

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 ZELLINIEN

Die verwendete humane T-Zelllinie H9 wurde käuflich von der „European Collection of Cell Cultures“ (ECACC 85050301) erworben. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10% FCS und unter Zusatz von 2mM Glutamin sowie 60 IU/ml Penicillin (Gibco) bei 37°C, 97% relativer Luftfeuchte und 6% (v/v) CO₂ in einem Sterikult 200 (Firma Scientific) kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen (Falcon) unterschiedlicher Größe, wobei die Zellen mit einer Dichte von 500000 Zellen/ml eingesät wurden. Nach 3 Tagen erfolgte die Zellernte. Dazu wurden die Zellen nach der Zentrifugation (10 min; 500×g; Raumtemperatur) und dem Absaugen des Überstands jeweils zweimal in PBS aufgenommen und erneut zentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Zellpellet bei –80°C gelagert.

PBS-Puffer: 137 mM NaCl,
2,7 mM KCl
8,1 mM Na₂HPO₄
1,4 mM KH₂PO₄
pH 7,2

3.2 PRÄPARATION DER AMINOPEPTIDASE AUS DER H9-ZELLINIE

3.2.1 HERSTELLUNG DER ZYTOSOLISCHEN FRAKTION

Nach dem Auftauen der H9-Zellen wurde das Pellet in zwei Volumina 10 mM HEPES-Puffer (Gibco; pH 6,5) mit 0,2 mM MgCl₂ und 2 mM DTT resuspendiert. Die entstandene Zellsuspension wurde mit Ultraschall (0°C; 5×20s; 30 W; Vibra-Cell, Sonics) homogenisiert und im Anschluss die zytosolische Fraktion durch eine Ultrazentrifugation (4°C; 100.000×g; 2 h; TL100, Beckmann) von den partikulären Bestandteilen getrennt. Die Reinheit der Fraktion wurde anhand der Bestimmung der γ -Glutamyltranspeptidaseaktivität (γ -GT) kontrolliert. Der relative Anteil partikulärer Verunreinigungen im Zytosol hatte einen Wert von 5% nicht überschritten.

3.2.2 AKTIVITÄTSBESTIMMUNG DER γ -GLUTAMYLTRANSPEPTIDASE

Die γ -GT, ein membrangebundenes Enzym, katalysiert den Transfer einer γ -Glutamylgruppe von Glutathion zur α -Aminogruppe einer Akzeptoraminosäure. Die Bestimmung der γ -GT-Aktivität erfolgte analog zur Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität, wobei γ -Glutamyl-p-nitroanilid (Chemapol) als Substrat diente und Glyzyl-Glyzin als Akzeptormolekül fungierte. Die Messung und Berechnung erfolgte wie bei Grisk und Mitarbeitern [49] beschrieben.

3.2.3 CHROMATOGRAPHISCHE TRENNMETHODEN

Die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus H9-Zellen wurde chromatographisch unter Verwendung des FPLC-Systems (Bio-Rad) bis zur Homogenität gereinigt. Die dabei durchgeführten Reinigungsschritte, die alle bei 4°C durchgeführt wurden, sind nachfolgend aufgeführt. Nach jedem Reinigungsschritt wurden die Ala-pNA-

hydrolysierende Aktivität sowie die Proteinkonzentration (Bradford-Assay; Bio-Rad) des teilgereinigten Enzyms bestimmt.

Gelfiltration über Sepharose 6B

Eine 2,6×100 cm große Säule (Pharmacia) wurde mit Sepharose 6B (Pharmacia) gemäß Herstellerhinweisen gefüllt. Die Matrix wurde vor dem Probenauftrag mit Beladungspuffer (50 mM Phosphatpuffer; pH 6,5; 2 mM DTT)(vgl.3.4.1) gespült. Anschließend wurde die zytosolische Fraktion (max. Volumen 4 ml) blasenfrei auf die Sepharose appliziert. Die Trennung erfolgte bei einer Flußrate von 0,5 ml/min, sowie einer Fraktionsgröße von 5 ml über 16 Stunden. Der Elutionspuffer entsprach dem Beladungspuffer.

Der Proteingehalt der Fraktionen wurde fortlaufend durch Messung der Extinktion bei 280 nm ermittelt. Alle Fraktionen wurden auf das Vorhandensein von Ala-pNA-hydrolysierenden Aktivitäten untersucht (vgl. 3.4.3) und positive Proben hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität und Proteinkonzentration quantitativ analysiert.

Chromatographie über Hydroxylapatit

Eine 5 ml Säule mit Hydroxylapatit-Matrix Typ I wurde gemäß den Herstellerangaben (Bio-Rad) erstellt. Die von der Gelfiltration herrührenden positiven Fraktionen wurden vereinigt und im Beladungspuffer (50 mM Phosphatpuffer; pH 6,5; 2 mM DTT) auf die Säule appliziert. An die Hydroxylapatit-Matrix gebundene Proteine wurden mit einem Elutionspuffer (250 mM Phosphatpuffer; pH 6,5; 2 mM DTT) nach folgendem Schema eluiert:

1. linear steigende Elutionspufferkonzentration von 23 bis 27%;
Flussrate 3 ml/min; Fraktionsgröße von 3 ml, 25 Minuten,
2. Elutionsschritt mit 100%igem Phosphatpuffer;
Flussrate 3 ml/min; 3 Minuten.

Alle Fraktionen wurden auf das Vorhandensein Ala-pNA-hydrolysierender Aktivität (vgl. 3.4.3) untersucht und die positiven Fraktionen vereinigt.

Trennung mittels Anionenaustauscher

Die Matrix (MonoQ, Bio-Rad) wurde entsprechend den Herstellerangaben behandelt. Die teilgereinigten Proteinfractionen von der Hydroxylapaptit-Chromatographie wurden mittels YM30-Konzentratoren (Millipore) konzentriert und in den Beladungspuffer (50 mM Phosphatpuffer; pH 6,5; 2 mM DTT) umgepuffert. Das Konzentrat wurde auf die Mono Q – Säule (Bio-Rad; 2ml) appliziert und mit einem Säulenvolumen Beladungspuffer nachgespült. Die an den MonoQ-Anionenaustauscher gebundenen Proteine wurden mit stufenweise steigender Salzkonzentration nach folgendem Schema eluiert:

Stufe 1: 20% Elutionspuffer (50 mM Phosphatpuffer, 2 mM DTT, 0,35 M NaCl, pH 6,5): Flussrate: 3 ml/min, Zeit: 5 Minuten;

Stufe 2: 51% Elutionspuffer: Flussrate: 3 ml/min, Zeit: 6 Minuten, Fraktionsgröße: 1 ml;

Stufe 3: 100% Elutionspuffer: Flussrate: 3 ml/min, Zeit: 4 Minuten.

Es wurden Fraktionen mit höchsten Ala-pNA hydrolysierenden Aktivitäten während der zweiten Stufe gesammelt. Die Beurteilung der Effektivität der Reinigungsschritte erfolgte anhand der Bestimmung der spezifischen Aktivität (vgl. 3.4.3). Daraus errechnete sich der Reinigungsfaktor nach der Formel:

$$\text{Reinigungsfaktor} = \frac{\text{Spezifische Aktivität der gesammelten Fraktion}}{\text{Spezifische Aktivität des Ausgangsmaterials}}$$

3.3 IDENTIFIKATION

3.3.1 SDS-POLYACRYLAMID-GEL-ELEKTROPHORESE

Die elektrophoretische Auftrennung der isolierten Proteine erfolgte unter reduzierenden bzw. nichtreduzierenden Bedingungen in SDS-haltigen Polyacrylamid-Gelen.

Proben:

- 0,5 µg zAAP aus der T-Zelllinie H9;
- 0,5 µg APN aus humaner Niere (bereitgestellt von Thilo Kähne, Magdeburg);

Probenvorbereitung für reduzierende Bedingungen:

Die Proben wurden mit Laemmli-Probenpuffer (mit Zusatz von 5% 2-ME; Bio-Rad) 1:2 verdünnt, drei Minuten bei 95°C gekocht und dann auf Eis gestellt.

Probenvorbereitung für nicht-reduzierende Bedingungen:

Die Proben wurden mit nativen Probenpuffer (ohne Zusatz von 2-ME; Bio-Rad) 1:2 verdünnt.

20-25 µl der vorbereiteten Probe wurden je Spur auf das Gel appliziert. Die Auftrennung erfolgte dann im 4-12%igen (m/V) Bis-Tris-Gel (NuPAGE Gel, Novex) unter folgenden Bedingungen:

- Laufpuffer: MES-SDS (Novex); 100 mA pro Gel.

Zur Kontrolle der Elektrophorese und zur Größenbestimmung der detektierten Proteine wurde der Proteinmarker Mark 12 (Novex) verwendet. Je nach Aufgabenstellung wurden nach Beendigung der Elektrophorese die Proteine mit Coomassie Blue G-250 (vgl. 3.3.2.) bzw. mit einer Silberfärbung (vgl. 3.3.2) visualisiert oder im „semi-dry“-Blot-Verfahren auf Nitrozellulose transferiert (vgl. 3.3.4).

3.3.2 VISUALISIERUNG

Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung wurde unter Verwendung des „Colloidal Blue Stain Kits“ (Novex) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Silber-Färbung

Die Silber-Färbung erfolgte unter Nutzung des „SilverXpress Kits“ der Firma Novex entsprechend dem Protokoll, welches für 1,0 mm starke Gele empfohlen wird.

3.3.3 MASSENSPEKTROMETRIE

Die zu untersuchende Proteinbande wurde nach Visualisierung mittels Silber-Färbung aus dem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten und das Gelstück in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mechanisch zerkleinert. Daran schlossen sich folgende Schritte an:

- Trypsin – Verdau (Boehringer Mannheim)
- Peptidextraktion durch Sonifikation (Sonorex RK 156)
- Reinigung der Peptidfragmente mittels einer Reverse-Phase (R2)-Säule (Poros 50 R2; Perseptive Biosystem)
- Co-Kristallisation mit CCA in 70% Acetonitril auf einem SCOUT 384-MALDI-Target (Bruker Daltonic).

Die massenspektrometrische Analyse der Peptidfragmente erfolgte mittels eines MALDI-TOF-MS (Reflex III, Bruker Daltonics) im Reflektor Modus mit interner Kalibrierung. Die erhaltenen Peptidfragmentmassen wurden mit Hilfe der MASCOT Software (Matrix Science) mit der OWL-Datenbank verglichen. Ab dem tryptischen Verdau wurde die Analyse von T. Kähne durchgeführt.

3.3.4 PROTEIN-BLOT UND IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS

Nach der elektrophoretischen Auftrennung (vgl. 3.3.1) wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose Membran (PROTRAN 85; Schleicher & Schüll) unter Nutzung der „semi-dry transfer cell“ Apparatur (Bio-Rad), bei 30 V für 2 Stunden transferiert.

Kathodenpuffer:	5 ml Roti-Blot K (Roth)
	35 ml H ₂ O dest.
	10 ml Methanol
Anodenpuffer:	5 ml Roti-Blot A (Roth)
	35 ml H ₂ O dest.
	10 ml Methanol

Blockierung

Die Membran wurde in 7,5% (w/v) entfettetem Milchpulver in PBS über Nacht bei 4°C blockiert und vor der Verwendung 3×10 Minuten in PBS unter starkem Schütteln bei Raumtemperatur gewaschen.

Kopplung des primären Antikörpers

Es wurden die folgenden primären Antikörper verwendet:

- monoklonaler anti-CD13-Antikörper, Klon LeuM7 (Becton-Dickenson)
- monoklonaler anti-CD13-Antikörper, Klon WM15 (Crawley Down, England)
- polyklonales anti-APN-Kaninchen-Antiserum 7B (U. Lendeckel, Magdeburg; Immunisierung mit einem synthetischen Peptidfragment der Zn-bindenden Region der APN und anschließender Reinigung mittels Protein A-Affinitätschromatographie)

Die primären Antikörper bzw. das Antiserum wurden 1:2000 in PBS mit 0,03% Tween 20 (Roth) verdünnt und die Nitrozellulosemembran 90 Minuten unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde 3×10 Minuten in PBS mit 0,03% Tween 20 unter starkem Schütteln bei Raumtemperatur gewaschen.

Kopplung des sekundären Antikörpers

Es wurden die folgenden sekundären Antikörper verwendet:

- Ziege-anti-Maus-IgG (ZAM), konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (Sigma)

- Ziege-anti-Kaninchen-IgG (ZAK), konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (Sigma)

Der ZAM-Antikörper wurde 1:500 und der ZAK-Antikörper 1:50 in PBS mit 0,03% Tween 20 verdünnt. Die Inkubation der Membran mit den Antikörperlösungen erfolgte bei Raumtemperatur für 45 Minuten. Es schlossen sich drei Waschschrirte (siehe oben) an.

Nachweisreaktion

Die Nachweisreaktion erfolgte bei 37°C mit NBT (0,66 mg/ml; Sigma) und BCIP (0,165 mg/ml; Sigma) in 10 ml Reaktionspuffer (0,1 M Tris/HCl; 0,1 M NaCl; 0,05 M MgCl₂; pH 9,5). Zur Beendigung der Nachweisreaktion wurde die Membran 15 Minuten mit Wasser und dann mit TE-Puffer (10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0) gespült und im Anschluss getrocknet.

3.4 BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG

3.4.1 ERMITTLUNG DER pH-ABHÄNGIGKEIT DER ALA-PNA HYDROLYSIERENDEN AKTIVITÄTEN

Die Messungen Ala-pNA-hydrolysierender Aktivitäten der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase wurden in drei Puffersysteme, im pH-Bereich von 5,0 bis 9,0 durchgeführt.

Phosphatpuffer mit Zusatz von 2mM DTT; pH-Bereich von 6,0 bis 8,0.

50 mM Phosphatpuffer: Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ ; das Mischungsverhältnis wurde von Harris entnommen [50]

- pH 6,0; 6,15 Teile von 0,5 M Na₂HPO₄ wurden mit 43,85 Teilen von 0,5 M NaH₂PO₄ gemischt und verdünnt..
- pH 6,5; 13,25 Teile von 0,5 M Na₂HPO₄ wurden mit 36,75 Teilen von 0,5 M NaH₂PO₄ gemischt und verdünnt.

- pH 7,0; 30,5 Teile von 0,5 M Na_2HPO_4 wurden mit 19,5 Teilen von 0,5 M NaH_2PO_4 gemischt und verdünnt.
- pH 7,5; 40,5 Teile von 0,5 M Na_2HPO_4 wurden mit 9,5 Teilen von 0,5 M NaH_2PO_4 gemischt und verdünnt.
- pH 8,0; 47,35 Teile von 0,5 M Na_2HPO_4 wurden mit 2,65 Teilen von 0,5 M NaH_2PO_4 gemischt und verdünnt.

50 mM Tris-HCl-Puffer mit Zusatz von 2mM DTT; pH-Bereich von 7,5 bis 9,0 [71].

- pH 7,5 ; 40,6 ml 0,1M HCl wurde 25 ml 0,2M Tris hinzugefügt und mit H_2O auf 100ml aufgefüllt.
- pH 8,0 ; 28,9 ml 0,1M HCl wurde 25 ml 0,2M Tris hinzugefügt und mit H_2O auf 100ml aufgefüllt.
- pH 8,5 ; 15,0 ml 0,1M HCl wurde 25 ml 0,2M Tris hinzugefügt und mit H_2O auf 100ml aufgefüllt.
- pH 9,0 ; 6,0 ml 0,1M HCl wurde 25 ml 0,2M Tris hinzugefügt und mit H_2O auf 100ml aufgefüllt.

50 mM Citrat-Phosphat-Puffer mit Zusatz von 2mM DTT; pH-Bereich 5,0 - 7,0 [71].

- pH 5,0; 48,5 Teile von 0,2 M Na_2HPO_4 wurden mit 43,1 Teilen 0,1 M Citronensäure gemischt und verdünnt.
- pH 5,5; 56,9 Teile von 0,2 M Na_2HPO_4 wurden mit 43,1 Teilen 0,1 M Citronensäure gemischt und verdünnt.
- pH 6,0; 63,2 Teile von 0,2 M Na_2HPO_4 wurden mit 43,1 Teilen 0,1 M Citronensäure gemischt und verdünnt.
- pH 6,5; 71,0 Teile von 0,2 M Na_2HPO_4 wurden mit 43,1 Teilen 0,1 M Citronensäure gemischt und verdünnt.
- pH 7,0; 82,4 Teile von 0,2 M Na_2HPO_4 wurden mit 43,1 Teilen 0,1 M Citronensäure gemischt und verdünnt.

3.4.2 UNTERSUCHUNG DER STABILITÄT UND DER HALTBARKEIT

Der Einfluss von 2 mM DTT auf die Stabilität der Aminopeptidase-Aktivität wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden bei 4°C untersucht. Als Kontrolle dienten Proben ohne DTT-Zusatz. Nach Ablauf der Reaktionszeit erfolgte eine Bestimmung der Ala-pNA-hydrolysierenden Aktivität (vgl. 3.4.3).

Das gereinigte Enzym wurde in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,5) mit 2 mM DTT bei -70°C; -20°C und 4°C, mit und ohne Zusatz von 20% Glycerol aufbewahrt. Nach 7 bzw. 26 Tagen erfolgte eine Bestimmung der Enzymaktivitäten (vgl. 3.4.3).

3.4.3 MESSUNG VON ENZYMAKTIVITÄTEN

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Aminopeptidase erfolgte anhand der hydrolytischen Spaltung des chromogenen Substrates Ala-pNA (Sigma). Dabei wurde eine Endpunktmessung des freigesetzten p-Nitroanilins bei 390 nm (molarer Extinktionskoeffizient $11,5 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$) am Spektrophotometer Spekol 21 (Carl Zeiss Jena, Küvettenstärke 1 cm) vorgenommen. Zu jeweils 100 µl Probe in 50 mM Phosphatpuffer (50 mM MOPS/NaOH, zytosolische Fraktion in 10 mM HEPES-Puffer) mit Zusatz von 2 mM DTT, wurden 100 µl einer 5 mM Alanyl-p-Nitroanilid-Lösung in 50 mM Phosphatpuffer gegeben. 100 µl des erhaltenen Reaktionsansatzes wurden für 30 bis 120 Minuten bei 37°C unter leichtem Schütteln (Thermomixer 5436, Eppendorf) inkubiert, wonach die Reaktion durch Zugabe von 400 µl 1 M Acetatpuffer (pH 4.2) beendet wurde. Entsprechend wurde die spontane Hydrolyse des Ala-pNA in 50 mM Phosphatpuffer in der jeweiligen Reaktionszeit bestimmt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation (6000×g, Raumtemperatur, Biofuge 13, Heraeus) wurde die Extinktion des Überstandes bei 390 nm gemessen. Die Extinktionsdifferenz ΔE wurde durch Subtraktion des nach 0 Minuten Reaktionszeit

erhaltenen Extinktionswertes ΔE_0 vom Extinktionswert ΔE_t nach 30-120 Minuten Inkubation errechnet. Die Aminopeptidase-Aktivität A nach der folgenden Formel berechnet:

$$A = \frac{\Delta E \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot t \cdot v}$$

A = Aminopeptidase-Aktivität [kat/ml]

V = Ansatzvolumen [ml]

ΔE = Extinktionsdifferenz

t = Reaktionszeit [s]

v = Probenvolumen [ml]

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

ε = molarer Extinktionskoeffizient des p-Nitroanilins [cm^2/mol]

Neben Ala-pNA wurde H-Met-pNA (Bachem), L-Leu-pNA (Sigma), L-Arg-pNA (Sigma), L-Pro-pNA (Sigma) und Gly-pNA (Sigma) mit einer Konzentration von jeweils 2,5 mM eingesetzt. Die Bestimmung erfolgte analog wie für Ala-pNA.

3.4.4 BESTIMMUNG DER EFFEKTORENWIRKUNG AUF DIE AMINOPEPTIDASE-AKTIVITÄT

Zur Charakterisierung der Aminopeptidase-Aktivität im Zytosol der H9-Zellen wurden Aminopeptidasen-Effektoren in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt:

Aminopeptidase-Inhibitoren: RB 3014 (bereitgestellt von B.P.Roques, Paris), Phebestin (Serva), Puromycin (Serva), Actinonin (Serva), Probestin (bereitgestellt von T.Aoyagi, Tokio), Bestatin (Serva), PAQ 22 (bereitgestellt von Y. Hashimoto, Tokio): von 1 nM bis 1 mM;

EDTA (Merck): von 0,1 μM bis 1 mM;

o-Phenanthrolin (Sigma): von 1 μ M bis 10 mM;

Iodacetamid (IAA, Sigma) von 0,1 μ M bis 0,1 M; für diese Untersuchung wurde zAAP ohne Zusatz von Thiolreagentien isoliert und in PBS Puffer pH 8,0 (siehe 3.1) umgepuffert.

DTT (Roth): von 1 bis 50 mM; für diese Untersuchung wurde zAAP ohne Zusatz von Thiolreagentien isoliert.

Kationen: 0,1 mM und 1mM;

Chloridionen: von 0,05 bis 1 mM.

Alle Effektoren wurden mit der jeweiligen Probe bei 37°C 15 Minuten vorinkubiert und anschließend wurde die Aminopeptidase-Aktivität bestimmt (vgl.3.4.3).

Als Kontrolle diente zAAP aus der T-Zelllinie H9 (bzw. APN aus humaner Niere, bereitgestellt von T. Kähne, Magdeburg) ohne Zusatz von Effektoren, deren Aktivität als 100 % angenommen wurde.

Die verwendeten Puffersysteme: 50 mM Phosphatpuffer, 2 mM Zusatz von DTT, pH 6,5; 50 mM MOPS/NaOH, 2 mM Zusatz von DTT, pH 6,5; PBS, pH 8,0.

3.4.5 METHODEN ZUR ERMITTLUNG DER ENZYMKINETISCHEN KONSTANTEN

Unter definierten Reaktionsbedingungen sind die Größen K_m und V_{max} der Michaelis-Menten-Kinetik charakteristische Konstanten für das jeweilige Enzym. K_m ist ein Maß für die Substrataffinität des jeweiligen Enzyms und V_{max} bezeichnet die maximal mögliche Reaktionsgeschwindigkeit. Zur experimentellen Bestimmung dieser Konstanten wurden Messungen der Reaktionsgeschwindigkeit der enzymkatalysierten Reaktion in Abhängigkeit von der Substratkonzentration durchgeführt. Für diese Untersuchung wurden unterschiedliche Konzentrationsbereiche benötigt. Ala-pNA wurden im Bereich von 0,025-1,50 mM und Met-pNA im Bereich von 0,002 bis 0,4 mM im Reaktionsgemisch eingesetzt. Arginin-pNA und Leucin-pNA mussten in niedrigeren Substratkonzentrationen von 0,004-0,2 mM (Arg-pNA) bzw.

0,001-0,06 mM (Leu-pNA) untersucht werden, da der Sättigungsbereich schneller erreicht wurde.

Zur Messung wurden 0,9 ml des gereinigten Enzyms (0,56 µg pro Ansatz) zunächst 2 Minuten bei 37°C präinkubiert und anschließend 0,1 ml des entsprechenden Substrates in der jeweiligen Konzentration zugesetzt. Innerhalb von 5 Minuten wurde der Umsatz des Substrates bei 37°C mit Hilfe eines Spektrophotometers (Cary 100, Varian) ermittelt. Die Berechnung der Enzymaktivitäten erfolgte mittels des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ des para-Nitroanilins, der bei einer Wellenlänge von 390 nm $11,5 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ beträgt.

Zur Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante (K_m) und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max}) wurde die graphische Methode nach Lineweaver-Burk verwendet, der eine Linearisierung der Michaelis-Menten-Gleichung zugrunde liegt.

Michaelis-Menten-Gleichung:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

V = die Geschwindigkeit einer Enzymreaktion

V_{\max} = die maximale Geschwindigkeit der Reaktion bei hohen Substratkonzentrationen

K_m = Michaelis-Menten Konstante

$[S]$ = Substratkonzentration

Durch Umformung der Michaelis-Menten-Gleichung in ihre reziproke Form entsteht die Gleichung:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Das Auftragen der reziproken Reaktionsgeschwindigkeit ($1/V$) gegen den reziproken Wert der Substratkonzentration ($1/[S]$) ergibt eine Gerade, die der allgemeinen Form

$y = ax + b$ gehorcht, wobei a die Steigung und b den Schnittpunkt mit der Ordinate ausdrückt.

Dabei ist:

$$\frac{1}{V} = y; \frac{1}{[S]} = x; \frac{K_m}{V_{\max}} = a; \frac{1}{V_{\max}} = b$$

Daraus ergibt sich für K_m und V_{\max} :

$$\frac{1}{b} = V_{\max} \quad \text{und} \quad \frac{a}{b} = K_m$$

Die Maximalgeschwindigkeit geteilt durch die Enzymkonzentration $[E_0]$ ergibt die Katalysekonstante [130].

$$\frac{V_{\max}}{[E_0]} = k_{\text{cat}}$$

3.4.6 ANALYSE DER SPALTUNG VON PEPTIDEN MIT HILFE DER KAPILLARELEKTROPHORESE (CE)

Eingesetzte Peptide: MK-Bradykinin (Bachem), Tuftsin (Bachem), CCK(3-8) (Bachem), GRP(14-27) (Bachem). Das humane Interleukin-2 (IL-2), Met-Interleukin-2 (Met-IL-2), HIV-1 Tat (1-9) und das Peptidfragment Val-Lys-Pro-Phe-Tyr wurden von J.Faust und K.Neubert (Halle) synthetisiert.

Der Reaktionsansatz bestand aus 3 μl (60 μkat pro Ansatz) gereinigter Aminopeptidase aus der H9-Zelllinie und 2 μl einer Lösung (1 mM) des jeweiligen Substrates. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 37°C. Parallel dazu wurden Kontrollproben ohne das Enzym angesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 μl 30 mM Phosphorsäure mit internem Standard (500 μM His) gestoppt, die Proben 4 min bei 14000 \times g zentrifugiert und der Überstand vom Sediment getrennt. Der Reaktionsansatz wurde dann mittels Kapillarelektrophorese (Biofocus, Bio-Rad)

analysiert. Die Kapillare (24 cm Länge, 25 µm Innendurchmesser, Bio-Rad) wurde mit 0,1 M Phosphatpuffer und mit linearem Polymer (Bio-Rad) gefüllt. Die aufbereiteten Proben wurden unter Druck in die Kapillare injiziert und bei einer elektrischen Spannung von 14kV getrennt. Die Absorption der Produkte wurde bei 200 nm detektiert. Die entstandenen Produkt-„Peaks“ wurden für jedes Substrat gegen die Kontrollprobe ausgewertet und als relative Werte dargestellt. Als signifikant wurde eine relative Spaltungsrate von über 10% angenommen.

Die Kapillarelektrophorese nach der Peptidspaltung wurde in Zusammenarbeit mit S. Wrenger durchgeführt.

3.5 BESTIMMUNG DER MRNA-EXPRESSION IN T-ZELLEN

3.5.1 PRÄPARATION MONONUKLEÄRER ZELLEN UND T-ZELL-ANREICHERUNG

Mononukleäre Zellen wurden durch Dichtegradienten-Zentrifugation aus heparinisiertem Blut gesunder Spender erhalten [23]. Von diesen Zellen erfolgte im Anschluss die Präparation peripherer T-Zellen mittels Nylon-Adhärenz-Technik [66]. Die Reinheit der Zellpopulation wurde durch eine FACS-Analyse verifiziert. Der Anteil der CD3-positiven Zellen sollte mehr als 92% der Gesamtzellzahl betragen. Die angereicherten T-Zellen wurden in AIM-V-Medium (Gibco) supplementiert mit 10% (v/v) FCS (Gibco) und 60 IU Penicillin/ml (Gibco), über Nacht bei 37°C, 97% Luftfeuchtigkeit, 6% CO₂ in einem Sterikult 200 inkubiert (Forma Scientific) und danach für die jeweiligen Versuche eingesetzt.

3.5.2 STIMULATION DER T-ZELLEN

Die T-Zell-Stimulantien wurden in den folgenden Endkonzentrationen im Kulturmedium verwendet:

PMA (Sigma)	10 ng/ml
PHA-L (Roche Diagnostics)	1 µg/ml
PWM (Serva)	2 µg/ml

Die Stimulation wurde sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit der folgenden APN-Inhibitoren durchgeführt:

Actinonin (Serva)	10 µM
Leuhistin (Sigma)	10 µM
RB 3014 (bereitgestellt von B.R.Roques, Paris)	0,1µM.

Jeweils 10×10^6 Zellen/well (3×10^6 Zellen/ml Medium) wurden in Zellkultur-Platten (Nunc) 24 Stunden bei 37°C, 97% relativer Luftfeuchte und 6% (V/V) CO₂ in einem Sterikult 200 (Forma Scientific) inkubiert.

Die quantitative Bestimmung der IL-2-mRNA-Gehalte (vgl. 3.5.5) von ruhenden und aktivierten T-Lymphozyten diente der Kontrolle der T-Zell-Aktivierung. In allen Experimenten überstiegen die IL-2-mRNA-Gehalte 24 Stunden nach Aktivierung die der ruhenden Zellen um mindestens das 100fache.

3.5.3 RNA-ISOLATION

Die Präparation totaler RNA aus Zelllinien erfolgte unter Verwendung des RNeasy-Mini-Kits der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden 2×10^7 Zellen eingesetzt, die nach der Ernte mindestens einmal in PBS gewaschen wurden. Die erhaltene RNA wurde mit DNase für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend einer erneuten Reinigung mit Hilfe der RNeasy-Zentrifugationssäulen unterzogen. Die Quantifizierung der erhaltenen DNA-freien totalen RNA erfolgte spektrophotometrisch am GeneQuant (Pharmacia). Der Quotient aus der OD₂₆₀ und

OD₂₈₀ war bei allen RNA-Präparationen zwischen 1,8 und 2,05. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

3.5.4 REVERSE TRANSKRIPTION

Für die nachfolgende enzymatische Amplifikation (RT-PCR) wurden 1 µg DNA-freie totale RNA mit Hilfe von AMV Reverser Transkriptase und random-hexameren Oligonukleotiden in Erststrang-cDNA umgeschrieben.

Ein typischer Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

1 µg RNA	
2 µl random-hexamere Oligonukleotide	(0,5 µg/µl, Roche Diagnostics)
1 µl RNase-Inhibitor aus humaner Plazenta	(40 U/µl, Ambion)
2 µl AMV reverse Transkriptase	(15 U/µl, Stratagene)
2 µl dNTP	(je 25 mM, InViTec)
4 µl 5× Reaktionspuffer	(Stratagene)
MilliQ-Wasser ad 20 µl	

Alle Komponenten wurden zunächst 45 Minuten bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA-Reaktionsmischung für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und dann auf Eis gestellt. Die Erststrang-cDNA wurde bis zur Verwendung in der PCR bei -20°C gelagert.

3.5.5 QUANTITATIVE RT-PCR

Zur quantitativen Bestimmung der Kopienzahl spezifischer mRNA mittels RT-PCR wurde der Lightcycler LC24 (Idaho Technology) verwendet. Der Lightcycler erlaubt die direkte Quantifizierung von PCR-Produkten sowie der für die PCR verwendeten Ausgangsmengen von „template“-cDNA. Dabei wird über die periodische Bestimmung der Fluoreszenzintensität des dsDNA-spezifischen Farbstoffes SYBR™Green der Zuwachs an PCR-Produkt in Abhängigkeit von der Zeit 35 PCR-

Zyklen gemessen. Durch die zugehörige Software wird nachfolgend die Ausgangsmenge „template-mRNA“ kalkuliert. Die PCR wurde in verschließbaren Glaskapillaren (Idaho Technology) und in einem Reaktionsvolumen von 10 µl durchgeführt.

Ein typischer Reaktionsansatz hatte die folgende Zusammensetzung:

1 µl cDNA

1 µl 2 mM dNTP (MBI Fermentas)

1 µl INViTaq (0,4 units, Invitrogen)

1 µl 10×Reaktionspuffer (10 mM MgCl₂, Idaho Technology)

0,3 µl SYBR™Green I (1:1000)

1 µl Primer* (je 5 µM) (BioTeZ)

MilliQ-Wasser ad 10 µl.

* Primer:

zAAP: forward 5`- AGGTGCGCTATGCTGCTGTA

reverse 5`- TTGCGTTAGAGGTTGCTGCT und

für die Kontrolle der T-Zell-Aktivierung:

IL-2: forward 5`-ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTT

reverse 5`- GTCAGTGTTGAGATGATGCTTTGAC

Das Amplifikationsprotokoll setzte sich aus folgenden Teilprogrammen zusammen:

Anfangsdenaturierung 95°C; 2 Minuten

35 Zyklen:

 Primerhybridisierung 60°C ; 30 Sekunden

 Primerverlängerung 72°C; 30 Sekunden

 Denaturierung 95°C; 30 Sekunden

Finale Verlängerung:

 Primerhybridisierung 60°C ; 30 Sekunden

 Primerverlängerung 72°C; 5 Minuten

Schmelzkurve

Anstieg von 72°C auf 95°C, 5 Minuten;
kontinuierliche Messung der Fluoreszenz

Die Auswertung verschiedener Stimulationsexperimente erfolgte durch den Vergleich der mRNA-Gehalte mit Hilfe des Anova-Testes, wobei ein p-Wert von $<0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurde.

