

4 ERGEBNISSE

4.1 ISOLATION UND IDENTIFIKATION EINER AMINOPEPTIDASE AUS DER T-ZELLINIE H9

Die Isolierung der unbekanntes zytosolischen Aminopeptidase mit Ala-pNA hydrolysierender Aktivität aus der T-Zelllinie H9 erfolgte chromatographisch in drei Schritten unter Nutzung eines FPLC-System. Diese Schritte waren im Einzelnen: Gelchromatographie über Sepharose 6B, Ionenaustausch-Chromatographie über Hydroxylapatit und über einen starken Anionenaustauscher (Mono Q).

4.1.1 GELCHROMATOGRAPHIE MIT SEPHAROSE 6B.

Die gewonnene zytosolische Fraktion von $0,88 \times 10^9$ H9-Zellen wurde in der Gelfiltrationschromatographie über Sepharose 6B aufgrund ihrer Proteingröße aufgetrennt. Das Elutionsprofil mit den korrespondierenden Ala-pNA-hydrolysierenden Aktivitäten zeigte (Abbildung 2), dass das gesuchte Protein sich in einer heterogenen Proteingruppe befindet. In diesem Reinigungsschritt wurde das Enzym um den Faktor 1,6 mit einer 54%igen Aktivitätsausbeute angereichert (siehe Tabelle 3).

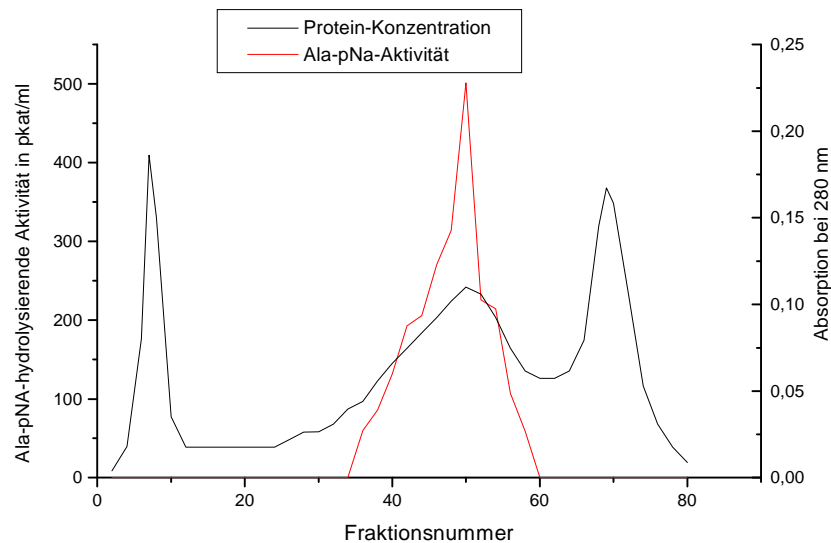


Abbildung 2: Diagramm der chromatographischen Trennung der Alanyl-Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9 mittels Sepharose 6B. Es wurde der Verlauf der Ala-pNA-hydrolysierenden Aktivität in den Fraktionen zusammen mit dem Verlauf der Proteinkonzentration dargestellt.

4.1.2 HYDROXYLAPATIT-CHROMATOGRAPHIE

Die unterschiedliche Adsorptionsfähigkeit zytosolischer Proteine an Hydroxylapatit wurde genutzt, um das Ala-pNA-hydrolysierende Enzym weiter zu reinigen. Die in den Fraktionen gemessenen Ala-pNA-hydrolysierenden Aktivitäten wurden in das Protein-Elutionsprofil integriert. In Abbildung 3 wurde das Beladungs- und Elutionsprofil dieses Schrittes dargestellt (für Einzelheiten siehe 3.2.3). Wie in der Abbildung ersichtlich ist, befanden sich die Fraktionen mit Ala-pNA-hydrolysierender Aktivität im Bereich von 23 bis 27% des Elutionspuffers (entspricht 57,5 bis 67,5 mM Phosphatpuffer).

Es wurde eine Anreicherung des Proteins um den Faktor 44,3 bei einer, bezogen auf die Ausgangsmenge, 48%igen Aktivitätsausbeute mit diesem Reinigungsschritt erreicht (vgl. Tabelle 3).

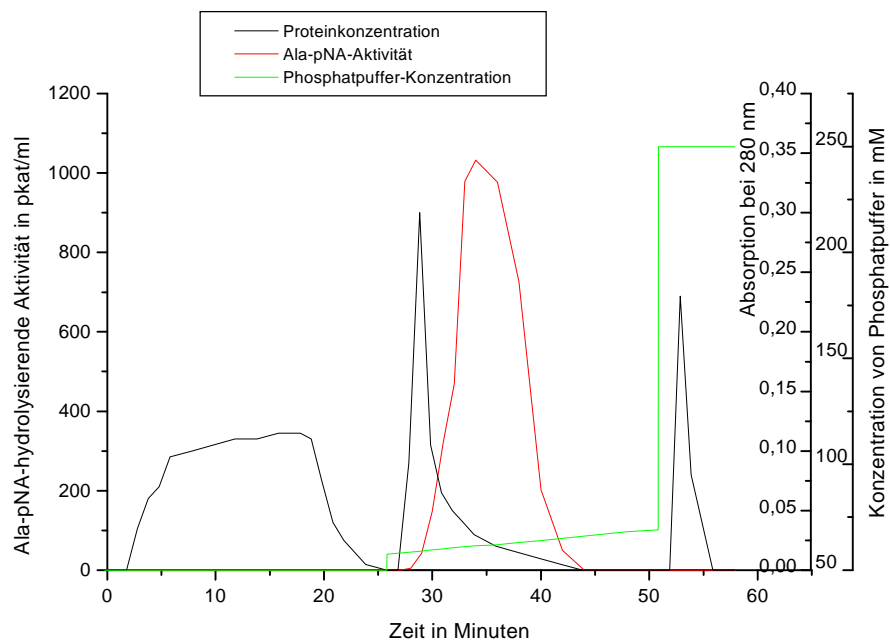


Abbildung 3: Profil der chromatographischen Trennung mittels Hydroxylapatit. Neben der Darstellung der Aktivität des Enzyms in den Fraktionen, wurde der Verlauf der Proteinkonzentration in Bezug zur ansteigenden Konzentration des Phosphatpuffers dargestellt.

4.1.3 IONENAUSTAUSCHER MIT MONO Q

Die im vorherigen Schritt (4.1.2) teilgereinigten Proteine wurden an eine starke Anionenaustauschermatrix (Mono Q) gebunden und mit einer stufenweise steigenden Konzentration von NaCl eluiert. Das Protein mit der Ala-pNA-hydrolysierenden Aktivität konnte dabei vollständig bei einer Salzkonzentration von 0,175 M isoliert werden (Abbildung 4). Durch diesen Schritt wurde das Enzym um den Faktor 777 angereichert, bei einer Aktivitätsausbeute von 16,5% (Tabelle 3).

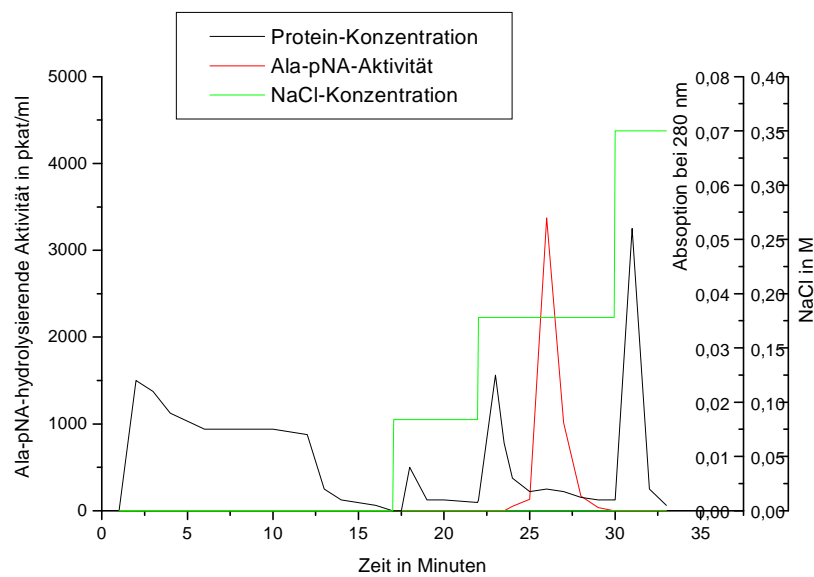


Abbildung 4: Darstellung des Verlaufes der chromatographische Trennung der Alanyl-Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9 mittels starkem Anionenaustauscher im Bezug zur NaCl-Konzentration.

Das gesamte Reinigungs-Protokoll für das Ala-pNA-hydrolysierende Protein der T-Zelllinie H9 wurde mit den einzelnen Teilschritten und den erzielten Ergebnissen in der Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Reinigungs-Protokoll der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase aus der 0,88 Mrd H9 T-Zellen.

Isolationsschritt	Protein in mg	Aktivität in nkat	Spezifische Aktivität in nkat/mg	Ausbeute in %	Anreicherungs- faktor
Zytosolische Fraktion	61,05	41,34	0,68	100	1
Sepharose 6 B	19,87	22,1	1,1	54	1,6
Hydroxylapatit	0,660	19,8	30	48	44,3
Mono Q	0,013	6,84	526	16,5	777

Das gereinigte Enzym wurde mittels einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) dargestellt. Es wurde in einem 4-12 %igem Gel unter reduzierenden (Bahn 1) bzw. unter nicht-reduzierenden (Bahn 2) Bedingungen als eine Proteinbande mit einem Molekularmasse von 101 kDa sichtbar (Abbildung 5).

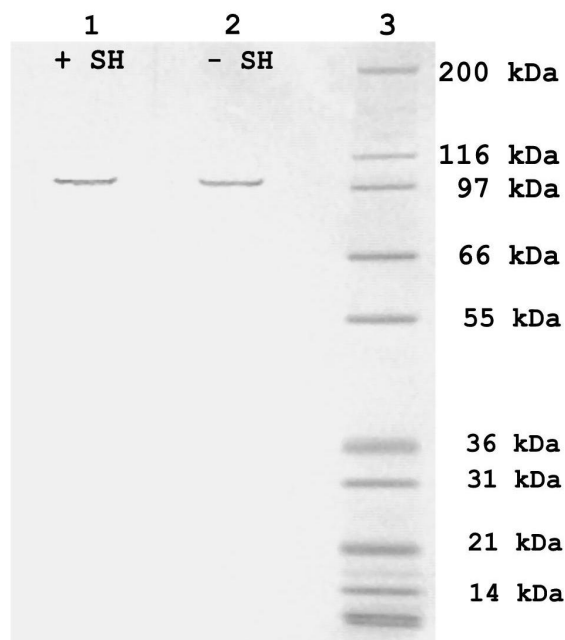


Abbildung 5: Darstellung der gereinigten Aminopeptidase der T-Zelllinie H9 mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Nach Auftrennung der Proteine in einem 4-12 %igem Polyacrylamidgel wurden die Proteinbanden mit einer Coomassie-Färbung visualisiert.

Bahn 1 = 0,5 µg des gereinigten Enzyms in Anwesenheit von 2-ME;

Bahn 2 = 0,5 µg des gereinigten Enzyms in Abwesenheit von 2-ME;

Bahn 3 = Proteinmarker (Mark 12, Novex).

4.1.4 IDENTIFIKATION MITTELS MASSENSPEKTROSKOPIE

Die Bande des isolierten Proteins (vgl. Abbildung 5) wurde ausgeschnitten, im Gel einer Trypsin-Verdauung unterzogen und die aus dieser Verdauung resultierenden Peptidfragmente unter Nutzung des MALDI-TOF-Massespektrometers analysiert. Es wurden insgesamt 15-Peptidfragmente untersucht. Im Ergebnis konnte eine 100%ige Identität des untersuchten Proteins mit der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase (EC 3.4.11.14; zAAP; Puromycin-sensitive Aminopeptidase; PSA) nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 6).

1	MWLAAAAPSL	ARRLLFLGPP	PPLLLLLVFS	RSSRRRLHSL	GLAAMPEKRP
51	FERLPADVSP	INYSLCLKPD	LLDFTFEGKL	EAAAQVRQAT	NQIVMNCADI
101	DIITASYAPE	GDEEIHATGF	NYQNEDEKVT	LSFPSTLQTG	TGTLKIDFVG
151	ELNDKMKGFY	RSKYTTPSGE	VRYA AVTQFE	ATDPRRAFPC	WDEPAIKATF
201	DISLVVPKDR	VALSNMNVID	RKPYPDENL	VEVKFARTPV	MSTYLVAFVV
251	GEYDFVETRS	KDGV CVRVYT	PVGKAEQGKF	ALEVA AKTLP	FYKDYFNVPY
301	PLPKIDLIAI	ADFAAGAMEN	WGLV TYRETA	LLIDPKNSCS	SSRQWVALVV
351	GHELAHQWFG	NLVTMEWETH	LWLNEGFASW	IEYLCVDHCF	PEYDIWTQFV
401	SADYTRAQEL	DALDNSHPIE	VSVGHPSEVD	EIFDAISYSK	GASVIRMLHD
451	YIGDKDFKKG	MNMYLTKFQQ	KNAATEDLWE	SLENASGKPI	AAVMNTWTQK
501	MGFPLIYVEA	EQVEDDRLLR	LSQKKFCAGG	SYVGEDCPQW	MVPITISTSE
551	DPNQAKLKIL	MDKPEMNVVL	KNVKPDQWVK	LNLGTVGFYR	TQYSSAMLES
601	LLPGIRDLSL	PPVDR LGLQN	DLFSLARAGI	ISTVEVLKVM	EAFVNEPNYT
651	VWSDLSCNLG	ILSTLLSHTD	FYEIQEFVK	DVFSPIGERL	GWDPKPGEGH
701	LDALLRGLVL	GKLGKAGHKA	TLEEARRRFK	DHVEGKQILS	ADLRSPVYLT
751	VLKHGDGTTL	DIMLKLHKQA	DMQEEKNRIE	RVLGATLLPD	LIQKVLTFAL
801	SEEV RPQDTV	SVIGGVAGGS	KHGRKAAWK F	IKDNWEELYN	RYQGGFLISR
851	LIKLSVEGFA	VDKMAGEVKA	FFESH PAPSA	ERTIQCCEN	ILLNAAWLKR
901	DAESIHQYLL	QRKASPPTV			

Abbildung 6: Aminosäure-Sequenz der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase (EC 3.4.11.14; zAAP; Puromycin-sensitive Aminopeptidase; PSA). Die identifizierten Peptid-Fragmente des aus der T-Zelllinie H9 untersuchten Enzyms wurden rot hervorgehoben.

4.2 CHARAKTERISIERUNG DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE DER T-ZELLINIE H9

4.2.1 BESTIMMUNG DER ABHÄNGIGKEIT DER ALA-pNA HYDROLYSIERENDEN AKTIVITÄT VOM pH-WERT

Die Untersuchungen wurden in drei Puffersystemen (Phosphatpuffer, Tris-HCl und Citrat-Phosphatpuffer) in einem pH-Bereich von 5,0 bis 9,0 durchgeführt (vgl. 3.4.3). Die höchste Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase konnte bei einem pH-Wert von 6,5 ermittelt werden.

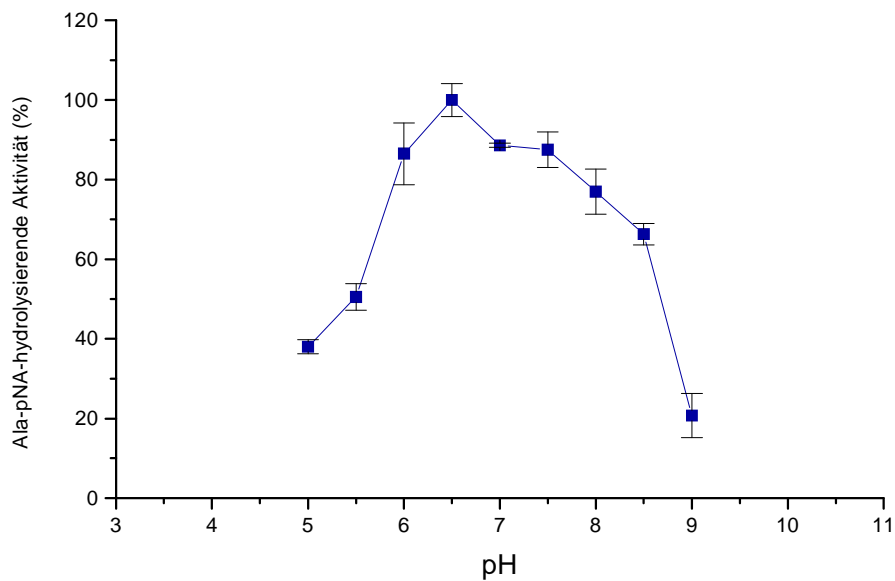


Abbildung 7: Abhängigkeit der Ala-pNA-hydrolysierenden Aktivität der gereinigten zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase vom pH-Wert. (n=4, MW \pm SD<10%)

4.2.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR STABILITÄT DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE

Stabilisierende Wirkung von DTT.

Die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase (zAAP) benötigt zum Erhalten der enzymatischen Aktivität die Anwesenheit von Thiolgruppen-Reagenzien. In unseren Untersuchungen (vgl. 3.4.3) hatte sich Dithiothreitol (DTT) in einer Konzentration von 2 mM (vgl.4.2.4) als ein wirksamer Stabilisator der zAAP erwiesen (Abbildung 8).

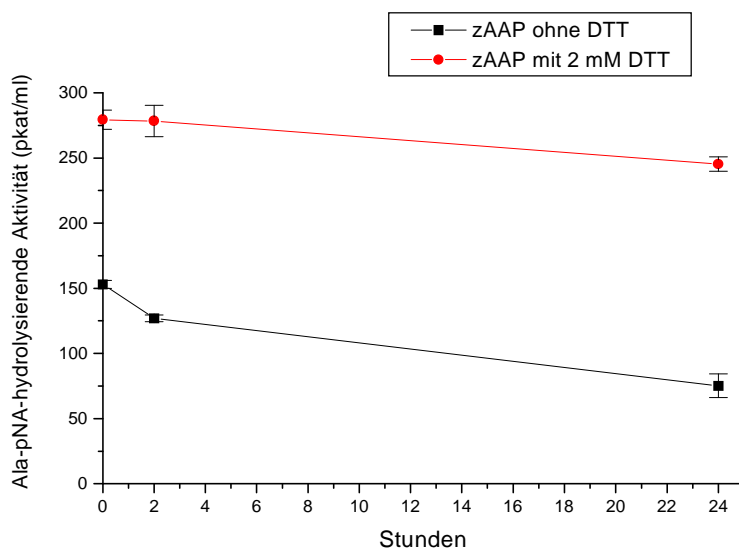


Abbildung 8: Stabilisierende Wirkung von DTT auf die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase.

Das gereinigte Enzym wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden mit und ohne 2 mM DTT in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,5) bei 4°C aufbewahrt. Anschließend wurde die Ala-pNA hydrolysierende Aktivität bestimmt (siehe 3.4.3.). Gezeigt wurde das Ergebnis eines von drei Versuchen.

Bestimmung der Aufbewahrungsbedingungen

Die beste Aufbewahrungstemperatur lag bei -70°C (siehe Tabelle 4). Die Aktivitätsverluste der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase betragen dabei innerhalb eines Monats bis zu 17 % und konnten durch Zusatz von 20 % Glycerol fast vollständig verhindert werden.

Deutliche Aktivitätsverluste des gereinigten Enzyms konnten hingegen bei den anderen untersuchten Temperaturen festgestellt werden. Eine Aufbewahrung des Enzyms bei -20°C bzw. 4°C verlangt immer einen 20 %igen Glycerol-Zusatz, um das Enzym weitestgehend zu stabilisieren (Tabelle 4).

Tabelle 4: Einfluss von Temperatur und Zusatz von Glycerol auf die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität der gereinigten zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase.

Die gereinigte zAAP wurde in 50 mM Phosphatpuffer, pH 6,5 mit 2 mM DTT und mit 20 % Glycerol-Zusatz (bzw. ohne Glycerol) bei verschiedenen Temperatur aufbewahrt. Nach 7 oder 26 Tage erfolgte die Messung der Ala-pNA hydrolysierenden Aktivität (siehe 3.4.3.). Die gemessenen Aktivitäten wurden mit den Aktivitäten der Kontrolle (Aktivitäten – Tag 0) verglichen. Es wurden Mittelwerte und die Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Aufbewahrungs- Temperatur	Untersuchungs- zeitraum	Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität in %	
		Kontrolle	20 % Glycerol
-70°C	7 Tage	88±2	92±3
	26 Tage	83±4	92±3
-20°C	7 Tage	78±3	85±5
	26 Tage	43±5	74±6
4°C	7 Tage	43±4	73±4
	26 Tage	39±5	64±2

4.2.3 SUBSTRATSPEZIFITÄT DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE UND ENZYMKINETISCHE DATEN

Spezifität gegenüber Aminoacyl-para-Nitroanilid (pNA)-Derivaten

Die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase spaltet ein breites Spektrum von Substraten. Von den para-Nitroanilid-Derivaten wurden folgende Aminosäuren (AS) effektiv abgespalten (vgl. auch Tabelle 5):

- AS mit unverzweigter, aliphatischer Seitenkette (Alanin)
- AS mit verzweigter, aliphatischer Seitenkette (Leucin)
- AS mit einer Seitenkette, die ein Schwefelatom enthält (Methionin)
- oder AS mit einer Seitenkette, die eine Aminogruppe enthält (Arginin).

Tabelle 5: Spaltungsfähigkeit von verschiedenen para-Nitroaniliden durch die zytosolische Aminopeptidase

Die verschiedenen Substrate wurden einheitlich in einer Konzentration von 2.5 mM eingesetzt. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte wie unter 3.4.3 beschrieben.

Substrate	Relative Spaltung (%)	±SD (%)
Met-pNA	127	4
Ala-pNA	100	2
Arg-pNA	54	2
Leu-pNA	42	4
Pro-pNA	6	2
Gly-pNA	4	2

Bestimmung der kinetischen Konstante verschiedener pNA-Derivate

Die am besten umgesetzten Substrate (vgl. Tabelle 5): Ala-pNA, Met-pNA, Leu-pNA und Arg-pNA wurden ausgewählt, um deren Affinität zur zAAP zu bestimmen. Um für das jeweilige Substrat eine Sättigung im Reaktionsansatz zu erreichen, wurden

unterschiedliche Substratskonzentrationen benötigt. Für jedes Substrat erfolgte die Bestimmung der Abhängigkeit zwischen Hydrolysegeschwindigkeit und Substratkonzentrationen (Abbildung 9 – 12). Aus den erhaltenen Daten wurde die Michaelis-Menten-Konstante und die maximale Geschwindigkeit mittels der graphischen Methode nach Lineweaver-Burk ermittelt (Abbildung 9 - 12).

Tabelle 6: Kinetische Parameter der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase für N-Acylparanitroanilid-Derivate.

Substrat	K_m (mM)	k_{cat} (nkat/ μ g)	k_{cat} / K_m (nkat/ μ g/mM)
Ala-pNA	0,217 \pm 0,02	0,180 \pm 0,044	0,83
Met-pNA	0,092 \pm 0,005	0,205 \pm 0,03	2,23
Arg-pNA	0,028 \pm 0,004	0,066 \pm 0,012	2,36
Leu-pNA	0,013 \pm 0,008	0,053 \pm 0,02	4,0

In Tabelle 6 wurden die gemessenen kinetischen Parameter der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase zusammengefasst. Die Analyse der K_m -Werte ergab, dass das Enzym die höchste Affinität gegenüber dem Leu-pNA Substrat besaß. Die Affinitätsreihenfolge stellte sich wie folgt dar: Leu > Arg > Met > Ala.

Der Quotient aus k_{cat} / K_m entspricht der Geschwindigkeitskonstante der Reaktion des freien Enzyms mit dem Substrat unter Bildung der Reaktionsprodukte und kann als ein Maß für die Effizienz des Substratumsatzes durch ein Enzym gewertet werden [130]. Bezüglich dem k_{cat} / K_m – Quotient schien Leu-pNA das beste Substrat für die zytosolische Alanyl-Amino-peptidase zu sein (Tabelle 6). Dann folgten Arg-pNA und Met-pNA. Ala-pNA stellte sich als das schlechteste Substrat der vier untersuchten para-Nitroanilide dar.

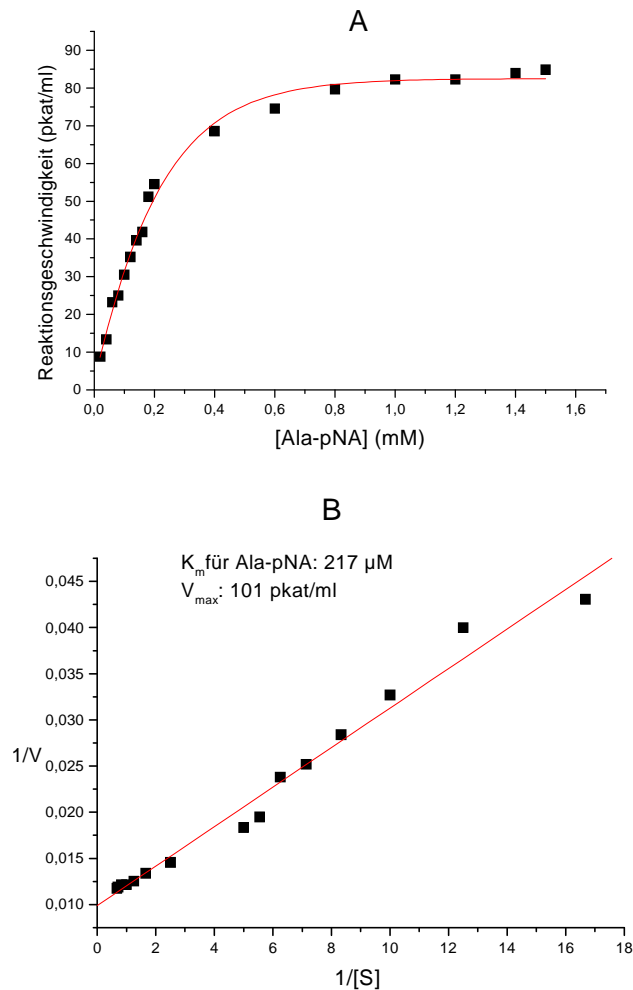


Abbildung 9: A: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (V) von der Konzentration des Ala-pNA-Substrats [S]. B: Graphische Ermittlung des K_m - und V_{max} -Wertes.

Das Substrat wurde in der Konzentration von 0,02 bis 1,50 mM eingesetzt (vgl. 3.4.5.). Gezeigt wird das Ergebnis eines von drei Versuchen. Der Korrelations-Koeffizient R^2 beträgt in diesem Fall 0,9800.

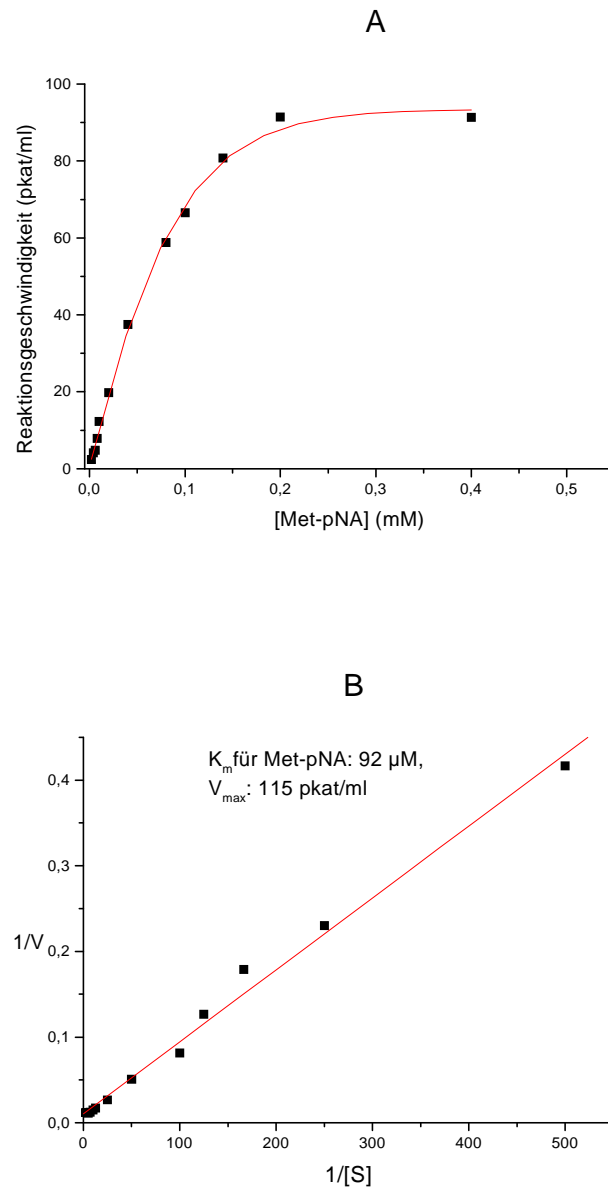


Abbildung 10: A: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (V) von der Konzentration des Met-pNA-Substrats $[S]$. B: Graphische Ermittlung des K_m - und V_{max} -Wertes.

Das Substrat wurde in der Konzentration von 0,002 bis 0,40 mM eingesetzt (vgl. 3.4.5.). Gezeigt wird das Ergebnis eines von drei Versuchen. Der Korrelations-Koeffizient R^2 beträgt in diesem Fall 0,9944.

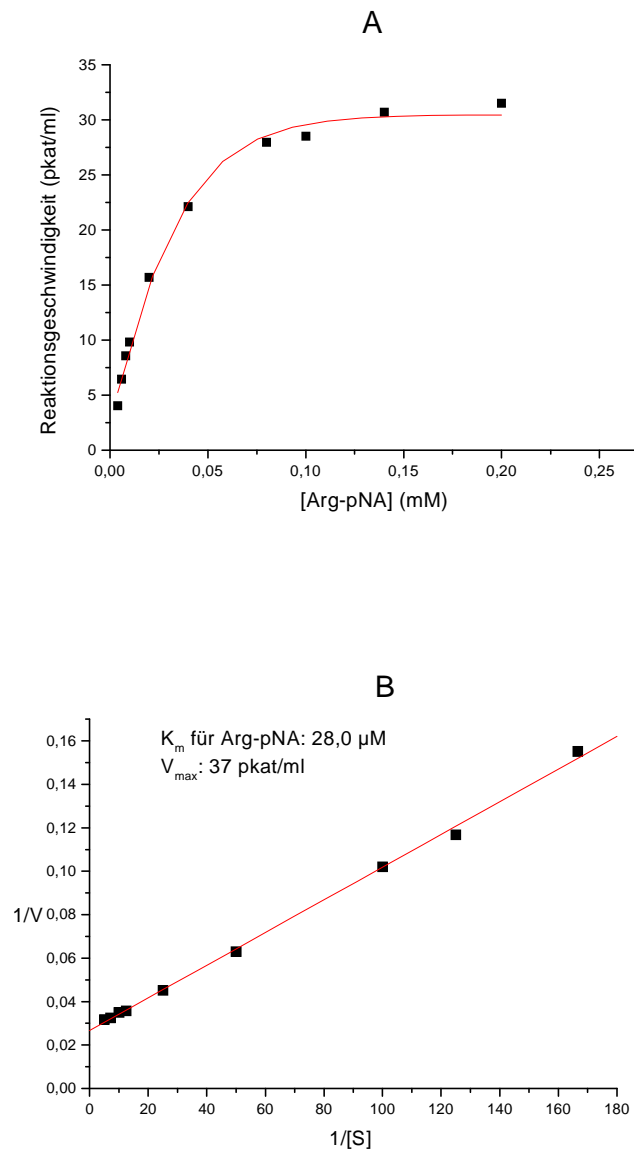


Abbildung 11:A: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (V) von der Konzentration des Arg-pNA-Substrats $[S]$. B: Graphische Ermittlung des K_m - und V_{max} -Wertes.

Das Substrat wurde in der Konzentration von 0,004 bis 0,20 mM eingesetzt (vgl. 3.4.5.). Gezeigt wird das Ergebnis eines von drei Versuchen. Der Korrelations-Koeffizient R^2 beträgt in diesem Fall 0,9949.

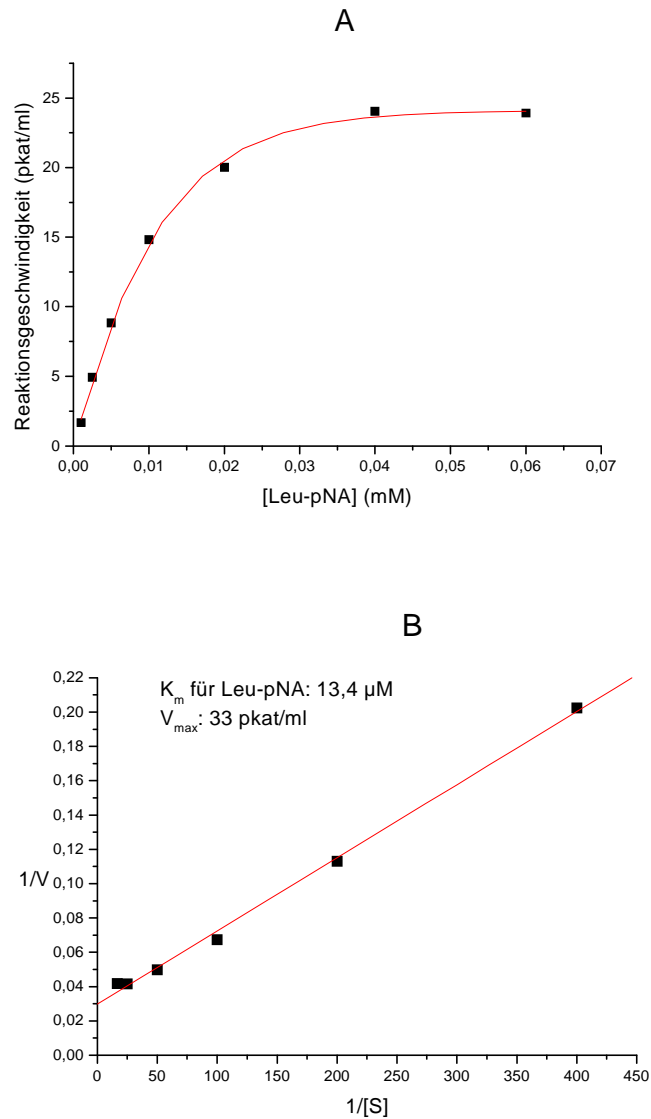


Abbildung 12: A: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (V) von der Konzentration des Leu-pNA-Substrats $[S]$. B: Graphische Ermittlung des K_m - und V_{max} -Wertes.

Das Substrat wurde in der Konzentration von 0,001 bis 0,06 mM eingesetzt (vgl.3.4.5.). Gezeigt wird das Ergebnis eines von zwei Versuchen. Der Korrelations-Koeffizient R^2 beträgt in diesem Fall 0,9902.

Spaltungsfähigkeit von Peptiden

Die Spaltungsfähigkeit der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase wurde an acht Peptiden untersucht:

- Cholecystokinin (CCK 3-8)
- Bradykinin (MK-Bradykinin)
- Interleukin-2 (IL-2)
- Met-Interleukin-2 (Met-IL-2, 1-12)
- Gastrin-freisetzendes Peptid (GRP)
- Tuftsin
- HIV-Tat (1-9)-Peptid
- Peptidfragment VKPFY

Die meisten dieser Peptidfragmente enthielten am N-Terminus ein Methionin. Trotzdem wurden sie unterschiedlich gespalten (vgl. Tabelle 7). Eine relativ gute Spaltungsrate von 46% konnte für Met-Interleukin-2 (1-12) ermittelt werden. Niedrigere Hydrolyseraten zeigten CCK (3-8) mit 17%, das Peptidfragment VKPFY mit 18% und Tuftsin mit 16%. MK-Bradykinin, GRP (14-20), IL-2 (1-12) und das Tat (1-9)-Peptid wurden nicht hydrolysiert (Effizienz unter 10%), obwohl sich ein Methionin am N-Terminus befand. Die Untersuchungen zeigten deutlich, dass die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase fähig ist, die von ihr bevorzugten Aminosäuren vom N-Terminus bestimmter Peptidfragmente zu spalten. Wie an den unterschiedlichen Spaltungsfrequenzen jedoch zu erkennen war, beeinflusste die Belegung der zweiten und wahrscheinlich weiterer Aminosäureposition vom N-Terminus des Peptidfragmentes die Fähigkeit zur Hydrolyse entscheidend.

Tabelle 7: Spaltungsfrequenz unterschiedlicher Peptidfragmente durch die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase.

Die Peptide wurden mit einer Konzentration von 0,4 mM eingesetzt und 30 min bei 37°C mit der gereinigten zAAP inkubiert (siehe 3.4.6). Die Bestimmung der Hydrolyserate erfolgte mittels Kapillar-Elektrophorese (CE). Eine erfolgreiche Spaltung wird bei einer Hydrolyserate von mehr als 10% angenommen.

Peptid	Sequenz	Anzahl der AS	Spaltung in %
Met-IL-2 (1-12)	MAPTSSSTKKTQL	13	46
VKPFY	VKPFY	5	18
CCK (3-8)	MGWMDF	6	17
Tuftsinsin	TKPR	4	16
Tat (1-9)	MDPVDPNIE	9	8
MK-Bradykinin	MKRPPGFSPFR	11	3
GRP (14-27)	MYPRGNHWAVGHLM	14	2
IL-2 (1-12)	APTSSSTKKTQL	12	2

4.2.4 EFFEKTOREN DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE

Einfluss des SH-aktiven Reagenzes.

Der Einfluss von DTT auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase ist konzentrationsabhängig. In einem Konzentrationsbereich von 1-10 mM DTT fand die Aktivierung der zAAP aus H9-Zellen statt. Die zweifache Erhöhung der Ala-pNA hydrolysierenden Aktivität wurde durch den Zusatz von 2 mM DTT erreicht. Die Konzentrationen von 25 mM oder 50 mM DTT hatten einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität der zAAP (vgl. Abbildung 13).

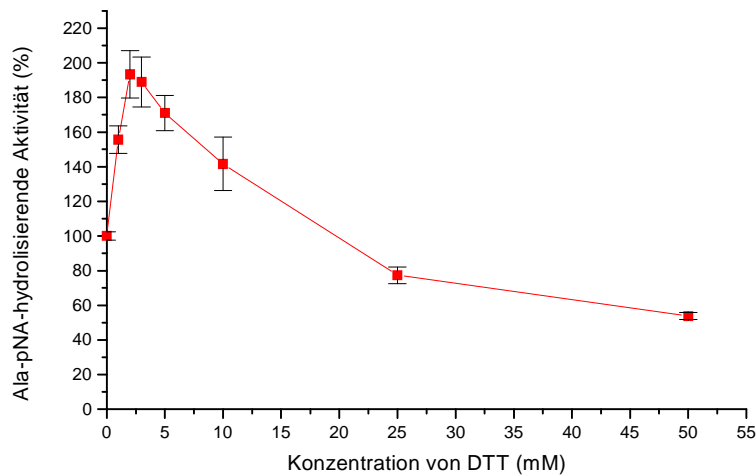


Abbildung 13: Einfluss des SH-aktiven Reagenzes Dithiothreitol (DTT) auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase.

Gereinigte zAAP im 50 mM Phosphatpuffer, pH 6,5 ohne Zusatz von Thiolreagenzien wurde mit entsprechender Konzentration von DTT 15 Minuten bei RT vorinkubiert und im Anschluss die Aktivität bestimmt (siehe 3.4.3.)(n=4, MW \pm SD <14 %).

Einfluss von Iodacetamid.

Thiolabhängige Proteasen können durch Reagenzien, die mit freien Thiolgruppen reagieren, inaktiviert werden. Iodacetamid bildet mit Thiolgruppen des Cysteins die Verbindung S-Carboxy-Amidomethylcystein [4]. Die Bildung dieser Verbindung innerhalb eines Enzyms kann zu einer Inaktivierung führen. Daher wurde der Einfluss von Iodacetamid auf die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität der zytosolischen (zAAP) und der membranständigen Alanyl-Aminopeptidase (APN) untersucht. Die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9 hatte sich in den Untersuchungen als eine Thiol-abhängige Protease erwiesen, da deren enzymatische Aktivität durch Iodacetamid beeinflusst werden konnte. Der IC₅₀-Wert betrug dabei 97,5 μ M (Tabelle 8). Im Gegensatz dazu wurde die membranständige Alanyl-Aminopeptidase nicht vom Thiolreagenzien beeinflusst (vgl. Abbildung 14).

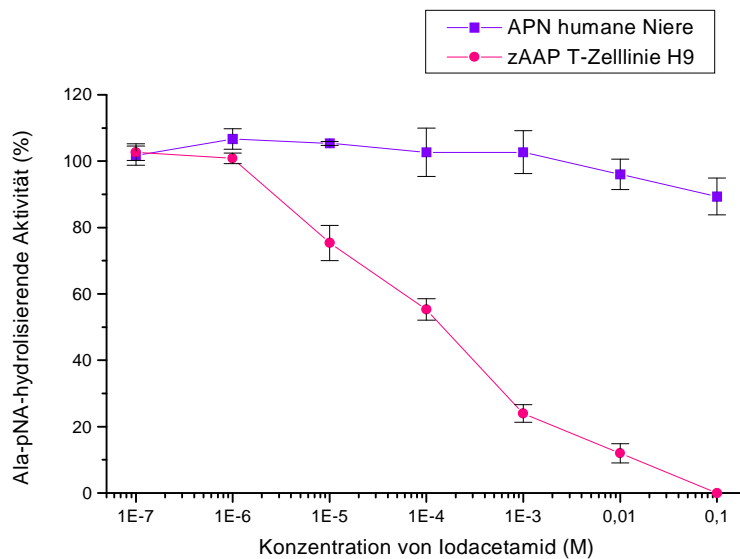


Abbildung 14: Vergleich: Iodacetamid-Einfluss auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase (zAAP) und der membranständigen Alanyl-Aminopeptidase (APN).

Gereinigte zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus H9-Zellen, bzw. gereinigte APN aus humanen Nieren wurden in PBS (pH8,0) ohne Zusatz von DTT 15 Minuten mit verschiedenen IAA-Konzentrationen bei 37°C vorinkubiert und im Anschluss wurde die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität bestimmt (siehe 3.4.3)(n=3, MW±SD <7 %).

Einfluss Chelat-bildender Effektoren.

Für die Untersuchung des Einflusses Chelat-bildender Effektoren auf die Aktivität der zAAP wurden EDTA und o-Phenanthrolin verwendet. Beide Verbindungen erwiesen sich als Inhibitoren, wobei jedoch ein Unterschied in der Empfindlichkeit der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase gegenüber diesen beiden Substanzen zu verzeichnen wurde (vgl. Abbildung15 und 16). EDTA erwies sich als der effektivere

Hemmstoff. Der berechnete IC_{50} Wert für diese Verbindung betrug $9,0 \mu\text{M}$. Für o-Phenanthrolin wurde ein IC_{50} Wert von $24 \mu\text{M}$ bestimmt (vgl. Tabelle 8).

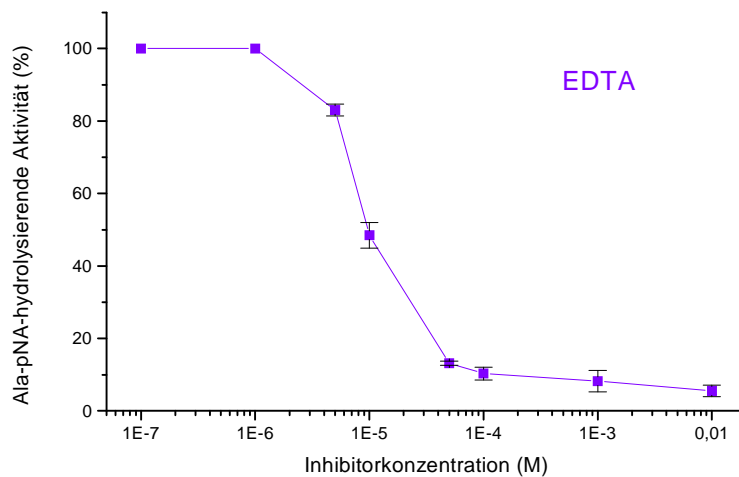


Abbildung 15: EDTA-Einfluss auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase

Gereinigte zAAP wurde mit den verschiedenen Konzentrationen von EDTA 15 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die Messungen erfolgten im 50 mM Phosphatpuffer, pH 6.5 mit Zusatz von 2 mM DTT. Im Anschluss wurde die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität bestimmt (siehe 3.4.3). (n=3, MW \pm SD <4 %).

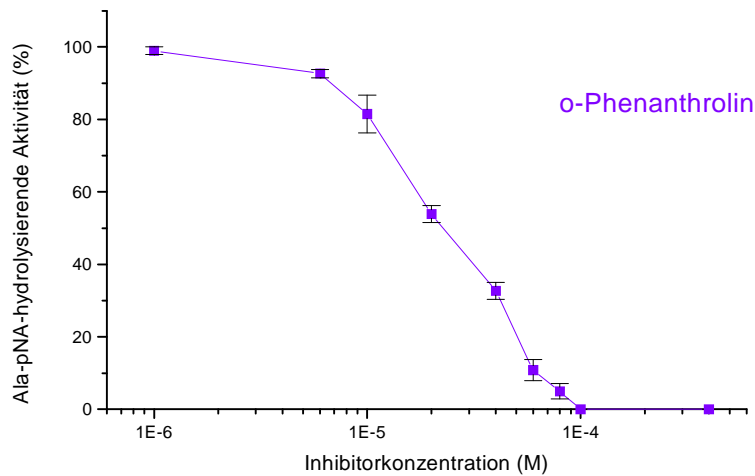


Abbildung 16: Einfluss von o-Phenanthrolin auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase

Gereinigte zAAP wurde mit den verschiedenen Konzentrationen von o-Phenanthrolin 15 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die Messungen erfolgten im 50 mM Phosphatpuffer, pH 6.5 mit Zusatz von 2 mM DTT. Im Anschluss wurde die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität bestimmt (siehe 3.4.3) (n=3, MW \pm SD <5%).

Einfluss von Aminopeptidase – Inhibitoren auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase.

Zur weiteren Charakterisierung der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase wurden die Aminopeptidase-Inhibitoren Actinonin, Bestatin, Probestin, Puromycin, RB3014 und Phebestin verwendet. In Abbildung 17 ist der Einfluss der verschiedenen Aminopeptidase-Inhibitoren auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9 dargestellt. Deutlich sind die Unterschiede in der Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber dem jeweiligen Inhibitor erkennbar. Als effektivste Inhibitoren haben sich Phebestin ($IC_{50}=0,015 \mu\text{M}$), Probestin ($IC_{50}=0,016 \mu\text{M}$) und RB3014 ($IC_{50}=0,025 \mu\text{M}$) erwiesen. Als weniger effektiv stellten sich hingegen die

Aminopeptidase-Inhibitoren Puromycin ($IC_{50}=3,1 \mu M$) und Bestatin ($IC_{50}=0,40 \mu M$) dar.

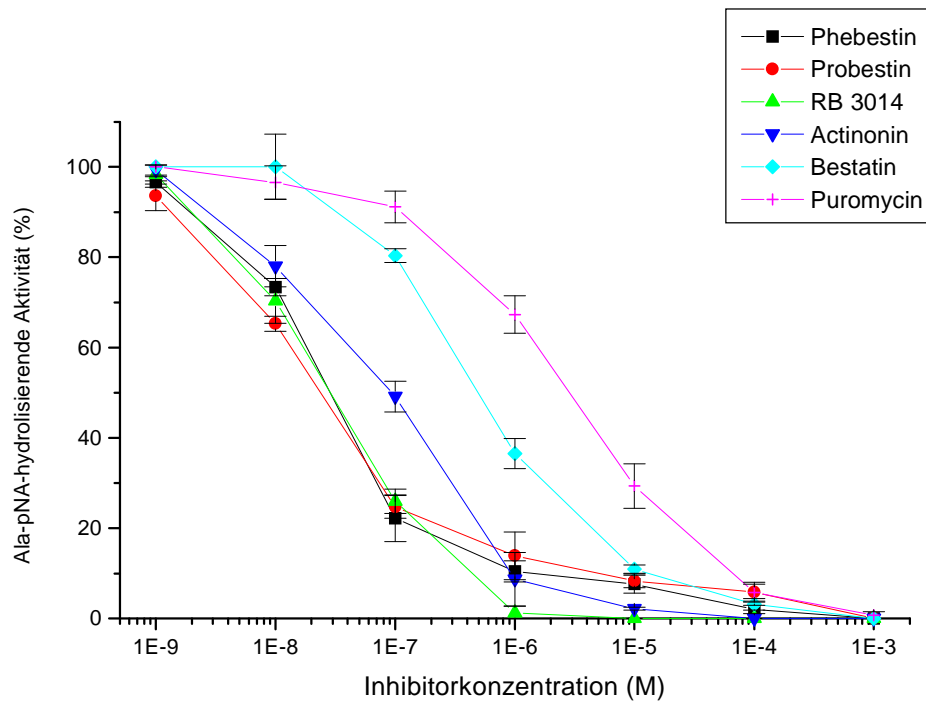


Abbildung 17: Vergleich des Einflusses von unterschiedlichen Amino-peptidase-Inhibitoren auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase aus H9-Zellen.

Gereinigte zAAP wurde mit verschiedenen Inhibitoren 15 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die Messungen erfolgten im 50 mM MOPS/NaOH Puffer, pH 6.5 mit Zusatz von 2 mM DTT. Das Puffersystem wurde gewechselt, um einen Vergleich mit publizierten Daten betreffend der zAAP zu ermöglichen (n=3, MW \pm SD <6%).

Einfluss von PAQ-22.

PAQ-22 ist ein neuentwickelter, spezifischer Inhibitor der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase, dessen Einfluss auf die humane membranständige Alanyl-Amino-peptidase (APN) noch nicht untersucht wurde (persönliche Mitteilung von Y.Hashimoto, Tokio). Die zAAP aus der T-Zelllinie H9 erwies sich sensitiv gegenüber diesem Inhibitor (Abbildung 18). Der berechnete IC_{50} -Wert für diese Reaktion betrug $0,29 \mu\text{M}$. Im Gegensatz dazu, blieb die Aktivität der humanen, membranständigen Alanyl-Amino-peptidase unbeeinträchtigt durch PAQ-22.

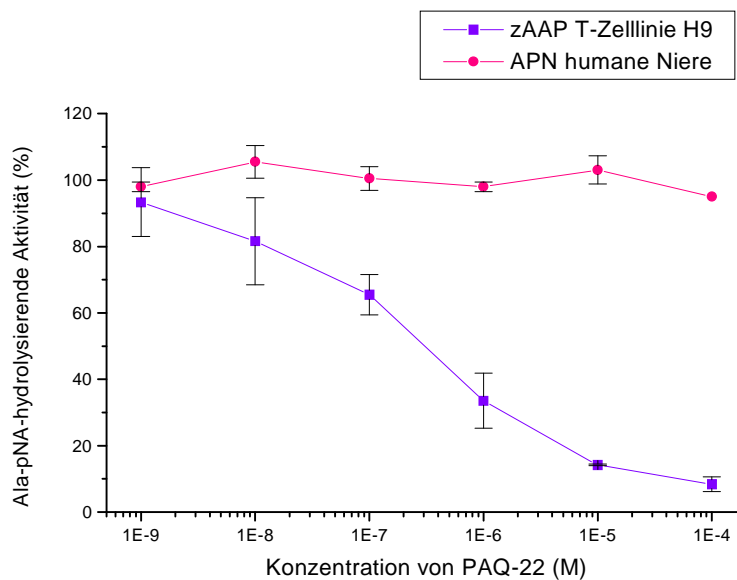


Abbildung 18: Einfluss von PAQ-22 auf die Aktivitäten der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase (zAAP) und der membranständigen Alanyl-Amino-peptidase (APN).

Gereinigte zAAP wurde mit den verschiedenen Konzentrationen von PAQ-22 15 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die Messungen erfolgten im 50 mM Phosphatpuffer, pH 6.5 mit Zusatz von 2 mM DTT. Im Anschluss wurde die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität bestimmt (siehe 3.4.3) ($n=3$, $MW \pm SD < 13\%$).

Zum Vergleich der Effektivität der Inhibitoren sind deren IC_{50} -Werte (die Inhibitor-konzentrationen, die eine 50%ige Hemmung bewirken) für die zytosolische Alanyl-Amino-peptidase in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: IC_{50} -Werte der verwendeten Inhibitoren der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase.

Inhibitor	IC_{50} -Wert
Phebestin	0,015 μ M
Probestin	0,016 μ M
RB 3014	0,025 μ M
Actinonin	0,075 μ M
PAQ-22	0,29 μ M
Bestatin	0,4 μ M
Puromycin	3,1 μ M
EDTA	9,0 μ M
o-Phenanthrolin	24 μ M
IAA	97,5 μ M

4.2.5 EINFLUSS VON IONEN AUF DIE AKTIVITÄT DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE

Einfluss von Kationen

Der Einfluss verschiedener Metallionen auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase wurde in zwei Konzentrationen von 1 mM (Abbildung 19) und 0,1 mM (Abbildung 20) untersucht. Eine deutliche Aktivierung der Ala-pNA-hydrolysierenden Aktivitäten wurde nur durch Kobaltionen beobachtet, wobei die Aktivierung konzentrationsabhängig ist. Die Konzentration von 1 mM Kobaltionen

bewirkte einen Anstieg der Enzymaktivitäten um 50 % und die von 0,1 mM Kobaltionen um 130%.

Eine leichte aber signifikante Aktivierung der Enzymaktivitäten bewirkten Barium-, Ammonium- und Strontiumionen in 0,1 mM Konzentration.

Stark inhibitorisch wirkten Schwermetallionen wie Kupfer-, Zink-, Cadmium- und Nickelionen auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase. Die vollständige Hemmung der Ala-pNA-hydrolysierenden Aktivitäten wurde durch Kupfer-, Zink-, Cadmiumionen bei einer Konzentration von 1mM erreicht. Nickelionen bewirkten in der gleichen Konzentration einen Aktivitätsverlust von 75%. Schwach hemmende Wirkung zeigten Calciumionen (1 mM).

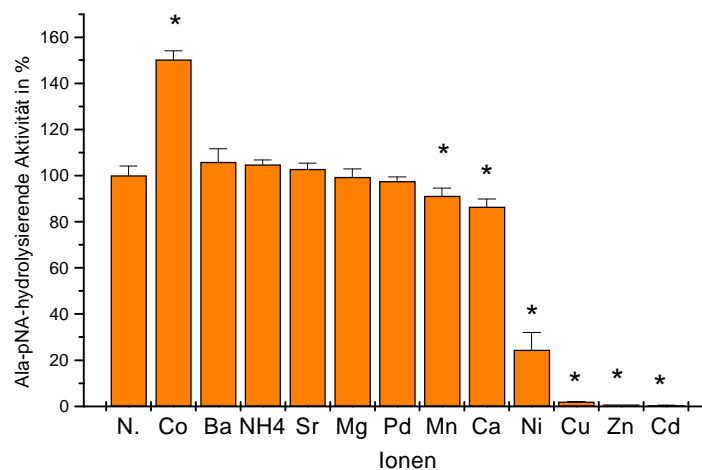


Abbildung 19: Einfluss der Kationen (1 mM) auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase.

Das gereinigte Enzym wurde mit verschiedenen Kationen in der Konzentration von 1mM 15 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die Messungen erfolgten in 50mM MOPS/NaOH, pH 6.5 mit Zusatz von 2mM DTT. Die Kontrolle (N) enthielt keinen Zusatz von Kationen. Angegeben sind Mittelwerte \pm SD < 8% aus vier unabhängigen Experimenten. *p<0,01 im Vergleich zur Kontrolle.

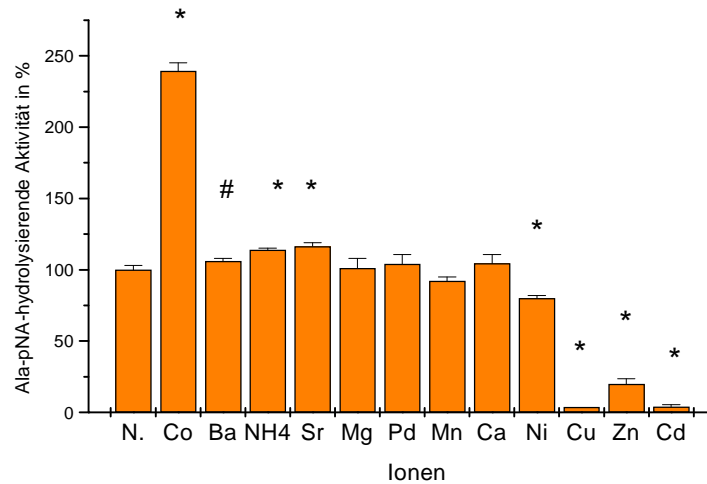


Abbildung 20: Einfluss der Kationen (0,1 mM) auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase.

Das gereinigte Enzym wurde mit verschiedenen Kationen in der Konzentration von 0,1mM 15 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die Messungen erfolgten in 50mM MOPS/NaOH, pH 6.5 mit Zusatz von 2mM DTT. Die Kontrolle (N) enthielt keinen Zusatz von Kationen. Angegeben sind Mittelwerte \pm SD < 7% aus vier unabhängigen Experimenten. *p<0,01, #p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

Einfluss von Chloridionen

Die Stimulierbarkeit durch Chloridionen ist zwar charakteristisch für die Arginyl-Aminopeptidase [18], jedoch wurde auch im Zytosol humaner Erythrozyten eine zytosolische Alanyl-Aminopeptidase beschrieben [2], deren Aktivität mit Chloridionen stimulierbar war. Daher wurde für die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase der Einfluss von Chloridionen im Bereich von 0,05 bis 1,0 M auf die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität untersucht. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Chloridionen keinen Einfluss auf die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase haben (Abbildung 21).

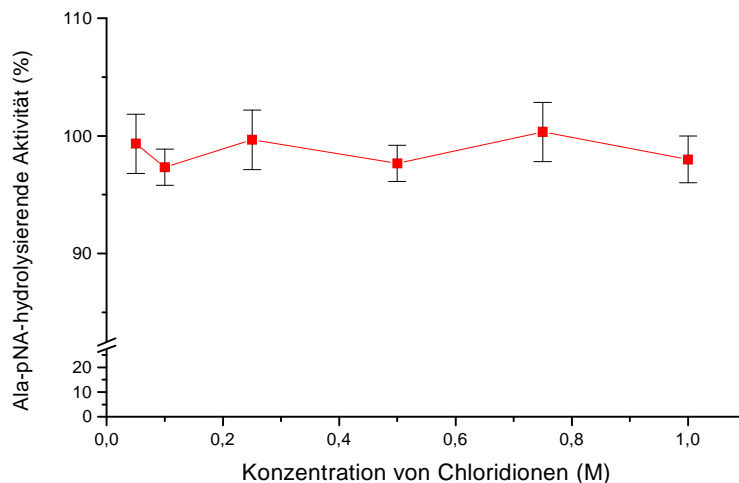


Abbildung 21: Einfluss von Chloridionen auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase.

Gereinigte zAAP wurde mit den verschiedenen Konzentrationen der Chloridionen 15 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die Messungen erfolgten in 50 mM Phosphatpuffer, pH 6.5 mit Zusatz von 2 mM DTT. Im Anschluss wurde die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität bestimmt (siehe 3.4.3) (n=3, MW \pm SD <3 %).

4.3 IMMUNREAKTIVITÄT DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE

Die Immunreaktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase (zAAP) wurde unter Anwendung von drei verschiedenen Antikörpern gegen die membranständige Alanyl-Aminopeptidase (APN) getestet. Die zwei Antikörper 7B und WM15 wiesen eine Kreuzreaktivität gegenüber der zAAP auf (Abbildung 22). Der 7B-Antikörper wurde mittels einer Immunisierung gegen die bekannte Struktur des katalytischen Zentrums



der APN erhalten.

Da das katalytische Zentrum der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase



zu diesem Sequenzmotiv eine große Ähnlichkeit aufweist, ist die beobachtete Kreuzreaktion erklärbar.

Der APN-Antikörper Leu M7 zeigte keine Kreuzreaktivität gegenüber Strukturen der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase (Abbildung 22).

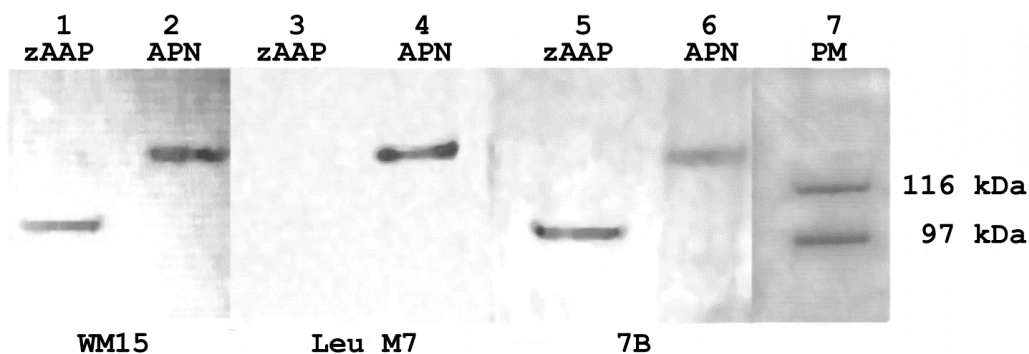


Abbildung 22: Immunreaktivität der beiden Alanyl-Aminopeptidasen (APN und zAAP) gegenüber APN-spezifischen Antikörpern. 0,5 µg APN aus humaner Niere und 0,5 µg zAAP aus der humanen T-Zelllinie H9 wurden unter nativen Bedingungen elektrophoretisch getrennt und auf eine Nitrozellulose Membran transferiert. Anschließend wurde die Antikörper-Nachweisreaktion durchgeführt (3.3.4). PM – Proteinmarker (Mark 12, Novex)

4.4 AKTIVIERUNGSABHÄNGIGE EXPRESSION DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE AUS HUMANEN LYMPHOZYTEN

4.4.1 STIMULATION HUMANER T-LYMPHOZYTEN UND EXPRESSION DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE

Humane periphere T-Lymphozyten wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden ohne Zusatz von Stimulatoren bzw. unter Zusatz einer der beiden Kombinationen aus PHA/PMA oder PWM/PMA inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Expression der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase auf der mRNA-Ebene durch Anwendung der quantitativen RT-PCR Technik bestimmt. Unabhängig vom verwendeten Stimulationssystem wurde ein aktivierungsabhängiger Anstieg der zAAP-mRNA-Gehalte beobachtet (PHA: $311,7 \pm 65$ %; PWM: $278,6 \pm 14$ % der unstimulierten Kontrolle; $p < 0.01$) (Abb.23).

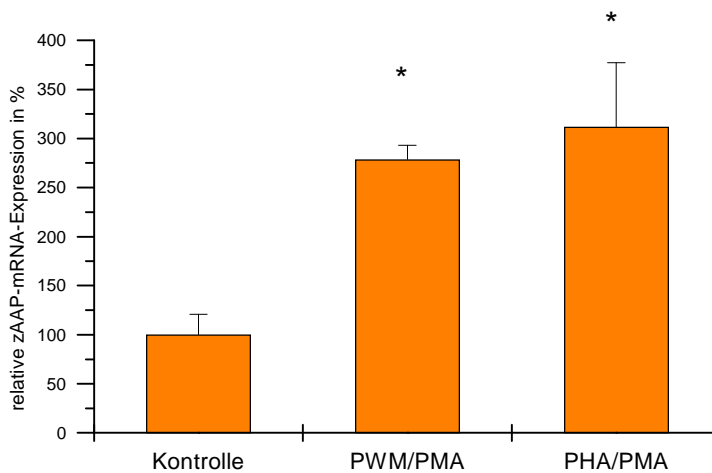


Abbildung 23: Aktivierungsabhängige Induktion der mRNA-Gehalte der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase in humanen T-Zellen. Humane T-Lymphozyten wurden 24 Stunden in Anwesenheit von PHA mit

PMA bzw. PMA mit PWM oder in Abwesenheit von Stimulatoren (Kontrolle) kultiviert (siehe 3.5.). Die Bewertung der Induktion der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase erfolgte auf der mRNA-Ebene mittels RT-PCR-Technik. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten. * $p < 0,01$

4.4.2 MODULATION DER mRNA-EXPRESSION DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE DURCH AMINOPEPTIDASE-INHIBITOREN

Erfolgte die mitogene Aktivierung von humanen peripheren T-Lymphozyten mittels PHA/PMA in Anwesenheit der Aminopeptidase-Inhibitoren Actinonin oder RB3014, war nach 24 Stunden eine deutliche Verminderung der aktivierungsabhängigen Induktion der zAAP-mRNA-Gehalte nachweisbar. Die Bestimmung der zAAP-mRNA-Gehalte erfolgte dabei mittels quantitativer RT-PCR (Lightcycler LC24). Die erhaltenen zAAP-mRNA-Gehalte betragen im Vergleich zu PHA/PMA-aktivierten Zellen für Actinonin $59,7 \pm 5 \%$ ($p=0,002$) und für RB3014 $60,76 \pm 16 \%$ ($p= 0,007$). Der durch Leuhistin hervorgerufene Effekt erreichte aufgrund erheblicher Schwankungen keine statistische Signifikanz (Abbildung 24).

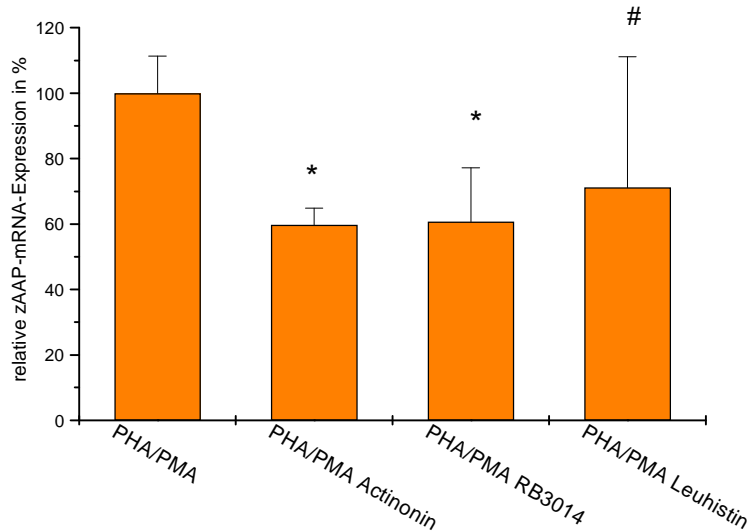


Abbildung 24: Einfluss von Aminopeptidase-Inhibitoren auf die Expression der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase PHA/PMA-aktivierter humaner T-Lymphozyten.

Humane T-Zellen wurden 24 Stunden mit PHA/PMA und den entsprechenden Inhibitoren kultiviert und die mRNA-Expression unter Anwendung der PCR-Technik bestimmt (siehe 3.5.). Angegeben sind Mittelwerte \pm SD aus vier unabhängigen Experimenten. * $p < 0,01$, # $p = ns$ im Vergleich zur PHA/PMA-Kontrolle.

Andere Effekte auf die aktivierungsabhängige Induktion der zAAP-mRNA wurden durch die Applikation von Aminopeptidase-Inhibitoren erreicht, wenn die T-Zell-Aktivierung durch die Kombination von PMA und PWM erfolgte. Der Inhibitor RB 3014 bewirkte in diesem System einen leichten, aber signifikanten Anstieg der zAAP-mRNA-Gehalte (133 ± 17 % der PWM/PMA-aktivierten Zellen; $p = 0,009$). Leuhistin und Actinonin hatten dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die zAAP-mRNA-Gehalte PWM/PMA-stimulierter T-Lymphozyten (110 ± 14 , $p = ns$; 108 ± 12 %, $p = ns$) (vgl. Abbildung 25).

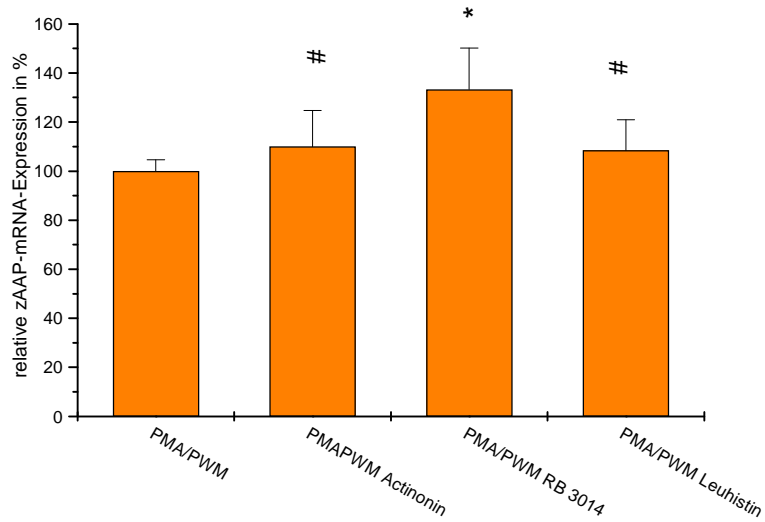


Abbildung 25: Regulation der zAAP-mRNA-Expression nach PMA/PWM

Stimulation und Behandlung mit Inhibitoren.

Humane T-Zellen wurden 24 Stunden mit PMA/PWM und den entsprechenden Inhibitoren kultiviert und die mRNA-Expression unter Anwendung der PCR-Technik bestimmt (siehe 3.5.). Angegeben sind Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten.. * $p < 0,01$; # $p = n.s.$ im Vergleich zur PMA/PWM-Kontrolle.

