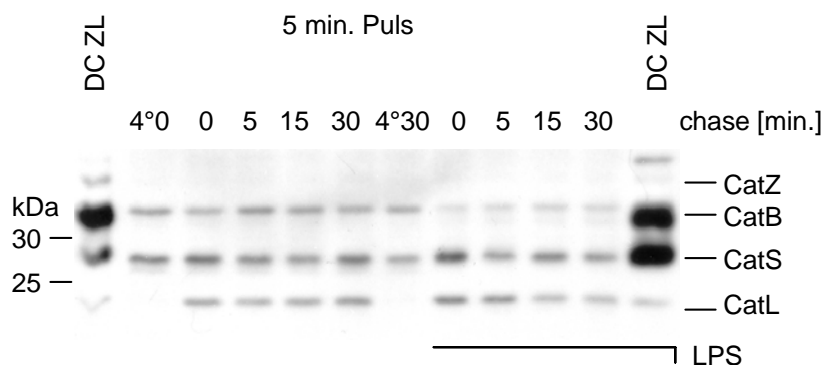


Um eine detaillierte Charakterisierung zu erlauben, wurden im nächsten Experiment intakte DC mit 25  $\mu$ M DCG-0N 10 min. gepulst und anschließend einem *chase* von maximal 30 min. unterzogen. Das Signal für Cat S nahm während des gesamten *chase* selektiv und kontinuierlich zu, während die Signalintensitäten der anderen Proteasen konstant schwach blieben (Abb. 4-15). Der gleiche Versuch wurde mit LPS-aktivierten DC durchgeführt. Es ergab sich, wie schon bei den Pulsversuchen, ein entgegengesetztes Ergebnis: Bereits direkt nach dem Puls war ein etwas stärkeres Signal für Cat S zu beobachten. Dieses wurde jedoch bei längeren *chase*-Zeiten nicht stärker, sondern sogar deutlich schwächer. Da im vorherigen Experiment bereits gezeigt wurde, dass die Affinitätsverbindung DCG-0N über einen Zeitraum von mindestens 2 h im endolysosomalen Kompartiment stabil bleibt und nicht prozessiert wird, kann die beobachtete Signalabnahme für Cat S nur auf einen beschleunigten Abbau von Cat S zurückzuführen sein, der mit der Aktivierung Dendritischer Zellen einhergeht. Das starke Signal für Cat S zu einem sehr frühen *chase*-Punkt deckt sich mit der Umstrukturierung des Prozessierungsmechanismus im Zuge der Aktivierung von DC: der auftretende pH-shift im endolysosomalen Kompartiment, die damit einhergehende frühere Aktivierung endozytischer Proteasen und auch deren Umverteilung in ein früheres Kompartiment.



**Abb. 4-15:** *Pulse chase*-Experiment mit iDC und mDC. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot eines Versuches bei dem MO-DC oder LPS-induzierte MO-DC mit 25  $\mu$ M DCG-0N 10 min bei 4°C oder 37°C. inkubiert wurden (Puls). Nach mehrmaligem Waschen wurden die Zellen bei 37°C mit Nährmedium ohne DCG-0N weiter inkubiert (*chase*). Als Kontrolle wurden Zelllysate (ZL) von MO-DC mit DCG-0N inkubiert.

Ein weiterer, bis auf eine auf 5 min. verkürzte Puls-Zeit identischer Versuch wurde durchgeführt, um die zeitliche Überlagerung von Internalisierung und intrazellulärer Vesikelreifung zu minimieren. Bei unreifen DC war bei dieser kurzen Puls-Zeit die kontinuierliche Zunahme des Signals für Cat S nicht zu beobachten, es blieb während des gesamten Versuches stabil (Abb. 4-16).

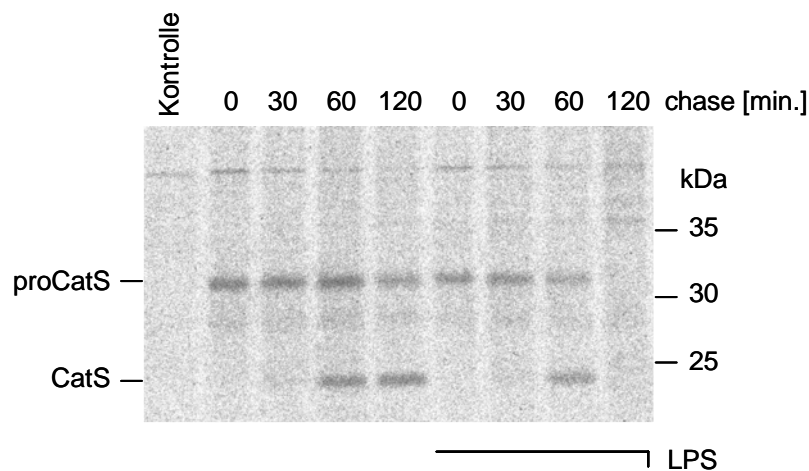


**Abb. 4-16:** Verkürztes *pulse chase*-Experiment mit iDC und mDC. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot eines Versuches bei dem MO-DC oder LPS-induzierte MO-DC mit 25  $\mu$ M DCG-0N 5 min. bei 4°C oder 37°C inkubiert wurden (Puls). Nach mehrmaligem Waschen die Zellen bei 37°C mit Nährmedium ohne DCG-0N weiter inkubiert (*chase*). Als Kontrolle wurden Zelllysate (ZL) von MO-DC mit DCG-0N inkubiert.

Das mag daran liegen, dass während der relativ kurzen Puls-Zeit wenig DCG-0N aufgenommen wurde, welches dann sehr zügig an aktive Proteasen band. In aktivierten DC fand sich ein deutlicheres Signal für Cat S als in unreifen DC unmittelbar nach dem Puls, welches im weiteren Verlauf des *chase* schwächer wurde. Für diese Beobachtungen ergeben sich drei mögliche Erklärungen: Entweder wird weniger DCG-0N aufgenommen, die Konzentration im endolysosomalen Kompartiment ist somit geringer und folglich werden vermindert aktive Proteasen detektiert oder aber führt die Ausreifung von DC zu einer verringerten Biosynthese und deswegen auch zu weniger aktivem Cat S. Letztlich könnte aktives Cat S schneller prozessiert und deshalb im Aktivitätsblot vermindert dargestellt werden.

Um die Frage der beschleunigten Prozessierung von Cat S im Zuge der Ausreifung Dendritischer Zellen zu klären, wurde im nächsten Versuch die Reifung und Stabilität von Cat S untersucht. Intakte unreife DC wurden mit [<sup>35</sup>S]-Met/Cys-Nährmedium 15 min. inkubiert, danach mit einem Überschuss an nicht radioaktivem Met/Cys gewaschen und anschließend einem *chase* von bis zu 2 h unterzogen. Die Zellen wurden gewaschen, lysiert und Cat S mittels Immunpräzipitation mit  $\alpha$ -Cat S-Antikörpern isoliert. Gebundenes Cat S wurde in 95°C heißem Probenpuffer eluiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Um die Spezifität der Immunpräzipitation zu gewährleisten, wurde zusätzlich mit Präimmenserum präzipitiert (Abb. 4-17 Spur 1). Direkt nach dem Puls und auch nach 30 min. *chase* wurden in unreifen DC gleiche Mengen an proCat S und kein reifes Cat S gefunden. Nach 1 h wurde proCat S etwa zur Hälfte in reifes Cat S

umgewandelt, wobei die Menge der Pro-Form konstant blieb. Nach 2 h *chase* war zu beobachten, dass mehr reifes Cat S als proCat S vorlag. Cat S wird im ER synthetisiert und wandert durch den Golgi-Apparat bis ins endolysosomale Kompartiment, wo es schließlich aktiviert wird. Die Umwandlung von proCat S zu Cat S 1 h nach dem Puls markiert also den Eintritt von neu synthetisiertem Cat S in den endolysosomalen Trakt. Die Stabilität von Cat S über den gesamten Versuch hinweg stimmt mit dem Ergebnis des vorigen *pulse chase*-Experimentes (Abb. 4-16) überein.



**Abb. 4-17:** Analyse der Biosynthese, Reifung und Degradierung von Cat S in DC. MO-DC oder LPS-induzierte MO-DC wurden mit [ $^{35}$ S]-Met/Cys-Nährmedium 15 min. bei 37°C inkubiert (Puls), gewaschen und bis zu 120 min. bei 37°C weiter inkubiert (*chase*). Nach der Lyse wurde Cat S mittels Immunopräzipitation mit  $\alpha$ -Cat S-Antikörpern isoliert. Gebundenes Cat S wurde in 95°C heißem Probenpuffer eluiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Um die Spezifität der Immunopräzipitation zu gewährleisten, wurde zusätzlich mit Präimmunsereum präzipitiert (Kontrolle).

LPS-stimulierte DC wurden dem gleichen Versuch unterzogen. proCat S erschien gleichfalls direkt nach dem Puls mit einer ähnlichen Signalintensität wie bei unreifen DC und wurde 1 h später in reifes Cat S umgewandelt. Die Aktivierung von DC hat somit kaum Einfluss auf die Biosynthese und die Ausreifung von Cat S. Bereits zu diesem Zeitpunkt war die Menge an proCat S und reifem Cat S reduziert und nach einer weiteren Stunde waren beide Signale verschwunden. Das Verschwinden beider Signale lässt sich mit einer beschleunigten Prozessierung von Cat S in aktivierten DC begründen. Die komplette Degradierung von Cat S erfolgt daher bereits 1 h nach dessen Eintritt in den endolysosomalen Trakt in LPS-stimulierten DC.

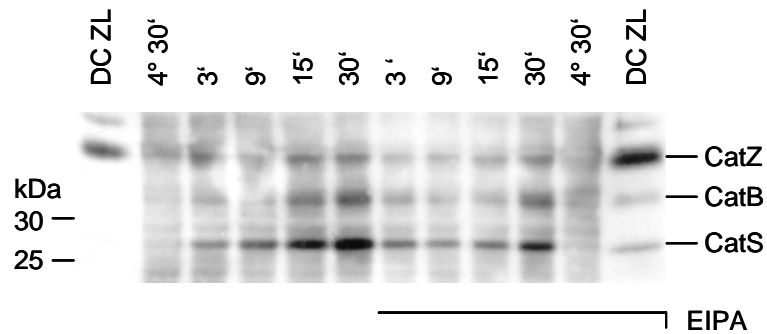
#### 4.4 Relevanz einzelner Endozytosewege in DC

Nachdem gezeigt wurde, dass die Aufnahme von DCG-0N mittels Pinozytose in unreifen und aktivierten Dendritischen Zellen selektiv zu einem Transport in ein mit Cat S-angereichertes Kompartiment führte, sollten die verschiedenen beteiligten Endozytosemechanismen, der Transport zum endolysosomalen Kompartiment und dessen Reifung näher im Detail untersucht werden. Außer Rezeptor-vermittelten Aufnahmewegen existieren in DC neben der Aktin-abhängigen Phagozytose noch verschiedene Formen der Pinozytose: die gleichfalls Aktin-abhängige Makropinozytose, Clathrin-vermittelte Endozytose, Caveolin-vermittelte Endozytose (eine spezielle Form von *lipid raft*, deren Existenz bei DC noch debattiert wird [Trombetta, Mellman 2005]) und Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose (verwandt mit der Caveolin-vermittelten Endozytose). Diese Endozytoseformen internalisieren verschiedene Größen und Arten von Partikeln (z.B. Liganden, Rezeptoren oder Lipide). Die Ausbildung der Vesikel, mit denen die Partikel in die Zelle aufgenommen werden, unterliegt unterschiedlichen Mechanismen. Die verschiedenen Endozytoseformen wurden in der Einleitung bereits ausführlich beschrieben. Der Einsatz von Reagenzien ermöglicht die Blockierung der initialen Schritte der Endozytose oder den Eingriff in spätere Stadien des intrazellulären Transportes und erlaubt Aussagen, über welchen Aufnahmeweg einzelne Partikel in die Zelle gelangen. Durch den gezielten Einsatz dieser Inhibitoren, gegebenenfalls auch in Kombination, sollten Aussagen über die einzelnen Endozytose- und Transportwege möglich sein.

In den folgenden Versuchen wurden, falls nicht anders angegeben, DC mit den jeweiligen Inhibitoren 1 h vor Beginn des Experimentes versetzt. Bei *pulse chase*-Experimenten wurden vor dem *chase* erneut Inhibitoren in gleicher Konzentration addiert. Zuerst wurden die Zellen mit DCG-0N bis zu 30 min. bei 37°C gepulst. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem PBS mehrfach gewaschen. Nach der Lyse mit einem Überschuss an JPM-565 wurden die Lysate gekocht und die detektierten Polypeptide über SDS-PAGE und Westernblot aufgetrennt und mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Als Kontrolle wurde die gleiche Anzahl an Zellen mit DCG-0N bei 4°C inkubiert und dem entsprechenden weiteren Arbeitsprotokoll unterzogen. Ferner wurden direkt vor dem Versuch Zelllysate generiert und diese dann mit DCG-0N für 30 min. bei RT inkubiert.

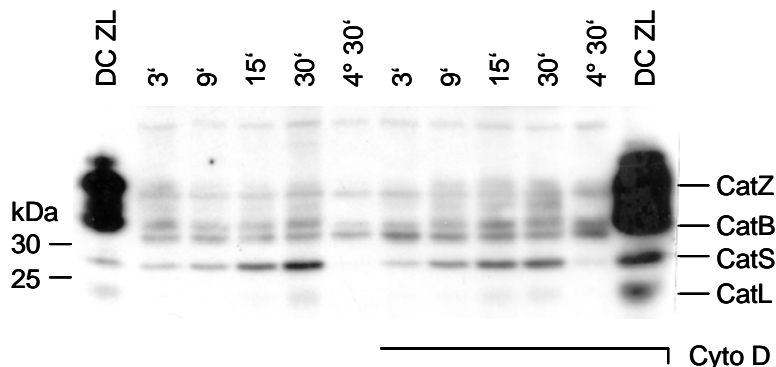
Zuerst wurde der Anteil der Makropinozytose an der Aufnahme von DCG-0N untersucht. Bei DC ohne Vorbehandlung ergab sich das übliche selektive, kontinuierlich während des Pulses ansteigende Signal für Cat S (Abb. 4-18). Wurde die gleiche Anzahl Zellen mit 100 µM

EIPA, einem Inhibitor der Makropinozytose, vor dem Puls inkubiert, war ebenfalls eine selektive Signalzunahme von Cat S zu beobachten. Die Intensitäten waren aber deutlich schwächer, erst nach 30 min. erreichte das Signal die gleiche Stärke wie beim 15 min. Puls nicht behandelten Zellen.



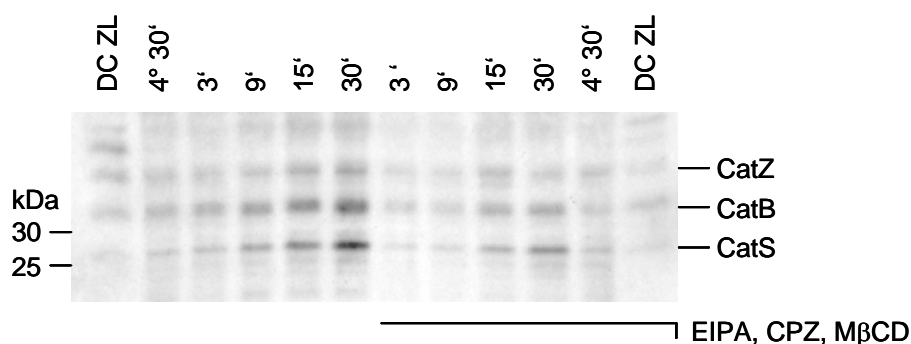
**Abb. 4-18:** Die Inhibition der Makropinozytose beeinflusst die Aufnahme von DCG-0N in DC. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot eines Versuches bei dem MO-DC oder mit EIPA behandelte MO-DC mit 25  $\mu$ M DCG-0N bei 4°C oder 37°C inkubiert wurden. Zusätzlich wurden als Kontrolle Zelllysate (ZL) von MO-DC mit DCG-0N inkubiert.

Somit scheint ein großer Anteil an DCG-0N mittels Makropinozytose von der Zelle aufgenommen zu werden. Die Verwendung von Cyto D (20  $\mu$ g/ml Medium), einem Inhibitor der Aktin-Polymerisation, führte ebenfalls zu einer, wenn auch geringen Abnahme der Signale für Cat S im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb. 4-19).



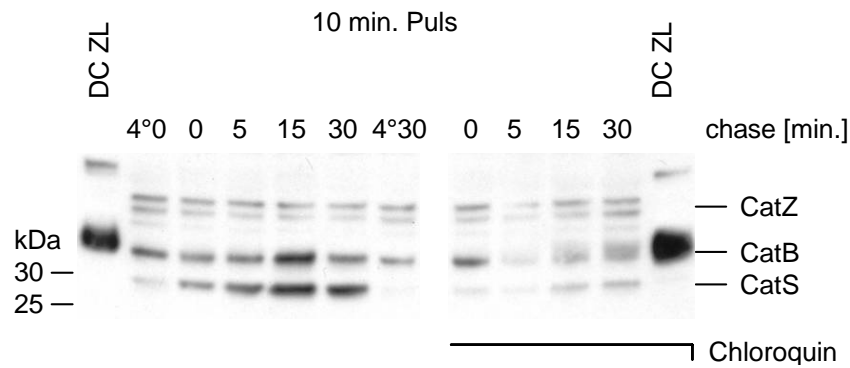
**Abb. 4-19:** Inhibition der Makropinozytose durch Cyto D. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot eines Versuches bei dem MO-DC oder mit Cyto D behandelte MO-DC mit 25  $\mu$ M DCG-0N bei 4°C oder 37°C inkubiert wurden. Zusätzlich wurden als Kontrolle Zelllysate (ZL) von MO-DC mit DCG-0N inkubiert.

CPZ, ein Inhibitor der Clathrin-vermittelten Endozytose, M $\beta$ CD, ein Inhibitor der Caveolin-vermittelten Endozytose und EIPA in Kombination sollten jegliche Endozytose außer Clathrin- und Caveolin-unabhängiger Endozytose blockieren. Wurden intakte DC mit einer Kombination von CPZ (10  $\mu$ g/ml), M $\beta$ CD (5 mM, direkt im Medium gelöst) und EIPA (100  $\mu$ M) behandelt, so ergab sich ein entsprechendes Ergebnis (Abb. 4-20). Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen waren die Signalintensitäten für Cat S wieder deutlich schwächer, die Aufnahme von DCG-0N konnte aber nicht vollständig unterbunden werden.



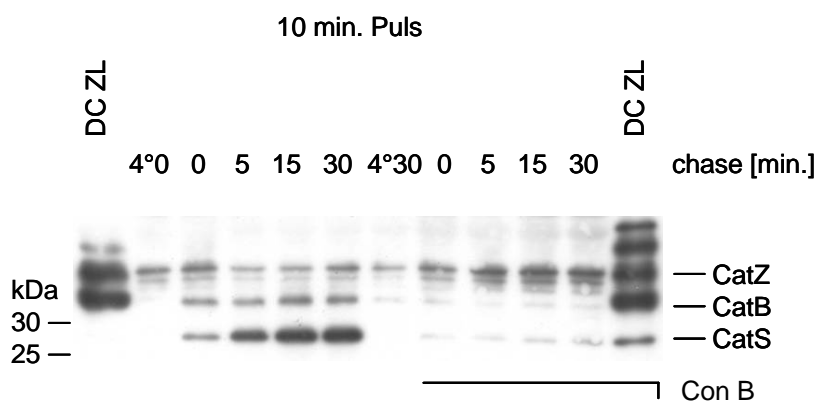
**Abb. 4-20:** Die Inhibition der Makropinozytose und der Clathrin- und Caveolin-vermittelten Endozytose beeinflusst die Aufnahme von DCG-0N in DC. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot eines Versuches bei dem MO-DC oder mit Inhibitoren behandelte MO-DC mit 25  $\mu$ M DCG-0N bei 4°C oder 37°C inkubiert wurden. Zusätzlich wurden als Kontrolle Zelllysate (ZL) von MO-DC mit DCG-0N inkubiert.

Im nächsten Experiment wurde der Einfluss der schwachen Base Chloroquin auf die Ansäuerung des endolysosomalen Kompartiments und damit auf die Aktivierung von Cat S untersucht. Intakte DC wurden mit 100  $\mu$ M Chloroquin inkubiert und anschließend einem Experiment im *pulse chase*-Format unterzogen. Hierbei wurde die selektive Zunahme der Signalintensität von Cat S fast komplett gestoppt (Abb. 4-21). Selbst nach 30 min. *chase* war die Intensität deutlich geringer als bei unbehandelten Zellen direkt nach dem Puls. Aber auch die Signale von Cat B waren deutlich schwächer. Da sich die Aktivität der einzelnen Cathepsine im Zelllysate nicht ändert, stoppt Chloroquin folglich den Transport von DCG-0N zu Cat S enthaltenden Kompartimenten.



**Abb. 4-21:** Die Inhibition der Ansäuerung beeinflusst den Transport von DCG-0N ins endozytische Kompartiment. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot eines Versuches bei dem MO-DC oder mit Chloroquin behandelte MO-DC 10 min. mit 25  $\mu$ M DCG-0N bei 4°C oder 37°C inkubiert wurden (Puls). Nach mehrmaligem Waschen wurden die Zellen bei 37°C mit Nährmedium ohne DCG-0N weiter inkubiert (*chase*). Als Kontrolle wurden Zelllysate (ZL) von MO-DC mit DCG-0N inkubiert.

Die endozytische Maschinerie wird größtenteils von der Aktivität der vakuolären  $H^+$ -ATPase reguliert: Eine niedrige Aktivität ist charakteristisch für unreife DC, die starke Endozytose zeigen. Werden DC aktiviert, z.B. durch den Maturationsstimulus LPS, führt das zu einer Aktivierung der ATPase und dadurch zu einem abgesenkten pH in den Vesikeln. Wurden intakte DC mit 20 nM Con B inkubiert und somit der geordnete Transport durch den endolysosomalen Trakt während des frühen Übergangsstadiums blockiert, wurde gleichfalls der Transport von internalisiertem DCG-0N zu aktivem Cat S gestoppt. Aktives Cat S wurde nur noch in sehr geringen Mengen detektiert (Abb. 4-22). Folglich wird die vakuoläre  $H^+$ -ATPase in intakten DC benötigt, um aufgenommenes Material zu aktivem Cat S zu transportieren.

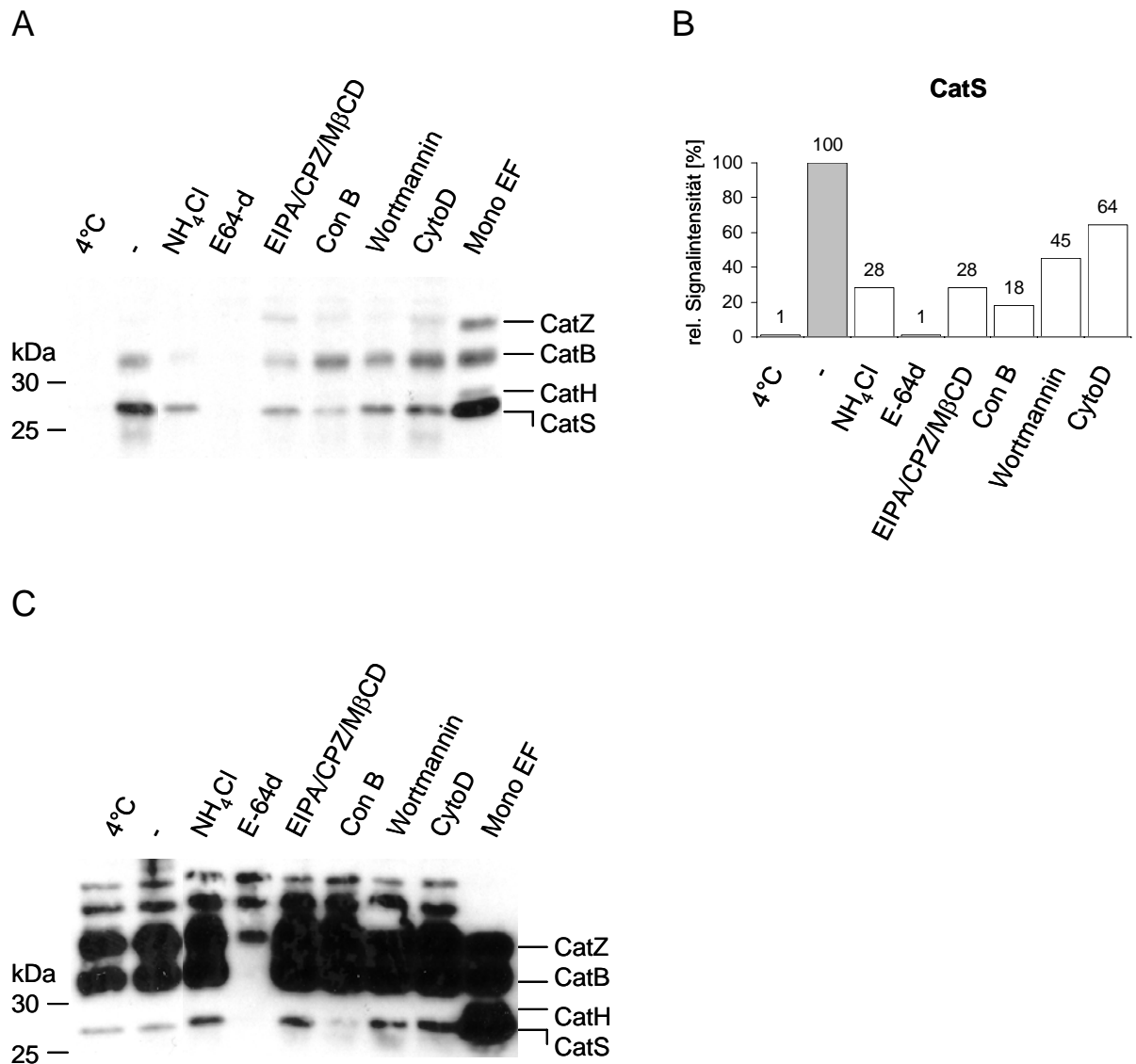


**Abb. 4-22:** Die Inhibition der  $H^+$ -ATPase beeinflusst den Transport von DCG-0N ins endozytische Kompartiment. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot eines Versuches bei dem MO-DC oder mit Con B behandelte MO-DC 10 min. mit 25  $\mu$ M DCG-0N bei 4°C oder 37°C inkubiert wurden (Puls). Nach mehrmaligem Waschen wurden die Zellen bei 37°C mit Nährmedium ohne DCG-0N weiter inkubiert (*chase*). Als Kontrolle wurden Zelllysate (ZL) von MO-DC mit DCG-0N inkubiert.

Um den Einfluss der einzelnen Inhibitoren auf die Internalisierung von Molekülen, deren Transport in den endolysosomalen Trakt und der Aktivierung von Cat S in einem Experiment anschaulich zusammenzufassen, wurden intakte DC mit den bezeichneten Inhibitoren inkubiert, anschließend einem 30-minütigen Puls unterzogen und danach mit eiskaltem PBS mehrfach gewaschen. Nach der Lyse mit einem Überschuss an JPM-565 wurden die Lysate gekocht, die detektierten Polypeptide über SDS-PAGE und Westernblot aufgetrennt und mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht (Abb. 4-23 A). Ferner wurde unmittelbar vor dem Puls von jeder Probe eine kleine Zellmenge lysiert und diese dann mit DCG-0N für 30 min. bei RT inkubiert, um den direkten Einfluss der Inhibitoren auf die Aktivität von Cat S von dem auf den zellulären Transport unterscheiden zu können (C). Die erhaltenen Signale des Puls-Experimentes wurden mittels Densitometrie (Image J) quantifiziert (B). Wie erwartet wurde bei 4°C kein DCG-0N internalisiert und deshalb auch kein Signal für Cat S erhalten, wogegen bei 37°C DCG-0N aufgenommen und daher ein deutliches Signal für Cat S detektiert wurde. Wurden die Zellen vor dem Puls mit E-64d inkubiert, verhinderte das die Detektion von aktivem Cat S während des Pulses. Das Ausbleiben von Signalen im Zelllysate bestätigte die vollständige Inhibition der Cysteinproteasen. Con B verminderte das Signal für Cat S um über 80%, während durch Zugabe von NH<sub>4</sub>Cl (50 mM) eine Reduzierung von 70% zu beobachten war. Con B inhibiert sehr spezifisch die vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase, während NH<sub>4</sub>Cl den pH in den Vesikeln deutlich ansteigen lässt. Mit diesen Werten wird folglich nicht nur der Einfluss des pHs in den Vesikeln zur Aktivierung von Cat S deutlich, sondern auch die wichtige Rolle der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase beim Transport von aufgenommenem extrazellulärem Material zu aktivem Cat S. Zusätzlich scheint Con B Cat S selektiv zu inhibieren, da auch im Zelllysate kein aktives Cat S detektiert werden konnte. Die Verwendung von Cyto D verringerte die Signalstärke von Cat S um fast 40%, somit ist auch die Aktin-Polymerisation für den Transport von DCG-0N zum endolysosomalen Kompartiment notwendig. Wortmannin (100 nM) halbierte das Signal für Cat S und belegt ebenso wie die Verwendung von EIPA weiter oben einen nicht zu vernachlässigenden Anteil der Makropinozytose an der Aufnahme von DCG-0N. CPZ, MβCD und EIPA in Kombination verminderten das Signal für Cat S um über 70%, die Aufnahme konnte aber nicht komplett unterbunden werden.

Die Internalisierung von DCG-0N hängt aufgrund dieser Ergebnisse von einer Reihe verschiedener Mechanismen ab. Phagozytose, wie bereits weiter oben beschrieben, und Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose scheinen zu einem nicht kleinen Prozentsatz an der Internalisierung von DCG-0N beteiligt zu sein.





**Abb. 4-23:** Einfluss der einzelnen Inhibitoren auf die Internalisierung von Molekülen, deren Transport in den endolysosomalen Trakt und der Aktivierung von Cathepsinen in einem 30-minütigen Puls-Experiment. (A) Abgebildet ist ein Aktivitätsblot eines Versuches bei dem MO-DC oder mit verschiedenen Inhibitoren behandelte MO-DC 30 min. mit 25 µM DCG-0N bei 4°C oder 37°C inkubiert wurden. Zur Kontrolle wurden endozytische Fraktionen (EF) von primären Monozyten mit DCG-0N inkubiert. (B) Densitometrische Quantifizierung der Cat S-Aktivität des in (A) abgebildeten Aktivitätsblots. (C) Aktivitätsverteilung der einzelnen Cathepsine im Zelllysate. MO-DC wurden mit den einzelnen Inhibitoren behandelt, lysiert und die gewonnenen Zelllysate mit DCG-0N inkubiert.

#### 4.5 Die Verwendung von Streptavidin bei Puls-Experimenten mit intakten DC

Nachdem in den bisherigen Kapiteln die Art der Aufnahme eines kleinen extrazellulären Moleküls, der intrazelluläre Transport und Einflüsse der Reifung/Aktivierung endolysosomaler Kompartimente/deren Proteasen auf diesen Prozess mit Hilfe der Affinitätsverbindung DCG-0N aufgezeigt wurden, sollte nun versucht werden, die Effizienz der Aufnahme zu verbessern. Dies sollte zum einen detaillierte Informationen durch deutlichere Signale erlauben und zum anderen möglicherweise Aufschlüsse über die verschiedenen Aufnahme-mechanismen geben.

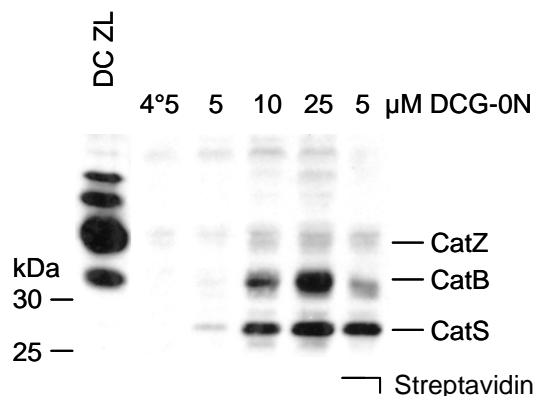
Bei extrazellulären Antigenen handelt es sich in der Mehrzahl um Proteine; daher nehmen intakte DC *in vivo* wahrscheinlich eher große proteinartige als kleine peptidartige Moleküle aktiv auf [Trombetta & Mellman 2005]. DCG-0N ist mit seiner Größe von etwas über 900 Dalton trotz des Biotins sogar noch zu den kleinen Peptiden zu zählen. Um eine aufwendige Synthese großer Affinitätsverbindungen zu umgehen, entstand die Idee, die hochaffine und in ihrer Stärke fast einer kovalenten Bindung gleichkommende Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin für diese Zwecke zu gebrauchen. Streptavidin besitzt ein Molekulargewicht von etwa 55 kDa und verfügt über vier freie Bindungsstellen, die mit Biotin besetzt werden können. Im Gegensatz zu dem sehr ähnlichen Avidin, welches deutlich alkalisch ist und in neutralem pH ausfällt [Hermanson 1996], erlaubt Streptavidin eine Anwendung bei neutralem oder leicht saurem pH. Dieses Streptavidin:DCG-0N-Konstrukt ist mit seiner Größe von etwa 57 kDa einem Protein sehr ähnlich. Wird von der Zelle die gleiche Menge an DCG-0N oder an Konstrukt aufgenommen, so lässt sich schon wegen des Verhältnisses DCG-0N zu Streptavidin von mindestens 2:1 eine Signalverstärkung erreichen.

Vor dem Versuch wurden das mit einem Biotin ausgestattete DCG-0N und Streptavidin in einem noch zu bestimmenden Verhältnis für etwa 1 h bei RT inkubiert. Wird bei gleicher Konzentration an DCG-0N im Pulsmedium später ein stärkeres Signal für Cat S enthalten, entspricht das einer verbesserten Internalisierung oder einem effizienteren Transport zu aktivem Cat S.

Um zu ermitteln, ob durch die Anwendung des Streptavidin:DCG-0N-Konstruktes die Aufnahme und der Transport zu aktiven Proteasen verbessert werden kann, wurden die gleiche Anzahl intakter DC entweder mit verschiedenen Konzentrationen DCG-0N oder mit dem Streptavidin:DCG-0N-Konstrukt für 30 min. gepulst. Das Konstrukt wurde vor dem Puls gebildet, indem bei RT 1 h Streptavidin und DCG-0N im molaren Verhältnis 1:2 inkubiert

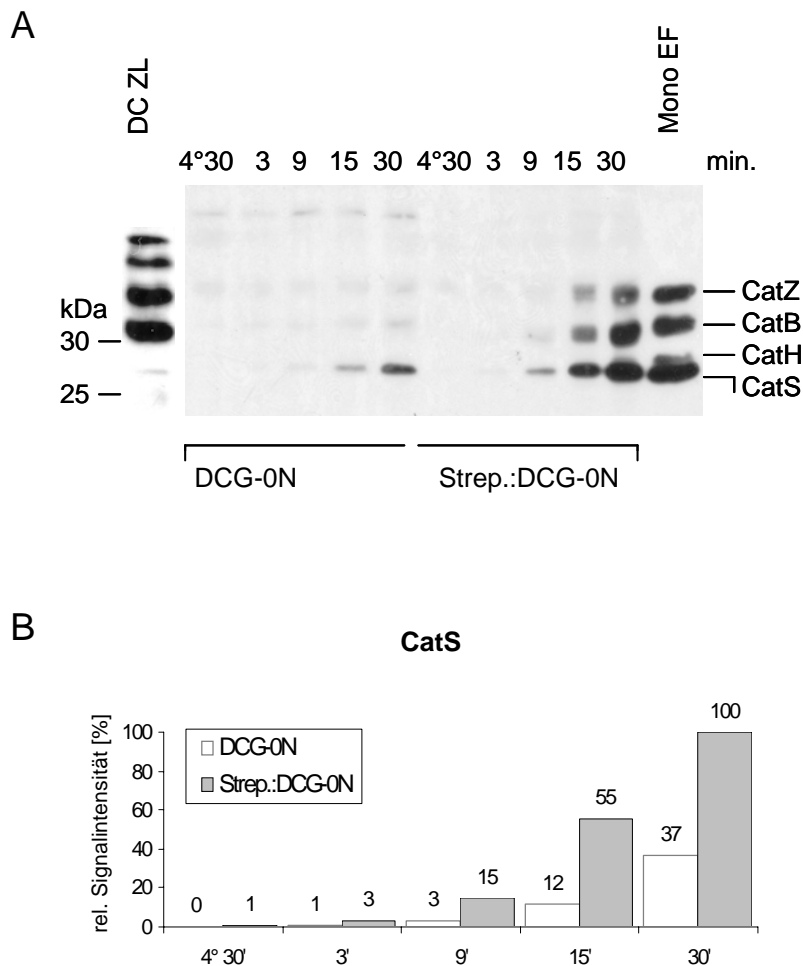
und danach ohne weitere Aufreinigung direkt ins Pulsmedium gegeben wurden. Nach dem Puls wurden die Zellen mit eiskaltem PBS mehrfach gewaschen und mit einem Überschuss an JPM-565 lysiert. Die Lysate wurden mit 3 mM Biotin im Probenpuffer [Rybak et al. 2004] 15 min. gekocht und die detektierten Polypeptide über SDS-PAGE und Westernblot aufgetrennt und mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

In Abb. 4-24 wird deutlich, dass die Menge an detektiertem aktivem Cat S von der Konzentration an DCG-0N im Pulsmedium abhängt. Bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M DCG-0N wurde nur ein schwaches Signal für Cat S visualisiert. Die Verwendung von 10 bzw. 25  $\mu$ M DCG-0N im Pulsmedium führte zu deutlich intensiveren Signalen für Cat S, aber auch Cat B wurde dargestellt. Bei 4°C wurden keine aktiven Cathepsine visualisiert. Das Konstrukt mit einer Endkonzentration von 5  $\mu$ M an DCG-0N im Pulsmedium zeigte im Vergleich zu 5  $\mu$ M DCG-0N ein deutlich stärkeres Signal. Die Signalintensität lag sogar zwischen den erhaltenen Signalen bei der Verwendung von 10 und 25  $\mu$ M DCG-0N. Außerdem war die ebenfalls dargestellte Cat B-Bande deutlich schwächer als bei diesen beiden Konzentrationen. Der selektive Transport zu einem mit Cat S angereicherten Kompartiment schien erhalten zu bleiben, muss aber in weiteren Experimenten mit verschiedenen Puls-Zeiten noch genauer untersucht werden. Die Aufnahme und der Transport von DCG-0N zu aktivem Cat S ließen sich also durch die Verwendung größerer Affinitätsverbindungen deutlich verbessern.



**Abb. 4-24:** Die Detektion von aktivem Cat S ist von der Konzentration der Affinitätsverbindung abhängig. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot eines Versuches bei dem MO-DC mit DCG-0N oder mit DCG-0N gekoppelt an Streptavidin 30 min. bei 4°C oder 37°C inkubiert wurden. Als Kontrolle wurden Zelllysate (ZL) von MO-DC mit DCG-0N inkubiert.

Um die Verbesserung der Aufnahme durch Streptavidin:DCG-0N in einem zeitlichen Verlauf zu untersuchen, wurden intakte DC mit 10  $\mu$ M DCG-0N bzw. Konstrukt (1  $\mu$ M Streptavidin, 10  $\mu$ M DCG-0N) für bis zu 30 min. gepulst (Abb. 4-25 A). Die erhaltenen Signale für Cat S wurden mittels Densitometrie (Image J) quantifiziert, um einen besseren Vergleich der einzelnen Signalintensitäten zu ermöglichen (Abb. 4-25 B). Die Inkubation von DC mit DCG-0N ergab die erwartete selektive kontinuierlich zunehmende Detektion von aktivem Cat S während des Pulses. Mit Ausnahme von Cat S wurden keine weiteren aktiven Cathepsine visualisiert. Das Ausbleiben von Signalen bei 4°C belegte die aktive Aufnahme sowohl bei DCG-0N als auch beim Streptavidin:DCG-0N-Konstrukt. Die Verwendung des Konstruktes bei 37°C führte zur gleichen selektiven Detektion von Cat S. Die erhaltenen Signalintensitäten waren jedoch eindeutig größer.

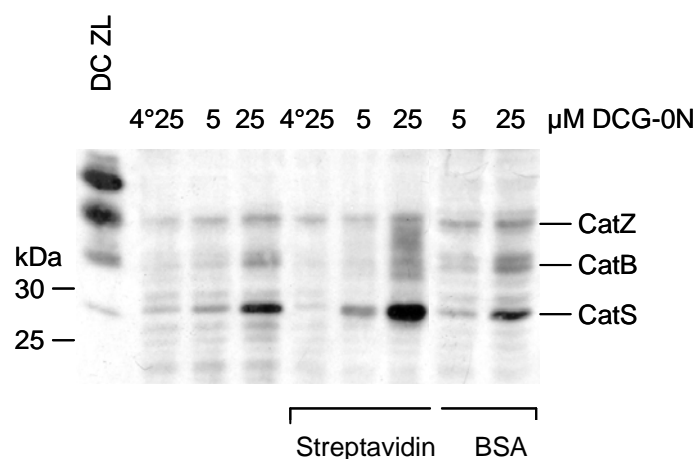


**Abb. 4-25:** (A) Die Konjugation von DCG-0N an Streptavidin verbessert den Transport zu aktivem Cat S. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot des Versuches bei dem MO-DC mit DCG-0N und mit DCG-0N gekoppelt an Streptavidin bei 4°C oder 37°C inkubiert wurden. Als Kontrolle wurden Zelllysate (ZL) von MO-DC und endozytische Fraktionen (EF) von primären Monozyten mit DCG-0N inkubiert. (B) Densitometrische Quantifizierung der Aktivität von Cat S des in (A) abgebildeten Aktivitätsblots.

Während bei DCG-0N erst nach 15 min. Puls ein deutliches Signal für Cat S bei dieser Exposition zu beobachten war, wurde bei Verwendung des Konstruktes bereits nach 9 min. aktives Cat S detektiert, wobei die Selektivität erhalten blieb. Anhand der Quantifizierung ergab sich eine fünffache Zunahme des Signals für Cat S. Nach 15 und 30 min. folgten dann zunehmend Banden für Cat B und Cat Z. Deren Intensität nahm aber erst zu, nachdem das Signal für Cat S bereits gesättigt war. Die Bindung von DCG-0N an Streptavidin erhöht also den Transport von DCG-0N zu aktivem Cat S unter Erhalt der Selektivität.

Versuche mit StreptavidinCy5 ergaben, dass das Fluorophor keinen Einfluss auf die Aufnahme des Konstruktes ausübte und deshalb ohne weiteres für *pulse chase*-Versuche mit intakten DC in der Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden konnte.

Um auszuschließen, dass es sich bei dem beobachteten Effekt um einem unspezifischen Co-Transport von DCG-0N mit Protein handelt, wurden Streptavidin und BSA in zwei verschiedenen Konzentrationen jeweils im Verhältnis von 1:20 mit DCG-0N inkubiert und anschließend mit intakten DC 30 min. gepulst. Weiterhin wurden DC mit verschiedenen Konzentrationen an DCG-0N und an Streptavidin:DCG-0N-Konstrukt bei 4°C und 37°C gepulst (Abb. 4-26). Bei DCG-0N und bei dem Konstrukt war wieder die konzentrationsabhängige Zunahme der Signalintensität von Cat S zu beobachten. Die Signalintensität des Konstruktes war bei beiden Konzentrationen deutlich stärker. Bei der Verwendung von BSA anstatt des Konstruktes ging die Verbesserung der Aufnahme vollständig verloren, was gegen einen unspezifischen Co-Transport spricht.

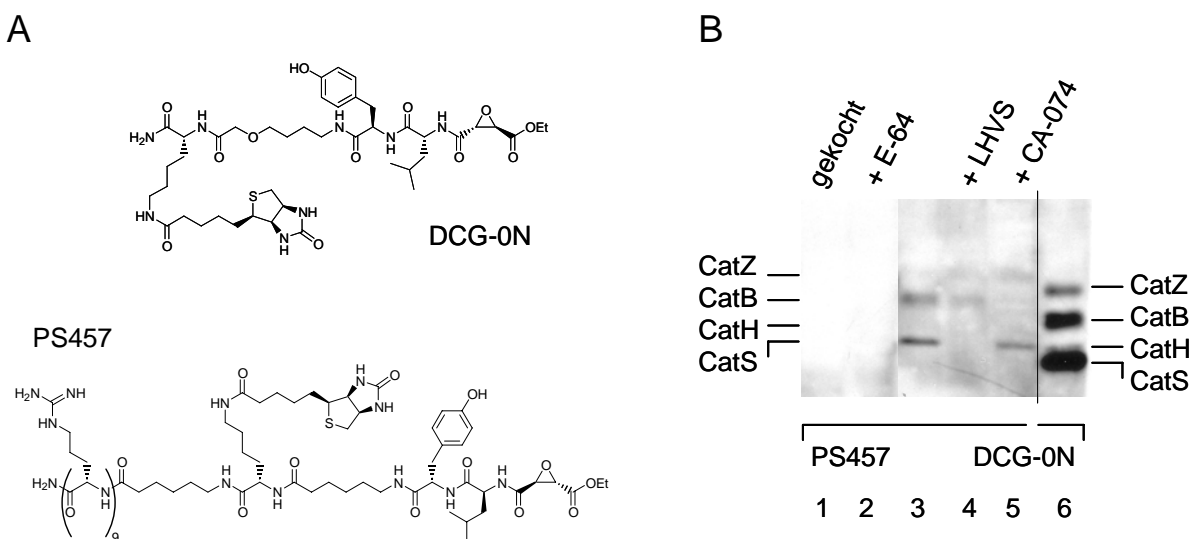


**Abb. 4-26:** Der Transport des Streptavidin:DCG-0N-Konstruktes unterliegt einem spezifischen Mechanismus. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot eines Versuches bei dem MO-DC mit DCG-0N, mit DCG-0N gekoppelt an Streptavidin oder unter Zugabe von BSA bei 4°C oder 37°C inkubiert wurden. Als Kontrolle wurden Zelllysate (ZL) von MO-DC mit DCG-0N inkubiert.

## 4.6 Zellpenetrierende Peptide verbessern den Transport in intakte DC

Die Translokationsaktivität der zellpenetrierenden Peptide (CPP) könnte es ermöglichen, die Aufnahme von Affinitätsverbindungen weiter zu verbessern, insbesondere mit dem Ziel, auch Prozessierungsstudien in reifen DC durchzuführen, da sich im Zuge ihrer Aktivierung die aktive Aufnahme von externen Molekülen stark vermindert. Außerdem könnten dadurch Versuche in antigenpräsentierenden Zellen ohne ausgeprägte Endozytosemechanismen möglich sein.

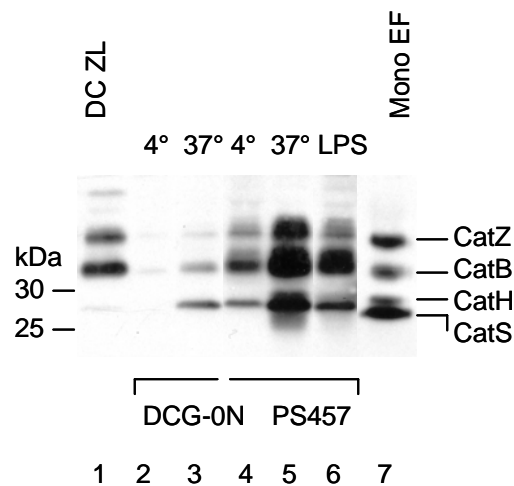
Zu diesem Zweck wurde ein Derivat von DCG-0N synthetisiert und die  $\epsilon$ -Aminogruppe der Lysinseitenkette um neun Arginine verlängert [Reich et al. 2006]. Dieses Nonaarginin-Derivat von DCG-0N (PS457, Abb. 4-27 A) sollte die Eigenschaften eines zellpenetrierenden Peptides und der Affinitätsverbindung zur Detektion aktiver Cysteinproteasen kombinieren.



**Abb. 4-27:** (A) DCG-0N und das Nonaarginin-Derivat PS457. (B) PS457 detektiert aktive Cathepsine. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot eines Versuches bei dem endozytische Fraktionen von primären Monozyten mit PS457 (Spur 1-5) oder DCG-0N (Spur 6) inkubiert wurden. Das Kochen der Probe und die Zugabe von 25 nM Cat S-Inhibitor LHVS (Spur 4), 1  $\mu$ M Cat B-Inhibitor CA-074 (Spur 5) und des Breitband-Cysteinproteaseninhibitors E-64 (25  $\mu$ M, Spur 2) vor der Inkubation mit DCG-0N dienten als Spezifitätskontrolle.

Um zu zeigen, wie weit aufgrund der Modifikation an der Lysinseitenkette die Eigenschaften der Affinitätsverbindung bei der Detektion aktiver Proteasen beeinflusst werden, wurden endozytische Fraktionen jeweils mit 10  $\mu$ M DCG-0N oder PS457 für 30 min. bei RT inkubiert. Die Lysate wurden mit Probenpuffer gekocht, die detektierten Polypeptide über SDS-PAGE und Westernblot aufgetrennt und mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Weitere Proben wurden vor der Inkubation mit PS457 entweder aufgekocht, um aktive Proteasen zu

denaturieren, oder mit 25  $\mu$ M E-64 zur Inhibition aktiver Cysteinproteasen vorbehandelt (Abb. 4-27 B, Spur 1+2). Bei diesen beiden Proben, welche als Spezifitätskontrolle von PS457 für die Detektion von Cysteinproteasen dienten, wurden keine aktiven Proteasen visualisiert. Die Inkubation von endozytischen Fraktionen mit PS457 führte zur Detektion von zwei schwachen Banden (Spur 3). Die Vorbehandlung von endozytischen Fraktionen mit dem Cat S-Inhibitor LHVS (25 nM, Spur 4) und dem Cat B-Inhibitor CA-074 (1  $\mu$ M, Spur 5) ergaben, dass es sich bei den Polypeptiden um Cat S bzw. Cat B handelte. Aufgrund des höheren Gewichtes von PS457 wanderten sie etwas langsamer im Gel als die vergleichbaren Signale in der mit DCG-0N versetzten Probe. PS457 erlaubt also die Visualisierung von aktiven Cysteinproteasen im Zelllysate mit der gleichen Spezifität aber wesentlich geringerer Affinität.



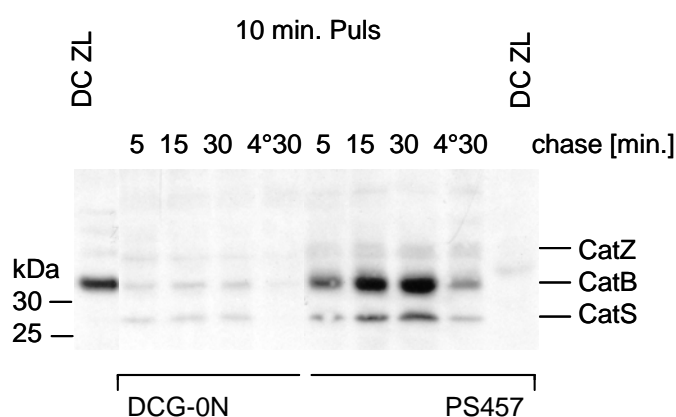
**Abb. 4-28:** PS457 verbessert die Detektion von aktivem Cat S in intakten DC. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot eines Versuches bei dem MO-DC oder mit LPS-induzierte MO-DC mit 10  $\mu$ M DCG-0N oder PS457 bei 4°C oder 37°C inkubiert wurden. Als Kontrolle wurden Zelllysate (ZL) von MO-DC und endozytische Fraktionen (EF) von primären Monozyten mit DCG-0N inkubiert.

Im nächsten Experiment wurden intakte DC mit 10  $\mu$ M PS457 oder DCG-0N 1 h bei 4°C oder 37°C gepulst (Abb. 4-28). Wie erwartet wurden bei der Inkubation von DC mit DCG-0N nur bei 37°C aktive Cathepsine visualisiert (Spur 2+3). PS457 detektierte bei 37°C ebenfalls die gleichen aktiven Proteasen (Spur 5). Die Intensität der Signale war im Vergleich zu DCG-0N deutlich stärker. PS457 wird folglich sehr effektiv zu einem aktive Cathepsine enthaltenden endolysosomalen Kompartiment transportiert. Wenn man die schlechtere Affinität von PS457 für Cysteinproteasen im Zelllysate bedenkt, dann wird der verbesserte Transport von PS457 ins endozytische Kompartiment sogar noch unterbewertet. Der Transport von externem Material zu einem Kompartiment, das aktives Cat S enthält, konnte mit

Hilfe von PS457 signifikant gesteigert werden. Im Vergleich zu DCG-0N wurde PS457 aber nicht mehr selektiv zu Cat S transportiert, auch Cat B und Cat Z wurden in vergleichbarer Menge detektiert. Somit führte die verbesserte Effizienz der Aufnahme auch zu einem Verlust an Selektivität des Transportes. Cat B wurde mit Hilfe von PS457 wesentlich deutlicher detektiert als Cat S, es ergab sich eine ähnliche Intensitätsverteilung wie im Zellysate.

Der genaue Aufnahmemechanismus von polykationischen Peptiden wird, wie bereits erwähnt, noch diskutiert (aktive Endozytose-vermittelte Aufnahme oder passives Überwinden der Zellmembran). Da PS457 aktives Cat B, Z und S auch bei 4°C detektierte (Spur 4), während unter diesen Bedingungen von DCG-0N keine aktiven Proteasen dargestellt wurden (Spur2), kann gefolgert werden, dass polykationische Moleküle wie PS457 frei von energieabhängigen Mechanismen in die Zelle gelangen können. Hier geht der selektive Transport zu Cat S jedoch verloren (vgl. Spur 3). Aber auch die aktive Aufnahme trägt deutlich zum endozytischen Transport von PS457 bei, weil zum einen Cathepsine bei 37°C deutlich stärker als bei 4°C dargestellt wurden und zum anderen auch die Drosselung der Endozytosemaschinerie durch LPS-vermittelte Ausreifung der DC zu einer verminderten Detektion von Cathepsinen führte.

Wurden intakte DC einem *pulse chase* mit 10 µM DCG-0N oder PS457 unterzogen, wurden diese Unterschiede sogar noch deutlicher (Abb. 4-29): Während die Signale beim *pulse chase* mit DCG-0N während des gesamten *chase* gleichmäßig nahe oberhalb der Detektionsgrenze blieben, konnten bei der Verwendung von PS457 deutliche Signale aktiver Cathepsine erhalten werden. Erst nach 15 min. *chase* wurde eine Signalsättigung erreicht.

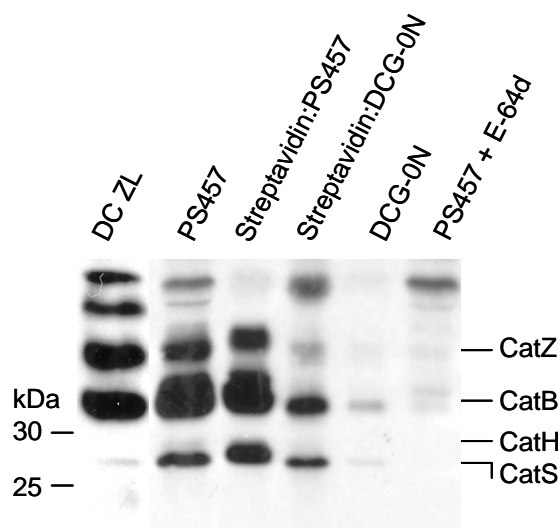


**Abb. 4-29:** PS457 verbessert die Detektion von aktivem Cat S im *pulse chase*-Experiment. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot eines Versuches bei dem MO-DC mit 10 µM DCG-0N oder PS457 bei 4°C oder 37°C inkubiert wurden (Puls). Nach mehrmaligem Waschen wurden die Zellen bei 37°C mit Nährmedium ohne Affinitätsverbindung weiter inkubiert (*chase*). Als Kontrolle wurden Zellysate (ZL) von MO-DC mit DCG-0N oder PS457 inkubiert.



Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Verwendung polykationischer Moleküle den Transport von extrazellulären Molekülen zu Cathepsin-enhaltenden Kompartimenten in intakten DC deutlich verbessert. Dieser Effekt ist zum Teil energieunabhängig, zum Teil aber auch Endozytose-vermittelt und beinhaltet keinen bevorzugten Transport zu einem Cat S-haltigen Kompartiment.

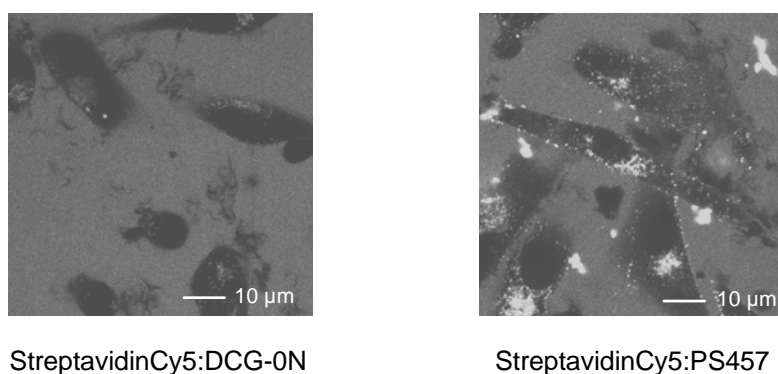
Um die Aufnahmeeffizienz von Streptavidin:DCG-0N-Konstrukten mit der von PS457 zu vergleichen, wurden intakte DC mit 5  $\mu$ M DCG-0N oder PS457 30 min. gepulst. Weiterhin wurden DCG-0N und PS457 vor dem Puls mit Streptavidin inkubiert (Verhältnis Streptavidin:Peptid 1:2). Die gleiche Anzahl Zellen wurde vor der Inkubation von PS457 mit E-64d versetzt (Abb. 4-30). Hier wurden keine aktiven Cathepsine detektiert. Die Verwendung von 5  $\mu$ M DCG-0N lieferte die schwächsten Signale für Cat S und Cat B. Beim Konstrukt Streptavidin:DCG-0N wurden wesentlich stärkere Signale erhalten, während das Signalverhältnis von Cat S zu Cat B gleich blieb. PS457 lieferte die stärksten Signale für Cat B und Cat S. Auch Cat Z wurde hier detektiert. Das Signalverhältnis von Cat S zu Cat B verschlechterte sich aber zum Nachteil von Cat S. Das Konstrukt Streptavidin:PS457 detektierte am meisten Cat S, wobei das Signalverhältnis von Cat S zu Cat B hier eindeutiger war im Unterschied zu PS457 und somit zumindest einen gewissen selektiven Transport zu Cat S-haltigen Kompartimenten annehmen lässt.



**Abb. 4-30:** Vergleich der verschiedenen Affinitätsverbindungen und Konstrukte in einem 30-minütigen Puls-Experiment. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot eines Versuches bei dem MO-DC mit 5  $\mu$ M DCG-0N oder verschiedenen Konstrukten bei 37°C inkubiert wurden. Als Kontrolle wurde ein Teil der Zellen vor dem Versuch mit dem Cysteinproteaseninhibitor E-64d behandelt. Außerdem wurden Zelllysate (ZL) von MO-DC mit DCG-0N inkubiert.

PS457 zeigt die größte Effizienz der Aufnahme und des Transportes zu Cat S-enthaltenden Kompartimenten, aber auch gleichzeitig die geringste Selektivität. Das Streptavidin:DCG-0N-Konstrukt ist weniger effizient, aber die Selektivität bleibt erhalten, wogegen das Streptavidin:PS457-Konstrukt einen Mittelweg zwischen beiden darstellt.

Konfokale Laserscanning Mikroskopie mit intakten Zellen bestätigte diese Resultate. Während bei der Verwendung des StreptavidinCy5:DCG-0N-Konstruktes geringfügig distinkte vesikuläre Färbungen in den Fluoreszenzbildern beobachtet wurden, waren bei dem StreptavidinCy5:PS457-Konstrukt eindeutig mehr vesikuläre Strukturen zu sehen (Abb. 4-31). Das StreptavidinCy5:PS457-Konstrukt wird also präferentiell vesikulär aufgenommen und verteilt sich nicht gleichmäßig im Zytosol.

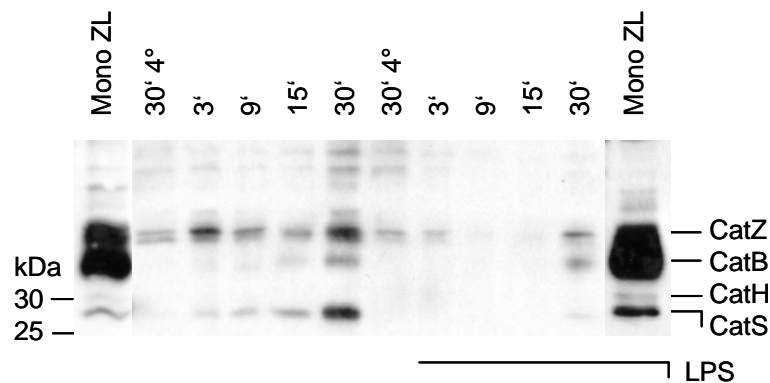


**Abb. 4-31:** Internalisierung von StreptavidinCy5:DCG-0N und StreptavidinCy5:PS457 in iDC unter dem konfokalen Mikroskop. Intakte MO-DC wurden mit DCG-0N oder PS457 jeweils gekoppelt an StreptavidinCy5 30 min. bei 37°C inkubiert.

#### 4.7 Puls-Experimente mit primären Monozyten

Nachdem das *rendez-vous* zwischen individuellen endozytischen Cysteinproteasen und internalisiertem exogenem Material am Modell der Affinitätsverbindung DCG-0N in intakten DC untersucht wurde, war von weiterem Interesse, ob Internalisierung und Prozessierung bei primären Zellen ähnlich ablaufen.

Daher wurden über eine zwei Schritte umfassende Dichtegradientenzentrifugation gewonnene primäre Monozyten, deren FACS<sup>®</sup>-Analyse eine durchschnittliche Reinheit von über 70% mit geringen Verunreinigungen von T- und B-Zellen ergab, ebenfalls einen Pulsformat mit DCG-0N unterzogen. Auch hier war eine selektive zeitabhängige kontinuierliche Zunahme von aktivem Cat S zu beobachten, während Cat B und Cat Z nur in sehr geringem Maße detektiert wurden (Abb. 4-32, vgl. Abb. 4-12). Wurden primäre Monozyten 24 h mit LPS kultiviert, so kamen die Aufnahme und der selektive Transport in ein mit aktivem Cat S-angereichertes Kompartiment fast vollständig zum Erliegen. Erst nach 30 min. Puls war ein schwaches Signal für Cat S zu beobachten. Puls-Experimente mit OVA-FITC und anschließender zytometrischer Analyse bestätigten die Drosselung der Aufnahme (nicht gezeigt):



**Abb. 4-32:** Der selektive Transport von DCG-0N zu aktivem Cat S ändert sich durch die LPS-induzierte Reifung von primären Monozyten. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot eines Versuches bei dem primäre Monozyten oder mit LPS-induzierte Monozyten mit 25  $\mu$ M DCG-0N bei 4°C oder 37°C inkubiert wurden. Als Kontrolle wurden Zelllysate (ZL) mit DCG-0N inkubiert.



## 5 Der Einsatz von LHVS zur therapeutischen Intervention bei EAE

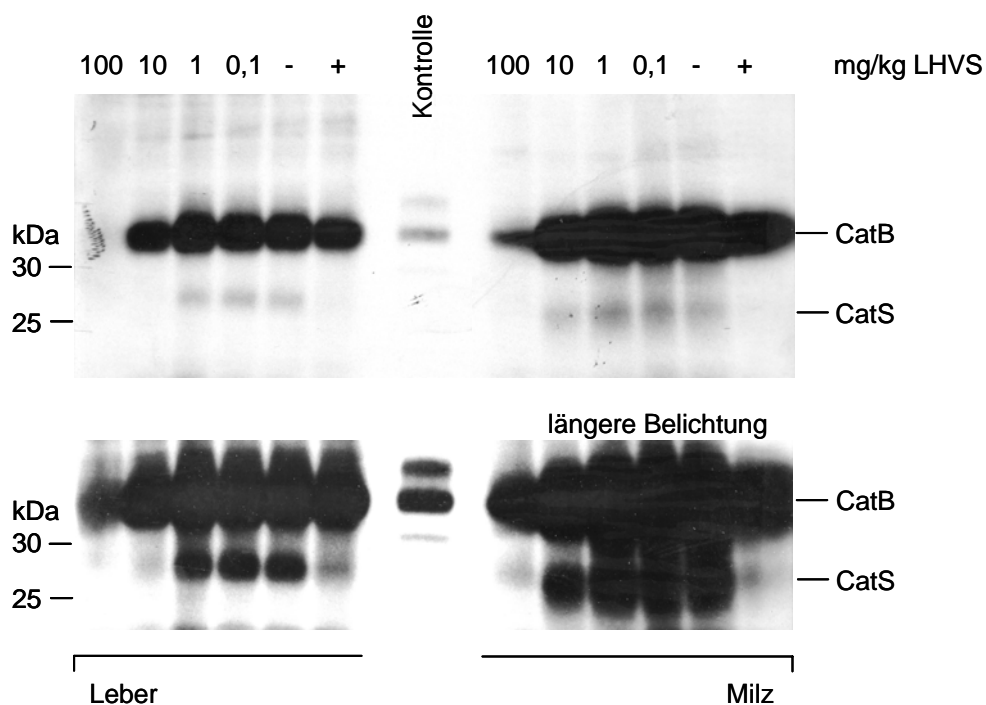
Es wurde gezeigt, dass Cat S wahrscheinlich eine dominante Protease bei der Prozessierung von internalisierten Antigenen darstellt. Cat S ist ferner an den initialen Schritten der Prozessierung von MBP, einem MS-assoziierten Autoantigen *in vitro* erheblich beteiligt [Beck et al. 2001]. Außerdem reguliert Cat S den Transport von MHC Klasse II in DC *in vitro* über die Prozessierung von Ii [Driessen et al. 1999]. Alle Schritte sollten sich folglich durch den Einsatz des spezifischen Cat S-Inhibitors LHVS manipulieren lassen. Deshalb sollte die Verwendung von LHVS zur selektiven Manipulation der MHC Klasse II-vermittelten Immunfunktion bei Autoimmunerkrankungen am Beispiel der MHC Klasse II-assoziierten Multiplen Sklerose überprüft werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Gramm LHVS synthetisiert [Palmer et al. 1995, Weiberth et al. 1999, mod. nach M. Leeuwenburgh].

Zur Dosisfindung wurden verschiedene Mengen in DMSO/Neutralöl gelöstes LHVS in Mäusen i.p. appliziert. Nach 1 h wurden die Tiere betäubt, getötet und Leber und Milz entnommen. Anschließend wurden aus den Organen isolierte Zellen mit der zellgängigen radioaktiven Affinitätsverbindung Z-Tyr[<sup>125</sup>I]-Ala-CHN<sub>2</sub> inkubiert. Die gebundenen Polypeptide wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht (Abb. 5-1). Bei der gleichen Anzahl an Zellen aus nichtbehandelten Kontrollmäusen wurde vor der Inkubation mit Z-Tyr[<sup>125</sup>I]-Ala-CHN<sub>2</sub> Cat S durch LHVS *in vitro* inhibiert. In der Leber wurde die Aktivität von Cat S ab einer LHVS-Dosis von 10 mg/kg eliminiert, in der Milz bei 100 mg/kg. Während in den unbehandelten Kontrollmäusen aktives Cat S vorhanden war (-), bestätigte die *in vitro* Inhibition von Cat S (+) dessen Identität.

Versuche, bei denen Mäusen 100 mg/kg LHVS in DMSO/Neutralöl appliziert wurde, zeigten eine Inhibition von Cat S zwischen 1 und 24 h nach Applikation. Auch innerhalb des ZNS wurde eine verminderte Aktivität von Cat S beobachtet (nicht abgebildet).

Die Verwendung von Neutralöl erwies sich in dem gewählten Volumen bei der Behandlung für die Tiere als relativ toxisch und deshalb wurde bei den folgenden Experimenten auf reines DMSO zur Formulierung von LHVS zurückgegriffen.

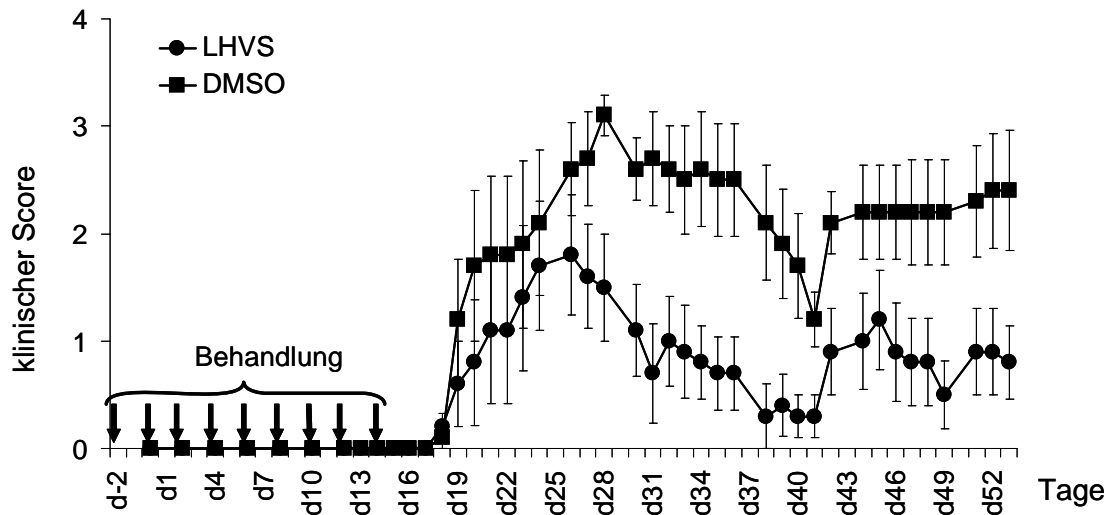


**Abb. 5-1:** Die Applikation von LHVS inhibiert die Aktivität von Cat S *in vivo*. Abgebildet ist ein Aktivitätsblot eines Versuches bei dem Mäuse mit dem Cat S-Inhibitor LHVS behandelt wurden. Anschließend wurden die isolierten Zellen verschiedener Organe mit [<sup>125</sup>I]-markiertem Z-Tyr-Ala-CHN<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Lyse wurden die Proteine bei 95°C denaturiert, die gebundenen Polypeptide über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht.

Werden C57BL/6 Mäuse mit MOG-Peptid MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK (MOG<sub>35-55</sub>), einem gut charakterisierten MS-assoziierten Autoantigen, immunisiert, so tritt nach 8-10 Tagen ein MS-ähnlicher, schubartiger Krankheitsverlauf auf (experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, EAE). Zur Anwendung der gewonnenen Erkenntnisse im Mausmodell der Multiplen Sklerose wurde bei je fünf C57BL/6 Mäusen 100 mg/kg LHVS in DMSO oder nur DMSO zur prophylaktischen Behandlung appliziert. Begonnen wurde 2 Tage vor der Immunisierung, weitere Applikationen erfolgten alle 48 Stunden bis einschließlich Tag 14. Am Tag 0 wurden die Mäuse mit 100 µg MOG<sub>35-55</sub> immunisiert. Zusätzlich wurden an Tag 0 und Tag 2 je 150 ng Pertussis Toxin i.v. verabreicht. Der Krankheitsverlauf wurde mit Hilfe eines klinischen Scores zwischen 0 (keine Beeinträchtigung) und 5 (Tod) festgehalten. Während bei der Kontrollgruppe der Score zwischen Tag 18 und 28 von 0 auf über 3 anstieg, war der Verlauf bei der behandelten Gruppe deutlich gemäßiger (Abb. 5-2). Hier wurde eine vorübergehende Spitze von weniger als 2 Punkten erreicht, die dann aber schnell wieder auf etwa 1 absank. Während des gesamten Versuches blieben die behandelten Mäuse um fast 2 Punkte unterhalb der Kontrollgruppe. Auffallend war die Langzeitwirkung: Auch nach

Einstellung der Applikationen am Tag 14 hielt der protektive Effekt von LHVS über den gesamten Versuchverlauf hinweg an.

Anschließende Untersuchungen müssen diese ersten erfolgsversprechenden Experimente bestätigen.



**Abb. 5-2:** Die Applikation von LHVS vermindert die Krankheitsaktivität der EAE im Mausmodell. Je 5 Mäusen wurde über 16 Tage alle 48 h LHVS oder nur DMSO appliziert. Die Induktion von EAE erfolgte durch die Immunisierung mit MOG<sub>35-55</sub> und Pertussis Toxin.





## 6 Diskussion

### 6.1 Detektion aktiver Proteasen *in vitro*

#### 6.1.1 Vergleich von DCG-0N mit E-64-Aktivitätsderivaten

Ein wesentlicher Teil der vorliegenden Arbeit umfasst die Synthese von DCG-0N, einer Affinitätsverbindung zur Detektion aktiver Cysteinproteasen, sowie dessen Charakterisierung in Zelllysaten und die Anwendung bei biologischen Fragestellungen.

Eine Derivatisierung von E-64, einem Inhibitor der Papain-ähnlichen Cathepsine, ermöglichte die Darstellung aktiver Cathepsine im Aktivitätsblot. Die Verlängerung der Peptidregion von E-64 erlaubte sowohl die Einführung des Detektionsmoleküls Biotin als auch die methodisch gegenüber der klassischen organischen Synthese zeitsparende Festphasensynthese an einem Harz. Die resultierende bifunktionelle Verbindung (DCG-03) enthielt einen Phenolring zur Einführung von radioaktivem Iod und eine weitere Detektionsdeterminante durch die biotinylierte Seitenkette von Lysin [Greenbaum et al. 2000]. Das sperrige Iod-Molekül hatte nur geringfügig negative Auswirkungen auf das Detektionsverhalten der Affinitätsverbindung. Eine Einführung der  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure ( $\epsilon$ Ahx) zwischen Spezifitätsdeterminante und das Detektionsmolekül Biotin bei der Synthese von DCG-04 verbesserte das Verhalten im ASL [Greenbaum et al. 2000]. Die Synthese von DCG-0N diente zur Weiterführung der bereits existierenden Derivate von E-64. Aus diesem Grund wurde der bei DCG-04 verwendete *spacer*  $\epsilon$ Ahx gegen ein längeres Molekül mit einem zusätzlichen Sauerstoffatom ausgetauscht. Neben verbesserten Eigenschaften im ASL sollte außerdem die Zellgängigkeit des Moleküls zur Anwendung in intakten Zellen erreicht werden. In einem ASL mit Zelllysaten der Makrophagenzelllinie J774 zeigten DCG-04 und DCG-0N keinen erkennbaren Unterschied im Detektionsmuster aktiver Cysteinproteasen [van Swieten et al. 2004]. Auch ein vergleichendes ASL [ $^{125}$ I]-markierter Affinitätsverbindungen mit endozytischen Fraktionen der humanen Monozytenzelllinie U937 ergab keine signifikanten Abweichungen. Leider zeigten Versuche mit intakten U937, dass DCG-0N keine zellpermeablen Eigenschaften besitzt. Somit konnte die Funktionalität von DCG-0N bestätigt werden, auch wenn keine offensichtlichen Verbesserungen gegenüber DCG-04 zu erkennen waren. Der Synthesaufwand vergrößerte sich aufgrund des zusätzlichen Azidbausteins beträchtlich, da der bei DCG-04 verwendete *spacer*  $\epsilon$ Ahx kommerziell erhältlich ist. Erfreulich jedoch ist die nicht erwartete Stabilität der Epoxidgruppe bei der Anwendung in

wässrigen Lösungsmitteln. Selbst bei Inkubationen über mehrere Stunden bei 37°C war keine Beeinträchtigung der Selektivität und Reaktivität feststellbar.

Eine klassische Methode um Aktivitäten von Proteasen zu messen, ist die Verwendung kleiner Peptide, die mit einem fluorogenen Molekül ausgestattet sind, welches nach der Proteolyse ein einfach zu detektierendes fluoreszierendes Produkt freisetzt. Diese Substrate werden oft *in vitro* zur Durchführung von Michaelis-Menten-Kinetiken mit gereinigten Enzymen eingesetzt. Die Methode ist in ihrem Einsatz jedoch beschränkt. Bis heute existieren nur wenige spezifische Substrate für einzelne Proteasen. Zur Aktivitätsmessung von Papain-ähnlichen Cysteinproteasen wird das Substrat Z-FR-AMC verwendet. Diese so genannte BLS-Aktivität stellt aufgrund ähnlicher Substratspezifitäten die kombinierte Aktivität der Cysteinproteasen Cat B, Cat L und Cat S dar [Morita et al. 1977]. Für den Einsatz in komplexen Proteingemischen wie etwa Zellysaten ist die Methode jedoch nur eingeschränkt verwendbar, weil sie keine Unterscheidung zwischen den Aktivitäten der einzelnen Cathepsine zulässt. Trägt eine Protease nur einen geringen Prozentsatz zur kombinierten Aktivität bei, wirkt sich eine Änderung ihrer Aktivität kaum auf das Gesamtsignal aus. Aussagen über die biologische Bedeutung einzelner Proteasen sind nicht möglich. Außerdem kann die Reaktivität gegenüber fluorogenen Substraten nur bei bereits bekannten Enzymen bestimmt werden. Herkömmliche Substrate liefern bei der Charakterisierung noch nicht identifizierter Proteasen kaum Informationen. Affinitätsverbindungen dagegen sind in der Lage, zwischen eng verwandten Proteasen zu differenzieren, sofern sich deren Laufverhalten im Gel unterscheidet. Außerdem ermöglichen sie die Isolierung und Identifizierung unbekannter Proteasen. Aus diesem Grund wurden schließlich Derivate von kleinen Proteaseninhibitoren wie etwa E-64 entwickelt. Die Reaktivität von E-64 gegenüber verschiedenen Cathepsinen ist ausführlich charakterisiert worden [Barrett et al. 1982, Otto et al. 1997]. E-64 zeigt fast identische Reaktionsgeschwindigkeiten für die in DC relevanten Cysteinproteasen Cat B, Cat L und Cat S. Die Reaktivität gegenüber Cat H jedoch ist etwa um den Faktor 20 geringer. Die indirekte Konkurrenz durch Titration von DCG-04 mit E-64 ergab ein fast identisches Detektionsverhalten beider Moleküle [Greenbaum et al. 2000], was dann auch für DCG-04 und DCG-0N bestätigt werden konnte [van Swieten et al. 2004]. Die Titration von E-64 gegen verschiedene Derivate von DCG-04 (die zur Epoxidgruppe benachbarte Aminosäure Leucin wurde durch 18 verschiedene AS ersetzt) ergab, dass Modifikationen in der erweiterten Bindungsregion der Protease kaum Einfluss auf ihre Selektivität und Effizienz haben [Greenbaum et al. 2000].

### 6.1.2 Charakterisierung von DCG-0N zur Affinitätsmarkierung in Zelllysaten

Im Hinblick auf die Anwendung von DCG-0N in intakten Zellen mussten u.a. Untersuchungen zur Spezifität und Sensitivität durchgeführt werden. Weiterhin war es nötig, Zelllysate und endozytische Fraktionen von primären Monozyten und MO-DC zu analysieren, welche für spätere Experimente mit intakten Zellen vorgesehen waren. Die mittels differentieller Zentrifugation gewonnenen angereicherten Zelllysate und endozytischen Fraktionen lieferten aufgrund der durchschnittlichen Proteasenaktivität aller Vesikel ein geeignetes Modell zur Analyse aktiver Cathepsine. Katalytische Thiolgruppen, wie etwa das Cystein im aktiven Zentrum von Cysteinproteasen, werden durch das Erhitzen der Probe mit denaturierenden Reagenzien inaktiviert. Sind nach diesem Vorgang noch Polypeptide im ASL darstellbar, so handelt es sich um freie nicht-katalytische Thiolgruppen (nicht-spezifische Alkylierung). Eine Reaktivität von DCG-0N gegenüber diesen Thiolgruppen konnte nicht festgestellt werden. Die zusätzliche Vorinkubation der Proben mit E-64 ermöglicht außerdem die zweifelsfreie Identifizierung der markierten Spezies als aktive Cysteinprotease im ASL. Eine weitere Quelle unspezifischer Detektion im ASL rührt von der Verwendung der Biotin-Streptavidin-Bindung zur Detektion aktiver Proteasen her. Streptavidin-reaktive Polypeptide werden aber ausschließlich im höhermolekularen Bereich deutlich jenseits von 40 kDa dargestellt und können von den niedermolekularen spezifischen Signalen unterschieden werden. Bei der Verwendung von radioaktivem Iod, der anderen möglichen Option zur Visualisierung aktiver Proteasen mittels DCG-0N, unterbleiben die höhermolekularen Signale [Greenbaum et al. 2000]. Andere Nachteile, wie die geringe Halbwertszeit von [<sup>125</sup>I], welche die Verwendbarkeit von [<sup>125</sup>I]-DCG-0N deutlich einschränkt, aber auch die aufwendige Arbeitsweise und deren Sicherheitsaspekte machen die radioaktive Detektionsmethode unattraktiv. Die deutlich gesteigerte Sensitivität von Avidin (Vectastain<sup>®</sup>) gegenüber dem herkömmlichen Detektionssystem mittels Streptavidin-Peroxidase ermöglichte eine sehr empfindliche und vor allen Dingen auch reproduzierbare Darstellung von Proteasenaktivitäten im Aktivitätsblot. Die Charakterisierung von DCG-0N bezüglich der Sensitivität in endozytischen Fraktionen und Zelllysaten ergab, dass bei professionellen APC, wie DC oder Monozyten, sehr kleine Mengen Gesamtprotein ausreichen (ca. 2 µg), um verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Daher eignet sich diese Methode auch sehr gut zur Analyse von Proteasen bei Zellen, die nur in sehr geringer Menge isoliert werden können. Die Verwendung von endozytischen Fraktionen ist gegenüber der von Zelllysaten zu bevorzugen, weil aufgrund der Anreicherung der endolysosomalen Proteasen unspezifische Signale zurücktreten, zytoplasmatische Proteasenaktivitäten eliminiert werden und so hoffentlich

repräsentativere Ergebnisse erzielt werden können. Die Reproduzierbarkeit von ASL konnte gleichfalls bestätigt werden. Die Verwendung einer densitometrischen Methode (Image J) zur Quantifizierung einzelner Signalintensitäten stützte die optische Auswertung von ASL. Zusätzlich wurden die erhaltenen Ergebnisse mit gemessenen Cat BLS-Aktivitäten verglichen. Der Einsatz von ASL erlaubt eine parallele semiquantitative Analyse verschiedener Proteasen in zellulären Systemen.

Eine mit endozytischen Fraktionen von MO-DC und primären Monozyten durchgeführte Titration von DCG-0N ergab eine hohe Sensitivität und Spezifität gegenüber aktiven Cathepsinen. Bereits bei einer Konzentration von DCG-0N im nanomolaren Bereich sind einzelne Cathepsine darstellbar. Aufgrund ähnlicher Reaktivität gegenüber verschiedenen Cathepsinen (bis auf Cat H) kann bei einem Überschuss von DCG-0N die Bandenintensität verschiedener Cathepsine in einer Probe mit den realen Aktivitätszuständen in der Zelle korreliert werden. Entgegen früheren Publikationen, bei denen zur Analyse 50  $\mu\text{M}$  DCG-04 eingesetzt wurden [Greenbaum et al. 2000], sind bereits 10  $\mu\text{M}$  DCG-0N für eine verlässliche Aussage ausreichend. Die Gefahr unspezifischer Signale verringert sich dadurch ebenfalls. Außerdem ist eine schonende und kurze Inkubation bei RT völlig ausreichend. Dies vergrößert die Wahrscheinlichkeit, die Aktivität der Proteasen nur geringfügig zu verfälschen, im Gegensatz zu älteren Publikationen, bei denen über einen längeren Zeitraum bei 37°C inkubiert wurde. Wurde der pH-Wert des Inkubationspuffers variiert, zeigte sich, dass alle untersuchten Cathepsine bis auf Cat S ab einem pH von 6 inaktiviert und folglich auch nicht mehr im ASL dargestellt werden. Diese Beobachtung deckt sich mit publizierten Enzymaktivitäten [Kirschke et al. 1989].

Außerdem eignet sich die Affinitätsverbindung als Reagenz zur Isolierung und Identifizierung bekannter und unbekannter Cysteinproteasen. Cat C, S, H und Z wurden mit Hilfe von DCG-0N aus einer B-Zelllinie isoliert und identifiziert. Ein noch nicht identifiziertes spezifisches Signal bei 37 kDa in humanen MO-DC bedarf noch der Aufklärung. Dem müssen aber neben der Verwendung einer größeren Proteinmenge Verbesserungen bei der Isolierung, Aufreinigung und den analytischen Methoden vorangehen. Die isoelektrische Fokussierung der 2D-SDS-Page erlaubt zudem eine Unterscheidung verschiedener Cathepsine mit gleichem Molekulargewicht aufgrund unterschiedlicher isoelektrischer Punkte.

Seit kurzem wird das Detektionswerkzeug Biotin durch empfindlichere Fluorophore ersetzt. So wird eine Darstellung von Proteasenaktivitäten bereits im Gel möglich. Aber auch diese Methode hat nicht zu vernachlässigende Nachteile: Die Affinitätsderivate werden deutlich

größer. Der kleine Fluorophor FITC ist zur Analyse von Proteasenaktivitäten in sauren Vesikeln nur eingeschränkt geeignet, andere Fluorophore sind deutlich größer. Die Eigenschaften des Moleküls könnten sich aufgrund Größe/Ladung/Hydrophobizität verschlechtern (Zugänglichkeit der Proteasen).

In einem neuen Ansatz wurden die acht vorhandenen Wasserstoff-Atome der verwendeten *spacer*  $\epsilon$ Ahx bei DCG-04 oder des Azidbausteins bei DCG-0N durch Deuterium ersetzt. Die erhaltenen Verbindungen werden ICAP (*isotope-coded affinity probes*) genannt [van Swieten et al. 2004]. Sie ermöglichen den quantitativen Vergleich zweier unterschiedlicher Proben. Eine Probe wird mit der klassischen Affinitätsverbindung inkubiert, die andere mit der deuterierten Variante. Beide Proben können nun vereinigt und die modifizierten Polypeptide in identischer Weise aufgereinigt und mittels Massenspektrometrie quantifiziert und identifiziert werden. Dies wird durch die um 8 m/z schwereren Fragmente der deuterierten Probe ermöglicht.

### 6.1.3 Untersuchung aktiver Cysteinproteasen in Lysaten verschiedener Zellen

Über die Detektion der Aktivitäten von Cysteinproteasen in Zelllysaten und im endozytischen Kompartiment mittels E-64-Derivaten gibt es bereits mehrere Publikationen. In Mäusen wurde z.B. mit DCG-04 die Modulation verschiedener Cathepsinaktivitäten in unterschiedlichen Karzinomen festgestellt [Greenbaum et al. 2000]. Der Vergleich myeloider Vorläufer-Zelllinien mit Hilfe von biotinyliertem JPM-565 ergab ebenfalls unterschiedliche Aktivitäten einzelner Cathepsine. Außerdem zeigte die subzelluläre Analyse peripherer humaner Monozyten als auch von unreifen und LPS-stimulierten MO-DC unterschiedliche Aktivitäten während der Reifung des endozytischen Kompartiments [Greiner et al. 2003, Lautwein et al. 2002]. Durch den Einsatz von DCG-0N konnte in BLC und primären humanen B-Lymphozyten ebenfalls eine subzelluläre Analyse des endozytischen Kompartiments durchgeführt werden [Lautwein et al. 2004]. Die Anwendung von DCG-0N in Zelllysaten von CD1c-DC ergab eine deutlich geringere Aktivität aller detektierbaren Cathepsine im Vergleich zu MO-DC [Burster et al. 2005].

Auch in Pflanzen wurden inzwischen mit DCG-04 Papain-ähnliche Cysteinproteasen nachgewiesen. In den Blättern von *Arabidopsis*, einem Kohlgewächs, oder in anderen Modellpflanzen wie etwa Gerste, Tabak oder Reis fanden sich verschiedene Cysteinproteasen, u.a. eine Cat B-ähnliche Protease. Die Verteilung und Aktivität der einzelnen Proteasen variierte in den Blättern, Blüten, Stamm oder Wurzeln von *Arabidopsis* [van der Hoorn et al. 2004].

#### 6.1.4 Untersuchung aktiver Serinproteasen in Lysaten verschiedener Zellen

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass sich das AEBSF-Derivat BAESBF zur Markierung und Darstellung der Aktivität von Serinproteasen eignet. Auch wenn die Effizienz von BAESBF nicht mit der von Affinitätsverbindungen für Cysteinproteasen wie etwa DCG-0N vergleichbar ist, wurden neben der Aktivität isolierter Proteine auch aktive Serinproteasen in verschiedenen primären Zellen nachgewiesen. Mit BAESBF konnten sowohl Trypsin und  $\alpha$ -Chymotrypsin als auch Cat G und Cat A detektiert werden. Dies stellt einen großen Vorteil gegenüber DAP, einer anderen Affinitätsverbindung für Cysteinproteasen dar. DAP kann zwar zur Detektion von aktivem Cat G verwendet werden, Cat A lässt sich jedoch nicht darstellen. Die Detektion von aktivem Cat G in Granulozyten bestätigt bereits publizierte Ergebnisse [Burster et al. 2005]. Übereinstimmend mit der vorliegenden Arbeit wird weiterhin beschrieben, dass in MO-DC zwar eine deutliche Proteinexpression von Cat G stattfindet, jedoch kein aktives Cat G dargestellt werden konnte. Diese Beobachtung lässt sich durch die Anwesenheit von Cat G-Inhibitoren, so genannten Serpinen, erklären [Remold-O'Donnell et al. 1992]. Cat G kommt in primären humanen B-Zellen (jedoch nicht in BLC) möglicherweise eine wichtige Rolle bei der MHC Klasse II-vermittelten Antigenpräsentation zu, da AEP dort ohne Bedeutung zu sein scheint [Burster et al. 2005].

Das in der Literatur auch als Carboxypeptidase C benannte Cat A wurde bis dato noch nicht in DC beschrieben, deswegen ist über seine dortige physiologische Funktion auch nichts bekannt. In murinen und humanen Fibroblasten reguliert Cat A die Degradierung des lysosomalen Membran-assoziierten Typ 2a-Proteins Lamp2a, das als Rezeptor der Chaperon-vermittelten Autophagie fungiert [Cuervo et al. 2003]. Außerdem besitzt Cat A eine regulierende Funktion gegenüber zwei lysosomalen Glykosidasen:  $\beta$ -D-Galaktosidase und *N*-Acetyl- $\alpha$ -neuraminidase. Ein primärer Defekt von Cat A ist die Ursache von Galactosialidosis, einer autosomalen rezessiven lysosomalen Stoffwechselerkrankung.

Inwieweit BAESBF zur semiquantitativen Analyse von Serinproteasen geeignet ist muss sich noch zeigen. In primären PMN war nach der Isolierung der Zellen jedoch ein deutlicher zeitabhängiger Abfall von Cat G-Aktivität zu beobachten. Weitere Arbeiten müssen sich auf die Zellgängigkeit des Moleküls und auf *pulse chase*-Experimente mit intakten Zellen zur Aufklärung der Rolle von Serinproteasen im endozytischen Kompartiment von APC fokussieren. Der Versuch der Synthese von FP-Peg-Biotin [Kidd et al. 2001], einem weiteren Molekül zum ASL von Serinproteasen, scheiterte mehrfach an den sehr instabilen Hydrolyseempfindlichen Zwischenprodukten.

## 6.2 Modulation von Cathepsinaktivitäten bei biologischen Fragestellungen

### 6.2.1 Autophagie

Autophagie stellt einen generellen Weg für die Prozessierung intrazellulärer Proteine im endozytischen Kompartiment und die Präsentation der resultierenden Peptide im Verbund mit MHC Klasse II-Molekülen dar. Die basale Aktivität der Autophagie wird besonders durch Mangelernährung stark erhöht. Zusätzlich ist Autophagie an der Entwicklung von Tumoren beteiligt [Shintani et al. 2004, Liang et al. 1999]. Bei Lymphozyten von Patienten, die an chronischer lymphatischer Leukämie litten, war eine erhöhte Autophagie zu beobachten [Seglen et al 1984]. Autophagie moduliert die Expression einer beträchtlichen Anzahl verschiedener Gene, was generell große Auswirkungen auf den zellulären Metabolismus hat.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate bezüglich der endozytischen Proteasen deuten auf profunde Auswirkungen einer gesteigerten Autophagie auf die MHC Klasse II-assoziierte Antigenpräsentation hin, welche durch eine verringerte Aktivität der Cathepsine im endozytischen Kompartiment bedingt sind. Der deutliche zeitabhängige Abfall der Expression und auch der Aktivität von Cat S, einer Schlüsselprotease der Prozessierung im endozytischen Kompartiment wirkt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Prozessierungsparameter und somit auf das Ligandenrepertoire der MHC Klasse II-Moleküle aus. Zusätzlich lassen die Ergebnisse der *in vitro* Prozessierungsstudie den Schluss zu, dass die Aktivität von AEP, einer weiteren äußerst wichtigen Protease bei der MHC Klasse II-assoziierten Prozessierung, ebenfalls empfindlich auf eine gesteigerte Autophagie reagiert. Cat D dagegen scheint resistenter zu sein, was sich auch in einer nur geringfügig veränderten Expression des Proteins im Western Blot zeigt. Eine allgemeine Drosselung der Aktivität endozytischer Proteasen mit subtilen Unterschieden zwischen einzelnen Schlüsselenzymen übt folglich einen deutlichen Einfluss auf die Generierung von MHC Klasse II-Liganden aus und erklärt möglicherweise die veränderte Präsentation verschiedener Peptide aus der gleichen Proteinquelle. Das MHC Klasse II-Peptidrepertoire wird über Autophagie nachhaltig beeinflusst und hat wahrscheinlich Auswirkungen auf die Regulation von CD4<sup>+</sup>-T-Zell-vermittelten Prozessen, abgesehen von bereits bekannten Implikationen bei Zellstress und Zelltod.

Außerdem könnte eine verminderte Cathepsinaktivität die Generierung von MHC Klasse II-Peptiden aufgrund der geringeren Effizienz endozytischer Proteasen begünstigen. Mit einer ähnlichen Argumentation wird auch die überlegene Rolle von DC unter den APC gegenüber Makrophagen begründet [Delamarre et al. 2005].

### 6.2.2 HCMV

Eine HCMV-Infektion *in vivo* bewirkt einen zellulären Immundefekt. Sowohl DC als auch andere professionelle APC wie etwa Monozyten sind Wirtszellen für HCMV. Von verschiedenen HCMV-kodierten Genprodukten wird vermutet, dass sie die MHC Klasse II-Funktionalität stören. Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer HCMV-Infektion auf die MHC Klasse II-assoziierte Antigenprozessierung in DC untersucht. Während DC bereits in der frühen Phase der Infektion nicht mehr in der Lage sind, neu synthetisierte MHC Klasse II-Komplexe bis zum finalen Stadium auszureifen (SDS-stabile Dimere), ändert und verzögert sich die generelle Synthese von MHC Klasse II-Molekülen nur geringfügig. Die Stabilität und Oberflächenexpression bleibt ebenfalls unbeeinflusst. Während des späten Infektionsstadiums führt dies zu einer deutlich reduzierten Synthese von MHC Klasse II-Molekülen und einer verminderten Oberflächenexpression (unveröffentlichte Resultate von Tobias Kessler). Folglich stört HCMV die MHC Klasse II-vermittelte Antigenpräsentation auf vielfältige Weise, was sich in den einzelnen Stadien der Infektion unterschiedlich äußert. Da HCMV die Reifung der MHC Klasse II-Moleküle und die Antigen-prozessierenden Enzyme gleichzeitig beeinträchtigt, sind mit großer Wahrscheinlichkeit verschiedene virale Proteine beteiligt.

Endozytische Proteasen wie z.B. Cat S werden in APC nicht nur zur Antigenprozessierung, sondern auch zur Reifung und zum Transport von MHC Klasse II-Molekülen und deren anschließender Funktionalisierung benötigt. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluss von HCMV auf das endozytische proteolytische System untersucht. Die erzielten Resultate zeigen, dass HCMV zu einem großen Teil bereits während des frühen Stadiums der Infektion die Aktivität endozytischer Proteasen beeinträchtigt und somit das proteolytische System manipuliert. In murinen DC reicht bereits eine geringfügige Änderung der Aktivität von Cat S aus, um den Transit vom unreifen Phänotyp zur reifen Form zu bewerkstelligen [Pierre et al. 1998]. HCMV beeinträchtigt in vergleichbarer Weise die phänotypische und funktionelle Maturation der MO-DC.

AEP gilt als die wichtigste endozytische Protease bei der Degradierung von Antigenen. HCMV reduziert aktives Cat S und AEP innerhalb der frühen Infektionsphase. Die deutlich erhöhte Stabilität des Peptides beim Verdau mit Lysaten von HCMV-infizierten DC stimmt mit der reduzierten Expression und Aktivität dieser Proteasen überein.

Aus der Sicht des Virus ist es obligat, die Prozessierung viraler Proteine im endozytischen Kompartiment zu unterbinden. Die Prozessierung würde schließlich zu einer Präsentation



viraler Antigene bereits während des frühen Stadiums der Infektion führen. Die verringerte Aktivität wichtiger endozytischer Proteasen resultiert mit großer Wahrscheinlichkeit in einer gestörten Prozessierung viraler Proteine im endozytischen Kompartiment und behindert möglicherweise auch die Beladung bereits vor der Infektion synthetisierter MHC Klasse II-Moleküle schon während der frühen Phase der Infektion. Dies könnte einen ersten Schritt der unmittelbaren viralen Intervention in das MHC Klasse II-System darstellen, bevor eher indirekte Mechanismen wie etwa die Änderung der Transkription greifen. Während des späteren Infektionsstadiums mündet der bereits während der frühen Phase der Infektion begründete Einfluss auf die Transkription MHC Klasse II-assoziiierter Gene in einer Verringerung MHC Klasse II-assoziiierter Proteine. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HCMV die MHC Klasse II-vermittelte Antigenpräsentation u.a. auf der Ebene der Expression MHC Klasse II-assoziiierter Proteasen in zeitabhängiger Weise beeinträchtigt.

### 6.2.3 *Yersinia enterocolitica*

Eine Infektion von DC mit *Yersinia enterocolitica* (YE) führt ähnlich wie bei HCMV zu einer reduzierten Oberflächenexpression von MHC Klasse II-Molekülen. Zusätzlich induziert YE aber auch Apoptose in DC. Diese Änderungen münden offensichtlich in eine eingeschränkte Fähigkeit zur Aktivierung von antigenspezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen [Orth et al. 1999]. Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer YE-Infektion auf die MHC Klasse II-assoziierte Antigenprozessierung untersucht. Bis dato gibt es keine Publikationen bezüglich Aktivitätsmodulationen von Cathepsinen aufgrund einer Infektion mit YE. Die vorliegenden Resultate zeigen, dass sich die Aktivität der wichtigsten MHC Klasse II-assoziierten Proteasen eine Stunde nach Infektion kaum verändert. Erst im weiteren Verlauf der Infektion war ein deutlicher Abfall der Aktivität aller untersuchten Cathepsine zu beobachten, ohne jedoch erkennbare Unterschiede bei einzelnen Proteasen zu ergeben. Zu diesem Zeitpunkt induzieren YE aber bereits Apoptose. Dies wird durch YopP verursacht, da ein YopP defizienter Zellstamm (pYV<sup>+</sup> YopP<sup>-</sup>) diesen Effekt nicht induziert [Erfurth et al. 2004]. Die Aktivität der Cathepsine in mit diesem Zellstamm infizierten DC unterscheidet sich eine Stunde nach Infektion von mit dem gesamten Virulenzplasmid infizierten DC. Alle untersuchten Cathepsine zeigen eine erhöhte Aktivität, welche sich aber drei Stunden nach Infektion auf das Niveau der bei Infektion mit dem gesamten Virulenzplasmid erhaltenen Werte absenkt. Folglich scheint die verringerte Aktivität der MHC Klasse II-assoziierten Proteasen keine Begleiterscheinung der Apoptose zu sein, sondern einen unabhängigen Vorgang darzustellen. Der deutliche zeitabhängige Abfall der

Cat S-Aktivität während der Infektion wirkt sich möglicherweise ebenfalls auf die Prozessierungsparameter und somit auf das Ligandenrepertoire der MHC Klasse II-Moleküle aus. In diesem Stadium der Infektion ist die verringerte Aktivität der endozytischen Proteasen nicht auf eine verminderte Expression zurückzuführen, was sich zumindest anhand der stabilen Expression von Cat S belegen lässt. Die allgemeine Drosselung der Aktivität endozytischer Proteasen bleibt wahrscheinlich nicht ohne Einfluss auf die Generierung von MHC Klasse II-Liganden.

### 6.3 Cat S als Schlüsselprotease bei der Prozessierung exogener Antigene

#### 6.3.1 Affinitätsverbindungen als Modell für die Aufnahme von Antigenen

Es existieren mehrere Ansätze, um die Prozessierung von Antigenen mittels eines Modells zu verfolgen. Eine Möglichkeit besteht darin, ein geeignetes Modellprotein an mehreren Stellen der Proteinsequenz mit einem Fluorophor oder mit Biotin zu markieren. Dies wird in der Regel über die Lysinseitenketten der Proteinsequenz vorgenommen. Das Protein wird von der Zelle aufgenommen und dann von Proteasen in viele Peptidbruchstücke zerkleinert. Diese Bruchstücke können dann mittels HPLC (Fluorophor) oder SDS-PAGE und Western Blot (Biotin) detektiert und gegebenenfalls sogar identifiziert werden. Mit dieser Methode erhält man vor allem Informationen über die Degradierungsschritte des Modellproteins. Dies erlaubt manchmal Rückschlüsse hinsichtlich der Beteiligung aktiver Proteasen.

Der zweite Ansatz geht *komplementär* vor. Es werden modifizierte Proteaseninhibitoren verwendet, welche ebenfalls mit Biotin oder geeigneten Fluorophoren ausgestattet sind. Diese Inhibitoren werden ebenfalls von der Zelle aufgenommen, sind aber aufgrund ihrer Größe und Struktur, die meist von einer normalen Peptidsequenz abweicht, eher proteasenresistent. Sie binden in das Zentrum aktiver Proteasen und erlauben dann nach Aufarbeitung der Zellen mit anschließender SDS-PAGE und Western Blot Aussagen über die Aktivität der gebundenen Proteasen bzw. die Sequenz und zeitliche Abfolge der Interaktion von Proteasen mit internalisiertem Material. Die Banden im Western Blot können mit Hilfe spezifischer Inhibitoren oder einer Sequenzierung eindeutig identifiziert werden. Bei diesem Ansatz werden nur aktive Enzyme detektiert und man erhält Informationen über die möglicherweise an der Prozessierung beteiligten Proteasen. Die Affinitätsverbindungen können so gewählt werden, dass ihre Anwendung entweder Aussagen über die Aktivität einer ganzen Proteasenfamilie erlaubt, wie z.B. über die Cathepsine aus der Gruppe der Cysteinproteasen, oder aber spezifisch Informationen von einer Protease liefert.

Die Verwendung des *pulse chase*-Formates sollte die Darstellung des Aufeinandertreffens von internalisierten Molekülen und verschiedenen Proteasen in einem zeitlichen Ablauf ermöglichen. Während des Pulses bei 37°C wird intakten DC die Affinitätsverbindung DCG-0N kontinuierlich im Nährmedium angeboten. Die Affinitätsverbindung wird, ähnlich einem über Endozytose internalisierten Antigen in einem Vesikel eingeschnürt und in die Zelle aufgenommen, wo dieser Vesikel dann mit dem endolysosomalen Kompartiment fusioniert. Proteasen gelangen ebenfalls in das endolysosomale Kompartiment und werden durch sukzessive Ansäuerung oder mit Hilfe anderer Proteasen aktiviert. Die Affinitäts-

verbindungen gelangen nun in das aktive Zentrum der Proteasen und gehen dort eine kovalente, irreversible Bindung ein. Über das Detektionssystem Biotin-Streptavidin können diese Proteasen sichtbar gemacht werden. Es werden so ausschließlich aktive Proteasen dargestellt.

### 6.3.2 In humanen DC gelangt exogenes Material selektiv zu aktivem Cat S

Die beiden modellhaften Vorstellungen über die intrazellulären Vorgänge bei der MHC Klasse II-assoziierten Antigenprozessierung, *epitope-guided processing* und *protease-dependent processing*, messen den initialen Schritten bei der proteolytischen Degradierung hohe Relevanz bei [Trombetta & Mellman 2005]. Eine wichtige Anforderung beim Modell des *protease-dependent processing* ist die sequentielle Exposition exogener Antigene gegenüber individuellen dominanten Proteasen. Nicht nur die jeweilige Protease und deren Substratspezifität entscheiden über die Generierung von MHC Klasse II-Epitopen, sondern im Besonderen die chronologische Abfolge, in welcher exogene Antigene individuellen dominanten Proteasen ausgesetzt werden. Zumindest für einige Antigene ist die entscheidende Rolle der initialen proteolytischen Attacke, die von einer so genannten Schlüsselprotease durchgeführt wird, auf die Antigenprozessierung, die Stimulation von T-Zellen *in vitro* und die resultierende Immunantwort *in vivo* belegt [Manoury et al. 1998, Beck et al. 2001, Manoury et al. 2002]. Tatsächlich haben Fraktionierungsstudien eine differenzielle Verteilung aktiver endolysosomaler Proteasen im endozytischen Kompartiment humaner DC erkennen lassen [Lautwein et al. 2002]. Dies lässt sich aber keinesfalls mit Sicherheit in ein sequentielles Muster übersetzen, nach dem aktive Proteasen in intakten humanen DC auf exogenes Material nach dessen Internalisierung treffen.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Interaktion von internalisiertem Material mit dem MHC Klasse II-assoziierten proteolytischen System in humanen MO-DC zu charakterisieren. Ebenso sollten mögliche Strategien zur Modifizierung oder Verbesserung des Transportes von extrazellulärem Material zu dem entsprechenden Protease-haltigen Kompartiment beleuchtet werden. Dies sollte nicht nur die Kenntnisse in Bezug auf die Biologie in DC und der Biochemie der Antigenprozessierung erweitern, sondern auch als Basis einer systematischen Manipulation der Antigenpräsentation verwendet werden. Dadurch könnten z.B. in Modellpeptiden Schnittstellen für individuelle Proteasen eingeführt werden, welche die Freisetzung eines gewünschten Epitopes oder aber im umgekehrten Fall eines MHC Klasse II-blockierenden Kompetitors ermöglichen. Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass humane DC effizient eine dem Kulturmedium zugegebene Peptid-ähnliche

Affinitätsverbindung internalisieren. Unter diesen Bedingungen wird das Molekül selektiv zu aktivem Cat S transportiert, während andere prominente Proteasen wie Cat B, Cat L oder Cat Z wenn überhaupt, dann nur in äußerst geringem Maße erreicht werden. Außerdem ist der an diesem Transport beteiligte Mechanismus von der Aktivität der vakuolären  $H^+$ -ATPase abhängig. Wurde das Kulturmedium humaner DC mit der Affinitätsverbindung versetzt, konnte der selektive Transport von exogenem Material zu aktivem Cat S bereits nach einer Minute beobachtet werden. Dieser selektive Transport nahm in den nächsten 20 bis 30 Minuten nach der Internalisierung noch deutlich zu, sofern eine ausreichende Konzentration der Affinitätsverbindung im Medium vorlag. Dies impliziert einerseits, dass Cat S die vorherrschende aktive Protease im frühen endozytischen Kompartiment in humanen DC darstellt. Zugleich deutet es darauf hin, dass Endosomen in humanen MO-DC während ihrer Reifung selektiv mit aktivem Cat S angereichert werden. Die Cat S-vermittelte Generierung von CLIP, dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Formation des MHC Klasse II:Antigen-Komplexes, ist im Beladungskompartiment lokalisiert, welches im späten endosomalen bis prälysosomalen Reifungsstadium vermutet wird [Driessen et al. 1999]. Daher ist es nahe liegend zu spekulieren, dass es sich bei dem mit Cat S angereicherten Zustand, welchen Endosomen bei ihrer Reifung nach 20 bis 30 Minuten erreichen, um dieses spezialisierte MHC Klasse II-Beladungskompartiment handelt.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cat S die vorherrschende Papain-ähnliche Cysteinprotease für die initiale Prozessierung darstellt, wenn exogenes Material mittels Endozytose in humane MO-DC internalisiert wird. Sie stimmen ferner mit der einzigartigen Stabilität und Aktivität von Cat S überein, die im Säuren beginnt und bis über den neutralen pH-Bereich hinausreicht [Chapman et al. 1997]. Folglich verläuft entweder der intrazelluläre Transport von Cat S und von Cat B unterschiedlich, oder lokale Bedingungen im frühen endozytischen Kompartiment, wie etwa der pH-Wert, begünstigen aktives Cat S gegenüber Cat B, während die Verteilung beider Proteasen gleich bleibt. Fraktionierungsstudien des endozytischen Kompartiments ergaben vergleichbar niedrige Mengen beider Proteasen im frühen endozytischen Kompartiment humaner DC [Lautwein et al. 2002]. Dies würde eher die zweite Annahme stützen. Formal kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass andere Proteasen, wie etwa AEP, Cat D oder Cat E, welche nicht mit Papain verwandt sind, exogene Moleküle in einem vergleichbaren Zeitfenster erreichen. Sie können mit der verwendeten Affinitätsverbindung aber nicht detektiert werden. Im Gegensatz zu Cat S konnte bis heute keine dieser Proteasen als Zymogen oder in aktiver Form im frühen

endosomalen Kompartiment nachgewiesen werden. Dies stimmt auch mit ihren im sauren Milieu liegenden pH-Optima überein.

Ein Kennzeichen von DC ist ihre Fähigkeit, intakte Antigene für einen längeren Zeitraum intrazellulär zu speichern, ohne diese bedeutsam proteolytisch zu degradieren (immunologisches Gedächtnis). In Monozyten dagegen erfolgt die Degradierung direkt nach der Aufnahme in die Zelle [Trombetta et al. 2003, Delamarre et al. 2005]. Diese Erkenntnisse implizieren eine geringe proteolytische Aktivität gegenüber exogenem Material in DC. Die vorliegenden Resultate belegen, dass internalisiertes Material selektiv zu Cat S transportiert wird, während Cat B, H, L oder Z nur geringfügig von der Affinitätsverbindung detektiert werden. Dies ändert sich auch zwei Stunden nach der Internalisierung nur unwesentlich. Eine derartig selektive Anwesenheit nur einer individuellen aktiven Protease könnte aufgrund der Substratspezifität von Cat S in eine stark limitierte Zahl proteolytischer Vorgänge münden. Das Resultat wäre ein verlängertes Überleben internalisierter Antigene und somit die zellbiologische Basis für das immunologische Gedächtnis in DC.

In einer früheren Arbeit wurde die Methode der Affinitätsmarkierung bereits als Modell für die Charakterisierung des Transportes von exogenem Material in intakten APC im Mausmodell eingesetzt. Dort wurde die proteolytische Aktivität in Phagosomen von murinen BM-APC charakterisiert. Dazu wurde die fast identische Affinitätsverbindung DCG-04 an Latexpartikel immobilisiert und über Phagozytose von den Zellen aufgenommen [Lennon-Duménil et al. 2002]. Neben aktivem Cat S wurden auch Cat B, L und Z während der phagosomalen Reifung mit Hilfe von DCG-04 in signifikanter Menge detektiert. Wurden murine BM-DC in CD11<sup>+</sup>- (DC) und CD11<sup>-</sup>-Zellen (hauptsächlich Makrophagen) aufgetrennt, so war der selektive Transport in ein mit Cat S-angereichertes Kompartiment im Vergleich mit der Verteilung aktiver Proteasen in den Zelllysaten nur in der Makrophagen-Population zu beobachten. Bei der Reifung der Phagosomen in murinen BM-CD11<sup>+</sup>-DC scheint folglich Cat S im Gegensatz zum endozytischen Kompartiment humaner MO-DC kaum eine bevorzugte Rolle zu spielen. Außerdem unterschieden sich MO-DC deutlich in ihrer Phagozytose-Effizienz von murinen BM-DC. Dies ergab ein Experiment, bei dem beiden Zellpopulationen die an Latexpartikel immobilisierte Affinitätsverbindung DCG-0N angeboten wurde. Die Analyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie zeigte, dass humane MO-DC nur etwa 10% der Partikel aufnehmen, welche von murinen BM-DC internalisiert werden. Beim Vergleich der Flüssigphasen-vermittelten Endozytose (Pinozytose) waren jedoch kaum Unterschiede zu beobachten. Folglich scheint bei humanen MO-DC zumindest *in vitro* die Pinozytose eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von exogenem Material zu spielen. Bis

heute ist *in vivo* noch nicht geklärt, ob der Phagozytose oder der Pinozytose bei der Aufnahme von Antigenen in humanen DC eine größere Bedeutung zukommt [Trombetta & Mellman 2005]. Es konnte aber gezeigt werden, dass mittels Pinozytose aufgenommene Antigene in effizienter Weise T-Zellen stimulieren [Delamarre et al. 2005, Zhong et al. 1997]. Außerdem zeigen die vorliegenden Resultate, dass durch die Immobilisierung von DCG-0N an Latexpartikel die Affinität gegenüber einzelnen Proteasen verändert wird. Während in endozytischen Fraktionen primärer Monozyten aktives Cat S in Relation zu nicht gebundenem DCG-0N nun verstärkt detektiert wurde, waren Cat Z und Cat H kaum noch darstellbar. Diese Beobachtung ergab sich in abgeschwächter Form auch bei der Verwendung deutlich kleinerer Magnetpartikel. Folglich kann die Immobilisierung von DCG-0N an größere Partikel Artefakte induzieren, wenn eine proteolytische Umgebung mit dieser Methode analysiert wird. Um diese Methode trotzdem zur Analyse der Phagozytose verwenden zu können, muss der Einsatz von sehr viel kleineren Partikeln getestet werden. Möglich erscheint auch die Option, neue Affinitätsverbindungen zu synthetisieren, bei denen zwischen dem reaktiven Element und der Detektionsdeterminante ein deutlich größerer Abstand besteht. So könnte garantiert werden, dass die Affinitätsverbindung ungehindert in das aktive Zentrum der Protease gelangt und daher eine repräsentative proteolytische Analyse ermöglicht.

### 6.3.3 DC Reifung führt zur Umstrukturierung des endozytischen Kompartiments

Die Proteolyse im endozytischen Kompartiment von DC wird hauptsächlich durch dessen Reifungsstadium und die Aktivität der vakuolären  $H^+$ -ATPase reguliert. Während in ruhenden oder unreifen DC eine geringe Aktivität der  $H^+$ -ATPase und folglich ein etwas höherer endosomaler pH-Wert gefunden werden, führt eine LPS-vermittelte Reifung von DC zu einer Absenkung des pH-Wertes und einer effizienteren Proteolyse [Trombetta et al. 2003]. Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass eine durch den Inhibitor Con B hervorgerufene Veränderung der Aktivität der  $H^+$ -ATPase oder eine LPS-vermittelte Aktivierung in der Tat die Interaktion internalisierter Moleküle mit aktiven Cathepsinen verändern. Die Inhibition der  $H^+$ -ATPase stoppte den Transport zu aktivem Cat S. Dass es sich dabei um eine selektive Blockierung der  $H^+$ -ATPase und nicht um eine Inaktivierung der Protease an sich handelte, konnte durch die Inkubation von Zelllysaten belegt werden, die aus mit Con B behandelten DC generiert wurden. Die Notwendigkeit der Ansäuerung endozytischer Vesikel zur Autokatalyse der eingeschlossenen Proteasen konnte mittels der schwachen Basen Chloroquin und  $NH_4Cl$  bestätigt werden: Beide Basen banden die mit Hilfe der vakuolären  $H^+$ -ATPase in

die Vesikel gelangten Protonen. So blieben eine Autokatalyse und damit die Aktivierung der Proteasen aus. Nach der Stimulation von DC mit LPS war eine leicht erhöhte Menge an aktivem Cat S zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach der Internalisierung der Affinitätsverbindung im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen zu beobachten. Dies deckt sich mit der belegten Modellvorstellung, nach der LPS eine Absenkung des endozytischen pH-Wertes induziert, wodurch wahrscheinlich die Aktivierung von Cat S mittels Autokatalyse bereits im frühen endozytischen Kompartiment ausgelöst wird. Auch die Umverteilung von aktivem Cat S in ein früheres Kompartiment durch die LPS-vermittelte Reifung von DC ist mit diesem Modell kompatibel [Lautwein et al. 2002].

Die intrazelluläre Reifung, Aktivierung und Degradierung von neu synthetisiertem Cat S, einer Schlüsselpotease bei der Antigenprozessierung in humanen DC, wurden bis dato noch nicht untersucht. Eine mit radioaktiv markierten Aminosäuren durchgeführte *pulse chase*-Analyse mit anschließender Immunopräzipitation belegt, dass Cat S im endozytischen Kompartiment LPS-stimulierter DC ungefähr eine Stunde nach Erreichen des endozytischen Traktes degradiert wird. In nicht stimulierten DC dagegen bleibt Cat S auch nach einer weiteren Stunde intakt. Die Biosynthese und die Konversion von pro-Cat S in seine reife Form werden indessen durch die Reifung von DC nicht beeinflusst. Folglich wird das Cat S-Niveau während der Reifung von DC kontrolliert, indem dessen Degradierung eingeleitet wird. Dieser Vorgang kann als zellulärer Sicherheitsmechanismus interpretiert werden, wodurch eine übermäßige durch Cat S verursachte Proteolyse verhindert wird: Eine Stunde nach der Biosynthese von Cat S wird es in seine reife Form umgewandelt, wahrscheinlich kurz nachdem pro-Cat S das endozytische Kompartiment erreicht hat. Die vorliegenden Resultate belegen, dass der Transport von aktivem Cat S zu neu internalisiertem Antigen größtenteils während den ersten 30 Minuten nach der Internalisierung stattfindet. Diese Beobachtung stimmt auch mit der Lokalisierung dieses Vorganges in frühen bis späten Endosomen überein. Ferner ist die Generierung von CLIP auf ein ähnliches Kompartiment beschränkt. Folglich ist die funktionelle Bedeutung von Cat S für die Antigenprozessierung in humanen DC wahrscheinlich auf das frühe bis späte endosomale Stadium beschränkt. Zwei Stunden nach der Synthese von Cat S erfolgt die Reifung vom Endosom zum Lysosom, wo sich Cat S dann in einer lysosomalen Umgebung befindet und nur noch wenig spezifische Cat S-Aktivität erforderlich ist, während wahrscheinlich destruktive Prozessierung vorherrscht. Vermutlich wird Cat S dann in diesem Pool an verschiedenen aktiven Proteasen, welcher aufgrund der Maturations-induzierten pH-Absenkung resultiert, degradiert und sein (selbst)zerstörerisches Potential limitiert.



#### 6.3.4 Konjugation an Träger verbessert Transport ins endozytische Kompartiment

Aktives Cat S ermöglicht die Reifung von Ii und letztlich den Peptidaustausch im MHC Klasse II-Kompartiment. Deshalb könnte ein verbesserter Transport exogenen Materials zu einem mit aktivem Cat S-angereicherten Kompartiment in humanen DC eine Strategie zur Verbesserung von Vakzinierungs-Protokollen darstellen. Die Resultate der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass der Transport von Peptid-ähnlichen synthetischen Komponenten zu aktivem Cat S in intakten humanen DC durch die Kopplung an zellpenetrierende Peptide (CPP) oder an ein größeres Protein wie z.B. Streptavidin erheblich verbessert werden kann. Die durch das CPP verbesserte endozytische Aufnahme ist von beiden Methoden der deutlich effizientere Weg der Internalisierung. Der selektive Transport zu einem Cat S-enthaltenden Kompartiment bleibt erhalten, wenn die Aufnahme mittels Makropinozytose durch die Kopplung der Affinitätsverbindung an ein größeres Protein wie z.B. Streptavidin erleichtert wird. Bei der Verwendung des CPP geht diese Selektivität fast vollständig verloren. Alle endozytischen Cysteinproteasen werden nun in einer weniger selektiven Weise erreicht. Unwahrscheinlich scheint jedoch, dass dieser verbesserte Transport des Konstruktes (PS457) zu endozytischen Proteasen nur aufgrund spontaner Permeabilisierung endozytischer Vesikel erfolgt. Die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden DC 30 Minuten nach der Aufnahme eines ähnlichen fluorogenen zellpenetrierenden Peptides zeigte eine selektive Färbung peripherer vesikulärer Kompartimente, jedoch keine unselektive Färbung des Zytosols. Die Internalisierung typischer Flüssigphasen-Marker, wie z.B. Dextran oder HRP wird zum Teil auch durch die Bindung an den Mannose-Rezeptor vermittelt [Garrett et al. 2000, Sallusto et al. 1995]. Deswegen kann man spekulieren, dass die verbesserte Aufnahme des DCG-0N:Streptavidin-Komplexes vielleicht ebenfalls von diesem zusätzlichen Mechanismus profitiert.

Trotz der breiten Akzeptanz bei der Verwendung als molekulare Transportvehikel ist der Mechanismus der Internalisierung von CPP noch nicht ausreichend verstanden. Bis heute wird diskutiert, ob die Aufnahme aufgrund spontaner Permeabilisierung der Zellmembran oder durch eine aktive Endozytose-vermittelte Internalisierung erfolgt [Fischer et al. 2004]. Da PS457 auch bei 4°C aktive Cathepsine in intakten DC erreichte, während das bei Verwendung des nicht zellpenetrierenden DCG-0N keineswegs der Fall war, kann argumentiert werden, dass CPP zumindest zu einem begrenzten Ausmaß unabhängig von energieabhängigen Mechanismen wie etwa Endozytose in die Zelle gelangen. Jedoch spielt auch die Endozytose beim Transport von PS457 zu Cathepsin-enthaltenden Kompartimenten eine wichtige Rolle. Die Aufnahme von PS457 war bei 4°C gegenüber 37°C verringert und

auch durch die LPS-vermittelte Drosselung der Pinozytose erreichte weniger PS457 aktive Cathepsine. Daher sind in humanen DC wahrscheinlich beide Mechanismen (Endozytose und spontane Permeabilisierung) bei der Überwindung der Zellmembran beteiligt.

Für Vakzinierungs-Strategien könnte es durchaus hilfreich sein, die absolute Menge antigenen Peptides, welche zu Cat S-enthaltenden Kompartimenten transportiert wird, zu erhöhen, ungeachtet dessen, ob andere Kompartimente ebenfalls erreicht werden. In diesem Sinne würde die Verlängerung eines gegebenen immunogenen Peptides um ein Nonaarginin-Derivat, evtl. zusätzlich versehen mit einer Cat S-sensitiven Schnittstelle, vielleicht den Transport und folglich auch die Beladung von MHC Klasse II-Molekülen in humanen DC mit diesem extrazellulären Peptid verbessern. Sogar in LPS-stimulierten Zellen, die zwar höchst immunogen sind, aber nur noch bescheidene Endozytose betreiben, könnten so antigene Peptide zu relevanten Prozessierungskompartimenten gelangen. In der Tat zeigte in einem *in vivo* Modell der Peptid-basierten Tumor-Immuntherapie das immunogene Peptid ausschließlich nach der Konjugation an ein CPP Wirkung, während das gleiche Peptid ohne Konjugat ergebnislos war. Die Vakzinierung mit dem Konstrukt resultierte in einem Erfolg der Behandlung und einer CD4-T-Zell-abhängigen Regression des Tumors infolge anhaltender Antigenpräsentation [Wang et al. 2002].

Die Kombination zwischen dem Einsatz von CPP und der Kenntnis der Proteasen, welche mittels dieser Werkzeuge erreichbar sind, könnte es letztlich ermöglichen, Antigene so nach Maß zu fertigen, dass sie sogar in reifen DC in optimaler Weise in prozessierungsrelevante, MHC Klasse II-enthaltende Kompartimente gelangen. Dort könnte das immunogene Peptidgerüst anschließend selektiv von den vorherrschenden Proteasen freigesetzt und folglich eine effektivere Präsentation erreicht werden.

### 6.3.5 Die Relevanz einzelner Endozytosewege in DC

Die Relevanz einzelner Endozytosewege wurde in DC noch unzureichend untersucht. Die Mehrheit der bis heute veröffentlichten Studien hat es nicht geschafft, zwischen den einzelnen Aufnahmemechanismen zu unterscheiden [Norbury 2006], was zum einen an der unzureichenden Selektivität der verwendeten Inhibitoren aber auch an der möglichen gegenseitigen Beeinflussung der verschiedenen Formen der Endozytose liegen mag. Auch über die Regulation der unterschiedlichen Internalisierungsmechanismen während der Reifung von DC herrscht ein Mangel an Informationen. Werden DC einem Maturationsstimulus ausgesetzt, kommt es für kurze Zeit zu einer gesteigerten Endozytose. Anschließend erfolgt jedoch eine allgemeine Drosselung aller Aufnahmemechanismen, wobei möglicherweise nicht alle

Formen der Endozytose in gleicher Form betroffen sind [West et al. 2004]. Die Reifung von DC führt zu einer Drosselung der Makropinozytose, der Clathrin-vermittelte Mechanismus scheint dagegen nur geringfügig beeinflusst zu werden [Garrett et al. 2000].

Es wurde bereits diskutiert, dass der Phagozytose bei humanen DC im Vergleich zu murinen DC eine deutlich geringere Rolle unter den verschiedenen Aufnahmemechanismen zukommt. Die weitere Untersuchung der unspezifischen Antigenaufnahme durch den Versuch der Inhibition einzelner Endozytoseformen ergab ohne Zweifel, dass deren Inhibition zu einer verminderten Internalisierung und somit zu einem verringerten Transport zu einem Cat S-enthaltenden Kompartiment führte. Die parallele Kontrolle der Zelllysate belegte, dass die verwendeten Inhibitoren keinen Einfluss auf die Aktivität der detektierten Cysteinproteasen ausübten. Publikationen belegen, dass der größte Teil löslicher Antigene über Makropinozytose aufgenommen wird [Garrett et al. 2000, Sallusto et al. 1995]. Diese Beobachtungen ließen sich durch die Blockierung der Makropinozytose bestätigen. Der Versuch der Inhibition jeglicher Pinozytose durch die Anwendung von EIPA, CPZ und M $\beta$ CD konnte den Transport der verwendeten Affinitätsverbindung zu aktivem Cat S zwar deutlich verringern, aber nicht vollständig blockieren. Für die restliche, nicht blockierte Aufnahme könnte der Mechanismus der Phagozytose verantwortlich sein. Wahrscheinlich verfügen DC über eine zusätzliche Form der Endozytose (Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose), die mit der Caveolin-vermittelten Endozytose verwandt ist [Trombetta & Mellman 2005]. Folglich könnte an der Restaktivität auch dieser Mechanismus beteiligt sein. Leider ist über ihn sehr wenig bekannt und es existieren noch keine Inhibitoren, die eine weitere Forschung erleichtern könnten [Fotin-Mleczek et al. 2005].

#### 6.3.6 Primäre Monozyten lassen eine ähnlich wichtige Rolle für Cat S vermuten

MO-DC dienen als Modell zur Aufklärung der Funktion von DC. Im Gegensatz zu primären DC (BDCA-2 DC und CD1c-DC) können sie in ausreichender Menge generiert werden, um z.B. Studien über die Prozessierung von Antigenen oder von Ii zu ermöglichen. Aktuelle Publikationen diskutieren jedoch, ob die Verteilung und Aktivität der MHC Klasse II-assoziierten Proteasen in MO-DC eher Makrophagen als anderen DC-Populationen ähneln [Trombetta & Mellman 2005]. Der Vergleich von humanen MO-DC mit CD1c-DC ergab eine erhöhte Aktivität der wichtigsten Cysteinproteasen in MO-DC. Auch gegenüber primären Monozyten (CD14<sup>+</sup>) war diese Aktivität erhöht [Burster et al. 2005]. Die Aktivitätsmessungen erfolgten allerdings in Zelllysaten und erlauben nur eine Schätzung über tatsächliche Vorgänge im endozytischen Kompartiment intakter Zellen.

Im Rahmen der hier durchgeführten Versuche mit intakten primären humanen Monozyten zeigt sich, dass Monozyten ebenfalls effizient eine dem Kulturmedium zugegebene Peptid-ähnliche Affinitätsverbindung internalisieren. Unter diesen Bedingungen wurde das Molekül selektiv zu aktivem Cat S transportiert, während andere prominente Proteasen wie Cat B, Cat L oder Cat Z, wenn überhaupt, dann in äußerst geringem Maße erreicht wurden. Dieser selektive Transport nahm in den nächsten 20 bis 30 Minuten nach der Internalisierung noch deutlich zu. Folglich scheint das endozytische Kompartiment primärer humaner Monozyten einer ähnlichen Funktionalität zu gehorchen. Im Gegensatz zu MO-DC erfolgt wahrscheinlich nach der Stimulation mit LPS jedoch keine Umverteilung von Cat S in ein früheres endozytisches Kompartiment. Mehr noch als bei DC scheint die LPS-induzierte Ausreifung bei primären Monozyten zu einer Drosselung der Aufnahme von exogenem Material zu führen. Ob diese Drosselung ebenfalls wie bei DC mit einer früheren Aktivierung endozytischer Proteasen und deren Umverteilung in ein früheres Kompartiment einhergeht, ist aufgrund fehlender Detektion von aktiven Cathepsinen zu frühen Zeitpunkten zu bezweifeln. Inwiefern sich die Biosynthese von Cat S oder anderen Cathepsinen bei der Aktivierung von primären Monozyten ändert, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Die gewonnenen Daten belegen, dass Cat S nicht nur die vorherrschende aktive Protease im frühen endozytischen Kompartiment in humanen DC, sondern auch in Monozyten darzustellen scheint.

#### 6.4 Inhibition von Cat S bei Autoimmunerkrankungen

Um einen möglichen Einsatz von Cathepsininhibitoren zur selektiven Manipulation der MHC Klasse II-vermittelten Immunfunktion bei Autoimmunerkrankungen einzuschätzen, wurden Pilotexperimente mit Applikationen des Cat S-selektiven Inhibitors LHVS in einem Mausmodell der Multiplen Sklerose *in vivo* durchgeführt. Diese Experimente mit intraperitonealer Applikation von LHVS zeigten, dass LHVS auch *in vivo* selektiv die Aktivität von Cat S nicht nur in Leber und Milz, sondern auch innerhalb des ZNS für etwa 18 Stunden eliminiert. Zum Erreichen des Effektes wurde jedoch ein Vielfaches der theoretisch berechneten Dosis benötigt, deshalb müssen Löslichkeit/Lösungsmittel der lipophilen Substanz und/oder Stabilität in Lösung noch optimiert werden. Die Gabe in Mineralöl erwies sich in dem gewählten Volumen (500 µl) als relativ toxisch, was bei nur mit Mineralöl behandelten Kontrolltieren beobachtet werden konnte. Eine klinisch fassbar eigene Toxizität von LHVS konnte bis jetzt noch nicht festgestellt werden. Eine erste Versuchsreihe mit einer Gruppe von je sechs Mäusen, die mit MOG-Peptid+Adjuvans immunisiert wurden, zeigte, dass die unbehandelten Mäuse an EAE erkrankten, während die LHVS-behandelten Tiere einen deutlich schwächeren Krankheitsverlauf erlitten. Der protektive Effekt hielt auch 6 Wochen nach Aussetzung der LHVS-Applikation an. Diese Ergebnisse implizieren erstmals Cat S-Inhibitoren als molekular basierte Therapieoption bei Multipler Sklerose. Möglicherweise verspricht die Synthese wasserlöslicher Derivate größere Aussicht auf eine erfolgreiche Anwendung von LHVS. Inzwischen werden verschiedene Cat S-Inhibitoren synthetisiert [Thurmond et al. 2005] und sicherlich in naher Zukunft auf ihre Eignung für den Einsatz *in vivo* untersucht.

Der prophylaktische Effekt von LHVS muss nun systematisch auf molekularer Ebene analysiert und gegebenenfalls optimiert werden. Weiterhin muss geprüft werden, ob die Applikation von LHVS auch bei einer therapeutischen Behandlung erfolgreich ist und ob diese Beobachtungen auf andere MHC Klasse II-assoziierte Autoimmunerkrankungen (z.B. Rheumatoide Arthritis) ausgedehnt werden können. Es muss untersucht werden, ob die systemische Gabe von LHVS oder anderen spezifischen Cat S-Inhibitoren zu Änderungen in der klinischen Krankheitsaktivität führt. Eine Akkumulation von Ii p10 als Zeichen der funktionellen Inhibition der Ii-Prozessierung *in vivo* oder eine Änderung der Frequenz Autoantigen-spezifischer T-Zellen (EAE) müsste zu beobachten sein.

Auch die in dieser Arbeit vorgelegte umfassendere Analyse der Funktion endozytischer Proteasen im humanen MHC Klasse II-System stützt neben älteren Arbeiten [Lautwein et al. 2002]

die Annahme, dass dieses für die MHC Klasse II-Funktion essentielle proteolytische System in seinen wesentlichen Funktionen nur eine limitierte Redundanz besitzt, was die pharmakologische Inhibition einzelner Proteasenaktivitäten mit dem Ziel der Manipulation der MHC Klasse II-vermittelten Immunantwort bei humanen Autoimmunerkrankungen als realistisches Ziel der Zukunft erscheinen lässt. Die Entwicklung entsprechender nicht kovalent bindender Proteaseninhibitoren gegen Cat S oder andere Schlüsselproteasen und deren umfassende Testung im Tiermodell bzw. in klinischen Studien erscheint in den nächsten Jahren wünschenswert.



## 7 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Affinitätsverbindungen zur Detektion und Inhibition aktiver Proteasen zu synthetisieren, um diese Werkzeuge zur Beantwortung zellbiologisch-immunologischer Fragestellungen im Bereich der MHC Klasse II-assoziierten Antigenprozessierung einzusetzen. Das biotinylierte E-64-Analogon DCG-0N wurde synthetisiert, und sein Einsatz zur Darstellung, Isolierung und Identifizierung von Cysteinproteasen nach Markierung in Zelllysaten und endozytischen Zellfraktionen mit anschließender Auftrennung mittels 1D und 2D-SDS-Page charakterisiert und etabliert. Analog ermöglichte die Verwendung des AEBSF-Analogons BAEBF die Darstellung aktiver Serinproteasen in Zelllinien und primären APC.

Dendritische Zellen (DC) stellen die funktionell entscheidende Zellpopulation zur Initiierung einer MHC Klasse II-vermittelten zellulären Immunantwort dar. Mit den synthetisierten Affinitätsverbindungen konnte hier erstmals gezeigt werden, dass sowohl bakterielle als auch virale Infektionen (*Yersinia enterocolitica* und HCMV) das Aktivitätsmuster MHC Klasse II-assoziiierter Proteasen in humanen DC sowie die Prozessierung von Modellantigenen *in vitro* verändern. Insbesondere die HCMV-Infektion bewirkt dabei eine deutliche Reduktion der Aktivität der beiden Schlüsselproteasen des MHC Klasse II-Systems, Cat S und AEP, was die Effizienz der Antigenprozessierung vermindert und damit zu dem durch eine HCMV-Infektion hervorgerufenen Defekt der zellulären Immunität *in vivo* beitragen könnte. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Autophagie die Expression, Aktivität und Funktion endozytischer Proteasen in APC moduliert.

Um die Prozessierung von Antigenen oder Autoantigenen in DC verstehen, modulieren, oder gar vorhersagen zu können, muss die Sequenz bekannt sein, in der exogene Antigene nach der Internalisierung durch DC mit den verschiedenen Proteasen der Antigenprozessierung interagieren. In einem wesentlichen Teil dieser Arbeit wird daher erstmals die Interaktion von internalisiertem Material mit dem MHC Klasse II-assoziierten proteolytischen System in intakten humanen DC charakterisiert. Dazu wurden DC mit löslichen Affinitätsverbindungen inkubiert, welche dann mittels verschiedener Endozytosewege aufgenommen werden und an aktive Proteasen binden. Es zeigte sich, dass so internalisiertes Material selektiv und nahezu ausschließlich mit aktivem Cat S interagiert, was die Modellvorstellung unterstützt, dass Cat S die vorherrschende Papain-ähnliche Cysteinprotease für die initiale Prozessierung von exogenem Antigen in humanen DC darstellt. In LPS-aktivierten DC wurde dabei aktives Cat S von internalisiertem Material eher erreicht als in ruhenden DC, wahrscheinlich aufgrund einer vermehrten Aktivierung von Cat S schon in frühen Endosomen wegen des durch die



---

LPS-Aktivierung hervorgerufenen pH-Abfalls im endozytischen Kompartiment von DC. Interessanterweise aktivieren LPS-stimulierte DC jedoch gleichzeitig einen gegenläufigen Regulationsmechanismus, indem sie neu synthetisiertes Cat S im endozytischen Kompartiment innerhalb kurzer Zeit vollständig degradieren, wie hier erstmals gezeigt wird.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit demonstrieren ferner, dass der Transport von Peptid-ähnlichen Substanzen zu aktivem Cat S in intakten humanen DC durch Kopplung an ein größeres Protein oder an zellpenetrierende Peptide (CPP) erheblich verbessert werden kann. Dabei bleibt der selektive Transport zu einem Cat S-enthaltenden Kompartiment erhalten, wenn die Aufnahme mittels Makropinozytose durch die Kopplung der Affinitätsverbindung an ein größeres Protein erleichtert wurde. Durch Kopplung eines CPP an DCG-0N (PS457) wurden dagegen alle endozytischen Cysteinproteasen in unselektiver Weise erreicht, dies jedoch mit erheblich höherer Effizienz. Der bis heute diskutierte Mechanismus der Internalisierung von CPP konnte durch die Verwendung von PS457 ebenfalls beleuchtet werden. Sie erfolgt sowohl energieabhängig mittels Endozytose als auch energieunabhängig und führt zunächst zu einer Anreicherung im endozytischen Kompartiment und nicht, wie meist angenommen, zu einem unselektiven energieunabhängigen Transit der Zellmembran mit Anreicherung im Zytosol. Der hocheffiziente Transport von CPP in ein Cat S-enthaltendes Kompartiment von DC könnte genutzt werden, um durch die Kopplung antigener Peptide an CPP die Effizienz der Peptidbeladung von MHC Klasse II bei Vakzinierungs-Strategien zu verbessern.

Da neben früheren Arbeiten auch die hier gewonnenen Ergebnisse eine zentrale Rolle von Cat S für die MHC Klasse II-assoziierte Antigenprozessierung implizierten, wurde der Cat S-selektive Inhibitor LHVS synthetisiert und sein Einsatz zur Manipulation MHC Klasse II-assoziiierter Autoimmunerkrankungen im Mausmodell der Multiplen Sklerose *in vivo* getestet. In diesem Pilotexperiment ließ sich der Ausbruch der Erkrankung tatsächlich durch den systemischen Einsatz des Cat S-Inhibitors günstig beeinflussen.

Zusammenfassend wurden Affinitätsverbindungen zur Detektion von Proteasenaktivität synthetisiert und zur Analyse MHC Klasse II-assoziiierter Proteasen in APC eingesetzt. Dabei konnte nicht nur erstmals direkt die Modulation des proteolytischen Systems in APC durch HCMV und Yersinien demonstriert, sondern auch ein selektiver Transport von exogenem Antigen zu Cat S in humanen DC identifiziert, charakterisiert und moduliert werden. Dies impliziert u.a. Cat S als ein Schlüsselenzym der Prozessierung von Autoantigenen bei MHC Klasse II-assoziierten Autoimmunerkrankungen, und der hier erstmals gezeigte günstige Effekt einer Cat S-Inhibition auf den klinischen Verlauf der Multiplen Sklerose im Mausmodell sollte weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet stimulieren.



## 8 Literaturverzeichnis

- Abuelyaman,A.S., Jackson,D.S., Hudig,D., Woodard,S.L., and Powers,J.C. (1997). Synthesis and kinetic studies of diphenyl 1-(N-peptidylamino)alkanephosphonate esters and their biotinylated derivatives as inhibitors of serine proteases and probes for lymphocyte granzymes. *Arch. Biochem Biophys*, **344**, 271-280.
- Ackerman,A.L. and Cresswell,P. (2004). Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat. Immunol*, **5**, 678-684.
- Aderem,A. and Underhill,D.M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*, **17**, 593-623.
- Albert,M.L., Sauter,B., and Bhardwaj,N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*, **392**, 86-89.
- Albert,M.L., Jegathesan,M., and Darnell,R.B. (2001). Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8<sup>+</sup> T cells. *Nat. Immunol*, **2**, 1010-1017.
- Alewood and Ben (1974). *Can. J. Chem.*
- Amyere,M., Mettlen,M., Van Der,S.P., Platek,A., Payraastre,B., Veithen,A., and Courtoy,P.J. (2002). Origin, originality, functions, subversions and molecular signalling of macropinocytosis. *Int. J Med Microbiol.*, **291**, 487-494.
- Anderson,R.G. (1998). The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem*, **67**, 199-225.
- Anderton,S.M., Viner,N.J., Matharu,P., Lowrey,P.A., and Wraith,D.C. (2002). Influence of a dominant cryptic epitope on autoimmune T cell tolerance. *Nat. Immunol*, **3**, 175-181.
- Antoniou,A.N., Blackwood,S.L., Mazzeo,D., and Watts,C. (2000). Control of antigen presentation by a single protease cleavage site. *Immunity.*, **12**, 391-398.
- Araki,N., Johnson,M.T., and Swanson,J.A. (1996). A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol*, **135**, 1249-1260.
- Avva,R.R. and Cresswell,P. (1994). In vivo and in vitro formation and dissociation of HLA-DR complexes with invariant chain-derived peptides. *Immunity.*, **1**, 763-774.
- Bakke,O. and Nordeng,T.W. (1999). Intracellular traffic to compartments for MHC class II peptide loading: signals for endosomal and polarized sorting. *Immunol Rev*, **172**, 171-187.
- Barrett,A.J., Kembhavi,A.A., Brown,M.A., Kirschke,H., Knight,C.G., Tamai,M., and Hanada,K. (1982). L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem J*, **201**, 189-198.
- Beck,H., Schwarz,G., Schroter,C.J., Deeg,M., Baier,D., Stevanovic,S., Weber,E., Driessen,C., and Kalbacher,H. (2001). Cathepsin S and an asparagine-specific endoprotease dominate the proteolytic processing of human myelin basic protein in vitro. *Eur J Immunol*, **31**, 3726-3736.
- Becker,T., Hartl,F.U., and Wieland,F. (2002). CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J Cell Biol*, **158**, 1277-1285.
- Berwin,B., Hart,J.P., Rice,S., Gass,C., Pizzo,S.V., Post,S.R., and Nicchitta,C.V. (2003). Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells. *EMBO J*, **22**, 6127-6136.
- Bevec,T., Stoka,V., Pungercic,G., Dolenc,I., and 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.
- Black,D.S. and Bliska,J.B. (1997). Identification of p130Cas as a substrate of Yersinia YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. *EMBO J*, **16**, 2730-2744.
- Blum,J.S. and Cresswell,P. (1988). Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 3975-3979.
- Bodmer,J.G., Marsh,S.G., Albert,E.D., Bodmer,W.F., Dupont,B., Erlich,H.A., Mach,B., Mayr,W.R., Parham,P., and Sasazuki,T. (1994). Nomenclature for factors of the HLA system, 1994. *Tissue Antigens*, **44**, 1-18.

- Bogyo,M., Verhelst,S., Bellingard-Dubouchaud,V., Toba,S., and Greenbaum,D. (2000). Selective targeting of lysosomal cysteine proteases with radiolabeled electrophilic substrate analogs. *Chem Biol*, **7**, 27-38.
- Bowman,E.J., Siebers,A., and Altendorf,K. (1988). Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 7972-7976.
- Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, **72**, 248-254.
- Burster,T., Beck,A., Tolosa,E., Marin-Esteban,V., Rotzschke,O., Falk,K., Lautwein,A., Reich,M., Brandenburg,J., Schwarz,G., Wiendl,H., Melms,A., Lehmann,R., Stevanovic,S., Kalbacher,H., and Driessen,C. (2004). Cathepsin G, and not the asparagine-specific endoprotease, controls the processing of myelin basic protein in lysosomes from human B lymphocytes. *J Immunol*, **172**, 5495-5503.
- Burster,T., Beck,A., Tolosa,E., Schnorrer,P., Weissert,R., Reich,M., Kraus,M., Kalbacher,H., Haring,H.U., Weber,E., Overkleeft,H., and Driessen,C. (2005). Differential processing of autoantigens in lysosomes from human monocyte-derived and peripheral blood dendritic cells. *J Immunol*, **175**, 5940-5949.
- Cella,M., Engering,A., Pinet,V., Pieters,J., and Lanzavecchia,A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*, **388**, 782-787.
- Cella,M., Salio,M., Sakakibara,Y., Langen,H., Julkunen,I., and Lanzavecchia,A. (1999). Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med*, **189**, 821-829.
- Chapman,H.A., Riese,R.J., and Shi,G.P. (1997). Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol*, **59**, 63-88.
- Chapman,H.A. (1998). Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Curr. Opin. Immunol*, **10**, 93-102.
- Chapuis,F., Rosenzweig,M., Yagello,M., Ekman,M., Biberfeld,P., and Gluckman,J.C. (1997). Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol*, **27**, 431-441.
- Chicz,R.M., Urban,R.G., Gorga,J.C., Vignali,D.A., Lane,W.S., and Strominger,J.L. (1993). Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J Exp Med*, **178**, 27-47.
- Chow,A.Y. and Mellman,I. (2005). Old lysosomes, new tricks: MHC II dynamics in DCs. *Trends Immunol*, **26**, 72-78.
- Clague,M.J., Urbe,S., Aniento,F., and Gruenberg,J. (1994). Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J Biol Chem*, **269**, 21-24.
- Conner,S.D. and Schmid,S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, **422**, 37-44.
- Cornelis,G.R. (2002). Yersinia type III secretion: send in the effectors. *J Cell Biol*, **158**, 401-408.
- Cresswell,P. (1996). Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell*, **84**, 505-507.
- Cuervo,A.M., Mann,L., Bonten,E.J., d'Azzo,A., and Dice,J.F. (2003). Cathepsin A regulates chaperone-mediated autophagy through cleavage of the lysosomal receptor. *EMBO J*, **22**, 47-59.
- Cumberbatch,M. and Kimber,I. (1992). Dermal tumour necrosis factor-alpha induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans' cell migration. *Immunology*, **75**, 257-263.
- Del Prete,G. (1998). The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *Int. Rev. Immunol*, **16**, 427-455.
- Delamarre,L., Pack,M., Chang,H., Mellman,I., and Trombetta,E.S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science*, **307**, 1630-1634.
- Dengjel,J., Schoor,O., Fischer,R., Reich,M., Kraus,M., Muller,M., Kreymborg,K., Altenberend,F., Brandenburg,J., Kalbacher,H., Brock,R., Driessen,C., Rammensee,H.G., and Stevanovic,S. (2005). Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 7922-7927.
- Denzin,L.K., Sant'Angelo,D.B., Hammond,C., Surman,M.J., and Cresswell,P. (1997). Negative regulation by HLA-DO of MHC class II-restricted antigen processing. *Science*, **278**, 106-109.
- Derossi,D., Joliot,A.H., Chassaing,G., and Prochiantz,A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes., **269**, 10444-10450.

- 
- Deussing,J., Roth,W., Saftig,P., Peters,C., Ploegh,H.L., and Villadangos,J.A. (1998). Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 4516-4521.
- Dhodapkar,M.V., Steinman,R.M., Krasovsky,J., Munz,C., and Bhardwaj,N. (2001). Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med*, **193**, 233-238.
- Dorfel,D., Appel,S., Grunebach,F., Weck,M.M., Muller,M.R., Heine,A., and Brossart,P. (2005). Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with in vitro-transcribed MUC1 RNA. *Blood*, **105**, 3199-3205.
- Driessen,C., Bryant,R.A., Lennon-Dumenil,A.M., Villadangos,J.A., Bryant,P.W., Shi,G.P., Chapman,H.A., and Ploegh,H.L. (1999). Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells. *J Cell Biol*, **147**, 775-790.
- Driessen,C., Lennon-Dumenil,A.M., and Ploegh,H.L. (2001). Individual cathepsins degrade immune complexes internalized by antigen-presenting cells via Fcγ receptors. *Eur J Immunol*, **31**, 1592-1601.
- Edman,P. and Begg,G. (1967). A protein sequenator. *Eur J Biochem*, **1**, 80-91.
- Erfurth,S.E., Grobner,S., Kramer,U., Gunst,D.S., Soldanova,I., Schaller,M., Autenrieth,I.B., and Borgmann,S. (2004). *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. *Infect. Immun.*, **72**, 7045-7054.
- Ezekowitz,R.A.B. and Hoffmann,J.A. (1996). Innate immunity. *Curr. Opin. Immunol*, **8**, 1-2.
- Fairchild,P.J. and Wraith,D.C. (1996). Lowering the tone: mechanisms of immunodominance among epitopes with low affinity for MHC. *Immunol Today*, **17**, 80-85.
- Fiebiger,E., Meraner,P., Weber,E., Fang,I.F., Stingl,G., Ploegh,H., and Maurer,D. (2001). Cytokines regulate proteolysis in major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by dendritic cells. *J Exp Med*, **193**, 881-892.
- Fischer,R., Kohler,K., Fotin-Mleczek,M., and Brock,R. (2004). A stepwise dissection of the intracellular fate of cationic cell-penetrating peptides. *J Biol Chem*, **279**, 12625-12635.
- Fotin-Mleczek,M., Fischer,R., and Brock,R. (2005). Endocytosis and cationic cell-penetrating peptides--a merger of concepts and methods. *Curr. Pharm. Des*, **11**, 3613-3628.
- Futaki,S., Suzuki,T., Ohashi,W., Yagami,T., Tanaka,S., Ueda,K., and Sugiura,Y. (2001). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem*, **276**, 5836-5840.
- Garrett,W.S., Chen,L.M., Kroschewski,R., Ebersold,M., Turley,S., Trombetta,S., Galan,J.E., and Mellman,I. (2000). Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell*, **102**, 325-334.
- Gebe,J.A., Swanson,E., and Kwok,W.W. (2002). HLA class II peptide-binding and autoimmunity. *Tissue Antigens*, **59**, 78-87.
- Gershoni,J.M. and Palade,G.E. (1983). Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochem*, **131**, 1-15.
- Greenbaum,D., Medzihradzky,K.F., Burlingame,A., and Bogoy,M. (2000). Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools. *Chem Biol*, **7**, 569-581.
- Greiner,A., Lautwein,A., Overkleeft,H.S., Weber,E., and Driessen,C. (2003). Activity and subcellular distribution of cathepsins in primary human monocytes. *J Leukoc Biol*, **73**, 235-242.
- Grigoleit,U., Riegler,S., Einsele,H., Laib,S.K., Jahn,G., Hebart,H., Brossart,P., Frank,F., and Sinzger,C. (2002). Human cytomegalovirus induces a direct inhibitory effect on antigen presentation by monocyte-derived immature dendritic cells. *Br. J Haematol.*, **119**, 189-198.
- Hart,D.N. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*, **90**, 3245-3287.
- Hartmann,G., Weiner,G.J., and Krieg,A.M. (1999). CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9305-9310.
- Hawiger,J. (1999). Noninvasive intracellular delivery of functional peptides and proteins. *Curr. Opin. Chem Biol*, **3**, 89-94.
- Heemels,M.T. and Ploegh,H. (1995). Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu. Rev. Biochem*, **64**, 463-491.

- Hegde,N.R., Tomazin,R.A., Wisner,T.W., Dunn,C., Boname,J.M., Lewinsohn,D.M., and Johnson,D.C. (2002). Inhibition of HLA-DR assembly, transport, and loading by human cytomegalovirus glycoprotein US3: a novel mechanism for evading major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J Virol.*, **76**, 10929-10941.
- Hermanson,G.T. (1996). Bioconjugate techniques. *Academic Press 1996*.
- Honey,K., Nakagawa,T., Peters,C., and Rudensky,A. (2002). Cathepsin L regulates CD4+ T cell selection independently of its effect on invariant chain: a role in the generation of positively selecting peptide ligands. *J Exp Med*, **195**, 1349-1358.
- Honey,K. and Rudensky,A.Y. (2003). Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat. Rev Immunol*, **3**, 472-482.
- Hsing,L.C. and Rudensky,A.Y. (2005). The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev*, **207**, 229-241.
- Jensen,P.E. (1991). Enhanced binding of peptide antigen to purified class II major histocompatibility glycoproteins at acidic pH. *J Exp Med*, **174**, 1111-1120.
- Kaiser,E., Colescott,R.L., Bossinger,C.D., and Cook,P.I. (1970). Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem*, **34**, 595-598.
- Kidd,D., Liu,Y., and Cravatt,B.F. (2001). Profiling serine hydrolase activities in complex proteomes. *Biochemistry*, **40**, 4005-4015.
- Kirschke,H., Wiederanders,B., Bromme,D., and Rinne,A. (1989). Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochem J*, **264**, 467-473.
- Kropshofer,H., Hammerling,G.J., and Vogt,A.B. (1999). The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules. *Immunol Rev*, **172**, 267-278.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Langerholc,T., Zavasnik-Bergant,V., Turk,B., Turk,V., Abrahamson,M., and Kos,J. (2005). Inhibitory properties of cystatin F and its localization in U937 promonocyte cells. *FEBS J*, **272**, 1535-1545.
- Lanzavecchia,A. (1990). Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, **8**, 773-793.
- Lautwein,A., Burster,T., Lennon-Dumenil,A.M., Overkleeft,H.S., Weber,E., Kalbacher,H., and Driessen,C. (2002). Inflammatory stimuli recruit cathepsin activity to late endosomal compartments in human dendritic cells. *Eur J Immunol*, **32**, 3348-3357.
- Lautwein,A., Kraus,M., Reich,M., Burster,T., Brandenburg,J., Overkleeft,H.S., Schwarz,G., Kammer,W., Weber,E., Kalbacher,H., Nordheim,A., and Driessen,C. (2004). Human B lymphoblastoid cells contain distinct patterns of cathepsin activity in endocytic compartments and regulate MHC class II transport in a cathepsin S-independent manner. *J Leukoc Biol*, **75**, 844-855.
- Lenarcic,B. and Bevec,T. (1998). Thyropins--new structurally related proteinase inhibitors. *Biol Chem*, **379**, 105-111.
- Lennon-Dumenil,A.M., Roberts,R.A., Valentijn,K., Driessen,C., Overkleeft,H.S., Erickson,A., Peters,P.J., Bikoff,E., Ploegh,H.L., and Wolf,B.P. (2001). The p41 isoform of invariant chain is a chaperone for cathepsin L. *EMBO J*, **20**, 4055-4064.
- Lennon-Dumenil,A.M., Bakker,A.H., Maehr,R., Fiebiger,E., Overkleeft,H.S., Roseblatt,M., Ploegh,H.L., and Lagaudriere-Gesbert,C. (2002). Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shows regulation of the phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation. *J Exp Med*, **196**, 529-540.
- Li,G., D'Souza-Schorey,C., Barbieri,M.A., Roberts,R.L., Klippel,A., Williams,L.T., and Stahl,P.D. (1995). Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase as a regulator of endocytosis via activation of Rab5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 10207-10211.
- Liang,X.H., Jackson,S., Seaman,M., Brown,K., Kempkes,B., Hibshoosh,H., and Levine,B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, **402**, 672-676.
- Manoury,B., Hewitt,E.W., Morrice,N., Dando,P.M., Barrett,A.J., and Watts,C. (1998). An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation. *Nature*, **396**, 695-699.

- 
- Manoury,B., Mazzeo,D., Fugger,L., Viner,N., Ponsford,M., Streeter,H., Mazza,G., Wraith,D.C., and Watts,C. (2002). Destructive processing by asparagine endopeptidase limits presentation of a dominant T cell epitope in MBP. *Nat. Immunol*, **3**, 169-174.
- Maric,M.A., Taylor,M.D., and Blum,J.S. (1994). Endosomal aspartic proteinases are required for invariant-chain processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 2171-2175.
- Marsh,S.G. (1998). HLA class II region sequences, 1998. *Tissue Antigens*, **51**, 467-507.
- Mason,R.W., Wilcox,D., Wikstrom,P., and Shaw,E.N. (1989). The identification of active forms of cysteine proteinases in Kirsten-virus-transformed mouse fibroblasts by use of a specific radiolabelled inhibitor. *Biochem J*, **257**, 125-129.
- Matsuno,K., Ezaki,T., Kudo,S., and Uehara,Y. (1996). A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. *J Exp Med*, **183**, 1865-1878.
- Maurer,D., Fiebiger,E., Reininger,B., Ebner,C., Petzelbauer,P., Shi,G.P., Chapman,H.A., and Stingl,G. (1998). Fc epsilon receptor I on dendritic cells delivers IgE-bound multivalent antigens into a cathepsin S-dependent pathway of MHC class II presentation. *J Immunol*, **161**, 2731-2739.
- McGrath,M.E. (1999). The lysosomal cysteine proteases. *Annu Rev Biophys Biomol. Struct.*, **28**, 181-204.
- Meara,J.P. and Rich,D.H. (1996). Mechanistic studies on the inactivation of papain by epoxysuccinyl inhibitors. *J Med Chem*, **39**, 3357-3366.
- Meier,O., Boucke,K., Hammer,S.V., Keller,S., Stidwill,R.P., Hemmi,S., and Greber,U.F. (2002). Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J Cell Biol*, **158**, 1119-1131.
- Mellman,I. and Steinman,R.M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, **106**, 255-258.
- Molinari,M., Salio,M., Galli,C., Norais,N., Rappuoli,R., Lanzavecchia,A., and Montecucco,C. (1998). Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by Helicobacter pylori toxin VacA. *J Exp Med*, **187**, 135-140.
- Mori,K. and Iwasawa,H. (1980). *Tetrahedron*, **36**, 87.
- Morita,T., Kato,H., Iwanaga,S., Takada,K., and Kimura,T. (1977). New fluorogenic substrates for alpha-thrombin, factor Xa, kallikreins, and urokinase. *J Biochem (Tokyo)*, **82**, 1495-1498.
- Mortz,E., Krogh,T.N., Vorum,H., and Gorg,A. (2001). Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics.*, **1**, 1359-1363.
- Moutaftsi,M., Mehl,A.M., Borysiewicz,L.K., and Tabi,Z. (2002). Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, **99**, 2913-2921.
- Nakagawa,T., Roth,W., Wong,P., Nelson,A., Farr,A., Deussing,J., Villadangos,J.A., Ploegh,H., Peters,C., and Rudensky,A.Y. (1998). Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science*, **280**, 450-453.
- Nakagawa,T.Y., Brissette,W.H., Lira,P.D., Griffiths,R.J., Petrushova,N., Stock,J., McNeish,J.D., Eastman,S.E., Howard,E.D., Clarke,S.R., Rosloniec,E.F., Elliott,E.A., and Rudensky,A.Y. (1999). Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity.*, **10**, 207-217.
- Neefjes,J.J., Stollorz,V., Peters,P.J., Geuze,H.J., and Ploegh,H.L. (1990). The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell*, **61**, 171-183.
- Nimmerjahn,F., Milosevic,S., Behrends,U., Jaffee,E.M., Pardoll,D.M., Bornkamm,G.W., and Mautner,J. (2003). Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol*, **33**, 1250-1259.
- Norbury,C.C. (2006). Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology*, **117**, 443-451.
- Oono,T., Fukui,Y., Masuko,S., Hashimoto,O., Ueno,T., Sanui,T., Inayoshi,A., Noda,M., Sata,M., and Sasazuki,T. (2001). Organ-specific autoimmunity in mice whose T cell repertoire is shaped by a single antigenic peptide. *J Clin. Invest*, **108**, 1589-1596.
- Orlandi,P.A. and Fishman,P.H. (1998). Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol*, **141**, 905-915.

- Orth,K., Palmer,L.E., Bao,Z.Q., Stewart,S., Rudolph,A.E., Bliska,J.B., and Dixon,J.E. (1999). Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a Yersinia effector. *Science*, **285**, 1920-1923.
- Otto,H.H. and Schirmeister,T. (1997). Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chem Rev*, **97**, 133-172.
- Page,M. (1990). Comprehensive Medical Chemistry. *Pergamon Press Oxford*, **2**, 61-87.
- Palmer,J.T., Rasnick,D., Klaus,J.L., and Bromme,D. (1995). Vinyl sulfones as mechanism-based cysteine protease inhibitors. *J Med Chem*, **38**, 3193-3196.
- Paludan,C., Schmid,D., Landthaler,M., Vockerodt,M., Kube,D., Tuschl,T., and Munz,C. (2005). Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science*, **307**, 593-596.
- Perkins,D.N., Pappin,D.J., Creasy,D.M., and Cottrell,J.S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, **20**, 3551-3567.
- Peters,P.J., Raposo,G., Neefjes,J.J., Oorschot,V., Leijendekker,R.L., Geuze,H.J., and Ploegh,H.L. (1995). Major histocompatibility complex class II compartments in human B lymphoblastoid cells are distinct from early endosomes. *J Exp Med*, **182**, 325-334.
- Pierre,P., Turley,S.J., Gatti,E., Hull,M., Meltzer,J., Mirza,A., Inaba,K., Steinman,R.M., and Mellman,I. (1997). Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature*, **388**, 787-792.
- Pierre,P. and Mellman,I. (1998). Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell*, **93**, 1135-1145.
- Pike,L.J. and Casey,L. (2002). Cholesterol levels modulate EGF receptor-mediated signaling by altering receptor function and trafficking. *Biochemistry*, **41**, 10315-10322.
- Pinet,V., Vergelli,M., Martin,R., Bakke,O., and Long,E.O. (1995). Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules. *Nature*, **375**, 603-606.
- Pluger,E.B., Boes,M., Alfonso,C., Schroter,C.J., Kalbacher,H., Ploegh,H.L., and Driessen,C. (2002). Specific role for cathepsin S in the generation of antigenic peptides in vivo. *Eur J Immunol*, **32**, 467-476.
- Pooga,M., Hallbrink,M., Zorko,M., and Langel,U. (1998). Cell penetration by transportan. *FASEB J*, **12**, 67-77.
- Poole,B. and Ohkuma,S. (1981). Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages. *J Cell Biol*, **90**, 665-669.
- Potocky,T.B., Menon,A.K., and Gellman,S.H. (2003). Cytoplasmic and nuclear delivery of a TAT-derived peptide and a beta-peptide after endocytic uptake into HeLa cells. *J Biol Chem*, **278**, 50188-50194.
- Pu,Z., Carrero,J.A., and Unanue,E.R. (2002). Distinct recognition by two subsets of T cells of an MHC class II-peptide complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 8844-8849.
- Pu,Z., Lovitch,S.B., Bikoff,E.K., and Unanue,E.R. (2004). T cells distinguish MHC-peptide complexes formed in separate vesicles and edited by H2-DM. *Immunity*, **20**, 467-476.
- Racoosin,E.L. and Swanson,J.A. (1992). M-CSF-induced macropinocytosis increases solute endocytosis but not receptor-mediated endocytosis in mouse macrophages. *J Cell Sci*, **102 ( Pt 4)**, 867-880.
- Ramachandra,L., Song,R., and Harding,C.V. (1999). Phagosomes are fully competent antigen-processing organelles that mediate the formation of peptide:class II MHC complexes. *J Immunol*, **162**, 3263-3272.
- Rammensee,H.G. (1995). Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr. Opin. Immunol*, **7**, 85-96.
- Rammensee,H.G. (2002). Survival of the fitters. *Nature*, **419**, 443-445.
- Remold-O'Donnell,E., Chin,J., and Alberts,M. (1992). Sequence and molecular characterization of human monocyte/neutrophil elastase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5635-5639.
- Rescigno,M., Granucci,F., Citterio,S., Foti,M., and Ricciardi-Castagnoli,P. (1999). Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol Today*, **20**, 200-203.
- Riegler,S., Hebart,H., Einsele,H., Brossart,P., Jahn,G., and Sinzger,C. (2000). Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J Gen. Virol.*, **81**, 393-399.
- Riese,R.J., Mitchell,R.N., Villadangos,J.A., Shi,G.P., Palmer,J.T., Karp,E.R., De Sanctis,G.T., Ploegh,H.L., and Chapman,H.A. (1998). Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *J Clin. Invest*, **101**, 2351-2363.



- 
- Riese,R.J., Mitchell,R.N., Villadangos,J.A., Shi,G.P., Palmer,J.T., Karp,E.R., De Sanctis,G.T., Ploegh,H.L., and Chapman,H.A. (1998). Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *J Clin. Invest*, **101**, 2351-2363.
- Roake,J.A. (1995). Pathways of dendritic cell differentiation and development. *Eye*, **9 ( Pt 2)**, 161-166.
- Rodriguez,G.M. and Diment,S. (1992). Role of cathepsin D in antigen presentation of ovalbumin. *J Immunol*, **149**, 2894-2898.
- Romani,N., Gruner,S., Brang,D., Kampgen,E., Lenz,A., Trockenbacher,B., Konwalinka,G., Fritsch,P.O., Steinman,R.M., and Schuler,G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med*, **180**, 83-93.
- Romani,N., Reider,D., Heuer,M., Ebner,S., Kampgen,E., Eibl,B., Niederwieser,D., and Schuler,G. (1996). Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods*, **196**, 137-151.
- Rybak,J.N., Scheurer,S.B., Neri,D., and Elia,G. (2004). Purification of biotinylated proteins on streptavidin resin: a protocol for quantitative elution. *Proteomics*, **4**, 2296-2299.
- Saegusa,K., Ishimaru,N., Yanagi,K., Arakaki,R., Ogawa,K., Saito,I., Katunuma,N., and Hayashi,Y. (2002). Cathepsin S inhibitor prevents autoantigen presentation and autoimmunity. *J Clin. Invest*, **110**, 361-369.
- Sallusto,F., Cella,M., Danieli,C., and Lanzavecchia,A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med*, **182**, 389-400.
- Saric,T., Chang,S.C., Hattori,A., York,I.A., Markant,S., Rock,K.L., Tsujimoto,M., and Goldberg,A.L. (2002). An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol*, **3**, 1169-1176.
- Schmid,H., Koop,M., Utermann,S., Lambacher,L., Mayer,P., and 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.
- Schroter,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 Methods*, **227**, 161-168.
- Schutze-Redelmeier,M.P., Gournier,H., Garcia-Pons,F., Moussa,M., Joliot,A.H., Volovitch,M., Prochiantz,A., and Lemonnier,F.A. (1996). Introduction of exogenous antigens into the MHC class I processing and presentation pathway by *Drosophila antennapedia* homeodomain primes cytotoxic T cells in vivo. *J Immunol*, **157**, 650-655.
- Schwarz,G., Brandenburg,J., Reich,M., Burster,T., Driessen,C., and Kalbacher,H. (2002). Characterization of legumain. *Biol Chem*, **383**, 1813-1816.
- Schwarze,S.R., Ho,A., Vocero-Akbani,A., and Dowdy,S.F. (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*, **285**, 1569-1572.
- Seglen,P.O., Munthe-Kaas,A.C., and Dybedal,M.A. (1984). Amino acid control of protein degradation in normal and leukemic human lymphocytes. *Exp Cell Res*, **155**, 121-128.
- Sette,A., Adorini,L., Colon,S.M., Buus,S., and Grey,H.M. (1989). Capacity of intact proteins to bind to MHC class II molecules. *J Immunol*, **143**, 1265-1267.
- Shi,G.P., Webb,A.C., Foster,K.E., Knoll,J.H., Lemere,C.A., Munger,J.S., and Chapman,H.A. (1994). Human cathepsin S: chromosomal localization, gene structure, and tissue distribution. *J Biol Chem*, **269**, 11530-11536.
- Shi,G.P., Villadangos,J.A., Dranoff,G., Small,C., Gu,L., Haley,K.J., Riese,R., Ploegh,H.L., and Chapman,H.A. (1999). Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity*, **10**, 197-206.
- Shi,G.P., Bryant,R.A., Riese,R., Verhelst,S., Driessen,C., Li,Z., Bromme,D., Ploegh,H.L., and Chapman,H.A. (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.
- Shintani,T. and Klionsky,D.J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, **306**, 990-995.

- Sowa,G., Pypaert,M., and Sessa,W.C. (2001). Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14072-14077.
- Spiro,D.J., Boll,W., Kirchhausen,T., and Wessling-Resnick,M. (1996). Wortmannin alters the transferrin receptor endocytic pathway in vivo and in vitro. *Mol. Biol Cell*, **7**, 355-367.
- Steinman,L. (1996). Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell*, **85**, 299-302.
- Steinman,R.M., Hawiger,D., and Nussenzweig,M.C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol*, **21**, 685-711.
- Steinman,R.M., Hawiger,D., Liu,K., Bonifaz,L., Bonnyay,D., Mahnke,K., Iyoda,T., Ravetch,J., Dhodapkar,M., Inaba,K., and Nussenzweig,M. (2003). Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann. N. Y. Acad Sci*, **987**, 15-25.
- Stockinger,B. (1992). Capacity of antigen uptake by B cells, fibroblasts or macrophages determines efficiency of presentation of a soluble self antigen (C5) to T lymphocytes. *Eur J Immunol*, **22**, 1271-1278.
- Sturgill-Koszycki,S., Schlesinger,P.H., Chakraborty,P., Haddix,P.L., Collins,H.L., Fok,A.K., Allen,R.D., Gluck,S.L., Heuser,J., and Russell,D.G. (1994). Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*, **263**, 678-681.
- Subtil,A., Hemar,A., and Dautry-Varsat,A. (1994). Rapid endocytosis of interleukin 2 receptors when clathrin-coated pit endocytosis is inhibited. *J Cell Sci*, **107 ( Pt 12)**, 3461-3468.
- Sumiya,S., Yoneda,T., Kitamura,K., Murata,M., Yokoo,C., Tamai,M., Yamamoto,A., Inoue,M., and Ishida,T. (1992). Molecular design of potent inhibitor specific for cathepsin B based on the tertiary structure prediction. *Chem Pharm. Bull. (Tokyo)*, **40**, 299-303.
- Tao,K., Stearns,N.A., Dong,J., Wu,Q.L., and Sahagian,G.G. (1994). The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch. Biochem Biophys*, **311**, 19-27.
- Thoren,P.E., Persson,D., Karlsson,M., and Norden,B. (2000). The antennapedia peptide penetratin translocates across lipid bilayers - the first direct observation. *FEBS Lett.*, **482**, 265-268.
- Thurmond,R.L., Sun,S., Karlsson,L., and Edwards,J.P. (2005). Cathepsin S inhibitors as novel immunomodulators. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **6**, 473-482.
- Tolosa,E., Li,W., Yasuda,Y., Wienhold,W., Denzin,L.K., Lautwein,A., Driessen,C., Schnorrer,P., Weber,E., Stevanovic,S., Kurek,R., Melms,A., and Bromme,D. (2003). Cathepsin V is involved in the degradation of invariant chain in human thymus and is overexpressed in myasthenia gravis. *J Clin. Invest*, **112**, 517-526.
- Tomazin,R., Boname,J., Hegde,N.R., Lewinsohn,D.M., Altschuler,Y., Jones,T.R., Cresswell,P., Nelson,J.A., Riddell,S.R., and Johnson,D.C. (1999). Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4+ T cells. *Nat. Med*, **5**, 1039-1043.
- Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J. (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*, **24**, 145-149.
- Trombetta,E.S., Ebersold,M., Garrett,W., Pypaert,M., and Mellman,I. (2003). Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science*, **299**, 1400-1403.
- Trombetta,E.S. and Mellman,I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol*, **23**, 975-1028.
- Tsai,B., Ye,Y., and Rapoport,T.A. (2002). Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat. Rev Mol. Cell Biol*, **3**, 246-255.
- Turk,B., Turk,V., and Turk,D. (1997). Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol Chem*, **378**, 141-150.
- Turk,B., Turk,D., and Turk,V. (2000). Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim. Biophys Acta*, **1477**, 98-111.
- Turley,S.J., Inaba,K., Garrett,W.S., Ebersold,M., Unternaehrer,J., Steinman,R.M., and Mellman,I. (2000). Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science*, **288**, 522-527.
- Urban,B.C., Willcox,N., and Roberts,D.J. (2001). A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 8750-8755.

- 
- van Bergen,J., Ossendorp,F., Jordens,R., Mommaas,A.M., Drijfhout,J.W., and Koning,F. (1999). Get into the groove! Targeting antigens to MHC class II. *Immunol Rev*, **172**, 87-96.
- van der Hoorn,R.A., Leeuwenburgh,M.A., Bogyo,M., Joosten,M.H., and Peck,S.C. (2004). Activity profiling of papain-like cysteine proteases in plants. *Plant Physiol*, **135**, 1170-1178.
- van Swieten,P.F., Maehr,R., van den Nieuwendijk,A.M., Kessler,B.M., Reich,M., Wong,C.S., Kalbacher,H., Leeuwenburgh,M.A., Driessen,C., van der Marel,G.A., Ploegh,H.L., and Overkleeft,H.S. (2004). Development of an isotope-coded activity-based probe for the quantitative profiling of cysteine proteases. *Bioorg Med Chem Lett.*, **14**, 3131-3134.
- Villadangos,J.A., Bryant,R.A., Deussing,J., Driessen,C., Lennon-Dumenil,A.M., Riese,R.J., Roth,W., Saftig,P., Shi,G.P., Chapman,H.A., Peters,C., and Ploegh,H.L. (1999). Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev.*, **172**, 109-120.
- Villadangos,J.A. and Ploegh,H.L. (2000). Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? *Immunity.*, **12**, 233-239.
- Villadangos,J.A., Cardoso,M., Steptoe,R.J., van Berkel,D., Pooley,J., Carbone,F.R., and Shortman,K. (2001). MHC class II expression is regulated in dendritic cells independently of invariant chain degradation. *Immunity.*, **14**, 739-749.
- Villadangos,J.A., Schnorrer,P., and Wilson,N.S. (2005). Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: a balance between creative and destructive forces. *Immunol Rev*, **207**, 191-205.
- Vives,E., Brodin,P., and Lebleu,B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*, **272**, 16010-16017.
- Wang,L.H., Rothberg,K.G., and Anderson,R.G. (1993). Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol*, **123**, 1107-1117.
- Wang,R.F. and Wang,H.Y. (2002). Enhancement of antitumor immunity by prolonging antigen presentation on dendritic cells. *Nat. Biotechnol.*, **20**, 149-154.
- Watts,C. (1997). Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol*, **15**, 821-850.
- Watts,C. and Amigorena,S. (2000). Antigen traffic pathways in dendritic cells. *Traffic.*, **1**, 312-317.
- Watts,C. and Amigorena,S. (2001). Phagocytosis and antigen presentation. *Semin. Immunol*, **13**, 373-379.
- Watts,C., Moss,C.X., Mazzeo,D., West,M.A., Matthews,S.P., Li,D.N., and Manoury,B. (2003). Creation versus destruction of T cell epitopes in the class II MHC pathway. *Ann. N. Y. Acad Sci*, **987**, 9-14.
- Watts,C. (2004). The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. *Nat. Immunol*, **5**, 685-692.
- Weber,D.A., Evavold,B.D., and Jensen,P.E. (1996). Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM. *Science*, **274**, 618-620.
- Weiberth,F. (1999). "One-pot" preparation of *N*-(carbonylamino)amino Acids and half-acid/half-ester urea dipeptides. *Tetrahedron Letters*, **40**, 2895-2898
- West,M.A., Bretscher,M.S., and Watts,C. (1989). Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells. *J Cell Biol*, **109**, 2731-2739.
- West,M.A., Wallin,R.P., Matthews,S.P., Svensson,H.G., Zaru,R., Ljunggren,H.G., Prescott,A.R., and Watts,C. (2004). Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science*, **305**, 1153-1157.
- Wolf,P.R. and Ploegh,H.L. (1995). How MHC class II molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **11**, 267-306.
- Yang,H., Kala,M., Scott,B.G., Goluszko,E., Chapman,H.A., and Christadoss,P. (2005). Cathepsin S is required for murine autoimmune myasthenia gravis pathogenesis. *J Immunol*, **174**, 1729-1737.
- York,I.A., Chang,S.C., Saric,T., Keys,J.A., Favreau,J.M., Goldberg,A.L., and Rock,K.L. (2002). The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat. Immunol*, **3**, 1177-1184.

Zhong,G., Reis e Sousa, and Germain,R.N. (1997). Antigen-unspecific B cells and lymphoid dendritic cells both show extensive surface expression of processed antigen-major histocompatibility complex class II complexes after soluble protein exposure in vivo or in vitro. *J Exp Med*, **186**, 673-682.

## 9 Veröffentlichungen

### Publikationen

Schwarz G, Brandenburg J, **Reich M**, Burster T, Driessen C, Kalbacher H.

*Characterization of legumain.*

Biol. Chem., 2002 Nov; 383(11): 1813-6.

Lautwein A\*, Kraus M\*, **Reich M**, Burster T, Brandenburg J, Overkleeft HS, Schwarz G, Kammer W, Weber E, Kalbacher H, Nordheim A, Driessen C.

*Human B lymphoblastoid cells contain distinct pattern of cathepsin activity in endocytic compartments and regulate MHC class II transport in a cathepsin S-independent manner.*

J. Leu. Bio., 2004 May; 75(5): 844-855.

Burster T, Beck A, Tolosa E, Marin-Esteban V, Röttschke O, Falk K, Lautwein A, **Reich M**, Brandenburg J, Schwarz G, Wiendl H, Melms A, Lehmann R, Stevanović S, Kalbacher H, Driessen C.

*Cathepsin G, and not the asparagine endoprotease AEP, controls the processing of myelin basic protein in lysosomes from human B lymphocytes.*

J. Immunol., 2004 May; 172(9): 5495-5503.

van Swieten PF, Maehr R, van den Nieuwendijk AM, Kessler BM, **Reich M**, Wong CS, Kalbacher H, Leeuwenburgh MA, Driessen C, van der Marel GA, Ploegh HL, Overkleeft HS.  
*Development of an isotope-coded activity-based probe for the quantitative profiling of cysteine proteases.*

Bioorg. Med. Chem. Lett., 2004 Jun; 14(12): 3131-4.

Dengjel J, Schoor O, Fischer R, **Reich M**, Kraus M, Müller M, Kreymborg K, Altenberend F, Brandenburg J, Kalbacher H, Brock R, Driessen C, Rammensee HG, Stevanović S.

*Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins.*

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 2005 May; 102(22): 7922-7.

Burster T, Beck A, Tolosa E, Schnorrer P, Weissert R, **Reich M**, Kraus M, Kalbacher H, Haering HU, Weber E, Overkleeft HS, Driessen C.

*Differential processing of autoantigens in lysosomes from human monocyte-derived and peripheral blood dendritic cells.*

J. Immunol. 2005, Nov;175(9): 5940-9.

Rückrich T, Brandenburg J, Cansier A, Müller M, Stevanović S, Schilling K, Wiederanders B, Melms A, **Reich M**, Driessen C, Kalbacher H.

*Specificity of human cathepsin S determined by processing of peptide substrates and MHC class II-associated invariant chain.*

accepted in Biol. Chem.

Kraus M\*, Rückrich T\*, **Reich M**, Gogel J, Beck A, Kammer W, Berkers CR, Burg D, Overkleeft HS, Ovaa H, Driessen C.

*Activity patterns of proteasome subunits reflect bortezomib sensitivity of hematologic malignancies and are variable in primary human leukemia cells.*

accepted in Leukemia

Burster T, Beck A, Øren A, Poeschel S, Bächle D, **Reich M**, Röttschke O, Falk K, Kalbacher H, Tolosa E, Overkleeft H, Driessen C.

*Interferon gamma controls the lysosomal processing of myelin basic protein in microglia cells by regulating cathepsin G activity.*

submitted

**Reich M**, van Swieten PF, Sommandas V, Kraus M, Fischer R, Weber E, Kalbacher H, Overkleeft HS, Driessen C.

*Endocytosis targets exogenous material selectively to cathepsin S in live human dendritic cells, while cell-penetrating peptides mediate nonselective transport to cysteine cathepsins.*

submitted

**Reich M\***, Kessler T\*, Tolosa E, Beck A, Kraus M, Weber E, Kalbacher H, Overkleeft HS, Jahn G, Riegler S and Driessen C.

*Human cytomegalovirus infection interferes with the MHC II-associated antigen presentation machinery of dendritic cells at multiple levels.*

submitted

---

Artunç F, Essig M, Artunç N, Plachtzik C, **Reich M**, Boehmer G, Haering HU, Erley CM, Risler T.

*Effects of Tetrahydrobiopterin (BH4) on nitric oxide (NO) bioavailability and renal hemodynamics in healthy volunteers.*

submitted

### **Abstracts und Poster:**

Burster T, Beck A, Øren A, Esteban VM, Tolosa E, Röttschke O, Falk K, **Reich M**, Lautwein A, Bächle D, Brandenburg J, Kalbacher H, Driessen C.

*IFN- $\gamma$  downregulates cathepsin G activity in microglia and results in increased stability of the major immunodominant region of myelin basic protein in lysosomal compartments.*

Posterpräsentation beim 34<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society of Immunology, Berlin 2003

Driessen C, Beck A, Esteban VM, Tolosa A, **Reich M**, Kalbacher H, Overkleeft HS, Burster T.

*Cathepsin G: a dominant protease in the MHC II-compartment of primary human DC that controls processing of myelin basic protein.*

Posterpräsentation beim 12<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Montréal 2004

**Reich M**, Erfurth S, Kraus M, Overkleeft HS, Driessen C.

*Pinocytosis by human dendritic cells targets exogenous material selectively to intracellular cathepsin S.*

Posterpräsentation beim 5<sup>th</sup> Annual Meeting - Federation of Clinical Immunology Societies, Boston 2005

## **10 Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Albert, Eckstein, Gauglitz, Göpel, Häfelinger, Hanack, Hoffmann, Gundram Jung, Günther Jung, Kuhn, Krug, Lindner, Maier, Nagel, Nakel, Oberhammer, Oelkrug, Pausewang, Pommer, Rammensee, Schott, Schurig, Seelig, Staudt, Stegmann, Steinle, Stevanović, Strähle, Zeller, Ziegler.