

ZUSAMMENFASSUNG

Die Struktur, Regulation und physiologische Funktion vieler Proteasen ist nur teilweise aufgeklärt. In der humanen T-Zelllinie H9 wurde eine neutrale Amino-peptidase-Aktivität nachgewiesen, deren bisherige biochemische Charakterisierung sie von anderen, bekannten Aminopeptidasen unterschied. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der Identität des Enzyms und dessen umfassende biochemische Charakterisierung und damit einen Beitrag zur Erweiterung des Kenntnisstandes über Vorkommen und Funktion von Aminopeptidasen im Zytosol von Immunzellen zu leisten.

Das Enzym wurde unter Anwendung von konventionellen chromatographischen Methoden isoliert und mit Hilfe der Massenspektrometrie (Maldi-TOF) als zytosolische Alanyl-Aminopeptidase (EC 3.4.11.14; zAAP, PSA) identifiziert. Die biochemischen Eigenschaften dieser Peptidase aus H9-Zellen zeigten Gemeinsamkeiten, aber auch erhebliche Differenzen im Vergleich zu bisher bekannten zytosolischen Alanyl-Aminopeptidasen aus anderen humanen Geweben. Aufgrund dieser Unterschiede wurden unterschiedliche Namen für dieses Enzym vergeben. Allen bisher beschriebenen Enzymen gemeinsam sind deren Eigenschaften als Metallo- und Thiolpeptidasen, deren breite Substratspezifität sowie deren Monomercharakter. Sie reagieren sensitiv gegenüber dem Inhibitor Puromycin, wobei quantitative Unterschiede vorhanden sind. Die wichtigsten Differenzen wurden in der Aktivierung durch Metallionen und im pH-Optimum der Enzymaktivität festgestellt. Dies könnte auf eine funktionelle Anpassung der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase an die Funktion im jeweiligen Gewebe hinweisen.

Die hohe Sensitivität der charakterisierten zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase gegenüber Aminopeptidase N (APN)-Inhibitoren, wie Phebestin, Probestin oder RB3014, kann mit einer hohen Ähnlichkeit der katalytischen Motive beider Peptidasen erklärt werden. Da auch einige spezifische APN-Antikörper gegen die Struktur des aktiven Zentrums gerichtet sind, wurde auch eine Kreuzreaktivität derselben mit der zAAP aus der T-Zelllinie H9 gefunden. Während die bisher als spezifisch betrachteten APN-Inhibitoren wie Phebestin, Probestin und RB 3014 mit

gleicher Effektivität auch die zAAP hemmen, steht mit dem neuentwickelten Inhibitor PAQ-22 erstmals ein selektiver Inhibitor der zAAP zur Verfügung.

Die Expression der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase in peripheren T-Zellen konnte durch Mitogene wie PHA und PWM induziert werden. Diese aktivierungsabhängige Verstärkung der Expression wurde auf der mRNA-Ebene mit Hilfe der quantitativen RT-PCR-Technik bestimmt. Sie spricht für eine Rolle der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase in der Immunantwort. Die induzierbare Aktivierung des Enzyms konnte durch die Applikation verschiedener APN-Inhibitoren modifiziert werden. Der Effekt der Wirkung war dabei abhängig von den verwendeten Mitogen-Kombinationen.

Zusammenfassend leistet die vorliegende Arbeit einen Beitrag zum Verständnis der Expression, Regulation und Funktion von Amino-peptidasen im Rahmen der Immunantwort. Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der hohen Sensitivität der zAAP gegenüber den APN-Inhibitoren sind für künftige Einsätze dieser Substanzen in der pharmakologischen Therapie entzündlicher und Autoimmun-Erkrankungen von grundlegender Bedeutung.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis.....	9
1 Einleitung	13
1.1 Proteolyse und Immunsystem	14
1.2 Klassifikation von Peptidasen	17
1.3 Aminopeptidasen	19
1.3.1 Zytoplasmatische Aminopeptidasen.....	20
1.3.2 Zytoplasmatische Aminopeptidasen und Immunsystem	22
2 Zielstellung der Promotionsarbeit	25
3 Material und Methoden	27
3.1 Zelllinien	27
3.2 Präparation der Aminopeptidase aus der H9-Zelllinie.....	28
3.2.1 Herstellung der zytoplasmatischen Fraktion	28
3.2.2 Aktivitätsbestimmung der γ -Glutamyltranspeptidase	28
3.2.3 Chromatographische Trennmethoden.....	28
3.3 Identifikation.....	30
3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	30
3.3.2 Visualisierung	31
3.3.3 Massenspektrometrie	32
3.3.4 Protein-Blot und Immunologischer Nachweis	32
3.4 Biochemische Charakterisierung	34
3.4.1 Ermittlung der pH-Abhängigkeit	34
3.4.2 Untersuchung der Stabilität und der Haltbarkeit	36
3.4.3 Messung von Enzymaktivitäten.....	36
3.4.4 Bestimmung der Effektorenwirkung auf die Aminopeptidase- Aktivität.....	37
3.4.5 Methoden zur Ermittlung der enzymkinetischen Konstanten.....	38

3.4.6	Analyse der Spaltung von Peptiden mit Hilfe der Kapillarelektrophorese (CE).....	40
3.5	Bestimmung der mRNA-Expression in T-Zellen	41
3.5.1	Präparation mononukleärer Zellen und T-Zell-Anreicherung	41
3.5.2	Stimulation der T-Zellen.....	42
3.5.3	RNA-Isolation.....	42
3.5.4	Reverse Transkription.....	43
3.5.5	Quantitative RT-PCR.....	43
4	Ergebnisse	47
4.1	Isolation und Identifikation einer Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9	47
4.1.1	Gelchromatographie mit Sepharose 6B.	47
4.1.2	Hydroxylapatit-Chromatographie	48
4.1.3	Ionenaustauscher mit Mono Q	50
4.1.4	Identifikation mittels Massenspektrometrie.....	53
4.2	Charakterisierung der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase der T- Zelllinie H9	54
4.2.1	Bestimmung der Abhängigkeit der Ala-pNA hydrolysierenden Aktivität vom pH-Wert	54
4.2.2	Untersuchungen zur Stabilität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase.....	55
4.2.3	Substratspezifität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase und enzymkinetische Daten.....	57
4.2.4	Effektoren der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase	64
4.2.5	Einfluss von Ionen auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase.....	71
4.3	Immunreaktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase.....	75
4.4	Aktivierungsabhängige Expression der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase aus humanen Lymphozyten.....	76
4.4.1	Stimulation humaner T-Lymphozyten und Expression der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase	76

4.4.2	Modulation der mRNA-Expression der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase durch Amino-peptidase-Inhibitoren	77
5	Diskussion	81
5.1	Biochemischer Vergleich der identifizierten zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase aus der T-Zelllinie H9 mit denen aus anderen Geweben .	81
5.1.1	Monomer - Charakter der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase	83
5.1.2	Abhängigkeit der zytosolischen Amino-peptidase Aktivität vom pH- Wert.....	83
5.1.3	Zytosolische Alanyl-Amino-peptidase als thiolabhängige Protease.....	84
5.1.4	Die zAAP aus der humanen T-Zelllinie H9 ist eine Metalloprotease....	85
5.1.5	Einfluss unterschiedlicher Ionen auf die enzymatische Aktivität.....	86
5.1.6	Sensitivität gegenüber Puromycin.	87
5.1.7	Sensitivität gegenüber Amino-peptidase-Inhibitoren.....	88
5.1.8	Sensitivität gegenüber PAQ-22.....	89
5.1.9	Substratspezifität der isolierten zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase.....	90
5.1.10	Immunreaktivität der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase	92
5.2	Stimulationsabhängige Expression der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase in peripheren T-Lymphozyten.....	93
5.3	Funktion der zAAP	95
5.4	Zusammenfassende Diskussion	97
	Literaturverzeichnis	101

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2-ME	2-Mercaptoethanol
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
AK	Antikörper
Ala-pNA	Alanyl-p-Nitroanilid
Ala-βNA	Alanyl-β-Naphtylamid
AMC	4-Methyl-Coumaryl-7-Amid
AMV	“avian myeloblastic virus”
AP	Aminopeptidase
APA	Aminopeptidase A
APN	Aminopeptidase N
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
B-Zellen	B-Lymphozyten
β-NA	β-Naphtylamid
CCA	α-Cyano-4-Hydroxymizsäure
CCK	Cholecystokinin
CD	„cluster of differentiation“, Systematik der Oberflächenantigene humaner Leukozyten
CD3 ⁺ - Zellen	T-Zellen, Thymozyten
CD4 ⁺ -Zellen	T-Helferzellen
CD8 ⁺ -Zellen	zytotoxische T-Zellen

cDNA	komplementäre DNA
Con A	Concanavalin A (Lektin aus <i>Canavalia ensiformis</i>)
CTL	Zytotoxische CD8 ⁺ -T-Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
DPIV	Dipeptidylpeptidase IV
ds	doppelsträngig
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FCS	Fetales Kälberserum
FPLC	Niederdruck-Flüssigkeitschromatographie
Gly	Glyzin
Gly-pNA	Glyzyl-p-Nitroanilid
GRP	Gastrin-freisetzendes Peptid
γ-GT	γ-Glutamyltranspeptidase
HEPES	N-2-Hydroxymethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IAA	Iodacetamid
IFN-γ	Interferon γ
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IU	Internationale Einheit
kat	Katal, umgesetzte Stoffmenge (mol) pro Sekunde
kbp	Kilobase (10 ³ Basenpaare)
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
LAP	Leucyl-Aminopeptidase
Leu	Leucin
Leu-pNA	Leucyl-p-Nitroanilid
mAK	monoklonaler Antikörper

Met	Methionin
Met-pNA	Methionyl-p-Nitroanilid
MHC	„major histocompatibility complex“
MW	Mittelwert
MNZ	mononukleäre Zellen
MOLT-4	„human acute lymphoblastic leukemia cells“
MOPS	3-Morpholin-2-propansulfonsäure
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
NBT	Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid
NEP	Neutrale Endopeptidase (EC 24.11.)
NK-Zelle	Natürliche Killerzellen
n.s.	nicht signifikant
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAQ-22	3-(2,6-Diethylphenyl)-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-Chinazolin-1,3-dion
PCMB	Para-Chloromercuribenzoat
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PHA	Phytohämagglutinin (Lektin aus <i>Phaseolus vulgaris</i>)
PHMB	Para-Hydroxymercuribenzoat
PHMS	Para-Hydroxymercuriphenylsulphonat
PIQ-22	2-(2,6-Diethylphenyl)-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-1,3-dion
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
Pro	Prolin
Pro-pNA	Prolyl-p-Nitroanilid
PSA	Puromycin Sensitive Aminoipeptidase; zAAP
PWM	„Pokeweed“ Mitogen, (Lektin aus <i>Phytolacca americana</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Trankription-Polymerase-Ketten-Reaktion

SD	Standardabweichung
SDF-1 α	“stromal cell derived factor-1 α “
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAP	„transporter associated with antigen processing“
TGF- β	„transforming growth factor“- β
TNF- α	„tumor necrosis factor“- α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T-Zellen	T-Lymphozyten
zAAP	zytosolische Alanyl-Aminopeptidase
ZAK	Ziege-anti-Kaninchen IgG
ZAM	Ziege-anti-Maus IgG