

5 DISKUSSION

5.1 BIOCHEMISCHER VERGLEICH DER IDENTIFIZIERTEN ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE AUS DER T-ZELLINIE H9 MIT DENEN AUS ANDEREN GEWEBEN

In der vorliegenden Arbeit wurde eine zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus der humanen T-Zelllinie H9 identifiziert und charakterisiert, die sich aufgrund ihrer biochemischen Charakteristik von anderen, bekannten Aminopeptidasen unterscheidet. Für die entsprechenden Untersuchungen wurde diese Aminopeptidase zunächst mittels konventioneller, chromatographischer Methoden gereinigt und mit Hilfe der Massenspektrometrie als zytosolische Alanyl-Aminopeptidase (EC.3.4.11.14, zAAP, PSA) identifiziert.

Die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase gehört zur Peptidasen-Familie M1 und enthält ein zinkbindendes Motiv HEXXH(X)₁₈E, welches charakteristisch für die Gluzincin-Gruppe der Zink-Metalloproteasen ist. Zu dieser Familie gehören auch Aminopeptidase A, Aminopeptidase N und die Leukotrien-A4-Hydrolase. Bisher wurde die cDNA der zAAP aus humanem Gehirn [29,149] und von der Maus [28] kloniert und sequenziert. Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt zwischen den beiden Spezies eine 98 %ige Identität. Das humane zAAP-Gen setzt sich aus 23 Exonen und 22 Intronen zusammen, befindet sich auf dem Chromosom 17 und ist ca. 40 kbp groß [149].

Die lösliche Alanyl-Aminopeptidase wurde oft als ein jeweils eigenständiges Enzym betrachtet und trägt daher unterschiedliche Namen wie Enkephalin-degradierende Aminopeptidase [36,131], Neuropeptid-degradierende Aminopeptidase [100], Aminopeptidase III [135,136], Thiol-Aminopeptidase [157], Puromycin-sensitive Aminopeptidase [102,61,164] oder breitenspezifische Aminopeptidase [3].

Im humanen System wurde die zytosolische Alanyl-Amino-peptidase aus Gehirn [100], Skelettmuskel [79,95], Niere [97], Augenlinse [134,135], Leber [164], Plazenta [157], Erythrozyten [3,2,99] und während der Fertigung der vorliegenden Arbeit aus der lymphoblastischen T-Zelllinie (MOLT-4 Zellen [75]) isoliert und biochemisch charakterisiert. Mit Hilfe von spezifischem Antiserum wurde die zytosolische Alanyl-Amino-peptidase in myelo-monozytären Zelllinie U937 [41] und der Nasenschleimhaut [111] identifiziert. Die stärkste Expression der zAAP wurden in Gehirn, Herz und Skelettmuskel nachgewiesen [102]. Die humane zAAP ist hauptsächlich im Zytosol lokalisiert [61]. Eine Ausnahme bildet hierbei tierisches Gehirngewebe, in dem eine membran-assoziierte Form der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase beschrieben wurde [62,53,60,39,54,102,131].

Die enzymatischen Eigenschaften der zAAP in den oben erwähnten humanen Geweben unterscheiden sich. Barrett und Dando [18] haben folgende gemeinsame Eigenschaften definiert:

- einzelne Polypeptid-Kette mit einer Molekularmasse von ca. 100 kDa;
- maximale enzymatische Aktivität im pH-Bereich von 7,3 bis 7,5;
- sensitiv gegenüber Thiolreagenzien;
- sensitiv gegenüber Metallchelatoren;
- unikale Sensitivität gegenüber Puromycin in nanomolarer Konzentration;
- Hemmung durch Bestatin;
- maximale Aktivierung durch 0,5 mM CaCl_2 und starke Hemmung der Aktivitäten durch Schwermetallionen wie Kupferionen, Zinkionen
- eine breite Substrat-Spezifität

5.1.1 MONOMER-CHARAKTER DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE

Die humane cDNA ist 3747 bp groß, kodiert 874 Aminosäuren mit einer daraus resultierenden theoretischen Molekularmasse von 99 kDa [29,149]. Bisher wurden zAAP mit folgenden Molekularmassen beschrieben:

- Plazenta zAAP 95 kDa;
- Leber zAAP 98 kDa;
- Augenlinsen zAAP 100 kDa;
- zAAP aus der Zelllinie U937 100 kDa;
- Skelettmuskel zAAP 102 kDa;
- zAAP aus der T-Zelllinie MOLT-4 102 kDa;
- Nieren zAAP 103 kDa;
- Gehirn zAAP 105 kDa;
- Erythrozyten zAAP 110 kDa;

Die mittels PAGE und Antikörper-Färbung ermittelte molekulare Masse der aus der T-Zelllinie H9 isolierten zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase beträgt 101 kDa. Da das Enzym die gleiche elektrophoretische Mobilität unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen zeigt, spricht dies für einen monomeren Charakter. Diese Werte fügen sich gut in die Charakteristik der bisher identifizierten zAAP aus anderen Geweben bzw. Zelllinien und der vorhergesagten Molekülmasse ein (vgl. obige Aufzählung).

5.1.2 ABHÄNGIGKEIT DER ZYTOSOLISCHEN AMINOPEPTIDASE-AKTIVITÄT VOM pH-WERT

Im generellen liegt die maximale Aktivität der verschiedenen humanen zytosolischen Alanyl-Aminipeptidasen im pH-Bereich von 7,3 bis 7,5 [100,95,97,164]. Zu den Ausnahmen gehört die zAAP aus der Plazenta mit einem pH-Optimum von 8,0 [157], die zAAP aus der Augenlinse mit einem Optimum von 6,0 [135] und die von mir isolierte zAAP aus H9-Zellen, die ihre höchste Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität

bei 6,5 hat. Mit diesem pH-Optimum findet man eine weitere Aminopeptidase in neutrophilen Granulozyten des Rinderblutes [11]. Für zAAP in humanen Erythrozyten konnte kein exakter Wert, sondern einen pH-Bereich von 6,0 bis 7,0 bestimmt werden [3]. Die Unterschiede in den pH-Optima deuten möglicherweise auf eine gewebsspezifische Funktion der verschiedenen zytosolischen Alanyl-Aminopeptidasen hin.

5.1.3 ZYTOSOLISCHE ALANYL-AMINOPEPTIDASE ALS THIOLABHÄNGIGE PROTEASE

Thiolproteinasen sind Enzyme, deren Aktivität an das Vorhandensein einer gewissen Anzahl von freien Thiolgruppen gebunden ist. Diese Eigenschaft wurde für die humane zytosolische Alanyl-Aminopeptidasen mit verschiedenen Thiolgruppen-Inhibitoren wie PCMB [95,157,164], PHMB [3,135], IAA [157] und PHMS [95,97] bestätigt. Die ermittelten IC_{50} -Werte für die PHMS-Hemmung der Aminopeptidase-Aktivität befanden sich im Bereich von 0,1 bis 0,2 mM [94]. Die Empfindlichkeit der von mir isolierten zAAP gegenüber freien Thiolgruppen wurde mit dem Sulfhydrylinhibitor Iodacetamid (IAA) untersucht, der mit der Thiolgruppe des Cysteins S-Carboxyamidomethylcystein bildet [4]. Das entstandene Produkt wirkte inhibitorisch auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase, wobei der ermittelte IC_{50} -Wert der Hemmung 97,5 μ M beträgt. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Empfindlichkeit der zAAP aus T-Zelllinie H9 gegenüber IAA höher ist als die der zAAP aus Plazenta, mit einem IC_{50} -Wert von 1,25 mM [157].

Zum Vergleich wurde die Empfindlichkeit der membranständigen Alanyl-Aminopeptidase (EC 3.4.11.2, APN) gegenüber Iodacetamid untersucht, die keine Thiolproteinase ist. Erwartungsgemäß konnte keine Hemmung der enzymatischen Aktivität der APN festgestellt werden.

Angesichts dieser Eigenschaften ist der dringende Bedarf des Enzyms nach Anwesenheit von Thiol-Reagenzien wie Mercaptoethanol (2-ME) oder Dithiothreitol (DTT), während des Reinigungsverfahrens und der Untersuchung der biochemischen Eigenschaften verständlich. Für die meisten beschriebenen zAAP fehlen die Angaben

über die genaue Auswirkung der Thiol-Reagenzien auf die Enzymaktivität. Es wird jedoch darauf hingewiesen, dass Thiol-Reagenzien eine stabilisierende Wirkung ausüben und deren Anwesenheit während der Isolation notwendig ist [97,100,164].

Aus den vorliegenden Untersuchungen für die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9 folgt, dass die Thiolreagenzien die stabilisierende und aktivierende Wirkung auf die Aktivität erzielten. Diese positive Wirkung der Thiolendonatoren ist dabei konzentrationsabhängig und wurde nur im Bereich von 1 bis 10 mM festgestellt. Die höchste Aktivierung der zAAP aus T-Zelllinie H9 findet bei der Konzentration von 2 mM DTT statt. Höhere Konzentrationen von DTT (z.B. 25 mM) wirkten hingegen inhibitorisch.

Die gleiche Auswirkung von Sulfhydrylreagenzien wurde für zAAP aus Plazenta beschrieben [157], wobei 5 mM DTT einen 20-fachen Anstieg der enzymatischen Aktivität bewirkte. Der zweifache Anstieg der Enzymaktivität wurde für die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus Schweine-Skelettmuskeln und Rattenleber festgestellt [42,165].

Dagegen konnte keine aktivierende Wirkung durch Sulfhydrylreagenzien für zAAP aus humanen Erythrozyten [3] oder für zAAP aus Augenlinse [135] bestätigt werden.

5.1.4 DIE ZAAP AUS DER HUMANEN T-ZELLINIE H9 IST EINE METALLOPROTEASE

Die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9 ist eine Metalloprotease. Die Hemmung der Aktivität der zAAP durch EDTA oder o-Phenanthrolin weist darauf hin, dass die metallbindende Region im zAAP-Molekül wichtig für die Regulation der Enzymaktivitäten ist. O-Phenanthrolin hemmt vollständig alle humanen, zytosolischen Alanyl-Aminopeptidasen in einer Konzentration von 1 mM [18]. Die IC_{50} -Werte für viele humane zAAP befinden sich im Bereich von 0,23 mM (Plazenta) [157] bis 0,5 mM (Niere, Skelettmuskel, Gehirn) [97,95]. Die zAAP aus der T-Zelllinie H9 stellt sich mit dem IC_{50} -Wert von 24 μ M 10-fach empfindlicher gegenüber o-Phenanthrolin dar.

Die vollständige Hemmung der enzymatischen Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidasen durch EDTA wird in einer Konzentration von 5 mM erreicht [18]. Die meisten IC_{50} -Werte liegen für die humanen zAAP im Bereich von 0,5 bis 1,0 mM [97,95,100].

Die zAAP aus der T-Zelllinie H9 reagiert auf EDTA deutlich sensitiver, was ein IC_{50} -Wert von 9,0 μ M für diese Hemmung belegt. Noch empfindlicher gegenüber EDTA als die von mir isolierte zAAP, zeigte sich eine zAAP aus Erythrozyten (IC_{50} -Wert von 0,9 μ M; [3]).

5.1.5 EINFLUSS UNTERSCHIEDLICHER IONEN AUF DIE ENZYMATISCHE AKTIVITÄT

Die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus den H9-Zellen ist durch Kobaltionen stark aktivierbar. Eine leichte, signifikante Aktivierung wurde auch durch andere bivalente Metallionen wie Strontium-, Barium- sowie durch Ammoniumionen nur in der Konzentration von 0,1 mM festgestellt. Dieses Ergebnis entspricht dem der zytosolischen Aminopeptidase aus humanen Erythrozyten [3,99] bzw. aus neutrophilen Granulozyten des Rinderblutes [11]. Beide Proteasen konnten ebenfalls nur durch Kobaltionen stark stimuliert werden. Im Gegensatz dazu wird die zAAP aus der Leber durch Kobaltionen sogar gehemmt [164].

Mit der fehlenden Stimulierung durch Calciumionen unterscheidet sich die charakterisierte zAAP von vielen anderen humanen zytosolischen Aminopeptidasen. So wird die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus der Niere [97], dem Skelettmuskel [95] und dem Gehirn [100] mit 0,5 mM Calciumionen am höchsten aktiviert. Neben der starken Aktivierung durch Calciumionen wurde auch eine Stimulierung der enzymatischen Aktivität dieser zAAP durch Mangan-, Magnesium- und Kobaltionen beschrieben. Die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9 zeigt sogar bei einer Konzentration von 1 mM Calciumionen eine leichte Hemmung der Enzymaktivität. Weiterhin ist die fehlende Aktivierung durch Mangan- und Magnesiumionen ein gutes Mittel zur Abgrenzung von der zytosolisch

lokalisierten Leucyl-Aminopeptidase [101]. Die zAAP der Augenlinse wurde an erster Stelle durch Manganionen und dann erst durch Kobaltionen stimuliert [135]. Schwermetallionen wie Kupfer-, Cadmium-, Zink- und Nickelionen in der Konzentration von 1 mM hemmen vollständig die Enzymaktivitäten der zAAP aus H9-Zellen. Möglicherweise kann die hemmende Wirkung auf die Metall-katalysierte Oxidation der freien SH-Gruppen als auch auf die Bildung von stabilen Komplexen mit der Beteiligung von SH-Gruppen zurückgeführt werden [65]. Gleiche inhibitorische Effekte durch Kupfer-, Cadmium-, Zinkionen wurden für andere humane Alanyl-Aminopeptidasen beschrieben [97,95,135,164,100].

Die Untersuchung des Chloridionen-Einflusses auf die Enzymaktivität diente vor allem der Abgrenzung gegenüber anderen Aminopeptidasen, da die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9 gegenüber diesen Ionen unbeeinflusst bleibt. Dies unterscheidet sie von der „Chlorid-aktivierbaren Alanyl-Aminopeptidase“ [2] aus dem Zytosol der Erythrozyten, bei der eine maximale Aktivierung durch 0,2 M Chloridionen festgestellt wurde. Eine Aktivierung durch Chloridionen ist eine charakteristische Eigenschaft der Arginyl-Aminopeptidase (EC 3.4.11.6, APB) [18,99].

5.1.6 SENSITIVITÄT GEGENÜBER PUROMYCIN.

Puromycin ist ein Inhibitor der Proteinsynthese, der den Vorgang des programmierten Zelltodes – der Apoptose - in verschiedenen Zelltypen induziert [33,34]. Zur gemeinsamen Charakteristik der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidasen aus verschiedenen Geweben und Zellen gehört ihre hohe Empfindlichkeit gegenüber Puromycin, was sie von den anderen Aminopeptidasen unterscheidet [18]. Weit verbreitet ist daher die Bezeichnung „Puromycin-sensitive Aminopeptidase“ (PSA). Die humanen, zytosolischen Alanyl-Aminopeptidasen unterscheiden sich jedoch stark in ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem charakteristischen Inhibitor – Puromycin. Bisher wurden folgende IC_{50} -Werte für die Inhibierung durch Puromycin beschrieben:

- Leber zAAP 0,6 μM [164]
- zAAP aus MOLT-4-Zellen 0,4 μM [75]
- Plazenta zAAP 2,0 μM [157]
- Erythrozyten zAAP 2,5 μM [3]
- Gehirn zAAP 6,5 μM [100]
- Nieren zAAP 20,0 μM [97].

Der IC_{50} -Wert der Inhibierung mit Puromycin beträgt für die zytosolische Alanyl-Amino-peptidase aus den H9-Zellen 3,1 μM und entspricht ungefähr dem der zAAP aus der Erythrozyten (vgl. obige Aufzählung). Mit dem IC_{50} -Wert von 20 μM ist die zAAP aus humaner Niere weniger sensitiv gegenüber Puromycin [97].

Zum Vergleich hat die membranständige Alanyl-Amino-peptidase (EC 3.4.11.2) je nach Gewebeherkunft IC_{50} -Werte gegenüber Puromycin von 50 μM (Samenflüssigkeit; [59]) bis 90 μM (neuronaies Gewebe; [25]) und gilt als Puromycin-insensitive Amino-peptidase.

5.1.7 SENSITIVITÄT GEGENÜBER AMINOPEPTIDASE-INHIBITOREN

Die Empfindlichkeit gegenüber dem wenig spezifischen Amino-peptidase-Inhibitor Bestatin [132,143] gehört zur gemeinsamen Charakteristik der Amino-peptidasen [147,148,18]. Für die verschiedenen humanen zytosolischen Alanyl-Amino-peptidasen sind die folgenden IC_{50} -Werte beschrieben:

- Skelettmuskel zAAP - 0,1 μM [95]
- Gehirn/Nieren zAAP - 0,2 μM [97,100]
- Plazenta zAAP - 0,25 μM [157]
- Erythrozyten zAAP - 1,0 μM [3].

Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierte zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9 stimmt hinsichtlich des IC_{50} -Wertes von $0,4 \mu\text{M}$ mit anderen humanen zAAP gut überein.

Effektiver als Bestatin haben sich spezifische Inhibitoren der membranständigen Alanyl-Aminopeptidase (EC 3.4.11.2) wie Actinonin [151], Probestin [10,167], Phebestin [104] und RB3014 [26] erwiesen. Am effektivsten gegenüber der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase stellten sich Phebestin (IC_{50} -Wert von $0,015 \mu\text{M}$), Probestin (IC_{50} -Wert von $0,016 \mu\text{M}$) und RB3014 (IC_{50} -Wert von $0,025 \mu\text{M}$) dar. Die beiden Aminopeptidasen APN und zAAP lassen sich daher nicht anhand ihrer Empfindlichkeit gegenüber diesen Inhibitoren unterscheiden. Dieses Resultat wirft neue Fragen nach der spezifischen Selektivität dieser APN-Inhibitoren auf. Die Analyse der Aminosäuresequenzen der APN und der zAAP, zeigt eine 40 %ige Ähnlichkeit bei einer 33 %igen Identität [149], die vor allem in drei konservierten Bereichen auftritt. Beide Proteasen gehören zur Familie der Gluzincin-Metallopeptidasen. Um die APN und die zAAP in weiteren Untersuchungen unterscheiden und damit Aussagen zur biologischen Bedeutung treffen zu können, ist die Entwicklung spezifischer Inhibitoren unabdingbar.

5.1.8 SENSITIVITÄT GEGENÜBER PAQ-22

PAQ-22 ist ein neuentwickelter, spezifischer Inhibitor der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase [68]. Der Inhibitor hemmt zAAP auf nicht-kompetitive Weise [145] und basiert auf einer Homophthalimid-Struktur. Bisher wurde lediglich die Hemmung der zAAP aus MOLT-4 Zellen nachgewiesen (IC_{50} - $3,8 \mu\text{M}$.; [68]), wogegen neutrale Aminopeptidasen wie APN (Schwein), LAP (Schwein), DPIV (Schwein), Trypsin (Rind) und Chymotrypsin (Rind) durch PAQ-22 nicht beeinflusst werden.

Die von mir untersuchte, zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9 ist sensitiv gegenüber PAQ-22. Der IC_{50} -Wert für diese Hemmung beträgt $0,29 \mu\text{M}$. Die membranständige Alanyl-Aminopeptidase (EC 3.4.11.2) aus humaner Niere ist dagegen resistent gegenüber diesem Inhibitor. Damit ist ein Inhibitor verfügbar, der

eine Unterscheidung der beiden Alanyl-Amino-peptidasen in biologischen Systemen ermöglicht.

5.1.9 SUBSTRATSPEZIFITÄT DER ISOLIERTEN ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE

Die zytosolische Alanyl-Amino-peptidase ist als ein Enzym mit breiter Substratspezifität bekannt [11,18,42,56,165], was auch durch eigene Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit belegt wurde. So konnte gezeigt werden, dass die zAAP effektiv Alanin, Methionin, Arginin und Leucin vom N-Terminus der p-Nitro-anilinderivate abspalten kann. Die Abspaltung von Prolin und Glycin hat sich dabei als wenig effektiv erwiesen. Diese Beobachtung wurde auch von anderen Autoren gemacht [11,42]. Die Affinität des Enzyms zum Substrat beschreibt in diesem Zusammenhang die Michaelis-Menten-Konstante (K_m). Basierend auf den ermittelten K_m -Werten sieht die Substrat-Affinitätsreihenfolge der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase aus der T-Zelllinie H9 wie folgt aus: Leu- > Arg- > Met- > Ala-pNA. Damit zeigt das Enzym die höchste Affinität zu Leucin und nicht, wie der Name suggeriert, zu Alanin. Alanin-pNA wird jedoch *in vitro* schneller hydrolysiert, was im hohem V_{max} -Wert seinen Niederschlag findet. Die Situation, die mit hoher Wahrscheinlichkeit *in vivo* vorkommt, wird durch den Quotienten von V_{max}/K_m oder k_{cat}/K_m widerspiegelt [127]. Auf der Grundlage dieser Bewertung wird das Leucin-Derivate *in vivo* wahrscheinlich am besten umgesetzt, da es den höchsten k_{cat}/K_m -Wert erreichte. Danach folgen Arginin- und Methionin-pNA. Die Substratspezifität und die Kinetik-Konstanten der identifizierten zAAP wurde mit Hilfe von p-Nitroaniliden (zAAP aus Plazenta, H9-Zellen), AMC (zAAP aus Leber, Gehirn, Niere, Skelettmuskel) und β -Naphthylamiden untersucht (zAAP aus Erythrozyten, U937-Zellen). Die K_m -Werte von zAAP's aus verschiedenen Geweben unterschieden sich trotz Verwendung des gleichen Substrates (Ala-AMC) und bei gleicher Methode beträchtlich. So wurden für die zAAP des humanen Skelettmuskels ein K_m -Wert von 70 μ M [95], des humanen Gehirns ein K_m -Wert von 170 μ M [100]

und der humanen Niere ein K_m -Wert von 200 μM [97] bestimmt. Im Ansatz vergleichbar mit dieser Arbeit ist die Bestimmung des Ala-pNA K_m -Werte für die zAAP aus der humanen Plazenta mit 510 μM [157]. Dieser Wert weicht auch wesentlich von dem für die zytosolische Alanyl-Amino-peptidase der H9-Zellen ermittelten K_m -Wert (217 μM) ab.

Festzustellen ist die generelle Tendenz, dass die zAAP die höchste Affinität gegenüber basischen und langen, aliphatischen Aminosäuren besitzt [11,42,135]. Die Affinitätsreihenfolge für Substrate zytosolischer Amino-peptidasen ist vergleichbar mit Ergebnissen, die für die zAAP aus der T-Zelllinie H9 erhalten wurde:

zAAP aus H9-Zellen	Leu > Arg > Met > Ala-pNA;
zAAP aus Leber	Arg > Met > Leu > Lys > Phe > Ala- AMC;
zAAP aus Schwein Skelettmuskel	Leu = Arg > Lys > Met > Phe > Ala- AMC;
zAAP aus Erythrozyten	Lys > Arg > Leu > Met > Phe > Tyr- β -NA
zAAP aus neutrophilen Granulozyten des Rinderblutes	Lys > Leu > Arg > Phe > Ala- β -NA.

In der vorliegenden Arbeit wurden Peptid-Substrate, die meist ein Methionin am N-Terminus hatten, hinsichtlich ihres Umsatzes durch die isolierte zAAP untersucht. Trotz der gleichen Aminosäure an der P1-Position, konnten Unterschiede festgestellt werden. Dieser Befund legt nahe, dass die Aminosäure an der zweiten Position der Peptid-Substrate ebenfalls eine Rolle spielt. Ob jedoch, wie in anderen Studien vermutet, kurze aliphatische [100] oder basische [11] Aminosäuren die Spezifität erhöhen, konnte auch durch meine Untersuchungen nicht geklärt werden. Die jeweils am besten umgesetzten Substrate entsprachen beiden Theorien. Andererseits konnte in einigen Fällen nachgewiesen werden, dass ein Prolin an der zweiten Position die Stabilität des Peptides erhöht. Ein typisches Beispiel dafür ist Bradykinin, welches wie Substanz P nicht durch die zytosolische Alanyl-Amino-peptidase umgesetzt wird [95,97,100].

Die Länge der Aminosäurekette soll ebenfalls eine wichtige Rolle spielen, da kurze Peptide bevorzugt werden [42,44,56]. Dieser limitierende Einfluss kann angesichts

der gewonnenen Ergebnisse für die zytosolische Alanyl-Amino-peptidase der H9-Zellen nicht bestätigt werden. Die beste Hydrolyse wurde für das mit 13 Aminosäuren längste Substrat erzielt.

5.1.10 IMMUNREAKTIVITÄT DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE

Obwohl spezifische zAAP-Antikörper existieren, kann eine Kreuzreaktivität mit anderen Mitgliedern der Gluzincin Familie nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die eigenen Untersuchungen haben dabei eine Kreuzreaktion monoklonaler APN-Antikörper mit der isolierten zAAP belegt. Beide Proteasen gehören zur oben erwähnten Zinkpeptidasen-Familie. Murray und Mitarbeiter [103] zeigten eine Reaktion spezifischer APN-Antikörpern mit dem Zytosol von Jurkat-Zellen. Es könnte sich dabei um eine Bindung der Antikörper an die zytosolische Alanyl-Amino-peptidase handeln. Diese Daten verdeutlichen, wie schwierig es ist, die beiden Amino-peptidasen zAAP und APN aufgrund ihrer Reaktion mit spezifischen APN-Antikörpern als auch der Inhibierbarkeit mit spezifischen APN-Inhibitoren, voneinander zu unterscheiden.

Insgesamt zeigt die zytosolische Alanyl-Amino-peptidase aus der humanen T-Zelllinie H9 in ihrer Charakteristik quantitative wie auch qualitative Differenzen zu den bisher beschriebenen zAAP-Formen aus anderen Geweben. Die vorgestellten Unterschiede in den biochemischen Eigenschaften können als die notwendige Anpassung an das jeweilige Gewebe interpretiert werden und gewebespezifische Modifikationen repräsentieren. Die beschriebenen Differenzen in den biochemischen Daten erschweren oft die Zuordnung des Enzyms zu einer bekannten Protease. Dies wird erst durch eine Isolation mit nachfolgender massenspektrometrischer Untersuchung möglich.

5.2 STIMULATIONSABHÄNGIGE EXPRESSION DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE IN PERIPHEREN T-LYMPHOZYTEN

Nachdem das Vorkommen der zytosolische Alanyl-Aminopeptidase in der T-Zelllinie H9 nachgewiesen wurde, lag es nahe, die Expression dieses Enzyms in peripheren T-Lymphozyten zu untersuchen. Mit dieser Arbeit wird zum ersten Mal eine stimulationsabhängige Induktion der Expression der mRNA der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase in peripheren T-Lymphozyten nachgewiesen. Sowohl PHA/PMA als auch PMA/PWM bewirkten nach 24 Stunden einen drastischen Anstieg der zAAP-mRNA-Menge. Die Stimulierbarkeit der Expression ist ein deutlicher Hinweis der Beteiligung der zAAP an der T-Zell-Aktivierung.

Eine stimulationsabhängige Induktion der Expression von Aminopeptidasen im Immunsystem wurde in verschiedenen Untersuchungen sowohl auf der Ebene der Protein-Expression als auch durch die Erhöhung der enzymatischen Aktivitäten dokumentiert [5,19,20,52,76,22,15].

Eine signifikante Erhöhung der Leu- und Ala-Aminopeptidase-Aktivitäten in intakten Thymocyten konnte nach einer Concanavalin A-Stimulation beobachtet werden [19]. Auf der Oberfläche von humanen Lymphozyten konnten Ala-pNa-hydrolysierende Aktivitäten nach einer 72-stündigen Inkubation mit Concanavalin A oder PHA nachgewiesen werden [5]. Ein wesentliches Ergebnis unserer Arbeitsgruppe ist, dass die mRNA-Expression der Aminopeptidase N (APN EC 3.4.11.2) von mononukleären Zellen (MNZ) und T-Zellen nach Stimulation *in vitro* mit unterschiedlichsten Effektoren (z.B. Mitogenen, Interleukinen, Antigenen) erhöht ist [82,87]. Der Grad der Stimulation der Zellen lässt sich dabei mit spezifischen Aminopeptidase-Inhibitoren verändern. Eine hemmende Wirkung auf die Proliferation und die Expression unterschiedlichster Gene (z.B. IL-2) konnte durch spezifische APN-Inhibitoren wie z.B. Leuhistin, RB3014 oder Actinonin bewirkt werden [9,80,81,83,84,87,166].

Auch für die zytosolisch lokalisierten Arginyl-Aminopeptidase [20] und Leucyl-Aminopeptidase [74] konnte die stimulationsabhängige Erhöhung der enzymatischen

Aktivität nachgewiesen werden, wobei die Stimulierung durch PWM nur eine leichte Aktivierung der LAP ergab. Die *in vitro* erreichte Induktion der zytosolischen Aminopeptidasen konnte auch durch spezifische Inhibitoren reguliert werden. So konnte die Expression der Arginyl-Aminopeptidase durch den spezifischen Inhibitor Arphamenin B herabreguliert werden [20]. Der Aminopeptidase-Inhibitor Bestatin erzielte dagegen eine induzierende Wirkung in *in vitro* stimulierten Lymphozyten [128].

Die in dieser Arbeit eingesetzten APN-Inhibitoren RB 3014 und Actinonin, erzielten in ihrer Wirkung auf die Expression der zAAP abhängig von der Stimulator-kombination völlig unterschiedliche Resultate. So zeigten die Inhibitoren nur bei PHA/PMA-stimulierten T-Zellen eine Hemmung der zAAP-mRNA Expression. Ein völlig anderes Resultat wurde bei T-Zellen beobachtet, die durch PWM/PMA stimuliert wurden. Hier führte die Behandlung mit dem spezifischen APN-Inhibitor RB3014 zu einer Induktion der Expression der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase. Actinonin und Leuhistin hatten hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die zAAP-Expression. Eine Erklärung für die hier festgestellten Unterschiede könnte in den verschiedenen Stimulationsmechanismen bzw. Signaltransduktionswegen liegen, über welche jeweils die Aktivierung der Zellen vermittelt wird.

Neben den *in vitro* Befunden konnte auch auf Lymphozyten aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis eine erhöhte Expression der APN nachgewiesen werden [76]. Insgesamt vermutet man daher, dass die Exopeptidasen eine modulierende Wirkung auf proliferative Prozesse von Immunzellen besitzen könnten. Die Bedeutung der zytosolisch lokalisierten Aminopeptidasen an diesen immunologischen Prozessen ist zur Zeit noch nicht aufgeklärt.

5.3 FUNKTION DER ZAAP

Nachdem die humane zAAP als hauptsächlich zytosolisch lokalisiert beschrieben wurde [39,42], blieb die Funktion *in vivo* zunächst unklar. Ein Vorkommen im Nukleus und an den Mikrotubuli des Spindelapparates mitotischer Zellen [28] führte zu einer Diskussion über die Beteiligung an der Zell-Zyklus-Regulation. Daneben wird die zAAP als Kandidat des Enkephalin-Metabolismus im Gehirn betrachtet [53,102]. Weitere Studien wiesen dem Enzym eine entscheidende Rolle in der Inaktivierung verschiedener Neuropeptide wie Somatostatin, Cholecystokinin und Dynorphin zu [62,53,55,102,127,36]. Bisher konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen den Mengen von zAAP und der Lokalisation von Neuropeptiden gefunden werden. In verschiedenen Gebieten von *post mortem* Gehirnen von Schizophrenie-Patienten wurden signifikant niedrigere Mengen von zAAP im Vergleich zum gesunden Gehirn festgestellt [63].

Mit der „goku“ Maus, in der das Gen der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase mutiert ist, steht seit kurzer Zeit ein gutes Modell zur Untersuchung der Rolle der zAAP *in vivo* zur Verfügung [112]. Die „goku“ Mäuse sind kleinwüchsig und zeigen einige Abweichungen vom normalen Verhalten bezüglich Schmerz- und Angstempfindlichkeit [112]. Dieser Phänotyp wird dem Fehlen der zAAP zugeschrieben. Weitere Versuche zeigten, dass die weiblichen „goku“ Mäuse unfruchtbar sind [113,114] und eine verzögerte Bildung des *Corpus Luteum* aufwiesen. Männliche „goku“ Mäuse sind kopulationsunfähig und weisen eine beeinträchtigte Spermato-genese auf. Diese Defizite lassen sich nicht mit der Verabreichung von Androgenen wiederherstellen [114]. Im Zusammenhang mit der starken Expression der zAAP im Gehirn und in den Sertoli-Zellen kann eine Beteiligung an den von Hormonen vermittelten Signalwegen vermutet werden [114]. Andere Studien berichten von einer Abhängigkeit der zAAP-Aktivität vom Östrogengehalt [35], was diese Hypothese unterstützen würde. Der genaue Mechanismus bleibt allerdings ungeklärt.

Neueste Daten zeigen, dass die zAAP innerhalb des Antigenprozessierungsweges für Liganden der MHC-Klasse I Moleküle nach dem Proteasom als „trimming peptidase“ fungieren kann [142]. Die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase übernimmt dabei

zusammen mit der Bleomycin-Hydrolase die endgültige N-Terminale Prozessierung in einer redundanten Weise. Durch diese Redundanz ist eine effizientere Generierung von CTL-Epitopen möglich, die es Viren und Tumorzellen erschwert, vom Immunsystem nicht entdeckt zu werden. Da neben diesem Befund auch die stimulationsabhängige Induktion der Expression der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase für eine Rolle der zAAP in der Immunantwort spricht, ist die Frage interessant, ob das Fehlen des Enzyms Auswirkungen auf das Immunsystem nach sich zieht. Zur näheren Beschreibung würden sich dann vorrangig „knockout“ bzw. „goku“ Mäuse eignen.

Um weitere Funktionen der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase aufzudecken, ist die Suche nach natürlichen Substraten und hochspezifischen Inhibitoren für dieses Enzym eine vordringliche Aufgabe. Vor kurzem wurde ein zAAP-Inhibitor, PIQ-22 (bzw. PAQ-22), entwickelt. PIQ-22 oder PAQ-22 sind Phthalimid-Derivate, die das Enzym auf nicht kompetitive Weise hemmen. Bisher wurde der Inhibitor gegenüber der tierischen APN, LAP, DPiV, Trypsin und Chymotrypsin getestet und es konnte keine Hemmung festgestellt werden. Die eigenen Untersuchungen bringen die Bestätigung für die inhibitorische Wirkung von PAQ-22 auf die zAAP aus der T-Zelllinie H9 und zeigen gleichzeitig, dass auch die humane APN resistent gegenüber PAQ-22 ist. Weitere Untersuchungen müssen die exakte Spezifität gegenüber der zAAP noch belegen. Dieser Inhibitor kann die Tumor-Invasion *in vitro* verhindern [145,75,68]. Bisher wurde keine direkte Beteiligung der zAAP an der Tumor-Invasion untersucht.

Auf der anderen Seite konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die bekannten APN-Inhibitoren auch auf die zAAP einen inhibitorischen und regulatorischen Effekt erzielen können. Dieses Ergebnis stellt einen therapeutisch interessanten Aspekt dar, der weitergehender Erklärung bedarf.

5.4 ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Im Zytosol der humanen T-Zelllinie H9 wurde eine zytosolische Alanyl-Aminopeptidase EC 3.4.11.14 molekular identifiziert und biochemisch charakterisiert. Dazu wurde das Enzym zunächst unter Nutzung der Methoden der FPLC-Chromatographie gereinigt und dann mittels Massenspektrometrie (Maldi-TOF) der zAAP zugeordnet. Die biochemischen Eigenschaften der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase (zAAP) aus H9-Zellen zeigten Gemeinsamkeiten aber auch Differenzen im Vergleich zu bisher bekannten zytosolischen Alanyl-Aminopeptidasen aus anderen humanen Geweben. Allen zAAP-en gemeinsam ist die Eigenschaft der Metallo- und Thiolpeptidase sowie eine breite Substratspezifität. Sie sind 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 Anpassung der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase an die Funktion im jeweiligen Gewebe hinweisen. Die zytosolische Aminopeptidase aus humanen Erythrozyten weist die höchste Ähnlichkeit mit der zAAP aus der T-Zelllinie H9. Ein Vergleich der Eigenschaften der bisher beschriebenen humanen zAAP's wurde in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Biochemische Eigenschaften der bisher aus humanen Geweben und Zellen charakterisierten zytosolischen Alanyl-Aminopeptidasen.

Humane zytosolische Alanyl-Aminopeptidasen (EC 3.4.11.14)								
Eigenschaft	H9-Zellen	Gehirn	Niere	Skelett- muskel	Plazenta	Augen -linse	Leber	Ery- thro- zyten
Molekularmasse (kDa)	101	105	103	102	95	100	98	110
pH-Optimum	6,5	7,3	7,3	7,3	8,0	6,0	7,5	6,0-7,0
Substratspezifität*	Ala-, Leu-, Phe-, Arg-, Lys-, Met-							
K _m Wert (Ala-Substrate)	217 µM (-pNA)	170 µM (-AMC)	200 µM (-AMC)	70 µM (-AMC)	510 µM (-pNA)	n.v.	n.v.	n.v.
Aktivierung mit Metallionen	Co⁺⁺	Ca ⁺⁺	Ca ⁺⁺	Ca ⁺⁺	n.v.	Mn ⁺⁺ Co ⁺⁺	n.v.	Co ⁺⁺
Puromycin (IC ₅₀ -Wert)	3,1 µM	6,5 µM	20 µM	n.v.	2,0 µM	n.v.	0,6 µM	2,5µM
Metallchelatoren	Sensitiv							
Thiolproteasen- Inhibitoren	Sensitiv							
Bestatin	Sensitiv							

* Für die Charakterisierung wurden Aminosäure-pNA, -AMC oder β-NA – Derivate genutzt.

n.v. – nicht vorhanden

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. Beide gehören zur Zinkpeptidasenfamilie (Zinkine) mit einem Zn-bindenden Motiv im aktiven Zentrum. Da auch einige APN-Antikörper gegen die Struktur des aktiven Zentrums gerichtet sind, wurde eine Kreuzreaktivität mit der zAAP aus der T-Zelllinie H9 beobachtet. Dies betraf den monoklonalen WM15-Antikörper als auch das 7B-Antiserum. Nicht betroffen war der Leu-M7 Antikörper, der direkt neben dem katalytischen Zentrum der APN bindet.

Auf der Inhibitorebene lassen sich beide Aminopeptidasen, zAAP und APN, mit dem Thiolpeptidasen-Inhibitor Iodacetamid und dem neuentwickelten Inhibitor PAQ-22 sicher voneinander unterscheiden, da die Aminopeptidase N gegenüber beiden Inhibitoren resistent ist.

Die Expression der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase in peripheren T-Zellen konnte durch PHA/PMA und PWM/PMA induziert werden. Diese aktivierungsabhängige Expression wurde auf der mRNA-Ebene mit Hilfe der quantitativen RT-PCR-Technik gemessen. Das belegt eine Beteiligung der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase an der Immunantwort. Die induzierbare Aktivierung des Enzyms konnte auch durch die Behandlung mit verschiedenen APN-Inhibitoren modifiziert werden. Der Effekt der Wirkung war dabei abhängig von den verwendeten Mitogen-Kombinationen.

