

Trimpeptidasen  
im Antigenprozessierungsweg  
für MHC-Klasse-I

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaft

2001

vorgelegt von

Lars Stoltze

Tag der mündlichen Prüfung:05.04.2001

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. H. Probst

Prof. Dr. H.-G. Rammensee

Prof. Dr. G. Jung

## Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Das Immunsystem</b>	<b>6</b>
1.1.1. Einteilung des Immunsystems	6
1.1.2. Erworbene Immunität	6
1.1.3. T-Lymphozyten	7
1.1.4. Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)	8
1.1.5. MHC-Klasse-I	8
1.1.6. MHC-Klasse-II	9
<b>1.2. Antigenprozessierung</b>	<b>10</b>
1.2.1. MHC-Klasse-I Weg	10
1.2.2. MHC-Klasse-II Weg	11
<b>1.3. Das Proteasom</b>	<b>13</b>
1.3.1. Vorkommen und Aufgaben des Proteasoms	13
1.3.2. Aufbau des eukaryontischen Proteasoms	13
1.3.2.1. 20S-Proteasom	13
1.3.2.2. 26S-Proteasom	14
1.3.2.3. Immunoproteasom	15
<b>1.4. Andere Proteasen im Antigenprozessierungsweg für MHC-Klasse-I</b>	<b>16</b>
<b>1.5. Zielsetzung und experimenteller Ansatz</b>	<b>18</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
<b>2.1. Material</b>	<b>19</b>
2.1.1. Chemikalien	19
2.1.2. Peptide	19
2.1.3. Plasmide	19
2.1.4. Antikörper	20
2.1.5. Zelllinien	20
2.1.5. Mäuse	21
2.1.6. Zellkulturmedien	21
2.1.7. Verwendete Proteaseinhibitoren	19
<b>2.2. Methoden</b>	<b>23</b>
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	23
2.2.1.2. Spektrometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen	23
2.2.1.3. Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen	23
2.2.1.4. Fällung von DNA mit Ethanol	23
2.2.2. Zellbiologische Methoden	23
2.2.2.1. Kultivierung von Säugerzellen	23
2.2.2.2. Zentrifugation von Zellen	24
2.2.2.3. Bestimmung der Lebendzellzahl	24
2.2.2.4. Einfrieren und Auftauen von Zellen	24
2.2.2.5. Inaktivieren von Zellen	24
2.2.2.6. Transfizierung von Zellen durch Elektroporation	24
2.2.3. Immunologische Methoden	25
2.2.3.1. Kultivierung von cytotoxischen T-Lymphocyten	25
2.2.3.2. <sup>51</sup> Cr-Freisetzungstest	25
2.2.3.3. Saures Waschen von Zellen	26
2.2.3.4. Durchflusszytometrie	26
2.2.3.5. Infektion von Zellen mit Vesiculärem Stomatitis Virus	27
2.2.4. Biochemische Methoden	27
2.2.4.1. Präparative Methoden	27

2.2.4.1.1.	Aufschluss von Zellen	27
2.2.4.1.2.	Ultrazentrifugation	27
2.2.4.1.3.	TFA Fällung von Proteinen	28
2.2.4.1.4.	FreeFlow Elektrophorese	28
2.2.4.1.5.	Chromatographische Methoden	28
2.2.4.1.5.1.	Ionenaustauscher-FPLC mit DEAE-Toyopearl	28
2.2.4.1.5.2.	Ionenaustauscher-FPLC mit MonoQ	28
2.2.4.1.5.3.	Gelfiltration mit Superdex	29
2.2.4.1.5.4.	Gelfiltration mit HPLC	29
2.2.4.1.5.5.	Reversed Phase-HPLC	29
2.2.4.2.	Analytische Methoden	29
2.2.4.2.1.	Proteinbestimmung	29
2.2.4.2.2.	Gelelektrophorese	30
2.2.4.2.2.1.	SDS-PAGE	30
2.2.4.2.2.2.	BN-PAGE	30
2.2.4.2.2.3.	Coomassie-Färbung	31
2.2.4.2.2.4.	Zink-Färbung	32
2.2.4.2.2.5.	Silber-Färbung	32
2.2.4.2.3.	Tryptischer In-Gel-Verdau	32
2.2.4.2.4.	Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation	33
2.2.4.2.5.	Fluoreszenzassay zur Bestimmung proteolytischer Aktivität	33
2.2.4.2.6.	Verdau synthetischer Peptide mit PSA, BH oder 20S Proteasom	34
2.2.4.2.7.	Entsalzen von Proben	34
2.2.4.2.8.	Jodierung von Peptiden mit <sup>125</sup> I	34
2.2.5.	Tierexperimentelle Methoden	35
2.2.5.1.	Gewinnung von Peptid-spezifischen CTL durch DNA-Immunisierung von Mäusen	35
2.2.5.2.	Gewinnung von Peptid-spezifischen CTL durch Peptid-Immunisierung von Mäusen	36
2.2.5.3.	Gewinnung von CTL durch Immunisierung mit Zellen	36
2.2.5.4.	Gewinnung von ConA und LPS aktivierten Zellen aus einer Milzsuspension	36
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
<b>3.1.</b>	<b>Effekte verschiedener Proteaseinhibitoren auf die Antigenprozessierung</b>	<b>37</b>
3.1.1.	Lactacystin inhibiert die Prozessierung ganzer Proteine und das C-terminale Trimming von VSV-NP 52-59	37
3.1.2.	LLnL inhibiert die Prozessierung ganzer Proteine und aktiviert das N-terminale Trimming von VSV-NP 52-59	38
3.1.3.	AAF-CMK inhibiert die Prozessierung ganzer Proteine und das N-terminale Trimming von VSV-NP 52-59	40
<b>3.2.</b>	<b>Definition und Reinigungskriterien von Trimpeptidasen</b>	<b>43</b>
3.2.1.	Definition von Trimpeptidasen	43
3.2.2.	Reinigungskriterien für Trimpeptidasen	43
<b>3.3.</b>	<b>Reinigung und Identifikation cytosolischer Trimpeptidasen</b>	<b>45</b>
3.3.1.	Reinigung cytosolischer Trimpeptidasen	45
3.3.2.	Identifikation cytosolischer Trimpeptidasen	48
<b>3.4.</b>	<b>Charakterisierung der identifizierten Trimpeptidasen in vitro</b>	<b>49</b>
3.4.4.	Die proteolytische Aktivität von PSA	50
3.4.5.	Die proteolytische Aktivität von BH	52
3.4.6.	Die proteolytische Aktivität anderer möglicher Trimpeptidasen	55
<b>3.5.</b>	<b>Charakterisierung der identifizierten Trimpeptidasen in vivo</b>	<b>56</b>
3.5.1.	Effekt von E64 und Puromycin auf die Antigenprozessierung	56
3.5.2.	Charakterisierung von BH <sup>-/-</sup> und PSA <sup>-/-</sup> Mäusen	58
<b>3.6.</b>	<b>Suche nach cytosolischen Vorläuferpeptiden von MHC-Liganden</b>	<b>61</b>
<b>3.7.</b>	<b>Suche nach cytosolischen Peptid-Chaperonen</b>	<b>62</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>65</b>
<b>4.1.</b>	<b>Problematik bei der Verwendung von Proteaseinhibitoren</b>	<b>65</b>
4.1.1.	Spezifität der verwendeten Proteaseinhibitoren	65

<b>4.2. Trimpeptidasen im Antigenprozessierungsweg für MHC-Klasse-I</b>	<b>67</b>
4.2.1. PSA als Trimpeptidase	69
4.2.2. BH als Trimpeptidase	71
4.2.3. Trimpeptidasen im ER	73
4.2.4. Redundanz im Trimpeptidasensystem	73
<b>4.3. Weitere Proteasen im Antigenprozessierungsweg für MHC-Klasse-I</b>	<b>75</b>
<b>4.4. Peptid-Chaperone im Antigenprozessierungsweg für MHC-Klasse-I</b>	<b>76</b>
<b>4.5. Ausblick</b>	<b>78</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>79</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>7. Literatur</b>	<b>81</b>
<b>8. Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen</b>	<b>96</b>
<b>Danksagung</b>	<b>97</b>
<b>Akademische Lehrer</b>	<b>98</b>
<b>Tabellarischer Lebenslauf</b>	<b>99</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Immunsystem

Die Aufgabe eines Immunsystems besteht in erster Linie darin, den eigenen Organismus vor Infektionen durch äußere Einflüsse zu schützen. Diese Infektionen können durch vielerlei andere Organismen, wie z.B. Bakterien oder Pilze ausgelöst werden. Aber auch Viren oder Makromoleküle können eine Infektion auslösen. Darüberhinaus können auch andere fremde Substanzen, selbst anorganische Materialien, das Immunsystem aktivieren. Die gleichen Mechanismen, welche den Schutz vor Infektionen bewirken, können sich jedoch unter gewissen Umständen auch in ungewollter Weise gegen den eigenen Organismus richten. Diese Reaktion des Immunsystems wird als Autoimmunität bezeichnet und ist der Grund für viele Krankheiten (z.B. Diabetes mellitus Typ 1; Myasthenia gravis). Die Mechanismen gegen den eigenen Organismus können jedoch auch erwünscht sein, etwa für die Entfernung von entarteten Tumorzellen und führen bei nicht Vorhandensein meist zum Tod des Organismus. Aus diesen Gründen beschränkt sich die Untersuchung des Immunsystems nicht nur auf das Verstehen der Mechanismen zur Fremdadwehr, sondern umfasst auch das Gebiet der Toleranz gegenüber dem eigenen Organismus.

Während auch Invertebraten gewisse Merkmale eines Immunsystems aufweisen (siehe 1.1.1.), wird im Folgenden das Immunsystem von Vertebraten beschrieben.

### 1.1.1. Einteilung des Immunsystems

Das Immunsystem wird im allgemeinen in mehrere Komponenten eingeteilt. Zu beachten ist wie bei jeder Einteilung eines Systems, dass das Ausfallen einer Komponente in der Regel immer eine mehr oder weniger große Störung des Gesamtsystems beinhaltet. Dies schließt ein, dass die im Folgenden erläuterten Komponenten sich in ihrer Wirkung ergänzen und für sich allein keinen ausreichenden Schutz bewirken können.

Als einfachste Einteilung wird zwischen natürlicher und erworbener (spezifischer) Immunität unterschieden. Invertebraten weisen nur Merkmale der natürlichen Immunität auf. Sie beinhaltet Barrieren wie die Haut, Effektormoleküle, die z.B. im Komplementsystem enthalten sind, Zellen wie Makrophagen oder NK-Zellen und bestimmte Cytokine. Die erworbene Immunität setzt sich aus Effektormolekülen wie den Antikörpern, Zellen wie den Lymphozyten und wiederum bestimmten Cytokinen zusammen.

Im Weiteren sollen einige Komponenten der erworbenen Immunität näher beschrieben werden.

### 1.1.2. Erworbene Immunität

Die erworbene Immunität lässt sich weiter in humorale und zellvermittelte Immunität untergliedern. In der humoralen Immunität sind die B-Lymphozyten (engl.: *bursa* oder

*bone marrow derived*) die wichtigsten Effektorzellen. Durch die Produktion von Antikörpern in löslicher und membrangebundener Form sind sie in der Lage, auf fast jede Art von Fremdstoff zu reagieren. Ihre Aktivierung ist von der direkten Erkennung der verschiedensten Strukturen der Fremdstoffe abhängig, wodurch sie sich von den wichtigsten Effektorzellen der zellvermittelten Immunität den T-Lymphozyten (von Thymus gereiften Lymphozyten) unterscheiden. Deren Aktivierung ist nur durch die Präsentation von Peptiden, die prozessierte Bruchstücke von Proteinen darstellen, auf MHC-Molekülen und weiteren kostimulatorischen Signalen (wie z.B. CD40 / CD40-Ligand-Wechselwirkungen) durch sogenannte professionelle Antigen präsentierende Zellen (APC, von engl.: *antigen presenting cell*) möglich (siehe 1.2.).

Beiden Lymphozytenunterarten ist dabei gemeinsam, dass sie über ihren spezifischen Rezeptor aktiviert werden, jedoch ein weiteres Signal durch andere Zellen benötigen, um ihre Funktion auszuführen. Für B-Zellen sind dies Signale von T-Helfer-Zellen und für T-Zellen Signale von professionellen APC. Diese setzen sich aus Makrophagen, Dendritischen Zellen (DC) und B-Zellen zusammen, deren Gemeinsamkeit ist, dass sie Haupthistokompatibilitätsmoleküle der Klasse II (MHC-Klasse-II-Moleküle) exprimieren.

Die Hauptmerkmale der erworbenen Immunität sind die der Spezifität (Erkennung einer bestimmten Struktur unter allen möglichen vorkommenden Strukturen), Diversität (durch genetische Variation der Oberflächen Rezeptoren von B- und T-Zellen wird die Spezifität ermöglicht), Gedächtnis (B- und T-Zellen können sich zu Gedächtniszellen differenzieren), Selbstbeschränkung (die Effektorreaktion ist nur von beschränkter Dauer) und Eigen- und Fremdunterscheidung (der eigene Organismus soll von der Effektorreaktion verschont bleiben).

### 1.1.3. T-Lymphozyten

Alle T-Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche einen T-Zell-Rezeptor (TCR, von engl.: *T-cell receptor*). Dieser Rezeptor besteht aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette. Nur eine kleine Population, deren Aufgabe noch nicht genau bekannt ist, besitzt einen TCR mit je einer  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette. Durch genetische Umlagerung während der Reifung von T-Zellen kann ein geschätztes Repertoire von bis zu  $10^{15}$  Rezeptoren unterschiedlicher Spezifität entstehen. Jede T-Zelle besitzt dabei nur einen TCR bestimmter Spezifität und dieser ist nicht kovalent mit einem CD3-Komplex assoziiert, bestehend aus fünf transmembranen Oberflächenmolekülen ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ), die für die Signalübertragung in die Zelle verantwortlich sind.

Die Aktivierung von T-Zellen ist davon abhängig, ob der TCR einen Komplex aus Peptid- und MHC-Molekül auf professionellen APC erkennt (diese beschränkte Erkennung wird Restriktion genannt (Zinkernagel and Doherty, 1974)) und ein kostimulatorisches Signal an die T-Zelle gesendet wird. Für das kostimulatorische Signal sind besonders die Moleküle CD40 auf den professionellen APC und CD40-Ligand auf den T-Zellen entscheidend (Schoenberger et al., 1998; Bennett et al., 1998). Weitere Wechselwirkungen wie durch B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) auf den professionellen APC, mit CD28 auf den T-Zellen spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Aktivierung (bzw. CTLA-4 (CD152) mit B7.1 und B7.2 in der negativen Regulation) der T-Zelle (Rudd, 1996; Tivol et al., 1995).

Die Aktivierung der T-Zelle führt dann je nach T-Zell-Typ zu verschiedenen Effektorreaktionen, die von naiven T-Zellen nicht ausgeführt werden können. Der für diese Promotionsarbeit wichtige T-Zell-Typ sind die cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL), da er als Effektorzelle eingesetzt wurde. Sie sind CD8 positiv und ihr TCR erkennt Peptid-MHC-I-Komplexe. Werden durch aktivierte CTL Fremdpeptid-MHC-I-Komplexe erkannt, wird die Zielzelle durch Freisetzen von porenbildenden Substanzen wie Perforin (Podack et al., 1991) oder durch Auslösen von Apoptose durch FAS (CD95) oder Granzyme (= Serinproteasen) (Apasov et al., 1993) lysiert.

#### 1.1.4. Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)

Die MHC-Moleküle kodieren aus einer Gruppe eng gekoppelter Gene, deren Bereich aus historischen Gründen MHC (engl.: *Major histocompatibility complex*) genannt wird (Counce et al., 1956). Im MHC befinden sich auch andere Gene, die an der Antigenprozessierung beteiligt sind, wie die des TAP-Transporters (engl.: *transporters associated with antigen processing*) sowie zwei der drei IFN-induzierbaren Proteasomuntereinheiten (Brown et al., 1991; Glynn et al., 1991; Ortiz-Navarrete et al., 1991). Der MHC weist einen sehr hohen genetischen Polymorphismus auf (Parham et al., 1995) und ist somit einer der wichtigsten Garanten für das Überleben einer Population. Eine menschliche Zelle exprimiert zum Beispiel maximal sechs verschiedene MHC-Klasse-I Allele. Dies bedeutet, dass trotz der großen Zahl verschiedener Peptide, die durch die unterschiedlichen Allele gebunden werden können (siehe 1.2.), die Möglichkeit besteht, dass einige Krankheitserreger nicht präsentiert werden können und dadurch ihrer Eliminierung entgehen. Da sich die in der gesamten menschlichen Population exprimierten MHC-Allele aufgrund des Polymorphismus jedoch stark unterscheiden, ist sichergestellt, dass mindestens einige Individuen in der Lage sind, den oben erwähnten Erreger zu eliminieren und somit das Überleben der menschlichen Population zu sichern.

#### 1.1.5. MHC-Klasse-I

Die Moleküle der Klasse I und II unterscheiden sich in Aufbau, Aufgabe und zellulärem Vorkommen, beide sind jedoch transmembrane Glykoproteine. Die Moleküle der Klasse II kommen nur auf bestimmten Zellen vor (siehe 1.1.2.), während die der Klasse I auf fast allen Zellen exprimiert werden. Das MHC-Klasse-I-Molekül besteht aus einer schweren  $\alpha$ -Kette (45 kD) und einem leichten nicht kovalent assoziierten  $\beta$ 2-Mikroglobulin (12 kD), welches nicht membrangebunden ist. Die schwere Kette besteht aus drei Domänen ( $\alpha_1$ - $\alpha_3$ ), wobei  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  die Antigenbindungstasche bilden. In dieser Bindungstasche wird der „Boden“ durch mehrere  $\beta$ -Faltblattstrukturen gebildet und zwei  $\alpha$ -Helices bilden jeweils die geschlossenen „Wände“ (Bjorkman et al., 1987a; Bjorkman et al., 1987b). Diese Tasche bindet nur Peptide mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren (Falk et al., 1991; Madden et al., 1991). Die Wechselwirkung von Peptid und MHC-Molekül erfolgt dabei über Wasserstoffbrücken und elektrostatische Wechselwirkungen, wobei bestimmte Aminosäuren eine Ankerfunktion ausüben, in dem sie größere Wechselwirkungen mit dem MHC-Molekül eingehen als andere (Rammensee et al., 1993), so dass für die unterschiedlichen Allele verschiedene Bindungsmotive erstellt werden können.



---

### 1.1.6. MHC-Klasse-II

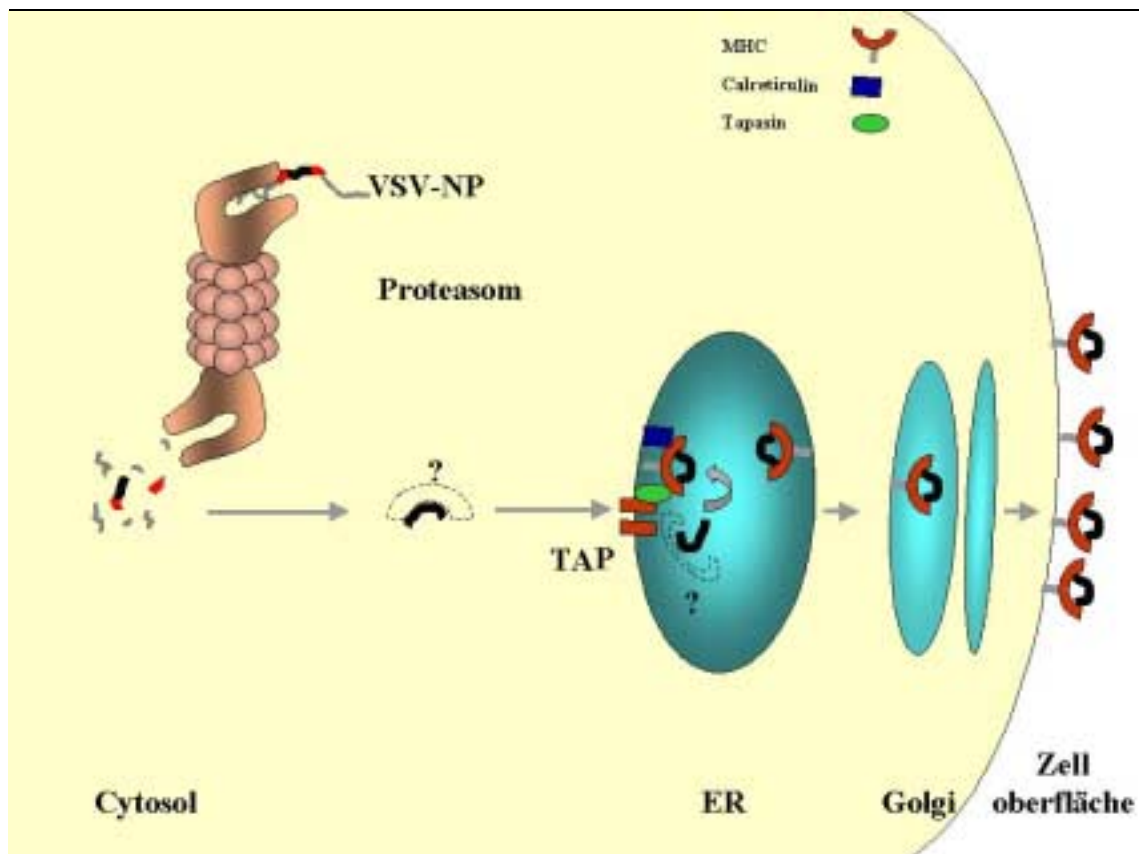
Die Moleküle der Klasse-II bestehen aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette (je ca. 30 kD), die sich jeweils aus zwei Domänen zusammensetzen und nicht kovalent assoziiert sind. Die Domänen  $\alpha_1$  und  $\beta_1$  bilden dabei die Antigenbindungstasche die sich ebenfalls aus einem  $\beta$ -Faltblattboden und zwei  $\alpha$ -Helices-Wänden zusammensetzt. Dabei sind die Enden der Tasche jedoch geöffnet (Brown et al., 1993), so dass Peptide von 12-25 Aminosäuren binden können (Rudensky et al., 1991). Die Wechselwirkungen beschränken sich jedoch ebenfalls auf einen Bereich von etwa 9 Aminosäuren, doch mögliche Bindungsmotive sind weniger strikt als bei MHC-Klasse-I-Molekülen (Röttschke and Falk, 1994).

## 1.2. Antigenprozessierung

Beide Wege der Antigenprozessierung sind noch nicht lückenlos aufgeklärt und es ist anzunehmen, dass unter bestimmten Voraussetzungen auch eine Überkreuzung der Wege möglich ist (Staerz et al., 1987; Rock and Clark, 1996; Speidel et al., 1997; Gromme et al., 1999). Deshalb sollen einleitend die „klassischen“ Wege beschrieben werden.

### 1.2.1. MHC-Klasse-I Weg

Der größte Teil der MHC-Klasse-I-Liganden stammt von endogenen Proteinen. Diese werden vom Proteasom abgebaut (Cerundolo et al., 1997) und die so entstandenen Peptide gelangen über den TAP-Transporter in ATP abhängiger Weise in das ER (Shepherd et al., 1993), dargestellt in Abbildung 1.1.. Somit gehört TAP zur Klasse der ABC-Transporter (engl.: *ATP-Binding-Cassette-Transporter*). Im ER werden die Peptide auf MHC-Moleküle geladen. Diese Peptid-MHC-Komplexe wandern dann über den Golgiapparat zur Zelloberfläche. Für den Transport der Peptide zwischen Proteasom und TAP, sowie TAP und MHC-Molekül werden verschiedene Chaperone verantwortlich gemacht (Srivastava et al., 1994; Arnold et al., 1995; Lammert et al., 1997b; Lammert et al., 1997a). Die exakten Beweise ihrer Beteiligung stehen allerdings noch aus.



**Abbildung 1.1** Klassischer Weg der MHC-Klasse-I Antigenprozessierung. Die Fragezeichen beziehen sich auf bisher nicht genau definierte Proteine.

Der TAP-Transporter besteht aus zwei homologen Untereinheiten TAP1 und TAP2. Er übt neben dem Proteasom und dem MHC-Molekül eine selektive Wirkung auf die zu präsentierenden Peptide aus. Obwohl ein funktioneller Polymorphismus bisher nur für TAP2 bei Ratten bekannt ist, zeigt die Transportspezifität für Peptide des Maus-TAP eine Bevorzugung von hydrophoben, bzw. bei TAP von Ratten hydrophoben und basischen C-Termini. Dies ist in Übereinstimmung mit den entsprechenden MHC-Bindungsmotiven (Schumacher et al., 1994). Bei menschlichen Zellen wurde dies nicht beobachtet (Momburg et al., 1994; Obst et al., 1995). Die Länge der Peptide kann ebenfalls variieren, liegt jedoch bevorzugt zwischen 8 und 14 Aminosäuren (Uebel and Tampé, 1999). In verschiedenen Arbeiten wurden Bindungsmotive für Peptide erstellt, die durch TAP transportiert werden (van Endert et al., 1995; Uebel et al., 1997; Neisig et al., 1995; Lauvau et al., 1999). Dabei stellte sich heraus, dass P an Position 2 und D, E oder G an Position 3 eine negative Wirkung auf den TAP-Transport haben (Uebel and Tampé, 1999). Dies beinhaltet, dass MHC-Liganden, die diese Aminosäuren an diesen Positionen benötigen, wie zum Beispiel für HLA-B7, nur als längere Vorläuferpeptide durch TAP transportiert werden können.

Des Weiteren wurde eine Interaktion von TAP mit MHC-Klasse-I-Molekülen nachgewiesen (Ortmann et al., 1994). Dabei bildet sich ein Komplex mit Calreticulin und Tapasin aus, zwei membranständige Chaperone im ER die mit dem unbeladenen MHC-Klasse-I-Molekül assoziieren. Tapasin stellt dabei den Kontakt zu TAP her (Sadasivan et al., 1996). Nach der Beladung des MHC-Moleküls mit Peptid enden diese Wechselwirkungen zwischen den vier Proteinen und das beladene MHC-Molekül wird zur Zelloberfläche transportiert (Pamer and Cresswell, 1998; van Endert, 1999). Ein Fehlen von Tapasin bewirkt dabei, dass weniger und instabilere Peptid-MHC-Komplexe auf der Zelloberfläche erscheinen. Tapasin scheint daher eine Art Qualitätskontrollfunktion bei der Beladung von MHC-Peptidkomplexen zu haben (Garbi N, 2000; Grandea, et al., 2000). Diese Wechselwirkungen zwischen MHC und den weiteren Molekülen lassen auch die Möglichkeit offen, dass kein weiteres lösliches Chaperon im ER an der Übertragung des Peptides von TAP auf das MHC-Molekül beteiligt ist.

Die Bedeutung von TAP im Antigenprozessierungsweg wird dadurch belegt, dass nur sehr geringe Antigenpräsentation in Zellen mit TAP-Defekten stattfindet und verschiedene Viren dieses Molekül als Zielobjekt nutzen, um den Antigenprozessierungsweg zu blockieren und somit der Erkennung durch das Immunsystem entgehen wollen (Hill et al., 1995; Früh et al., 1995; Wiertz et al., 1996).

### 1.2.2. MHC-Klasse-II Weg

Der klassische Weg für die MHC-Klasse-II Beladung beinhaltet die Aufnahme von exogenen Proteinen durch Phagozytose, Pinozytose oder Rezeptor vermittelte Endocytose. Die so entstandenen Vesikel verschmelzen mit Lysosomen, in denen die Proteolyse durch Cathepsine und andere Proteasen stattfindet. Eine Fusion mit MHC-II-Moleküle enthaltenden Vesikeln lässt dann ein Beladungskompartiment entstehen (MCI). In diesem Kompartiment sind komplette MHC-Klasse-II-Moleküle enthalten, deren Bindungstasche noch durch CLIP besetzt ist. Dies ist ein Peptidfragment aus der invarianten Kette (Ii). Dieses Chaperon bildet während des Zusammenbaus von MHC-Klasse-II-Molekülen einen Komplex aus drei MHC-Heterodimeren und drei invarianten

---

Ketten ( $\alpha\beta$ -li)<sub>3</sub>. Sind entsprechende Peptide in den MCI Beladungskompartimenten anwesend, katalysiert HLA-DM den Austausch von CLIP mit Peptid und das beladene MHC-Molekül wird auf die Oberfläche transportiert, um dort von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt zu werden (Pieters, 1997). HLA-DM wird dabei von HLA-DO in seiner Funktion kontrolliert (Denzin et al., 1997).

### 1.3. Das Proteasom

#### 1.3.1. Vorkommen und Aufgaben des Proteasoms

Das Proteasom ist die wesentlichste Komponente des Lysosomen unabhängigen Proteinabbaus in eukariontischen Zellen. Hauptsächlich werden dabei falsch gefaltete oder nicht mehr benötigte Proteine abgebaut, die vorher durch Ubiquitin für den Abbau markiert wurden (Ciechanover, 1998; Hershko and Ciechanover, 1998). Dabei werden durch verschiedene ubiquitinübertragende Enzyme Ubiquitinmonomere auf die Proteine übertragen, so dass Ubiquitinketten entstehen, die dann vom Proteasom als Abbausignal erkannt werden (Ciechanover, 1998). Somit ist das Proteasom ein wichtiges Enzym für das Recycling von Aminosäuren und die Funktion ist dabei so bedeutend, dass Proteasom defiziente Zellen nicht lebensfähig sind.

Neben der Funktion im Proteinabbau sind aber auch andere bekannt, zum Beispiel bei der Regulation der periodischen Cyclindegradation (Glutzer et al., 1991; Seufert et al., 1995) oder die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nf- $\kappa$ B (Palombella et al., 1994). Als „Nebeneffekt“ der oben erwähnten Proteinabbaufunktion des Proteasoms ist die Bedeutung in der Generierung von MHC-Klasse-I-Liganden, bzw. deren Vorläuferpeptide zu nennen, die im Detail im Weiteren dieser Arbeit beschrieben wird. Das Vorkommen des Proteasoms in der Zelle beschränkt sich auf den Zellkern und das Cytosol. Dabei ist eine Assoziation mit dem ER (Rivett et al., 1992; Newman et al., 1996; Enenkel et al., 1998) oder dem Cytoskelett (Scherrer and Bey, 1994) möglich.

Die katalytische Einheit des Proteasoms, das 20S Proteasom, wurde in Eukaryonten und ebenso in Archaeobakterien und zuletzt in Eubakterien (Tamura et al., 1995) nachgewiesen.

#### 1.3.2. Aufbau des eukaryontischen Proteasoms

##### 1.3.2.1. 20S-Proteasom

Das 20S Proteasom weist in der Quartärstruktur 28 Untereinheiten auf, die sich in je 2 x 7 homologe Untereinheiten des Typs  $\alpha$  und  $\beta$  aufteilen. Es sind jedoch nur drei der sieben  $\beta$  Untereinheiten katalytisch aktiv. Jede aktive  $\beta$ -Untereinheit beinhaltet dabei eine andere Schnittspezifität: chymotryptische (nach hydrophoben Resten), tryptische (nach basischen Resten) oder Petidyl-Glutamyl-Peptid-Hydrolase (nach sauren Resten) Aktivität (Heinemeyer et al., 1993; Hilt et al., 1993; Enenkel et al., 1994; Arendt and Hochstrasser, 1997). Zusätzlich existieren drei weitere IFN- $\gamma$ -induzierbare  $\beta$ -Untereinheiten, die katalytisch aktiv sind, die gleichen Spezifitäten wie die konstitutiven Untereinheiten aufweisen und die regulären katalytischen Untereinheiten ersetzen können (siehe 1.3.2.3.).

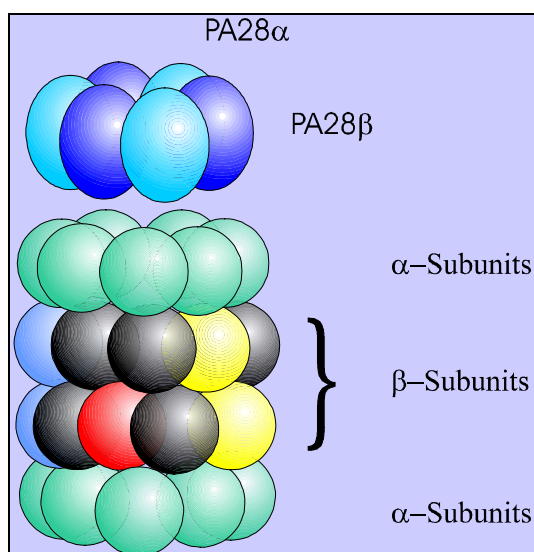
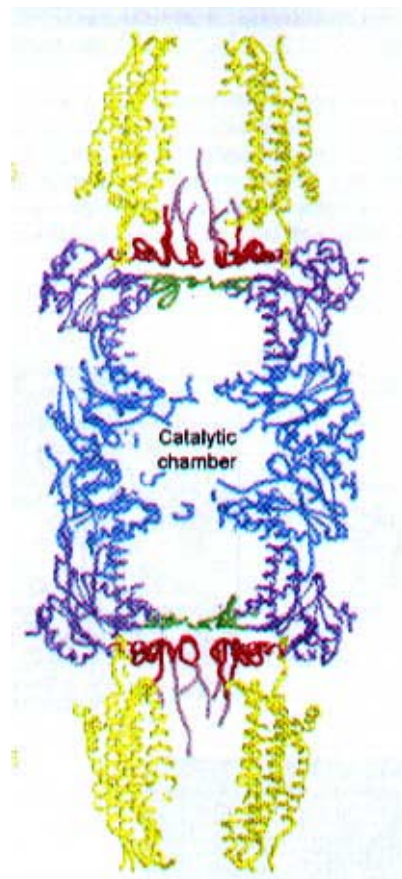
Die Anordnungen der Untereinheiten konnte an Hand der Kristallstrukturen des archaeobakteriellen (Löwe et al., 1995) und des Hefe 20-S-Proteasoms (Groll et al., 1997) aufgeklärt werden. Danach bilden je sieben Untereinheiten einen Ring. Die so erhaltenen vier Ringe ergeben übereinandergelegt eine Fass ähnliche Struktur (Abb. 1.2.A), mit der Abfolge  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ , so dass sie in einer rotationssymmetrischen Beziehung stehen (C2-Achse entlang der  $\beta_7\beta_7$ -Kontaktfläche). Die katalytische

Funktion ist dabei auf den Innenraum beschränkt. Das Hefe 20S Proteasom ergab eine nach außen abgeschlossene Struktur, so dass vermutlich eine Verschiebung der  $\alpha$ -Untereinheiten notwendig ist, um einen Substratzugang zu ermöglichen (Groll et al., 1997). Die existierenden Regulatoren bewirken wahrscheinlich eine Öffnung des Rings aus  $\alpha$ -Untereinheiten, wie an Hand der Kristallstruktur von 11S Regulator und 20S Proteasom gezeigt werden konnte (Abb. 1.2.B und (Whitby et al., 2000)).

### 1.3.2.2. 26S-Proteasom

Der 20S-Komplex kann in Assoziation mit verschiedenen Regulatoren vorliegen. Der Komplex aus 19 S Regulator und 20S Proteasom bildet das 26S Proteasom, das in erster Linie am Ubiquitin abhängigen Proteinabbau beteiligt ist (Hershko and Ciechanover, 1992; Jentsch and Schlenker, 1995). Der 19 S-Komplex ist dabei für die Erkennung und Entfaltung des Proteins sowie Abspaltung des Ubiquitins vom Protein verantwortlich und führt es dann in ATP abhängiger Weise dem 20S-Komplex zu.

Ein weiterer Komplex besteht aus 20S Proteasom und 11S Regulator (Dubiel et al.,

**A****B**

**Abbildung 1.2.** Struktur des Proteasoms. **A** Schematische Darstellung des 20S Proteasoms mit PA28. **B** Kristallstruktur des Komplexes aus 20S Proteasom mit zwei PA28 Regulatoren. Der Komplex ist vertikal in der Mitte aufgeschnitten. Aus Whitby et al., 2000.

1992). Der 11S-Regulator (auch PA28 genannt) kann sich aus zwei Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ , ringförmig, alternierend als  $\alpha_3\beta_3$  aufbauen oder aus nur sechs  $\gamma$ -Untereinheiten aufgebaut sein. Dabei scheint sich das Vorkommen des 11S Regulators aus  $\gamma$ -Untereinheiten jedoch bevorzugt auf den Zellkern zu konzentrieren (Soza et al., 1997; Wojcik et al., 1998) und die Funktion von PA28- $\gamma$  eine andere zu sein, als die von PA28 $\alpha\beta$  (Murata et al., 1999). Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten sind IFN- $\gamma$  induzierbar (Ahn et al., 1995) und sollen *in vitro* die Doppelschnittfunktion des 20S Proteasoms erhöhen (Dick et al., 1996; Niedermann et al., 1997), was allerdings nicht bedeutet, das PA28 die Konformation der aktiven  $\beta$ -Untereinheiten verändert (Whitby et al., 2000). Somit scheint *in vivo* eine verbesserte Lyse von Virus infizierten Zellen durch den 11S-Regulator ermöglicht zu werden (Groettrup et al., 1996). Dies zeigt sich auch in der  $\beta$ -Maus der  $\beta$ -Untereinheit, die Veränderungen in ihrer Immunantwort aufweist (Preckel et al., 1999). Die  $\gamma$ -Untereinheit defiziente Maus ist nur etwas kleiner als eine normale Maus, hat aber die normalen Mengen an  $\alpha$  und  $\beta$ -Untereinheiten (Murata et al., 1999).

Es wurden auch Hybridproteasome beschrieben, die sich jeweils aus 20S Proteasom und einem 11S- sowie einem 19S-Regulator zusammen setzen (Hendil et al., 1998; Tanahashi et al., 2000) Diese Art von Proteasom soll ebenfalls beim Proteinabbau eine Rolle spielen (Tanahashi et al., 2000). Nur welche besondere Funktion sie dabei ausüben, bleibt noch offen.

### 1.3.2.3. Immunoproteasom

Das 20S Proteasom, das die IFN- $\gamma$  induzierten  $\beta$ -Untereinheiten enthält, wird als Immunoproteasom bezeichnet (Boes et al., 1994). Dabei wird angenommen, dass im Falle einer Infektion das von den Zellen produzierte IFN- $\gamma$  den Austausch der  $\beta$ -Untereinheiten in neu synthetisierten Proteasomen bewirkt. Idealerweise besteht dann das 26S-Immunoproteasom aus dem 20S-Proteasom mit IFN-induzierbaren  $\beta$ -Untereinheiten und dem 11S-Regulator (da die  $\alpha,\beta$ -Untereinheiten auch IFN- $\gamma$  induzierbar sind). Eine Assoziation mit anderen Regulatoren oder Mischformen sind aber auch hier möglich. Ob eine strikte Trennung zwischen Immunoproteasom und konstitutivem Proteasom möglich ist oder es weitere Proteasome gibt, die sich als Mischformen herausstellen ist dabei nicht geklärt.

Die Schnittspezifität von Immunoproteasom und konstitutivem Proteasom unterscheidet sich (Morel et al., 2000; Toes et al., 2000). Daher wird angenommen, dass das Immunoproteasom die Immunantwort verstärkt und das konstitutive Proteasome für den „normalen“ Proteinabbau zuständig ist und somit auch eher für Autoimmunkrankheiten verantwortlich sein könnte. Ebenso könnten verschieden Arten von Proteasomen unterschiedliche Rollen in der Entwicklung von Lymphozyten spielen (H. Schild unveröffentlichte Daten).

#### 1.4. Andere Proteasen im Antigenprozessierungsweg für MHC-Klasse-I

Die Hauptquelle aller Liganden für MHC-Klasse-I Moleküle ist das Proteasom (Cerundolo et al., 1997). In mehreren Arbeiten wurde allerdings gezeigt, dass MHC-Klasse-I-Liganden auch ohne das Proteasom generiert werden können (Vinitzky et al., 1997; Luckey et al., 1998; Anton et al., 1998), worauf hier kurz als Exkurs in die nicht klassische Antigenprozessierung des MHC-Klasse-I-Weges eingegangen werden soll. Je nach der Herkunft des Antigens können bei dieser Art der Prozessierung unterschiedliche Proteasen beteiligt sein. So können MHC-Klasse-I-Liganden von Signalpeptiden unabhängig vom Proteasom generiert werden (Bai and Forman, 1997; Wolfel et al., 2000). Dabei gibt es TAP abhängige und unabhängige Epitope, was beinhaltet, dass es cytosolische wie auch ER lokalisierte Proteasen gibt, die an dieser Art der Prozessierung beteiligt sind (Wei and Cresswell, 1992; Henderson et al., 1992; Bai et al., 1998; Wolfel et al., 2000). Als extremstes Beispiel kann auch der Fall betrachtet werden, wenn sich die Wege von MHC-Klasse-I und Klasse-II überschneiden (siehe 1.2.). In solch einem Fall, wie z.B. der Kreuzpräsentation durch Chaperone oder dem Recycling von MHC-Molekülen, müssen sogar Cathepsine zu den Proteasen gerechnet werden, die an der Entstehung des Peptidrepertoires für MHC-Klasse-I beteiligt sind.

Für den klassischen und damit größten Teil der entstehenden Liganden ist jedoch das Proteasom notwendig. In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass das Proteasom nicht in allen Fällen die exakten Liganden für MHC-Klasse-I generiert (Stoltze, 1998; Craiu et al., 1997a; Paz et al., 1999; Dick et al., 1998a). In den meisten Fällen scheint es so zu sein, dass das Proteasom notwendig ist, um den exakten C-Terminus der Liganden zu generieren (Stoltze et al., 1998; Craiu et al., 1997a). Dies schließt offensichtlich nicht die Liganden mit ein, die ganz unabhängig vom Proteasom hergestellt werden. Für die dabei entstehenden Peptidvorläufer ist es notwendig, dass die überschüssigen aminoterminalen Aminosäuren entfernt werden, damit sie in die Bindungstasche des MHC-Moleküls passen (siehe 1.1.5.).

Obwohl schon sehr früh solche Prozessierungsvorgänge diskutiert wurden (Falk et al., 1990), ist das zelluläre Kompartiment, in dem die Entfernung der überschüssigen Aminosäuren stattfindet, bisher nicht bekannt. Es gibt Hinweise darauf, dass im ER eine Prozessierung von sowohl C-terminal (Elliott et al., 1995) als auch N-terminal (Snyder et al., 1994; Snyder et al., 1997; Lobigs et al., 2000) verlängerten Vorläuferpeptiden möglich ist. Dies hat jedoch noch nicht dazu geführt, dass eine mögliche Protease charakterisiert wurde, die für diese Prozessierung verantwortlich sein könnte. Es scheint jedoch, dass zur korrekten Prozessierung im ER das entsprechende MHC Molekül anwesend sein muss (Brouwenstijn and Shastri, 2000). Inwieweit dies mit den Prozessierungsvorgängen und der verantwortlichen Protease im Zusammenhang steht, ist noch offen.

Als ein weiteres mögliches Kompartiment wurde der Golgiapparat und die darin enthaltene Furinprotease vorgeschlagen (Gil-Torregrosa et al., 1998). Dieser Weg könnte neben dem endgültigen Generieren von MHC-Liganden auch als alternativer Weg für alle Membranproteine Bedeutung haben, die auf dem Weg zur Zelloberfläche eine Reifung unterlaufen und somit eine Quelle für MHC-Liganden sein können.



---

Neben dem Golgiapparat und ER ist natürlich eine Prozessierung von Vorläuferpeptiden im Cytosol nicht ausgeschlossen. Ein indirekter Hinweis auf die Existenz solcher Proteasen im Cytosol kommt daher, dass unterschiedliche Vorläuferpeptide für das Ovalbuminepitop 257-264 identifiziert wurden (Paz et al., 1999). Bisher wurden zwei cytosolische Proteasen als mögliche Kandidaten vorgeschlagen. Für Kandidat eins, die Leucinaminopeptidase (LAP), spricht, dass sie IFN- $\gamma$  induzierbar ist (Harris et al., 1992) und ein N-terminal verlängertes Vorläuferpeptid des Ovalbumin 257-264 Epitops *in vitro* prozessieren kann (Beninga et al., 1998). Da IFN- $\gamma$  einen generellen Einfluss auf eine Immunantwort im Allgemeinen und der Antigenprozessierung im Speziellen hat (siehe 1.3.2.3.), ist hier die Annahme, dass Proteine, die IFN- $\gamma$  induzierbar sind, eine Rolle in der Immunantwort spielen. Der zweite Kandidat Tri-Peptidyl-Peptidase II (TPP-II) wird nicht nur für die Entfernung von Aminosäuren von Vorläuferpeptiden verantwortlich gemacht, sondern auch für die Kompensation von weiteren Funktionen des Proteasoms (Glas et al., 1998; Geier et al., 1999). Dies beinhaltet auch die Möglichkeit, dass TPP-II in der Proteasom unabhängigen Antigenprozessierung eine Rolle spielen könnte (Geier et al., 1999).

### **1.5. Zielsetzung und experimenteller Ansatz**

Ziel dieser Doktorarbeit ist es, den Beitrag des Proteasoms bei der Generierung des Modell CTL-Epitops vom Vesikulären Stomatitis Virus, das Nukleoprotein 52-59-Peptid (RGYVYQGL) zu untersuchen. Des Weiteren, aufbauend auf Daten aus der vorangegangenen Diplomarbeit, waren die proteolytischen Aktivitäten zu charakterisieren, die neben dem Proteasom an der Prozessierung dieses Epitops beteiligt sind.

Zu diesem Zweck wurden die in der Diplomarbeit hergestellten Transfektanten, die unterschiedliche Minigenkonstrukte des VSV NP Epitops 52-59 enthalten, benutzt, um durch spezifische Hemmung des Proteasoms den Beitrag zur Prozessierung für dieses Epitope zu bestimmen. Weiterhin wurden die Transfektanten mit nur N-terminal verlängertem Minigenkonstrukt verwendet, um Proteaseinhibitoren zu finden, die in der Lage sind, die N-terminale Prozessierung, an der das Proteasom nicht beteiligt ist, zu blockieren.

Aus den Ergebnissen dieser Experimente wurden Selektionskriterien aufgestellt, um cytosolische Proteasen zu charakterisieren, die für N-terminales Prozessieren von MHC-Liganden zuständig sind.

Um die Arbeit abzurunden, wurden Versuche unternommen Peptidvorläufer für MHC-Liganden direkt mithilfe der Massenspektrometrie zu identifizieren und Peptid-Chaperone zu finden, die verhindern, dass die entstehenden MHC-Liganden vollständig zu Aminosäuren abgebaut werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Alle allgemein verwendeten Reagenzien, die nicht gesondert aufgeführt werden sind in Appendix A aufgeführt.

#### 2.1.2. Peptide

Die in Tabelle 2.1. gezeigten Peptide wurden im Peptidlabor der Arbeitsgruppe (Dr. S. Stevanović) durch Festphasensynthese nach der Fmoc/tBu-Strategie mit dem Syntheseautomaten 432 A (Applied Biosystems) synthetisiert. Ihre Reinheit wurde mit reversed-phase-HPLC (Beckman, System Gold mit RP-18 „Ultrasphere“-Säule) sowie MALDI-MS (engl.: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry*) getestet.

Ursprungprotein	Sequenz des Epitops	MHC-Allel-Restriktion	Referenz
Vesikuläres Stomatitis Virus Nukleoprotein 52-59	RGYVYQGL	H2-K <sup>b</sup>	(van Bleek and Nathenson, 1990)
Ovalbumin 257-264	SIINFEKL	H2-K <sup>b</sup>	(Falk et al., 1991); (Röttschke et al., 1991)
<i>E.coli</i> β-Galaktosidase 876-884	TPHPARIGL	H2-L <sup>d</sup>	(Gavin et al., 1993)
Zufallssynthese mit Glykosylierungsmotiv	T(Tpa)DNKTRAY	-	(Lammert et al., 1997a)

**Tabelle 2.1.** Zusammenstellung aller verwendeten Peptide.

#### 2.1.3. Plasmide

Die aufgeführten Plasmide wurden zur DNA-Immunisierung und der Herstellung der Zelllinie MC-v5 verwendet.

Bezeichnung	Beschreibung	Ursprungsvektor	Referenz
V5-neo-OVA	Kodiert für: <b>RGYVYQGLKSGNV</b> und Ovalbumin	pIRES-OVA	Hergestellt durch B. Pömmerl
5v5-SII	Kodiert für: <b>SLSDLRGYVYQGLKSGNV</b> und SIINFEKL	pIRES-5v5-OVA (Stoltze, 1998)	Hergestellt durch B. Pömmerl

**Tabelle 2.2.** Zusammenstellung aller verwendeten Plasmide.

## 2.1.4. Antikörper

Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.3. aufgeführt.

Bezeichnung	Spezies	Isotyp	Spezifität	Referenz
FITC-K9-18	Maus	IgG2a	H2-K <sup>d</sup>	(Arnold et al., 1985)
PE-anti mouse-Thy-1.2 0100513	Maus	IgG2a	Thy-1.2	Pharmingen
AF6-88.5-FITC	Maus	IgG2a	H2-K <sup>b</sup>	Pharmingen
FITC-anti mouse-CD4 553729	Ratte	IgG2b	CD4	Pharmingen
FITC-anti mouse-CD8 553031	Ratte	IgG2a	CD8	Pharmingen

**Tabelle 2.3.** Zusammenstellung aller verwendeten Antikörper.

## 2.1.5. Zelllinien

Name	Charakterisierung	Haupt-MHC-Allel	Referenz
EL-4	T-Zell-Lymphom, welche in C57BL/6-Mäusen durch Dimethyl-Benzanthrazen induziert wurde	H2 <sup>b</sup>	(Shevach et al., 1972)
EG-7	Mit Ovalbumin-cDNA transfizierte EL-4-Zellen	H2 <sup>b</sup>	(Moore et al., 1988)
RMA-S	TAP2-Mutante, Mutterlinie ist RMA, eine Maus Thymomzelllinie	H2 <sup>b</sup>	(Ljunggren and Karre, 1985)
LS-O	Aus DNA-Immunisierung von C57BL/6-Mäusen erhaltene anti OVA CTL-Linie, spezifisch für SIINFEKL + H2-K <sup>b</sup>		(Stoltze, 1998)
LS-Vn	Aus DNA-Immunisierung von C57BL/6 erhaltene anti VSV-Nukleoprotein CTL-Linie spezifisch für RGYVYQGL+ H2-K <sup>b</sup>		(Stoltze, 1998)
MC-57	Fibroblastenlinie aus C57BL/6	H2 <sup>b</sup>	(Dunn and Potter, 1957)
MC-v	Mit dem Minigenkonstrukt v-O transfizierte MC-57-Zellen	H2 <sup>b</sup>	(Stoltze, 1998)
MC-5v	Mit dem Minigenkonstrukt 5v-O transfizierte MC-57-Zellen	H2 <sup>b</sup>	(Stoltze, 1998)
MC-5v5	Mit dem Minigenkonstrukt 5v5-O transfizierte MC-57-Zellen	H2 <sup>b</sup>	(Stoltze, 1998)
MC-v5	Mit dem Minigenkonstrukt 5v5-neo-OVA transfizierte MC-57-Zellen	H2 <sup>b</sup>	Während dieser Arbeit von mir hergestellt
COX	EBV transformierte humane B-Zelllinie	Siehe ECACC	(ECACC, IHW No. 9022)

**Tabelle 2.4.** Zusammenstellung aller verwendeten Zelllinien.

In Tabelle 2.4. sind alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien aufgeführt und ihre Herkunft erläutert.

#### 2.1.5. Mäuse

Es wurden männliche und weibliche Mäuse im Alter von sechs bis zehn Wochen verwendet. In Tabelle 2.5. sind alle verwendeten Mausstämme aufgeführt.

Maus	H2-Haplotyp	Referenz
BALB/c	H2 <sup>d</sup>	Charles River Viga
C57BL/6	H2 <sup>b</sup>	Charles River Viga
129-Blmh <sup>tm1Geh</sup> (hier als BH 129 svev bezeichnet)	H2 <sup>b</sup>	(Schwartz et al., 1999)
Goku BALB/cA	H2 <sup>d</sup>	(Osada et al., 1999)

**Tabelle. 2.5.** Zusammenstellung aller verwendeten Mäuse.

#### 2.1.6. Zellkulturmedien

##### Komplettes RPMI:

Zu 0.5 l RPMI wurden folgende Zusätze gegeben:

- 50 ml hitzeinaktiviertes (1 h 56°C) FCS
- 2 mM Glutamin
- $5 \times 10^{-5}$  M 2-Mercaptoethanol
- 2.5 ml Penicillin/Streptomycin
- 10 mM HEPES-Puffer
- 24 mM NaHCO<sub>3</sub>

##### CTL-Medium:

Zu 0.5 l  $\alpha$ -Medium, (Minimum essential Medium Eagle, Life Technologies) wurden folgende Zusätze gegeben:

- 50 ml hitzeinaktiviertes (1 h 56°C) FCS
- 25 ml ConA-Überstand
- 25 ml 0.5 M Methyl- $\alpha$ -D-Manno-Pyranoside in PBS
- 2 mM Glutamin
- $5 \times 10^{-5}$  M 2-Mercaptoethanol
- 5 ml Penicillin/Streptomycin

---

Komplettes  $\alpha$ -Medium:

Zu 0.5 l  $\alpha$ -Medium, wurden folgende Zusätze gegeben:

- 50 ml hitzeinaktiviertes (1 h 56°C) FCS
- 2 mM Glutamin
- $5 \times 10^{-5}$  M 2-Mercaptoethanol
- 2.5 ml Penicillin/Streptomycin

#### 2.1.7. Verwendete Proteaseinhibitoren

Die verwendeten Proteaseinhibitoren sind mit ihrer Strukturformel in Abbildung 4.1. dargestellt. Butabindide wurde zur Verfügung gestellt von J.C. Schwartz, Paris, Frankreich, Lactacystin wurde von E. J. Corey, Harvard University, USA und LLnL, AAF-CMK, Bestatin, Puromycin sowie E64 von Sigma bezogen. Zu generellen Mechanismen von Proteaseninhibitoren siehe Otto 1997 (Otto and Schirmeister, 1997).

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.2. Spektrometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen

DNA-Konzentrationen können spektrometrisch bei 260 nm gemessen werden, da eine Lösung von 50 µg/ml eine Absorption von 1 besitzt (in einer 1 cm tiefen Quarzküvette). Das Verhältnis der Absorption 260nm/280nm ist bei einer reinen DNA-Lösung dabei 1,8, so dass bei Abweichungen von diesem Wert eine Verunreinigung durch Proteine abschätzbar ist.

Die aufgereinigten DNA-Lösungen wurden jeweils 1:100 verdünnt und durch ein Ultraspec 3000 (Pharmacia, Biotech) die Absorption bestimmt.

#### 2.2.1.3. Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen

DNA kann in Agarosegelen nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch die Zugabe von Ethydiumbromid kann die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht werden, da Ethydiumbromid ein Interkalator ist, der sich zwischen die DNA-Basen einlagert und selbst unter UV-Bestrahlung Licht emittiert.

Es wurden 1 % Agarosegele verwendet (3 µg Agarose pro 30 ml TAE, 1,5 µl Ethydiumbromid), als Laufpuffer 400 ml TAE, 12,5 µl Ethydiumbromid und die Gele wurden bei 90 V 1 h 30 min laufen gelassen. Zur Größenbestimmung der DNA wurde jeweils eine 1 Kilobasen DNA-Leiter (Life Technologies) als Marker verwendet.

#### 2.2.1.4. Fällung von DNA mit Ethanol

DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen an 3 M Natriumacetat pH 5,3 und 2,5 Volumenteile 100 % Ethanol bei 15000 g, 15 min, 4°C, gefällt und mit 70 % Ethanol gewaschen.

### 2.2.2. Zellbiologische Methoden

#### 2.2.2.1. Kultivierung von Säugerzellen

Alle nicht-CTL-Zelllinien wurden in komplettem RPMI in Kulturflaschen oder -platten (Costar) im Inkubator (Labotect) bei 37°C, 7 % CO<sub>2</sub> und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre in Kultur gehalten. Zum Erhalten großer Zellmengen, wurden Zellen in 2 l Rollerflaschen kultiviert, die dabei zu  $\frac{3}{4}$  mit Medium gefüllt und im 37°C Wärmerraum inkubiert wurden. Adhärenz wachsende Zellen wurden vor dem Umsetzen zum Ablösen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (Life Technologies) behandelt.

#### 2.2.2.2. Zentrifugation von Zellen

Alle Zellen wurden standardmäßig bei 450 g, 3 min und Raumtemperatur zentrifugiert. Zum Ernten der Zellen aus Rollerflaschen wurden die Zellen bei 1000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert.

#### 2.2.2.3. Bestimmung der Lebendzellzahl

Ein Aliquot aus einer homogenen Zellsuspension wurde mit einem definiertem Volumen 0.05 % Trypanblaulösung gemischt. Ein Teil dieser Lösung wurde in eine Neubauer-Zählkammer überführt und die lebenden (d.h. nicht gefärbten) Zellen ausgezählt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors sowie der Zählkammerkonstanten ( $\times 10^4$ ) ließ sich die Zellkonzentration bestimmen.

#### 2.2.2.4. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Ein Pellet von mindesten  $1 \times 10^6$  Zellen wurde in 1 ml 5 % DMSO / FCS aufgenommen und in ein verschraubbares Polypropylenröhrchen überführt. Dieses wurde in einem mit 2-Propanol gefüllten Plastikbehälter (Nalgene) für einige Tage bei - 80°C eingefroren, bis es für längere Lagerung in einen N<sub>2</sub>-Tank überführt wurde.

Das Auftauen der Zellen erfolgte möglichst schnell bei 37°C wobei das DMSO durch Waschen mit komplettem RPMI entfernt wurde. Danach wurden die Zellen, wie unter 2.2.2.1 beschrieben, in Kultur genommen.

#### 2.2.2.5. Inaktivieren von Zellen

Um Zellen zu inaktivieren, d.h. ihre DNA durch Strahlung zu zerstören und somit ihr Wachstum zu unterbinden, wurden sie einer <sup>137</sup>Caesium-Quelle (Gammacell 1000 Elite, Nordion International Inc.) ausgesetzt.

Die angewendete Bestrahlungszeit für Milzzellen zur CTL-Restimulation betrug 3 min 41 sec, dies entspricht 32.3 Gy. Tumorzellen wurden für 22 min bestrahlt, dies entspricht 200 Gy.

#### 2.2.2.6. Transfizierung von Zellen durch Elektroporation

DNA kann in Zellen transfiziert werden, in dem man ihre Membran kurzzeitig durch Anlegen einer hohen Spannung für DNA passierbar macht. Der genaue Mechanismus dieses Vorganges ist nicht bekannt und die benötigte Spannung und Stromstärke variiert sehr stark zwischen verschiedenen Zelllinien. Ähnlich wie bei transformierten Bakterien werden positiv transfizierte Zellen durch Selektion mit einem Antibiotikum erhalten, da der zu transfizierende Vektor ein Resistenzgen gegen das Selektionsantibiotikum enthält. In diesem Fall wurde das Neomycinresistenzgen (Colbere-Garapin et al., 1981) verwendet.



Um MC-57 Zellen mit den Minigenvektor v5-OVA-neo zu transfizieren, wurde je 10 µg linearisierter Vektor eingesetzt. Die DNA wurde, wie unter 2.2.1.4. beschrieben, gefällt und gewaschen, steril in 20 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen und in die Transfektionsküvette (Bio-Rad) pipettiert. 5 x 10<sup>6</sup> Zellen in 0.6 ml PBS wurden zur DNA in der Transfektionsküvette hinzugegeben und auf Eis 10 min vorinkubiert, dann bei 260 V, 975 µF elektroporiert (Gene Pulser II, Bio-Rad) und erneut 10 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden dann in einer 500 ml Flasche mit 25 ml komplettem RPMI für 24-48 h bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von G418 in einer Endkonzentration von 1 mg/ml wurde auf positiv transfizierte Zellen selektioniert.

### 2.2.3. Immunologische Methoden

#### 2.2.3.1. Kultivierung von cytotoxischen T-Lymphocyten

Um cytotoxischen T-Lymphocyten in Kultur zu halten, müssen diese regelmäßig restimuliert werden. Aus diesem Grunde wurden einmal wöchentlich alle aus Mäusen stammenden CTL-Linien restimuliert. Alle Restimulationen erfolgten in Kulturplatten mittlerer Größe („24-well-Platten“).

Eine Maus mit entsprechendem MHC-Genotyp wurde durch Genickbruch geopfert und die Milz entnommen. Die ganze Milz wurde in PBS aufgenommen und wie unter 2.2.2.5. beschrieben, inaktiviert. Es wurde dann eine Zellsuspension erstellt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde 2 min in einer hypotonen Lösung (0.16 M NaCl, 0.17 M Tris, pH 7.2) aufgenommen, um die Erythrozyten zu lysieren, dann mit 8 ml CTL-Medium versetzt und erneut abzentrifugiert. Die Milzzellen wurden in CTL-Medium mit der Konzentration von 5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml aufgenommen. Dazu wurden 1 ml Milzzellen mit je etwa 5 x 10<sup>5</sup> CTL gegeben, woraufhin mit 80 - 100 ng/ml Peptid oder 5 x 10<sup>5</sup> inaktivierten und mit 100ng/ml für 1h bei 37°C mit Peptid beladenen Tumorzellen, stimuliert wurde.

#### 2.2.3.2. <sup>51</sup>Cr-Freisetzungstest

Im <sup>51</sup>Cr-Freisetzungstest werden Zellen mit Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> inkubiert. Das CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup> Anion gelangt durch spezifische Ionenkanäle in die Zelle und wird dort durch Glutathion zu Cr<sup>III</sup> reduziert. Cr<sup>III</sup> gelangt in den Zellkern und bindet dort an die DNA. Wird solch eine Zielzelle nun von CTLs erkannt, wird sie von diesen lysiert und ihre intrazellulären Substanzen freigesetzt. Das Cr kann so im Überstand der Lösung nachgewiesen werden. Durch Anwendung folgender Formel:

$$\% \text{ spez. Lyse} = \frac{\text{cpm Probe} - \text{Spontanfreisetzung}}{\text{cpm maximale Freisetzung} - \text{Spontanfreisetzung}} \times 100$$

kann der Anteil der lysierten Zellen bestimmt werden.

Die gewünschte Menge Zielzellen wurden abzentrifugiert, auf das Pellet 10 µl Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> (5 µCi/ml, Amersham) gegeben und 45 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit 2 ml komplettem RPMI gewaschen (abzentrifugiert mit 450 g, 2 min). Der Test selbst wurde in Mikrotiterplatten (runder Boden, Costar) ausgeführt. Dabei wurden je 100 µl komplettes RPMI vorpipettiert, die Effektorzellen in 150 µl komplettem RPMI vorgelegt und daraufhin jeweils 50 µl über die Testvertiefungen transferiert. Zu den Effektorzellen wurden dann je 100 µl komplettes RPMI mit je 1 x 10<sup>4</sup> <sup>51</sup>Cr markierten Zielzellen pipettiert, so dass das Endvolumen pro Vertiefung 200 µl betrug. Der Test wurde bei 37°C für 4 h inkubiert und danach aus jeder Vertiefung 50 µl des Überstandes auf eine Feststoffscintillatorplatte (Packard) übertragen. Diese wurde über Nacht oder bei 60°C für 45 min getrocknet und dann im β-Zähler (1450 Microbeta Plus-Counter, Wallac) ausgezählt.

Zur Bestimmung der maximalen Freisetzung wurden 100 µl der markierten Zielzellen mit 100 µl 0.2 % Triton X 100 (Sigma) versetzt. Für die spontane Freisetzung wurden zu den Zielzellen nur komplettes RPMI gegeben. Beide Werte wurden aus Doppelbestimmungen ermittelt.

Als Positivkontrolle für die verwendeten CTL wurde während der Cr-Aufnahme jeweils 10 µl des spezifischen Peptides (1 µg/ml) zu den entsprechenden Zielzellen gegeben.

#### 2.2.3.3. Saures Waschen von Zellen

Durch das saure Waschen von Zellen ist es möglich, die MHC-Klasse-I-Moleküle von Zelloberflächen zu entfernen, da sie in saurer Lösung ihr gebundenes Peptid verlieren und infolgedessen nicht mehr stabil sind (Storkus et al., 1993).

Die Zellen wurden abzentrifugiert und auf das vom Überstand befreite Pellet 200 µl einer frisch angesetzten „sauren Lösung“ (Verhältnis 1:1, Zitronensäure 0.263 M und NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.132 M) pipettiert und 1 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 ml NaHPO<sub>4</sub> 0.15 M, pH 7.5 gestoppt, die Zellen abzentrifugiert und zweimal mit 2 ml PBS gewaschen.

#### 2.2.3.4. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (oder auch FACS (engl.: *Fluorescence-Activated-Cell-Sorter*)-Analyse) ist eine sehr effiziente Methode zur Analyse der Oberflächenmoleküle einer Zelle. Die Zelle wird dabei mit einem Antikörper inkubiert, der spezifisch gegen ein bestimmtes Oberflächenmolekül gerichtet ist. Mit einem Zweitantikörper, der eine fluoreszierende Komponente gegen den Erstantikörper enthält, ist es möglich Aussagen über die Quantität der Moleküle auf der Oberfläche zu machen. Die hier verwendeten Erstantikörper sind alle schon mit FITC (Fluorescein isothiocyanate) oder PE (Phycoerythrin) als Fluoreszenzkomponente markiert, welches Licht bei 530 nm („grün“), bzw. 575 nm („rot“) emittiert. Dadurch wird nur ein Erstantikörper benötigt und ein Arbeitsschritt eingespart.

Als Negativkontrolle dient jeweils ein Antikörper gleichen Isotyps mit einer Spezifität, die nicht auf den Zellen vertreten ist. In den hier unternommenen Experimenten ist dies

der FITC-K9-18 Antikörper, der gegen H2-K<sup>d</sup> gerichtet ist, welches nicht auf den untersuchten Zellen vorkommt.

$5 \times 10^5$  Zellen wurden mit 0.075 µg Maus-Erstantikörper versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde mit FACS-Puffer (2 % FCS/PBS) gewaschen und das Pellet in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. (Bei Verwendung eines Zweitantikörpers wurden 140 µg Zweitantikörper zugegeben, 15 min bei RT inkubiert und daraufhin erneut mit FACS-Puffer gewaschen.) Das Pellet wurde in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und zur Analyse auf dem FACS-Gerät (FACSsort, Becton Dickinson) verwendet. Die Merkmale der Größe und Granularität der Zellen wurden dabei verwendet, um nur lebende Zellen in der Analyse zu berücksichtigen.

#### 2.2.3.5. Infektion von Zellen mit Vesiculärem Stomatitis Virus

Zur Infektion von Zellen mit VSV wurde dieser in einem Verhältnis 10:1 von PfU (engl.: *plaque forming units*) zu Zielzellen eingesetzt. Allgemein wurden Zellen mit  $1 \times 10^7$  PfU VSV in 200 µl RPMI ohne FCS für 1.5 h bei 37°C infiziert und der Virus danach durch zweimaliges Waschen mit komplettem RPMI entfernt.

In Inhibitionsexperimenten wurden die Zellen jeweils für 2 h mit dem Inhibitor vorinkubiert und auch während der Infektion die Inhibitorkonzentration beibehalten und nach der Infektion die Zellen nochmals für 2h mit Inhibitor bei 37°C inkubiert.

### 2.2.4. Biochemische Methoden

#### 2.2.4.1. Präparative Methoden

Alle präparativen Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 4°C durchgeführt.

##### 2.2.4.1.1. Aufschluss von Zellen

Bis zu 20 ml Zellpellet (zentrifugiert bei 1000g in einem 50 ml Falconröhrchen) wurden mit dem Puffer der FreeFlow Elektrophorese gewaschen. Die Zellen wurden mit 10 – 20 Stößen in einem 5 ml Potter-Elvehjem-Homogenisator mit einem 60 µm Spalt bei 1000 rpm aufgeschlossen.

Für die Peptidvorläufersuche wurden die Zellen in 10 % Glycerin, 1.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 200 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7.6 RT mit 10 mM LLnL, 100 mM PMSF, 1 M Jodacetamid, 1 µg/ml Aprotonin gewaschen.

##### 2.2.4.1.2. Ultrazentrifugation

Aufgeschlossene Zellen wurden mit 20 000 g für 3 min zentrifugiert (Beckman TL 100 Ultrazentrifuge), um unzerstörte Zellen und große Membranen abzutrennen. Der

Überstand wurde ein weiteres Mal bei 400 000 g für 12 min zentrifugiert, um alle verbleibenden Membranfragmente (Lysosomen, ER, Golgi) abzutrennen und reines Cytosol zu erhalten. Aufschluss und Trennung der Kompartimente wurden auf Reinheit getestet (Schröter, 1999).

#### 2.2.4.1.3. TFA Fällung von Proteinen

Um Peptide von Proteinen zu trennen, kann man eine Lösung mit dem gleichen Volumen 10 % TFA mischen. Diese wird mindestens 15 min auf Eis inkubiert, um die Proteine ausfallen zu lassen. Danach wird 10 min bei 15000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Es wird davon ausgegangen, dass sich alle Peptide im Überstand und nicht im Proteinpellet befinden.

#### 2.2.4.1.4. FreeFlow Elektrophorese

Aufgereinigtes Cytosol wurde auf eine FreeFlow Elektrophorese aufgetragen (Dr. Weber GmbH, München). Als Puffer wurde 250 mM Sucrose, 10 mM Tri(hydroxymethyl)aminomethane / Essigsäure pH 6.9 Raumtemperatur verwendet und die Trennung mit etwa 1.6 ml/h Pufferfluss, 1 ml/h Probenauftragung bei 800 V, 10°C durchgeführt. Erhaltene Fraktionen wurden auf proteolytische Aktivität im Fluoreszenzassay getestet (siehe 3.2.4.2.5.).

#### 2.2.4.1.5. Chromatographische Methoden

Es wurde eine FPLC-Anlage der Firma Pharmacia Biotech verwendet (Pumpen Typ P500, Kontrolleinheit LCC-501, UV Detektor VWM2141, Fraktionsensammler FRAC-200). Für die HPLC wurde das SMART-System von Pharmacia Biotech benutzt.

##### 2.2.4.1.5.1. Ionenaustauscher-FPLC mit DEAE-Toyopearl

Die Säule (XK16/40, Pharmacia Biotech) wurde mit etwa 200 ml DEAE-Toyopearl (TosoHass) gefüllt und mit Puffer A (10 % Glycerin, 25 mM KCl, 1.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 10 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7.6 Raumtemperatur) equilibriert.

Relevante Fraktionen aus der FreeFlow Elektrophorese wurden auf eine DEAE-Toyopearl Säule geladen. Die Probe wurde mit folgendem Stufengradienten getrennt: Probeninjektion je nach Größe mit 1 ml/min, dann 32.5 min 2 ml/min 0 % Puffer B, 33 min 25 % B, 106.5 min 80 % B, 107 min 100 % B. Puffer B ist dabei Puffer A mit 250 mM KCl. Erhaltene Fraktionen wurden auf proteolytische Aktivität im Fluoreszenzassay getestet (siehe 2.2.4.2.5.).

##### 2.2.4.1.5.2. Ionenaustauscher-FPLC mit MonoQ

Relevante Fraktionen aus der Ionenaustauscher-FPLC mit DEAE-Toyopearl wurden auf eine MonoQ-Säule (Pharmacia Biotech, HR5/5) mit der Flussrate 0.5 ml/min aufgetragen. Die Trennung erfolgte mit den gleichen Puffern wie in 2.2.4.1.5.1., einer

---

Flussrate von 1 ml/min und einem linearen Gradienten über 20 min von 25 mM – 250 mM KCl, Fraktionsgröße 0.5 ml. Erhaltene Fraktionen wurden auf proteolytische Aktivität im Fluoreszenzassay getestet (siehe 2.2.4.2.5.).

#### 2.2.4.1.5.3. Gelfiltration mit Superdex

Relevante Fraktionen aus der Ionenaustauscher-FPLC mit MonoQ wurden in der Speedvac auf ein Volumen von etwa 250 µl eingengt und auf eine Superdex 200 Säule (Pharmacia Biotech) mit der Flussrate 0.5 ml/min aufgetragen. Als Puffer wurde der gleiche Puffer A verwendet (siehe 2.2.4.1.5.1.) mit 200 mM NaCl und kein KCl. Erhaltene Fraktionen wurden auf proteolytische Aktivität im Fluoreszenzassay getestet (siehe 2.2.4.2.5.).

#### 2.2.4.1.5.4. Gelfiltration mit HPLC

Je 100 µl des mit radioaktiv markiertem Peptid versetzten Cytosols wurde auf eine TSK-Gel HPLC-Gelfiltrations-Säule geladen (0.75 x 30 cm, TosoHaas) und mit 0.5 ml/min in Puffer A (siehe 2.2.4.1.5.3.) auf einer HPLC (Liquidchromatograph Series II 1090, Hewlett Packard) getrennt. Dabei wurden 0.25 ml Fraktionen gesammelt und diese in einem  $\gamma$ -Zähler (Multi-Crystal counter LB2104, Berthold) gemessen. Relevante Fraktionen aus mehreren Läufen eines Experiments wurden vereinigt und weiter verwendet.

#### 2.2.4.1.5.5. Reversed Phase-HPLC

Zur Auftrennung und Entsalzung der Peptidverdaus durch Proteasen wurden je 66 µl des Verdaus auf eine  $\mu$ RPC C2/C18 SC 2.1/10-Säule (2.1x100 mm; Pharmacia Biotech) geladen. Die Trennung erfolgte über Eluent A: 0.1 % TFA, Eluent B: 80% Acetonitrile mit 0.081 % TFA. Stufengradient: 0-30 % B in 0-23.5 min, 30-36 % B in 23.5-40.0 min. Flussrate: 150 µl/min, der Gradient wurde dabei 5 min nach der Probeninjektion gestartet. Die eluierten Peptide wurden dann auf einem MALDI-TOF-MS (Hewlett Packard) analysiert.

### 2.2.4.2. Analytische Methoden

#### 2.2.4.2.1. Proteinbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde nach einer abgewandelten Methode der Bradford Bestimmung durchgeführt. Verwendet wurde dabei den Herstellerangaben entsprechend Roti-Nanoquant (Roth).

## 2.2.4.2.2. Gelelektrophorese

## 2.2.4.2.2.1. SDS-PAGE

Alle SDS Gele wurden nach Westermeier, 2000 gegossen. Dabei wurden Sammel- und Trenngel gleichzeitig gegossen, da dem Trenngel 10% Glycerin zugesetzt wurde. Das gleichzeitige Gießen beeinflusst dabei die Trennung nicht. Exemplarisch ist Tabelle 2.6. für ein 8 % Gel mit der Dimension 8.5 x 8.5 x 0.1 cm aufgeführt.

	Trenngel (ml)	Sammelgel (ml)
H <sub>2</sub> O	3	3
Glycerin	2.5	-
Acrylamid; Bis 40%T, 3% C	2	0.6
4x Trenn-/Sammelgelpuffer	2.5	1.3
TEMED	0.004	0.005
APS 40%	0.008	0.012

**Tabelle 2.6.** Ansatz für 8% SDS-Gele 8.5 x 8.5 x 0.1 cm.

Dabei wurden die Lösungen aus Tabelle 2.7. verwendet:

4x Trenngelpuffer pH 8.8	1.5 M Tris-Base, 0.01 M SDS mit HCl auf pH 6.8 titriert
4 x Sammelgelpuffer pH 6.8	0.5 M Tris-Base, 0.01 M SDS mit HCl auf pH 6.8 titriert
10x Laufpuffer	0.25 M Tris-Base, 0.035 M SDS, 1.9 M Glycin
5x Probenpuffer	0.17 M SDS, 0.5 M EDTA, 0.7 M Bromphenol Blau, 12.5 % Trenngelpuffer

**Tabelle 2.7.** Verwendete Lösungen für SDS-Gele.

Die Gele wurden mit 120 V gestartet und nach dem Eintreten der Probe ins Sammelgel mit 150 V für 3 h laufen gelassen.

## 2.2.4.2.2.2. BN-PAGE

Die Blaue-Nativ-Gelelektrophorese (BN-PAGE) wurde nach Schägger et al., 1994 durchgeführt. Diese Art der Elektrophorese erweitert das Spektrum der Proteine, bei denen durch Nativgelelektrophorese ihre Molekülmassen bestimmt werden kann. Es können Membranproteine, Proteine mit einem pI unter 5.4 sowie Proteine mit einem pI unter 8.6, die Coomassie binden, verwendet werden (Schägger et al., 1994). Der Coomassiefarbstoff bindet dabei an die nativen Proteine ohne ihre Funktion zu beeinflussen, ähnlich wie SDS an denaturierte Proteine und verbessert somit die ladungsbedingte Trennung der Proteine im nativen Zustand.

Für die Gele wurden 2-20 % Gradientengele verwendet. Für ein Gel der Dimension 8.5 x 8.5 x 0.1 cm wurden dabei je 3.6 ml einer 20 %igen, bzw. 2 %igen Acrylamidlösung in einen Gradientenmixer (Hoefer Pharmacia Biotch Inc) gegeben (zum Ansetzen der Lösungen siehe Tabelle 2.8.). Nach Zugabe des Ammoniumpersulfats (APS), erst zu der niedriger konzentrierten Lösung, dann zur höher konzentrierten, wurde das Gel gegossen.

	20 %	2 %
Glycerin	2 ml	1 ml
Acrylamid; Bis 40 % T / 3% C	4 ml	0.4 ml
4x Gelpuffer	2 ml	2 ml
H <sub>2</sub> O	-	4.6 ml
TEMED	4 µl	4 µl
APS 40 %	6 µl	8 µl

**Tabelle 2.8.** Ansätze für Gradientengele 8.5 x 8.5 x 0.1 cm.

Als 4x Gelpuffer wurde dabei 2 M Aminocaprinsäure, 200 mM Bistris, titriert mit HCl zu pH 7.0 (4°C), verwendet. Der Katodenlaufpuffer bestand aus 50 mM Tricine, 20 mM Bistris, 0,02 % Brilliant-Blue G (Sigma), pH 7.0 (4°C) und wurde jeweils nach einem Viertel des Laufes durch den gleichen Puffer ohne Serva G ersetzt. Der Anoden Puffer bestand aus 50 mM Bistris mit HCl auf pH 7.0 (4°C) titriert.

Die Gele wurden bei 100 V, maximal 8 mA, 4°C für 15 min gefahren, bis die Probe in das Gel gelaufen war. Danach bei 250 V, maximal 8 mA für 1.5 h bei 4°C.

#### 2.2.4.2.2.3. Coomassie-Färbung

Acrylamidgele wurden 5–10 min in 45 % Methanol / 10 % Essigsäure / 45 % H<sub>2</sub>O / 0.2 % Coomassie Brilliant-Blue R-250 (Sigma) gefärbt und für 2 bis 10 h in 50 % Methanol / 10 % Essigsäure / 40 % H<sub>2</sub>O entfärbt. Die Nachweisgrenze liegt dabei etwa bei 400 ng (Rehm, 2000).

Bei Coomassie-Färbungen für tryptische In-Gel-Verdaus zur anschließenden MS-Analyse wurde 5 min in 45 % Methanol / 1 % Essigsäure / 50 % H<sub>2</sub>O / 0.2 % Coomassie Brilliant-Blue R-250 (Sigma) gefärbt und maximal 20 min in 50 % Methanol / 1 % Essigsäure / 45 % H<sub>2</sub>O entfärbt. Dadurch soll die Fixierung des zu untersuchenden Proteins im Gel minimiert werden, um beim eluieren der Peptide aus dem Gel eine optimale Ausbeute zu erhalten.

#### 2.2.4.2.2.4. Zink-Färbung

Zinkfärbungen erfolgten nach Fernandez-Patron et al., 1995 (Fernandez-Patron et al., 1995). Dabei wird nur das Gel mit einem Imidazol-Zn-Komplex gefärbt. Die Proteine sind dann gegen einen dunklen Hintergrund als farblose Banden zu erkennen. Die Sensitivität der Färbung liegt dabei zwischen der Coomassie und der Silberfärbung. Diese Art der Färbung ist besonders für die Verdauanalyse von Proteinen aus Gelen zu empfehlen, da das Protein nicht verändert wird und somit Verdaufragmente einfacher aus dem Gel zu eluieren sind. Die Färbung erfolgte mit einem Zn-Färbungs-Kit (Biorad).

#### 2.2.4.2.2.5. Silber-Färbung

Die Silberfärbung ist die sensitivste Färbemethode von Proteinen in Polyacrylamidgelen. Dabei liegt die Nachweisgrenze bei etwa 30 ng (Rehm, 2000).

Lösung 1	50 % Methanol / 10 % Essigsäure / 40 % H <sub>2</sub> O
Lösung 2	5 % Methanol / 7 % Essigsäure / 88 % H <sub>2</sub> O
Lösung 3	0.03 mM DTT / H <sub>2</sub> O
Lösung 4	0.1 % Silbernitrat / H <sub>2</sub> O
Lösung 5	3 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / H <sub>2</sub> O
Lösung 6	2.3 M Zitronensäure

**Tabelle 2.9.** Verwendete Lösungen zur Silberfärbung.

Das Gel wurde 10 min in Lösung 1 inkubiert. Daraufhin je 3 min in der Mikrowelle in Lösung 2, 3 und 4. Dann in H<sub>2</sub>O gewaschen und mit Lösung 5 entwickelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 % des Entwicklungsvolumens mit Lösung 6 gestoppt.

#### 2.2.4.2.3. Tryptischer In-Gel-Verdau

Lösungen:	50 % Acetonitril / 50 % H <sub>2</sub> O
	45 mM DTT
	100 mM Jodacetamid
	0.1 M NaHCO <sub>3</sub>
	0.05 µg/µl Trypsin (Sigma) in 0.1 M NaHCO <sub>3</sub>
	50 % TFA / 50 % H <sub>2</sub> O
	50 % TFA / 50 % Acetonitril
Lösung A	0.1 % TFA / 99.9 % H <sub>2</sub> O
Lösung B	40 % Methanol / 1 % Ameisensäure / 60 % H <sub>2</sub> O

**Tabelle 2.10.** Verwendete Lösungen für den tryptischen In-Gel-Verdau.



Alle verwendeten Eppendorfgläser wurden mit einer 100 mM Glycinlösung für 1 h bei 37°C vorbehandelt, um eine unspezifische Peptidbindung an Gefäßwänden zu vermeiden. Für diese Technik wurden nur Chemikalien höchster Reinheit verwendet (inklusive LiChrosolve-Wasser (Merck)).

Die Proteinbanden wurden ausgeschnitten und in sehr kleine Stücke zerkleinert. In einem Schüttler wurden die Fragmente je 10 min in 2 x 1 ml H<sub>2</sub>O, 1 x 1 ml 50 % Acetonitril und noch mal in 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und entfärbt. In der Speedvac wurden die Gelstücke eingetrocknet. Das Pellet wurde in 100 µl NaHCO<sub>3</sub> mit sofortiger Zugabe von 5 µl DTT 1 h bei 55°C inkubiert. Dann wurden 5 µl Jodacetamid zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Gelstücke mit 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und diese in der Speedvac eingetrocknet. 20 µl der Trypsinlösung wurden zum Pellet gegeben und bei 37°C für 15 min inkubiert. Es folgen die Zugabe von 50 µl NaHCO<sub>3</sub> und nach weiteren 15 min nochmals 100 µl. Danach folgte der Verdau von 12 h (bzw. über Nacht).

Der Überstand aus dem Verdau wurde separat auf enthaltene Peptide untersucht. Zur Extraktion der Peptide aus den Gelstücken wurden diese 2x in 100 µl der TFA / H<sub>2</sub>O Lösung 20 min bei RT geschüttelt und die jeweiligen Überstände vereinigt. Dann zur weiteren Extraktion noch 2x in der TFA/Acetonitril Lösung 20 min, RT und die Überstände mit den TFA / H<sub>2</sub>O Überständen vereinigt.

Das eluierte Probenmaterial und der Verdauüberstand wurde in der Speedvac eingetrocknet und das Material in 20 µl Lösung A aufgenommen. Zur Entsalzung der Probe wurden Ziptips (Millipore) verwendet, die mit C18 Material gefüllt sind, um Peptide zu binden. Diese wurden mit 20 µl Lösung B zweimal gewaschen, mit 20 µl Lösung A dreimal vorbehandelt und dann die Probe zehnmal aufgesogen. Diese wurde dann dreimal mit je 20 µl Lösung A gewaschen und mit 15 µl Lösung B eluiert. Die so vorbereitete Probe kann direkt für die Massenspektrometrie verwendet werden.

#### 2.2.4.2.4. Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation

Bei der MALDI Massenspektrometrie (engl.: *Matrix Assisted Desorption Ionization*) werden 0.5 µl einer Trägersubstanz (20 mg 2,5-Dihydroxy-Acetophenon + 5 mg Ammoniumcitrat in 1 ml Isopropanol [4:1]) auf ein Gold-Target aufgetragen und dieses unter Vakuum getrocknet. Auf dieses Target werden dann 1 µl der, wie unter 2.2.4.2.7 angegebenen, entsalzten Probe aufgetragen und ebenfalls unter Vakuum getrocknet, so dass Probe und Trägersubstanz zusammen kristallisieren. Durch einen Schuss mit einem Laser werden dann Ionen aus dem Target herausgerissen und in einem elektrischen Feld beschleunigt. Dies geschieht in einem LD-TOF-System (engl.: *laser desorption - time of flight*) (Hawlett-Packard G2025A) bei 10<sup>-6</sup> Torr und einer Laserenergie von 1.5 µJ. Die Flugzeit ist dabei proportional zur Quadratwurzel des m/z Verhältnisses und die Ionen werden normalerweise nur einfach geladen, womit man die [M+H]<sup>+</sup>-Ionen misst.

#### 2.2.4.2.5. Fluoreszenzassay zur Bestimmung proteolytischer Aktivität

Alle Fluoreszenzassays wurden bei 37°C für 0.5 bis 2 h in dem entsprechenden Säulenpuffer oder Puffer A (siehe 2.2.4.1.5.1.) inkubiert. Die Versuchsbedingungen nach den einzelnen Reinigungsschritten ergaben sich wie folgt, wobei die verwendeten

Inhibitoren immer 20 min bei 37°C vorinkubiert wurden: FreeFlow: 200 µl Fraktion, 50 µM Substrat, 50 µM AAF-CMK oder Lactacystin, Gesamtvolumen 200 µl. DEAE: 50 µl Fraktion, 200 µM Substrat, Gesamtvolumen 50 µl. Für Inhibitorstudien 10 µl Fraktion, 100 µM Substrat, 100 µM Lactacystin, AAF-CMK, Bestatin oder 10 µM Butabindide, Gesamtvolumen 100 µl. MonoQ: 5 µl Fraktion, 200 µM Substrat, Gesamtvolumen 50 µl. Superdex 200: 30 µl Fraktion, 200 µM Substrat, Gesamtvolumen 50 µl.

Zur Erstellung der Inhibitorprofile wurden je 0.1 µg rekombinanter PSA und 10 µl gereinigter BH verwendet. Das Endvolumen betrug 200 µl Puffer A mit 50 µM Substrat und jeweils 50 µM Lactacystin, LLnL, AAF-CMK, Bestatin, Puromycin oder E64 und 5 µM Butabindide.

#### 2.2.4.2.6. Verdau synthetischer Peptide mit PSA, BH oder 20S Proteasom

20 µg Peptid wurden mit 0.4 µg rekombinanter humaner PSA (Baculovirus exprimiert und von M.W. Thompson, Kentucky, USA zur Verfügung gestellt), 4 µg rekombinanter humaner BH (*E.Coli* exprimiert und von J.S. Lazo, Pittsburgh, USA zur Verfügung gestellt) oder 20S Proteasom (aus humanen Erythrocyten, zur Verfügung gestellt von A.K. Nußbaum aus unserer Arbeitsgruppe) für bis zu 4 h bei 37°C inkubiert. Als Reaktionspuffer wurde Puffer A verwendet (siehe 2.2.4.1.5.1.). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden 60 µl Aliquotes entnommen und die Reaktion mit 6 µl 10 %iger Essigsäure gestoppt. Die Proben wurden bis zum Entsalzen bei -20°C gelagert.

#### 2.2.4.2.7. Entsalzen von Proben

Um Proben für die Massenspektrometrie zu entsalzen, können entweder, wie unter 2.2.4.2.3. beschrieben, Ziptips verwendet werden oder eine Entsalzung über kleine C18-Säulen (Sample Prep station G1001A, Hewlett Packard) erfolgen. Dabei wird die Flüssigkeit jeweils mit Argongas über die Säule gedrückt, so dass es nur eine Flussrichtung gibt und eine höhere Bindungsrate von Peptiden an die Matrix erreicht wird.

Die Säulchen werden jeweils mit 500 µl 40 % Methanol / 1 % Ameisensäure / 60 % H<sub>2</sub>O gewaschen, mit 300 µl 0.1 % TFA / 99.9 % H<sub>2</sub>O equilibriert, die Probe aufgetragen, mit 300 µl 0.1 % TFA / 99.9 % H<sub>2</sub>O gewaschen und die Probe mit 50 µl 40 % Methanol / 1 % Ameisensäure / 60 % H<sub>2</sub>O eluiert.

#### 2.2.4.2.8. Jodierung von Peptiden mit <sup>125</sup>I

Tyrosinreste in Peptiden und Proteinen können durch <sup>125</sup>I markiert werden. Dabei wird das eingesetzte Jodid-Anion durch Chloramin-T zum Iodid-Kation oxidiert. Diese ersetzt in einer elektrophilen Substitutionsreaktion am aktivierten Aromaten ein H-Atom in Orthostellung zur Hydroxylgruppe des Tyrosins. Überschüssiges Iodonium wird durch Natriummetabisulfit zum Iodid reduziert und durch Extraktion mit Anionenaustauschmaterial vom markierten Peptid getrennt.

Lösungen:	1 mg/ ml Peptid
	1 mCi Na <sup>125</sup> I (Amersham)
	PBS
	1 mg/ml Chloramin-T (Serva) in H <sub>2</sub> O
	1 mg/ml Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> in H <sub>2</sub> O
	Dowex (1x8, Serva) gelagert in 1 mg/ml BSA Vor der Nutzung 2 x in PBS waschen

**Tabelle 2.11.** Verwendete Lösungen Jodierung von Peptiden.

10 µl Peptid werden mit 30 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl Chloramin-T und 10 µl Na<sup>125</sup>I 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann werden 20 µl Natriummetabisulfit (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) zugegeben und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgt die Zugabe von 500 µl PBS und die Lösung wird in ein Eppendorf transferiert, dass 0.5 ml BSA freies Dowex enthält. Sie wird bei 15000 g für 1 min zentrifugiert und das Pellet verworfen. Der Überstand wird nochmals mit 0.5 ml Dowex von freiem Iodid gereinigt und dann ein 5 µl Aliquot im γ-Zähler (Multi-Crystal counter LB2104, Berthold) gemessen. Die Aktivität eines gut markierten Peptides liegt dabei bei 0.2 bis 1 x 10<sup>4</sup> cpm/ng Peptid.

### 2.2.5. Tierexperimentelle Methoden

#### 2.2.5.1. Gewinnung von Peptid-spezifischen CTL durch DNA-Immunisierung von Mäusen

Durch Immunisierung von Mäusen mit einer reinen DNA-Lösung ist es möglich CTL zu erhalten, die gegen Proteine gerichtet sind, für welche die injizierte DNA kodierte (Sweetser et al., 1989; Ulmer et al., 1993). Der genaue Weg der DNA ist dabei nicht bekannt, wobei vermutlich dendritische Zellen die DNA aufnehmen, die kodierenden Proteine prozessieren und damit die Immunantwort anregen (Casares et al., 1997).

Die zu behandelnden Mäuse wurden mit dem Inhalations-Anästhetikum Metofane (Janssen GmbH) betäubt. 5 Tage vor der eigentlichen Immunisierung wurde den Mäusen intramuskulär (*Musculus tibialis anterior*) in beide Hinterbeine je 50 µl PBS mit 6.25 ng/µl Cardiotoxin (Latoxan) gespritzt. Mit Hilfe dieses Schlangengiftes (aus *Naja nigricollis*) wird eine Entzündungsreaktion hervorgerufen, die dazu beiträgt, die injizierte DNA besser aufzunehmen. Auf die gleiche Weise wie Cardiotoxin wurde den Mäusen nach 5 Tagen 50 µl PBS mit 1 µg/µl DNA je Hinterbein injiziert, nach weiteren 10 Tagen wurden sie geopfert und ihre Milz entnommen. Nach Erstellen einer Milzsuspension wurden die Erythrozyten, wie unter 2.2.3.1 beschrieben, entfernt und jeweils die Hälfte der Zellen in 10 ml α-Medium mit 100 ng/ml Peptid für 5 Tage restimuliert. Im Cr-Freisetzungstest wurde dann auf vorhandene Peptid spezifische CTL getestet.

#### 2.2.5.2. Gewinnung von Peptid-spezifischen CTL durch Peptid-Immunisierung von Mäusen

Durch Injektion von Peptiden ist es ebenso wie mit DNA möglich, Peptid spezifische CTL zu erhalten.

Den Mäusen wurden 100 µl einer Peptidlösung *subcutan* injiziert. Darin sind 25 µg des gewünschten Peptides, 12.5 µg eines MHC-Klasse-II „Helfer“ Peptides (HBV coreProtein, und 12.5 µg einer Helferpeptidbibliothek (die auf bisher unbekannt weise das Immunisierungsergebnis verbessert) enthalten. Weiterer Bestandteil sind 50 µl eines Adjuvants. Dabei wurden Freund's Complete Adjuvant, Freund's Incomplete Adjuvant oder Titamax (alle Sigma) verwendet. Nach 8-10 Tagen wurden die Mäuse geopfert und die Zellen wie in 2.2.5.1. in Kultur genommen.

#### 2.2.5.3. Gewinnung von CTL durch Immunisierung mit Zellen

Zur Untersuchung der unterschiedlichen Peptidrepertoires von BH  $-/-$  und Wildtypmäusen wurden jeweils  $1 \times 10^7$  inaktivierte Milzzellen aus  $-/-$  in Wildtypmäuse (bzw. umgekehrt) *intrapitoneal* in 100 µl PBS injiziert. Nach acht Tagen wurden die Mäuse geopfert und die Milzzellen, wie unter 2.2.3.1 beschrieben, in Kultur genommen. Dabei wurden zur Stimulation jeweils  $2 \times 10^7$  Milzzellen der immunisierten Wildtypmaus mit  $1 \times 10^7$  inaktivierten Milzzellen der  $-/-$  Mäuse in 8 ml  $\alpha$ -Medium in einer 6-well-Kulturplatte gemischt (bzw. umgekehrt). Nach fünf Tagen wurden dann jeweils 5 ml der Kultur aus Wildtypmäusen als Effektorzellen gegen  $-/-$  ConA-Blasten als Zielzellen auf cytotoxische Aktivität im Cr-Freisetzungstest getestet. Die ganze Prozedur gilt entsprechend für Wildtyp gegen  $-/-$  Mäuse.

#### 2.2.5.4. Gewinnung von ConA und LPS aktivierten Zellen aus einer Milzsuspension

Um aktivierte T-Zellen zu erhalten, die im Cr-Freisetzungstest als Zielzellen eingesetzt werden können (nicht aktivierte Milzzellen nehmen kein Cr auf), werden  $1 \times 10^7$  Milzzellen in einer 6-well-Kulturplatte mit 2.5 µg/ml ConA (Roche) in  $\alpha$ -Medium für 3 Tage inkubiert. Danach wird das Medium durch CTL-Medium ersetzt, so dass nach fünf Tagen die Zellen als Zielzellen verwendet werden können.

Um aktivierte B-Zellen zu erhalten, die im Cr-Freisetzungstest als Zielzellen eingesetzt werden können, werden  $1 \times 10^7$  Milzzellen in einer 6-well-Kulturplatte mit 10 µg/ml LPS (Sigma) in  $\alpha$ -Medium für 2-4 Tage inkubiert. Diese Zellen können dann als Zielzellen verwendet werden.

### 3. Ergebnisse

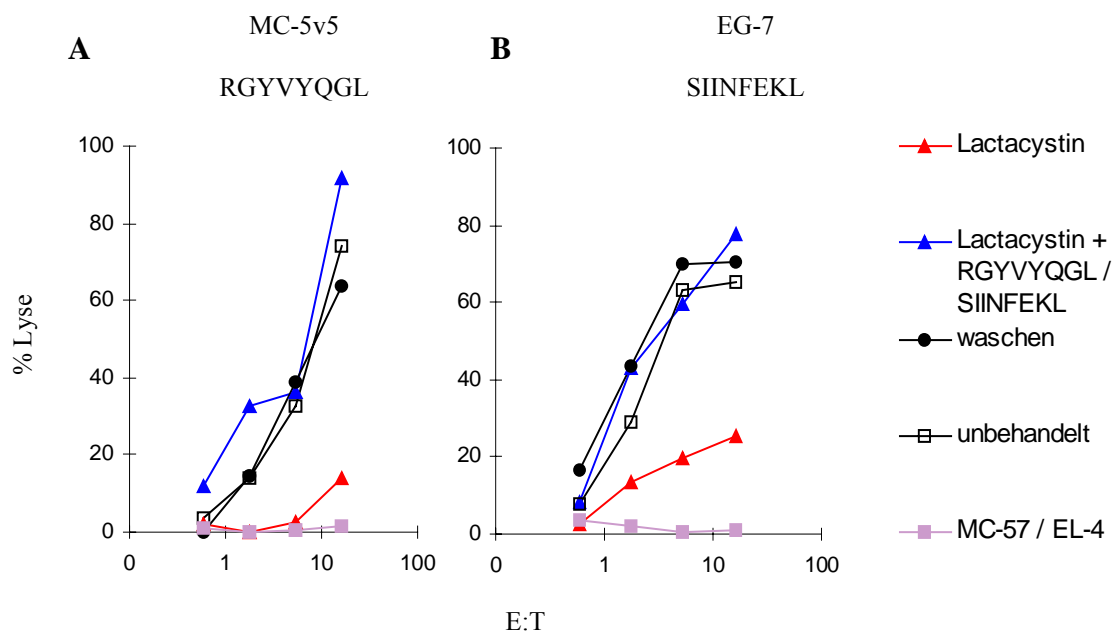
#### 3.1. Effekte verschiedener Proteaseinhibitoren auf die Antigenprozessierung

Aufbauend auf Daten aus der vorangegangenen Diplomarbeit (Stoltze, 1998), in der festgestellt wurde, dass Lactacystin keinen Effekt auf die N-terminale Prozessierung von MHC-Klasse-I-Liganden hat, wurde der Effekt von verschiedenen Proteaseinhibitoren auf die Antigenprozessierung untersucht. Dabei wurden die jeweiligen Zellen in der angegebenen Inhibitorkonzentration vorinkubiert, wie unter 2.2.3.3. beschrieben sauer gewaschen, wieder für 2h in der Anwesenheit des Inhibitors inkubiert und dann im Cr-Freisetzungstest (siehe 2.2.3.2.) auf die Präsentation des Antigens getestet.

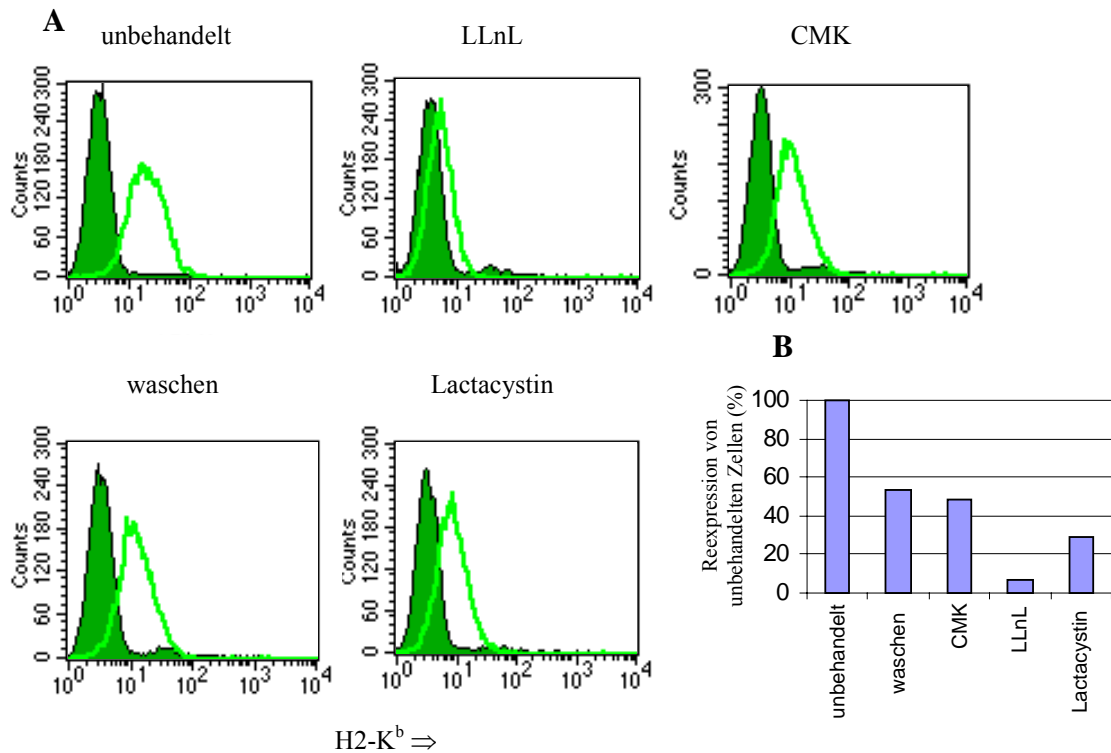
##### 3.1.1. Lactacystin inhibiert die Prozessierung ganzer Proteine und das C-terminale Trimming von VSV-NP 52-59

Lactacystin ist der bisher spezifischste bekannte Proteasominhibitor (Bogyo et al., 1997). Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  wurden bisher keine entscheidenden Effekte auf andere Proteasen festgestellt, erst bei höheren Konzentrationen wird z.B. TPP-II *in vitro* beeinflusst (Geier et al., 1999). Mit 10  $\mu\text{M}$  Lactacystin werden *in vitro* alle Aktivitäten des Proteasoms ausgeschaltet, wobei die PGPH-Aktivität kompetitiv, die anderen beiden jedoch kovalent modifiziert werden (Bogyo et al., 1997).

Bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit wurde gezeigt, dass 10  $\mu\text{M}$  Lactacystin keinen Einfluss auf die Prozessierung des VSV-NP 52-59 Epitops in den Minigentransfektanten MC-v und MC-5v hat (Stoltze, 1998). In MC-5v5



**Abbildung 3.1.** Effekt von Lactacystin auf die Antigenpräsentation von VSV-NP 52-59 und OVA 257-264. Saures Waschen von Zellen mit je 10  $\mu\text{M}$  Lactacystin. **A** MC-5v5 **B** EG-7.

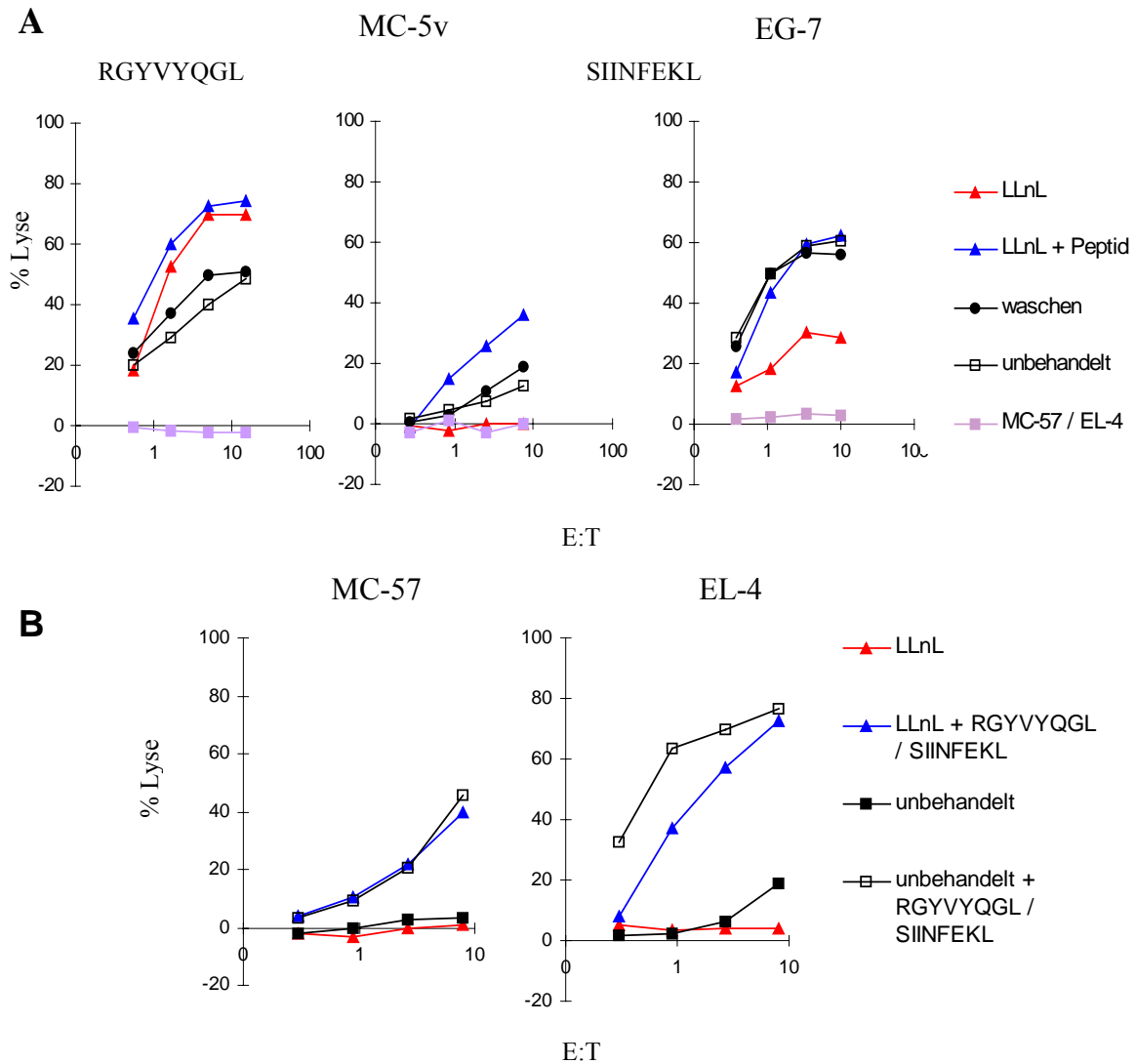


**Abbildung 3.2.** Effekt verschiedener Proteaseinhibitoren auf die Reexpression von H2-K<sup>b</sup> in MC-57 Zellen nach saurem Waschen. **A** FACS-Diagramme der einzelnen Inhibitoren. Eingesetzte Konzentrationen: LLnL 200  $\mu$ M, Lactacystin 10  $\mu$ M und AAF-CMK 50  $\mu$ M **B** Prozentuale Auswertung der Verschiebungen.

Transfektanten wird die Prozessierung jedoch inhibiert (Abb. 3.1.A). Zusätzlich wird nochmals die Inhibition der Prozessierung des OVA 257-264 Epitops aus dem gesamten Ovalbuminprotein gezeigt (Abb. 3.1.B). Dies bestätigt, dass Lactacystin die Prozessierung von CTL-Epitopen aus ganzen Proteinen hemmt, wie auch für das  $\beta$ -Gal Epitop 876-884 gezeigt wurde (Stoltze et al., 1998; Stoltze, 1998). In Zusammenhang mit den *in vitro* Verdaudaten des 5v5 Peptides mit 20S Proteasom (Stoltze et al., 1998; Stoltze, 1998) und der Inhibition der Prozessierung in MC-5v5 Transfektanten durch Lactacystin lässt sich somit rückschließen, dass das Proteasom die verantwortliche Protease für C-terminals Trimming des VSV-NP 52-59 Epitopes ist und den korrekten C-Terminus generiert.

### 3.1.2. LLnL inhibiert die Prozessierung ganzer Proteine und aktiviert das N-terminale Trimming von VSV-NP 52-59

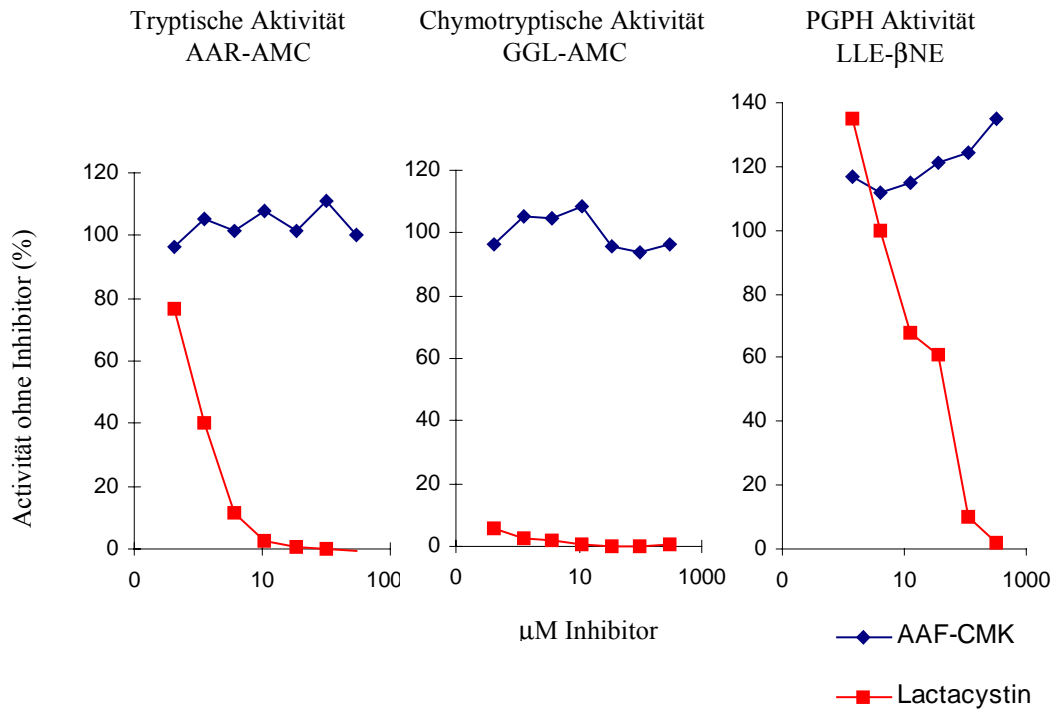
LLnL (N-Acetyl-L-Leucin-L-Leucin-L-NorLeucinal) inhibiert das Proteasom in allen drei Aktivitäten, ist jedoch nicht so spezifisch wie Lactacystin, da es auch einen Effekt auf Cathepsine und Calpaine hat (Sasaki et al., 1990; Rock et al., 1994). Ebenso werden bisher nicht näher charakterisierte ER Proteasen durch LLnL inhibiert (Hughes et al., 1996). Dadurch ist der Effekt von LLnL auf die Antigenprozessierung größer als der von Lactacystin. Behandelt man MC-57 Zellen oder die entsprechenden Minigenttransfektanten mit 200  $\mu$ M LLnL und saurem Waschen, so ist die Reexpression von MHC-Klasse-I auf der Zelloberfläche nach zwei Stunden geringer als in einem



**Abbildung 3.3.** Effekt von LLnL auf die Antigenprozessierung. **A** Effekt von 200  $\mu$ M LLnL auf die Prozessierung von VSV-NP 52-59 und OVA 257-264 in MC-5v und OVA 257-264 in EG-7 **B** 200  $\mu$ M LLnL bewirken keine peptidunabhängige Apoptose durch CTL auf den verwendeten Zielzellen.

Vergleichsexperiment, in dem Zellen mit 10  $\mu$ M Lactacystin oder 50  $\mu$ M AAF-CMK behandelt werden. Daraus kann ebenfalls geschlossen werden, dass mehr Proteasen, die an der Antigenprozessierung beteiligt sind, durch LLnL inhibiert werden als durch Lactacystin (Abb. 3.2.). AAF-CMK hat in diesen Experimenten nur einen geringen Effekt auf die Expression von MHC-Klasse-I Molekülen.

In einer Konzentration von 200  $\mu$ M inhibiert LLnL die Prozessierung des OVA CTL-Epitops 257-264 aus dem Proteinkontext heraus in EG-7 Zellen (Abb. 3.3.A). Dies ist ebenfalls der Fall im intern exprimierten OVA der MC-5v Transfektanten (Abb. 3.3.A). Überraschenderweise ist jedoch die Expression des VSV-NP 52-59 Epitops in den MC-5v Transfektanten verstärkt (Abb. 3.3.A). Dies überrascht besonders, da die Gesamtmenge an MHC-Klasse-I nach dem Experiment geringer ist als bei anderen Inhibitoren (Abb. 3.2.B) und zeigt somit eine direkte oder indirekte Aktivierung der Prozessierung an. Dass diese verstärkte Lyse nicht durch einen indirekten nicht proteolytischen Effekt von LLnL ausgelöst wird, wie z.B. der Hochregulation von FAS, ist dadurch gezeigt, dass MC-57 oder EL-4 Zellen in Anwesenheit von LLnL nicht



**Abbildung 3.4.** Effekt von AAF-CMK auf die drei katalytischen Aktivitäten des 20S Proteasoms *in vitro*. 20S Proteasom wurde mit den entsprechenden fluogenen Substraten und Inhibitormengen inkubiert.

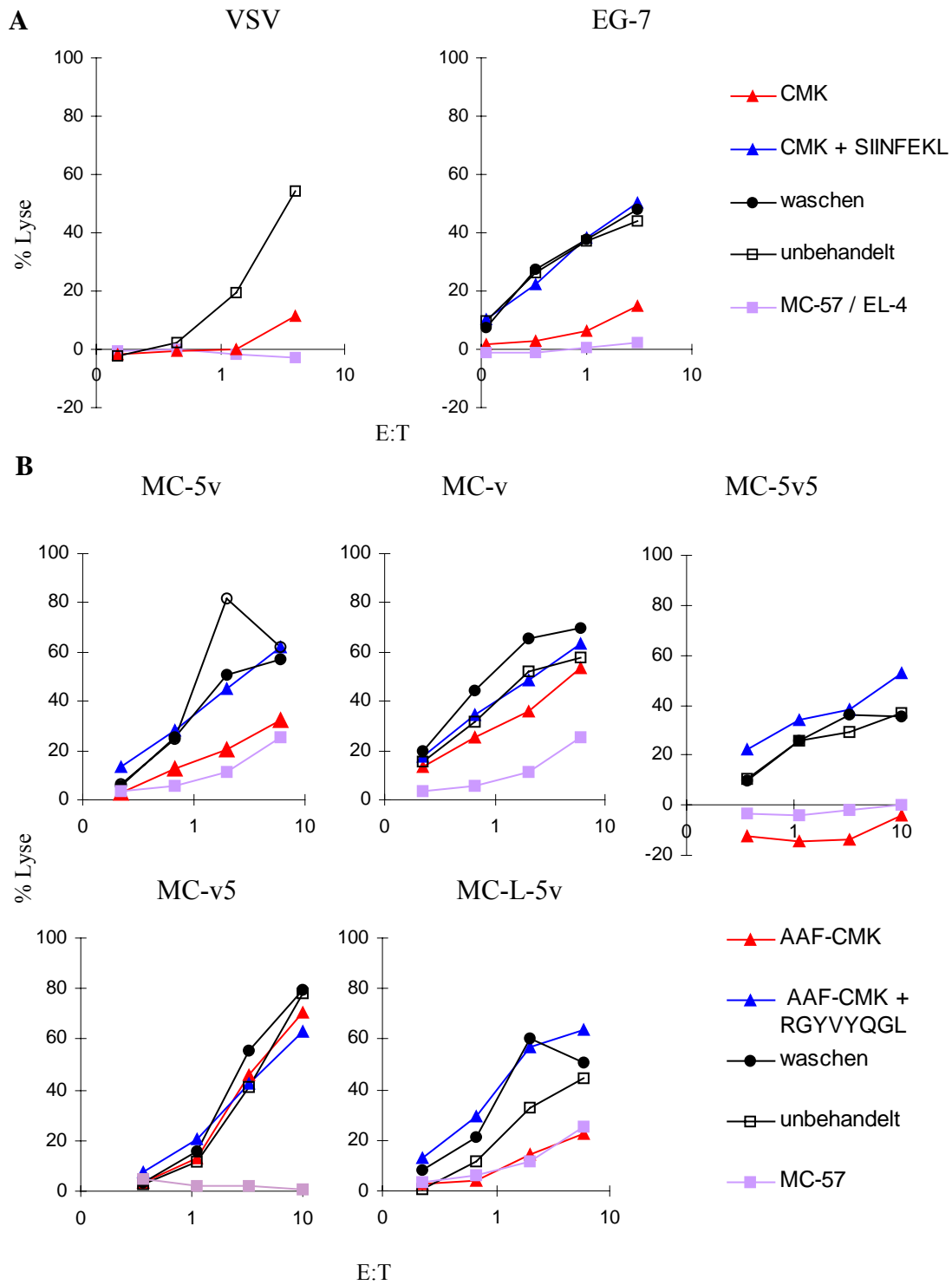
verstärkt lysiert werden, sondern erst nach der Zugabe des relevanten Peptides (Abb. 3.3.B).

### 3.1.3. AAF-CMK inhibiert die Prozessierung ganzer Proteine und das N-terminale Trimming von VSV-NP 52-59

AAF-CMK (Alanin-Alanin-Phenylalanin-Chloromethylketon) ist ein unspezifischer Proteaseninhibitor. Prinzipiell hemmt er alle Proteasen, die in der Lage sind nach AAF zu schneiden. Dies beinhaltet TPP-II (Geier et al., 1999), schließt aber nicht aus, dass auch Proteasen die durch andere Chlor-Methylketone mit weniger Aminosäuren (z.B. L-CMK) gehemmt werden, wie Tricon interagierender Faktor 3 (Tamura et al., 1998) ebenfalls inhibiert werden. Das Proteasom ist allerdings in keiner seiner proteolytischen Aktivitäten durch AAF-CMK inhibierbar, wie *in vitro* Verdaus der jeweiligen fluorogenen Substrats mit titriertem Inhibitor zeigen (Abb. 3.4.).

In einer Konzentration von 50 µM ist AAF-CMK dagegen in der Lage, die Prozessierung verschiedener CTL-Epitope aus dem Proteinkontext heraus zu inhibieren. Exemplarisch wird die Inhibition von OVA 257-264 in EG-7 Zellen und von VSV-NP 52-59 in MC-57 Zellen infiziert mit VSV gezeigt (Abb. 3.5.A). Ebenso wird die Prozessierung des Hepatitis B Coreantigens 93-100 (MGLKFRQL) in RBL-5C Zellen im Proteinkontext und in P13.1 Zellen, infiziert mit Vaccinia Viren, die unterschiedliche Minigenkonstrukte dieses Epitops enthalten und durch die CTL-Linie LS-M erkannt werden, inhibiert (unveröffentlichte Daten).





**Abbildung 3.5.** Effekt von AAF-CMK auf die Antigenprozessierung. **A** Effekt von 50  $\mu$ M AAF-CMK auf die Prozessierung des VSV-NP Epitops 52-59 in VSV infizierten MC-57 Zellen und OVA 257-264 in EG-7 Zellen. **B** Effekt auf die Prozessierung des VSV-NP Epitops 52-59 in unterschiedlichen Minigentransfektanten.

In den Minigentransfektanten ist eine Inhibition der Antigenprozessierung zu beobachten, sobald das VSV-NP 52-59 CTL-Epitop eine N-terminale Verlängerung aufweist (Abb. 3.5.B, siehe MC-5v und MC-5v5). In MC-v Zellen ist keine Inhibition zu erkennen, da logischerweise keine weitere Prozessierung des VSV-NP 52-59 Epitops

---

notwendig ist (Abb. 3.5.B). Da aber auch in MC-v5 Zellen kein Effekt durch AAF-CMK zu beobachten ist, im Gegensatz zu den MC-5v5 Zellen, ist der Inhibitionseffekt von AAF-CMK spezifisch für die N-terminale Prozessierung von CTL-Epitopen.

Auffallend ist, dass auch die Prozessierung des Minigenkonstruktes mit ER-Signalsequenz in MC-L-5v Zellen gehemmt wird (Abb. 3.5.B). Da das VSV-NP 52-59 CTL-Epitope vermutlich TAP unabhängig in das ER gelangen kann (Hosken and Bevan, 1992), ist allerdings nur die Aussage möglich, dass, falls für dieses Epitop N-terminales Trimming auch im ER stattfindet, dieses ebenfalls durch AAF-CMK inhibiert wird.

### 3.2. Definition und Reinigungskriterien von Trimpeptidasen

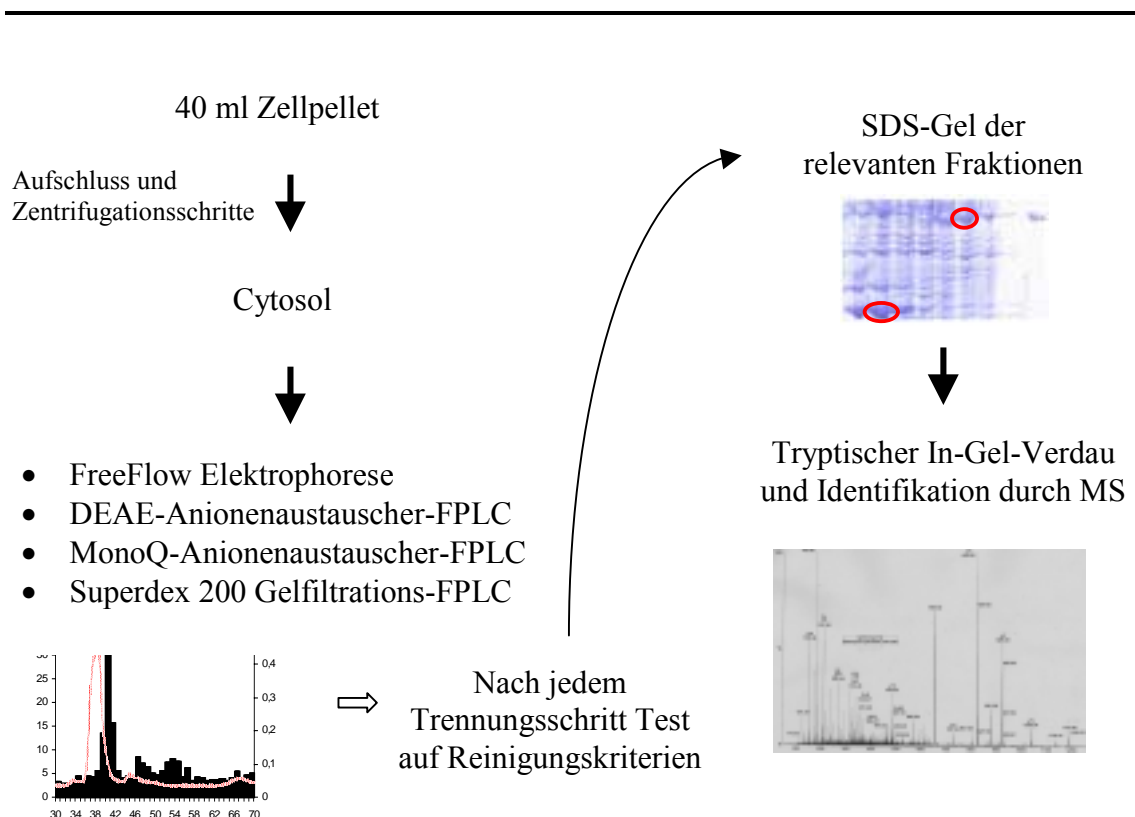
#### 3.2.1. Definition von Trimpeptidasen

Aus den in der Diplomarbeit (Stoltze et al., 1998) und in 3.1. gezeigten Daten wurde folgende Definition für den Begriff Trimpeptidasen aufgestellt:

1. Die entsprechenden Proteasen sind an der Generierung von MHC-Klasse-I-Liganden beteiligt.
2. Diese Proteasen sind in der Lage Aminosäuren von Peptidvorläufern zu entfernen, die vom Proteasom generiert wurden.
3. Diese Proteasen können Aminopeptidaseaktivität und/oder Endopeptidaseaktivität besitzen.

#### 3.2.2. Reinigungskriterien für Trimpeptidasen

Um solche in 3.2.1. definierte Trimpeptidasen zu identifizieren, die an der Generierung des VSV-NP 52-59 Epitops beteiligt sind, wurden aus den vorhandenen Daten



**Abbildung 3.6.** Reinigungsschema zur Identifikation von Trimpeptidasen. Aus dem Ausgangsmaterial von 40 ml Zellpellet wurde das Cytosol aufgereinigt. Durch vier Trennungsschritte, nach welchen alle Fraktionen auf die Selektionskriterien getestet wurden, wurden relevante Trimpeptidaseaktivitäten aufgereinigt und auf einem SDS-Gel analysiert. Die entscheidenden Proteinbanden wurden durch tryptischen Verdau und MS-Analyse identifiziert.

---

zwingende Selektionskriterien aufgestellt, die von relevanten Proteasen erfüllt werden müssen:

1. Da Lactacystin keinen Effekt auf das N-terminale Trimming hat (Stoltze et al., 1998), darf eine Trimpeptidase nicht durch Lactacystin gehemmt werden.
2. Da AAF-CMK einen Effekt auf die N-terminale Prozessierung von VSV-NP 52-59 hat (Abb. 3.5.B), muss die entsprechende Trimpeptidase durch diesen Inhibitor inhibierbar sein.
3. Die entsprechende Trimpeptidase muss in der Lage sein, die natürlich flankierenden fünf Aminosäuren des VSV-NP 52-59 Epitops zu entfernen.

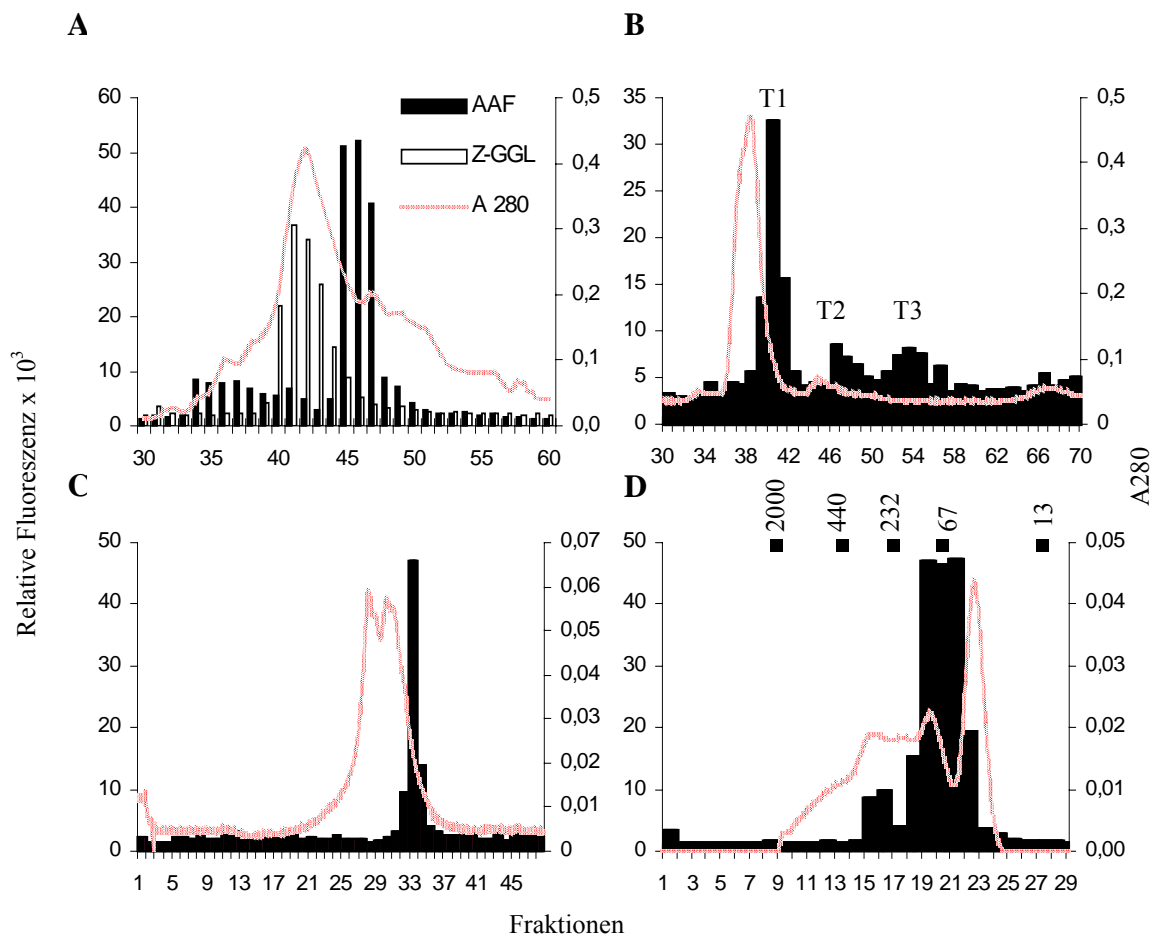
Aufbauend auf diesen Selektionskriterien wurde wie in Abbildung 3.6. beschrieben nach cytosolischen Trimpeptidasen gesucht.

### 3.3. Reinigung und Identifikation cytosolischer Trimpeptidasen

#### 3.3.1. Reinigung cytosolischer Trimpeptidasen

Cytosol aus COX Zellen (eine humane EBV transformierte B-Zelllinie) wurde durch Zentrifugationsschritte von anderen Zellkompartimenten und Membranen getrennt. Im darauffolgenden Separationsschritt konnten mit Hilfe einer FreeFlow Elektrophorese bereits mehrere proteolytische Aktivitäten voneinander getrennt werden (Abb. 3.7.A). Die FreeFlow Elektrophorese stellt dabei eine sehr schonende, trägerfreie Elektrophorese dar, in der Proteine nach ihrer Ladung in einem starken elektrischen Feld und konstantem Pufferfluss kontinuierlich aufgetrennt werden.

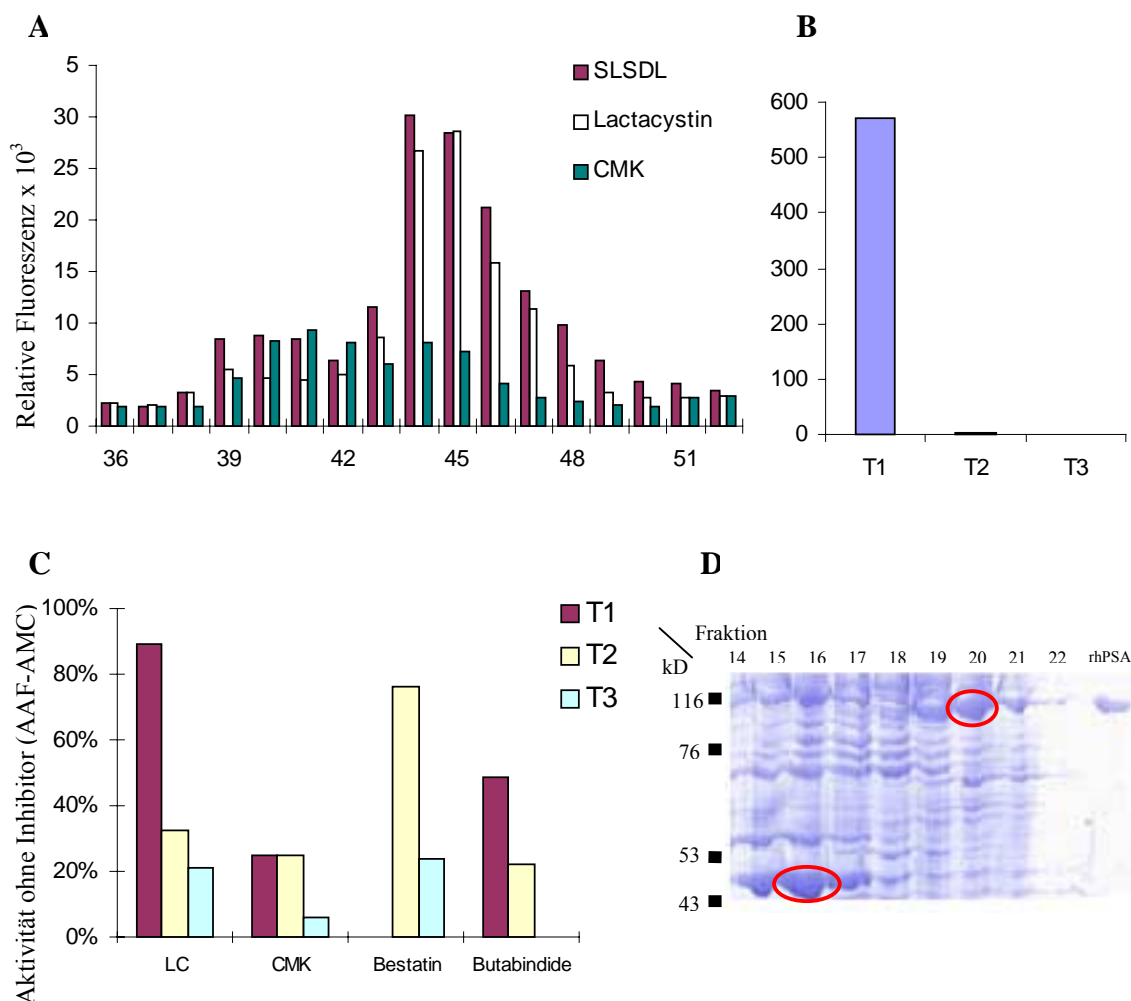
Die einzige stark auftretende Endproteaseaktivität (Fraktionen 41-44), die in der Lage ist das fluorogene Substrat Z-GGL-AMC zu schneiden, konnte dabei durch Westernblott und die Inhibition durch Lactacystin als Proteasom identifiziert werden (nicht gezeigt). Die geringe Aminopeptidaseaktivität gegen AAF-AMC in den



**Abbildung 3.7.** Reinigungsprofile der identifizierten Trimpeptidasen. **A** FreeFlow Elektrophorese von reinem Cytosol **B** DEAE-Anionenaustauscher-FPLC von den vereinigten Fraktionen 45-46 aus **A** **C** MonoQ-Anionenaustauscher-FPLC von den vereinigten Fraktionen 40-41 aus **B** **D** Superdex 200 Gelfiltrations-FPLC von den vereinigten Fraktionen 33-34 aus **C**. Verwendete Marker Dextranblau 2000 kDa, Ferritin 440 kDa, Thyroglobin 232 kDa, BSA 67 kDa und RNase 13 kDa.

Fractionen 34-38 wurde nicht weiter charakterisiert, da keine proteolytische Aktivität gegen die natürlichen flankierenden fünf Aminosäuren des VSV-NP 52-59 Epitops SLSDL-AMC nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.8.A). Die einzige Aktivität, die alle gesetzten Selektionskriterien erfüllt, sind Fractionen 44-45. Sie schneidet effektiv nach SLSDL, ist inhibierbar durch AAF-CMK und nicht beeinflusst durch Lactacystin (Abb. 3.8.A). Daher wurden diese beiden Fractionen vereinigt und zur weiteren Aufreinigung verwendet.

Im nächsten Trennungsschritt, einer Anionenaustausch-Chromatographie mit DEAE-Toyopearl-Material, wurden drei proteolytische Aktivitäten voneinander getrennt (Abb. 3.7.B). Die Aktivität T2 wurde nicht weiter charakterisiert, da Lactacystin einen Effekt auf die Aktivität zeigte und das Substrat SLSDL nicht umgesetzt wurde (Abb. 3.8.B und C). Die Aktivität T3 wurde durch Westernblott als TPP-II identifiziert (nicht gezeigt). T3 zu 100 % durch Butabindide inhibierbar, der spezifischste bekannte Inhibitor für TPP-II (Rose et al., 1996) und außerdem ist T3 nicht in der Lage das SLSDL Substrat umzusetzen (Abb. 3.8.B und C). Da Butabindide auch keinen Einfluss auf die

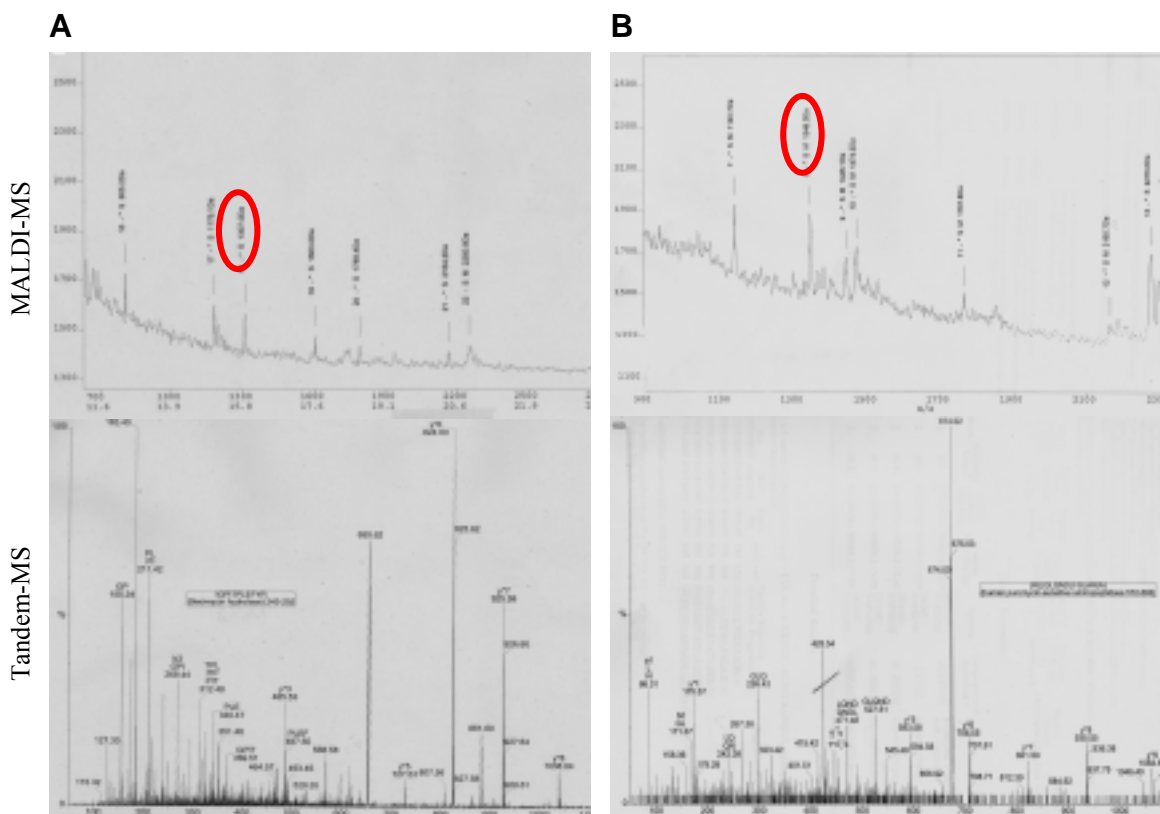


**Abbildung 3.8.** Überprüfung der Selektionskriterien für die Reinigung der Trimpeptidasen. **A** FreeFlow Elektrophorese **B** SLSDL-AMC auf DEAE-Aktivitäten **C** Inhibitorprofil von DEAE-Aktivitäten **D** 8 % SDS-PAGE der relevanten Superdexfractionen und rekombinanter humaner PSA (rhPSA). Die dominantesten Banden sind markiert.

Prozessierung des VSV-NP 52-59 Epitops im Experiment mit saurem Waschen von MC-5v Zellen zeigte (unveröffentlichte Daten), wurde T3 nicht für weitere Experimente berücksichtigt. T1 hingegen erfüllt alle drei Selektionskriterien, da es als einzige Aktivität das SLSDL Substrat effektiv umsetzt, Lactacystin keinen Effekt auf die Aktivität hat, aber AAF-CMK die Aktivität inhibiert (Abb. 3.8.B und C). Daher wurden die Fraktionen 41-42 vereinigt und für die weitere Aufreinigung verwendet.

Durch die Anwendung einer weiteren Anionenaustauscher-Chromatographie mit MonoQ-Material wurde eine verbesserte Proteintrennung erreicht, die proteolytische Aktivität eluierte allerdings wieder als ein Peak (Abb. 3.7.C). Das Inhibitionsprofil unterscheidet sich dabei nicht vom bereits als T1 getesteten, so dass für einen weiteren Trennungsschritt die Fraktionen 33 und 34 vereinigt wurden.

Nach dem Einengen der Fraktionen in der Speedvac wurden diese einer Gelfiltration mit Superdex-200 Material unterzogen. Überraschenderweise eluierten von dieser Säule zwei Aktivitätspeaks. (Abb. 3.7.D). Eine Aktivität bei einem Molekulargewicht von 300 kD und die andere bei 100 kD. Nach dem Auftragen der entsprechenden Fraktionen auf ein 8% SDS Gel zeigte die Aktivität bei 300 kD eine dominante Bande bei 50 kD und die 100 kD Aktivität eine dominante 100 kD Bande im Gel (Abb. 3.8.D). Zur weiteren Charakterisierung wurden diese Banden ausgeschnitten und wie unter 3.2.2. beschrieben, die Proteasen identifiziert.



**Abbildung 3.9.** Identifikation von PSA und BH durch MALDI und Tandem-MS. Für die durch MS identifizierten Peptide sind für BH und PSA beispielhaft ein jeweiliges Peptidspektrum aus MALDI und Tandem-MS gezeigt. Die Massenpeaks des MALDI-Spektrums, deren Tandem-MS-Spektrum gezeigt ist, sind markiert. **A** 50 kD Bande aus Abb. 3.7.D. Peptid aus humaner BH 245-255 **B** 100 kD Bande aus Abb. 3.7.D. Peptid aus humaner PSA 572-583.

### 3.3.2. Identifikation cytosolischer Trimpeptidasen

Die ausgeschnittenen Proteinbanden wurden einem tryptischen In-Gel-Verdau unterzogen und mithilfe des MALDI-MS und Tandem-MS identifiziert (MS-Analysen wurden von M. Schirle aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt). Abb. 3.9. zeigt je ein MALDI-Peptidspektrum eines Verdau einer 50 kD Bande aus Fraktion 16, einer 100 kD Bande aus Fraktion 20 und je ein daraus resultierendes Tandem-MS-Spektrum eines im MALDI identifizierten Peptids.

In Tabelle 3.1. sind alle auf dem Tandem MS identifizierten Peptide aufgeführt. Diese wurden dann mithilfe des im Internet zugänglichen Datenbankprogramms Proteinprospektor der University of California San Francisco (<http://prospector.uscf.edu>) den entsprechenden Proteinen zugeordnet. Aus der Fraktion 20 ließen sich gleich mehrere Peptide der humanen Puromycin sensitiven Aminopeptidase (PSA) Aminosäuresequenz zuordnen. Aus der Fraktion 16 ließ sich als einziges Peptid einer Protease das Peptid IGPITPLEFYR der humanen Bleomycin Hydrolase (BH) Sequenz 245-255 zuordnen. Auffallend ist, dass in der gleichen Fraktion wie BH zwei Hitzeschockproteine enthalten sind, Hitzeschock-70-verwandtes Protein und HSC70-interagierendes Protein. Dies ist dahingehend interessant, da Hitzeschockproteine für den Peptidtransport zu TAP verantwortlich gemacht werden (siehe 3.8. und 4.4.).

Fraktion 16	MW	Sequenz	Ausgangsprotein
110 kD Bande	1736.8	EFSITDVVPYISLR	Hitzeschock-70-verwandtes Protein APG-2 391-405
	1403.8	NAVEEYVYEMR	Hitzeschock-70-verwandtes Protein APG-2 619-629
50 kD Bande	<b>1307.0</b>	<b>IGPITPLEFYR</b>	<b>humane BH 245-255</b>
	1471.8	VAAIEALNDGELQK	HSC70- interagierendes Protein 119-132
	1446.8	AIEINPDSAQPYK	HSC70- interagierendes Protein 174-186
	1107.0	AIDLFTDAIK	HSC70- interagierendes Protein 133-142
40 kD Bande	1791.8	SYELPDGQVITIGNER	β-Actin 239-254
<b>Fraktion 20</b>			
100 kD Bande	<b>1473.8</b>	<b>DAESIHQYLLQR</b>	<b>humane PSA 901-912</b>
	<b>1381.8</b>	<b>VLGATLLPDLIQK</b>	<b>humane PSA 782-794</b>
	<b>1348.0</b>	<b>LGLQNDLFSLAR</b>	<b>humane PSA 572-583</b>
	<b>1191.0</b>	<b>ATFDISLVVPK</b>	<b>humane PSA 198-208</b>

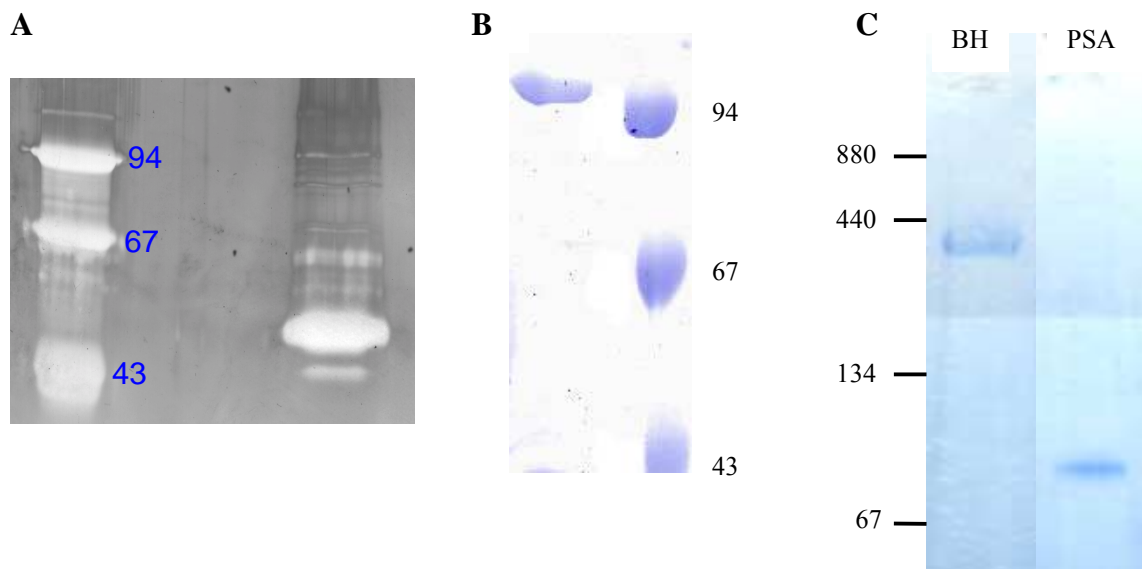
**Tabelle 3.1.** Durch Trypsinverdau und MS-Analyse identifizierte Peptide der dominantesten Banden des Gels in Abb. 3.8.D. Aufgeführt sind die Sequenz der Peptide und das Ursprungprotein.



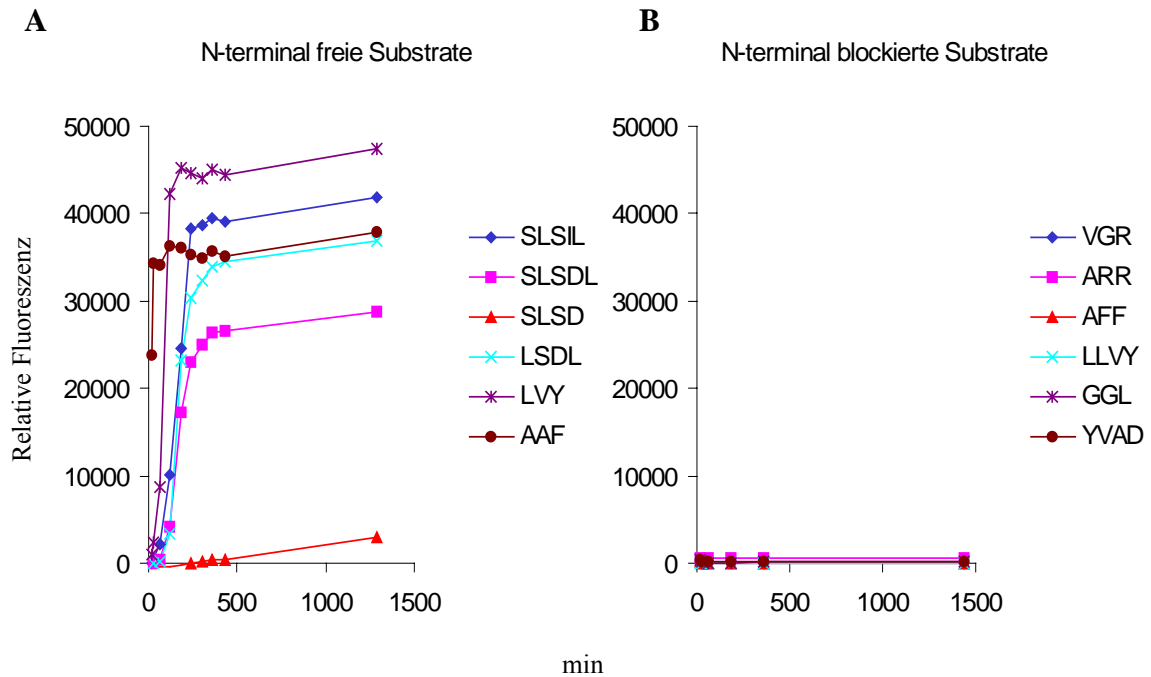
### 3.4. Charakterisierung der identifizierten Trimpeptidasen *in vitro*

Beide identifizierte Trimpeptidasen konnten von Kooperationspartnern rekombinant erhalten werden. PSA wurde von M.W. Thompson aus der Gruppe von L. B. Hersh (Kentucky, USA) als Baculovirus exprimiertes Protein geliefert. BH wurde von der Gruppe um J.S. Lazo Pittsburgh als *E.coli* exprimiertes Protein geliefert. Die erhaltenen Proteine wurden in SDS- und BN-PAGE Gelen auf ihre Reinheit und native Größe hin getestet.

Beide Proteine weisen im SDS-Gel eine Proteinbande der gewünschten Größe auf, BH bei 50 kD und PSA bei 100 kD (Abb. 3.10.A und B), die den beschriebene Daten entsprechen. In der BN-PAGE Elektrophorese, in der sich das Molekulargewicht von nativen Proteinen bestimmen lässt, weist die rekombinante PSA die beschriebene Größe von 100 kD auf. BH erscheint jedoch bei 350 kD und wäre demnach ein Homoheptamer an Stelle des beschriebenen und in Abb. 3.7.D beobachteten Homohexamers von 300 kD (Abb. 3.10.C). Dies könnte eventuell daran liegen, dass der zur Reinigung des Proteins verwendete His-tag nicht entfernt wurde, was durch die entsprechende Kristallstruktur überprüft werden soll (persönliche Mitteilung J.S. Lazo). Das Inhibitorprofil von gereinigter und rekombinanter BH hat sich dessen ungeachtet nicht unterschieden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die proteolytische Aktivität keinen Unterschied aufweist. Im Text wird trotzdem darauf hingewiesen, wann rekombinante oder gereinigte BH verwendet wurde.



**Abbildung 3.10.** Natives und denaturiertes Verhalten, der erhaltenen rekombinanten Proteine. **A** 5 µg rekombinante BH, 8 % SDS, Zn-Färbung **B** 2 µg rekombinante PSA, 8 % SDS, Coomassi-Färbung. Marker A und B Phosphorylase b 94 kD, BSA 67 kD, Ovalbumin 43 kD **C** 5µg BH und PSA, 2-20 % BN-PAGE. Marker BSA Monomer 67 kD, Dimer 134 kD, Ferritin Monomer 440 kD, Dimer 880 kD.



**Abbildung 3.11.** Proteolytische Aktivität von PSA *in vitro*. **A** Umsatz von N-terminal freien fluogenen Substraten **B** Umsatz von N-terminal blockierten fluogenen Substraten.

#### 3.4.4. Die proteolytische Aktivität von PSA

PSA hat eine reine Aminopeptidaseaktivität. Bei der Inkubation mit N-terminal blockierten und N-terminal freien fluorogenen Substraten wurde, auch nach einer Inkubation von 20 h, keine proteolytische Aktivität gegenüber N-terminal blockierten Substraten beobachtet (Abb. 3.11.A und B). Als Aminopeptidase agiert PSA relativ unspezifisch. Auch wenn keine eingehenden Spezifitätsexperimente durchgeführt wurden, ist doch aus Abb. 3.11.A zu ersehen, dass ineffizient nach einem D geschnitten wird. SLSD, welches mit einem D endet, wird sogar fast gar nicht umgesetzt. Wird jedoch ein D durch I ersetzt (vergleiche SLSDL mit SLSIL, Abb. 3.11.A) erhöht sich die Umsatzgeschwindigkeit.

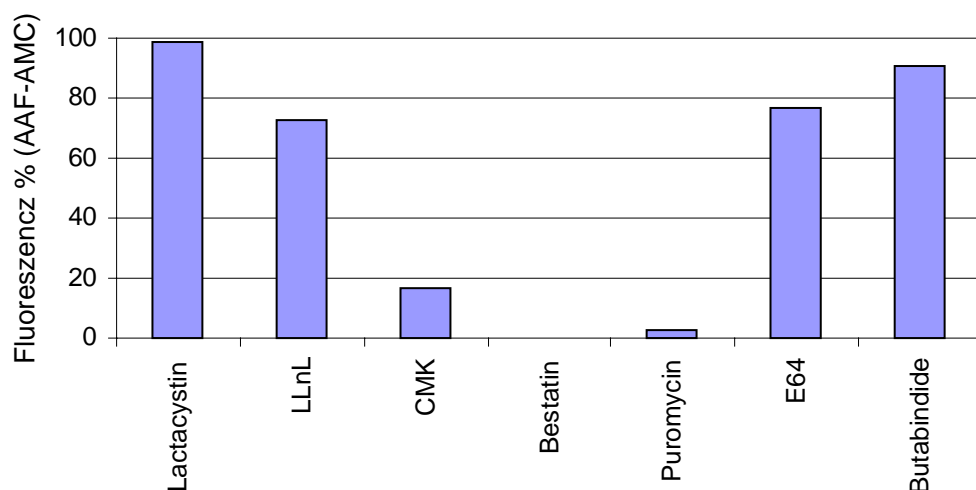
*In vitro* ist PSA in der Lage die natürlichen flankierenden Aminosäuren des VSV-NP 52-59 Epitops zu entfernen, wie sich im Verdau mit den entsprechenden Peptiden zeigen lässt (Tab. 3.2.). Dabei wird, der Aminopeptidaseaktivität entsprechend, eine Aminosäure nach der anderen entfernt und das Epitop selbst nicht vom Verdau verschont. Es zeigt sich jedoch, dass bei vorhandenem korrekten C-Terminus des Epitops das Epitop unter den gefundenen Fragmenten ist. Auch das 18 Aminosäuren lange Vorläuferpeptid 5v5 wird ohne weiteres verdaut, jedoch ohne dass das Epitop unter den Fragmenten ist. Auffallend ist, dass in beiden Verdaus eine Anreicherung des Fragments entsteht, welches mit einem D beginnt (2v, bzw. 2v5 Tab. 3.2.). Dies bestätigt die Beobachtung mit den fluorogenen Substraten, das D ein nicht favorisiertes Substrat für PSA darstellt.

Die Substratspezifität für längere Peptide scheint nicht unbegrenzt zu sein. So wurde ein weiteres Peptid, mit 22 Aminosäuren, welches aus dem Hepatitis B core Antigen 83-104 stammt (RDLVVS~~Y~~VNTNMGLKFRQLLWFH), nicht durch PSA verdaut. Dies mag an der Länge oder an der Sequenz des Peptides liegen.

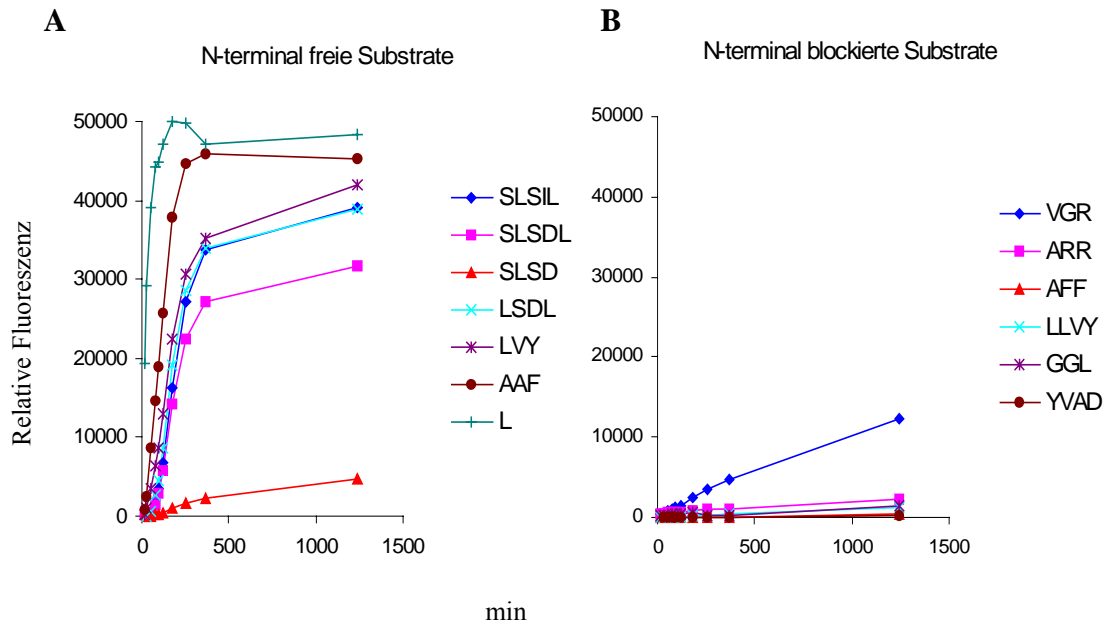
PSA Verdau von:	SLSDLRGYVYQGL	5v	SLSDLRGYVYQGLKSGNV	5v5
<b>Fragment</b>	LSDLRGYVYQGL	4v	LSDLRGYVYQGLKSGNV	4v5
<b>gefunden:</b>	SDLRGYVYQGL	3v	SDLRGYVYQGLKSGNV	3v5
	DLRGYVYQGL	2v	DLRGYVYQGLKSGNV	2v5
	RGYVYQGL	v	LRGYVYQGLKSGNV	1v5
	GYVYQGL	-1v	RGYVYQGLKSGNV	v5
	YVYQGL	-2v	GYVYQGLKSGNV	-1v5
	VYQGL	-3v	YVYQGLKSGNV	-2v5
	YQGL	-4v	VYQGLKSGNV	-3v5
	QGL	-5v	YQGLKSGNV	-4v5
			QGLKSGNV	-5v5

**Tabelle 3.2.** Verdau von 5v und 5v5 durch PSA und daraus resultierende Fragmente.

Das Inhibitorprofil von PSA bestätigt, dass AAF-CMK ein potenter Inhibitor für PSA ist (Abb. 3.12.). Da der Inhibitionseffekt aber bei sehr langer Inkubationszeit nachlässt (Daten nicht gezeigt), ist anzunehmen, dass eine nicht kovalente Inhibition vorliegt. Bestatin inhibiert ebenfalls als Aminopeptidaseinhibitor die Aminopeptidase PSA, ebenso wie Puromycin, von dem der Name für PSA abgeleitet wurde. Andere Inhibitoren wie Lactacystin, LLnL, E64 oder Butabindide haben keinen wesentlichen Einfluss auf PSA.



**Abb. 3.12.** Inhibitorprofil rekombinanter PSA mit AAF-AMC.



**Abbildung 3.13.** Proteolytische Aktivität von BH *in vitro*. **A** Umsatz von N-terminal freien fluogenen Substraten **B** Umsatz von N-terminal blockierten fluogenen Substraten.

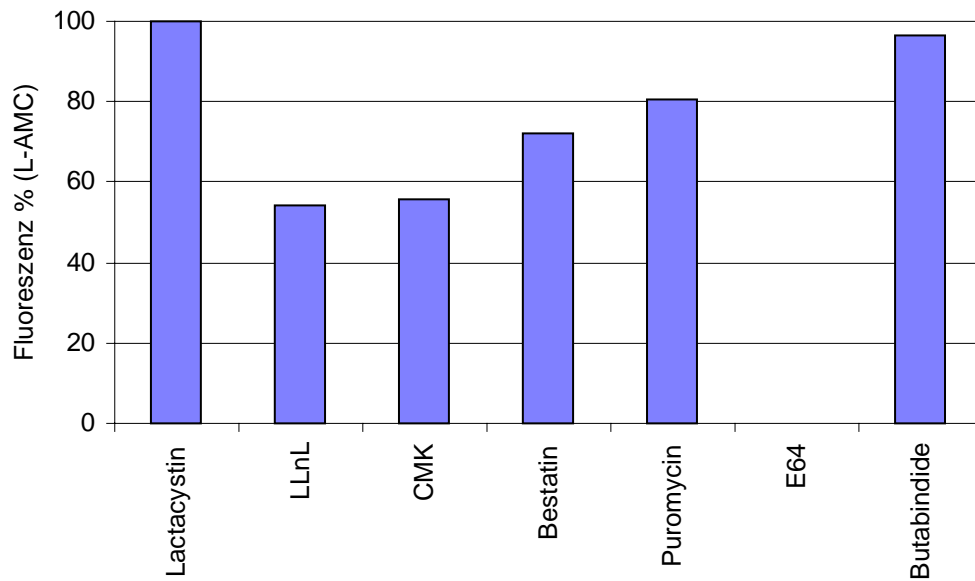
### 3.4.5. Die proteolytische Aktivität von BH

BH hat vorwiegend Aminopeptidaseaktivität (Abb. 3.13.A). Dabei fällt genau wie bei PSA auf (siehe 3.4.4.), dass D eine Aminosäure ist, nach der nicht gern geschnitten wird. Im Gegensatz zu PSA, weist BH jedoch eine eindeutige Endopeptidaseaktivität auf, die besonders bei dem Substrat VGR auffällt, aber auch bei ARR und in sehr geringem Maße bei LLVY zu beobachten ist (Abb. 3.13.B). Relativ zur Aminopeptidaseaktivität ist sie allerdings gering. Dabei ist nicht auszuschließen, dass *in vivo* diese Aktivität eine Bedeutung haben kann.

Ebenso wie PSA ist auch BH in der Lage, die natürlich N-terminal flankierenden Aminosäuren des VSV-NP 52-59 Epitops zu entfernen. Dabei entsteht ein gleiches Schnittmuster wie mit PSA, so dass das Epitop selbst nur erscheint, wenn der C-Terminus bereits vorliegt und das Epitop auch hier weiter verdaut wird (Tab. 3.3.).

BH Verdau von:	SLSDLRGYVYQQL	5v	SLSDLRGYVYQGLKSGNV	5v5
Fragment gefunden:	LSDLRGYVYQQL	4v	LSDLRGYVYQGLKSGNV	4v5
	SDLRGYVYQQL	3v	SDLRGYVYQGLKSGNV	3v5
	DLRGYVYQQL	2v	DLRGYVYQGLKSGNV	2v5
	RGYVYQQL	v	LRGYVYQGLKSGNV	1v5
	YVYQQL	-2v	RGYVYQGLKSGNV	v5
	VYQQL	-3v	GYVYQGLKSGNV	-1v5
			YVYQGLKSGNV	-2v5
			VYQGLKSGNV	-3v5

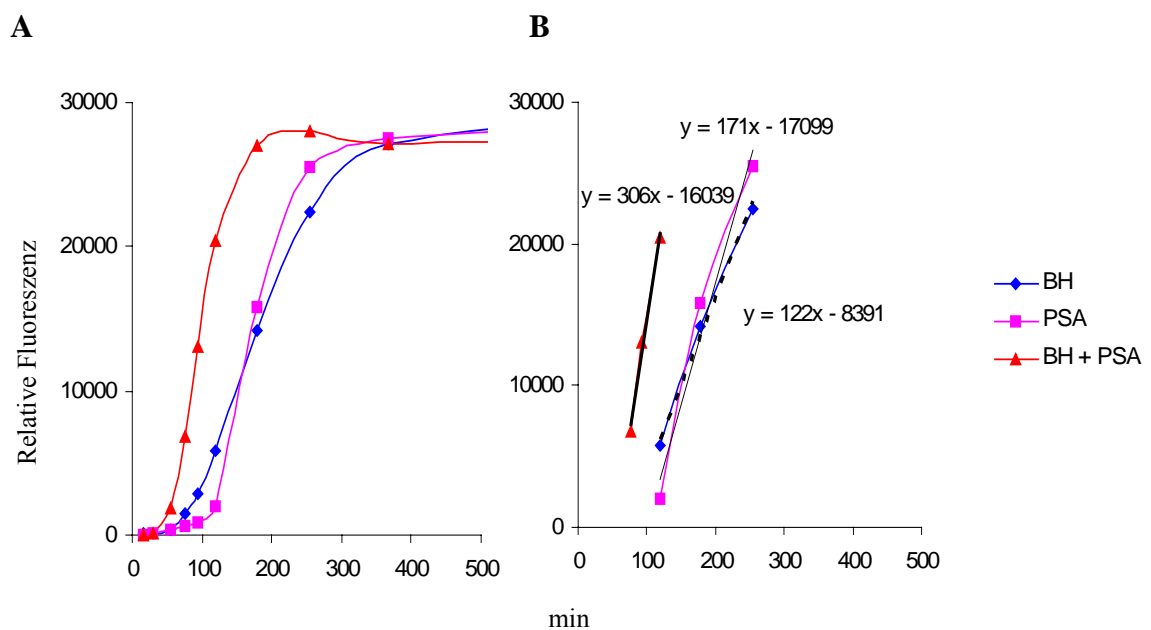
**Tabelle 3.3.** Verdau von 5v und 5v5 durch rekombinante BH und daraus resultierende Fragmente.



**Abbildung 3.14.** Inhibitorprofil gereinigter BH mit L-AMC.

Genau wie PSA ist BH aber auch nicht in der Lage, das 22 Aminosäure lange Peptid aus dem Hepatitis B core Antigen 83-104 (RDLVVS~~Y~~VNTNMGLKFRQLLWFH) zu verdauen. Auch hier ist nicht geklärt, ob dies an der Länge oder der Sequenz des Peptides liegt.

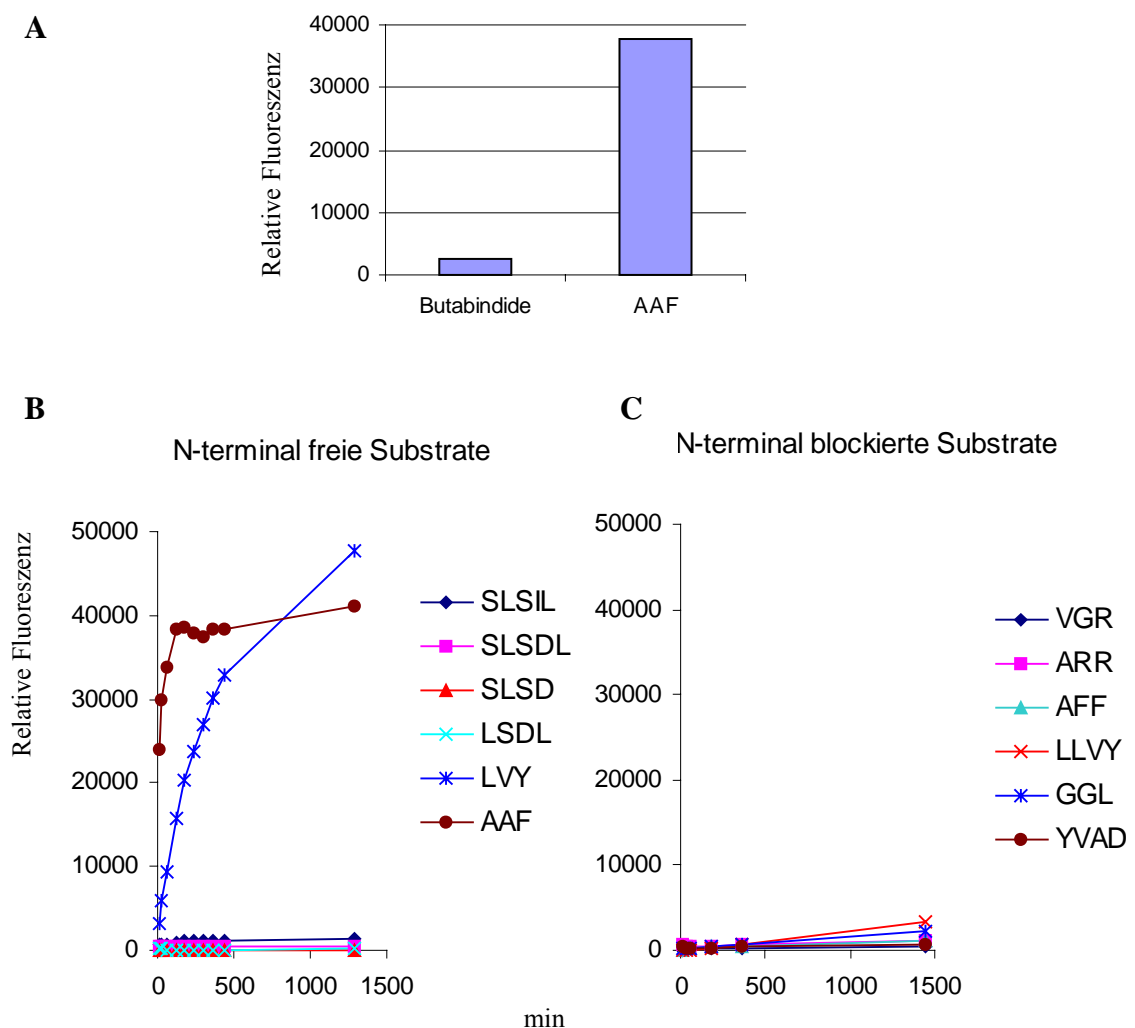
Das Inhibitorprofil von BH zeigt, dass AAF-CMK zwar BH inhibiert, E64 aber als



**Abbildung 3.15.** Kombinierte Proteolyse von SLSDL-AMC durch PSA und BH. **A** Umsatzkurven der einzelnen und kombinierten Proteasen **B** Berechnung der Umsatzgeschwindigkeit.

Cysteinproteaseninhibitor für die Cysteinprotease BH wesentlich effizienter ist (Abb.3.14.). Ebenso wie bei PSA ist anzunehmen, dass bei AAF-CMK eine nicht kovalente Inhibition vorliegt, da der Inhibitoreffekt über die Zeit abnimmt. E64 hemmt konstant über die Zeit und lässt somit eine kovalente Inhibition vermuten (Daten nicht gezeigt). Da AAF-AMC von BH auch schlechter umgesetzt wird als von PSA (siehe 3.2.1.) ist es nicht verwunderlich, dass AAF-CMK schlechter inhibiert, da es vermutlich schlechter in die katalytische Tasche passt als bei PSA.

Da beide Proteasen über mehrere Reinigungsschritte koeluierten, wurde untersucht, ob sie sich in ihrer Aktivität gegenseitig beeinflussen. Es zeigte sich jedoch, dass nur eine normale Addition beider Aktivitäten zu beobachten ist, wie es bei zwei unabhängig von einander reagierenden Enzymen zu erwarten ist. Beispielhaft ist in Abb. 3.15.A der Verdau von SLSDL-AMC gezeigt, das die natürlichen flankierenden Aminosäuren des VSV-NP 52-59 Epitops darstellt. Die Addition der Steigungen der Kurven im steady-state Zustand (gleichbedeutend mit der Reaktionsgeschwindigkeit) der einzelnen Enzyme ergeben exakt die Geschwindigkeit der kombinierten Enzyme (Abb. 3.15.B,  $171+122 = 293$  zu  $306$  relative Einheiten/min). Da im kombinierten Ansatz die gleichen Mengen der Enzyme wie im einzelnen Ansatz verwendet wurden, beeinflussen sich die



**Abbildung 3.16.** Charakterisierung der proteolytischen Aktivität von TPP-II. **A** Überprüfung der Reinheit der verwendeten TPP-II durch die Inhibition mit Butabindide **B** Umsatz von N-terminal freien fluogenen Substraten **C** Umsatz von N-terminal blockierten fluogenen Substraten.

beiden Trimpeptidasen offensichtlich nicht in ihrer proteolytischen Aktivität.

#### 3.4.6. Die proteolytische Aktivität anderer möglicher Trimpeptidasen

Neben den selbst identifizierten Trimpeptidasen wurden auch TPP-II und LAP, die ebenfalls als mögliche Trimpeptidasen gehandelt werden (Beninga et al., 1998; Geier et al., 1999), auf ihre proteolytische Aktivität hin untersucht.

Die proteolytische Reinheit von TPP-II (aufgereinigt von N.P. Emmerich aus unserer Arbeitsgruppe) wurde dadurch bestätigt, dass die Inkubation mit Butabindide eine Reduktion der Aktivität gegen AAF-AMC um 93 % ergab (Abb. 3.16.A). Im Unterschied zu PSA und BH ist TPP-II nur in der Lage drei Aminosäuren auf einmal mit einem freien N-Terminus zu verdauen (Abb. 3.16.B). Diese erhaltenen Daten entsprechen den bisher publizierten (Balow et al., 1986; Barrett et al., 1998). Auch bei Substraten mit einer oder zwei Aminosäuren schneidet TPP-II nicht (Daten nicht gezeigt). N-terminal blockierte Substrate werden von TPP-II schlechter umgesetzt als von BH (Abb. 3.16.C). Erst nach über 20 h ist eine Aktivität gegen LLVY und etwas gegen GGL erkennbar. Wie bei BH kann man die Bedeutung dieser Aktivität *in vivo* jedoch nicht exakt einschätzen. Durch die so bestätigte Schnittspezifität von TPP-II wurde entschieden, auf den Verdau der Vorläuferpeptide 5v und 5v5 zu verzichten, da es äußerst unwahrscheinlich erscheint, dass sich das endgültige Epitop unter den entstehenden Fragmenten finden lässt.

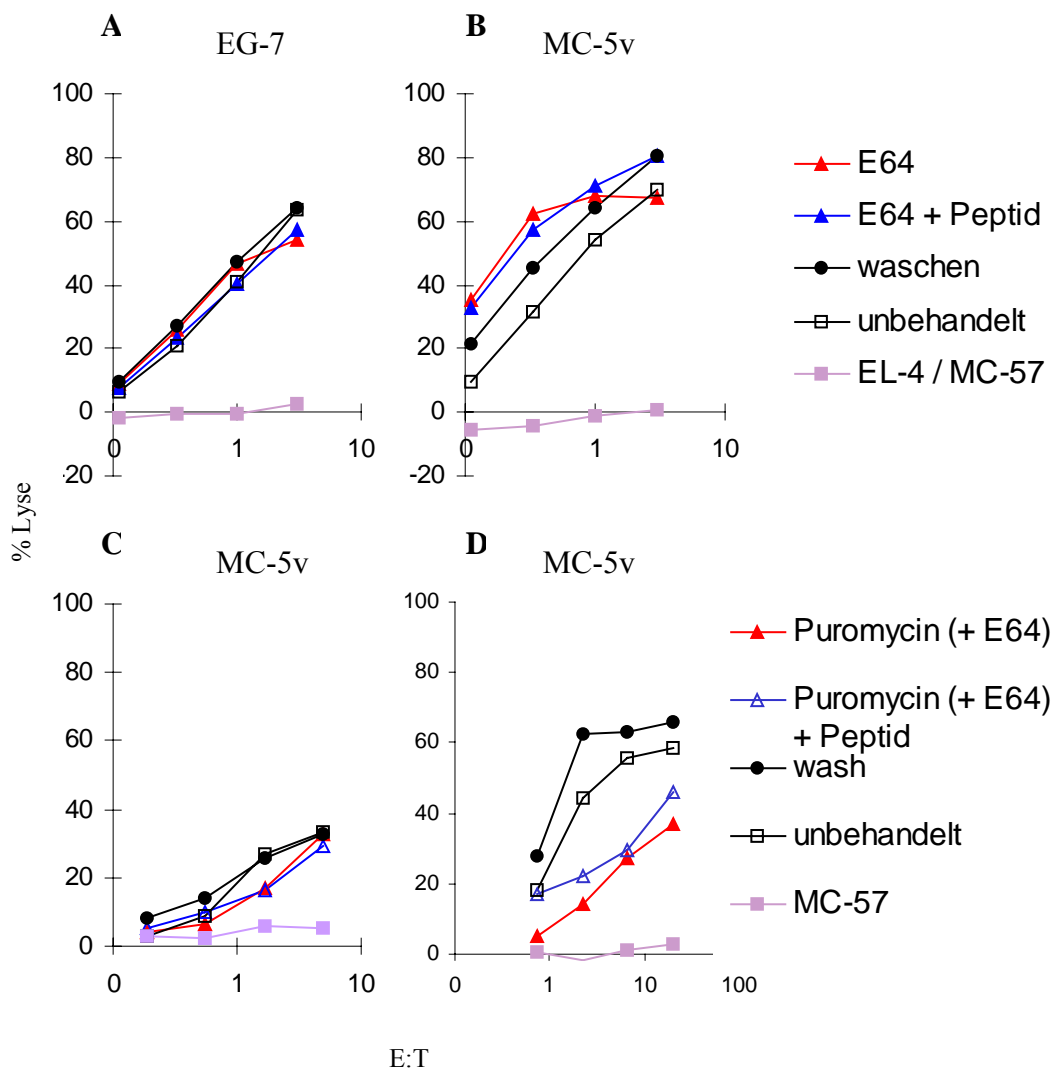
LAP, welches von Sigma bezogen wurde, wurde ebenfalls auf die Umsetzung der N-terminal blockierten und freien fluorogenen Substrate getestet. Dabei ähnelt das Verhalten von LAP am ehesten dem von PSA, da es nicht in der Lage ist N-terminal blockierte Substrate umzusetzen. Bei N-terminal freien Substraten ist keine Bevorzugung von bestimmten Aminosäuren als Substrate zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Allerdings war LAP nicht in der Lage, die vorhandenen Vorläuferpeptide 5v und 5v5 proteolytisch abzubauen.

### 3.5. Charakterisierung der identifizierten Trimpeptidasen *in vivo*

Nach der Identifikation von PSA und BH als Trimpeptidasen und ihrer Charakterisierung *in vitro* wurde unter Zuhilfenahme der bereits vorhandenen Informationen über die beiden Proteasen versucht, ihren jeweiligen Beitrag zur Antigenprozessierung *in vivo* zu bestimmen.

#### 3.5.1. Effekt von E64 und Puromycin auf die Antigenprozessierung

E64 hat als Inhibitor einen größeren Effekt auf BH als AAF-CMK (siehe 3.4.5.). Es stellt sich daher die Frage, ob E64 alleine einen Effekt auf die Antigenprozessierung hat. Daher wurden wie mit anderen Proteaseinhibitoren Experimente mit dem sauren



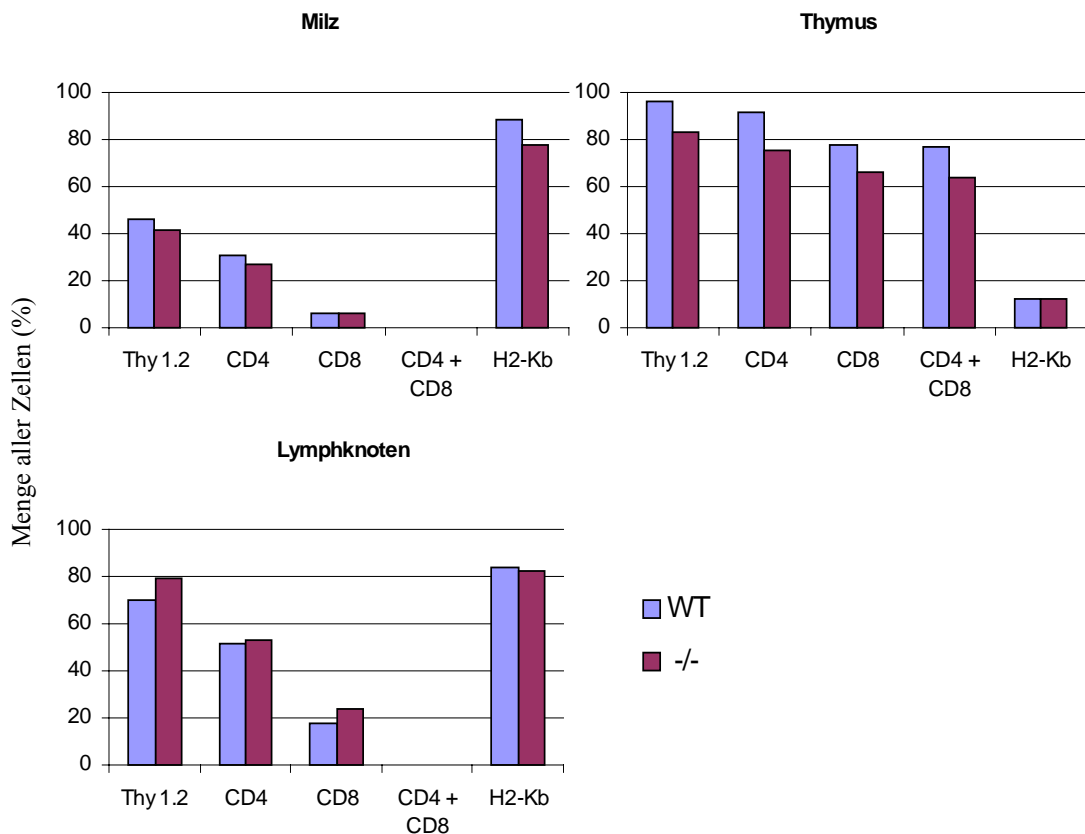
**Abbildung 3.17.** Effekt von E64 und Puromycin auf die Antigenpresentation von OVA 257-264 und VSV-NP 52-59. Saures Waschen von Zellen mit folgenden Zellen und Inhibitoren **A** EG-7 + 200  $\mu$ M E64 **B** MC-5v + 200  $\mu$ M E64 **C** MC-5v + 100  $\mu$ M Puromycin **D** MC-5v + 200  $\mu$ M E64 und 100  $\mu$ M Puromycin.



Waschen von Zellen und folgendem Cr-Freisetzungstest unternommen (für Einzelheiten siehe 3.1.). Es zeigt sich jedoch, dass E64 (in einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$ ) weder auf die Prozessierung des Ova 257-263 Epitops aus dem ganzen Proteinkontext noch auf die Prozessierung des VSV-NP 52-59 Epitops aus dem Minigen 5v heraus einen Einfluss hat (Abb. 3.17.A und B).

In gleicher Weise wurde der Einfluss von Puromycin auf die Antigenprozessierung untersucht. Puromycin ist bekanntlich in der Lage, die Translation in Zellen frühzeitig abubrechen. Es sind jedoch keine cytosolischen Proteasen außer PSA bekannt, die durch Puromycin gehemmt werden, wodurch dies der spezifischste bekannte Inhibitor für PSA ist. (Es werden zwar noch Dipeptidyl-peptidase-II und die bakterielle Pyroglutamyl-Peptidase durch Puromycin inhibiert, doch diese befinden sich nicht im Cytosol (Barrett et al., 1998)). Aber auch Puromycin alleine zeigt in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  keinen Effekt auf die Prozessierung des VSV-NP 52-59 Epitops aus dem Minigenprodukt 5v (Abb. 3.17.C).

Unter der Annahme, dass die Prozessierung des VSV-NP 52-59 Epitops nur inhibiert werden kann, wenn beide Proteasen gleichzeitig ausgeschaltet werden, was bei AAF-CMK der Fall ist, wurden die entsprechenden Zellen mit Puromycin (100  $\mu\text{M}$ ) plus E64 (200  $\mu\text{M}$ ) behandelt. In zwei unabhängigen Experimenten wurde eine Tendenz sichtbar, dass diese Kombination einen Einfluss auf die Prozessierung des VSV-NP 52-59 Epitops hat (Abb. 3.17.D). Da die Erkennung durch Peptidzugabe nach dem sauren Waschen in Anwesenheit der Inhibitoren die Erkennung durch CTLs nicht wieder herstellte, kann dieser Effekt jedoch nicht eindeutig auf die Inhibition proteolytischer



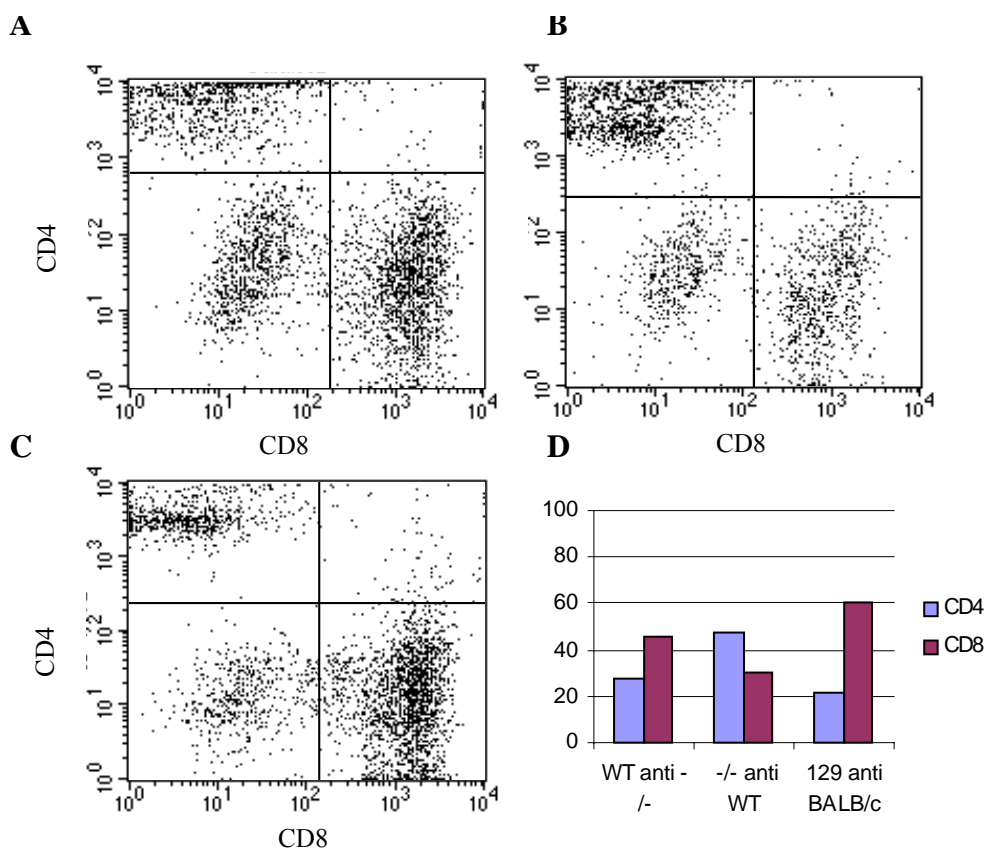
**Abbildung 3.18.** FACS Charakterisierung von BH WT und -/- Mäusen auf ihr T-Zell Repertoire.

Ereignisse zurück geführt werden. Es ist jedoch auszuschließen, dass die Inhibitoren einen Einfluss auf die Effektorfunktion der CTLs haben, da diese Peptid beladene Zellen in Anwesenheit der Inhibitoren normal lysieren (Daten nicht gezeigt). Unglücklicherweise konnten diese Experimente bis zum Ende dieser Arbeit nicht mehr verbessert werden, da experimentelle Probleme auftraten.

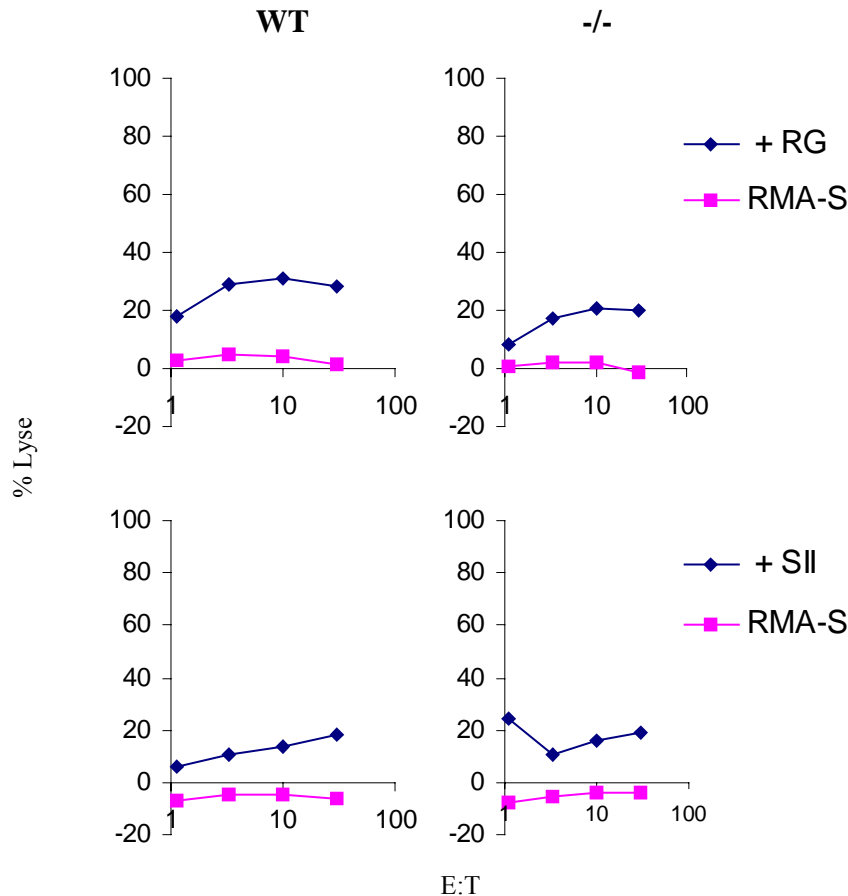
### 3.5.2. Charakterisierung von BH<sup>-/-</sup> und PSA<sup>-/-</sup> Mäusen

Mit Hilfe von Kooperationspartnern konnten die Knockout-Mäuse der beiden Trimpeptidasen erhalten werden. T. Takeuchi (Tokio, Japan) lieferte dabei die PSA<sup>-/-</sup> Mäuse (Osada et al., 1999) und J.L. Lazo (Pittsburgh, USA) die BH<sup>-/-</sup> Mäuse (Schwartz et al., 1999). Unglücklicherweise konnten die Nachkommen der PSA<sup>-/-</sup> Mäuse aus technischen Gründen bisher nicht genotypisiert werden, so dass eine Charakterisierung dieser Mäuse noch nicht möglich war.

Die erhaltenen BH<sup>-/-</sup> Mäuse wurden durch FACS-Analyse auf ihr T-Zellrepertoire hin untersucht, da durch unterschiedliche Peptidrepertoires, bedingt durch das Fehlen einer Trimpeptidase, Auswirkungen auf das T-Zellrepertoire möglich sind. Dabei unterschieden sich jedoch Wildtyp und Knockout-Mäuse in Milz, Thymus und Lymphknoten weder in Bezug auf CD4 noch CD8 positive oder doppelt positive T-



**Abbildung. 3.19.** T-Zellwachstum nach der zweiten Restimmung in Kulturen aus **A** BH<sup>-/-</sup> immunisiert mit WT **B** BH WT immunisiert mit -/- **C** Allokontrolle BH 129 ssev gegen BALB/c **D** Graphische Darstellung.



**Abbildung 3.20.** DNA-Immunisierung von BH  $-/-$  und WT Mäusen mit 5v5-0.  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstest nach der ersten Restimulation. Als Zielzellen wurden RMA-S beladen mit RGYVYQGL (RG) oder SIINFEKL (SII) verwendet.

Zellen (Abb. 3.18.). Die Gesamtmenge der T-Zellen ist dabei auch gleich, was durch den allgemeinen T-Zellmarker Thy1.2 untersucht wurde (Abb. 3.18.) Bedingt durch das Fehlen einer Trimpeptidase könnte es auch zu einer geringeren MHC-Klasse-I Expression kommen, da weniger MHC-Liganden generiert werden. Es sind jedoch in keinem der betrachteten Organe Unterschiede in Bezug auf MHC-Klasse-I Expression zu erkennen, was beispielhaft am H2-K<sup>b</sup> Molekül geprüft wurde (Abb. 3.18).

Durch das Fehlen einer Trimpeptidase könnte es dazu kommen, dass WT und  $-/-$  Mäuse unterschiedliche Peptidrepertoires generieren und es somit möglich ist, durch Immunisierung eine T-Zellantwort von WT Mäusen gegen  $-/-$  Zellen, bzw. umgekehrt zu erzeugen. Diese Experimente wurden durchgeführt. Auf Grund hoher Spontanfreisetzung im Cr-Freisetzungstest von den als Zielzellen verwendeten ConA-Blasten sind diese Versuche bisher jedoch nicht eindeutig aussagekräftig. In den verwendeten Zellkulturen wurde jedoch ein vermehrtes Wachstum von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach der zweiten Restimulation durch FACS-Analyse festgestellt (Abb. 3.19.). Da WT sowie  $-/-$  Mäuse normalerweise nur etwa 10 % an CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz besitzen (Abb. 3.18.), deutet dies daraufhin, dass ein unterschiedliches Peptidrepertoire vorliegt. Da erst durch den Cr-Freisetzungstest ausgeschlossen werden kann, dass es sich nicht um unspezifische Vermehrung von CD8 Zellen handelt, die z.B. gegen Komponenten

---

des FCS gerichtet sind, bleibt die Frage nach dem unterschiedlichen Peptidrepertoire und der Beitrag von BH zu diesem Repertoire noch unbeantwortet.

Um zu überprüfen, ob BH<sup>-/-</sup> Mäuse in der Lage sind das VSV-NP Epitope 52-59 aus dem Minigenkonstrukt 5v5 zu generieren, wurden diese Mäuse mit dem Plasmid 5v5-SII immunisiert. Diese DNA-Immunsierung ergab in WT wie <sup>-/-</sup> Mäusen eine CTL Antwort gegen das VSV-NP Epitope 52-59, sowie auch gegen das OVA 257-263 Epitop (Abb. 3.20.). Die CTL-Antwort im Cr-Freisetzungstest wurde jedoch erst nach einer Restimulation beobachtet, was an den Kulturbedingungen liegen könnte oder an einer generell schwächeren Antwort in diesen Mäusen als in den in der Diplomarbeit verwendeten C57BL/6. Gerade bei dem als positiv Kontrolle vom Plasmid kodierten SIINFEKL wäre eine stärkere CTL-Antwort zu erwarten. Es sieht jedoch so aus, dass der Mangel an BH alleine nicht ausreichend ist, um die Prozessierung des VSV-NP 52-59 Epitops zu verhindern.

### 3.6. Suche nach cytosolischen Vorläuferpeptiden von MHC-Liganden

Aufbauend auf den in 3.1.1. erhaltenen Daten wurde der Versuch unternommen cytosolische Vorläuferpeptide von MHC-Liganden direkt durch MS-Analyse zu identifizieren. Dabei wird die Annahme zugrunde gelegt, dass das Proteasom den korrekten C-Terminus des VSV-NP 52-59 Epitops generiert. In diesem Fall sollten sich die Vielfalt der möglichen Vorläuferpeptide in den Minigentransfektanten MC-5v5 auf sechs mögliche Peptide beschränken (die Peptide 5v, 4v, 3v, 2v, 1v und v).

Wenn cytosolische Extrakte hergestellt werden und TFA gefällt sind, sollten sich alle Peptide im Überstand befinden. Der Überstand wird dann auf ein Tandem-MS aufgetragen, das vorher mit den synthetischen Peptiden 5v bis v geeicht wurde, so dass Elutionszeit und Masse der gesuchten Peptide vorher bekannt sind. Die zugrunde liegende Methode wurde dafür von Markus Schirle für die Tumorummunologie entwickelt (Schirle et al., 2000).

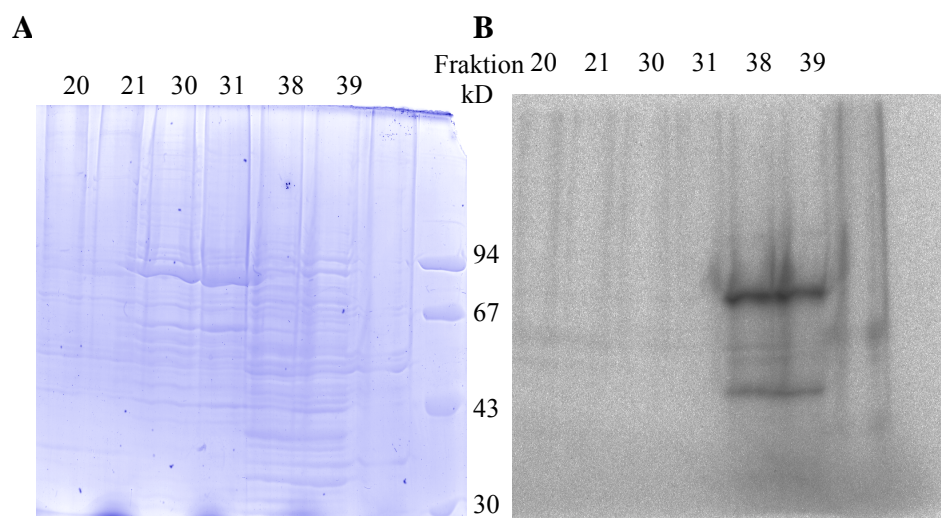
Im Experiment wurde Cytosol von 40 ml Zellpellet (20ml frisch mit 2 mM EDTA geerntet, 20 ml eine Woche bei -80°C gelagert) MC-5v5 Zellen verwendet. Von diesem Pellet wurde Cytosol, wie unter 2.2.4.1.1. und 2.2.4.1.2. beschrieben, gewonnen. Es wurde der Versuch unternommen, dieses Cytosol direkt mit TFA zu fällen. Bei der Einengung dieses Ansatzes in der Speedvac kam es durch ausfallendes Material zu enormen Verlusten und um den resultierenden Überstand auf das MS laden zu können, musste immer noch filtriert werden, dies bedingte weitere Verluste. Es ist somit nicht verwunderlich, dass im MS keine Peptide identifiziert werden konnten.

Zur Verbesserung der Methode wurde das gewonnene Cytosol in einem weiteren Versuch über eine S300 Gelfiltrationssäule (Pharmacia Biotech), wie unter 2.2.4.5.3. beschrieben, aufgetrennt. Die Bindung von Peptiden an Chaperone sollte dadurch nicht beeinflusst werden (Paz et al., 1999), wobei bei anderen Chromatographiemethoden die Bindung der Peptide verloren zu gehen scheint (N. Brouwenstijn, persönliche Mitteilung). Die so erhaltenen Fraktionen wurden in der Speedvac eingengt, konnten darauf aber auf Grund des enthaltenen Glycerols nicht direkt auf das MS aufgetragen werden. Daher wurden die Proben, wie unter 2.2.4.2.7 beschrieben, entsalzt. Ob in diesen Proben noch Peptide zu finden sind, wird im Moment noch analysiert.

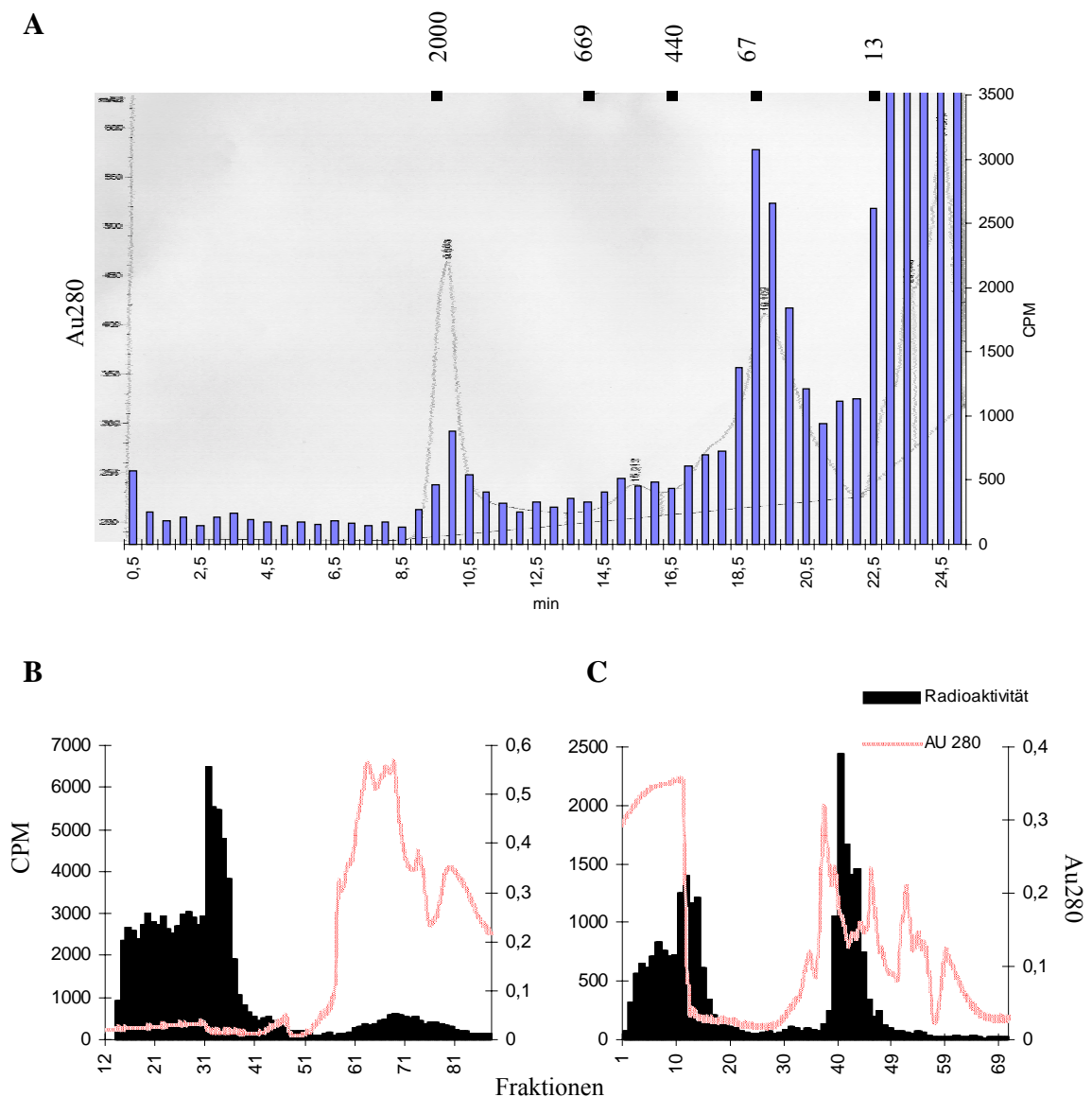
### 3.7. Suche nach cytosolischen Peptid-Chaperonen

Da wie in 3.4.4. und 3.4.5. beschrieben die identifizierten Trimpeptidasen bei dem Verdau von Vorläuferpeptiden das Epitop selbst nicht vor dem Verdau verschonen, ist die Postulierung eines Peptid-Chaperones der logische Schluss. Um nach solchen Chaperonen zu suchen, wurde Cytosol von  $5 \times 10^8$  MC-5v5 Zellen, wie unter 2.2.4.1.1. und 2.2.4.1.2 beschrieben, aufgereinigt. Zu der erhaltenen Lösung mit etwa 1 ml Volumen wurden 2  $\mu\text{g}$  (mit 22  $\mu\text{Ci}$  in 100  $\mu\text{l}$  PBS) des  $^{125}\text{I}$ -markierten und mit einem UV-Crosslinker versehenen Peptides T(Tpa)DNKTRAY zugegeben und bei 37°C für 10 min inkubiert. Durch 5 min Bestrahlung mit UV-Licht wurde das Peptid zu den potentiellen Bindungspartnern vernetzt (Brunner, 1996) und die Lösung dann mit einer Silica Gelfiltration auf einer HPLC aufgetrennt. Die so erhaltenen Fraktionen wurden entweder direkt auf einem SDS-PAGE Gel analysiert oder weiter mit einer MonoQ-Anionenaustauscher-Säule aufgereinigt.

Der Hauptteil der  $^{125}\text{I}$ -Aktivität eluiert mit den Hauptpeaks der Proteinmenge (Abb. 3.22.A), abgesehen vom ungebundenen Peptid, das am Ende ab einer Elutionszeit von 23 min erscheint. Da in den Fraktionen des größeren Molekulargewichts (Fraktionen 20-21, 10-10.5 min) im SDS-Gel nach Analyse auf einem Phosphorimager (BAS-1500, FujiFilm) keine spezifischen Aktivitätsbanden zu erkennen sind (Abb. 3.21.B), liegt die Vermutung nahe, das es sich hierbei um Proteinaggregate handelt, die das markierte Peptid unspezifisch binden. Auch bei den Fraktionen um 600 kD sind keine radioaktiv markierten Proteinbanden im SDS-Gel nachzuweisen (Abb. 3.21.B). Erst bei den Fraktionen 38 und 39 (19-19.5 min) erscheinen vier Banden im Gel (Abb. 3.21.B). Eine Zuordnung zu definierten Proteinbanden ist leider nicht möglich, da sich noch zu viele Proteine in diesen Fraktionen befinden (Abb. 3.21.A). Die Größe der Hauptbande bei etwa 70 kD lässt jedoch Hsc70 als Kandidaten erscheinen. Für die anderen Banden bei etwa 55, 52 und 48 kD liegt keine Vermutung nahe, um welche Proteine es sich handeln könnte.

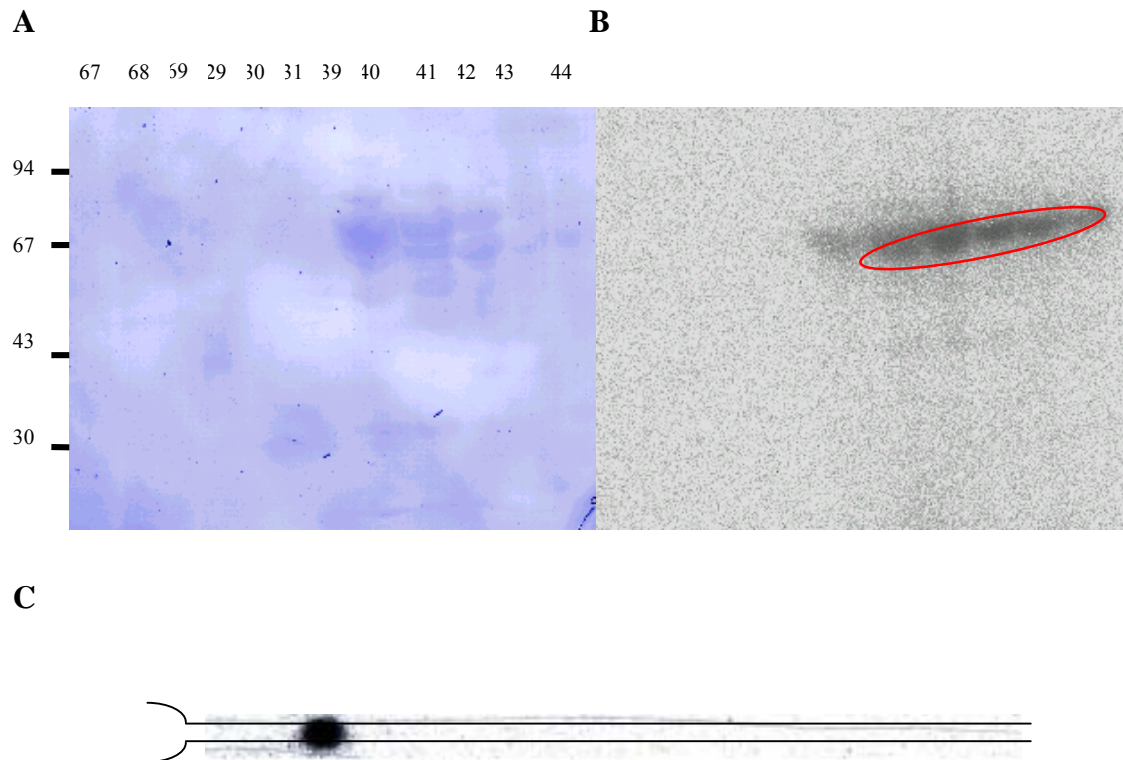


**Abb. 3.21.** 8 % SDS-Page der HPLC-Gelfiltration von Cytosol mit T(Tpa)DNKTRAY. **A** Coomassie Färbung **B** Radioaktivität.



**Abbildung 3.22.** Auftrennung von cytosolischen Peptid-Chaperonen mit kreuzvernetztem T(Tpa)DNKTRAY. **A** Elutionsprofil nach Gelfiltration mit Proteinabsorption bei 280 nm und Radiaktivität **B** Fraktionen 20-21 (10-10.5 min) nach MonoQ-Anionenaustauscher, bzw. **C** Fraktionen 38-39 (19-19.5 min).

Um der Identifizierung der peptidbindenden Proteine nachzugehen, wurde von den sehr hoch molekularen Fraktionen bei etwa 2000 kD und den nieder molekularen Fraktionen bei 70 kD je eine MonoQ-Anionenaustauschersäule gefahren. Bei beiden Säulenläufen eluierte ein großer Teil der Aktivität gleich zu Beginn (Abb. 3.22.B und C). Dies lässt darauf schließen, dass entweder noch eine große Menge unspezifisch und nicht kovalent gebundenes Peptid in diesen Fraktionen enthalten war oder dass die Kreuzvernetzung des Peptides nicht permanent ist. Andererseits könnten auch einige der peptidbindenden Chaperone degradiert sein und somit ein anderes Elutionsverhalten zeigen als die nativen Proteine. In beiden Fällen sind jedoch auch Aktivitätspeaks korrelierend zu Proteinpeaks zu sehen.



**Abbildung 3.23.** Auftrennung von Peptid-Chaperonen. **A** Relevante Fraktionen aus der Gelfiltration auf einem 8 % SDS PAGE **B** Die entsprechende Radioaktivitätsverteilung, die in C aufgetragenen Banden sind rot markiert **C** Aufkonzentrationsgel mit Radioaktivitätsverteilung. Die verwendete Pasteurpipette ist schwarz eingezeichnet.

Zur weiteren Analyse wurden die Aktivitätspeaks der MonoQ-Fraktionen 67-68 aus dem hochmolekularen Lauf und die Fraktionen 30-31 und 39-44 aus dem MonoQ-Lauf der 70 kD-Probe auf ein 8 % SDS-Gel geladen (Abb. 3.23.). Dabei ist zu erkennen, dass sich in den Fraktionen 39-44 das gleiche Muster für die Peptidbindung an Proteine ergibt, wie in Abb. 3.22.B, da vier Banden in Fraktion 40 als  $^{125}\text{I}$ -markiert betrachtet werden können (Abb. 3.23.B). In den anderen Fraktionen sind keine  $^{125}\text{I}$ -markierten Proteinbanden zu erkennen, was wieder den Schluss einer unspezifischen oder unstablen Bindung des Peptids zulässt.

Von diesen vier markierten Proteinbanden wurden die dominanten Banden bei 70 kD ausgeschnitten und auf einem Konzentrationsgel in einer Pasteurpipette laufen gelassen (Gevaert et al., 1996). Da sicher nur eine kleine Proteinmenge vorliegt, sollte so das Verhältnis von Proteinmenge zu Gelvolumen minimiert und eine bessere Ausbeute an Fragmentpeptiden im folgenden Trypsinverdau erreicht werden. Die Aufkonzentration konnte nachgewiesen werden (Abb. 3.23.C) und ein Trypsinverdau folgte. Leider konnten jedoch keine Peptide im MALDI oder Tandem-MS nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass nicht genug Proteinmenge vorlag.



## 4. Diskussion

In dieser Promotionsarbeit wurde untersucht, in welchem Ausmaß das Proteasom und andere Proteasen an der Generierung des VSV-NP 52-59 CTL Epitops beteiligt sind und ob mögliche Peptidvorläufer sowie das Epitop schützende Peptid-Chaperone existieren.

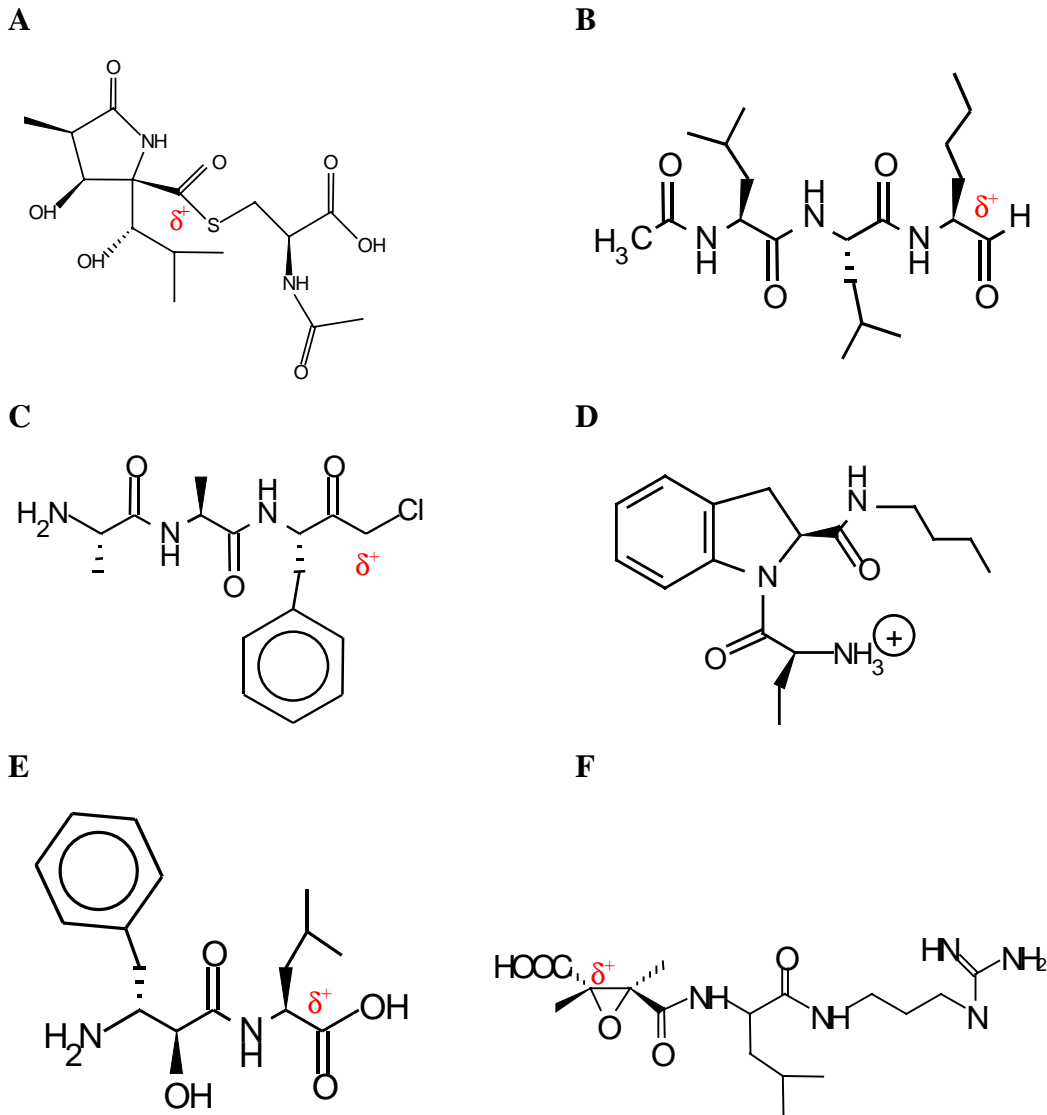
### 4.1. Problematik bei der Verwendung von Proteaseinhibitoren

Neben der genetischen Elimination eines zu untersuchenden Proteins ist das gezielte Ausschalten des Proteins durch spezifische Inhibitoren die beste Möglichkeit, um Informationen über Wirkungsweise oder Funktion zu erhalten. Dabei sind jedoch bei der Verwendung von Inhibitoren, nicht nur von Proteaseinhibitoren, deren Spezifität und die eingesetzte Konzentration zu berücksichtigen. Ist ein Inhibitor nicht spezifisch genug, so wird der beobachtete Effekt mit einer falschen Aussage interpretiert. Wird keine Beeinflussung des untersuchten Systems beobachtet bleibt die Frage offen, ob der Inhibitor in ausreichender Konzentration verwendet wurde, bevor eine korrekte Aussage gemacht werden kann. Verwendet man Inhibitoren, die nur eine Gruppe von Aktivitäten inhibieren (z.B. Proteolyse), so muss zusätzlich gewährleistet sein, dass keine anderen Proteolyse unabhängigen Aktivitäten beeinflusst werden.

Im Allgemeinen entspricht die Spezifität eines Inhibitors immer nur dem aktuellen Wissensstand. Für einen Inhibitor der heute als 100 % spezifisch gilt, kann morgen schon gezeigt werden, dass er verschiedene andere Prozesse ebenfalls beeinflusst. Eine Vernachlässigung von zusätzlichen Effekten eines Inhibitors ist nur in dem Ausnahmefall zulässig, wenn der untersuchte Effekt so dominant inhibiert wird, dass die Nebeneffekte des Inhibitors keine Rolle für das Versuchsergebnis spielen. Um jedoch so korrekte Aussagen wie möglich zu machen, sollte auch dieses durch die Verwendung des zum aktuellen Zeitpunkt spezifischsten vorhandenen Inhibitors vermieden werden.

#### 4.1.1. Spezifität der verwendeten Proteaseinhibitoren

Lactacystin (Abb. 4.1.A), welches aus *Actinomycetes* isoliert wurde (Omura et al., 1991), ist zum heutigen Zeitpunkt der spezifischste Proteasominhibitor (Fenteany et al., 1995). Die proteolytische Aktivität der Endopeptidasen Trypsin, Chymotrypsin, Papain, Calpain I und II, Cathepsin B, Thrombin und Plasminogenaktivator werden nicht durch Lactacystin beeinflusst (Fenteany et al., 1995; Omura et al., 1991) und es hat keinen Effekt auf lysosomalen Proteinabbau (Craiu et al., 1997b). Allerdings wird Cathepsin A (Ostrowska et al., 1997) und ebenso TPP-II (Geier et al., 1999) durch hohe Lactacystinkonzentrationen inhibiert. Neben TPP-II werden auch andere, bisher nicht näher charakterisierte Aminopeptidasen durch Lactacystin inhibiert (Abb. 3.8.C). Die tryptische und chymotryptische Aktivitäten des Proteasoms werden kovalent inhibiert und die PGPH-Aktivität kompetitiv. Allerdings wird durch geringe Hydrolyse auch die Aktivität der kovalent modifizierten Untereinheiten wiederhergestellt (Bogyo et al., 1997). Es wurde auch diskutiert, dass Lactacystin nicht alle Aktivitäten im Proteasom ausschaltet, sondern diese verändert (Valmori et al., 1999). Diese These bedarf jedoch eingehendere Experimente. Unter Berücksichtigung der zur Zeit vorhandenen Daten ist



**Abbildung 4.1.** Verwendete Inhibitoren. Die elektrophilen C-Atome welche kovalent mit den reaktiven Zentren der Proteasen reagieren können, sind rot markiert. **A** Lactacystin, nur das  $\beta$ -Lacton ist aktiv **B** LLnL **C** AAF-CMK **D** Butabindide **E** Bestatin **F** E64, zellgängig als Ester (E64d).

es zulässig anzunehmen, dass Lactacystin der spezifischste bekannte Inhibitor für das Proteasom ist, da andere eventuell spezifischere Inhibitoren, wie z.B. Epoxomicin (Meng et al., 1999) (ebenfalls aus *Actinomycetes* (Hanada et al., 1992)) oder durch Modellierung hergestellte bivalente Inhibitoren (Loidl et al., 1999b; Loidl et al., 1999a), weniger gut alle drei Aktivitäten des Proteasoms ausschalten.

LLnL (Abb. 4.1.B) wird ebenfalls sehr häufig als Proteasominhibitor eingesetzt. Die Inhibition des Proteasoms ist dabei eben so gut wie durch Lactacystin (Rock et al., 1994). Jedoch ist LLnL wesentlich unspezifischer, da Cathepsine und Calpaine (Rock et al., 1994; Sasaki et al., 1990) und somit auch lysosomaler Proteinabbau (Craiu et al., 1997b) inhibiert wird. Des Weiteren werden auch bisher nicht bekannte ER-Proteasen (Hughes et al., 1996) inhibiert. LLnL als Proteasom spezifischen Inhibitor einzusetzen, ist somit sicher nicht zulässig, was auch dadurch unterstrichen wird, dass LLnL einen wesentlich größeren Effekt auf die Antigenpräsentation hat als Lactacystin (Abb. 3.2.).

Im Gegensatz zum Proteasom wird jedoch TPP-II nicht durch LLnL inhibiert (Geier et al., 1999).

AAF-CMK (Abb. 4.1.C) ist ein sehr unspezifischer Inhibitor für Proteasen. Das Proteasom wird in keiner seiner Aktivitäten durch AAF-CMK gehemmt (Abb. 3.4. und (Geier et al., 1999; Emmerich et al., 2000)). TPP-II wird dagegen sehr effizient durch AAF-CMK inhibiert (Geier et al., 1999), ebenso wie andere nicht charakterisierte Proteasen (Abb. 3.8.C). Somit kann AAF-CMK sicher nicht als TPP-II spezifisch angesehen werden, wie fälschlicherweise getan wurde (Hilbi et al., 2000).

Butabindide (Abb. 4.1.D) ist der spezifischste bekannte Inhibitor für TPP-II. Da er durch Modelling synthetisiert wurde (Rose et al., 1996), ist er sehr effizient in der Inhibition von TPP-II (Rose et al., 1996; Renn et al., 1998). Es sind bisher keine weiteren Proteasen bekannt, die durch Butabindide gehemmt werden.

Bestatin (Abb. 4.1.E) gilt als unspezifischer Aminopeptidaseninhibitor (Barrett et al., 1998). Er scheint sehr viele Proteasen zu inhibieren und eine immunstimulierende Wirkung zu haben, deren Ursache nicht bekannt ist (Leyhausen et al., 1983). Besonderes Interesse galt bisher der Wechselwirkung von LAP mit Bestatin, so dass die Kristallstruktur von LAP mit gebundenem Bestatin sehr früh publiziert wurde (Burley et al., 1990).

E64 ist ein für Cysteinproteasen spezifischer Inhibitor. Innerhalb der Cysteinproteasen besteht jedoch kaum Selektivität (Otto and Schirmeister, 1997).

#### **4.2. Trimpeptidasen im Antigenprozessierungsweg für MHC-Klasse-I**

Das Proteasom ist die Protease mit dem größten Beitrag zur Generierung von MHC-Klasse-I-Liganden (Cerundolo et al., 1997), es ist jedoch nicht an der Entfernung der flankierenden N-terminalen Aminosäuren des VSV-NP 52-59 Epitops beteiligt (Stoltze, 1998). Lactacystin der bisher spezifischste bekannte Inhibitor für das Proteasom (Fenteany et al., 1995; Craiu et al., 1997b), inhibiert jedoch die Herstellung des Epitops sobald dieses um C-terminale Aminosäuren verlängert ist (Abb. 3.1.A und (Craiu et al., 1997a)). Dabei wird durch die Zugabe von externem Peptid und die darauf erfolgende Erkennung durch die spezifischen CTL (Abb. 3.1.), sowie durch die Präsentation des Minigenproduktes in den MC-v Zellen (Stoltze, 1998) sichergestellt, dass Lactacystin keinen Proteasen unspezifischen Effekt auf die Antigenprozessierung hat. Ebenso bewirkt die eingesetzte Konzentration von 10  $\mu$ M nur eine Inhibition von TPP-II um 50 % (Geier et al., 1999). Dies ist nicht ausreichend, um den Effekt in Abb. 3.1.A zu erklären. Insbesondere, da die Endopeptidaseaktivität von TPP-II extrem gering ist (Abb. 3.16.C).

Dieser Effekt von Lactacystin beschränkt sich nicht nur auf Minigene und auch nicht nur auf das VSV-NP 52-57 Epitop, da auch die Prozessierung des H2-K<sup>b</sup> restringierten Ovalbumin Epitops 257-264 in EG-7 Zellen (Abb. 3.1.B) und des H2-L<sup>d</sup> restringierten  $\beta$ -Gal Epitops 876-884 in P13.1 Zellen inhibiert wird (Stoltze, 1998). In Einbeziehung dessen, dass das 20S Proteasom *in vitro* den korrekten C-Terminus des VSV-NP 52-59 Epitops generiert und den bestätigenden Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen für das Ovalbumin 257-264, das Influenza Nukleoprotein 366-374 und Sendai Virus Nukleoprotein 324-332 Epitop (Dick T, 1997; Craiu et al., 1997a; Serwold and Shastri,

1999; Mo et al., 1999) liegt die Schlussfolgerung nahe, dass das Proteasom in häufigen Fällen den korrekten C-Terminus von MHC-Liganden generiert. In manchen Fällen besteht zwar die Möglichkeit, dass das Proteasom neben dem exakten C-Terminus auch den korrekten N-Terminus eines Eitops generiert (Dick T, 1997; Lucchiari-Hartz et al., 2000). Dies scheint jedoch eher die Ausnahme als die Regel zu sein.

AAF-CMK inhibiert nun Proteasen, die in der Lage sind N-terminale Prozessierung durchzuführen. Dass dieser Effekt spezifisch für Trimpeptidasen ist, zeigt sich durch die Inhibition der Prozessierung in MC-5v Zellen, wogegen in MC-v sowie MC-v5 kein Effekt zu beobachten ist (Abb. 3.5.B). C-terminales Trimming wird somit nicht durch AAF-CMK inhibiert.

Die Wirkung von AAF-CMK beschränkt sich dabei nicht nur auf Minigentransfektanten, die für das N-terminal verlängerte VSV-NP 52-59 Epitop kodieren (Abb. 3.5.B), sondern inhibiert auch die Prozessierung des VSV-NP 52-59 Epitops in VSV infizierten Zellen (Abb. 3.5.A). Dabei zeigt die Präsentation in MC-v Zellen sowie die Erkennung durch CTL nach Zugabe des relevanten Peptides wieder, dass kein generelles Problem in der Antigenpräsentation durch AAF-CMK verursacht wird (Abb. 3.5.B). Ebenso wie bei Lactacystin ist dieser Effekt nicht nur auf das VSV Epitope beschränkt, auch die Prozessierung des Ovalbumin Epitops 257-264 in EG-7 Zellen (Abb. 3.5.A) wird gehemmt. In gleicher Weise wird die Prozessierung des H2-K<sup>b</sup> restringierten Hepatitis B core Antigen 93-100 Epitops, welches durch Minigenkonstrukte von rekombinanten Vaccinia Viren in Zellen exprimiert wurde, durch AAF-CMK in der Prozessierung inhibiert (Matthias Hoffmann unveröffentlichte Daten). Dies schließt aus, dass AAF-CMK einen Effekt auf die Virusinfektion durch VSV hat.

Da AAF-CMK keine Auswirkungen auf die Aktivität des Proteasoms erkennen lässt (Abb. 3.4. und (Emmerich et al., 2000; Geier et al., 1999)), ergibt sich somit, dass die neben dem Proteasom an der Antigenprozessierung beteiligten Proteasen den in 3.2.1. aufgestellten Kriterien genügen müssen. Dies heißt, dass sie natürlich flankierende Aminosäuren von Vorläuferpeptiden für MHC-Klasse-I-Liganden entfernen können, dass sie nicht durch Lactacystin inhibiert werden und dass AAF-CMK einen Effekt auf ihre proteolytische Aktivität hat. Da, wie weiter unten diskutiert wird, nicht eindeutig ist, ob nur Aminopeptidasen oder auch Endopeptidasen an diesen proteolytischen Vorgängen, unabhängig vom Proteasom, beteiligt sind, wurde mit dieser Arbeit und (Stoltze et al., 2000) der Begriff „Trimpeptidase“ eingeführt. Dies soll allgemein für Proteasen gelten, die MHC-Klasse-I-Liganden aus Vorläuferpeptiden, jedoch nicht aus ganzen Proteinen generieren können. In der Regel (die Prozessierung von Signalpeptiden ausgenommen) werden diese Proteasen nach dem Proteasom arbeiten, aus dem einfachen Grunde, da sie selbst keine ganzen Proteine abbauen können.

Die in dieser Arbeit identifizierten Trimpeptidasen PSA und BH erfüllen die gesetzten Kriterien in Bezug auf das VSV-NP 52-59 Epitop. Besonders die Tatsache, dass beide Trimpeptidasen in der Lage sind die entsprechenden synthetischen Vorläuferpeptide für VSV-NP 52-59 *in vitro* zu verdauen (Tab. 3.2. und 3.3.), sprechen für ihre Fähigkeit an der Prozessierung teilzuhaben. Neben dieser Qualifikation als Trimpeptidase sprechen jedoch auch noch andere Gründe dafür, dass diese beiden Proteasen in der Antigenprozessierung eine Rolle spielen.

#### 4.2.1. PSA als Trimpeptidase

PSA ist seit etwa 20 Jahren bekannt (Hersh, 1981), doch weder eine physiologische Funktion noch entsprechende Substrate konnten ihr bisher zugeordnet werden. Der Name PSA leitet sich aus der Inhibition durch Puromycin her, welche für eine Protease sehr ungewöhnlich ist. Nur zwei weitere bekannte Proteasen sind durch Puromycin inhibierbar, die lysosomale Dipeptidyl-peptidase-II (DPP-II) (McDonald et al., 1968; Barrett et al., 1998) und die bakterielle Pyroglutamyl-Peptidase (Mantle et al., 1990; Barrett et al., 1998).

Das Vorkommen von PSA ist in vielen Geweben belegt (McLellan et al., 1988), sie existiert in fast allen Spezies (de Souza et al., 1991) und ihr Gen zeigt *housekeeping* Struktur (Thompson et al., 1999), was bedeutet, dass sie in jeder Zelle permanent vorkommt. Auch dies ist sicherlich eine Eigenschaft, die von einer Trimpeptidase erwartet würde, da der MHC-Klasse-I-Prozessierungsweg in fast allen Zellen vorkommt. Dementsprechend konnte PSA nicht nur aus COX Zellen gereinigt werden,

```

MWLAAAVPSLARLLLLLGGPPPPLLLLLSRSSRRRRRLHSLGLAAMPEKR
PFERLPAEVSPINYSLCLKPDLLDFTFEGKLEAAAQVRQATNQIVMNCAD
IDIITASYAPEGDEEIHATGFNYQNEDEKVTLSFPSTLQTGTGLKIDFV
GELNDKMKGFYRSRYTTPAGEVRYAAV TQFEATDPRRAFPCWDEPAIKAT
FDISLVVPKDRVALSNM NVIDRKPYPDENLVEVKFARTPVMSTYLVAFV
VGEYDFVETRSGDGVCRVYTPVGKAEQGF FALEVAAKTLPFYKDYFNVP
YPLPKIDLIAIADFAAGAMENWGLVTYRETALLIDPKNSCSSSRQWVALV
VGHSLAHQWFGNLVTMEWWTLLWLNFGFASWIEYLCVDHCFPEYDIWTQF
VSADYTRAQELDALDNSHPIEVSVGHPSEVDEIFDAISYSKGGASVIRMLH
DYIGDKDFKKGMNMYLTKFQOKNAATEDLWESLESASGKPIAAVMNTWTK
QMGFPLIYV EAEQVEDDRVLKLSQKKFCASGPYGGEDCPQWMVPITISTS
EDPNQAKLKILMDKPEMSVVLKNVCPDQWVKNLGTGFGFYRTQYSSAMLE
SLLPGIRDLSLPPVDRLGLQNDLFLSLARAGIISTVEVLKVMEAFVNEPNY
TVWSDLSCNLGILSTLLSHTDFYEEIQEFVKD VFSPIGERLWDPKPGEG
HLDALLRGLVLGKLGKAGHKATLEEARRRFKEHVEGKQILSADLRSPVYL
TVLKHGDGA TLDIMLKLHKQADMQEEKNRIERVLGATLSPELIQKVLTF
LSEEVRPQDTVSV IGGVAGGSKHGRKAAWKFIKDNWEELHNRYQGGFLIS
RLIKLSVEGFAVDKMAGEVKAFFESHAPSARTIQCCENILLNAAWLK
RDADSIHQYLLQRKTSPPSV

```






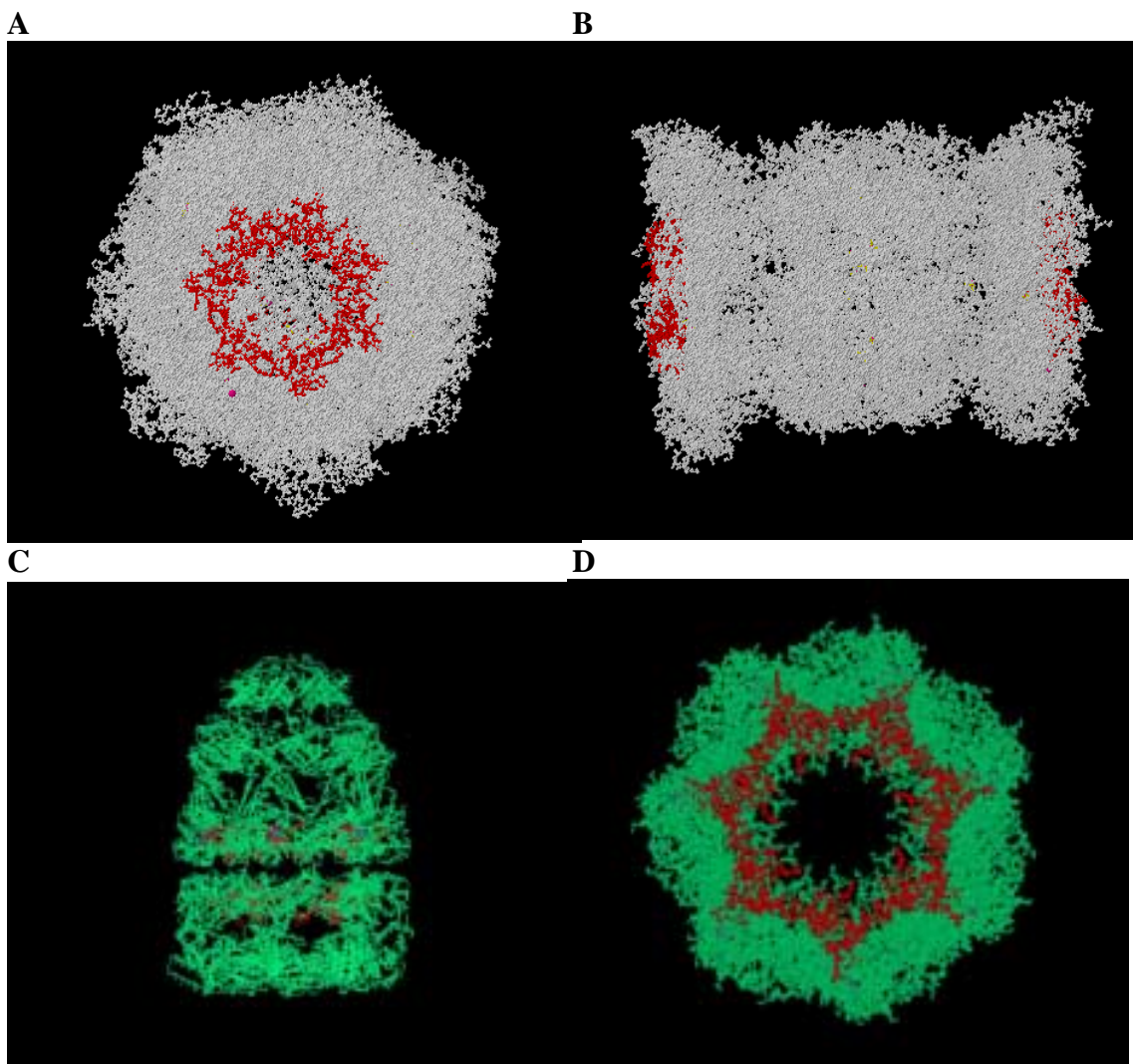
	Zinkfingermotiv HEXXH(X) <sub>n</sub> E
	72 % Ähnlichkeit zum n-terminalen Motiv der α-Proteasom Untereinheiten
	40 % Ähnlichkeit zum n-terminalen Motiv der α-Proteasom Untereinheiten
	58 % und 43 % Identität zu Tricon interagierender Faktor 2 und 3
	28 % Ähnlichkeit zu einem GroEL-Motiv

Abbildung 4.2. Motivvergleiche in der Aminosäuresequenz von PSA.

sondern auch aus EL-4 Zellen und mithilfe von RT-PCR und Western Blot in MC-57 Zellen nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten).

Da PSA konstitutiv in Zellen exprimiert wird, ist es nicht verwunderlich, dass sie in MC-57 Zellen nicht durch IFN- $\gamma$  induziert werden kann, was durch RT-PCR getestet wurde (unveröffentlichte Daten). Es ist jedoch bemerkenswert, dass Metallo-Proteasen an der Prozessierung von MHC-Klasse-I-Liganden beteiligt sind (Lopez et al., 2000). Dies spricht sehr für PSA als Trimpeptidase, da es eine Zn-Protease ist.

Ebenso auffallend ist, dass in der Aminosäuresequenz von PSA zwei Abschnitte gefunden wurden, die eine Ähnlichkeit von 72 und 40 % zu dem einzigen bekannten konservierten Proteasommotiv aufweisen (Abb. 4.2.A und B, (Constam et al., 1995)). Dieses Motiv befindet sich an den N-Termini der  $\alpha$ -Untereinheiten des Proteasoms und



**Abbildung 4.3.** Motivvergleiche von PSA mit Proteasom und GroEL. **A** Konserviertes Motiv in den  $\alpha$ -Untereinheiten des Proteasoms (rot). Dargestellt an der 20S-Proteasom-Kristallstruktur aus Hefe. **A** Aufsicht **B** Seitenansicht **C** Motivähnlichkeit im GroEL Komplex (rot), dargestellt an der Kristallstruktur des GroEL/GroES-Komplexes **D** Aufsicht auf die untere Hälfte des GroEL-Komplexes.

stellt die Kontaktregion des 20S Corepartikels zu den entsprechenden Regulatoren dar (Abb. 4.3.A, 1.2.B und (Whitby et al., 2000)). Bei einer weiteren Analyse der Sequenz stellt sich heraus, dass es einen anderen Abschnitt in der Proteinsequenz gibt, der eine wenn auch nur geringe Ähnlichkeit von 28 % zum GroEL-Komplex aufweist. Auch in diesem Fall handelt es sich um ein Motiv einer Kontaktregion zwischen Untereinheiten (Abb. 4.3.C und D). Außerdem weist PSA in zwei Abschnitten 58 und 43 % Identität zu den Tricon interagierenden Faktoren 2 und 3 auf (Abb. 4.2.), die dafür verantwortlich gemacht werden, dass ein großer proteolytischer Komplex (Tricon) seine Aktivität in Anwesenheit der interagierenden Faktoren ändert (Tamura et al., 1996; Tamura et al., 1998).

Diese Motivähnlichkeiten legen nahe, dass weitere Interaktionspartner von PSA existieren, die die Trimpeptidase in ihrer Aktivität beeinflussen könnten. Da allerdings je nach den angesetzten Kriterien, in Bezug auf Ähnlichkeiten von Aminosäuren der verwendeten Computerprogramme Unterschiede in den Ergebnissen der Vorhersage auftreten, ist nicht eindeutig, wie relevant diese Aussagen *in vivo* sind. Trotzdem wurden Versuche unternommen, Interaktionspartner von PSA zu identifizieren, die jedoch bis zum Ende dieser Arbeit zu keinem Erfolg führten.

In Bezug auf Substratspezifität scheint PSA nach den meisten Aminosäuren schneiden zu können, wenn auch mit unterschiedlichen Effizienzen (Abb. 3.11. und (Johnson and Hersh, 1990; Safavi and Hersh, 1995)). Allerdings kann die Substratlänge nicht unbegrenzt sein, was sich darin zeigt, dass das Vorläuferpeptid aus dem Hepatitis B core Antigen 83-104 mit 22 Aminosäuren nicht verdaut wurde (siehe 3.4.4.). Eine genaue Aussage über Spezifitäten ist aber erst nach einer erweiterten Analyse mit längeren Substraten, die alle Aminosäuren beinhalten oder durch die Verwendung von Substratbibliotheken (Backes et al., 2000) möglich, da z.B. das ineffiziente Schneiden nach D nicht aus Studien mit kurzen Substraten vorausgesagt wurde (Johnson and Hersh, 1990).

#### 4.2.2. BH als Trimpeptidase

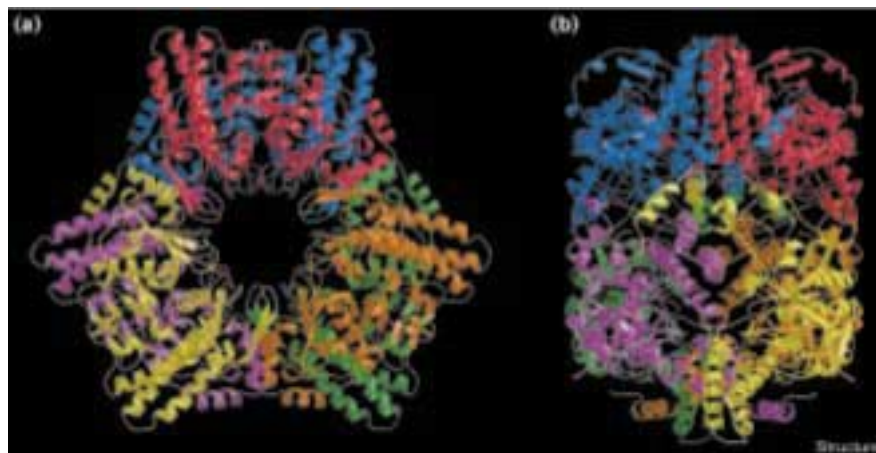
Auch BH ist seit längerem als Protease bekannt, jedoch genau wie bei PSA konnten ihr bisher weder eine physiologische Funktion noch Substrate zugeordnet werden. Der Name BH resultiert aus der Beobachtung, dass sie das als Chemoterapeutikum verwendete Bleomycin hydrolysiert und somit inaktiviert (Umezawa et al., 1974). Da Bleomycin jedoch nicht als natürliches Substrat angesehen werden kann, bleibt diese Eigenschaft zwar unerwünscht für die Chemotherapie, insbesondere, da BH in vielen Tumoren überexprimiert zu sein scheint (Bromme et al., 1996). Dies gibt jedoch keinen Aufschluss über die Funktion von BH *in vivo*.

Ebenso wie PSA ist BH über die Spezies hinweg konserviert und das Gen weist *housekeeping* Struktur auf (Ferrando et al., 1997), wodurch sie in vielen Geweben nachgewiesen werden konnte (Bromme et al., 1996). Auch BH ist nicht durch IFN- $\gamma$  induzierbar, wie in vier Tumorzelllinien durch RT-PCR Untersuchungen gezeigt wurde (unveröffentlichte Daten). Bemerkenswert ist jedoch die Inhibition von BH als Cysteinprotease durch E64 (Abb. 3.14. und (Enenkel and Wolf, 1993; Bromme et al., 1996)), da E64 einen Effekt auf die Antigenprozessierung des H2-L<sup>d</sup> restringierten murinen CMV pp89 Epitops hat (Lopez and Del Val, 1997). Da E64 alleine keinen Effekt auf die Prozessierung des VSV-NP 52-59 Epitops hat (siehe 3.5.1.), ist dies ein

erster Hinweis darauf, dass es sich bei den hier untersuchten Trimpeptidasen um ein mögliches redundantes System handelt und soll weiter unten ausführlicher diskutiert werden.

Auffallend ist, dass BH eine Struktur aufweist, die der des Proteasoms sehr ähnelt (Abb. 4.4. und (O'Farrell et al., 1999)). Diese Struktur besteht aus einem Homohexamer mit zwei übereinander liegenden Ringen aus jeweils drei Untereinheiten und einem katalytischen Zentrum mit einem C-terminalem Cystein als reaktive Aminosäure pro Untereinheit. Dabei werden die Untereinheiten von BH selbst aktiviert, in dem ein K vom C-Terminus der Untereinheiten entfernt wird (Zheng et al., 1998). Dieser Vorgang erinnert ebenfalls sehr stark an die Reifung der  $\beta$ -Untereinheiten des Proteasoms, bei denen ein Propeptid autokatalytisch entfernt wird (Seemuller et al., 1996; Chen and Hochstrasser, 1996). Die Struktur von BH könnte ein Grund dafür sein, dass wie beim 20S Proteasom *in vitro* nur Peptide Zugang zu den katalytischen Zentren bekommen können und selbst längere Peptide, wie das aus dem Hepatitis B core Antigen 83-104 mit 22 Aminosäuren, nicht durch BH verdaut werden (siehe 3.4.4.). Es ist daher möglich, dass *in vivo* BH durch Regulatoren oder die Modifikation des Substrates in der Lage ist, größere Substrate zu verdauen. Dies wäre dann mit dem 26S und 20S Proteasom zu vergleichen. Auch das 20S Proteasom kann ganze Proteine nur in Ausnahmefällen *in vitro* verdauen (Nussbaum et al., 1998). Die geringe Endopeptidaseaktivität von BH *in vitro* (Abb. 3.13. und (Koldamova et al., 1998b; Adachi et al., 1997)) würde somit eine ganz andere Bedeutung *in vivo* erhalten, somit ist nicht auszuschließen, dass sich die Endopeptidasespezifität nicht nur auf Schnitte nach R beschränkt. Die Möglichkeit weiterer Interaktionspartnern von BH zeigt sich auch dadurch, dass BH in einem Hefe-two-hybrid-System an ein Homolog des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms 9 bindet (Koldamova et al., 1998a).

Für die Aminopeptidaseaktivität weißt BH keinen Unterschied zu PSA auf, es scheint ebenfalls relativ unspezifisch zu schneiden und nur in der Umsatzrate einzelne Aminosäuren zu unterscheiden (Enenkel and Wolf, 1993). Dies zeigt sich auch durch



**Abbildung 4.4.** Kristallstruktur humaner BH. Die sechs Untereinheiten sind in unterschiedlichen Farben gezeigt. Aus O'Farrell et al., 1999.



das ineffiziente Schneiden nach D und P (Abb. 3.13. und (Bromme et al., 1996)). Für eine genaue Analyse der Schnittspezifität von BH bedarf es aber genauso wie bei PSA weiterer Studien, um genauere Aussagen machen zu können.

Der Vollständigkeit halber soll noch erwähnt werden, das beschrieben wurde, dass BH auch DNA bindet (Xu and Johnston, 1994) und an weitere Proteine wie z.B. Ribosomen bindet (Koldamova et al., 1999). Da diese Ergebnisse jedoch kontrovers sind und sich in Bezug auf die DNA-Bindung scheinbar auf das Hefeprotein beschränken (Bromme et al., 1996), soll hier nicht weiter darauf eingegangen werden. Außerdem wird BH mit der Proteolyse des Amyloid Vorläufer Proteins in der Alzheimer Krankheit in Verbindung gebracht (Montoya et al., 1998; Lefterov et al., 2000), wobei aber auch diese Rolle umstritten ist (Farrer et al., 1998).

#### 4.2.3. Trimpeptidasen im ER

In mehreren Publikationen wurde gezeigt, dass von N-terminal verlängerten MHC-Klasse-I-Liganden, die an ER-Signalsequenzen gekoppelt sind, N-terminale Aminosäuren im ER von TAP defizienten Zellen entfernt werden können (Snyder et al., 1994; Snyder et al., 1997; Lobigs et al., 2000). Da sogar ein MHC-Klasse-I Ligand aus dem Kontext eines Proteinfragmentes generiert werden konnte (Elliott et al., 1995), wird auch die Existenz einer Endopeptidaseaktivität im ER nicht ausgeschlossen. Trotzdem scheint eine solche Aktivität im ER im Vergleich zum Proteasom weniger Spezifität oder Fähigkeit im Generieren der C-Termini von MHC-Klasse-I-Liganden zu haben, da in den meisten Fällen C-terminal verlängerte Epitope, die direkt in das ER gesteuert werden, nicht in der Entstehung des MHC-Klasse-I-Liganden resultieren (Siliciano and Soloski, 1995; Snyder et al., 1998). Dies zeigt sich schon, wenn man den C-Terminus eines relevanten Epitops um nur zwei Aminosäuren verlängert (Eisenlohr et al., 1992).

Die Existenz einer Trimpeptidase im ER, wie von Falk et al., 1990 postuliert ist also sehr wahrscheinlich. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass es sich dabei auch um mehrere Trimpeptidasen handeln könnte, da unterschiedliche Inhibitoren die Prozessierung von verschiedenen Peptidvorläufern verhindert (Brouwenstijn and Shastri, 2000). In derselben Arbeit wurde auch gezeigt, dass das relevante MHC-Klasse-I-Molekül notwendig ist, um den endgültigen MHC-Liganden zu generieren. Über diese Funktion des MHC-Moleküls wurde ebenfalls bereits in Falk et al., 1990 spekuliert. Inwieweit sich dies auf die Lokalisation der Prozessierung oder eine mögliche Peptid-Chaperon-Funktion des MHC-Klasse-I-Moleküls auswirkt, wird unter 4.4. diskutiert. Solange kein möglicher Kandidat als Trimpeptidase im ER identifiziert ist, bleibt es daher offen, ob eine solche Peptidase löslich im Lumen des ER, als membrangebundene Protease im Lumen des ER oder gar inseriert in der ER-Membran (siehe 4.3.) vorliegt.

#### 4.2.4. Redundanz im Trimpeptidasensystem

Aus der Tatsache, dass zwei Trimpeptidasen gereinigt wurden, die die gesetzten Selektionskriterien erfüllen, beide über mehrere Reinigungsschritte koeluiieren und beide die entsprechenden Vorläuferpeptide *in vitro* verdauen, wird vorgeschlagen, dass es sich bei Trimpeptidasen um ein redundantes System handelt (Abb. 5.1). Dies erklärt

sehr einfach, dass mit E64 oder Puromycin als alleinigem Inhibitor kein Effekt auf die Prozessierung des VSV-NP 52-59 Epitops gesehen wurde, da zwar jeweils eine der Trimpeptidasen inhibiert ist, jedoch die andere unbeeinflusst bleibt (siehe Inhibitorprofile in Abb. 3.12. und 3.14.). Der endgültige Beweis für dieses Modell, durch das Experiment mit beiden Inhibitoren gleichzeitig, konnte bis zum Ende dieser Arbeit aber nur als Tendenz geliefert werden (Abb. 3.17.D) und bedarf einer weiteren Bestätigung. Eine vorliegende Redundanz erklärt jedoch, warum BH  $-/-$  Mäuse keinen Phänotyp in Bezug auf T-Zellentwicklung (Abb. 3.18.) oder die Prozessierung von 5v5 Minigenen zeigen (Abb. 3.19.). Vermutlich gibt erst die zweifach defiziente Maus, in der beide Trimpeptidasen fehlen, einen endgültigen Aufschluss über den Beitrag der Proteasen zur Antigenprozessierung. Diese Maus ist jedoch erst in ihrer Entstehung.

Vorhandene Redundanz erklärt auch den beobachteten Effekt von LLnL auf die MC-5v Minigen-Transfektanten, in denen durch LLnL die Präsentation des VSV-NP 52-59 Epitops verstärkt wird (Abb. 3.3.A). Da für dieses Minigenkonstrukt das Proteasom nicht notwendig ist, um das endgültige CTL-Epitop zu generieren und LLnL in der Lage ist das Proteasom und ER-Proteasen zu inhibieren (Rock et al., 1994; Hughes et al., 1996), jedoch keinen Effekt auf PSA hat (Abb. 3.12.), wird das VSV-NP 52-59 Epitop weiterhin prozessiert. Andere zelleigene Liganden werden nicht prozessiert, da das Proteasom inhibiert ist und Liganden, die unabhängig vom Proteasom generiert werden, aber LLnL sensitive ER-Trimpeptidasen benötigen, ebenfalls nicht. Dadurch kann es zu einer erhöhten Präsentation des VSV Epitops kommen und somit zu einer höheren Lyse durch die entsprechenden CTL führen. Dies zeigt, dass vermutlich nicht alle Liganden von den gleichen Trimpeptidasen generiert werden und es somit weitere bisher nicht identifizierte Trimpeptidasen gibt. Außerdem ist dies ein weiterer Hinweis, dass PSA an der endgültigen Prozessierung des VSV-NP 52-59 Epitops im Cytosol beteiligt ist.

LLnL ist somit in der Lage, fast alle an der Antigenprozessierung beteiligten Proteasen zu inhibieren, da das Peptidrepertoire fast auf null reduziert wird und kaum noch MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche erscheinen (Abb. 3.2.B). Lactacystin inhibiert das Proteasom und kann die Herstellung von mindestens 50 % der auf MHC-Klasse-I Molekülen präsentierten Peptide verhindern. Es scheint jedoch nur ein kleiner Teil der Peptide ausschließlich auf Proteasen angewiesen zu sein, die durch AAF-CMK inhibiert werden, da AAF-CMK nur eine Reduktion der MHC-Klasse-I Expression von etwa 10 % bewirkt (Abb. 3.2.B). Auch dies spricht für eine Redundanz bei Trimpeptidasen.

Ein Modell von redundanten Trimpeptidasen könnte auch die bisherigen Kandidaten mit einbeziehen. So kann LAP, welches durch IFN- $\gamma$  induziert wird, eine ähnliche Aufgabe wie die IFN- $\gamma$  induzierbaren  $\beta$ -Untereinheiten des Proteasoms zufallen (Van Kaer et al., 1994; Fehling et al., 1994) und im Fall einer Infektion die Prozessierung effizienter und zuverlässiger machen. Ebenso ist nicht auszuschließen, dass TPP-II für manche MHC-Klasse-I-Liganden eine Prozessierungsfunktion übernimmt (Geier et al., 1999), da nicht sicher ist, dass für alle Liganden die gleichen Proteasen für N-terminale Prozessierung verantwortlich sind. Die bisher nur postulierten Trimpeptidasen im ER würden somit das Modell abrunden. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass je nach Art und vor allem Sequenz des Vorläuferpeptids unterschiedliche Trimpeptidasen an der Generierung des endgültigen MHC-Klasse-I-Liganden beteiligt sein können.

### 4.3. Weitere Proteasen im Antigenprozessierungsweg für MHC-Klasse-I

Neben dem Proteasom und den Trimpeptidasen wurde auch Proteasom unabhängige Antigenprozessierung für MHC-Klasse-I beschrieben (Vinitsky et al., 1997; Luckey et al., 1998; Anton et al., 1998; Glas et al., 1998). Besonders für MHC-Klasse-I Liganden, die von Signalpeptiden stammen, ist diese Art der Prozessierung ein wichtiger alternativer Prozessierungsweg, da bei ihrer Prozessierung das Proteasom oft keine Rolle spielt (Bai and Forman, 1997; Wolfel et al., 2000). Wie bei den Trimpeptidasen können diese Proteasen im ER oder Cytosol lokalisiert sein, da die Prozessierung von Signalpeptiden TAP abhängig und unabhängig erfolgen kann (Wei and Cresswell, 1992; Henderson et al., 1992; Bai et al., 1998; Wolfel et al., 2000). Inwieweit die vorgeschlagenen Trimpeptidasen an dieser Art der Prozessierung teilhaben, bleibt dabei offen. Im Cytosol könnten BH und TPP-II beteiligt sein, da beide wie beschrieben auch Endopeptidaseaktivität besitzen (Abb. 3.13.B und 3.16.C und (Koldamova et al., 1998b; Adachi et al., 1997; Geier et al., 1999)). Vor kurzem wurde auch die Möglichkeit beschrieben, dass die Prozessierung von Signalpeptiden direkt in der ER-Membran durchgeführt werden könnte. Dabei handelt es sich scheinbar um eine neue bisher nicht bekannte Familie von Proteasen, die zwei Motive HEXXH und LDG innerhalb von Membranen aufweisen (Rudner et al., 1999; Weihofen et al., 2000). Das Prinzip der Intramembranproteolyse scheint dabei über unterschiedlichste Bereiche verbreitet zu sein (Brown et al., 2000). Ob diese Art von Proteasen im Gegenzug auch als Trimpeptidasen funktionieren können, bleibt abzuwarten.

Als extremste Version der vom Proteasom unabhängigen Antigenprozessierung ist der Fall der Überschneidung der Antigenprozessierungswege für MHC-Klasse-I und II zu sehen (Staerz et al., 1987; Rock and Clark, 1996; Speidel et al., 1997; Gromme et al., 1999). Es wäre demnach denkbar, dass auch Cathepsine als Proteasen betrachtet werden müssten, die zur Entstehung des Peptidrepertoires für MHC-Klasse-I beitragen. Ob dies der Fall ist oder diese MHC-Moleküle nur Peptide aufnehmen, die durch Kreuzpräsentation durch Hitzeschockproteine in die entsprechenden Zellen gelangt sind, bleibt eine offene Frage.

Die Berücksichtigung der Tatsache, dass neben dem Proteasom andere Proteasen in der Antigenprozessierung für MHC-Klasse-I eine Rolle spielen, erzwingt ein Überdenken der Rolle von epitopflankierenden Sequenzen in der Antigenprozessierung. Die Information zur Entstehung eines MHC-Klasse-I-Liganden ist auf Grund des MHC-Motives und scheinbar auch durch Schnittinformationen (Ossendorp et al., 1996; Sijts et al., 1996) zu einem Teil in der Sequenz des Liganden enthalten. Aber auch die flankierenden Sequenzen können einen positiven oder negativen Einfluss auf die Prozessierung haben (Del Val et al., 1991; Bergmann et al., 1996). Die C-terminalen Flankierungen scheinen dabei besonders wichtig für die Prozessierung durch das Proteasom zu sein (Eggers et al., 1995; Niedermann et al., 1995; Beekman et al., 2000). Die N-terminale Flankierung wurde ebenfalls oft mit der Schnittspezifität des Proteasoms in Verbindung gebracht (Eggers et al., 1995; Yellen-Shaw et al., 1997). Um diese Interpretationen unter Berücksichtigung von Trimpeptidasen zu bestätigen, ist es notwendig alle an der Prozessierung beteiligten Proteine zu kennen. Erst durch spezifisches Ausschalten (genetisch oder durch Inhibitoren) entsprechender Proteasen ist es dann möglich, eine korrekte Aussage über die Funktion vor allem der N-terminalen Sequenzen zu erhalten.

Auch das Phänomen der Immundominanz bestimmter Epitope (Yewdell and Bennink, 1999) ist somit nicht nur durch die Schnittspezifität des Proteasoms oder dem vorhandenen T-Zellrepertoire (Niedermann et al., 1995; Deng et al., 1997) zu erklären. Es könnte gut sein, dass ein Epitopvorläufer zwar bevorzugt den C-Terminus durch das Proteasom generiert bekommt, jedoch ein anderer Vorläufer der in geringerem Ausmaß durch das Proteasom entsteht, sich in den folgenden proteolytischen Schritten besser zur Generierung des endgültigen Epitops eignet. Wodurch auch Trimpeptidasen eine Rolle in der Selektion von immundominanten Epitopen spielen könnten (Zhang et al., 2000). Auch die Untersuchung von Immundominanz wird somit, durch die Identifikation weiterer Teilnehmer am Prozessierungsweg, entscheidend verbessert.

#### 4.4. Peptid-Chaperone im Antigenprozessierungsweg für MHC-Klasse-I

Die Existenz von Peptid-Chaperonen, die in der Lage sind, die entstehenden Liganden im Cytosol und ER zu transportieren und vor der endgültigen Degradation zu schützen, scheint eine logische Schlussfolgerung aus den erhaltenen Daten zu sein. Andernfalls würde, wie in Tab. 3.2. und 3.3. gezeigt, eine Trimpeptidase den entstehenden MHC-Klasse-I-Liganden vollständig degradieren und die Aminosäuren den normalen Recyclingprozessen der Zelle zugeführt werden. Ob allerdings die Existenz von Peptid-Chaperonen zum Transport von MHC-Klasse-I-Liganden notwendig ist, bleibt eine offene Frage. Es wird auch diskutiert, dass reine Diffusionsphänomene ausreichend sind, um Peptide vom Ort ihrer Entstehung zum MHC-Klasse-I-Molekül gelangen zu lassen.

Als mögliche Kandidaten für solch eine Peptid-Chaperonfunktion wurden bisher HSP70 im Cytosol und GP96 sowie PDI im ER angesehen. Dass diese Chaperone Peptide binden können, wurde durch Immunisierungsexperimente und Kreuzvernetzung von radioaktiv markierten Peptiden bewiesen (Srivastava et al., 1994; Arnold et al., 1995; Lammert et al., 1997b; Lammert et al., 1997a; Spee and Neefjes, 1997). Für GP96 wurde sogar eine Bindungsregion nachgewiesen (Linderoth et al., 2000). Die Frage, ob diese Chaperone notwendig für den Peptidtransport sind, ist dennoch nicht geklärt.

Eine hilfreiche Information bei der Suche nach Peptid-Chaperonen, wäre zu wissen, welche Peptide von ihnen gebunden werden. Da es bisher nicht gelungen ist, Peptidvorläufer zu identifizieren (außer Paz et al., wie im folgenden Absatz diskutiert), sondern nur ganze Liganden oder verkürzte Liganden aus Ganzzellextrakten isoliert wurden (Dick et al., 1998b), wurde versucht, Vorläuferpeptide mithilfe der Massenspektrometrie zu identifizieren. Dass dies nicht gelang (siehe 3.6.) kann an der Menge der vorhandenen Peptide liegen, oder an der gewählten Aufreinigungsmethode. Ebenfalls besteht die Möglichkeit, dass entstehende Peptide sehr schnell aus dem Cytosol in das ER transportiert werden (Reits et al., 2000) und dort durch Chaperone oder MHC-Klasse-I selbst (Brouwenstijn and Shastri, 2000) vor dem Abbau geschützt werden. Peptide, die so nicht dem Abbau entkommen werden, dann vielleicht so schnell degradiert, dass sie nicht mehr nachweisbar sind. Dies gilt insbesondere unter der Berücksichtigung der Theorie von vorhandenen DRiPs (engl.: *Defective ribosomal products*) (Yewdell et al., 1996; Schubert et al., 2000), da Minigenprodukte DRiPs sehr ähnlich sind und daher schwer als Peptide nachweisbar wären.

Diese Interpretation wird jedoch durch Paz et al., widerlegt, da es ihnen kürzlich gelang, von cytosolischen Chaperonen Peptidvorläufer von einem etwa 60 kD großen Protein zu

---

eluieren (Paz et al., 1999). Allerdings verwendeten sie auch ein etwas artifizielles aber dafür sehr sensitives Nachweissystem. Dabei unterscheidet sich dieses Chaperon von HSP70 und scheint in der Peptidbindungseigenschaft empfindlich gegenüber hoher Salzkonzentration zu sein, so dass es bisher nicht identifiziert werden konnte (N. Brouwenstijn; persönliche Mitteilung). Dies stimmt mit den in Abb. 3.21.B erhaltenen <sup>125</sup>I-markierten peptidbindenden Proteinen überein. Bei der dominanten Bande bei etwa 70 kD könnte es sich um HSP70 handeln. Die darauf folgenden zwei etwas schwächeren Banden haben jedoch etwa die Größe des von Paz et al., vermuteten Chaperons. Endgültige Aussagen bedürfen natürlich einer Identifikation der Proteine, was in erster Linie eine Frage der eingesetzten Menge ist, um genug Material für einen Trypsin-in-Gel Verdau zu haben.

#### 4.5. Ausblick

Um dem Fernziel einer verlässlichen Vorhersage von MHC-Klasse-I-Liganden aus bekannten Proteinsequenzen näher zu kommen, ist es notwendig, alle Einflussfaktoren auf die Generierung von MHC-Klasse-I-Liganden zu kennen. Die bisherigen Vorhersagemöglichkeiten wie MHC-Bindungsmotive (Rammensee et al., 1999) und Proteasomschnitte (Kuttler et al., 2000; Nussbaum et al., 2000) waren essentielle Schritte, um dieses Ziel zu erreichen. Der Beitrag dieser Arbeit zu diesem Ziel ist offensichtlich, da durch die Identifikation von weiteren Teilnehmern im Antigenprozessierungsweg weitere Selektionskriterien in der Generierung von MHC-Klasse-I-Liganden untersucht werden können und somit die Vorhersagen verbessert werden.

Um dies zu erreichen, ist es notwendig, die exakten Beiträge der identifizierten Trimpeptidasen im MHC-Klasse-I Weg zu untersuchen. Das beste System dafür sind die vorhandenen -/- Mäuse und die zukünftigen doppelt defizienten Mäuse. Mit diesen können dann spezifische Fragestellungen auf einzelne Antigene und Beiträge zur Entstehung des vorhandenen Peptidrepertoires genauer untersucht werden.

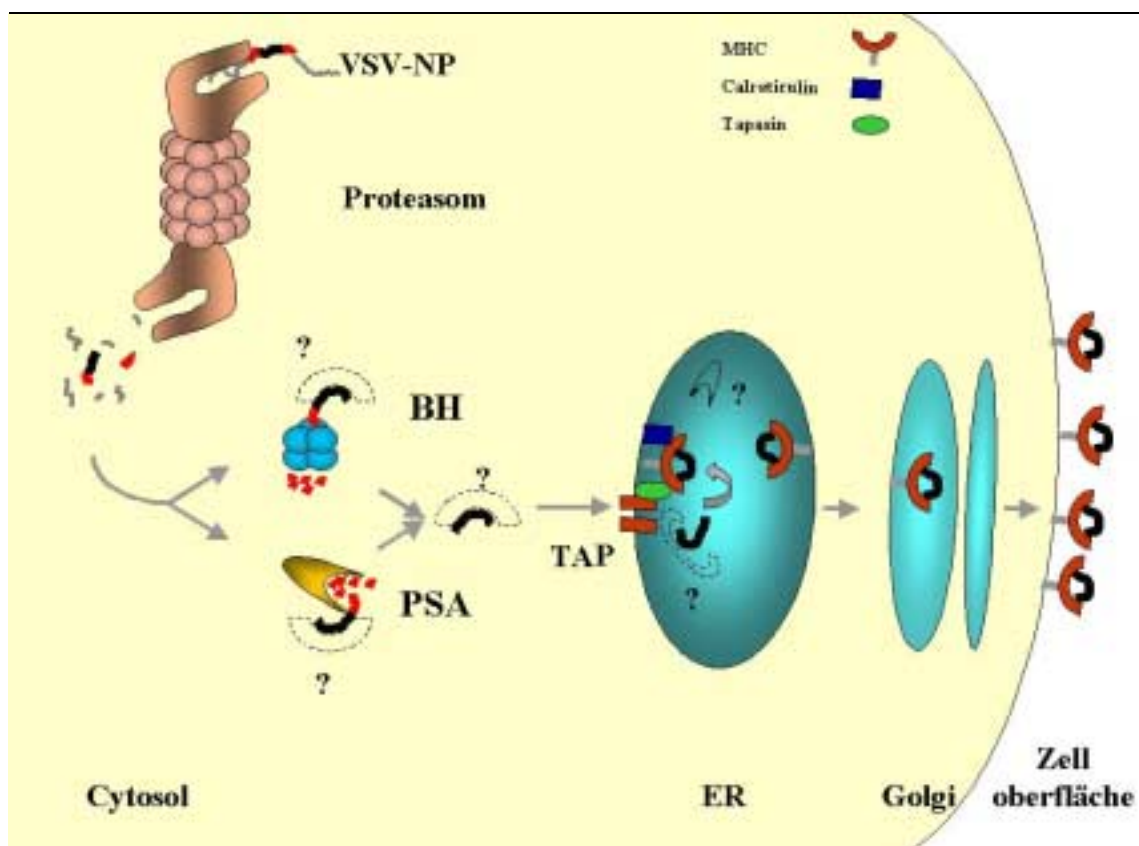
Die Identifikation von Peptidvorläufern ergänzt die Charakterisierung von Trimpeptidasen, da somit die relevanten Substrate aufgedeckt werden und die notwendigen Schnittspezifitäten von Trimpeptidasen genauer untersucht werden können. Zusätzlich lassen sich mit Hilfe bekannter Peptidvorläufer einfacher Peptid-Chaperone identifizieren, die dann auf ihre Interaktion mit Trimpeptidasen untersucht werden können. Dadurch würden weitere wichtige Selektionsprozesse für MHC-Klasse-I-Liganden identifiziert.

## 5. Zusammenfassung

Aus den in dieser Arbeit erhaltenen Daten lässt sich der Antigenprozessierungsweg für MHC-Klasse-I, wie in Abb. 5.1. gezeigt, ergänzen. Neben den bekannten Molekülen wie dem Proteasom, MHC-Klasse-I Molekül, TAP, Calreticulin und Tapasin sind mit dieser Arbeit zwei weitere Enzyme identifiziert worden, die am Prozessierungsweg beteiligt sind. Es handelt sich dabei um die Trimpeptidasen Bleomycin Hydrolase (BH) und Puromycin sensitive Aminopeptidase (PSA). Sie übernehmen als Trimpeptidasen die endgültige N-terminale Prozessierung von MHC-Klasse-I-Liganden in einer komplementären und redundanten Weise. Durch diese Redundanz ist eine effizientere Generierung von CTL-Epitopen möglich und Viren und Tumorzellen wird es erschwert, vom Immunsystem nicht entdeckt zu werden.

Zusätzlich zu den identifizierten Trimpeptidasen wurde nachgewiesen, dass cytosolische Peptid-Chaperone mit einem Molekulargewicht von etwa 60 kD existieren können, die am Transport von CTL-Epitopvorläufern beteiligt sind.

Aufbauend auf dieser Arbeit ist es somit möglich die Vorhersage von MHC-Klasse-I-Liganden zu verbessern und Peptid-Chaperone zu identifizieren, die am Phänomen des intrazellulären Peptidtransports beteiligt sind.



**Abb. 5.1.** Antigenprozessierungsweg für MHC-Klasse-I mit Trimpeptidasen Bleomycin Hydrolase (BH) und Puromycin sensitive Aminopeptidase (PSA). Postulierte Peptid-Chaperone, bzw. weitere Trimpeptidasen (?).

## 6. Abkürzungsverzeichnis

AAF-CMK	Alanin-Alanin-Phenylalanin-Chloromethylketon
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APC	professionelle antigenpräsentierende Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriophosphat
AU280	Absorption bei 280 nm
BN-PAGE	Blue-native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
BH	Bleomycin Hydrolase
CMK	AAF-CMK
ConA	ConcanavalinA
CTL	Cytotoxische T-Lymphozyten
DC	Dendritische Zellen
dH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes H <sub>2</sub> O
E:T	Verhältnis von Effektorzellen zu Zielzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
HPLC	High performance liquid chromatography
HSP	Hitze Schock Protein
INF	Interferon
kB	Kilobasen
kD	Kilodalton
LAP	Leucinaminopeptidase
LC	Lactacystin
LLnL	N-Acetyl-L-Leucin-L-Leucin-L-NorLeucinal
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MHC-I Moleküle	Haupthistokompatibilitätsmoleküle der Klasse I
MHC-II Moleküle	Haupthistokompatibilitätsmoleküle der Klasse II
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NP	Nukleoprotein
OD <sub>550</sub>	Optische Dichte bei 550 nm
Ova	Ovalbumin
PE	Phycoerythrin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PSA	Puromycin sensitive Amino-peptidase
pH	Potentia Hydrogenii
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Tab.	Tabelle
TAP	Transporters associated with antigen processing
tBu	tertiär Butyl
TCR	T-Zell Rezeptor
VSV	Vesiculäres Stomatitis Virus



## 7. Literatur

- Adachi,H., Tsujimoto,M., Fukasawa,M., Sato,Y., Arai,H., Inoue,K., and Nishimura,T. (1997). cDNA cloning and expression of chicken aminopeptidase H, possessing endopeptidase as well as aminopeptidase activity. *Eur. J. Biochem.* *245*, 283-288.
- Ahn,J.Y., Tanahashi,N., Akiyama,K., Hisamatsu,H., Noda,C., Tanaka,K., Chung,C.H., Shibmura,N., Willy,P.J., and Mott,J.D. (1995). Primary structures of two homologous subunits of PA28, a gamma- interferon-inducible protein activator of the 20S proteasome. *FEBS Lett.* *366*, 37-42.
- Anton,L.C., Snyder,H.L., Bennink,J.R., Vinitsky,A., Orłowski,M., Porgador,A., and Yewdell,J.W. (1998). Dissociation of proteasomal degradation of biosynthesized viral proteins from generation of MHC class I-associated antigenic peptides [published erratum appears in *J Immunol* 1999 Mar 1;162(5):3105]. *J Immunol* *160*, 4859-4868.
- Apasov,S., Redegeld,F., and Sitkovsky,M. (1993). Cell-mediated cytotoxicity: contact and secreted factors. *Curr. Opin. Immunol.* *5*, 404-410.
- Arendt,C.S. and Hochstrasser,M. (1997). Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 7156-7161.
- Arnold,B., Horstmann,U., Kuon,W., Burgert,H.G., Hammerling,G.J., and Kvist,S. (1985). Alloreactive cytolytic T-cell clones preferentially recognize conformational determinants on histocompatibility antigens: analysis with genetically engineered hybrid antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *82*, 7030-7034.
- Arnold,D., Faath,S., Rammensee,H., and Schild,H. (1995). Cross-priming of minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T cells upon immunization with the heat shock protein gp96. *J. Exp. Med.* *182*, 885-889.
- Backes,B.J., Harris,J.L., Leonetti,F., Craik,C.S., and Ellman,J.A. (2000). Synthesis of positional-scanning libraries of fluorogenic peptide substrates to define the extended substrate specificity of plasmin and thrombin [published erratum appears in *Nat Biotechnol* 2000 May;18(5):559]. *Nat. Biotechnol.* *18*, 187-193.
- Bai,A., Broen,J., and Forman,J. (1998). The pathway for processing leader-derived peptides that regulate the maturation and expression of Qa-1b. *Immunity.* *9*, 413-421.
- Bai,A. and Forman,J. (1997). The effect of the proteasome inhibitor lactacystin on the presentation of transporter associated with antigen processing (TAP)-dependent and TAP-independent peptide epitopes by class I molecules. *J. Immunol.* *159*, 2139-2146.
- Balow,R.M., Tomkinson,B., Ragnarsson,U., and Zetterqvist,O. (1986). Purification, substrate specificity, and classification of tripeptidyl peptidase II. *J. Biol. Chem.* *261*, 2409-2417.
- Barrett,A.J., Rawlings,N.D., and Woessner,J.F. (1998). *Handbook of Proteolytic Enzymes.* Academic Press).
- Beekman,N.J., van Veelen,P.A., van Hall,T., Neisig,A., Sijts,A., Camps,M., Kloetzel,P.M., Neefjes,J.J., Melief,C.J., and Ossendorp,F. (2000). Abrogation of CTL epitope processing by single amino acid substitution flanking the C-terminal proteasome cleavage site. *J. Immunol.* *164*, 1898-1905.

- Beninga, J., Rock, K.L., and Goldberg, A.L. (1998). Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J Biol Chem* 273, 18734-18742.
- Bennett, S.R., Carbone, F.R., Karamalis, F., Flavell, R.A., Miller, J.F., and Heath, W.R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393, 478-480.
- Bergmann, C.C., Yao, Q., Ho, C.K., and Buckwold, S.L. (1996). Flanking residues alter antigenicity and immunogenicity of multi-unit CTL epitopes. *J. Immunol.* 157, 3242-3249.
- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. (1987a). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329, 506-512.
- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. (1987b). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329, 512-518.
- Boes, B., Hengel, H., Ruppert, T., Multhaupt, G., Koszinowski, U.H., and Kloetzel, P.M. (1994). Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J. Exp. Med.* 179, 901-909.
- Bogyo, M., McMaster, J.S., Gaczynska, M., Tortorella, D., Goldberg, A.L., and Ploegh, H. (1997). Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the *Escherichia coli* homolog HslV by a new class of inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 6629-6634.
- Bromme, D., Rossi, A.B., Smeekens, S.P., Anderson, D.C., and Payan, D.G. (1996). Human bleomycin hydrolase: molecular cloning, sequencing, functional expression, and enzymatic characterization. *Biochemistry* 35, 6706-6714.
- Brouwenstijn, N. and Shastri, N. MHC class-I dependent cleavage of antigenic precursor peptides in the endoplasmic reticulum. 30-11-2000. Düsseldorf. 30-11-2000. Conference Poster
- Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364, 33-39.
- Brown, M.G., Driscoll, J., and Monaco, J.J. (1991). Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. *Nature* 353, 355-357.
- Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B., and Goldstein, J.L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100, 391-398.
- Brunner, J. (1996). Use of photocrosslinkers in cell biology. *trends in Cell Biology* 6, 154-157.
- Burley, S.K., David, P.R., Taylor, A., and Lipscomb, W.N. (1990). Molecular structure of leucine aminopeptidase at 2.7-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 6878-6882.
- Casares, S., Inaba, K., Brumeanu, T.D., Steinman, R.M., and Bona, C.A. (1997). Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J. Exp. Med.* 186, 1481-1486.
- Cerundolo, V., Benham, A., Braud, V., Mukherjee, S., Gould, K., Macino, B., Neefjes, J., and Townsend, A. (1997). The proteasome-specific inhibitor lactacystin blocks presentation of cytotoxic T lymphocyte epitopes in human and murine cells. *Eur J Immunol* 27, 336-341.

- Chen,P. and Hochstrasser,M. (1996). Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell* 86, 961-972.
- Ciechanover,A. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17, 7151-7160.
- Colbere-Garapin,F., Horodniceanu,F., Kourilsky,P., and Garapin,A.C. (1981). A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. *J. Mol. Biol.* 150, 1-14.
- Constam,D.B., Tobler,A.R., Rensing-Ehl,A., Kemler,I., Hersh,L.B., and Fontana,A. (1995). Puromycin-sensitive aminopeptidase. Sequence analysis, expression, and functional characterization. *J Biol Chem* 270 , 26931-26939.
- Counce,S., Smit,P., Barth,R., and Snell,G.D. (1956). Strong and weak histocompatibility gene differences in mice and their role in rejection of homografts of tumor skin. *Ann. Surg.* 144, 198-204.
- Craiu,A., Akopian,T., Goldberg,A., and Rock,K.L. (1997a). Two distinct proteolytic processes in the generation of a major histocompatibility complex class I-presented peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10850-10855.
- Craiu,A., Gaczynska,M., Akopian,T., Gramm,C.F., Fenteany,G., Goldberg,A.L., and Rock,K.L. (1997b). Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J. Biol. Chem.* 272, 13437-13445.
- de Souza,A.N., Bruno,J.A., and Carvalho,K.M. (1991). An enkephalin degrading aminopeptidase of human brain preserved during the vertebrate phylogeny. *Comp Biochem Physiol C* 99, 363-367.
- Del Val,M., Schlicht,H.J., Ruppert,T., Reddehase,M.J., and Koszinowski,U.H. (1991). Efficient processing of an antigenic sequence for presentation by MHC class I molecules depends on its neighboring residues in the protein. *Cell* 66, 1145-1153.
- Deng,Y., Yewdell,J.W., Eisenlohr,L.C., and Bennink,J.R. (1997). MHC affinity, peptide liberation, T cell repertoire, and immunodominance all contribute to the paucity of MHC class I-restricted peptides recognized by antiviral CTL. *J. Immunol.* 158, 1507-1515.
- Denzin,L.K., Sant'Angelo,D.B., Hammond,C., Surman,M.J., and Cresswell,P. (1997). Negative regulation by HLA-DO of MHC class II-restricted antigen processing. *Science* 278, 106-109.
- Dick T. (1997). Mechanismen der intrazellulären Proteolyse im MHC-Klasse-I Weg der Antigenprozessierung. Freie Universität Berlin. (Dissertation)
- Dick,T.P., Nussbaum,A.K., Deeg,M., Heinemeyer,W., Groll,M., Schirle,M., Keilholz,W., Stevanović,S., Wolf,D.H., Huber,R., Rammensee,H.-G., and Schild,H. (1998a). Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J. Biol. Chem.* 273, 25637-25646.
- Dick,T.P., Ruppert,T., Groettrup,M., Kloetzel,P.M., Kuehn,L., Koszinowski,U.H., Stevanović,S., Schild,H., and Rammensee,H.-G. (1996). Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* 86, 253-262.
- Dick,T.P., Stevanović,S., Keilholz,W., Ruppert,T., Koszinowski,U., Schild,H., and Rammensee,H.-G. (1998b). The making of the dominant MHC class I ligand SYFPEITHI. *Eur. J. Immunol.* 28, 2478-2486.

Dubiel,W., Pratt,G., Ferrell,K., and Rechsteiner,M. (1992). Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *J. Biol. Chem.* 267, 22369-22377.

Dunn,T.B. and Potter,M. (1957). A transplantable mast-cell neoplasm in the mouse. *J. Natl. Cancer Inst.* 18, 587-601.

Eggers,M., Boes-Fabian,B., Ruppert,T., Kloetzel,P.M., and Koszinowski,U.H. (1995). The cleavage preference of the proteasome governs the yield of antigenic peptides. *J. Exp. Med.* 182, 1865-1870.

Eisenlohr,L.C., Yewdell,J.W., and Bennink,J.R. (1992). Flanking sequences influence the presentation of an endogenously synthesized peptide to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 175, 481-487.

Elliott,T., Willis,A., Cerundolo,V., and Townsend,A. (1995). Processing of major histocompatibility class I-restricted antigens in the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 181, 1481-1491.

Emmerich,N.P., Nussbaum,A.K., Stevanović,S., Priemer,M., Toes,R.E., Rammensee,H.-G., and Schild,H. (2000). The human 26S and 20S proteasomes generate overlapping but different sets of peptide fragments from a model protein substrate. *J Biol Chem.* 275, 21140-21148.

Enekel,C., Lehmann,A., and Kloetzel,P.M. (1998). Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. *EMBO J.* 17, 6144-6154.

Enekel,C., Lehmann,H., Kipper,J., Guckel,R., Hilt,W., and Wolf,D.H. (1994). PRE3, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked LMP2 (RING12) gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for the peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing activity. *FEBS Lett.* 341, 193-196.

Enekel,C. and Wolf,D.H. (1993). BLH1 codes for a yeast thiol aminopeptidase, the equivalent of mammalian bleomycin hydrolase. *J Biol Chem* 268, 7036-7043.

Falk,K., Röttschke,O., and Rammensee,H.-G. (1990). Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules [see comments]. *Nature* 348, 248-251.

Falk,K., Röttschke,O., Stevanović,S., Jung,G., and Rammensee,H.-G. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351, 290-296.

Farrer,L.A., Abraham,C.R., Haines,J.L., Rogaeva,E.A., Song,Y., McGraw,W.T., Brindle,N., Premkumar,S., Scott,W.K., Yamaoka,L.H., Saunders,A.M., Roses,A.D., Auerbach,S.A., Sorbi,S., Duara,R., Pericak-Vance,M.A., and George-Hyslop,P.H. (1998). Association between bleomycin hydrolase and Alzheimer's disease in caucasians. *Ann. Neurol.* 44, 808-811.

Fehling,H.J., Swat,W., Laplace,C., Kuhn,R., Rajewsky,K., Muller,U., and von Boehmer,H. (1994). MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science* 265, 1234-1237.

Fenteany,G., Standaert,R.F., Lane,W.S., Choi,S., Corey,E.J., and Schreiber,S.L. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268, 726-731.

Fernandez-Patron,C., Calero,M., Collazo,P.R., Garcia,J.R., Madrazo,J., Musacchio,A., Soriano,F., Estrada,R., Frank,R., and Castellanos-Serra,L.R. (1995). Protein reverse staining:

high-efficiency microanalysis of unmodified proteins detected on electrophoresis gels. *Anal. Biochem.* 224, 203-211.

Ferrando, A.A., Pendas, A.M., Llano, E., Velasco, G., Lidereau, R., and Lopez-Otin, C. (1997). Gene characterization, promoter analysis, and chromosomal localization of human bleomycin hydrolase. *J Biol Chem* 272, 33298-33304.

Früh, K., Ahn, K., Djaballah, H., Sempe, P., van Endert, P.M., Tampé, R., Peterson, P.A., and Yang, Y. (1995). A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature* 375, 415-418.

Garbi, N., Tan, P., Chambers, B.J., Ljunggren, H.G., Momburg, F., and Hammerling, G.J. (2000). Impaired immune responses and altered peptide repertoire in tapasin-deficient mice. *Nat. Immunol.* 1, 234-238.

Gavin, M.A., Gilbert, M.J., Riddell, S.R., Greenberg, P.D., and Bevan, M.J. (1993). Alkali hydrolysis of recombinant proteins allows for the rapid identification of class I MHC-restricted CTL epitopes. *J. Immunol.* 151, 3971-3980.

Geier, E., Pfeifer, G., Wilm, M., Lucchiari-Hartz, M., Baumeister, W., Eichmann, K., and Niedermann, G. (1999). A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science* 283, 978-981.

Gevaert, K., Verschelde, J.L., Puype, M., Van Damme, J., Goethals, M., De Boeck, S., and Vandekerckhove, J. (1996). Structural analysis and identification of gel-purified proteins, available in the femtomole range, using a novel computer program for peptide sequence assignment, by matrix-assisted laser desorption ionization-reflectron time-of-flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* 17, 918-924.

Gil-Torregrosa, B.C., Raul, C.A., and Del Val, M. (1998). Major histocompatibility complex class I viral antigen processing in the secretory pathway defined by the trans-Golgi network protease furin. *J Exp Med* 188, 1105-1116.

Glas, R., Bogyo, M., McMaster, J.S., Gaczynska, M., and Ploegh, H.L. (1998). A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function. *Nature* 392, 618-622.

Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-138.

Glynne, R., Powis, S.H., Beck, S., Kelly, A., Kerr, L.A., and Trowsdale, J. (1991). A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature* 353, 357-360.

Grande, A.G., Golovina, T.N., Hamilton, S.E., Sriram, V., Spies, T., Brutkiewicz, R.R., Harty, J.T., Eisenlohr, L.C., and Van Kaer, L. (2000). Impaired assembly yet normal trafficking of MHC class I molecules in Tapasin mutant mice. *Immunity.* 13, 213-222.

Groettrup, M., Soza, A., Eggers, M., Kuehn, L., Dick, T.P., Schild, H., Rammensee, H.-G., Koszinowski, U.H., and Kloetzel, P.M. (1996). A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature* 381, 166-168.

Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., and Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386, 463-471.

Gromme, M., Uytdehaag, F.G., Janssen, H., Calafat, J., van Binnendijk, R.S., Kenter, M.J., Tulp, A., Verwoerd, D., and Neefjes, J. (1999). Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 10326-10331.

- Hanada,M., Sugawara,K., Kaneta,K., Toda,S., Nishiyama,Y., Tomita,K., Yamamoto,H., Konishi,M., and Oki,T. (1992). Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. *J. Antibiot. (Tokyo)* 45, 1746-1752.
- Harris,C.A., Hunte,B., Krauss,M.R., Taylor,A., and Epstein,L.B. (1992). Induction of leucine aminopeptidase by interferon-gamma. Identification by protein microsequencing after purification by preparative two- dimensional gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 267, 6865-6869.
- Heinemeyer,W., Gruhler,A., Mohrle,V., Mahe,Y., and Wolf,D.H. (1993). PRE2, highly homologous to the human major histocompatibility complex- linked RING10 gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chrymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *J. Biol. Chem.* 268, 5115-5120.
- Henderson,R.A., Michel,H., Sakaguchi,K., Shabanowitz,J., Appella,E., Hunt,D.F., and Engelhard,V.H. (1992). HLA-A2.1-associated peptides from a mutant cell line: a second pathway of antigen presentation. *Science* 255, 1264-1266.
- Hendil,K.B., Khan,S., and Tanaka,K. (1998). Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes. *Biochem. J.* 332 ( Pt 3), 749-754.
- Hersh,L.B. (1981). Solubilization and characterization of two rat brain membrane-bound aminopeptidases active on Met-enkephalin. *Biochemistry* 20, 2345-2350.
- Hershko,A. and Ciechanover,A. (1992). The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 761-807.
- Hershko,A. and Ciechanover,A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425-479.
- Hilbi,H., Puro,R.J., and Zychlinsky,A. (2000). Tripeptidyl peptidase II promotes maturation of caspase-1 in shigella flexneri-induced macrophage apoptosis . *Infect. Immun.* 68, 5502-5508.
- Hill,A., Jugovic,P., York,I., Russ,G., Bennink,J., Yewdell,J., Ploegh,H., and Johnson,D. (1995). Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* 375, 411-415.
- Hilt,W., Enenkel,C., Gruhler,A., Singer,T., and Wolf,D.H. (1993). The PRE4 gene codes for a subunit of the yeast proteasome necessary for peptidylglutamyl-peptide-hydrolyzing activity. Mutations link the proteasome to stress- and ubiquitin-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* 268, 3479-3486.
- Hosken,N.A. and Bevan,M.J. (1992). An endogenous antigenic peptide bypasses the class I antigen presentation defect in RMA-S. *J. Exp. Med.* 175, 719-729.
- Hughes,E.A., Ortmann,B., Surman,M., and Cresswell,P. (1996). The protease inhibitor, N-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal, decreases the pool of major histocompatibility complex class I-binding peptides and inhibits peptide trimming in the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 183, 1569-1578.
- Jentsch,S. and Schlenker,S. (1995). Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. *Cell* 82, 881-884.
- Johnson,G.D. and Hersh,L.B. (1990). Studies on the subsite specificity of the rat brain puromycin-sensitive aminopeptidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 276, 305-309.
- Koldamova,R.P., Lefterov,I.M., DiSabella,M.T., Almonte,C., Watkins,S.C., and Lazo,J.S. (1999). Human bleomycin hydrolase binds ribosomal proteins. *Biochemistry* 38, 7111-7117.

- Koldamova,R.P., Lefterov,I.M., DiSabella,M.T., and Lazo,J.S. (1998a). An evolutionarily conserved cysteine protease, human bleomycin hydrolase, binds to the human homologue of ubiquitin-conjugating enzyme 9. *Mol Pharmacol* 54, 954-961.
- Koldamova,R.P., Lefterov,I.M., Gadjeva,V.G., and Lazo,J.S. (1998b). Essential binding and functional domains of human bleomycin hydrolase. *Biochemistry* 37, 2282-2290.
- Kuttler,C., Nussbaum,A.K., Dick,T.P., Rammensee,H.-G., Schild,H., and Haderer,K.P. (2000). An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages [published erratum appears in *J Mol Biol* 2000 Aug 4;301(1):229]. *J. Mol. Biol.* 298, 417-429.
- Lammert,E., Arnold,D., Nijenhuis,M., Momburg,F., Hammerling,G.J., Brunner,J., Stevanović,S., Rammensee,H.-G., and Schild,H. (1997a). The endoplasmic reticulum-resident stress protein gp96 binds peptides translocated by TAP. *Eur. J. Immunol.* 27, 923-927.
- Lammert,E., Stevanović,S., Brunner,J., Rammensee,H.-G., and Schild,H. (1997b). Protein disulfide isomerase is the dominant acceptor for peptides translocated into the endoplasmic reticulum. *Eur. J. Immunol.* 27, 1685-1690.
- Lauvau,G., Kakimi,K., Niedermann,G., Ostankovitch,M., Yotnda,P., Firat,H., Chisari,F.V., and van Endert,P.M. (1999). Human transporters associated with antigen processing (TAPs) select epitope precursor peptides for processing in the endoplasmic reticulum and presentation to T cells. *J Exp Med* 190, 1227-1240.
- Lefterov,I.M., Koldamova,R.P., and Lazo,J.S. (2000). Human bleomycin hydrolase regulates the secretion of amyloid precursor protein. *FASEB J.* 14, 1837-1847.
- Leyhausen,G., Schuster,D.K., Vaith,P., Zahn,R.K., Umezawa,H., Falke,D., and Muller,W.E. (1983). Identification and properties of the cell membrane bound leucine aminopeptidase interacting with the potential immunostimulant and chemotherapeutic agent bestatin. *Biochem. Pharmacol.* 32, 1051-1057.
- Linderoth,N.A., Popowicz,A., and Sastry,S. (2000). Identification of the peptide-binding site in the heat shock chaperone/tumor rejection antigen gp96 (Grp94). *J. Biol. Chem.* 275, 5472-5477.
- Ljunggren,H.G. and Karre,K. (1985). Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J. Exp. Med.* 162, 1745-1759.
- Lobigs,M., Chelvanayagam,G., and Mullbacher,A. (2000). Proteolytic processing of peptides in the lumen of the endoplasmic reticulum for antigen presentation by major histocompatibility class I. *Eur J Immunol* 30, 1496-1506.
- Loidl,G., Groll,M., Musiol,H.J., Ditzel,L., Huber,R., and Moroder,L. (1999a). Bifunctional inhibitors of the trypsin-like activity of eukaryotic proteasomes. *Chem. Biol.* 6, 197-204.
- Loidl,G., Groll,M., Musiol,H.J., Huber,R., and Moroder,L. (1999b). Bivalency as a principle for proteasome inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 5418-5422.
- Lopez,D. and Del Val,M. (1997). Selective involvement of proteasomes and cysteine proteases in MHC class I antigen presentation. *J Immunol* 159, 5769-5772.
- Lopez,D., Gil-Torregrosa,B.C., Bergmann,C., and Del Val,M. (2000). Sequential cleavage by metallopeptidases and proteasomes is involved in processing HIV-1 ENV epitope for endogenous MHC class I antigen presentation . *J Immunol* 164, 5070-5077.

- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., and Huber, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268, 533-539.
- Lucchiari-Hartz, M., van Endert, P.M., Lauvau, G., Maier, R., Meyerhans, A., Mann, D., Eichmann, K., and Niedermann, G. (2000). Cytotoxic T lymphocyte epitopes of HIV-1 Nef: Generation of multiple definitive major histocompatibility complex class I ligands by proteasomes. *J Exp Med* 191, 239-252.
- Luckey, C.J., King, G.M., Marto, J.A., Venketeswaran, S., Maier, B.F., Crotzer, V.L., Colella, T.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Engelhard, V.H. (1998). Proteasomes can either generate or destroy MHC class I epitopes: evidence for nonproteasomal epitope generation in the cytosol. *J Immunol* 161, 112-121.
- Madden, D.R., Gorga, J.C., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. (1991). The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* 353, 321-325.
- Mantle, D., Lauffart, B., McDermott, J., and Gibson, A. (1990). Characterization of aminopeptidases in human kidney soluble fraction. *Clin. Chim. Acta* 187, 105-113.
- McDonald, J.K., Reilly, T.J., Zeitman, B.B., and Ellis, S. (1968). Dipeptidyl arylamidase II of the pituitary. Properties of lysylalanyl- beta-naphthylamide hydrolysis: inhibition by cations, distribution in tissues, and subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 243, 2028-2037.
- McLellan, S., Dyer, S.H., Rodriguez, G., and Hersh, L.B. (1988). Studies on the tissue distribution of the puromycin-sensitive enkephalin-degrading aminopeptidases. *J Neurochem* 51, 1552-1559.
- Meng, L., Mohan, R., Kwok, B.H., Elofsson, M., Sin, N., and Crews, C.M. (1999). Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 10403-10408.
- Mo, X.Y., Cascio, P., Lemerise, K., Goldberg, A.L., and Rock, K. (1999). Distinct proteolytic processes generate the C and N termini of MHC class I-binding peptides. *J. Immunol.* 163, 5851-5859.
- Momburg, F., Roelse, J., Howard, J.C., Butcher, G.W., Hammerling, G.J., and Neefjes, J.J. (1994). Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature* 367, 648-651.
- Montoya, S.E., Aston, C.E., DeKosky, S.T., Kamboh, M.I., Lazo, J.S., and Ferrell, R.E. (1998). Bleomycin hydrolase is associated with risk of sporadic Alzheimer's disease [published erratum appears in *Nat Genet* 1998 Aug;19(4):404]. *Nat. Genet.* 18, 211-212.
- Moore, M.W., Carbone, F.R., and Bevan, M.J. (1988). Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 54, 777-785.
- Morel, S., Levy, F., Bulet-Schiltz, O., Brasseur, F., Probst-Kepper, M., Peitrequin, A.L., Monsarrat, B., Van Velthoven, R., Cerottini, J.C., Boon, T., Gairin, J.E., and Van den Eynde, B.J. (2000). Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity.* 12, 107-117.
- Murata, S., Kawahara, H., Tohma, S., Yamamoto, K., Kasahara, M., Nabeshima, Y., Tanaka, K., and Chiba, T. (1999). Growth retardation in mice lacking the proteasome activator PA28gamma. *J. Biol. Chem.* 274, 38211-38215.



- Neisig,A., Roelse,J., Sijts,A.J., Ossendorp,F., Feltkamp,M.C., Kast,W.M., Melief,C.J., and Neefjes,J.J. (1995). Major differences in transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent translocation of MHC class I-presentable peptides and the effect of flanking sequences. *J. Immunol.* *154*, 1273-1279.
- Newman,R.H., Whitehead,P., Lally,J., Coffey,A., and Freemont,P. (1996). 20S human proteasomes bind with a specific orientation to lipid monolayers in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* *1281*, 111-116.
- Niedermann,G., Butz,S., Ihlenfeldt,H.G., Grimm,R., Lucchiari,M., Hoschutzky,H., Jung,G., Maier,B., and Eichmann,K. (1995). Contribution of proteasome-mediated proteolysis to the hierarchy of epitopes presented by major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity.* *2*, 289-299.
- Niedermann,G., Grimm,R., Geier,E., Maurer,M., Realini,C., Gartmann,C., Soll,J., Omura,S., Rechsteiner,M.C., Baumeister,W., and Eichmann,K. (1997). Potential immunocompetence of proteolytic fragments produced by proteasomes before evolution of the vertebrate immune system. *J. Exp. Med.* *186*, 209-220.
- Nussbaum,A.K., Dick,T.P., Keilholz,W., Schirle,M., Stevanović,S., Dietz,K., Heinemeyer,W., Groll,M., Wolf,D.H., Huber,R., Rammensee,H.-G., and Schild,H. (1998). Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 12504-12509.
- Nussbaum, A. K., Kuttler, K. C., Haderer, K. P., Rammensee, H. G., and Schild, H. (2001). PProC: A Prediction Algorithm for Proteasomal Cleavages available on the WWW. *Immunogenetics.* (In Press)
- Obst,R., Armandola,E.A., Nijenhuis,M., Momburg,F., and Hammerling,G.J. (1995). TAP polymorphism does not influence transport of peptide variants in mice and humans. *Eur. J. Immunol.* *25*, 2170-2176.
- O'Farrell,P.A., Gonzalez,F., Zheng,W., Johnston,S.A., and Joshua-Tor,L. (1999). Crystal structure of human bleomycin hydrolase, a self-compartmentalizing cysteine protease. *Structure Fold Des* *7*, 619-627.
- Omura,S., Fujimoto,T., Otaguro,K., Matsuzaki,K., Moriguchi,R., Tanaka,H., and Sasaki,Y. (1991). Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuritogenesis of neuroblastoma cells [letter]. *J. Antibiot. (Tokyo)* *44*, 113-116.
- Ortiz-Navarrete,V., Seelig,A., Gernold,M., Frentzel,S., Kloetzel,P.M., and Hammerling,G.J. (1991). Subunit of the '20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature* *353*, 662-664.
- Ortmann,B., Androlewicz,M.J., and Cresswell,P. (1994). MHC class I/beta 2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature* *368*, 864-867.
- Otto,H. and Schirmeister,T. (1997). Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chem. Rev.* *97*, 133-171.
- Osada,T., Ikegami,S., Takiguchi-Hayashi,K., Yamazaki,Y., Katoh-Fukui,Y., Higashinagawa,T., Sakaki,Y., and Takeuchi,T. (1999). Increased anxiety and impaired pain response in puromycin-sensitive aminopeptidase gene-deficient mice obtained by a mouse gene-trap method. *J Neurosci* *19*, 6068-6078.
- Ossendorp,F., Eggers,M., Neisig,A., Ruppert,T., Groettrup,M., Sijts,A., Mengede,E., Kloetzel,P.M., Neefjes,J., Koszinowski,U., and Melief,C. (1996). A single residue exchange

within a viral CTL epitope alters proteasome-mediated degradation resulting in lack of antigen presentation. *Immunity*. 5, 115-124.

Ostrowska,H., Wojcik,C., Omura,S., and Worowski,K. (1997). Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, inhibits human platelet lysosomal cathepsin A-like enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234, 729-732.

Palombella,V.J., Rando,O.J., Goldberg,A.L., and Maniatis,T. (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- $\kappa$ B1 precursor protein and the activation of NF- $\kappa$ B. *Cell* 78, 773-785.

Pamer,E. and Cresswell,P. (1998). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 323-358.

Parham,P., Adams,E.J., and Arnett,K.L. (1995). The origins of HLA-A,B,C polymorphism. *Immunol. Rev.* 143, 141-180.

Paz,P., Brouwenstijn,N., Perry,R., and Shastri,N. (1999). Discrete proteolytic intermediates in the MHC class I antigen processing pathway and MHC I-dependent peptide trimming in the ER. *Immunity* 11, 241-251.

Pieters,J. (1997). MHC class II restricted antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 89-96.

Podack,E.R., Hengartner,H., and Lichtenheld,M.G. (1991). A central role of perforin in cytotoxicity? *Annu. Rev. Immunol.* 9, 129-157.

Preckel,T., Fung-Leung,W.P., Cai,Z., Vitiello,A., Salter-Cid,L., Winqvist,O., Wolfe,T.G., Von Herrath,M., Angulo,A., Ghazal,P., Lee,J.D., Fourie,A.M., Wu,Y., Pang,J., Ngo,K., Peterson,P.A., Früh,K., and Yang,Y. (1999). Impaired immunoproteasome assembly and immune responses in PA28<sup>-/-</sup> mice. *Science* 286, 2162-2165.

Rammensee,H.-G., Bachmann,J., Emmerich,N.P., Bachor,O.A., and Stevanović,S. (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.

Rammensee,H.-G., Falk,K., and Rötzschke,O. (1993). MHC molecules as peptide receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 35-44.

Rehm,H. (2000). Gele färben. In *Der Experimentator: Proteinbiochemie*, S. 13.

Reits,E.A., Vos,J.C., Gromme,M., and Neefjes,J. (2000). The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* 404, 774-778.

Renn,S.C., Tomkinson,B., and Taghert,P.H. (1998). Characterization and cloning of tripeptidyl peptidase II from the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 273, 19173-19182.

Rivett,A.J., Palmer,A., and Knecht,E. (1992). Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 1165-1172.

Rock,K.L. and Clark,K. (1996). Analysis of the role of MHC class II presentation in the stimulation of cytotoxic T lymphocytes by antigens targeted into the exogenous antigen-MHC class I presentation pathway. *J. Immunol.* 156, 3721-3726.

Rock,K.L., Gramm,C., Rothstein,L., Clark,K., Stein,R., Dick,L., Hwang,D., and Goldberg,A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761-771.

- Rose, C., Vargas, F., Facchinetti, P., Bourgeat, P., Bambal, R.B., Bishop, P.B., Chan, S.M., Moore, A.N., Ganellin, C.R., and Schwartz, J.C. (1996). Characterization and inhibition of a cholecystokinin-inactivating serine peptidase. *Nature* 380, 403-409.
- Rötzschke, O. and Falk, K. (1994). Origin, structure and motifs of naturally processed MHC class II ligands. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 45-51.
- Rötzschke, O., Falk, K., Stevanović, S., Jung, G., Walden, P., and Rammensee, H.-G. (1991). Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur. J. Immunol.* 21, 2891-2894.
- Rudd, C.E. (1996). Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function. *Immunity.* 4, 527-534.
- Rudensky, A.Y., Preston-Hurlburt, P., Hong, S.C., Barlow, A., and Janeway, C.A., Jr. (1991). Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353, 622-627.
- Rudner, D.Z., Fawcett, P., and Losick, R. (1999). A family of membrane-embedded metalloproteases involved in regulated proteolysis of membrane-associated transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 14765-14770.
- Sadasivan, B., Lehner, P.J., Ortmann, B., Spies, T., and Cresswell, P. (1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity.* 5, 103-114.
- Safavi, A. and Hersh, L.B. (1995). Degradation of dynorphin-related peptides by the puromycin-sensitive aminopeptidase and aminopeptidase M. *J. Neurochem.* 65, 389-395.
- Sasaki, T., Kishi, M., Saito, M., Tanaka, T., Higuchi, N., Kominami, E., Katunuma, N., and Murachi, T. (1990). Inhibitory effect of di- and tripeptidyl aldehydes on calpains and cathepsins. *J. Enzyme Inhib.* 3, 195-201.
- Schägger, H., Cramer, W.A., and von Jagow, G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217, 220-230.
- Scherrer, K. and Bey, F. (1994). The prosomes (multicatalytic proteinases; proteasomes) and their relationship to the untranslated messenger ribonucleoproteins, the cytoskeleton, and cell differentiation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 49, 1-64.
- Schirle, M., Keilholz, W., Weber, B., Gouttefangeas, C., Dumrese, T., Becker, H.D., Stevanović, S., and Rammensee, H.-G. (2000). Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach. *Eur. J. Immunol.* 30, 2216-2225.
- Schoenberger, S.P., Toes, R.E., van der Voort, E.I., Offringa, R., and Melief, C.J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393, 480-483.
- Schröter, C.J. (1999). Die Rolle endosomaler-lysosomaler Proteasen bei der Prozessierung MHC Klasse II-präsentierter Antigene. Universität Tübingen. (Dissertation)
- Schubert, U., Anton, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W., and Bennink, J.R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774.

- Schumacher, T.N., Kantesaria, D.V., Heemels, M.T., Ashton-Rickardt, P.G., Shepherd, J.C., Früh, K., Yang, Y., Peterson, P.A., Tonegawa, S., and Ploegh, H.L. (1994). Peptide length and sequence specificity of the mouse TAP1/TAP2 translocator. *J. Exp. Med.* *179*, 533-540.
- Schwartz, D.R., Homanics, G.E., Hoyt, D.G., Klein, E., Abernethy, J., and Lazo, J.S. (1999). The neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for epidermal integrity and bleomycin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 4680-4685.
- Seemuller, E., Lupas, A., and Baumeister, W. (1996). Autocatalytic processing of the 20S proteasome. *Nature* *382*, 468-471.
- Serwold, T. and Shastri, N. (1999). Specific proteolytic cleavages limit the diversity of the pool of peptides available to MHC class I molecules in living cells. *J. Immunol.* *162*, 4712-4719.
- Seufert, W., Futcher, B., and Jentsch, S. (1995). Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* *373*, 78-81.
- Shepherd, J.C., Schumacher, T.N., Ashton-Rickardt, P.G., Imaeda, S., Ploegh, H.L., Janeway, C.A., Jr., and Tonegawa, S. (1993). TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective [published erratum appears in *Cell* 1993 Nov 19;75(4):613]. *Cell* *74*, 577-584.
- Shevach, E.M., Stobo, J.D., and Green, I. (1972). Immunoglobulin and theta-bearing murine leukemias and lymphomas. *J. Immunol.* *108*, 1146-1151.
- Sijts, A.J., Neisig, A., Neeffjes, J., and Pamer, E.G. (1996). Two *Listeria monocytogenes* CTL epitopes are processed from the same antigen with different efficiencies. *J. Immunol.* *156*, 683-692.
- Siliciano, R.F. and Soloski, M.J. (1995). MHC class I-restricted processing of transmembrane proteins. Mechanism and biologic significance. *J. Immunol.* *155*, 2-5.
- Snyder, H.L., Bacik, I., Bennink, J.R., Kearns, G., Behrens, T.W., Bachi, T., Orłowski, M., and Yewdell, J.W. (1997). Two novel routes of transporter associated with antigen processing (TAP)-independent major histocompatibility complex class I antigen processing. *J. Exp. Med.* *186*, 1087-1098.
- Snyder, H.L., Bacik, I., Yewdell, J.W., Behrens, T.W., and Bennink, J.R. (1998). Promiscuous liberation of MHC-class I-binding peptides from the C termini of membrane and soluble proteins in the secretory pathway. *Eur. J. Immunol.* *28*, 1339-1346.
- Snyder, H.L., Yewdell, J.W., and Bennink, J.R. (1994). Trimming of antigenic peptides in an early secretory compartment. *J Exp Med* *180*, 2389-2394.
- Soza, A., Knuehl, C., Groettrup, M., Henklein, P., Tanaka, K., and Kloetzel, P.M. (1997). Expression and subcellular localization of mouse 20S proteasome activator complex PA28. *FEBS Lett.* *413*, 27-34.
- Spee, P. and Neeffjes, J. (1997). TAP-translocated peptides specifically bind proteins in the endoplasmic reticulum, including gp96, protein disulfide isomerase and calreticulin. *Eur. J. Immunol.* *27*, 2441-2449.
- Speidel, K., Osen, W., Faath, S., Hilgert, I., Obst, R., Braspenning, J., Momburg, F., Hammerling, G.J., and Rammensee, H.-G. (1997). Priming of cytotoxic T lymphocytes by five heat-aggregated antigens in vivo: conditions, efficiency, and relation to antibody responses. *Eur. J. Immunol.* *27*, 2391-2399.

- Srivastava,P.K., Udono,H., Blachere,N.E., and Li,Z. (1994). Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics* 39, 93-98.
- Staerz,U.D., Karasuyama,H., and Garner,A.M. (1987). Cytotoxic T lymphocytes against a soluble protein. *Nature* 329, 449-451.
- Stoltze, L. Einfluß von Epitop-flankierenden Aminosäuren auf die Proteasom-abhängige Antigenprozessierung im MHC-Klasse-I-Weg. 1998. Universität Tübingen. (Diplomarbeit)
- Stoltze,L., Dick,T.P., Deeg,M., Pommerl,B., Rammensee,H.-G., and Schild,H. (1998). Generation of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein cytotoxic T lymphocyte epitope requires proteasome-dependent and -independent proteolytic activities. *Eur J Immunol* 28, 4029-4036.
- Stoltze,L., Schirle,M., Schwarz,G., Schröter,C., Thompson,M.W., Hersh,L.B., Kalbacher,H., Stevanović,S., Rammensee,H.-G., and Schild,H. (2000). Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat. Immunol.* 1, 413-418.
- Storkus,W.J., Zeh,H.J., III, Salter,R.D., and Lotze,M.T. (1993). Identification of T-cell epitopes: rapid isolation of class I-presented peptides from viable cells by mild acid elution. *J. Immunother.* 14, 94-103.
- Sweetser,M.T., Morrison,L.A., Braciale,V.L., and Braciale,T.J. (1989). Recognition of pre-processed endogenous antigen by class I but not class II MHC-restricted T cells. *Nature* 342, 180-182.
- Tamura,N., Lottspeich,F., Baumeister,W., and Tamura,T. (1998). The role of tricorn protease and its aminopeptidase-interacting factors in cellular protein degradation. *Cell* 95, 637-648.
- Tamura,T., Nagy,I., Lupas,A., Lottspeich,F., Cejka,Z., Schoofs,G., Tanaka,K., De Mot,R., and Baumeister,W. (1995). The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*. *Curr. Biol.* 5, 766-774.
- Tamura,T., Tamura,N., Cejka,Z., Hegerl,R., Lottspeich,F., and Baumeister,W. (1996). Tricorn protease--the core of a modular proteolytic system. *Science* 274, 1385-1389.
- Tanahashi,N., Murakami,Y., Minami,Y., Shimbara,N., Hendil,K.B., and Tanaka,K. (2000). Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* 275, 14336-14345.
- Thompson,M.W., Tobler,A., Fontana,A., and Hersh,L.B. (1999). Cloning and analysis of the gene for the human puromycin-sensitive aminopeptidase. *Biochem Biophys Res Commun* 258, 234-240.
- Tivol,E.A., Borriello,F., Schweitzer,A.N., Lynch,W.P., Bluestone,J.A., and Sharpe,A.H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity.* 3, 541-547.
- Toes, R. E., Nussbaum, A. K., Schirle, M., Kraft, M., Emmerich, N. P., Zwinderman, T. P., Dick, T. P., Müller, J., Schönfish, S., Stevanović, S., Rammensee, H. G., and Schild, H. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. 2000. (submitted)
- Uebel,S., Kraas,W., Kienle,S., Wiesmuller,K.H., Jung,G., and Tampé,R. (1997). Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 8976-8981.

Uebel,S. and Tampé,R. (1999). Specificity of the proteasome and the TAP transporter. *Curr. Opin. Immunol.* *11*, 203-208.

Ulmer,J.B., Donnelly,J.J., Parker,S.E., Rhodes,G.H., Felgner,P.L., Dwarki,V.J., Gromkowski,S.H., Deck,R.R., DeWitt,C.M., and Friedman,A. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein . *Science* *259*, 1745-1749.

Umezawa,H., Hori,S., Sawa,T., Yoshioka,T., and Takeuchi,T. (1974). A bleomycin-inactivating enzyme in mouse liver. *J Antibiot (Tokyo)* *27*, 419-424.

Valmori,D., Gileadi,U., Servis,C., Dunbar,P.R., Cerottini,J.C., Romero,P., Cerundolo,V., and Levy,F. (1999). Modulation of proteasomal activity required for the generation of a cytotoxic T lymphocyte-defined peptide derived from the tumor antigen MAGE-3. *J. Exp. Med.* *189*, 895-906.

van Bleek,G.M. and Nathenson,S.G. (1990). Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2Kb molecule . *Nature* *348*, 213-216.

van Endert,P.M. (1999). Genes regulating MHC class I processing of antigen. *Curr. Opin. Immunol.* *11*, 82-88.

van Endert,P.M., Riganelli,D., Greco,G., Fleischhauer,K., Sidney,J., Sette,A., and Bach,J.F. (1995). The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. *J. Exp. Med.* *182*, 1883-1895.

Van Kaer,L., Ashton-Rickardt,P.G., Eichelberger,M., Gaczynska,M., Nagashima,K., Rock,K.L., Goldberg,A.L., Doherty,P.C., and Tonegawa,S. (1994). Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice. *Immunity* *1*, 533-541.

Vinitzky,A., Anton,L.C., Snyder,H.L., Orłowski,M., Bennink,J.R., and Yewdell,J.W. (1997). The generation of MHC class I-associated peptides is only partially inhibited by proteasome inhibitors: involvement of nonproteasomal cytosolic proteases in antigen processing? *J. Immunol.* *159*, 554-564.

Wei,M.L. and Cresswell,P. (1992). HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides . *Nature* *356*, 443-446.

Weihofen,A., Lemberg,M.K., Ploegh,H.L., Bogyo,M., and Martoglio,B. (2000). Release of signal peptide fragments into the cytosol requires cleavage in the transmembrane region by a protease activity that is specifically blocked by a novel cysteine protease inhibitor . *J. Biol. Chem.* *275*, 30951-30956.

Westermeier,R. (2000). *Electrophoresis in Practice*. VCH.

Whitby,F.G., Masters,E.I., Kramer,L., Knowlton,J.R., Yao,Y., Wang,C.C., and Hill,C.P. (2000). Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators . *Nature* *408*, 115-120.

Wiertz,E.J., Tortorella,D., Bogyo,M., Yu,J., Mothes,W., Jones,T.R., Rapoport,T.A., and Ploegh,H.L. (1996). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction . *Nature* *384*, 432-438.

Wojcik,C., Tanaka,K., Paweletz,N., Naab,U., and Wilk,S. (1998). Proteasome activator (PA28) subunits, alpha, beta and gamma (Ki antigen) in NT2 neuronal precursor cells and HeLa S3 cells. *Eur. J. Cell Biol.* *77*, 151-160.

---

Wolfel,C., Drexler,I., Van Pel,A., Thres,T., Leister,N., Herr,W., Sutter,G., Huber,C., and Wolfel,T. (2000). Transporter (TAP)- and proteasome-independent presentation of a melanoma-associated tyrosinase epitope . *Int. J. Cancer* 88, 432-438.

Xu,H.E. and Johnston,S.A. (1994). Yeast bleomycin hydrolase is a DNA-binding cysteine protease. Identification, purification, biochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 269, 21177-21183.

Yellen-Shaw,A.J., Wherry,E.J., Dubois,G.C., and Eisenlohr,L.C. (1997). Point mutation flanking a CTL epitope ablates in vitro and in vivo recognition of a full-length viral protein. *J. Immunol.* 158, 3227-3234.

Yewdell,J.W., Anton,L.C., and Bennink,J.R. (1996). Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J Immunol* 157, 1823-1826.

Yewdell,J.W. and Bennink,J.R. (1999). Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 51-88.

Zhang,Q.J., Chen,S.S., Saari,C.A., Massuci,M.G., Tufaro,F., and Jefferies,W.A. (2000). Evidence of selective processing of immunodominant epitopes in virally infected cells. *J. Immunol.* 164, 4513-4521.

Zheng,W., Johnston,S.A., and Joshua-Tor,L. (1998). The unusual active site of Gal6/bleomycin hydrolase can act as a carboxypeptidase, aminopeptidase, and peptide ligase. *Cell* 93, 103-109.

Zinkernagel,R.M. and Doherty,P.C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248, 701-702.

## 8. Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen

**Stoltze,L.**, Dick,T.P., Deeg,M., Pommerl,B., Rammensee,H-G., and Schild,H. (1998). Generation of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein cytotoxic T lymphocyte epitope requires proteasome-dependent and -independent proteolytic activities. *Eur J Immunol* 28, 4029-4036.

**Stoltze,L.**, Nussbaum,A.K., Sijts,A., Emmerich,N.P., Kloetzel,P.M., and Schild,H. (2000). The function of the proteasome system in MHC class I antigen processing. *Immunol. Today* 21, 317-319.

**Stoltze,L.**, Schirle,M., Schwarz,G., Schröter,C., Thompson,M.W., Hersh,L.B., Kalbacher,H., Stevanović,S., Rammensee,H-G., and Schild,H. (2000). Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nature Immunol.* 1, 413-418.

Hofmann,M. , Nussbaum,A.K., Emmerich,N.P., **Stoltze,L.**, and Schild,H. (2001). Mechanisms of antigen presentation. *Emerging Therapeutic Targets* (in press)



---

## Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee, für das Demonstrieren eines außergewöhnlichen Führungsstils in seiner Arbeitsgruppe. Dies beinhaltet besonders die Überlassung großer Freiheiten während des Arbeitens und die Möglichkeit jede Art von Kongress zu besuchen, inklusive der Ermöglichung von Betriebsseminaren und –ausflügen.

Dr. Stefan Stevanović sei für seine motivierende Arbeitshaltung und seine bereitwillige Bereitschaft jede dumme Frage zu beantworten gedankt.

Bei Dr. Hansjörg Schild bedanke ich mich für sein permanentes Interesse an der Arbeit, seinen immer regen Gedankenaustausch und der Hilfe beim Schreiben der Paper.

Das ganze Labor der Arbeitsgruppe bekommt ein Dankeschön für seine anregende Arbeitsatmosphäre. Besonderer Dank gilt dabei Sascha Nußbaum und Markus Schirle für gemeinsamen Spaß neben der Laborarbeit bei Skitouren, Klettern oder Wandern.

Auch für die Hilfe der Kooperationspartner Christian Schröter, Gerold Schwarz und Hubert Kalbacher möchte ich mich bedanken. Ohne sie hätte ich die Freeflow Elektrophorese nie kennengelernt.

Den Freizeitkickern danke ich dafür, dass man wenigstens einmal in der Woche zum Schwitzen gekommen ist und der vom Sitzen schmerzende Rücken wieder gerade gebogen wurde.

Am meisten danke ich aber Daniela, die alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit ertragen musste.

## **Akademische Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren:

Anderer, Bisswanger, Bohley, Büsen, Eisele, Gauglitz, Grabmayer, Günzl, Hagenmaier, Hamprecht, Hanack, Hoffmann, Jung, Kalbacher, Kaiser, Lindner, Mayer, Mecke, Metzner, Nakel, Oberhammer, Pfeiffer, Pommer, Probst, Rammensee, Reutter, Staudt, Strähle, Stegmann, Voelter, Wagner, Walden, Weser, Wiesinger, Wohlleben.

---

## **Tabellarischer Lebenslauf**

### **Die Person**

Name:	Stoltze
Vorname:	Lars
Geburtstag:	10.09.1971
Geburtsort:	Bonn
Status:	verheiratet

---

### **Die Ausbildung**

09.78 - 06.82	Grundschule in Alsfeld/Hessen
06.91	Abitur an der Goetheschule Kassel
10.91 - 09.92	Wehrdienst: Hochgebirgszug Bad Reichenhall
10.92	Beginn des Biochemiestudiums an der Universität Tübingen
06.95 - 08.95	Studienaufenthalt: H.E.J Research Institute of Chemistry; Karachi; Pakistan
09.95 - 12.95	Praktikum: Agresearch; Hamilton; Neuseeland
07.97 - 03.98	Diplomarbeit am Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. H.-G. Rammensee
03.98	Beendigung des Biochemiestudiums an der Universität Tübingen
04.98 – 03.01	Doktorarbeit am Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. H.-G. Rammensee

---

Tübingen, den 05.04.01