

2 ZIELSTELLUNG DER PROMOTIONSARBEIT

Die Struktur, Regulation und physiologische Funktion vieler Proteasen ist nur teilweise aufgeklärt. In der humanen T-Zelllinie H9 wurde eine neutrale Aminopeptidase-Aktivität nachgewiesen, deren bisherige biochemische Charakterisierung sie von anderen, bekannten Aminopeptidasen unterschied [103,159]. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der Identität des Enzyms und dessen umfassende biochemische Charakterisierung. Damit sollte ein Beitrag zur Erweiterung des Kenntnisstandes über Vorkommen und Funktion von Aminopeptidasen im Zytosol von Immunzellen geleistet werden. Im einzelnen waren die folgenden Teilaufgaben zu bearbeiten:

1. Molekulare Identifizierung der unbekannt humanen, zytosolischen Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9.

Dabei sollte die Aminopeptidase unter Anwendung verschiedenster biochemischer Methoden gereinigt werden. Die molekulare Identifizierung des gereinigten Enzyms sollte dann mittels tryptischem Verdaus und Nutzung der Massenspektrometrie vorgenommen werden.

2. Charakterisierung der isolierten Aminopeptidase.

Die folgenden Eigenschaften sollten näher charakterisiert werden:

- Substratspezifität
- Spaltungsfähigkeit von biologisch-aktiven Peptiden
- Einfluss von verschiedenen Metall-Ionen und Metallchelatoren auf die Aktivität
- Sensitivität gegenüber Aminopeptidasen-Inhibitoren
- pH-Abhängigkeit der hydrolysierenden Aktivität
- Wirkung von Thiolreagenzien auf die enzymatische Aktivität.

- Überprüfung der Kreuzreaktivität gegenüber kommerziell vorhandenen APN-Antikörpern.

3. Untersuchungen zur mRNA-Expression des identifizierten Enzyms

Mit der molekularen Identifizierung der zytosolischen Aminopeptidase wurde die Voraussetzung getroffen, diese Peptidase auf dem Niveau der mRNA qualitativ und quantitativ zu erfassen. Die mRNA-Expression soll an peripheren T-Zellen unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden. Anhand dieser Untersuchungen kann eine mögliche Beteiligung dieser Aminopeptidase im Rahmen der Immunantwort näher bestimmt werden.