

**Protein – Disassembly
im Verlauf der
endosomalen Prozessierung**

Dissertation

**Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“**

am Fachbereich Biologie der
Johannes Gutenberg Universität
Mainz

**Holger Kremmin
geb. in Rheinbach**

Mainz, im Jahre 2000

Für Gabriela

Die in der vorliegenden Dissertation zusammengefassten Ergebnisse wurden von Juni 1997 bis Oktober 1999 am Institut für Immunologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz erarbeitet.

Dekan: Prof. Dr. XXXX

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. XXXX

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. XXXX

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2000

Ich danke Herrn Prof. Dr. XXXX und Herrn Prof. Dr. XXXX für Ihr Interesse und die Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen und die Gutachten zu erstellen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. XXXX für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seiner Arbeitsgruppe, die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen sowie die kritische Durchsicht des Manuskripts dieser Arbeit.

Mein weiterer Dank gilt:

Herrn Dipl. Biol. XXXX für die wertvollen Diskussionen und guten Ratschläge während dieser Dissertation sowie für konstruktive Ratschläge bei der Erstellung des Manuskripts.

Herrn Dipl. Biol. XXXX und Herrn Dipl. Biol. XXXX für viele angeregte Diskussionen.

Herrn cand.med. XXXX und Herrn Dipl. Biol. XXXX für gute Zusammenarbeit.

Herrn Dipl. Biol. XXXX und Frau Dipl. Biol. XXXX für stete Diskussionsbereitschaft während dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. XXXX für die gute Zusammenarbeit während des Laboralltages und stete Diskussionsbereitschaft.

Teile dieser Arbeit wurden bereits oder werden veröffentlicht:

Holger Kremmin and Konrad Reske: Binding properties of peptides bound to the rat MHC class II molecule RT1.B^I evaluated by Molecular Modeling methods; in Vorbereitung

Holger Kremmin , Martin Blüggel, Helmut E. Meyer and Konrad Reske: Intracellular processing kinetics of FITC labeled OVALBUMIN in bone marrow derived LEWIS rat macrophages in response to external stimuli; in Vorbereitung

Albert Sickmann, Martin Blüggel, Michael Kulke, Holger Kremmin, Alexandra Marx, Konrad Reske and Helmut E. Meyer: Identification of major histocompatibility complex class II-associated peptides derived from freshly prepared rat Langerhans cells using MALDI-PSD and Edman degradation; **Analyst** **125**: 569-573; 2000

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst habe.
Quellen und Hilfsmittel sind vollständig angegeben.

Remagen, den 1. Juni 2000

(Holger Kremmin)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 26. Juli 1967
Geburtsort : Rheinbach
Familienstand: Verheiratet, ein Kind
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Bildungsgang

08/78 – 06/85 Vinzenz – Pallotti - Kolleg, Rheinbach
Privates Gymnasium für Jungen
7. Juni 1985 Sekundarabschluss I – Fachoberschulreife –
08/85 – 06/88 Städtisches Gymnasium Rheinbach
16. Juni 1988 Allgemeine Hochschulreife – Abitur –
09/88 – 09/90 Rheinische Friedrich – Wilhelms - Universität Bonn
Studium der Chemie
04/91 – 09/97 Johannes Gutenberg – Universität Mainz
Studium der Biologie
12/93 – 03/94 Diplom – Vorprüfung in den Fächern
Botanik, Zoologie, Chemie und Mathematik
12/95 – 02/96 Mündliche Diplomprüfung in den Fächern
Biophysik, Genetik, Immunologie und Zoologie
12. Mai 1997 Diplom – Hauptprüfung in Biologie
Abschluss als Diplom Biologe
10/97 – 04/00 Johannes Gutenberg – Universität Mainz
Studium der Physik
05/97 – 04/00 Doktorand am Inst. für Immunologie
Thema der Dissertation:
„Protein-Disassembly im Verlauf der endosomalen
Antigen-Prozessierung“

Berufstätigkeit als

Diplom Biologe

05/97 – 04/00 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Johannes
Gutenberg Universität Mainz, Institut für Immunologie
seit 1.5.2000 Software Engineer bei LION Bioscience AG, Heidelberg

Furcht nämlich das ist des Menschen Erb- und Grundgefühl; aus der Furcht erklärt sich Jegliches, Erbsünde und Erbtugend. Aus der Furcht wuchs auch meine Tugend, die heisst: Wissenschaft.

Die Furcht nämlich vor wildem Gethier – die wurde dem Menschen am längsten anzüchtet, einschliesslich das Thier, das er in sich selber birgt und fürchtet: - Zarathustra heisst es „das innere Vieh.“

Solch lange alte Furcht, endlich fein geworden, geistlich, geistig – heute, dünkt mich, heisst sie: Wissenschaft.

Also sprach Zarathustra IV, Von der Wissenschaft
Friedrich Nietzsche

Zusammenfassung

Die Prozessierung von internalisierten Proteinantigenen und die Beladung von MHC Klasse II – Heterodimeren mit den prozessierten Proteinfragmenten in Antigen präsentierenden Zellen sind Schlüsselprozesse der antigenspezifischen Immunantwort. In dieser Arbeit wurden grundlegende Studien durchgeführt, um die Antigenprozessierung in Makrophagen und dendritischen Zellen auf molekularer Ebene zu untersuchen. Als Sonde für die Antigenprozessierung wurde das Modellprotein Ovalbumin verwendet. Dieses wurde hoch gereinigt und mit einem Fluoreszenzmarker versehen.

In Kinetikexperimenten wurde gezeigt, dass unabhängig vom Aktivierungszustand der akzessorischen Zellen ein Großteil des intakten Ovalbumins in den Zellen persistiert. Der Abbau des Proteins beginnt in den späten Endosomen und führt zu einem distinkten 40kD Abbaufragment. Der weitere schrittweise Abbau des Proteins findet in den Lysosomen statt. Die Edmann – Sequenzierung des Fragmentes ergab, dass die initiale Spaltung des Ovalbumin in einem zweistufigen Prozess abläuft. Beide Prozessierungsschritte erfolgen schnell aufeinander. Der erste Abbauschritt generiert das dominante Ovalbumin – Epitop OVA₃₂₃₋₃₃₉.

LPS – Stimulation der KMMØ hatte zur Folge, dass die gleichen in nicht stimulierten Zellen beobachteten Fragmente gebildet wurden, jedoch zu einem erheblich späteren Zeitpunkt. In Gegenwart der Proteinase – Inhibitoren Leupeptin und Pepstatin A war diese verzögerte Degradierung nicht zu beobachten. LPS induziert vermutlich weitere Enzyme, die an der Prozessierung von Ovalbumin beteiligte Proteinasen beeinträchtigen. Eine vollständige Hemmung des Abbaus konnte jedoch nicht erreicht werden.

Mit *Molecular Modelling* – Studien wurde ein Molekülmodell des Ratten MHC Klasse II – Moleküls RT1.B¹ entwickelt und dessen Bindungsspezifität untersucht. Wesentliche Eigenschaften der RT1.B¹ – Peptid Interaktionen wurden ermittelt. Auf der Grundlage der berechneten Molekülmodelle wurde ein Wirkmechanismus für die durch DM-Moleküle katalysierte Peptidbeladung von RT1.B¹ postuliert. Bei einer Kooperativität der Wasserstoffbrücken – Bindungen genügt die Lösung einer einzigen Wasserstoffbrücke zwischen Peptid und MHC Klasse II – Molekül, um die Dissoziation von schwach gebundenen Peptiden erheblich zu beschleunigen. Hochaffine Binder werden hierdurch jedoch nicht beeinflusst.

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
AP	Alkalische Phosphatase
BSA	Bovines Serum Albumin
CA	Conalbumin
CAT	Kathepsin
DC	Dendritische Zellen
Dig	Digoxigenin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein
Gln	Glutamin
GM-CSF	„Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor“
HEL	Hühner-Lysozym
HS	Pferde Serum
INF	Interferon
IU	Internationale Einheit
KD	Kilodalton
KMMØ	Knochenmarksmakrophagen
LC	Langerhans Zellen
MAK	monoklonaler Antikörper
M-CSF	„Macrophage Colony Stimulating Factor“
MD	„Molecular Dynamics“
MM	„Molecular Modeling“
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
POD	Peroxidase
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
R.M.S.	„Root Mean Square“
SDS	Natriumdodecylsulfat
TRP	Trypsin
V/V	Volumenprozent
W/W	Gewichtsprozent

1. Einleitung	1
1.1 Die Antigenpräsentation	2
1.2 Antigenpräsentierende Zellen	3
1.2.1 Dendritische Zellen	3
1.2.2 Mononukleare Phagozyten	5
1.3 MHC-Klasse II restringierte Antigen-Präsentation	6
1.3.1 Struktur der MHC-Klasse II-Moleküle	8
1.3.2 Die invariante Kette	10
1.3.3 Funktion des DM-Moleküls bei der Peptidbeladung von MHC-Klasse II Molekülen	12
1.4 Problemstellung der Arbeit	14
2. Material und Methoden	16
2.1 Grundaustattung	16
2.1.1 Allgemeine Laborgeräte	16
2.1.2 Plastikwaren	16
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	17
2.1.4 Puffer für proteinbiochemische Arbeiten	17
2.1.5 Detergentien	17
2.1.6 Modellantigen	18
2.1.7 Proteasen und Proteaseninhibitoren	18
2.1.8 Zytokine und Antikörper	19
2.1.9 Molekulargewichtsstandards	21
2.1.10 Versuchstiere und Zelllinien	21
2.2 Methoden der Zellkultur	22
2.2.1 Puffer, Lösungen und Medien für die Zellkultur	22
2.2.2 Seren zur Supplementierung von Medien und Puffern	23
2.2.3 Kulturbedingungen	23
2.2.4 Organentnahme und Zellpräparation	24
2.2.4.1 Knochenmarkpräparation	24
2.2.4.2 Lyse der Erythrozyten	24
2.2.4.3 Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität	25
2.2.5 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen	25
2.2.6 In vitro Generation von dendritischen Zellen	25
2.2.6.1 Dendritische Zellen aus Knochenmarkskulturen	26
2.2.6.2 Anreicherung von DC aus Knochenmarkskulturen	26
2.2.6.3 Beladung von magnetischen Partikeln mit Antikörper	26
2.2.7 Gewinnung von Knochenmarksmakrophagen	27
2.2.8 Solubilisierung von Zellen	27
2.2.8.1 Solubilisierung mit ionischem Detergens	27
2.2.8.2 Solubilisierung mit nichtionischem Detergens	27
2.3 Elektrophoretische Methoden	28
2.3.1 Allgemeines	28
2.3.2 Eindimensionale SDS - Polyacrylamid Gelelektrophorese	29
2.3.2.1 Materialien und Lösungen	29
2.3.2.2 Zusammensetzung der Gele	30

2.3.2.3	Vorbereitungen	31
2.3.2.4	Durchführung der Gelelektrophorese	31
2.3.3	Zweidimensionale Gelelektrophorese	31
2.3.3.1	Materialien und Lösungen	32
2.3.3.2	Vorbereitungen	32
2.3.3.3	Durchführung der zweidimensionalen Elektrophorese	33
2.3.4	Nachweis unmarkierter Proteine durch Silberfärbung	34
2.3.4.1	Reagenzien	34
2.3.4.2	Durchführung	34
2.3.5	Markierung von Proteinen mit Fluorescein oder Digoxigenin	35
2.3.5.1	Materialien und Lösungen	36
2.3.5.2	Durchführung der Markierungsreaktion	36
2.3.6	Proteintransfer auf PVDF-Membran	37
2.3.6.1	Materialien und Lösungen	37
2.3.6.2	Durchführung	38
2.3.7	Nachweis der an PVDF-Membran gebundenen Proteine	39
2.3.8	Nachweis markierter Proteine	39
2.3.8.1	Materialien und Lösungen	40
2.3.8.2	Nachweis von Fluorescein-markierten Proteinen	41
2.3.8.3	Nachweis von Digoxigenin-markierten Proteinen	41
2.4	Chromatographische Methoden	42
2.4.1	Prinzip der Gelfiltration	42
2.4.2	Prinzip der Ionenaustausch- Chromatographie	43
2.4.3	Basisaufbau des FPLC-Systems	44
2.4.3.1	Der Chromatographie-Kontroller LCC 500	45
2.4.3.2	Die Kolbenpumpe P-500	45
2.4.3.3	Das Motorventil MV-7	45
2.4.3.4	Der Fraktionssammler FRAC -100	46
2.4.3.5	Der Monitor UV-1	46
2.4.4	Gelfiltration mit der Superose 12 - Säule	46
2.4.4.1	Proben- und Puffervorbereitung	47
2.4.4.2	Durchführung der Gelfiltration	47
2.4.4.3	Regeneration der Säule	48
2.4.5	Anionenausch- Chromatographie mit POROS HQ/F und MonoQ HR10/10	48
2.4.5.1	Proben und Puffervorbereitung	48
2.4.5.2	Durchführung der Anionenaustauschchromatographie	49
2.5	Enzymatische Verdauung der Modellproteine in vitro	49
2.5.1	In vitro Verdauung der unmarkierten Modellantigene	50
2.5.2	In vitro Verdauung der markierten Modellantigene	50
2.6	Durchführung der intrazellulären Prozessierung von markierten Antigenen	51
2.7	Molekulargenetische Arbeiten	52
2.7.1	Isolierung von Gesamt- RNA aus eukaryontischen Zellen	52
2.7.1.1	Einfrieren von Zellen für RNA- Präparationen	52
2.7.1.2	Präparation der RNA	52
2.7.1.3	Photometrische Mengenbestimmung	53
2.7.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	54
2.7.3	PCR – Methoden	55

2.7.3.1	cDNA – Synthese mit dem ThermoScript RT-PCR System	56
2.7.3.2	Durchführung der PCR	57
2.8	Fotodokumentation	59
2.8.1	Entwicklung der Röntgenfilme	59
2.8.2	Herstellung und Entwicklung von Negativaufnahmen	59
2.8.3	Anfertigung von Positivabzügen	60
2.9	Computerprogramme	60
2.9.1	Visualisierungs- und Sequenzprogramme	61
2.9.1.1	RASMOL	61
2.9.1.2	SeqVu	61
2.9.1.3	VMD 1.3	61
2.9.1.4	MolScript v2.1	61
2.9.1.5	ClustalX 1.8	62
2.9.2	Molecular Modelling Programme	62
2.9.2.1	Modeller 4	62
2.9.2.2	AutoDock Version 3.0	63
2.9.2.3	TINKER 3.7	63
2.9.2.4	CCP4	63
2.9.3	Programme zur Strukturintegritätsprüfung	64
2.9.3.1	WhatCheck 4.99g	64
2.9.3.2	Procheck	64
3.	Ergebnisse	65
3.1	Proteinbiochemische und molekularbiologische Untersuchungen	66
3.1.1	Aufreinigung des Modellprotein Ovalbumin	66
3.1.2	Markierung und Nachweis von Ovalbumin	71
3.1.3	In vitro Verdauung von FITC markiertem Ovalbumin	73
3.1.4	2D – Analyse von enzymatisch abgebauten FITC- Ovalbumin	74
3.1.5	Molekularbiologische Untersuchungen	77
3.1.5.1	RNA – Isolation aus Knochenmarks - Makrophagen	77
3.1.5.2	RT – PCR Nachweis lysosomaler Proteinasen	78
3.1.6	Aufnahme von FITC-OVA durch KMMØ	79
3.1.7	Solubilisierungsbedingungen für FITC-OVA gepulste Zellen und Trennbedingungen für die Zellsolubilisate	81
3.1.8	Kinetik der Antigenprozessierung durch Knochenmarksmakrophagen	83
3.1.9	Einfluß des Aspartat- Proteinase - Inhibitors Pepstatin A auf die Kinetik der Antigenprozessierung	87
3.1.10	Kinetikanalyse der Antigenprozessierung unter dem Einfluß des SH- Proteinase - Inhibitors Leupeptin	89
3.1.11	Einfluß verschiedener Proteinaseinhibitoren auf die Antigenprozessierung	91
3.1.12	Zweidimensionale Analyse der Antigenprozessierung durch unstimulierte Makrophagen	95
3.1.13	Prozessierung von FITC – OVA durch dendritische Zellen	95
3.1.14	Edmann – Sequenzierung der aus MØ isolierten Fragmente von FITC-OVA	98
3.2	Biophysikalisch – theoretische Untersuchungen	102
3.2.1	Struktur der kristallisierten MHC Klasse II und DM-Moleküle	103
3.2.1.1	Topologiediagramm des MHC Klasse II Molekül	106

3.2.1.2	Sequenzvergleich der aufgelösten Strukturen mit RT1B – Sequenzen	107
3.2.2	Komparatives Modelling des RT1.B – Komplexes	110
3.2.2.1	Peptidbindungsgrube des RT1.B ¹ Moleküls	114
3.2.3	<i>Docking</i> von Peptiden in die Bindungsgrube des RT1.B ¹ – Modells	118
3.2.3.1	<i>Docking</i> von Peptiden mit Hilfe von <i>AutoDock 3</i>	118
3.2.3.2	<i>Docking</i> von Peptiden in der Bindungsgrube des RT1.B ¹ – Moleküles mit Hilfe des Programmes Modeller 4	120
3.2.4	Potentielle Energie der RT1.B ¹ – Peptid Komplexe	123
3.2.5	Konformationsvergleich des I-A ^k -HEL ₅₀₋₆₂ und RT1.B ¹ -HEL ₅₀₋₆₂ – Komplexes	124
3.2.6	Konformationsvergleich des RT1.B ¹ -CLIP und RT1.B ¹ -CLIPm – Modells	125
3.2.7	Molekulare Kontakte zwischen dem RT1.B Molekül und dem CLIP-Peptid	126
3.2.8	Intermolekulare Wechselwirkungen zwischen RT1.B ¹ und CLIPm	129
3.2.9	Analyse der Wechselwirkungen zwischen RT1.B ¹ und HEL ₅₀₋₆₂	131
3.2.10	<i>Van der Waals</i> und Wasserstoffbrücken – Kontakte von OVA ₃₂₃₋₃₃₅ mit dem RT1.B ¹ – Molekül	133
3.2.11	Vergleich der Anzahl der intermolekularen Wechselwirkungen der vier untersuchten Peptide mit dem RT1.B ¹ - Molekül	135
4.	<i>Diskussion</i>	138
4.1	Technische Limitationen des <i>in vivo</i> Testsystems	140
4.1.1	Nachweis der markierten Proteine	140
4.1.2	Trennung der komplexen Zellsolubilisate in der Gelelektrophorese	141
4.1.3	Solubilisierungsbedingungen der Modellantigen – gepulsten Zellen	143
4.2	In vivo Prozessierung von FITC – OVA	144
4.2.1	Persistenz von FITC – OVA in KMMØ	144
4.2.2	Abbaukinetik von FITC – OVA in KMMØ und DC	146
4.2.3	Einfluß von Proteinase - Inhibitoren auf die Prozessierung von FITC-OVA	147
4.2.4	Gezielte Inhibition von endo- /lysosomalen Proteinasen	149
4.2.5	Sequenzierung des intrazellulär generierten FITC-OVA 40 kD – Fragmentes	150
4.3	„<i>Molecular Modelling</i>“ -Methoden	152
4.3.1	Klassische Mechanik beim <i>Molecular Modelling</i>	152
4.3.2	<i>Molecular Modelling</i> Algorithmen	153
4.3.3	Qualität der komparativen <i>Modelling</i> Methoden	153
4.3.4	<i>Docking</i> von Peptiden in das RT1.B – Molekül	154
4.4	Bindung von Peptiden an das RT1.B¹ – Molekül	156
4.4.1	Vergleich der Bindung von CLIP ₈₈₋₁₀₀ und CLIPm ₈₈₋₁₀₀	156
4.4.2	Vergleich des I-A ^k – HEL und RT1.B – HEL – Komplexes	157
4.4.3	Analyse des RT1-B ¹ – OVA ₃₂₃₋₃₃₅ Komplexes und hypothetischer Wirkmechanismus von DM	158
5.	<i>Literatur</i>	160

1. Einleitung

Die Regelung und Kontrolle dynamischer Systeme ist ein grundlegender Prozess biologischer Einheiten. Signalverarbeitung und Signalübertragung sind die prinzipiellen Mechanismen solcher Systeme. Ein biologisches Nachrichtensystem besteht aus einem komplexen, vermaschten und vielfältig rückgekoppelten Fluss verschiedenster informations-tragender Signale. Die Aufgabe der biologischen Signalübertragung besteht darin, eine Information von einer biologischen Einheit zu einer anderen zu transportieren, oder sie dem biologischen Zweck und ihrer Bedeutung entsprechend aufzubereiten und zu

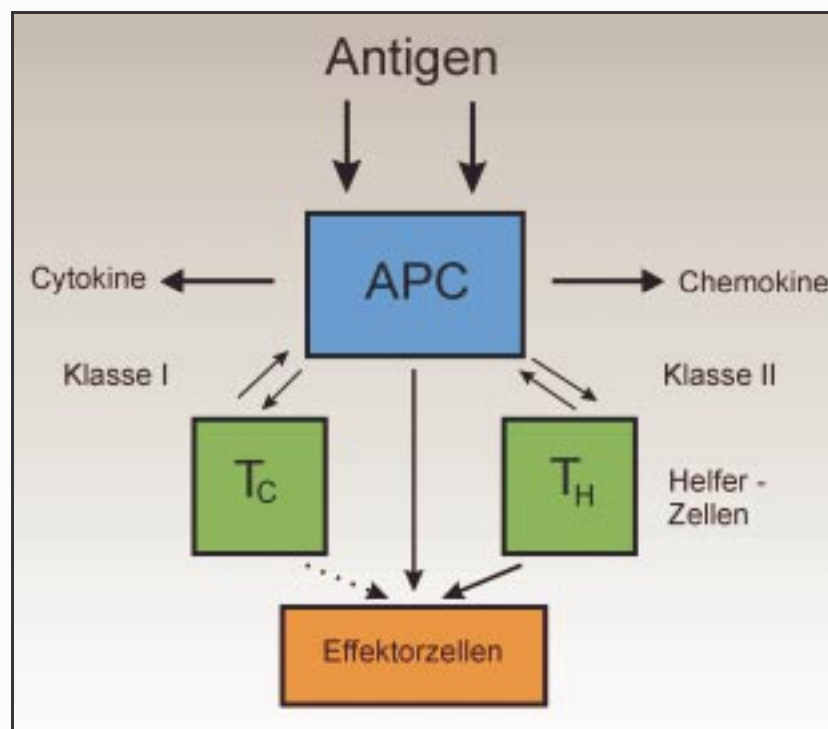


Abb. 1 Stellung der antigenpräsentierenden Zelle innerhalb des Immunsystems

T_C = zytotoxische T-Zellen; T_H = Helfer T-Zellen; APC = Antigenpräsentierende Zelle

verarbeiten. Ein Beispiel für solche Signalflüsse oder Nachrichtensysteme stellt das Immunsystem der Vertebraten dar [1]. Die Leistungen dieses Systems sind beachtlich. So führen Signale verschiedenster Herkunft zu gerichteten Ausgangssignalen, der Immunantwort. Innerhalb der zellulären Immunantwort, die durch Spezifität und Gedächtnis gekennzeichnet ist, nimmt die Antigenpräsentierende Zelle (APC) eine zentrale Stellung ein [2]. Die Abb. 1 zeigt eine vereinfachte Repräsentation der Stellung der APC innerhalb der zellulären Immunität.

1.1 Die Antigenpräsentation

Die Antigenpräsentierende Zelle verarbeitet von außen einwirkende Signale und gibt diese an eine signalverstärkende Einheit, die T - Helfer Zelle weiter. Dabei finden zwei zentrale Ereignisse des zellulären Immunsystems statt: die Prozessierung, d.h. die enzymatische Degradierung von Proteinen und die Präsentation der gebildeten Proteinbruchstücke im Kontext mit MHC - Molekülen durch die antigenpräsentierende Zelle. Die Erkennung dieser Antigen - MHC - Komplexe durch spezifische T - Zellen mittels des T - Zell - Antigenrezeptors (TCR) führt zu einer Signalverstärkung und weiteren Stimulierung des Immunsystems. Der T - Zellrezeptor kann nur von APC verarbeitete Signale auswerten. Die Erkennung von Fremdpeptid im Kontext mit MHC - Molekülen durch den T - Zellrezeptor wird als MHC - Restriktion bezeichnet [3].

Ein vielschichtiges, weitgehend integriertes Überwachungssystem mit einem Netzwerk von positiven und negativen Kontrollmechanismen reguliert das Verhalten der beteiligten Zellen und moduliert die Immunreaktivität. Das Immunsystem ist daher ein einzigartiges Beispiel für das Funktionieren biologischer Kommunikations- und Erkennungsmechanismen [4a - b].

Um das System vielschichtiger zu gestalten, entwickelte das Immunsystem zwei verschiedene Typen von MHC - Molekülen, die MHC Klasse I - und MHC Klasse II - Moleküle. Die Verarbeitung von endogenem, z.B. viralem, Antigen führt zu MHC Klasse I - Peptid - Komplexen. MHC Klasse I - Moleküle im Kontext mit prozessierten Peptiden werden von zytotoxischen T - Zellen erkannt, welche die sie stimulierenden Zellen durch direkten Kontakt abtöten. T- Helfer - Zellen (T_H) dagegen erkennen exogen internalisiertes und prozessiertes Antigen zusammen mit Molekülen des MHC Klasse II - Komplexes auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zelle. Die Aufgabe der T - Helfer - Zellen ist es, nach Aktivierung anderen Zellpopulationen des Immunsystems durch Zytokine zusätzliche Signale darzubieten [2].

Während die Vorgänge der MHC Klasse I restringierten Antigenprozessierung recht gut verstanden sind [5], ist die Mechanistik der MHC Klasse II restringierten Antigenprozessierung in weiten Zügen unverstanden. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird daher auf die MHC Klasse II vermittelte Immunantwort eingegangen.

1.2 Antigenpräsentierende Zellen

Während alle kernhaltigen Zellen MHC Klasse I – Moleküle exprimieren, werden MHC Klasse II – Moleküle nur von spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen exprimiert. Eine konstitutive Expression ist bei B- Zellen [6], dendritischen Zellen[7], Langerhanszellen der Haut [8] und bestimmten Maus – T – Zellklonen [9 a - c] beobachtet worden. Fakultativ exprimieren Makrophagen [10], Astrozyten [11], Endothel- und Epithelzellen [12] sowie einige humane T - Zelllinien MHC Klasse II - Moleküle. In der zellulären Immunität nehmen Makrophagen und dendritische Zellen als APC eine zentrale Position ein.

1.2.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) entwickeln sich aus dem Knochenmark. Es handelt sich um professionelle antigenpräsentierende Zellen, die sich durch eine hohe Antigenaufnahme- und Prozessierungsrate, Wanderungs- und T - Zell - Stimulationsfähigkeit auszeichnen. Durch ihre außergewöhnliche Fähigkeit ruhende, naive T - Zellen im Gegensatz zu anderen antigenpräsentierenden Zellen zu aktivieren, ist ihnen eine herausragende Rolle bei der Primärantwort des Immunsystems eigen. Die geringe Populationsdichte der dendritischen Zellen in verschiedenen Geweben erschwert die Untersuchung dieser immunkompetenten Zellen, so dass bei ihrer Untersuchung *in vitro* - Kultursystemen eine besondere Bedeutung zukommt [15 b].

Dendritische Zellen wurden erstmals von STEINMAN ET AL. 1973 beschrieben, der die DC in der leicht adhärenen Fraktion von Maus - Milzzellsuspensionen entdeckte. Die dendritischen Zellen stellen eine kleine Population dar; in nichtlymphatischen Geweben stellen sie weniger als 0,5% und 1% in lymphatischen Geweben aller kernhaltigen Zellen [13]. In der Milz kann der Anteil an dendritischen Zellen rund 1,5% aller kernhaltigen Zellen betragen [14].

In ihrer charakteristischen Morphologie unterscheiden sich die dendritischen Zellen deutlich von B- und T - Zellen, Makrophagen und Granulozyten. Es handelt sich um Leukozyten mit einer Vielzahl von Zellfortsätzen, welche einem ständigen Formwandel unterliegenden. Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigen ein relativ elektronendurchlässiges Zytoplasma mit wenig globulären und filamentösen Strukturen. Der Kern zeigt normale Strukturen wie Heterochromatin an der Kernmembran und einen granulierten

Nukleolus; im Gegensatz zu Makrophagen zeigen die dendritischen Zellen nur eine geringe Anzahl an Polyribosomen und ein schwach ausgebildetes endoplasmatisches Retikulum. Endozytotische Vesikel und Lysosomen sind nur in geringen Mengen nachzuweisen, Peroxidase- oder kationenabhängige Membran - ATPase - Färbungen sind negativ [15 a - c].

Anhand ihrer Morphologie und Funktion konnten dendritische Zellen bzw. deren Differenzierungsstadien in den meisten Geweben mit Ausnahme des zentralen Nervensystems [16], in der afferenten Lymphe und im peripheren Blut aller untersuchten Spezies nachgewiesen werden [17]. Aufgrund ihrer Verteilung in den Geweben und ihrer Funktion lassen sich dendritische Zellen in verschiedene Differenzierungsstadien unterteilen [18].

Dendritische Zellen können verschiedenste Arten von Protein - Antigenen effizient internalisieren, prozessieren und im Kontext mit MHC Klasse II - Molekülen präsentieren. Die Reifung der dendritischen Zellen zu antigenpräsentierenden Zellen lässt sich in drei Phasen unterteilen. In der Internalisierungsphase [121] zeichnen sich die dendritischen Zellen durch eine hohe Makropinozytosefähigkeit aus, durch die sie ein großes Flüssigkeitsvolumen aufnehmen und konzentrieren können. Bei der Makropinozytose werden sehr viel größere Vesikel gebildet als bei der Pinozytose. Sie ermöglicht den dendritischen Zellen, etwa ein halbes Zellvolumen pro Stunde auszutauschen [19]. In diesem Differenzierungsstadium zeigen dendritische Zellen auch die Fähigkeit zur Phagozytose von partikulärem Antigen [20 a - c]. Weiterhin exprimieren diese Zellen Rezeptoren für IgG und Mannose. Hierdurch können dendritische Zellen Immunkomplexe und mannosylierte Antigene aufzunehmen. In dieser Phase ist die Syntheserate an MHC Klasse II - Molekülen hoch. Dendritische Zellen in dieser funktionellen Phase werden in der Literatur als unreife Zellen bezeichnet.

In der Wanderungsphase [121] verlieren die dendritischen Zellen ihre Internalisierungsfähigkeiten. Die Wanderungsphase ist bisher wenig erforscht, da aufgrund der geringen Anzahl an dendritischen Zellen nur sehr wenige Zellen, die sich in dieser Phase befinden, isoliert werden können. Nach Aufnahme von z.B. Bakterien in der Peripherie verlieren die dendritischen Zellen ihre Phagozytosefähigkeit und wandern zu den regionalen Lymphknoten. In dieser Phase werden MHC- Klasse II Moleküle nicht mehr neu synthetisiert und die Antigenprozessierungsfähigkeit geht verloren [21].

In der Effektorphase[121] zeichnen sich dendritische Zellen durch eine hohe MHC Klasse II- Expression sowie Expression von kostimulatorischen Molekülen aus. In dieser Phase zeigen die dendritischen Zellen eine zwölfmal höhere MHC Klasse II Expression

<i>Phase</i>	<i>Eigenschaften</i>
Internalisierungsphase	Makropinozytose, Phagozytose, hohe Kl. II Syntheserate
Wanderungsphase	Synthese von Adhäsionsmolekülen, Verlust der Phagozytosefähigkeit, keine Kl. II de novo Synthese
Effektorphase	hohe Kl. II und Adhäsionsmolekülexpression, kostimulatorische Moleküle

Tab. 1 Reifungsstadien der dendritischen Zellen

als LPS - aktivierte B - Zell - Blasten [22]. Die hohe Expression an Adhäsionsmolekülen führt zu erleichterter Cluster Bildung mit T - Zellen und setzt die Aktivierungsschwelle für T - Zellen herab [23 a - c]. In dieser Phase können naive T - Zellen durch die dendritischen Zellen aktiviert werden. Diese grobe Einteilung ist statisch gesehen; die einzelnen Phasen gehen fließend ineinander über und entziehen sich dadurch der exakten Erforschung [24].

1.2.2 Mononukleare Phagozyten

Das mononukleäre Phagozytensystem stellt die zweite große Antigenpräsentierende Zellpopulation des Immunsystems dar. Die Gemeinsamkeit aller Zellen dieses Systems ist die Fähigkeit zur Phagozytose. In den frühen zwanziger Jahren entdeckten Morphologen, dass bestimmte Zellen intravenös injizierte Farbstoffe aufnehmen. ASCHOFF identifizierte diese Zellen als Makrophagen im Bindegewebe, Mikroglia im zentralen Nervensystem, Endothelzellen und Retikulärzellen der lymphoiden Organe. Er gruppierte diese Zellen als das Retikulo - Endothelialsystem. Mittlerweile ist erwiesen, dass sich die Pinozytosefähigkeit der Endothel- und Retikulozellen grundlegend von der Phagozytosefähigkeit der Makrophagen (MØ) und Monozyten unterscheidet. Daher werden letztere als das Mononukleäre Phagozytensystem bezeichnet [2].

Die Zellen dieses Systems haben ihren Ursprung im Knochenmark. Nach Reifung und Aktivierung zeigen sie zahlreiche morphologische Formen. Der erste Zelltyp, der aus dem Knochenmark in das periphere Blut gelangt, ist der nicht vollständig ausgereifte Monozyt. Monozyten haben einen Durchmesser von 10 - 15 µm, einen bohnenförmigen Nucleus und ein fein granuliertes Zytoplasma mit Lysosomen, Phagosomen und Zytoskelettfilamenten. Nachdem die Zellen in das Gewebe gelangen, differenzieren sie zu

Makrophagen, die auch Histozyten genannt werden. Makrophagen können durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert werden und zeigen nach Aktivierung unterschiedliche Formen und Funktionen. Das fundamentale Konzept der Makrophagenaktivierung geht auf Beobachtungen von Metchnikoff zurück [25].

Die Makrophagen – Heterogenität ist ein gut dokumentiertes Phänomen [26]. Es ist seit längerer Zeit bekannt, dass Makrophagen, die von unterschiedlichen anatomischen Bereichen isoliert werden, eine große Diversität an Fähigkeiten und Phenotypen zeigen. Da die Makrophagenfunktion größtenteils von Signalen der unmittelbaren Mikroumgebung abhängt, wird angenommen, dass sich die Makrophagen – Heterogenität von den Bedingungen des spezifischen Gewebes ableitet.

Das mononukleäre Phagozytensystem repräsentiert Zellpopulationen, die nicht nur in der natürlichen, sondern auch in der erworbenen Immunantwort eine wichtige Rolle spielen. Die Aufgabe der Makrophagen bei der natürlichen Immunantwort ist die Phagozytose fremder Partikel, von Makromolekülen und Zellen, welche verletzt oder tot sind, wie z.B. seneszente Erythrozyten. Zudem produzieren Makrophagen zahlreiche Zytokine, die weitere inflammatorische Zellen, vor allem Neutrophile und Granulozyten, zum Ort der Entzündung rekrutieren. Sie sind zudem für zahlreiche systemische Effekte einer Entzündung verantwortlich, u.a. für Fieber [4]. In der erworbenen Immunität spielt das mononukleäre Phagozytensystem sowohl in der kognitiven als auch in der Effektorphase eine wichtige Rolle. Die Fähigkeit nach γ - Interferon Stimulus MHC Klasse II - Moleküle zu exprimieren macht sie zu akzessorischen Zellen der T-Lymphozytenaktivierung [27]. Nach Aktivierung durch von T - Zellen sezernierten Zytokinen sind Makrophagen effektiver in der Phagozytose und in der Zerstörung phagozytierter Antigene. Dies macht sie zu den prinzipiellen Effektoren der zellulären Immunität [28]. Durch die Expression von Rezeptoren für opsonierte Partikel können aktivierte Makrophagen diese stärker binden und phagozytieren als nicht opsonierte Partikel [26]. Die Fähigkeit von Makrophagen und Lymphozyten, sich gegenseitig zu stimulieren ist ein wichtiger Steuer- und Regulationsmechanismus der zellulären Immunität.

1.3 MHC-Klasse II restringierte Antigen-Präsentation

Bei der Präsentation exogener, internalisierter und prozessierter Fremdproteine durch antigenpräsentierende Zellen nehmen die MHC Klasse II - Moleküle eine zentrale Stellung ein; sie stellen sozusagen den „Präsentierteller“ für Antigene dar. Einige antigen-

präsentierende Zellen exprimieren die Klasse II - Moleküle konstitutiv, andere unter dem Einfluss verschiedener Zytokine. T - Zellen erkennen den MHC Klasse II/Peptid - Komplex durch den Klasse II restringierten T - Zell - Rezeptor. Die T-Zellen werden durch diesen Vorgang unter Beteiligung kostimulatorischer Moleküle aktiviert. Die aktivierten T - Helfer - Zellen führen durch Freisetzung verschiedener Zytokine zur Verstärkung der Immunantwort. Dies erfolgt durch die Induktion von T- oder B - Zell - Proliferation, durch B -Zell - Differenzierung oder durch Aktivierung von Makrophagen [29 a - b].

Die hochpolymorphen MHC Klasse II- $\alpha\beta$ - Heterodimere assoziieren im Verlauf der Synthese im endoplasmatischen Retikulum mit einem dritten Molekül, der invarianten Kette (Ii). Nach Transport zum Trans - Golgi - Netzwerk wird der Klasse II/Ii - Komplex in endo-/lysosomale Kompartimente dirigiert, wo es zur teilweisen Abspaltung der invarianten Kette kommt. Ein Teil der invarianten Kette (CLIP) verbleibt in der Bindungsgrube des Klasse II - Moleküls. Es wird postuliert, dass der Austausch von CLIP gegen Antigen - Peptid durch DM-Moleküle katalysiert wird [30].

Antigene werden durch Phagozytose, rezeptorvermittelte Endozytose oder Pinozytose aufgenommen und in den endo-/lysosomalen Weg eingebracht. In diesen Kompartimenten werden die Proteinantigene von proteolytischen Enzymen degradiert [31]. Die Beladung der MHC Klasse II - Moleküle mit Proteinfragmenten findet in spezialisierten Kompartimenten statt, die als MIIC („MHC class II compartment“) zusammengefaßt werden [32]. Dieses Kompartiment umfasst die folgenden Charakteristika:

- Das Kompartiment enthält DM für den Austausch von CLIP
- Der pH ist sauer, um optimale Bedingungen für proteolytische Enzyme und DM zu gewährleisten
- Es ist für durch Pinozytose, Phagozytose und Endozytose aufgenommenes Material zugänglich
- Es enthält MHC Klasse II - Moleküle, die mit Peptiden beladen werden können
- Der Transport von MHC Klasse II - Peptid Komplexen zur Plasmamembran ist möglich

Als die verantwortlichen Proteinasen der Antigenprozessierung werden vor allem die Kathepsine diskutiert [33]. Neuere Befunde legen auch die Beteiligung von Legumain, einer

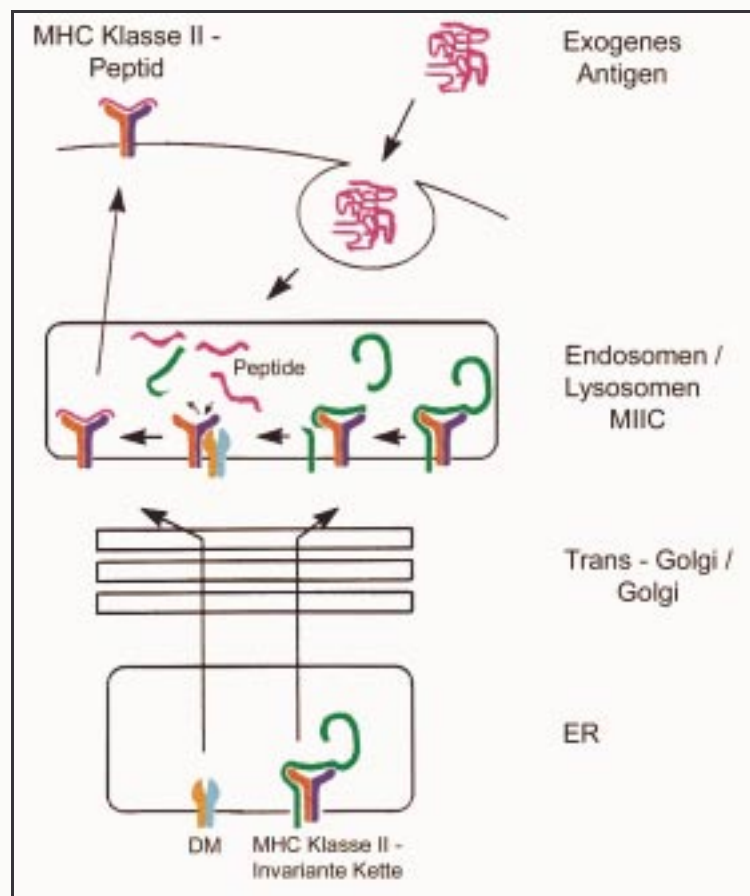


Abb. 2 MHC Klasse II restringierte Antigenpräsentation

Asparaginyll - Endopeptidase bei der Antigenprozessierung nahe [34]. Welche Enzyme exakt an der Generierung antigenener Peptide beteiligt sind, ist jedoch zur Zeit unbekannt. Zudem wird zur Zeit ein alternativer Mechanismus der Antigenbeladung diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass MHC Klasse II - Moleküle intakte Proteine an der Zelloberfläche binden können [35]. Diese werden dann nach Internalisierung in endosomalen Kompartimenten terminal von Proteinasen gekürzt [36].

Die Klasse II Peptid - Komplexe werden zur Plasmamembran transportiert, wo sie von T - Helfer - Zellen erkannt werden können. Eine graphische Darstellung dieses komplexen Sachverhaltes zeigt die Abbildung 2.

1.3.1 Struktur der MHC-Klasse II-Moleküle

Die MHC Klasse II - Moleküle sind durch nicht kovalente Bindungen assoziierte Heterodimer - Transmembran - Glykoproteine. Sie bestehen aus der 34-36 kD schweren α -Kette und einer leichteren, 28-31 kD schweren β -Kette. Beide Ketten lassen sich in vier Domänen unterteilen: eine kurze, C - terminale zytoplasmatische Region von 12-15 AS, einen Transmembranbereich von 20-25 AS und zwei extrazytoplasmatischen Domänen von je 90-100 AS. Die extrazytoplasmatischen Domänen werden als $\alpha 1, \alpha 2$ bzw. $\beta 1, \beta 2$

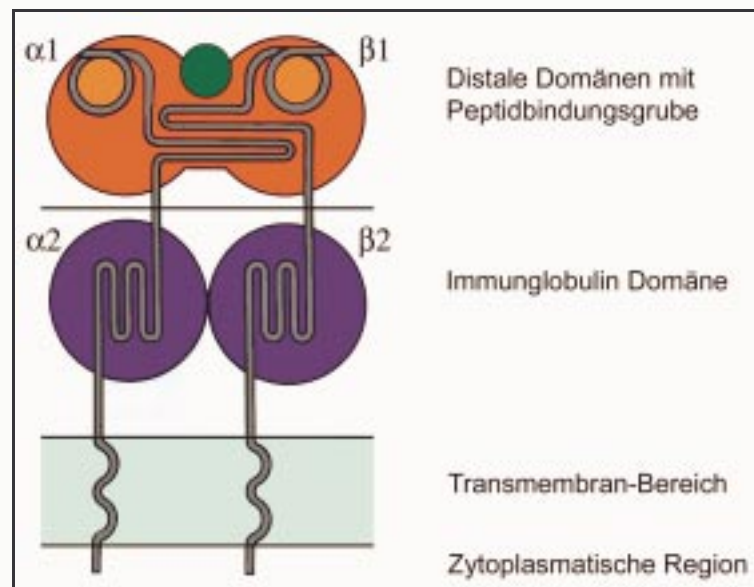


Abb. 3 Schematische Darstellung des MHC Klasse II- α, β Heterodimers

bezeichnet. Die stark konservierten und durch interne Disulfidbrücken stabilisierten Domänen $\alpha 2$ und $\beta 2$ besitzen strukturelle Homologie zu Immunglobulin - Domänen. Die Domänen tragen aufgrund von posttranslationalen Modifikationen im Golgi - Apparat jeweils N - glykosidische Kohlenhydrat - Seitenketten [37].

Die N - terminalen Domänen $\alpha 1$ und insbesondere $\beta 1$ sind polymorph und bilden die Peptidbindungsgrube. Sowohl die $\alpha 1$ als auch die $\beta 1$ -Domäne bilden je vier β - Faltblattstrukturen und eine α - Helix aus, die zusammen die Peptidbindungsgrube mit einem „Boden“ aus acht antiparallelen β - Faltblattstrukturen und zwei als „Seitenwände“ dienenden α - Helices ergeben. Das Peptid wird in der Bindungsgrube sowohl durch Wasserstoffbrücken zwischen dem Peptid - „Backbone“ und den α - Helices als auch durch Wasserstoffbrücken und andere Wechselwirkungen der Peptid - Seitenketten mit der Bindungsgrube fixiert. Ein Teil der Peptid - Seitenketten ragt aus der Bindungsgrube heraus und kann mit dem T - Zellrezeptor in Wechselwirkung treten. Dies wird durch die Poly - Prolin - II Konformation des gebundenen Peptids möglich [38 a - b].

1.3.2 Die invariante Kette

Die invariante Kette (Ii, γ) ist ein basisches, Methionin reiches Typ II - Membranglykoprotein. Der N - Terminus der invarianten Kette ist in das Zytoplasma ausgerichtet. Es existieren verschiedene Molekülformen der invarianten Kette; durch alternatives Splicing werden zwei unterschiedliche invariante Transkripte erhalten[39]. Die kürzere mRNA kodiert für die Hauptform der invarianten Kette, IiP31. Die das Exon 6b umfassende mRNA kodiert für ein größeres Protein der invarianten Kette, das als IiP40 bei der Ratte bzw. IiP41 bei Maus und Mensch [40] bezeichnet wird. Für das Humansystem werden zwei weitere Formen der invarianten Kette, IiP35 bzw. IiP43 beschrieben [40]. Sie entstehen durch die Nutzung eines zweiten, stromaufwärts im Leserahmen gelegenen Startkodons. Die invariante Kette wird zusammen mit Klasse II - Molekülen kotranslatiert [41]. Nach ihrer Synthese im endoplasmatischen Retikulum formt die invariante Kette ein Trimer. Die Trimerisierung erfolgt an der carboxyterminalen Domäne (AS 163-183), ebenso scheint die Transmembranregion an diesem Prozess beteiligt zu sein [42 a - c]. Drei $\alpha\beta$ -MHC Klasse II - Dimere lagern sich mit dem Trimer aus drei invarianten Ketten in einem Chaperon - vermittelten Prozess zu einem Nonamerkomplex zusammen [43]. Die invariante Kette sorgt durch das Sorting - Signal für einen erleichterten, gerichteten Transport der MHC Klasse II - Moleküle nach Passage durch den Golgi - Apparat in endo-/lysosomale Kompartimente, wo es zur Peptidbeladung des MHC Klasse II - Moleküls kommt [44]. Die invarianten Ketten des Nonamer - Komplexes werden in endo-/lysosomalen Kompartimenten abgespalten [45 a - c]. Ein Teil der invarianten Kette verbleibt nach der Abspaltung in der Bindungsgrube des MHC Klasse II - Moleküls; es wird CLIP („class II associated invariant chain peptide“) genannt [46].

Die Struktur der invarianten Kette konnte in großen Teilen durch NMR - Studien in Lösung ermittelt werden. So zeigt die carboxyterminale Domäne eine klare Trimerisierung in Lösung. Die einzelnen Protomere bestehen aus drei α - Helices und einem Faltblatt. Die Helix C, AS 160 - 180, ist für die Trimerisierung der Protomere verantwortlich. Das generelle Aussehen des Trimers ist ein kurzer Zylinder mit einem Durchmesser von 40 Å und einer Höhe von 25 Å. Die trimere Architektur zentriert um die Helix C, die intensive interprotomere Kontakte ausbildet [47]. Die weiter N - terminal gelegene Domäne AS 72 - 110 bekommt im Komplex mit MHC Klasse II - Molekülen eine geordnete Struktur. Die AS 87 - 101 in der CLIP - Region binden in der Bindungsgrube des Klasse II - Moleküls, bilden dort jedoch nur schwache Wechselwirkungen aus. Drei MHC Klasse II - Moleküle

umschließen die N - terminalen Segmente der invarianten Kette. Diese Segmente zeigen eine ungeordnete Struktur [48]. Eine Modellvorstellung des $\alpha\beta$ - Trimers zeigt Abb. 5.

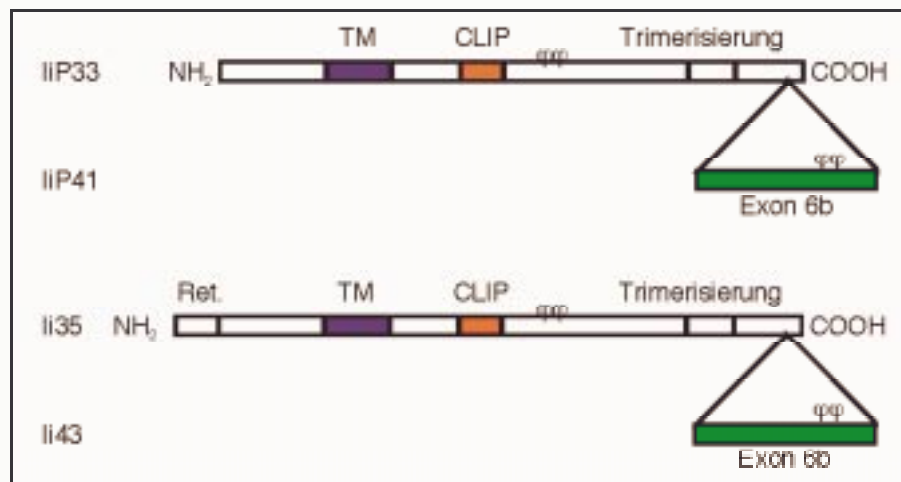


Abb. 4 Schematische Darstellung der invarianten Kette und ihrer vier verschiedenen Formen

Ret. = Retentionssignal; TM = Transmembranbereich, CLIP = „class II associated invariant chain peptide“; φ = Kohlenhydratseitenketten

Für die Funktion der invarianten Kette sind weitere Hypothesen in der Diskussion, die die bisher über die invariante Kette ermittelten Fakten mit der Modellvorstellung der MHC Klasse II - Peptidbeladung in Einklang zu bringen versuchen.

Die Konformationshypothese besagt, dass die invariante Kette die Konformation der MHC Klasse II - Moleküle beeinflusst. Bei Transfektionsexperimenten mit Zellen, die für das Gen der invarianten Kette defizient sind, wurden Klasse II - Heterodimere mit veränderter Konformation gefunden. So konnten einige Antikörper die Klasse II Moleküle nicht mehr erkennen und das Laufverhalten der Klasse II Moleküle in der SDS - PAGE wurde durch Modifikationen im Golgi - System verändert [49 a - c].

Durch die Assoziation der invarianten Kette mit dem $\alpha\beta$ - Heterodimer im ER wird die Peptidbindungsgrube gegen vorzeitige Peptidbeladung geschützt. Nach proteolytischem Abbau der invarianten Kette und Verdrängung von CLIP kann antigenes Peptid gebunden werden [50]. Diese Blocking - Hypothese beruht auf der Beobachtung, dass das $\alpha\beta$ - Heterodimer Peptide binden kann, nicht jedoch im Komplex mit der intakten invarianten Kette [51 a-c].

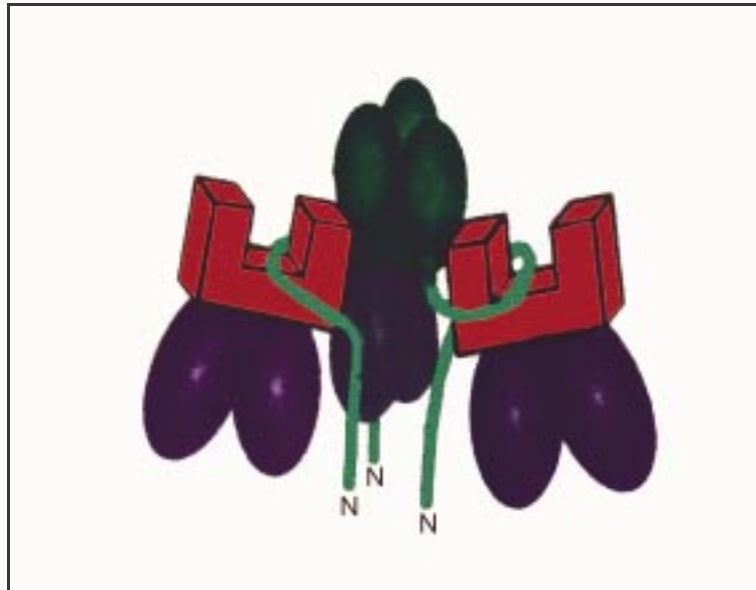


Abb. 5 Hypothetisches Molekülmodell des $\alpha\beta\gamma$ -Trimers
 Blau = Immunglobulin-ähnliche Domäne des MHC Klasse II-Moleküls; Rot = Peptidbindungsgrube des MHC Klasse II-Moleküls; Grün = invariante Kette

1.3.3 Funktion des DM-Moleküls bei der Peptidbeladung von MHC-Klasse II Molekülen

DM - Genprodukte sind glykosylierte $\alpha\beta$ - Heterodimer - Transmembranproteine. Beide Ketten besitzen Sequenzhomologie zu den MHC Klasse II - Molekülen und lassen sich wie die MHC Klasse II - Moleküle in je vier Domänen unterteilen: je eine Zytosol - und Transmembrandomäne sowie je zwei luminale Domänen. Die zur Membran proximal gelegene Domäne ist zu den Immunglobulindomänen homolog. DM gehört zur Immunglobulin - Supergenfamilie [52 a - c].

Die Röntgenstrukturdaten liegen seit kurzem für das humane [53] und murine DM [54] vor. Die Faltung und Domänenorganisation von DM ist ähnlich zu den klassischen MHC Klasse II - Molekülen. Die Peptidbindungs - Taschen der Klasse II - Moleküle sind beim DM - Molekül jedoch nicht vorhanden; eine Peptidbindungsgrube bildet sich nicht aus. Die α - Helices der $\alpha 1$ - und $\beta 1$ - Domäne sind über das erste und letzte Drittel miteinander in Kontakt. Dies ist eine strukturelle Homologie zum neonatalen FC - Rezeptor [55]. In der Mitte bildet sich eine zentrale Tasche aus, die von polaren und geladenen Aminosäuren ausgebildet wird. Die Tasche ist 10 Å breit und 10 Å tief und größer als im FC - Rezeptor. Ein möglicher Reaktionsmechanismus der Peptidbeladung oder DM - Klasse II - Kontaktstellen lassen sich aus der Struktur von DM jedoch nicht ableiten.

Die detaillierte Funktion von DM in vivo ist bisher nicht ermittelt worden. In vitro Studien legen jedoch eine wichtige Rolle von DM bei der Peptidbeladung von MHC Klasse II - Heterodimeren nahe [56]. Die β - Kette des DM-Moleküls besitzt ein „targeting“ - Signal für die Internalisierung [57] des DM- $\alpha\beta$ - Heterodimers in endo-/lysosomale Kompartimente [58 a - d], wo die Peptid - Beladung des MHC Klasse II - Moleküls stattfindet.

Antigene, die im Kontext mit MHC Klasse II - Molekülen präsentiert werden, gelangen nach ihrer Aufnahme in das endo-/lysosomale System, das aus einer Reihe distinkter Subkompartimente besteht [59]. In antigenpräsentierenden Zellen wird neben Komplexen aus der invarianten Kette und MHC Klasse II - Molekülen auch DM zu endo / lysosomalen Kompartimenten transportiert, die als „MHC - class II compartments“ oder kurz MIIC bezeichnet werden [60 a - d]. Frühe immunzytochemische Studien zeigten, dass die MHC Klasse II - Moleküle sowohl innerhalb des endo-/lysosomalen Systems lokalisiert sind, als auch in morphologisch definierten, multivesikulären Strukturen hoch angereichert sind [61 a - b]. Die Isolation von MIIC - Membranvesikeln erlaubte deren biochemische und funktionelle Charakterisierung und belegt die Existenz dieser spezialisierten Kompartimente [62]. Neben MHC Klasse II Molekülen konnten in dem MIIC - Kompartiment die lysosomalen Marker Kathepsin D, Lamp-1 und CD 63 [63] sowie das DM-Molekül [64] lokalisiert werden.

Studien an DM - defizienten Zellen zeigen die besondere Bedeutung von DM bei der Antigenpräsentation. Reife, Peptid - beladene MHC Klasse II - Moleküle werden u.a. dadurch charakterisiert, dass sie eine Stabilität gegenüber 1% SDS bei Raumtemperatur aufweisen. Solche kompakt gefaltete Peptidtragende - Dimerformen des $\alpha\beta$ - Heterodimers werden C - Formen genannt [65]. SDS - Instabilität ist hingegen ein Charakteristikum für unreife, mit CLIP assoziierte MHC Klasse II - Moleküle [66 a - b]. Aus DM - defizienten Zellen isolierte MHC - Klasse II Moleküle zeigen keine SDS - Stabilität und sind hauptsächlich mit CLIP assoziiert [67]. Diese Zellen sind nicht in der Lage, intakte Proteinantigene im Kontext mit MHC Klasse II - Molekülen effizient zu präsentieren und MHC Klasse II/Antigen - Peptid restringierte T - Zellen zu aktivieren. Durch Transfektion der DM - defizienten Zellen mit cDNA für DM α und DM β konnte der Wildtyp wiederhergestellt werden [68].

Die an DM - defizienten Zelllinien ermittelten Befunde wurden durch „knock out“ - Mäuse, die eine Deletion im H2.M-Genlokus besitzen, bestätigt. Die antigenpräsentierenden

Zellen dieser Mäuse können intakte Antigene nicht präsentieren, ebenso ist die Präsentation von Antigen - Peptiden vermindert; die MHC Klasse II - Moleküle sind überwiegend mit CLIP assoziiert und zeigen keine SDS - Stabilität [69 a - b].

Diese Befunde legen folgende Funktion für DM nahe: Da CLIP nur eine geringe Bindungsaffinität zu MHC Klasse II - Molekülen aufweist, könnte DM die Funktion eines Peptidaustauschers ausüben. Die Freisetzung von CLIP aus der Bindungsgrube von MHC Klasse II - Molekülen durch DM konnte in *in vitro* Studien gezeigt werden; die MHC Klasse II - Moleküle konnten anschließend Peptide binden, was zu SDS stabilen MHC Klasse II - Molekülen führte. Auch andere Peptide als CLIP können durch DM aus der MHC Klasse II Bindungsgrube gelöst werden [70 a - b]; in diesem Zusammenhang wird eine „Editor“ - Funktion von DM diskutiert [71]. Die fehlende SDS - Stabilität von aus DM - defizienten Zellen isolierten MHC Klasse II - Molekülen könnte auf eine Chaperon - Funktion von DM bei der Faltung von MHC Klasse II Molekülen hinweisen.

Professionelle antigenpräsentierende Zellen wie B - Zellen und dendritische Zellen exprimieren DM konstitutiv, jedoch nur in geringen Mengen [72]. Aufgrund der geringen Konzentration an DM ist eine katalytische Wirkung sehr wahrscheinlich.

1.4 Problemstellung der Arbeit

Die Generierung antigener Peptide in Antigenpräsentierenden Zellen und die Beladung von MHC Klasse II - Molekülen mit diesen Peptiden ist das zentrale Ereignis der Klasse II restringierten Antigenpräsentation. Bei diesen Prozessen wird festgelegt, welche Epitope, d.h. Sequenzbereiche, eines Proteinantigens auf der Zelloberfläche präsentiert werden.

Die Kernmoleküle dieses Prozesses, MHC Klasse II, DM und die invariante Kette sind gut charakterisiert. Ebenso liegt die Röntgen - Struktur der Molekülkomplexe vor. Die an der Prozessierung von internalisierten Proteinen beteiligten Enzyme sind jedoch nicht einwandfrei identifiziert. Daher ist es von großem Interesse, die Vorgänge der Spaltung von Proteinen auf Molekülebene, d.h. der Antigenprozessierung im engeren Sinne, zu erforschen. Zudem ist der Einfluss des Aktivierungszustand in verschiedenen akzessorischen Zelltypen auf die Prozessierung weitgehend unerforscht.

In dieser Arbeit wurde die Antigen - Aufnahme und Prozessierung in Makrophagen und dendritischen Zellen aus Knochenmarkskulturen der Lewis Ratte in den Vordergrund

gestellt. Dabei war es das Ziel, die interne, proteolytische Spaltung des mit einem Fluoreszenzmarker versehenen Modellantigens Ovalbumin zu untersuchen und die erhaltenen Daten zur gezielten Proteolyse dieses Modellproteins in Kontext mit dem Vorgang der Antigenbeladung zu setzen. Aus den ermittelten Befunden sollten Modellvorstellungen über die Vorgänge der proteolytischen Spaltung von Protein - Antigenen während der Antigen - Prozessierung entwickelt werden.

Mit Hilfe von Computer - Simulationen sollte versucht werden, die notwendigen Bedingungen für die Peptidbindung in der Bindungsgrube des Ratten MHC - Komplexes RT1B^l zu ermitteln. Das berechnete Peptidbindungsmotif sollte sowohl mit eigenen Sequenzdaten als auch mit Literaturdaten verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Grundaustattung

2.1.1 Allgemeine Laborgeräte

In der nachfolgende Liste sind diejenigen Geräte aufgeführt, die für allgemeine Aufgaben benötigt wurden und die Grundausrüstung des Laboratoriums darstellten. Geräte, die für spezielle Aufgabenstellungen benötigt wurden, sind an den entsprechenden Stellen aufgeführt.

Analysenwaage	Typ HS4	(Mettler, Gießen)
Brutschrank/CO ₂ -Inkubator	Typ 6000	(Heraeus, Deutschland)
Gasmonitor	Heraeus Gasmonitor	(Heraeus, Deutschland)
Folienschweißgerät	Typ FS70	(Elite, Deutschland)
Laborwaage	Typ L2200S+	(Sartorius, Göttingen)
Heizrührer	IKAMAG-RCT	(Janke&Kunkel KG)
Magnetrührer	IKA-KMO	(Janke&Kunkel KG)
Pipettierhilfen	Pipetus Standard, Pipetus akku	(Hirschmann, Deutschland)
Pipetten, verstellbar	1-10 µl, 10 - 100 µl, 200 -1000 µl	(Eppendorf, Hamburg)
pH - Meter	PHM 83 Autocal	(Radiometer, Krefeld)
Wasserbad m. Thermostat	Typ 5584, D8	(Haake, Karlsruhe)
Taumler	Typ GFL 3011	(GFL, Burgwedel)
Mikroskop	Typ ID 02	(Zeiss, Deutschland)
Sterile Werkbank	antair BSK	(SLEE, Mainz)
Netzgeräte	Typ LKB 2103	(Pharmacia LKB, Freiburg)
	Consort E722	(LMS GmbH, Dossenheim)
Zentrifugen	Biofuge A; Omnifuge 2.0 RS	(Heraeus, Hanau)
Kühlschränke m. Eisfächern	Skiafrost Comfort	(Siemens, Deutschland)
	kristall	(Liebherr, Deutschland)
Mikroliter Glasspritzen	Hamilton 50µl, 100 µl, 500 µl	(Bonaduz, Schweiz)
Vakuumpumpe	Leybold Trivac DbB	(Leybold Heraeus)
Schüttler	Mixer 5432	(Eppendorf, Hamburg)
Heizblock	Thermostat 5320	(Eppendorf, Hamburg)
Ultraschallbad	Transsonic 460	(ELMA)
Vortex	VF2	(Janke&Kunkel, Stauffen)

2.1.2 Plastikwaren

Handschuhe, unsteril	rotiprotect No. 5884,5885,5886	(Roth, Karlsruhe)
Petrischalen	60 und 145 mm, bakteriologisch	(Greiner)
Reaktionsgefäße	1,5 ml Eppendorf Safelock	(Eppendorf, Hamburg)
	1,7 ml Multi TTT E518	(Roth, Karlsruhe)
	2,0 ml Eppendorf Safelock	(Eppendorf, Hamburg)
Schutzunterlage	Polytrap 296 PE	(Mitlacher, Mainz)

Stretchfilm	NESCO- Film, Best. Nr. 2569	(Roth, Karlsruhe)
Zellkulturflaschen	50, 260 und 800 ml Fassungsvermögen	(Nunc)
Zellkulturplatten	Platten mit 24 Vertiefungen	(Costar)
	Platten mit 96 Vertiefungen	(Titertek)
Zentrifugenröhrchen	10 ml Rundboden, Typ 163177	(Greiner, Nürtingen)
	10 ml Spitzboden	(Greiner, Nürtingen)
	50 ml Spitzboden	(Greiner, Nürtingen)

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien wurden - wenn nicht anders vermerkt- in p.a. Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Pierce (Bruchsal) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Das Wasser in bidestillierter Qualität, u.a. zum Ansetzen von Lösungen, stammte aus einer Millipore Entmineralisierungsanlage (Millipore, Eschborn).

2.1.4 Puffer für proteinbiochemische Arbeiten

- PBS - Stammlösung. 1,4 M (81,8 g/l) NaCl
0,1 M (15,6 g/l) NaH₂PO₄* 2 H₂O
- Lämmli - Probenpuffer 62,5 mM (75,6 mg/ml) TRIS pH 6,8
0,77 M (63 ml/ml) 2- Mercaptoethanol
2% SDS (100ml SDS 20%)
10 % (v/v) Glycerin (100 ml/ml)
- Phosphatpuffer 9 ml 1 M Na₂HPO₄
91 ml 1 M NaH₂PO₄
mit Aqua bidest auf 1 L auffüllen, pH 5,9
- Acetatpuffer 0,1 M HAc/ 0,1 M NaAc; pH 4,6
- TBS 50 mM (6,05 g/l) TRIS
150 mM (8,76 g/l) NaCl
mit HCl auf pH 7,5 eingestellt

2.1.5 Detergentien

SDS: Sodium - Dodecylsulfat ist ein ionisches Detergens, das es dem Proteinchemiker erlaubt, Proteine in einem Agarose- oder Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Die SDS- Moleküle denaturieren die meisten Proteine bei gleichzeitiger Inaktivierung und umgeben diese gleichmäßig mit einem Monolayer. Durch die negative Ladung der SDS- Moleküle und der gleichmäßigen stöchiometrischen Ummantelung wandern die SDS- ummantelten Proteine gemäß dem Molekulargewicht zur Anode.

Nonident P 40: Nonident P 40 ist ein Ethylenphenol - Polyethylenglycolether ([C₃₀H₅₄O₁₂]_n) und hat ein Molekulargewicht von 606 D bei n = 11. Es ist ein nichtioni-

sches Detergens und eignet sich gut für die Zellsolubilisierung, da es Proteaseinhibitoren nicht in ihrer Funktion einschränkt (Fluka) [73].

Triton X 100: Triton X (t - Octylphoxypolyetoxyethanol) ist ein weitverbreitetes Detergens für die Solubilisierung von Membranproteinen und anderen Komponenten unter nicht - denaturierenden Bedingungen [73].

2.1.6 Modellantigen

Das Modellantigen Ovalbumin wurde in unterschiedlich reiner Form bei Sigma bezogen und im entsprechenden Puffer gelöst.

2.1.7 Proteasen und Proteaseinhibitoren

CBZ-Phe-Ala-CHN₂: Carbobenzoxy - Phe - Ala - diazomethylketon ist ein irreversibler Inhibitor von Cysteinproteasen wie z.B. Kathepsin B und Papain. Stammlösung : 16 mM (6,3 mg / ml DMSO), bei -20°C gelagert (Bachem) [74].

Complete: Complete - Tabletten hemmen ein breites Spektrum an Serin -, Cystein - , Metaloproteasen sowie Calpaine. Durch die optimierte Zusammensetzung sind sie besonders geeignet zum Schutz von Proteinen, die aus tierischem Gewebe und Zellen, Hefe oder Bakterien isoliert werden. Complete enthält sowohl reversible als auch irreversible Proteaseinhibitoren. Eine Tablette ist ausreichend zur Inhibierung von 50 ml Extraktionslösung. Stammlösung: eine Tablette / 2 ml Aqua bidest. (Roche).

Kathepsin B: Kathepsin B ist eine Cystein - Protease, die über Endoprotease und Peptidyl - Dipeptidase Aktivität verfügt. Es ist eine der Hauptproteasen des endo-/lysosomalen Systems und zeigt breite Spezifität. Kathepsin B ist unter anderem an der proteolytischen Spaltung der invarianten Kette beteiligt. Stammlösung: 1 mg/ml Phosphatpuffer (Sigma).

Kathepsin D: Kathepsin D (EC 3.4.23.5) ist eine Aspartyl - Protease und eine der dominanten Proteinasen in den endo-/lysosomalen Kompartimenten. Es ist an der Degradierung zahlreicher endozytierter Proteine beteiligt, eine immunologische Relevanz wird diskutiert. Stammlösung: 1 mg /ml Acetatpuffer (Sigma).

Leupeptin: Dieses Tripeptid inhibiert Kathepsin B, Papain, Plasmin und Trypsin, sowie in geringerem Umfang Kathepsin D. Stammlösung: 1 mg/ml PBS, bei - 20°C gelagert (Sigma).

Pepstatin A: Dieses Pentapeptid (Mr 685,91) inhibiert die sauren Proteasen Kathepsin D und Pepsin. Stammlösung: 1 mg/ml Methanol 20% (Sigma).

PMSF: Phenylmethylsulfonylfluorid inhibiert Serinproteasen und einige Cysteinproteasen: Stammlösung: 100 mM (17,4 mg/ml Methanol).

Trasyolol: Aprotinin aus Rinderlunge mit inhibitorischer Wirkung auf Kallikrein und zahlreiche intrazelluläre Proteasen sowie Chymotrypsin, Plasmin und Trypsin. Stammlösung: 2,8 mg/ml in ST - Puffer (Bayer AG).

Trypsininhibitor: Inhibitor aus Sojabohnen, der Trypsin und andere Serinproteasen hemmt. Stammlösung: 5mg/ml ST - Puffer (Serva).

E64d: E64d ist ein Derivat von E64, bei dem die Guanidinobutan - Gruppe gegen eine Alkyl - Gruppe ausgetauscht ist. Hierdurch wird der Cysteinproteinaseninhibitor zellpermeabel. E-64, das aus Kulturen von ASPERGILLUS JAPONICUS isoliert wurde, gilt als Prototyp der Oxiran - Inhibitoren [75].

Cat3: Cat3 ist ein N- Petidyl, O- Acyl Hydroxamat, das selektiv Serin- und Cysteinproteinasen inhibiert. Cysteinproteinasen werden durch die Formation eines Sulphenamid - Adduktes inhibiert, Serinproteinasen durch Carbamylierung des Serins im aktiven Zentrums [76].

2.1.8 Zytokine und Antikörper

14-4-4S: Zytotoxischer monoklonaler Antikörper der Subklasse IgG2a/Kappa mit Spezifität für I-E^{k,d,p,r}- Determinanten. Er besitzt zusätzlich eine Kreuzreaktivität mit dem Haplotyp RT1.D der Ratte [77].

Anti-Digoxigenin-AP: Polyklonaler Schafs - Antikörper, der 100% Reaktivität mit Digoxigenin und Digoxin zeigt, jedoch keine Kreuzreaktivität mit anderen Steroiden. Fab - Fragmente wurden durch enzymatische Verdauung mit Papain erhalten und mit alkalischer Phosphatase gekoppelt. Der Antikörper wurde im Western - Blot verwendet (Roche).

Anti-FITC-POD: Polyklonaler Schafs - Antikörper, der eine hohe Affinität zu FITC - Derivaten aufweist. Fab - Fragmente wurden durch enzymatische Verdauung mit Papain erhalten und mit Peroxidase gekoppelt. Der Antikörper wurde im Western - Blot verwendet (Roche).

GM-CSF: Murines GM-CSF („Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor“) ist ein in seiner Wirkung als artspezifisches beschriebenes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 23 kD, das von aktivierten T-Zellen, Endothelzellen, Fibroblasten und Makrophagen sezerniert wird [78]. Es stimuliert die Proliferation und das Überleben von Granulozyten und Makrophagen im Knochenmark. Im Maussystem ist die Differenzierung der einzelnen Vorläuferzellen stark dosisabhängig. Das verwendete GM-CSF wurde von Hr. Dr. Seiler (Behringwerke) zur Verfügung gestellt [79a-e].

INF- γ : Interferon- γ ist ein lymphoider Faktor mit potenter antiviraler Aktivität, der u.a. von T-Lymphozyten nach Stimulation durch ein Mitogen oder Antigen produziert wird. Das verwendete, gentechnisch hergestellte Ratten Interferon- γ wurde von Hr. Prof. Kirchner zur Verfügung gestellt. Es besitzt eine spezifische Aktivität von 1×10^6 IU/ml [80].

M-CSF: Der Zusatz von M-CSF („Macrophage Colony Stimulating Factor“) in KM - Kulturen begünstigt das Wachstum und die Differenzierung von Makrophagen aus Vorläuferzellen der mononukleären, phagozytischen Linie und stimuliert die Proliferation reifer Makrophagen. M-CSF wurde als Kulturüberstand der Maus - Fibroblastenlinie L929 gewonnen.[81 a - b]

LPS: Lipopolysaccharide sind wesentliche Zellwandbestandteile gramnegativer Mikroorganismen. LPS stellen T - Zell - unabhängige Antigene für ruhende B - Zellen dar und sind polyklonale Aktivatoren für die Blastentransformation mit anschließender Mitose. Im weiteren Reaktionsverlauf werden Antikörper sezerniert (überwiegend IgM). Lipopolysaccharide zeigen vielfältigen Einfluss auf Zellen des Immunsystems [2].

2.1.9 Molekulargewichtsstandards

Mark 12™ Wide Range Protein Standard (Novex, San Diego USA)

- Myosin (200 kD)
- β -Galactosidase (116,3 kD)
- Phosphorylase b (97,4 kD)
- Bovines Serumalbumin (BSA, 66,3 kD)
- Glutamat-Dehydrogenase (55,4 kD)
- Lactat-Dehydrogenase (36,5 kD)
- Carboanhydrase (31 kD)
- Trypsin-Inhibitor (21,5 kD)
- Lysozym (14,4 kD)
- Aprotinin (6 kD)
- Insulin, B-Kette (3,5 kD)
- Insulin, A-Kette (2,5 kD)

SeeBlue™ Pre-Stained Standard (Novex, San Diego USA)

- Myosin (210 kD)
- Bovines Serumalbumin (BSA, 78 kD)
- Glutamat-Dehydrogenase (55 kD)
- Alkohol-Dehydrogenase (45 kD)
- Carboanhydrase (34 kD)
- Myoglobin (23 kD)
- Lysozym (16 kD)
- Aprotinin (7 kD)
- Insulin, B-Kette (4 kD)

MultiMark™ Multi-Colored Standard (Novex, San Diego USA)

- Myosin (208 kD)
- Phosphorylase B (105 kD)
- Glutamat-Dehydrogenase (53 kD)
- Carboanhydrase (34 kD)
- Myoglobin – blau (23 kD)
- Myoglobin – rot (17 kD)
- Lysozym (13 kD)
- Aprotinin (7 kD)
- Insulin (4 kD)

2.1.10 Versuchstiere und Zelllinien

Zuchtpaare des Inzuchtstammes "Lewis" (LEW, Haplotyp RT1^b) stammen aus dem Zentralinstitut für Versuchstiere und wurden im institutseigenen Tierstall kontinuierlich in-

gezüchtet. Für die Untersuchungen wurden männliche Ratten im Alter von drei Monaten eingesetzt.

Die F10-Zelllinie sind Astrozytenzellen der „Lewis“-Ratte, die fakultativ MHC Klasse II exprimieren und eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Immunantwort im Gehirn spielen [82].

2.2 Methoden der Zellkultur

2.2.1 Puffer, Lösungen und Medien für die Zellkultur

Die hier aufgeführten Puffer, Lösungen und Medien wurden unter sterilen Bedingungen mit bidestiliertem Wasser angesetzt und, wenn nicht anders angegeben, bei 4°C gelagert.

Gey's Lösung: Zur selektiven Lyse der Erythrozyten in Zellpräparationen wurde diese Lösung eingesetzt (150 mM NH_4Cl mit 10 mM Tris/HCl (pH 9,0) auf pH 7,5 eingestellt) [83]

Glutaminlösung: L-Glutamin ist eine Aminosäure, die für kultivierte Zellen essentiell ist. Glutamin ist unter Kulturbedingungen für die meisten Zellen eine der wichtigsten Kohlenstoffquellen und stellt gleichzeitig einen Ausgangsstoff für die weitere Synthese von Biomolekülen und Proteinen dar. Da Glutamin sehr labil ist, wurde die 200 mM Stammlösung dem Medium erst kurz vor Kulturbeginn in einer Endkonzentration von 2 mM zugesetzt. Die Stammlösung wurde bei -20°C gelagert.

PBS: Es handelt sich um eine physiologische Kochsalzlösung (140 mM NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 ; pH 6,6). Sie wurde als Stammlösung in zehnfacher Konzentration angesetzt und vor Gebrauch 1:10 verdünnt, wodurch sich der pH auf 7,4 erhöht.

Pen/Strep - Lösung: Um Kontaminationen möglichst gering zu halten, wurde den Kulturmedien eine Stammlösung der Antibiotika Penicillin (10^4 IU/ml) und Streptomycin (10 mg/ml) 1% zugesetzt.

Trypanblau - Lösung: Diese Färbelösung (0,5% (w/v) Trypanblau, 150 mM NaCl) diente zur Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität. Die Lösung wurde nach dem Ansetzen durch ein Papierfaltenfilter filtriert.

Versen: Zum Ablösen adhärenter Zellen aus Kulturgefäßen diente diese EDTA - haltige, physiologische Salzlösung (2,6 mM KCl, 136,8 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1,1 mM Glukose, 1,4 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM NaH_2PO_4).

TRP/EDTA - Lsg: Zum Ablösen der F10-Tellen aus Kulturflaschen diente diese EDTA - haltige, physiologische Lösung (0,25% (w/v) Trypsin, 0,03% (w/v) EDTA ü.N. in PBS gelöst, sterilfiltriert). Lagerung bei -20°C .

DMEM: DULBELCCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM (9,75 g/l DMEM Trockenpulver, 3,7 g/l NaHCO_3 , 10 ml/l Pen/Strep - Lösung, 1 ml/l 2-Mercaptoethanol; pH 7,2) wurde als Basiskulturmedium bei der Kultivierung von dendritischen Zellen und Zelllinien eingesetzt. Das DMEM Trockenpulver enthält Phenolrot als pH - Indikatorfarbstoff.

MEM: MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM (9,526 g/l MEM Trockenpulver, 4,77 g HEPES, 10 ml / l Pen/Strep -Lösung, 1 ml/l 2-Mercaptoethanol; pH 7,2) wurde als Waschmedium beim Umsetzen der Zellen verwendet. Das MEM Trockenpulver enthält Phenolrot als pH -Indikatorfarbstoff.

2.2.2 Seren zur Supplementierung von Medien und Puffern

Um die Vitalität der Zellen zu erhalten, wurden die Kultur- und Waschmedien mit **FCS** (fetal calf serum) und zum Teil zusätzlich mit **HS** (horse serum) supplementiert. Die Seren wurden von den Firmen Roche bzw. Biochrom tiefgefroren, steril und auf Mykoplasmen getestet, bezogen. Zur Komplementinaktivierung erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei 56°C . Vor dem Einsatz in die Zellkultur wurden die Seren auf Toxizität und auf Eignung für verschiedene Zelltypen getestet.

2.2.3 Kulturbedingungen

Sämtliche Arbeiten wurden in einer sterilen Werkbank unter Verwendung steriler Glas- und Plastikwaren durchgeführt, um Kontaminationen mit Luftkeimen wie Pilzsporen und Bakterien zu verhindern. Die Zellkulturen wurden in einem Brutschrank bei 37°C , ca. 95% Luftfeuchtigkeit und einem Kohlendioxidgehalt von 10% kultiviert. Unter diesen Bedingungen behalten die Kulturmedien einen physiologischen pH - Wert, und Flüssigkeitsverluste durch Verdunstung sind minimal.

2.2.4 Organentnahme und Zellpräparation

2.2.4.1 Knochenmarkpräparation

Materialien und Reagenzien:

- Präparierbesteck (Witegro, Taunusstein)
- Zentrifugenröhrchen (50 ml)
- 5 ml Injektionspritze mit 0,7 mm (18 G) Kanüle
- MEM/ 1% FCS, auf Eis gekühlt

Das rote Knochenmark in den Markhöhlen der langen Röhrenknochen stellt ein hämatopoetisches Organ dar, in dem sich die pluripotenten Stammzellen des Blutsystems sowie reife und unreife Formen von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten befinden. Die Knochenmarkspräparation erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Versuchstiere wurden durch das Einleiten von Kohlendioxid in einen Exsikator getötet und mit Nadeln dorsal auf einer Präparierunterlage fixiert. Nach Desinfektion des Felles mit Alkohol wurde die Haut an Abdomen, Vorder- und Hinterextremitäten abpräpariert. Femur und Tibia wurden weitgehend von Muskeln befreit, von Hüft- und Fußgelenken abgetrennt und anschließend vom Kniegelenk befreit. Die Röhrenknochen wurden mit Hilfe einer 5 ml Injektionsspritze und aufgesetzter 0,7 mm Kanüle mit kaltem MEM/1% FCS durchspült. Das Knochenmark wurde in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Entsprechend wurde bei der Präparation von Humerus und Radius vorgegangen. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurde das Präparat mit einer 5 ml - Pipette aufsuspendiert.

2.2.4.2 Lyse der Erythrozyten

Um die Knochenmarkspräparation von Erythrozyten zu befreien, wurde das Präparat nach erfolgter Suspendierung für 10 min bei 4°C und 200xg zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 3 ml Gey's Lösung suspendiert und 2 1/2 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit MEM/ 1% FCS gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden sie in Kultur genommen.

2.2.4.3 Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität

Um die Lebendzellzahl zu bestimmen, wird eine Ausschlussfärbung mit Trypanblau durchgeführt. Die Zellmembran lebender Zellen ist für Trypanblau für ca. fünf bis sieben Minuten impermeabel, wogegen sich das Zytoplasma und der Zellkern toter Zellen sofort stark blau anfärben. Beschädigte Zellen, die kaum noch Zytoplasma enthalten, färben sich jedoch nur blaßblau. Die Zellen wurden nach der Zentrifugation in einem definiertem Volumen Medium aufgenommen, zum Zählen der Zellen in der Neubauer-Zählkammer wurde ein Aliquot dieser Zellsuspension mit Trypanblau nach Bedarf 1:2 bis 1:64 verdünnt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl} = (Z * V * X * 10^4)/Q$$

Z = Zellzahl, V = Verdünnungsfaktor, 10^4 = Kammerfaktor, x = Gesamtvolumen der Zellsuspension in ml, Q = Anzahl der Eckquadrate

2.2.5 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Um nicht alle Zellen auf Dauer in Kultur halten zu müssen, wurden Aliquote mit einer Zelldichte von 5×10^6 bis 1×10^7 /ml FCS eingefroren und in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Auf diese Weise können Zellen über Jahre aufbewahrt werden [84]. Um Zellschädigungen während des Einfrierens durch Scherkräfte der Wasserkristalle so gering wie möglich zu halten, wurde den Zellsuspensionen kurz vor dem Einfrieren der Gefrierschutz Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Endkonzentration von 10% zugesetzt. Die Zellsuspension wurde in Kryoampullen aliquotiert und bei -70°C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Zellaliquote in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Zur Rekultivierung wurden entsprechende Zellaliquote bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in 50 ml Kulturmedium überführt. Nach Kultur über Nacht wurden die Zellen gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Nach erneutem Waschen zur vollständigen Entfernung des DMSO wurden die Zellen im entsprechenden Kulturmedium kultiviert.

2.2.6 In vitro Generation von dendritischen Zellen

Durch Anreicherung von dendritischen Zellen (DC) aus lymphatischen Organen kann aufgrund des geringen Vorkommens dieser Zellen in den Geweben und wegen aufwendiger Separationsverfahren nur eine geringe Menge an DC erhalten werden [85]. Die Etablierung eines in vitro Kultursystems in unserem Labor durch Fr. Dr. Mehlig ermöglicht

hingegen die Gewinnung ausreichender Mengen an DC aus Vorläuferzellen des Knochenmarks der Ratte[86].

2.2.6.1 Dendritische Zellen aus Knochenmarkskulturen

Unter dem Einfluss von suboptimalen Mengen an GM-CSF differenzieren Knochenmarkszellen zu Makrophagen, Granulozyten und Zellen mit dendritischer Morphologie. Zur Generierung wurden Knochenmarkszellen in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml Kulturmedium (DMEM, 5% FCS, 1% Gln), das mit 2 ng rekombinantem GM-CSF/ml Medium supplementiert worden war, für 8 Tage in großen Petrischalen ohne Beschichtung kultiviert[87 a - b].

Bei der Zellernte wurde zuerst das Medium mit den nichtadhärenten Zellen entfernt und durch kaltes Versen ersetzt. Nach zehnmütiger Inkubation bei 4°C ließen sich die adhären Zellen leicht vom Kulturschalenboden abspritzen.

2.2.6.2 Anreicherung von DC aus Knochenmarkskulturen

Bei der Generierung von DC aus Knochenmarkskulturen differenzieren neben DC auch Granulozyten und Makrophagen aus, so dass weitere Schritte zur Anreicherung erforderlich sind. Da DC konstitutiv MHC - Klasse II Moleküle im Unterschied zu den anderen Zellpopulationen der Knochenmarkskultur exprimieren, bot sich eine Separation über Klasse II mit Hilfe von Immunobeads an. Hierbei handelt es sich um magnetische Partikel, die von Polystyrol umhüllt sind und auf deren Oberfläche anti - Maus IgG kovalent gebunden ist. Mit Hilfe eines gegen Klasse II gerichteten Sekundärantikörper können so DC im Magnetfeld selektiert werden [88].

2.2.6.3 Beladung von magnetischen Partikeln mit Antikörper

Die Beladung der Immunobeads mit monoklonalen Antikörper erfolgte durch Inkubation von Hybridomüberstand mit Immunobeads in einer Konzentration von 1ml/ 2×10^7 Beads. Während der mindestens zweistündigen Inkubation bei 4°C wurden die Partikel durch Rotation des Ansatzes in der Schwebelage gehalten. Nach Abschluss der Inkubation erfolgten zwei Waschschrte mit MEM/1% FCS, wobei die paramagnetischen Partikel durch das Magnetfeld des Zellseparators im Reaktionsgefäß zurückgehalten und das Medium mit einer Pasteurpipette abgezogen wurde. Die Partikel wurden anschließend in einer Dichte von 4×10^8 Beads/ ml MEM/1% FCS aufgenommen.

2.2.7 Gewinnung von Knochenmarksmakrophagen

Unter dem Einfluss von M-CSF differenzieren und proliferieren Knochenmarkszellen zu Makrophagen. Zur Generierung von Ratten - Makrophagen aus Knochenmarkspräparationen wurden 5×10^5 KM - Zellen/ml Kulturmedium (DMEM, 50 % L929-Kulturüberstand, 5% FCS, 10 % HS, 1% Gln) in unbeschichte Petrischalen eingesät. Um ein optimales Zellwachstum zu erreichen, wurden am fünften Tag 10 ml frisches Medium pro Kulturschale zugegeben. Nach 9-11 Tagen Kulturdauer wurden die Zellen mit Versen vom Boden der Petrischalen abgelöst [89].

2.2.8 Solubilisierung von Zellen

Um in Zellen aufgenommenes Antigen biochemisch untersuchen zu können, ist es notwendig, die Zellen zu solubilisieren. Hierzu stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung: die Solubilisierung mit Detergentien oder durch Scherkräfte. Als Detergentien stehen sowohl ionische als auch nichtionische zur Verfügung. Bei der Zellsolubilisierung muss darauf geachtet werden, dass eine genügende Menge an Proteaseinhibitoren anwesend ist, um die intrazellulären Proteasen vollständig zu hemmen [90].

2.2.8.1 Solubilisierung mit ionischem Detergens

- Solubilisierungspuffer 1% SDS
 16mM CBZ-Phe-Ala, 10mM Pepstatin A
 oder eine Tablete Complete / 50 ml
 in 20mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,5

Für manche Proteine ist es nützlich, die Zellen unter denaturierenden Bedingungen zu solubilisieren. Da eine Auftrennung der Proteine in der 1D-SDS-PAGE erfolgt, bietet sich SDS als Detergens an.

Nach dem Ernten der Zellen wurde zweimal gewaschen und der Überstand durch Solubilisierungspuffer ersetzt. Nach einer dreißigminütigen Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Schüttler konnten die Proben untersucht werden.

2.2.8.2 Solubilisierung mit nichtionischem Detergens

- Solubilisierungspuffer 1% Triton X 100 oder 1% Nonident P40
 16mM CBZ-Phe-Ala, 10mM Pepstatin A
 oder eine Tablete Complete / 50 ml

in 20mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,5

Um bei der Zellyse die Proteine nicht zu denaturieren, ist es sinnvoll, ein nichtionisches Detergens wie Nonident P40 oder Triton X 100 einzusetzen. Ein weitere Vorteil ist, dass - im Gegensatz zur SDS - Lyse- auch zweidimensionale Analysen möglich sind.

Nach dem Ernten der Zellen und zweimaligen Waschen wurde zum Zellpellet der Solubilisierungspuffer gegeben. Nach einer halbstündigen Inkubation konnten die Proben weiteren Untersuchungen zugeführt werden.

2.3 Elektrophoretische Methoden

2.3.1 Allgemeines

Eine sehr leistungsfähige Methode zur Auftrennung von Proteinen beruht auf dem Phänomen, dass ein Molekül mit einer Nettoladung im elektrischen Feld wandert. Diesen Vorgang bezeichnet man als Elektrophorese, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins (bzw. eines anderen Moleküls) im elektrischen Feld abhängig von der elektrischen Feldstärke (E), der Nettoladung des Proteins (z) und dem Reibungskoeffizienten (f) ist. Es gilt :

$$V = \frac{Ez}{f}$$

Um eine bessere Auftrennung zu ermöglichen, führt man die elektrophoretische Auftrennung nicht in wässriger Lösung, sondern in einer Matrix durch. Hierdurch werden durch kleine Temperaturgradienten verursachte Konvektionsströme vermieden; ferner wirken sie als Molekularsiebe und verbessern so die Auflösung. Moleküle, die im Verhältnis zu den Gelporen kleiner sind, wandern rasch vorwärts, im Verhältnis größere bleiben nahezu unbeweglich; Moleküle mittlerer Größe wandern mit entsprechender Geschwindigkeit durch das Gel. Als Trägermedium werden bei der Elektrophorese häufig Polyacrylamidgele verwendet, da diese chemisch inert und durch Polymerisation von Acrylamid leicht herzustellen sind. Die Porengröße kann durch unterschiedliche Konzentrationen von Acrylamid und Methylenbisacrylamid, einem quervernetzenden Reagens variiert werden [91].

2.3.2 Eindimensionale SDS - Polyacrylamid Gelelektrophorese

Bei der 1D-SDS-Page werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch die Bindung von Natriumdodecylsulfat (SDS, $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2\text{OSO}_3^- \text{Na}^+$) werden die Proteine denaturiert, da SDS alle nicht kovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört. Die SDS - Anionen binden sich an die Hauptketten, etwa ein SDS - Molekül pro zwei Aminosäurereste, so dass ein Komplex aus denaturiertem Protein und SDS entsteht. Die stark negative Ladung des Proteins ist dank seiner Masse proportional. Die erworbene negative Ladung ist zumeist wesentlich größer als die ursprüngliche Ladung des Proteins, so dass seine Ladung vernachlässigt werden kann. Somit hängt die Wanderungsgeschwindigkeit nur noch von der Molekulargröße bzw. der Anzahl SDS - vermittelter Ladungen und der Porengröße des Gels ab. Des Weiteren ist die elektrophoretische Beweglichkeit vieler Proteine in SDS - Polyacrylamidgelen dem Logarithmus ihrer Masse proportional [92 a - f].

Um im niedermolekularen Bereich zwischen 1-100 kD eine bessere Auftrennung zu erhalten, wurde zusätzlich zum Glycin - System nach Lämmli das Tricin - System eingesetzt. Dieses wird durch den Einsatz des Leitons Tricin und ein diskontinuierliches Puffersystem erreicht [93].

2.3.2.1 Materialien und Lösungen

- Flachgelkammern, Anfertigung nach Institutserfordernissen (Keuz, Reiskirchen)
- 2 Glasplatten 165 * 150 mm, eine mit einem Ausschnitt von 120*20 mm an der schmalen Seite
- Abstandshalter (Spacer) aus Kunststoff (170 * 12 mm; 1,5 mm oder 1,0 mm dick)
- Probenkamm, Teflon, 120 mm breit, 12 Probenaschen à 100µl
- Metallklammern (Roth, Karlsruhe)
- Vaseline (Roth, Karlsruhe)
- Elektrodenpuffer Glycin 4x
 - 60 g Tris
 - 288 g Glycin
 - 100 ml SDS 20% (20 g)
 - ad 5 l, eingestellt auf pH 8,5
- Anodenpuffer Tricin
 - 0,2 M Tris (24,23 g/l)
 - ad 1 l, mit konz. HCl auf pH 8,9 eingestellt
- Kathodenpuffer Tricin
 - 0,1 M Tris (12,11 g/l)
 - 0,1 M Tricin (17,92 g/l)
 - 0,1 M SDS (5 ml 20 % SDS-Lsg. / 1000 ml)
 - ad 1 l, pH beträgt 8,25
- Lösung A
 - 3 M (366 g/l) Tris
 - 48 % (v/v) 1 N HCl (480 ml/l)
 - eingestellt auf pH 8,5
- Lösung B
 - 3,0 M Tris (36,34 g/ 100 ml)

- Lösung C
0,3 M SDS (1,5 ml 20 % SDS-Lsg./ 100 ml)
ad 100 ml, mit konz. HCl auf pH 8,45 eingestellt
20 % (w/v) Acrylamid (280 g/l)
0,735 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid (7,35 g/l)
- Lösung D
95,75 (v/v) 1 M Tris/HCl pH 7,0
4 % (v/v) SDS 20 %
0,25 (v/v) TEMED (Tetramethylethyldiamin)
- Lösung E
48 % (w/v) Acrylamid
1,5 % (w/v) N,N'-Methylen-Bisacrylamid
- Glycerin
- SDS - Lösung 20 % 20 % (w/v) SDS (20 g/100 ml)
- APS - Lösung 10% 10 % (w/v) APS (1 g/10 ml)

2.3.2.2 Zusammensetzung der Gele

Die Gellösungen wurden gemäß folgender Tabelle pipettiert, wobei darauf geachtet wurde, dass die Lösungen gut durchmischt wurden :

<i>Lösung</i>	<i>Stacker</i>	<i>10%</i>	<i>16,5%</i>
Lösung E (ml)	0,5	5,1	8,3
Lösung B (ml)	1,5	8,3	8,3
Glyzerin (ml)	/	3	3
Aqua bidest. (ml)	4,0	8,6	5,3
TEMED (µl)	10	20	20

Tab. 2 Zusammensetzung der Gellösungen für Tricin- Gele

<i>GEL</i>	<i>10 %</i>	<i>12 %</i>	<i>14 %</i>	<i>16 %</i>
Lösung A (ml)	3,00	3,00	3,00	3,00
Lösung C (ml)	8,48	10,18	11,87	13,56
Glyzerin (ml)	3,00	3,00	3,00	3,00
Aqua bidest. (ml)	9,40	7,70	6,01	4,32
SDS 20 % (µl)	120	120	120	120

Tab. 3 Zusammensetzung der Gellösungen für Glycin-Gele

Zu der jeweiligen Gellösung wurden kurz vor dem Gießen 100 µl 10 % APS - Lösung hinzugegeben.

Zusammensetzung des Stackers für Glycin - Gele : 1 ml Lösung C, 1 ml Lösung D, 4 ml Aqua bidest sowie 80 µl 10 % APS

2.3.2.3 Vorbereitungen

An den nicht ausgeschnittenen Seiten zwischen zwei Glasplatten wurden je drei Abstandshalter positioniert, der Kontaktbereich zwischen Glasplatte und Abstandshalter durch dünnes Auftragen von Vaseline abgedichtet und mit Hilfe von Metallklammern fixiert. In den Hohlraum zwischen die Glasplatten konnten nun die Polyacrylamid - Gellösungen gegossen werden. Nach Ansetzen der benötigten Menge an Gellösung wurde kurz vor dem Gießen APS 10% als Starter der Polymerisierungsreaktion zugesetzt und die Lösung gut durchmischt.

Nach Zugabe von APS - Lösung zur angesetzten Sammelgellösung wurde die Geltasche gefüllt und der Probenkamm sorgfältig positioniert. Nach einer Polymerisationsdauer von mindestens einer Stunde wurde der Probenkamm vorsichtig entfernt und die Taschen mit Aqua bidest. gespült.

Vor dem Einsetzen des vorbereiteten Flachgels in die Elektrophoresekammer wurde der untere Spacer entfernt und verbleibende Vaseline im entstandenen Spalt entfernt. Nun wurden die Kammern mit Elektrophoresepuffer gefüllt und verbleibende Luft im Spalt oder den Probenaschen mit Hilfe einer abgewinkelten Kanüle und einer Einwegspritze entfernt, um eine gleichmäßige Ausbreitung des elektrischen Feldes zu ermöglichen.

2.3.2.4 Durchführung der Gelelektrophorese

Der Probenpuffer wurden mit 1ml Bromphenol - Blau versetzt, um zum einen eine visuelle Kontrolle beim Auftragen der Proben zu gewährleisten als auch den Fortgang der Elektrophorese beobachten zu können. Die Proben wurden mit Hilfe einer Hamiltonkanüle aufgetragen, dass maximale Endvolumen der Proben betrug 100 µl. Die Elektrophorese wurde bis zum Erreichen der Proben in das Trenngel bei 40 mA durchgeführt, anschließend wurde die Stromstärke auf 6 bis 8 mA bei Glycin -, bzw. auf 10-15 mA bei Tricin- Gelen reduziert und das Gel über Nacht laufen gelassen. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn der Farbstoff den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

2.3.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese nach O'Farrell [94] ist eine hochauflösende Trennmethode für Proteine. Zusätzlich zur Trennung nach dem Molekulargewicht wird eine Trennung nach dem isoelektrischen Punkt vorgeschaltet. Hierdurch wird eine Tren-

nung nach zwei Parametern erreicht, wodurch unterschiedliche Proteine mit gleichem Molekulargewicht unterschieden werden können. Bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) bildet eine in einer Acrylamidgelmatrix enthaltene Mischung niedermolekularer Trägerampholyte nach Anlegen einer Spannung einen stabilen pH- Gradienten aus, in dem sich die amphoteren Proteine nach Erreichen ihres isoelektrischen Punktes in engen stationären Banden konzentrieren. Als Trennprinzip wird die Tatsache ausgenutzt, dass die Mobilität der Proteine an ihrem isoelektrischen Punkt annähernd null ist.

2.3.3.1 Materialien und Lösungen

- IEF Elektrophoresekammer Typ 155 (Bio Rad, München)
- Glasröhrchen 150 mm lang, 1,5 mm Innendurchmesser (Bio Rad, München)
- Ampholines pH 3,5-10 (40% -ige Lösung; Fluka)
- Kanüle 180 mm lang, 22 Gauge (Fluka)
- Einwegspritze 5 ml (Bekton - Dickesson)
- IEF - Standard 2 mg/ml Cytochrom C in IEF Probenpuffer
- IEF - Probenpuffer 9,5 M Harnstoff
2% w/v Triton X 100
2% v/v Ampholines pH 3,5-10
Aqua bidest.

- IEF-Acrylamidlsg. 28,38% w/v Acrylamid
1,62% w/v N,N-Methylenbisacrylamid
Aqua bidest. ad 100%
- Triton X 100 Lsg. 10% w/v Triton X 100
- Gelüberschichtungs-lsg. 8 M Harnstoff
- Probenüberschichtungs-lsg. 1,75 M Harnstoff
1,25% Triton X 100
Aqua bidest. ad 100%
- Anodenpuffer 25 mM (3,33 g/l) Asparaginsäure
25 mM (3,68 g/l) Glutaminsäure
- Kathodenpuffer 570 mM (120 ml/l) Ethylendiamin
25 mM (4,35 g/l) Arginin
25 mM (3,65 g/l) Lysin
- IEF-Gelmischung 2,76g Harnstoff
1 ml Triton X 100 Lsg.
0,66 ml IEF-Acrylamidlsg.
0,25 ml Ampholines
7 µl Temed
Aqua bidest. ad 5 ml
10 µl APS - Lösung (kurz vor dem Gießen hinzugeben)

2.3.3.2 Vorbereitungen

Alle Lösungen wurden vor Versuchsbeginn gründlich entgast. Die gründlich gesäuberten Glasröhrchen wurden an einem Ende mit Parafilm verschlossen und vertikal in einer

Halterung fixiert. Mittels einer Einwegspritze mit aufgesetzter Kanüle wurden die Röhren zu einer Höhe von exakt 11cm mit der vorbereiteten IEF-Gelmischung luftblasenfrei gefüllt und mit Gelüberschichtungslösung aufgefüllt. Nach einer Polymerisationszeit von einer Stunde wurden Parafilm und Gelüberschichtungslösung entfernt und die Rundgele in die Elektrophoresekammer eingespannt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich am unteren Ende keine Luftblasen festsetzten. Bis zum Probenauftrag konnten die Gele mit 20 µl Probenüberschichtungslösung versehen aufgehoben werden.

Für die zweite Dimension wurden Standard 10% Tricingele mit einer Dicke von 1mm gegossen. Als Probenkamm diente ein spezieller IEF-Kamm mit einer 11 cm langen Tasche für die Rundgele und einer Proben tasche für den Molekulargewichtsstandard.

2.3.3.3 Durchführung der zweidimensionalen Elektrophorese

Die in maximal 80 µl IEF-Probenpuffer gelösten Proben wurden nach Zusatz von 5µl IEF-Standard mit einer Mikroliterspritze blasenfrei unter die Probenüberschichtungslösung gefüllt. Anschließend wurden zunächst die Glasröhren und dann der gesamte Anodenraum mit Anodenpuffer aufgefüllt. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte unter schrittweiser Erhöhung der Spannung (30 min 100V, 30 min 200V, 16h 300V, 1h 800V). Der mitgeführte IEF-Standard fokussiert als charakteristische rotbraune Bande am anodischen Ende des Rundgels und ermöglicht so die Kontrolle der Auftrennung. Nach Beendigung der Fokussierung wurden die Glasröhren entnommen und bei -20°C eingefroren.

Für die zweite Dimension wurde die Proben tasche der vorbereiteten Flachgele gründlich mit Aqua bidest. ab gespült. Das tiefgefrorene IEF-Rundgel wurde mit Druckluft vorsichtig aus dem Glasröhren gepresst und horizontal auf den oberen Rand des Tricingels gelegt. Das IEF-Rundgel wurde mit einem Filterpapierstück von 1,5 cm x 11 cm fixiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich an der Kontaktstelle zwischen Rundgel und Flachgel keine Lufteinschlüsse befanden. Nach Einspannen des Gels in die Elektrophoresekammer wurde der gesamte obere Gelrand mit SDS-Probenpuffer überschichtet. Dabei diente das Filterpapier als Reservoir für den Probenpuffer. Anschließend wurde die obere Kammer mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Der Gellauf wurde unter Standardbedingungen durchgeführt.

2.3.4 Nachweis unmarkierter Proteine durch Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine einfache und schnelle Methode, um in der SDS-PAGE aufgetrennte Proteine im Gel anzufärben. Die hohe Sensitivität dieser Visualisierungstechnik erlaubt die Detektion von Proteinmengen bis in den Nanogramm - Bereich. Die Methode ist zuverlässig, reproduzierbar und ergibt einen niedrigen Hintergrund. Bei allen Arbeitsschritten müssen Handschuhe getragen werden, da sich durch die hohe Nachweisempfindlichkeit bereits Fingerabdrücke auf dem Gel anfärben [95].

2.3.4.1 Reagenzien

- Fixierlösung Ethanol 99,9% v/v (100 ml)
Essigsäure 98% v/v (25 ml)
mit Aqua bidest. auf 250 ml auffüllen
- Sensitivierungslösung Ethanol 99,9% v/v (75 ml)
Glutardialdehyd 25% w/v (1,25 ml)
Natriumthiosulfat 5% w/v (10 ml)
Natriumacetat (17 g)
mit Aqua bidest. auf 250 ml auffüllen
- Silberlösung Silbernitrat 2,5% w/v (25 ml)
Formaldehyd 37% w/v (0,1 ml)
mit Aqua bidest. auf 250 ml auffüllen
- Entwicklerlösung Natriumcarbonat (6,25 g)
Formaldehyd 37% w/v (0,05 ml)
mit Aqua bidest. auf 250 ml auffüllen
- Stopplösung EDTA-Na₂* H₂O (3,65 g) mit Aqua bidest. auf 250 ml auffüllen
- Präservierungslösung Ethanol 99,9 % v/v (75 ml)
Glycerin 98 % v/v (10,8 ml)
mit Aqua bidest. auf 250 ml auffüllen

2.3.4.2 Durchführung

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 30 min. in einer Stahlwanne mit Fixierlösung auf dem Taumler inkubiert; anschließend wurde die Lösung vorsichtig abgegossen und für weitere 30 min in der Sensitivierungslösung inkubiert. Nach Abschluss der Sensitivierung wurde die Lösung durch Aqua bidest. ersetzt und dreimal für je 5 min. gewaschen. Im Anschluss an den Waschvorgang wurde das Gel für 20 min in der Silberlösung inkubiert und danach zweimal je eine Minute mit Aqua bidest. gewaschen. Nun wurde die Entwicklerlösung zugesetzt und solange entwickelt, bis die Banden ausreichend sichtbar waren. Längere Entwicklungszeiten führten zu einer Erhöhung des Hintergrundes, während zu kurze Entwicklungszeiten dazu führten, dass sich nicht

alle Banden ausreichend anfärbten. Um die Entwicklung zu stoppen, wurde die Entwicklerlösung abgegossen und durch die Stopplösung ersetzt. Nach mindestens 20 min. in der Stopplösung wurde das Gel dreimal für je 5 min. gewaschen und anschließend 1 h in der Präservierungslösung inkubiert. Die Gele wurden in Hybridisierungsbeutel eingeschweißt und konnten bei 4°C für mehrere Monate aufbewahrt werden.

2.3.5 Markierung von Proteinen mit Fluorescein oder Digoxigenin

Die gängigen Verfahren zur biochemischen Charakterisierung von Proteinen beinhalten eine Markierung mit Radioisotopen wie z.B. ^{125}Jod , gefolgt von deren gelelektrophoretischer Auftrennung [96]. Der Nachweis der Proteine erfolgt durch Autoradiographie. Der Einsatz von Fluorescein oder Digoxigenin als Markierungsreagenz ermöglicht jedoch alternative, nichtradioaktive Möglichkeiten zur Identifizierung von Proteinen. Dabei werden Proteine mit Fluorescein bzw. Digoxigenin in Form seines Hydroxysuccinimidesters inkubiert; im wässrigen Milieu folgt eine spontane Hydrolyse des Moleküls und Fluorescein bzw. Digoxigenin wird über eine kovalente Bindung an die ϵ - Aminogruppe der Lysinreste gekoppelt [97 a - b]. Der Nachweis der Proteine erfolgt nach Blotten auf eine PVDF - Membran über eine hochsensitive Chemilumineszenzreaktion. Die Fluorescein - Gruppe wird durch einen Antikörper, das in Form eines Peroxidase - Konjugates eingesetzt wird, nachgewiesen. Digoxigenin markierte Proteine werden gleichfalls über eine Chemilumineszenz nachgewiesen, hier bindet jedoch ein Fab'-Fragment eines gegen Digoxigenin gerichteten Antikörpers, an den alkalische Phosphatase gebunden ist. Die gekoppelten Enzyme setzen ein spezifisches Chemilumineszenz - Substrat um, wodurch Photonen emittiert werden. Diese Lichtemission kann durch Schwärzung des Röntgenfilms nachgewiesen werden.

Zusätzlich zur Chemilumineszenz - Detektion kann die Fluorescein - Gruppe auch durch Fluoreszenz - Aktivierung nachgewiesen werden. Durch Aktivierung mit kurzwelligem Licht kommt es zu einer starken Lichtemission im sichtbaren Bereich.

Durch den Einsatz von Fluorescein und Digoxigenin als Markierungsreagenz können die verfahrenstechnischen Komplikationen der radioaktiven Markierung umgangen werden, ohne dass die Nachweisqualität merklich nachlässt. Des Weiteren sind Lysine statistisch weit häufiger in Proteinen vorhanden als Tyrosine, an den der radioaktive Marker gekoppelt wird. Hierdurch können nach einer enzymatischen Spaltung des markierten

Proteins mehr Fragmente nachgewiesen werden als bei der herkömmlichen Methode der ^{125}I -Markierung.

Bei der Markierungsreaktion reagiert ein aktiver Digoxigenin- bzw. Fluoresceincapronsäure-Succinylester mit den primären Aminogruppen der zu markierenden Proteine, vor allem mit der ϵ - Aminogruppe der Aminosäure Lysin. Bei der Reaktion wird der Succinylester abgespalten. Durch den Capronsäure - Anteil werden bei der späteren Bindung des Fab - Fragments bzw. Streptavidin sterische Hinderungen minimiert. Die Markierungsreaktion findet bei einem basischen pH - Wert statt.

2.3.5.1 Materialien und Lösungen

- Markierungslösung 100 mM Natriumhydrogencarbonat
 500 mM NaCl, pH 8,3
- Dialysierschlauch mit MV-Cutoff von 10 000 D (Serva)
- Fluoresceinlösung 10 mg/ 100 μl DMSO D-Biotinoyl- ϵ -aminocaproicacid-N-hydroxy-succinimid-ester
- Digoxigeninlösung 1mg/ 100 μl DMSO Digoxigenin-3-0-methyl-carbonyl- ϵ -aminocaproicacid-N-hydroxysuccinimid-ester

2.3.5.2 Durchführung der Markierungsreaktion

Vor der Markierungsreaktion wurde die benötigte Menge an Markierungsreagens ausgerechnet. Da der aktivierte Ester mit der ϵ - Aminogruppe der Lysine reagiert, wurde zuerst die Anzahl der vorhanden Lysine im Proteinmolekül bestimmt. Diese Wert wurde um eins erhöht, um auch den N - Terminus des Proteins zu berücksichtigen. Nun wurde die Molzahl des abgewogenen Proteins errechnet, und dieser Wert mit der Anzahl der Lysine + 1 multipliziert. Hieraus konnte nun die benötigte Menge an Markierungsreagens errechnet werden. Da die Markierungsreaktion nicht quantitativ verläuft und eine Reaktionseffizienz von 70% angenommen wird, wurde die errechnete Menge an Markierungsreagens mit dem Faktor 1,4 multipliziert.

Das abgewogene Protein wurde in der Markierungslösung gelöst und mit der errechneten Menge an Markierungslösung versetzt. Die Reaktion fand in 2 ml Bechergläsern, in denen sich ein Mini - Rührfisch befand, für 2h auf einem Magnetrührer bei Raumtemperatur statt. Um Flüssigkeitsverluste zu vermeiden, wurden die Bechergläser mit Parafilm verschlossen.

Nach Abschluss der Markierungsreaktion wurde die Lösung in einen Dialysierschlauch eingebracht, der an beiden Enden mit Gefrierbeutelklammern verschlossen wurde. Ein

Ende wurde mit einem Metallgewicht beschwert. Anschließend erfolgte Dialyse gegen den benötigten Puffer bei 4°C für 24 Stunden unter ständigem Umrühren. Der Dialysierpuffer wurde dreimal gewechselt. Mit Hilfe der Dialyse wurde nicht reagiertes Markierungsreagens aus der Proteinlösung entfernt.

<i>Ovalbumin</i>	
Molekulargewicht	45 000 D
Anzahl Lysine	20
eingesetzte Menge Protein	10 mg
Molzahl	$2,40 \times 10^{-7}$
MolzahlxAnzahl Lysine +1	$5,04 \times 10^{-6}$
Molzahl Fluoresceinlösung x 1,4	$7,01 \times 10^{-6}$
Fluoresceinlösung	35 µl
eingesetzte Menge Protein	2,5 mg
Molzahl	$6,00 \times 10^{-8}$
MolzahlxAnzahl Lysine +1	$1,26 \times 10^{-6}$
Molzahl Digoxigeninlösung x 1,4	$1,7 \times 10^{-6}$
Digoxigeninlösung	55 µl

Tab. 4 Berechnungsschema für Markierungsreagens

2.3.6 Proteintransfer auf PVDF-Membran

Um die Proteine, die in der SDS-PAGE aufgetrennt wurden, spezifisch nachzuweisen oder automatisch N - Terminal sequenzieren zu lassen, mussten diese auf einem Medium immobilisiert werden. Dies geschieht durch Elektro - Blotting auf eine PVDF - Membran [98]. Die für spezifische Nachweise eingesetzte PVDF - Membran Immobilon P besitzt eine Porengröße von 0,45µm und eine von der Molekülgröße abhängige, typische Absorptionsfähigkeit von 85µg/cm² (Insulin) bis 295µg/cm² (Ziegen - IgG). Für Sequenzierreaktionen wurde eine spezielle Membran, Immobilon P^{SQ}, mit einer Porengröße von 0,2 µm eingesetzt. Die Proteine werden durch starke unspezifische elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen fixiert. Im Gegensatz zu Nitrocellulose - Membranen bietet die PVDF - Membran den Vorteil von sehr gleichmäßiger Oberflächen- und Strukturbeschaffenheit und hoher Materialfestigkeit.

2.3.6.1 Materialien und Lösungen

- Naßblotkammer TRANS- BLOT (Bio Rad, München)
- PVDF - Membran Immobilon P bzw. Immobilon P^{SQ} (Milipore, Eschborn)
- Filterpapier 0,3 mm, Typ 4369, 460 * 570 mm (Schleicher + Schüll, Deutschland)
- Flachspatel, 24 cm (Roth, Karlsruhe)
- Pinzette, fein (Aesculap- Werke, Waiblingen), Griff - Flächen mit Silikonschlauch geschützt

- Transferpuffer 48 mM (5,82 g/l) TRIS
39 mM (2,94 g/l) Glycin [99]

2.3.6.2 Durchführung

Zur Vorbereitung des Western Blots wurde die Blotkammer mit Transferpuffer gefüllt und bei 4°C vorgekühlt. Das Polyacrylamid - Gel wurde nach vorsichtigem Abheben der Glasplatten für 15- 25 min in Transferpuffer equilibriert; während dieses Schrittes wurde das Gel mit Hilfe eines Skalpell auf die benötigte Größe geschnitten. Die PVDF - Membran wurde auf Gelgröße zurechtgeschnitten, wobei darauf geachtet wurde, die Membran nicht mit ungeschützten Fingern zu berühren. Vier Filterpapiere wurden für

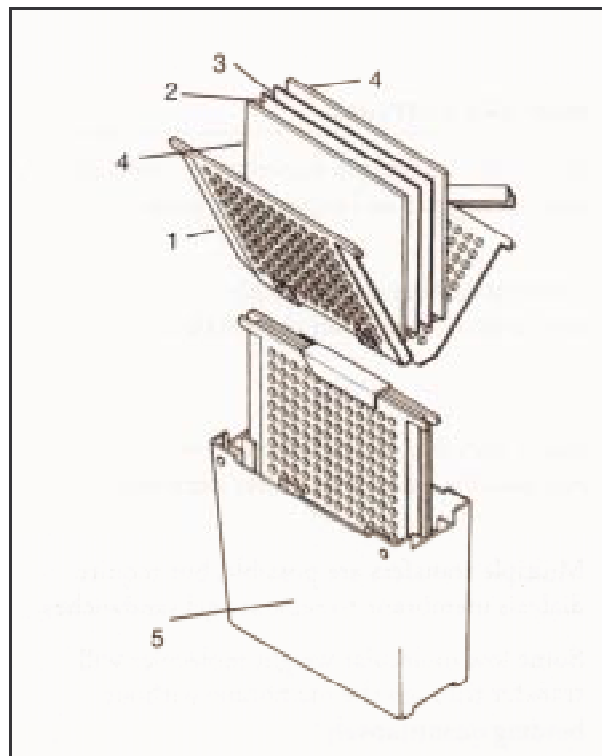


Abb. 6 Schematischer Aufbau der Transfer-Apperatur

1 = Gelhalter, 2 = Gel, 3 = Membran, 4 Filterpapier, 5 Puffertank

das Blotten auf Gelgröße zusammengeschnitten und vor dem Blotten in Transferpuffer inkubiert. Die PVDF - Membran wurde kurz in p.a. Methanol angefeuchtet und für mindestens 5 min. in Transferpuffer equilibriert. Die Schaumstoffunterlagen der Blothaltung wurden nach gründlicher Reinigung mit Aqua bidest. in Transferpuffer befeuchtet und die einzelnen Komponenten wie in Abb. 6 übereinander geschichtet, wobei genau

darauf geachtet werden mußte, das die einzelnen Schichten luftblasenfrei übereinander lagen.

Die Blothalterung wurde anschließend zugeklappt und mit der Klammer verschlossen. Der so vorbereitete Blot sowie die Kühlschlange wurden in die Transferkammer eingehängt. Die komplett zusammengesetzte Blotkammer wurde dann an das Netzteil und das Kühlaggregat, eingestellt auf 4°C, angeschlossen. Während des Blotvorgangs wurde der Transferpuffer mittels eines Magnetrührers verwirbelt, um die Abwärme besser zu verteilen.

Es wurde bei einer Stromspannung von 200 V für eine Stunde unter ständiger Kühlung geblottet [100]. Nach dem Blotvorgang wurde die PVDF- Membran zweimal kurz mit TBS gewaschen.

2.3.7 Nachweis der an PVDF-Membran gebundenen Proteine

- Färbelösung 0,25% Coomassie Blue R-250; 50% Methanol; 10 % Essigsäure
- Entfärbelösung 5% Methanol; 7,5% Essigsäure

Um die Effizienz des Proteintransfers oder Banden für Sequenzierungen zu visualisieren, können die auf der Membran gebundenen Proteine mit Coomassie Blue angefärbt werden. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran zweimal in TBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran für zwei Stunden in der Färbelösung inkubiert. Nach Beendigung des Färbevorgangs wurde die Färbelösung abgenommen und die Membran unter mehrfachem Wechsel in der Entfärbelösung inkubiert. Der Entfärbevorgang dauerte mindestens zwei Stunden, zur vollständigen Entfärbung konnte auch die Membran auch für 24 h bei 4°C entfärbt werden. Nach der Entfärbereaktion wurde die Membran luftgetrocknet und in Hybridisierungsbeutel eingeschweißt.

2.3.8 Nachweis markierter Proteine

Beim Nachweis von Fluorescein- oder Digoxigenin markierten Proteinen wurde die spezifische Bindung zwischen Marker und Antikörper ausgenutzt. Die Detektion der markierten Proteine erfolgte nach gleichem Prinzip. Beim Digoxigenin wurde ein spezifisch gegen Digoxigenin gerichtetes Fab'-Fragment verwendet, an dass das Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt ist, während an das Anti - Fluorescein Fab'-Fragment Peroxidase gekoppelt ist.

Das gekoppelte Enzym setzt ein spezifisches Substrat um, das entweder zu einer visuellen oder spektrometrisch detektierbaren Farbreaktion bzw. zu einer Chemilumineszenz in Form einer kalten Lichtemission führt. Bei der hier eingesetzten Chemilumineszenz konnten die Signale über einen Röntgenfilm detektiert werden.

Zusätzlich zum indirekten Nachweis über eine antikörpervermittelte Reaktion konnten Fluorescein – markierte Proteine direkt durch Aktivierung der Fluoreszenz nachgewiesen werden.

2.3.8.1 Materialien und Lösungen

- BM Chemilumineszenz Western- Blotting Kit (Biotin/Streptavidin) (Boehringer, Mannheim)
- Folienschweißgerät Typ 244 (Schott, Germany)
- Hybrdisierungsbeutel (Gibco, Schottland)
- Röntgenfilmkassetten X-Omatik (Kodak, Stuttgart)
- Tween 20
- α - Dig - AP Stlsg. (250 U/200 μ l) (Roche)
- α - Dig - AP Arb.lsg. 23,75 ml TBS
1,25 ml Block.St.lsg. B
1 μ l Anti - Dig - AP Stlsg.
- Block.Stlsg A 10 ml Blockierungsreagenz 10x (Roche)
mit TBS auf 1 L auffüllen
- Block.Stlsg B 5 g Casein (Fluka) / 100 ml PBS
- Blockierungslösung A 5 ml Blockierungs- Stammlösung A
45 ml TBS
- Blockierungslösung B 10 ml Blockierungs- Stammlösung B
20 ml TBS
- Detektionslösung AP 1,98 ml Detektionspuffer
20 μ l CDP- Star - Lösung
- Detektionslösung POD 1,5 ml Substrat- Lösung A (5 mM Luminol, 5 mM 4-Jodphenol in
0,1 M Tris-HCl ,pH 9,35)
1,5 ml Substrat- Lösung B (100 μ l/L Wasserstoffperoxid in
0,1 M Tris - HCl, pH 9,35)
- Detektionspuffer AP 0,1 M Tris-HCl
0,1 M NaCl
50 mM MgCl₂
pH auf 9,5 eingestellt
- α - FLUOS POD- St.lsg. lyophilisiertes Anti – FLUOS - Fab- POD in 1ml Aqua bidest (250 U/ ml)
vor Gebrauch kurz abzentrifugieren
- α -FLUOS POD- Arb.lsg. 1,25 ml Blockierungsreagenz- Stammlösung
23,75 ml TBS
10 μ l Anti- FLUOS- POD- Stammlösung

- Waschpuffer 0,1 % Tween 20 in Maleinsäurelsg (1ml Tween 20/ L TBS)

2.3.8.2 Nachweis von Fluorescein-markierten Proteinen

Zum direkten Nachweis über die Fluoreszenz wurde die gewaschene Membran in einem Hybridisierungsbeutel eingeschweißt. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Staubpartikel mit eingeschlossen wurden. Anschließend wurde die eingeschweißte Membran auf einen UV-Tisch gelegt und mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm angeregt. Die emittierte Fluoreszenz wurde mit dem Photo - Imaging System aufgezeichnet und digital gespeichert. Danach konnte die Membran für den indirekten Nachweis weiter verarbeitet werden. Dazu wurde die Membran wieder aus dem Hybridisierungsbeutel herausgenommen.

Die Inkubationsschritte fanden alle auf einem Taumler bei mäßiger Geschwindigkeit und Raumtemperatur statt. Die in TBS gewaschene Membran wurde 30 min. in Blockierungslösung A inkubiert, anschließend wurde die Blockierungslösung verworfen. Im nächsten Schritt wurde die Membran 45 min. mit α - FLUOS- POD- Arbeitslösung inkubiert. Das ungebundene α - FLUOS- POD wurde nach der Inkubation durch viermaliges Waschen (je 10 min.) in 100 ml Waschpuffer entfernt. Während dieser Schritte wurden Substrat - Lösung A und B in einem Wasserbad bei 25°C auf Raumtemperatur gebracht und 30 Minuten vor der Nachweisreaktion die Detektionslösung angesetzt. Die gewaschene PVDF - Membran wurde in einem Hybridisierungsbeutel von drei Seiten eingeschweißt, die überflüssige Flüssigkeit mit einer Glaspipette durch Rollen auf einer weichen Unterlage hinausgedrückt, das Detektionsreagens vorsichtig eingefüllt, gleichmäßig mit der Glaspipette verteilt und nach Entfernen des überschüssigen Detektionsreagens zugeschweißt. Die Inkubation mit dem Röntgenfilm erfolgte im Fotolabor unter geeignetem Schutzlicht in einer Röntgenfilmkassette. Die Expositionsdauer variierte in Abhängigkeit von der Signalstärke zwischen 0,5 s und 1 h, wobei die Röntgenfilme sofort entwickelt wurden.

2.3.8.3 Nachweis von Digoxigenin-markierten Proteinen

Der Nachweis von Digoxigenin - markierten Proteinen erfolgt durch den Umsatz von CDP - Star durch die alkalische Phosphatase. CDP - Star ist ein ultrasensitives Chlor-substituiertes 1,2 - Dioxetan Chemilumineszenz - Substrat für die alkalische Phosphatase und führt zur schnellen Produktion von sichtbarem Licht. Die enzymatische

Dephosphorylierung von CDP - Star führt zur Bildung eines metastabilen Dioxetan Phenolat - Anions, das beim Zerfall in gepufferter Lösung zu einer Lichtemission bei 466 nm führt. Auf PVDF - Membranen wird die maximale Lichtemission nach ca. 3 h erreicht und bleibt bis zu 3 Tagen erhalten. Da bei der Detektion aufgrund der, im Vergleich zum α -FLUOS-POD - System, höheren unspezifischen Bindung des anti - Dig - AP - Fab´ - Fragments an PVDF - Membranen, mußte mit BSA blockiert werden, um eine deutliche Herabsetzung des Hintergrundes zu erreichen.

Nach dem Abbau des Blots wurde die Membran sofort für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur im Blockierungspuffer inkubiert. Um eine noch weitere Herabsetzung des Hintergrundes zu erreichen, wurde auch über Nacht bei 4°C blockiert. Nach erfolgter Blockierung wurde das Reagens verworfen und durch Anti - Dig - AP- Arbeitslösung ersetzt. Exakt eine halben Stunde später wurde viermal mindestens zehn Minuten im Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Membran wurde in einem Hybridisierungs - Beutel derartig eingeschweißt, dass eine Seite offen blieb. Die CDP - Star - Detektionslösung wurde so in den Hybridisierungs - Beutel eingefüllt, dass nur die Oberseite der Membran benetzt wurde. Durch Rollen mit einer Glaspipette wurde die Lösung gleichmäßig über die Membran verteilt und überflüssiges Reagens herausgerollt. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurde das Detektionsreagens vollständig herausgedrückt, der Beutel aufgeschnitten und die Membran in einem neuen Hybridisierungsbeutel vollständig eingeschweißt. Hierdurch wurden unspezifische Signale durch Bindung des umgesetzten CDP - Star - Substrates an den Hybridisierungsbeutel vermieden. Die eingeschweißte Membran wurde nun in einer Expositionskassette fixiert und konnte nach ca. 15 Minuten auf einem Röntgenfilm exponiert werden. Das Auflegen des Röntgenfilms erfolgte unter Schutzlicht. Durch eine Veränderung der Expositionszeit konnte die Signalstärke variiert werden, typische Expositionszeiten lagen zwischen wenigen Sekunden bis zu eineinhalb Stunden. Die Entwicklung der Röntgenfilme konnte sofort erfolgen.

2.4 Chromatographische Methoden

2.4.1 Prinzip der Gelfiltration

Mit Hilfe der Gelfiltration lassen sich Moleküle in Lösung aufgrund unterschiedlicher Größe trennen, indem sie durch eine mit einem Gel gepackten Säule fließen. Das Gel ist

ein heterogenes Phasensystem, das aus einer flüssigen und einer festen Phase, der Gelmatrix, besteht. Die Gelmatrix besteht aus porösen Kügelchen, die aus unlöslichen, aber stark hydratisierten Polymeren wie Dextran oder Agarose bestehen. Die Poren, welche mit der flüssigen Phase gefüllt sind, haben eine Größe, die vergleichbar ist mit der Größe der zu trennenden Moleküle. Relativ kleine Moleküle können in die Poren diffundieren, wogegen relativ große Moleküle aufgrund ihrer Größe nicht im gleichen Maße in die Poren diffundieren können. Sehr große Moleküle können überhaupt nicht in die Poren diffundieren und bleiben in der flüssigen Phase, dem **Ausschlußvolumen** der Säule. Große Moleküle passieren die Säule schneller und verlassen sie zuerst, weil ihnen ein kleineres Volumen zugänglich ist. Kleinere Moleküle werden länger zurückgehalten, ihre **Retentionszeit** ist um so größer, je kleiner sie sind. Die Reihenfolge des Austritts von Molekülen ist umgekehrt zur Reihenfolge bei der Elektrophorese. Bei der Gelfiltration wird nicht die Molekülmasse, sondern die Größe in Form des Stoke'schen Radius des Moleküls bestimmt [101 a - c].

Für die Auflösung der Trennung ist das verwendete Säulenmaterial (u.a. Porengröße), Länge der Säule, aufgetragenes Probenvolumen und Flußrate von Bedeutung. So ist die Auflösung proportional zur Quadratwurzel der Säulenlänge, aber auch die Elutionszeit ist proportional der Säulenlänge. Da die Separation nur von der Größe der Moleküle abhängt, ist die Zusammensetzung des Eluents für die Trennung nicht von Bedeutung. Üblicherweise wird ein Puffer verwendet, der einen definierten pH und Ionenzusammensetzung besitzt, bei dem die Struktur und biologische Funktion der zu trennenden Moleküle erhalten bleibt. Eine Ionenstärke größer als 0,15 ist generell zu empfehlen, um unerwünschte ionische Wechselwirkungen zwischen den gelösten Molekülen und der Gelmatrix zu verhindern.

2.4.2 Prinzip der Ionenaustausch- Chromatographie

Ionenaustausch- Chromatographie (IEX) trennt Moleküle nach ihrer Nettoladung. Negativ oder positiv geladene Gruppen werden kovalent an eine Matrix gekoppelt, wodurch man Kationen- respektive Anionenaustauscher erhält. Moleküle mit entgegengesetzter Ladung werden vom Ionentauscher gebunden, während neutrale und gleich geladene im Ausschlußvolumen der Säule eluieren. Die Bindung der geladenen Moleküle ist reversibel und adsorbierte Moleküle werden gewöhnlich mit einem Salz- oder pH- Gradienten eluiert. Die Wahl der Ionentauscher Matrix ist abhängig von den Eigenschaften des zu

untersuchenden Moleküls. Für amphotere Moleküle bestimmen der isoelektrische Punkt des Moleküls und die Stabilität bei verschiedenen pH- Werten die Separationsstrategie. Bei einem pH über dem pI des zu untersuchenden Moleküls ist das Molekül positiv geladen. Ist das Protein zudem bei diesem pH stabil, kann es mittels eines Anionenaustauschers gereinigt werden. Bei umgekehrten Verhältnissen sollte ein Kationentauscher gewählt werden. Weiterhin spielen die beteiligten Elutionspuffer bei der Spezifität der Bindung eine große Rolle. Das Gegenion fällt hierbei stärker ins Gewicht. Auch die Konformation der zu untersuchenden Moleküle hat Einfluß auf die Trennbedingungen. [102]

2.4.3 Basisaufbau des FPLC-Systems

Das FPLC (FAST PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY) - System der Firma Pharmacia ist ein automatisiertes Chromatographiesystem, das es dem Benutzer erlaubt, reproduzierbar die verschieden Arten der Flüssigkeits - Chromatographie durchzuführen. Durch die elektronische Steuerung können Parameter wie Flußrate und Gradientenverlauf konstant gehalten sowie komplexe Abläufe programmiert werden. Das Basissystem besteht aus dem Chromatographie Kontroller LCC 500, zwei P-500 Kolbenpumpen, der Peristaltikpumpe P-1, dem Motorventil MV-7, dem Monitor UV-1, dem Zweikanalschreiber REC - 482 sowie dem Fraktionssammler FRAC-100. Mit diesem System können Drücke bis zu 5 MPa aufgebaut werden, wodurch hohe Flußraten auch bei fest gepackten Säulen möglich sind.

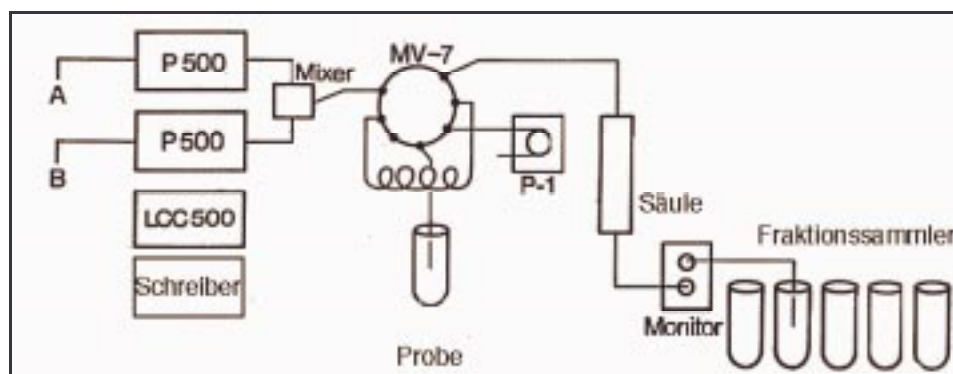


Abb. 7 Übersichtsschema der FPLC-Anlage

2.4.3.1 Der Chromatographie-Kontroller LCC 500

Der LCC 500 ist ein 32 kB Computer, der in einer auf die Erfordernisse der Flüssigkeits-Chromatographie abgestimmten Sprache programmiert wird. Als Programmierbasis können Volumeneinheiten in ml oder Zeiteinheiten in Minuten gewählt werden. Mit dem Kontroller können die Ventile, die Pumpen und der Fraktionssammler angesteuert werden. Zur Datenerfassung sind zwei Monitoreingänge vorhanden, die mit einem A/D - Wandler verbunden sind. Mit Hilfe des eingebauten Peak - Integrators können die Daten quantitativ ausgewertet werden. Mit Hilfe des Kontrollers ist es möglich, den kompletten Chromatographieablauf zu automatisieren, hierzu können bis zu 10 Programme bzw. Unterprogramme gespeichert werden.

2.4.3.2 Die Kolbenpumpe P-500

Die Pumpe P-500 ist eine Präzisions - Pumpe für die Flüssigkeits - Chromatographie und andere Applikationen, bei denen ein konstanter Fluß bei Drücken bis zu 5 MPa benötigt wird. Die Pumpe arbeitet hochreproduzierbar, besonders bei niedrigen Flußraten über den gesamten Druckbereich. Die Pumpe ist resistent gegen die meisten Lösungsmittel, auch gegen korrosive Chemikalien. Mit Hilfe von zwei Pumpen und nachgeschaltetem Mischer können präzise Gradienten geformt werden. Die Steuerung kann komplett vom Kontroller übernommen werden.

2.4.3.3 Das Motorventil MV-7

Das Motorventil MV-7 verfügt über 7-“Ports“ und kann in drei Positionen geschaltet werden. Mit Hilfe des Ventils ist automatischer Probenauftrag möglich; durch die Wahl unterschiedlicher Probenschleifen kann das Auftragsvolumen bestimmt werden. Das Volumen der Probenschleifen variiert von 25 - 500 µl, größere Probenvolumina werden

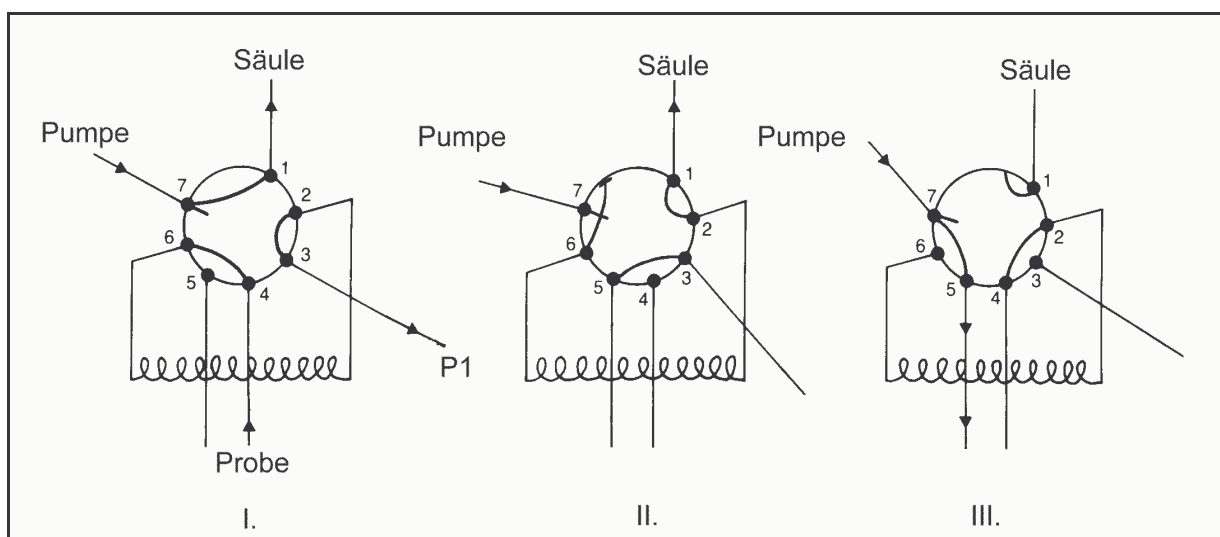


Abb. 8 Operationspositionen des Motorventils MV-7

lumen der Probenschleifen variiert von 25 - 500 μl , größere Probenvolumina werden mit Hilfe des Superloop aufgetragen. Die MV-7 wird vollständig vom Controller gesteuert, und mit Hilfe der Peristaltik - Pumpe P-1 ist ein vollautomatischer Probenauftrag möglich. Beim Beladen der Probenschleife kommt es durch das interne Totvolumen des Ventils zu einem Probenverlust von mindestens 10 μl , es sollte jedoch immer das doppelte Probenvolumen der Schleife zur Verfügung stehen.

Die Ventilposition I. ermöglicht das Befüllen der Probenschleife, der Puffer fließt direkt zur Säule. Zum Probenauftrag wird das Ventil in die Position II. geschaltet, der Puffer fließt nun durch die Probenschleife zur Säule. Die Probe wird somit auf die Säule aufgetragen. Mit Hilfe der Position III. ist es möglich, den Pufferwechsel zu automatisieren, der Puffer wird an der Säule vorbei geleitet.

2.4.3.4 Der Fraktionssammler FRAC -100

Der Fraktionssammler FRAC- 100 ist ein vielseitiges Instrument für das automatische Sammeln von Fraktionen. Die Fraktionen können nach verschiedenen Kriterien gesammelt werden, mit Zeit- oder Volumenbasis. So können uniforme Fraktionen pro Volumen oder Zeiteinheit gesammelt werden, oder nur die Peak - Fraktionen gesammelt werden. Der FRAC-100 kann vom Controller gesteuert werden, er kann jedoch auch eigenständig programmiert werden und unabhängig vom Controller operieren.

2.4.3.5 Der Monitor UV-1

Der Monitor UV-1 ist ein Zweistrahl - Durchfluß UV - Absorptionsmeter, mit dem die UV-Absorption bei 214, 254 oder 280 nm gemessen werden kann. Die Meßzellen haben eine optische Pfadlänge von 3 mm oder 10 mm. Die Ergebnisse können als Absorptions- (AU) oder Transmission - Einheiten (T%) ausgegeben werden. Die Sensitivität kann von 0,01 bis 2 AU oder 0-100% Transmission eingestellt werden. Das Monitor - Signal wird in den Controller, den Fraktionssammler und in den Schreiber eingespeist.

2.4.4 Gelfiltration mit der Superose 12 - Säule

Superose 12 ist ein quervernetztes Agarose Medium, das für die Gelfiltration von Biomolekülen optimiert ist [103]. Durch den engen Bereich der Partikelgröße erlaubt das Superosemedium hohe Flußraten bei niedrigen Drücken. Die durchschnittliche Partikelgröße beträgt 10 μm ; der optimale Trennbereich liegt zwischen 1 und 100 kD. Das Me-

dium liegt in einer Pharmacia HR 10/30 Säule gepackt vor. Die Länge der Säule beträgt 30 cm, und der innere Durchmesser 10 mm. Die Flußraten liegen zwischen 0,3 - 1,0 ml/min bei einem maximalen Druck von 3 MPa. Das maximale Probenvolumen liegt bei 200 µl und sollte 30 mg/ml Protein nicht überschreiten.

2.4.4.1 Proben- und Puffervorbereitung

Um optimale Trennergebnisse zu erhalten, ist eine akribische Puffer- und Probenvorbereitung notwendig. Alle verwendeten Puffer wurden durch ein 0,2 µm Filter sterilfiltriert und in einer Saugflasche vollständig entgast. Die Proben wurden zunächst bei 10.000g für zehn Minuten abzentrifugiert und der Überstand durch ein 0,2 µm Filter filtriert. Anschließend wurde die Proben im Ultraschallbad für fünf Minuten entgast. Die so behandelte Probe konnte nun mit Hilfe der Peristaltikpumpe P-1 in die Probenschleife eingebracht werden.

2.4.4.2 Durchführung der Gelfiltration

Das Motorventil MV-7 wurde mit einer 50µl-Probenschleife versehen, der Monitor UV-1 mit der Optischen Einheit für 214 nm verbunden und die OD auf 0,2 bzw. 0,5 AU eingestellt. Das Ventil wurde auf die Position I. gestellt und die Probenschleife mit Hilfe der Peristaltikpumpe gefüllt. Nach Anschluß der Säule wurde das folgende Schaltprogramm gestartet und das Monitorsignal auf dem Schreiber mitprotokolliert.

<i>Zeit</i>	<i>Befehl</i>	<i>Wert</i>	<i>Kommentar</i>
0,0	CONC %B	0,0	Nur Puffer A verwenden
0,0	ML / MIN	0,5	Flußrate von 0,5 ml / min
0,0	CM / MIN	0,5	Schreibervorschub 0,5 cm / min
12,0	CLEAR DATA		Internen Datenspeicher des Kontrollers löschen
12,0	MONITOR	1	Peak Monitor 1 einstellen (UV-1)
12,0	LEVEL %	10,0	Peaks ab 10% Vollausschlag auswerten
12,0	MIN / MARK	1,0	Internen Druckervorschub auf 1 Markierung / min
12,0	INTEGRATE	1	Internen Peakintegrator mit autom. Nullabgleich an
12,0	VALVE.POS	1.2	Ventil auf Probenauftrag stellen
28,0	VALVE.POS	1.1	Ventil auf Durchfluß stellen
78,0	MONITOR	0	Monitor aus
78,0	INTEGRATE	0	Peakintegrator aus und Werte ausdrucken

Tab. 5 Schaltprogramm für die Gelfiltration mit Superose 12

2.4.4.3 Regeneration der Säule

Um die Trenneigenschaften der Säule zu erhalten, ist ein regelmäßiges Waschen der Säule notwendig; nach ca. 30-40 Chromatographieläufen ist zusätzlich ein Filterwechsel notwendig.

Zur Reinigung wurde die Säule zuerst mit 50 ml 70% Essigsäure gewaschen, dabei wurde eine Flußrate von 0,2 ml / min eingestellt. Die Essigsäure wurde durch 50 ml 20% Ethanol ersetzt. Im nachfolgenden Schritt wurde der pH mit 0,1 M NaOH neutralisiert und im abschließenden Schritt die Säule mit Aqua bidest. gewaschen. Die Säule konnte nun mit dem benötigten Puffer equilibriert werden.

Wurde die Trenneffizienz der Säule durch den Waschvorgang nicht wieder hergestellt, wurde zusätzlich der obere Filter der Säule nach Herstellerangaben gewechselt.

2.4.5 Anionenausch- Chromatographie mit POROS HQ/F und MonoQ HR10/10

Die analytische Säule POROS HQ/F ist ein Polystyren / Divinylbenzen Medium, das für die Perfusionschromatographie optimiert ist. Bei der Perfusionschromatographie enthalten die Matrixpartikel zusätzliche Kanäle, die es der Flüssigkeit erlauben, auch durch die Beads zu fließen. Dadurch wird die erforderliche Distanz für die Diffusion der Biomoleküle zu und von internen Bindungsseiten gegenüber der konventionellen Chromatographie verkürzt. Hierdurch werden hohe Flußraten ohne Verlust der Bindungskapazität und Auflösung ermöglicht. Damit kann die benötigte Zeit für einen Lauf drastisch verkürzt werden, was vor allem für analytische Trennungen von Vorteil ist [104] . Die präparative Säule MonoQ HR 10/10 ist ein quervernetztes, hydrophiles Polyetherresin, an das quaternäre Ammoniumgruppen gekoppelt sind. Die MonoQ ist gegenüber der POROS HQ/F Säule ein klassisches Medium. Beide sind starke Anionenaustauscher und zeigen eine ähnliche Trennleistung. Die mit der POROS HQ/F Säule ermittelten Gradienten konnten leicht auf die präparative Säule übertragen werden, wenn man den Gradienten in Säulenvolumen (CV) berechnete.

2.4.5.1 Proben und Puffervorbereitung

Um optimale Ergebnisse zu erhalten, wurden die Probe und die Puffer sorgfältig vorbereitet. Alle verwendeten Puffer wurden sterilfiltriert und vollständig entgast. Die Proben

<i>Zeit POROS</i>	<i>Zeit MonoQ</i>	<i>Befehl</i>	<i>Wert</i>	<i>Kommentar</i>
0,0	0,0	CONC %B	0,0	Nur Puffer A
0,0	0,0	ML / MIN	4,00	Flußrate auf 4 ml/min
0,0	0,0	CM / MIN	0,50	Schreibergeschwindigkeit
0,0	0,0	VALVE.POS	1,1	Ventil auf Pos. I.
0,0	0,0	CLEAR DATA		Internen Speicher löschen
0,0	0,0	MONITOR	1	PEAK Monitor 1 (UV-1)
0,0	0,0	LEVEL %	10	Peaks ab 10% Vollauschlag
0,0	0,0	INTEGRATE	1	Int. Peakintegrator ein
0,0	0,0	PORT.SET	6.1	Fraktionssammler ein
2,0	2,0	CONC %B	0,0	
2,0	2,0	CONC %B	100	Nur Elutionspuffer, Säule waschen
4,0	14,0	CONC %B	0,0	
10,0	24,0	ML / MIN	1,0	Flußrate für Probenauftrag
10,0	24,0	VALVE.POS	1,2	Probenauftrag
10,0	24,0	MIN / MARK	1,0	Internen Schreiber ein
11,0	25,0	VALVE.POS	1,1	Ende Probenauftrag, hier 1 ml
11,0	25,0	ML / MIN	4,0	Normale Flußrate
13,0	35,0	CONC %B	0	Start Gradient
33,0	285,0	CONC %B	100	Gradient in 100 CV
33,0	285,0	PORT.SET	6.0	Fraktionssammler aus
33,0	285,0	CONC %B	0	Nur Auftragspuffer
40,0	300,0	CONC %B	0	Säule waschen

Tab. 6 Schaltprogramm für die Anionenaustauschchromatographie

wurden bei 10.000g zentrifugiert und anschließend durch ein 0,2µm Filter sterilfiltriert. Zudem wurde die Probe vorher in den Laufpuffer A umdialysiert.

2.4.5.2 Durchführung der Anionenaustauschchromatographie

Das Motorventil MV – 7 wurde mit dem 10 ml Superloop verbunden, der Monitor UV-1 mit der optischen Einheit für 280 nm verbunden und die OD auf 0,2 bzw. 2,0 eingestellt. Das Ventil wurde auf Position I. gestellt und der Superloop mit Hilfe der Peristaltikpumpe gefüllt. Nach Anschluß der Säule wurde das Schaltprogramm in Tab. 6 gestartet und das Monitorsignal auf dem Schreiber mitprotokolliert.

2.5 Enzymatische Verdauung der Modellproteine in vitro

Um Degradierungsfragmente der Modellantigene durch die Proteasen Kathepsin B und D zu ermitteln, wurden verschiedene Testsysteme etabliert. Sie ermöglichen den Nachweis der Fragmente sowohl der markierten als auch der unmarkierten Modellantigene; die unmarkierten Proteine können sowohl in der SDS-PAGE als auch mittels Gelfiltration getrennt werden.

2.5.1 In vitro Verdauung der unmarkierten Modellantigene

Die Inkubation der Modellantigene mit den Proteasen fand bei 37°C statt. Die Konzentration an Protease wurde so gewählt, dass das jeweilige Enzym mittels Silberfärbung nicht nachweisbar war. Die Konzentration an Modellantigen wurde so gewählt, dass einerseits das Gel nicht überladen wurde, andererseits jedoch die proteolytischen Fragmente gut nachweisbar waren. Um den in vivo Bedingungen möglichst nahe zu kommen, wurden die pH - Werte der Puffer auf pH 5,9 bzw. pH 4,6 eingestellt. Um den Puffer durch Zugabe der Antigenlösung nicht zu erschöpfen, waren die Antigene im jeweiligen Puffer in einer Konzentration von 2,5mg/ml gelöst. Das Endvolumen des Ansatzes betrug 40 µl, die Inkubationsdauer variierte von 1-4 Stunden.

	<i>Kontrolle</i>	<i>Prot. + B</i>	<i>Prot. + D</i>	<i>Prot. +BD</i>
Protein	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Kathepsin B	—	3 µl	—	3 µl
Kathepsin D	—	—	3 µl	3 µl
DTT	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Puffer	29 µl	26 µl	26 µl	23 µl

Tab. 7 Pipettierschema des In Vitro Verdau unmarkierter Proteine

Die Proben wurden nach obigen Schema pipettiert und bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Proben kurz zentrifugiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Proben mit 40 µl Laemmli - Puffer versetzt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte mittels Silberfärbung.

2.5.2 In vitro Verdauung der markierten Modellantigene

Der in vitro Verdau der markierten Proteine wurde gegenüber der Verdauung der unmarkierten Proteine leicht modifiziert. Durch die erheblich höhere Nachweisempfindlichkeit der Chemilumineszenzreaktion bzw. Fluoreszenz gegenüber der Silberfärbung konnte die eingesetzte Proteinmenge um den Faktor zehn reduziert werden. Nach der Markierung lag das Protein in einer Konzentration von 2,5 mg/ml vor. Um das Verhältnis Protease zu Protein nicht zugunsten der Protease zu verschieben, wurde die eingesetzte Proteasekonzentration ebenfalls verringert. Die Endkonzentration des Ansatzes betrug 40 µl, der pH betrug 5,9 bzw. 4,6.

	<i>Kontrolle</i>	<i>Prot. + B</i>	<i>Prot. + D</i>	<i>Prot. + BD</i>
Protein	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Kathepsin B	—	1 μ l	—	1 μ l
Kathepsin D	—	—	1 μ l	1 μ l
DTT	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Puffer	38 μ l	37 μ l	37 μ l	36 μ l

Tab. 8 Pipettierschema des In Vitro Verdau markierter Proteine

Nach dem Pipettieren der Ansätze wurde für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde Zugabe von 40 μ l - Laemmli - Puffer gestoppt und die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis der proteolytischen Fragmente erfolgte durch Chemiluminiszenz - Detektion bzw. Fluoreszenz nach dem Transfer der Fragmente auf PVDF - Membran.

2.6 Durchführung der intrazellulären Prozessierung von markierten Antigenen

Die für den Versuch eingesetzten dendritischen Zellen wurden aus GM-CSF - supplementierten Knochenmarkskulturen gewonnen. Die Zellen wurden für acht Tage in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml Kulturmedium (DMEM, 5% FCS, 1% Gln, 2 ng rmGM-CSF) in Petrischalen kultiviert, die Zellernte erfolgte mit Versen. Knochenmarksmakrophagen wurden durch elftägige Kultur von Knochenmarkszellen in Gegenwart von M-CSF gewonnen. Die Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml Kulturmedium (DMEM, 50% L929-Überstand, 5% FCS, 10% HS, 1% Gln) für elf Tage kultiviert und anschließend mit Versen geerntet. Die Knochenmarksmakrophagen wurden 72h vor Versuchsende mit LPS bzw. γ - Interferon stimuliert. Die Zugabe von Proteinaseinhibitoren erfolgte 20h vor Versuchsende.

Die Zellen wurden einem Tag vor der Antigenzugabe in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml Kulturmedium bei DC's bzw. 1×10^6 Zellen/ml Kulturmedium nach zweimaligem Waschen in 24-Well-Kulturplatten eingesetzt. Die Zugabe des markierten Antigens erfolgte in einer Konzentration von 25 μ g/ml Kulturmedium über einen Zeitraum von 5min bis zu 4h. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die 24 Well- Platten bei 1200 U/min für 15 min. abzentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Nach sorgfältigem Entfernen des PBS wurde zu den Zellen die entsprechende Solubilisierungslösung gegeben. Nach einer mindestens halbstündigen Inkubation konnten die Zellen bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert werden.

2.7 Molekulargenetische Arbeiten

2.7.1 Isolierung von Gesamt- RNA aus eukaryontischen Zellen

Bei allen Arbeiten mit RNA muß besonders die Kontamination mit RNA- degradierenden Enzymen, den Ribonukleasen, vermieden werden. Diese ubiquitären und äußerst robusten Enzyme zeichnen sich durch extreme Thermostabilität und Unempfindlichkeit gegen chemische Agenzien der verschiedensten Stoffklassen aus. Da diese Enzyme bereits in geringen Mengen wirksam sind, wurden folgende Vorsichtsmaßnahmen getroffen:

- Bei allen Arbeiten wurden Handschuhe getragen
- Glas- und Plastikwaren wurden vor Gebrauch autoklaviert
- Wenn möglich wurden die Lösungen zur Inaktivierung von RNasen mit DEPC behandelt und autoklaviert
- Es wurde nur DEPC- behandeltes Aqua bidest. (DEPC-H₂O) verwendet
- RNA- Präparationen wurden stets bei -70°C gelagert
- Alle Lösungen wurden sterilfiltriert

2.7.1.1 Einfrieren von Zellen für RNA- Präparationen

Die für die RNA- Isolierung vorgesehenen Zellen wurden geerntet und einmal mit PBS gewaschen. Von dem erhaltenen Zellsediment wurde verbleibende Waschflüssigkeit möglichst weitgehend entfernt. Die Zellen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -70°C gelagert.

2.7.1.2 Präparation der RNA

- GSCN-Stammlösung 59,1 g GSCN
 950 mg Na-Citrat
 625 mg Sarcosyl
 ad 100 ml DEPC-H₂O
- GSCN/ME 976 µl GSCN- Stammlösung
 24 µl 2-Mercaptoethanol
- NaAc-Lsg. 3M Natriumacetat, pH 8,0
- Phenol/Chloroform Lsg. 25 ml Phenol
 24 ml Chloroform
 1 ml Isoamylalkohol
- DEPC/EtOH 5 µl DEPC
 45 µl 99,9% Ethanol
- NP40-Lyse- Stammlsg. 0,5 ml 2 M Tris
 2,8 ml 5 M NaCl
 1,5 ml 1 M MgCl₂
 0,5 ml NP40

- NP40-Lyse ad 100 ml DEPC-H₂O
450 µl NP40-Lyse- Stammlösung
0,45 µl DEPC/EtOH

Die Isolierung der Gesamt - RNA aus eukaryontischen Zellen wurde in Anlehnung an die Methode von Chomczynski und Sacchi [105] durchgeführt.

Alle Arbeitsschritte wurden soweit möglich auf Eis durchgeführt. Zudem wurden nur autoklavierte, sterile Plastikwaren benutzt. Zu den schockgefrorenen Zellen wurden 450 µl NP40 - Lyse gegeben und gut resuspendiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur für zwei Minuten bei 14.000 U/min scharf abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorf - Gefäß überführt. Hierzu wurden 450 µl GSCN/ME - Lösung gegeben und für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Aufgrund der reduzierenden Wirkung von 2-Mercaptoethanol und der denaturierenden Wirkung von GSCN wurden endogene RNasen inaktiviert. Nach Zugabe von 90 µl dreimolarer Natriumacetatlösung und 1 ml Phenol / Chloroformlösung wurde die Mischung gut gevortext. Nach einer dreissigminütigen Zentrifugation bei 14.000 U/min und 4°C bildeten sich drei Phasen aus. Die obere enthielt die RNA, die mittlere die Interphase mit der genomischen DNA und die untere Phase die Proteinen. Die obere, RNA - haltige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt und mit einem Volumen Chloroform gewaschen. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 14.000 U/min und 4°C wurde die obere Phase wiederum in ein neues Gefäß überführt und ein Volumen Isopropanol zur Fällung hinzugegeben. Nach einer mindestens dreissigminütigen Inkubation bei -70°C wurde die Probe für zwanzig Minuten bei 14.000 U/min und 4°C abzentrifugiert. Das Isopropanol wurde abgenommen und durch 1,5 ml kaltes 70%iges Ethanol ersetzt. Im Anschluß an eine zehnminütige Zentrifugation (14.000, 4°C) wurde das Ethanol abgezogen und das Pellet luftgetrocknet. Nach dem das Pellet gut getrocknet war, wurde es in 30 µl Aqua bidest. gelöst. Die RNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -70°C gelagert.

2.7.1.3 Photometrische Mengenbestimmung

- Photometer Lambda 2 UV/VIS Spektrometer (Perkin Elmer)
- Quarz Mikroküvetten

Ein Aliquot der RNA - Probe wurde mit DEPC - H₂O versetzt und im Photometer bei 260nm gemessen. Als Richtwert zur Ermittlung der RNA - Menge gilt: eine optische

Dichteinheit bei 260nm entspricht 40 μg RNA pro ml. Während bei $\lambda = 260\text{nm}$ vorwiegend Nukleinsäuren absorbieren, zeigen Proteine eine Absorption bei $\lambda = 280\text{nm}$. Das Verhältnis der Absorption bei diesen beiden Wellenlängen erlaubt Aussagen über den Reinheitsgrad der RNA – Präparation: Der Quotient aus OD_{260} zu OD_{280} sollte 1,8 – 2,0 betragen. Verunreinigungen mit Proteinen lassen das Verhältnis kleiner werden.

2.7.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

- TAE 50-fach 2 M Tris (242 g/l)
 50 mM EDTA
 5,71 % (v/v) Eisessig
 ad 100% Aqua bidest.
- Trenngel 1 % (w/v) Agarose Type II (Sigma)
 2% (v/v) TAE 50-fach
 0,01% (v/v) Ethidiumbromidlösung
 ad 100% DEPC-H₂O
- Elektrophoresepuffer 2 % (v/v) TAE 50-fach
 ad 100% DEPC-H₂O

- Ladepuffer 50 % (w/v) Glycerin
 1 mM EDTA
 0,4 % (w/v) Bromphenolblau
 0,4 % (w/v) Xylencyanol

- Gelträger
- Probenkamm
- Elektrophoresekammer DNA-Mini-Sub-Cell (Bio-Rad)

Zur Herstellung des Agarose – Trenngels wurde die Agarose in DEPC-H₂O durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60°C wurden die übrigen Gelkomponenten zugesetzt, gemischt und in einen vorbereiteten Gelträger gefüllt. Mit einem Kunststoffkamm wurden Startkanäle für die Nukleinsäure - Proben ausgespart. Das Gel wurde nach dem Erkalten in eine Elektrophoresekammer überführt, die mit Elektrophoresepuffer gefüllt wurde, bis das Gel etwa 1mm bedeckt war. Die zu untersuchende Probe wurde mit 1 μl Ladepuffer versetzt, mit DEPC-H₂O auf 10 μl aufgefüllt und in die Probenaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 100V, bis der Farbmaler das Gelende erreicht hatte.

2.7.3 PCR – Methoden

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro* – Technik, mit der man gezielt Nukleinsäureabschnitte, die von zwei bekannten DNA – Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigen kann. Sie wurde von Erlich, Saiki und Mullis für die *in vitro* – Vermehrung des β - Globingens etabliert [106]. Um DNA mit Hilfe einer PCR amplifizieren zu können, benötigt man als Starthilfe Oligonucleotidprimer, sogenannte Amplimer. Dabei handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA – Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA – Matrize (Template) sind. Eine DNA – Polymerase verlängert unter den richtigen Reaktionsbedingungen in Gegenwart von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der einzelsträngigen DNA – Matrize und synthetisiert so neue DNA – Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist. All diese DNA – Moleküle liegen am Ende der Reaktion als Doppelstränge vor. Um diese Synthese zu wiederholen, muß man die doppelsträngige DNA erneut durch Hitze aufschmelzen und nach Abkühlung die Primer wieder binden lassen. Sobald die Primer hybridisieren und eine optimale Temperatur vorherrscht, verlängert die Polymerase die Primer. Die Zahl der amplifizierten Moleküle steigt exponentiell nach der Formel 2^n , wobei n die Anzahl der Vermehrungszyklen angibt. Jeder Reaktionszyklus einer PCR besteht aus drei typischen Reaktionsritten:

- I. Thermische Denaturierung der Matrizen – DNA bei $93^{\circ}\text{C} - 95^{\circ}\text{C}$
- II. Anlagerung (Anneling) der Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige DNA ($50 - 65^{\circ}\text{C}$)
- III. DNA – Synthese ausgehend von den Primern durch eine thermostabile DNA- Polymerase (72°C)

Dieser Reaktionszyklus wird typischerweise 30-40 mal wiederholt und führt zu einer exponentiellen Vermehrung des durch die Amplimere flankierten DNA – Abschnittes. Der Nachweis der Amplifikationsprodukte erfolgt durch eine gelelektrophoretische Auftrennung eines Aliquotes des PCR – Ansatzes. Bei der Durchführung der PCR ist strengstens darauf zu achten, dass es zu keinerlei Fremd – DNA Kontamination kommt, da bereits winzigste Spuren einer Verunreinigung zu falschen Ergebnissen führen kann.

Mit Hilfe der RT-PCR lässt sich die Genexpression auf Stufe der RNA untersuchen. Hierbei wird die mRNA mit Hilfe einer Reversen – Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Mit genspezifischen Primer lässt sich so über PCR leicht nachweisen, ob ein bestimmtes Gen auf mRNA – Ebene exprimiert wird [107].

2.7.3.1 cDNA – Synthese mit dem ThermoScript RT-PCR System

- ThermoScript RT 15 U/ μ l (Gibco)
- 5x cDNA Synthesepuffer 250 mM Tris
375 mM Kaliumacetat
40 mM Magnesiumacetat
pH 8,4
- DTT-Lsg. 0,1 M DTT
- dNTP- Mix 10mM
- RNaseOut 40 U/ μ l
- Oligo (dT)₂₀ 50 μ M
- DEPC – H₂O
- cDNA Synthesemix 4 μ l 5x cDNA Synthesepuffer
1 μ l 0,1 M DTT
2 μ l 10 mM dNTPs
1 μ l DEPC – H₂O
1 μ l RNaseOut
1 μ l ThermoScript RT

Das ThermoScript RT-PCR System ist für die sensitive und reproduzierbare Detektion und Analyse von RNA – Molekülen in einem Zwei - Stufen Prozess von der Firma Gibco entwickelt worden. Dieses System dient der Erststrang – cDNA - Synthese aus PolyA - mRNA oder gesamtzellulärer RNA. Die hierbei verwendete AMV - ThermoScript RNase H-RT zeichnet sich durch eine erhöhte Temperaturstabilität aus. Daher führt sie zu höheren cDNA - Ausbeuten und zu mehr full - length cDNA Transkripten als herkömmliche Reverse Transkriptasen. Das System ist so ausgerichtet, dass sogar noch 10pg zelluläre RNA für eine Erststrang – cDNA - Synthese ausreichen.

In sterilen 1,5ml Eppendorf - Caps wurden jeweils etwa 1-2 μ g DNase - behandelte, gesamtzelluläre RNA mit 50 μ M Oligo(dT) - Primer oder 10mM Ankerprimer zusammengegeben und mit DEPC-H₂O auf 10 μ l aufgefüllt. Dann wurden die Ansätze bei 65°C für 5min denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Daraufhin wurden je 10 μ l einer Reaktionsmischung (für n Proben galt: (n+1) x (4 μ l 5x cDNA - Synthese-Puffer, 2 μ l dNTP - Mix, 1 μ l DTT, 1 μ l RNaseOUT, 1 μ l DEPC-H₂O, 1 μ l ThermoScript RT)) auf Eis zu den einzelnen Ansätzen gegeben. Die einzelnen Proben wurden daraufhin 30-60min für die cDNA - Synthese in vorgewärmte Wasserbäder gegeben. Dabei galt für den Oligo(dT)₂₀ und die Ankerprimer eine Wasserbadtemperatur von 50-60°C und für die genspezifischen Primer eine Temperatur je nach Schmelzpunkt des verwendeten Primers von bis zu 65°C. Anschließend wurde die Reaktion für 5min bei 85°C gestoppt. . Dann wurden die Proben auf Eis gestellt und kurz abzentrifugiert. Zu den Proben wurde dann 1 μ l

RNase H hinzugegeben und für 20min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Daraufhin wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.7.3.2 Durchführung der PCR

- Taq DNA Polymerase 5 U/μl Amplitaq (Gibco)
- 10x PCR Puffer (Gibco)
- MgCl₂-Lsg. 50 mM MgCl₂ (Gibco)
- dNTP-Mix 10 mM (Gibco)
- Forward-Primer 10 μM
- Reverse-Primer 10 μM
- Matrizen - cDNA
- DEPC-H₂O
- Thermocycler MWG Primus 25

Die Taq - Polymerase ist ein hitzestabiles Enzym aus *Thermus aquaticus* [108], dass am

<i>Komponente</i>	<i>μl</i>
cDNA	2
Taq-Polymerase	0,5
10xPCR Puffer	5
50 mM MgCl ₂	1,5
10 mM dNTP-Mix	1
10 μM Forward Primer	1
10 μM Reverse Primer	1
DEPC- H ₂ O	38

Tab. 9 PCR - Reaktionsansatz

häufigsten für die PCR eingesetzt wird. Die optimale Temperatur für die Taq - Polymerase liegt zwischen 70-80°C. Bei dieser Temperatur synthetisiert sie DNA mit einer Geschwindigkeit von 35-100 Nucleotiden pro Sekunde. Die Taq - Polymerase gehört zu den hochprozessiven DNA - Polymerasen. Der PCR - Reaktionsansatz wurde gemäß Tab. 9 in 0,5 ml PCR Reaktionsgefäßen zusammenpipettiert. Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurden nur autoklavierte Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und steriles Wasser verwendet. Um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen, wurde eine sogenannte *Hot Start* PCR durchgeführt. Dabei wird die Polymerase erst nach der erstmaligen Denaturierung der DNA zugegeben. Für den Nachweis des ubiquitären Haushaltsprotein β- Aktin wurde ein spezielles Profil verwendet. Das Schaltprogramm für den MWG - Zyklus ist in Tab. 10a angegeben. Die Aktin - PCR ist eine *Touchdown-PCR*. Hierbei sind die Bedingungen für die Zyklen so gewählt, dass im wesentlichen das gewünschte Amplikon gebildet wird und nur wenig PCR - Artefakte und Primerdimere entstehen. Während der PCR - Zyklen

	<i>Befehl</i>	<i>Parameter</i>	<i>Kommentar</i>
1	LIDHT	110°C	Deckelheizung an
2	TEMP	94°C, 3:30 min	Denaturierung
3	LIDOP		Deckel auf, Hot Start
4	LIDCL		Deckel schließen
5	LOOP[2X	Schleifenkörper 2x
6	TEMP	94°C, 0:45 min	Denaturierung
7	TEMP	67°C, 1:00 min	Annealing
8	TEMP	72°C, 1:15 min	Elongation
9	LOOP]		Ende Schleife
10	LOOP[2x	Schleifenkörper 2x
11	TEMP	94°C, 0:45 min	Denaturierung
12	TEMP	66°C, 1:00 min	Touchdown PCR
13	TEMP	72°C, 1:15 min	Elongation
14	LOOP]		Schleifenende
15	LOOP[25X	25x Zyklen
16	TEMP	94°C, 0:45 min	Denaturierung
17	TEMP	65°C, 1:00 min	Annealing
18	TEMP	72°C, 1:15 min	Elongation
19	LOOP]		Schleifenende
20	TEMP	72°C, 5:15 min	Verlängerung lange Frag.
21	LIDHT	OFF	Deckelheizung aus
22	RAMP	4°C, 3°C/s	auf 4° abkühlen
23	TEMP	4°C, Forever	auf 4°C halten
24	END		Programmende

Tab. 10a Schaltprogramm für die Aktin - PCR

wird die Anlagerungstemperatur kontinuierlich von einem Wert oberhalb der zu erwarteten T_m auf einen Wert unter T_m abgesenkt. Dies erleichtert die optimale Hybridisierung des Amplimers mit dem Zielmolekül; das richtige Amplikon wird vermehrt und angereichert, bevor unerwünschte Produkte auftauchen.

Für den Nachweis der Kathepsine wurde eine Standard - PCR durchgeführt. Hierbei wurde auf eine Optimierung der PCR verzichtet, um die RT-PCR unter standardisierten

	<i>Befehl</i>	<i>Parameter</i>	<i>Kommentar</i>
1	LIDHT	110°C	Deckelheizung an
2	TEMP	94°C, 3:30 min	Denaturierung
3	LIDOP		Deckel auf, Hot Start
4	LIDCL		Deckel schließen
5	LOOP[35x	Schleifenkörper 35x
6	TEMP	94°C, 1:00 min	Denaturierung
7	TEMP	60°C, 1:30 min	Annealing
8	TEMP	72°C, 1:30 min	Elongation
9	LOOP]		Ende Schleife
10	TEMP	72°C, 10:00 min	lange Fragmente
11	LIDHT	OFF	Deckelheizung aus
12	RAMP	4°C, 3°C/s	auf 4°C abkühlen
13	TEMP	4°C, Forever	Temperatur halten
14	END		Programmende

Tab. 10b Schaltprogramm für die Standard - PCR

Bedingungen durchzuführen. Alle Primer wurden so gewählt, dass sie über eine GC - Gehalt von 50% verfügten. Das Schaltprogramm für die Standard - PCR ist in Tab. 10b aufgeführt. Von den erhaltenen PCR - Produkten wurden 10µl elektrophoretisch aufgetrennt und durch Fluoreszenz nachgewiesen.

2.8 Fotodokumentation

Zur Dokumentation der Ergebnisse ist es nötig, von SDS- Gelen Positiv- Abzüge zu erstellen. Ebenso sind die Röntgenfilme nach der Belichtung zu entwickeln. Alle Schwarzweiß - Fotoarbeiten wurden im institutseigenen Fotolabor durchgeführt.

2.8.1 Entwicklung der Röntgenfilme

- Röntgenfilm Kodak X-OMAT ARS (Kodak)
 Reflection NEF-486 (Du Pont)
- Entwickler Kodak LX 24, 1:5 (Kodak)
- Fixierer Kodak AL 4, 1:5 (Kodak)

Zur Entwicklung der Röntgenfilme wurden diese in einer Dunkelkammer drei Minuten in der Entwicklerlösung unter Bewegung inkubiert, anschließend kurz in Wasser gelegt und für zehn Minuten in der Fixierlösung fixiert. Danach wurden die Filme für mindestens zehn Minuten gewässert und an der Luft getrocknet.

2.8.2 Herstellung und Entwicklung von Negativaufnahmen

- Negativfilm Agfaortho Professional (ISO 25)
 Ilford Pan F (ISO 50)
- Reprokamera Leica MD-2
- Reproanlage Reprovit IIa (Leica)
- Leuchtbox Leitz
- Entwicklerdose Typ 1236 (Jobo)
- Negativentwickler Rodinal 1:25 (Agfa)
- Fixierer Agefix 1:8 (Agfa)
- Netzmittel Agepon 0,5% (Agfa)

Gele wurden im Durchlicht mit Blende 11 und Belichtungszeiten von 1/60, 1/30 und 1/15 sec aufgenommen. Montagen von Positivabzügen wurden im Auflicht mit Belich-

tungszeiten zwischen 0,5 und 2 Sekunden fotografiert. Zur Entwicklung wurden die Filme in der Dunkelkammer auf eine Entwicklungsspule gedreht und in eine Entwicklerdose gelegt. Anschließend wurde die Dose mit 250 ml Negativentwickler gefüllt, und es wurde für fünf Minuten unter gleichmäßigem Kippen der Dose entwickelt. Nach einer einminütigen Zwischenwässerung wurde fünf Minuten mit 250 ml Fixierer fixiert und dann 20 Minuten unter fließendem Wasser gewässert. Anschließend wurde der Film für eine Minute in ein Netzmittel gelegt. Nach Abstreifen wurde der Film an der Luft getrocknet.

2.8.3 Anfertigung von Positivabzügen

- Vergrößerungsgerät Durst M800
- Fotopapier Ilfospeed 1.24 M1, Semimatt
 Ilfospeed 1.1 M1, Brilliant (Ilford Paramus)
- Entwickler Eukobrom 1:9 (Tetanal)
- Stoppbad 1,5% (v/v) Essigsäure
- Fixierer Agefix 1:8 (Agfa)

Der Negativfilm wurde in das Vergrößerungsgerät eingespannt. Negativaufnahmen für Fotomontagen wurden auf halbmattes, Endabzüge auf glänzendes Fotopapier bei Blende 11 oder 16 und Belichtungszeiten von 15 bis 120 Sekunden projiziert. Danach wurde der Film eine Minute unter leichtem Schwenken in Eukobrom entwickelt. Die Entwicklungsreaktion wurde im Essigsäurebad gestoppt, anschließend erfolgte eine zehnminütige Fixierung in Agefix. Die Wässerung erfolgte für mindestens zehn Minuten unter fließendem Wasser. Die Bilder wurden luftgetrocknet.

2.9 Computerprogramme

Alle verwendeten Computerprogramme lagen als Quellcode vor und sind unter den Betriebssystemen LINUX (Kernel 2.2.10) und z.T. unter Microsoft WINDOWS 98 lauffähig. Die Programme wurden mit Hilfe des EGCS- oder Microsoft VISUAL C++ Compiler in ausführbare Programme übersetzt. Die Simulationen wurden auf einem AMD K7 / 500 Rechner gefahren. Die verwendeten Programme lassen sich in vier Gruppen unterteilen:

- Molecular Modelling Programme
- Programme zur Strukturintegritätsprüfung
- Visualisierungssoftware zur Darstellung der räumlichen Struktur
- Sequenzalignment- und Darstellungsprogramme

Die Programme werden hier nur kurz besprochen, die genauere Darstellung der Algorithmen erfolgt an geeigneter Stelle im Diskussionsteil.

2.9.1 Visualisierungs- und Sequenzprogramme

2.9.1.1 RASMOL

RASMOL ist ein Molekül - Graphikprogramm für die Visualisierung von Proteinen, Nucleinsäuren und kleinen Molekülen. Mit Hilfe des Programms können qualitativ hochwertige Bilder für Lehre und Publikationen erzeugt werden. Das Programm liest Molekül - Koordinatendateien ein und zeigt diese interaktiv auf dem Bildschirm an. Das geladene Molekül kann in unterschiedlichen Darstellungsformen angezeigt werden, u.a. Drahtmodelle, „Ball and Stick“ sowie abstrakte Modelle. Unterschiedliche Bereiche des Moleküls können sowohl in unterschiedlicher Darstellungsform als auch unterschiedlichen Farben präsentiert werden; ferner kann das erzeugte Molekül frei gedreht und vergrößert bzw. verkleinert werden [109].

2.9.1.2 SeqVu

SeqVu ist eine Computerapplikation, mit dessen Hilfe multiple Sequenzalignments schnell und einfach manipuliert werden können. Mit Hilfe dieses Programms können homologe Bereiche leicht gekennzeichnet werden, und der Einsatz von Farben erlaubt es, Eigenschaften von Aminosäuren hervorzuheben [110].

2.9.1.3 VMD 1.3

VMD ist ein Molekül - Graphik - und Visualisierungsprogramm, das für die interaktive Anzeige von molekularen Systemen, in speziellen von Biopolymeren wie Proteinen, Nucleinsäuren etc. entwickelt wurde. VMD verfolgt mit seinem Ansatz folgende Ziele: generelle Moleküldarstellung, Visualisierung von dynamischen Moleküldaten sowie die Darstellung und Kontrolle von „*Molecular Dynamics*“ Simulationen. Zudem ist das Programm in der objektorientierten Sprache C++ geschrieben worden, so dass es leicht um zusätzliche Module erweitert werden kann [111].

2.9.1.4 MolScript v2.1

Mit Hilfe des Programms *MolScript* lassen sich ausgehend von 3D - Koordinatenfiles

schematische oder detaillierte Zeichnungen von Molekülen erstellen. Das Programm eignet sich besonders für die Darstellung von Sekundärstrukturen in Proteinen und deren räumlicher Anordnung zueinander. im Gegensatz zu den interaktiven Programmen wie RASMOL oder VMD wird MolScript mittels einer Skriptsprache gesteuert. In einem Skriptfile wird die Darstellungsweise einzelner Molekülbereiche explizit festgelegt. Mit Hilfe des Programms *MolAuto* lassen sich aus PDB - Dateien erste Skripte automatisch ableiten [112].

2.9.1.5 ClustalX 1.8

ClustalX ist ein leistungsfähiges Programm, um multiple Sequenzalignments durchzuführen. Im Gegensatz zu seinen Vorgängern verfügt es über eine graphische Benutzeroberfläche, welche die Bedienung erheblich vereinfacht. Zudem ist eine Ausgabe von Verwandtschaftsdaten möglich, die mit dem Programm Treeview graphisch dargestellt werden können [113].

2.9.2 Molecular Modelling Programme

2.9.2.1 Modeller 4

Modeller 4 ist eine Implementierung eines automatischen, komparativen „*Molecular Modelling*“ Programms. Der Kernalgorithmus beruht auf der Erfüllung von räumlichen Beschränkungen der zu modellierenden Struktur, die sich auf physikalische Gesetzmäßigkeiten zurückführen lassen. Hierbei werden vor allem sterische Hinderungen berücksichtigt. Die „*Modelling*“ - Prozedur beginnt mit einem Alignment der zu modellierenden Struktur (*Target*) mit verwandten, aufgelösten 3D - Strukturen (*Templates*). Dieses Alignment ist die Eingabe des Programms, die Ausgabe ist die modellierte 3D - Struktur mit allen Hauptketten- und Seitenkettenatomen mit Ausnahme von Wasserstoffatomen. Das Programm lässt sich durch eine flexible Skriptsprache namens *TOP* steuern, dabei kann jeder grundlegende Parameter einstellen. Nachteilig ist der hohe Hauptspeicherbedarf des Programms (min. 90 MB) sowie die lange Programmlaufzeit, die je nach Optimierungsstufe oft mehrere Stunden beträgt. Zudem zeigt sich das Programm gegenüber dem Alignment äußerst empfindlich. So führen bereits Abweichungen von nur einer Aminosäure im Alignment zu falschen Ergebnissen[114].

2.9.2.2 AutoDock Version 3.0

AutoDock ist ein Programm zum automatisierten andocken von flexiblen Liganden an Rezeptoren. *AutoDock* ermöglicht somit die Voraussage von Interaktionen zwischen Ligand und Rezeptor. Dabei ist es möglich, unterschiedliche Andockstellen für einen Liganden zu errechnen. Während die bisherige Technik auf die manuelle Unterstützung durch den Anwender angewiesen war, ermöglicht es *AutoDock*, verschiedene Substrate für eine Rezeptor automatisch zu testen und mögliche Bindungspartner zu finden. Zudem verfügt das Programm über eine „*Scoring*“ – Funktion, die es ermöglicht, die gefundenen Ligand – Rezeptor – Komplexe miteinander zu vergleichen. Um das Docken zu simulieren, stehen drei verschiedene Algorithmen zu Verfügung: *Monte Carlo Simulation*, *simuliertes Annealing* und ein *genetischer Algorithmus* [115].

2.9.2.3 TINKER 3.7

Die *TINKER* –Suite ist als leicht zu benutzendes, flexibles System von Programmen und Routinen für „*Molecular Mechanics*“ und „*Molecular Dynamics*“ entwickelt worden. Zudem ermöglicht es weitere energiebasierte und strukturmanipulierende Berechnungen. *TINKER* besteht aus einer Reihe von kleinen Programmen, die komplexe Berechnungen durchführen können. Viele der verschiedenen Energieminimierungs- „*Molecular Dynamics*“ – Berechnungen können mit der ganzen oder Teilen der Struktur durchgeführt werden. Dabei kann im kartesischen, internen oder „*rigid body*“ Koordinaten gerechnet werden. Zudem können unterschiedliche Bindungs- und Kristalltypen berücksichtigt werden [116].

2.9.2.4 CCP4

Die *CCP4* – Programmsuite ist eine Ansammlung von Programmen, die für die Auswertung von kristallographischen Daten hilfreich ist. Zudem sind zahlreiche Routinen vorhanden, um PDB – Dateien den benötigten Bedürfnissen anzupassen. So ist es z.B. leicht möglich, die Atomnummerierung zu ändern [117].

2.9.3 Programme zur Strukturintegritätsprüfung

2.9.3.1 WhatCheck 4.99g

WhatCheck ist ein freiverfügbares Subset des Kristallographie – Paketes *WhatIF* [118]. Mit Hilfe des Programms lassen sich zahlreiche Integritätsprüfungen durchführen. So werden bei den administrativen *Checks* die Nomenklatur, Kettennamen überprüft und nach fehlenden Atomen und C – terminalen Sauerstoffatomen gesucht. Des weiteren wird die Symmetrie und Geometrie der Struktur überprüft. Hierbei werden vor allem die Chiralität, Bindungslängen und –winkel, Torsionswinkel sowie die Planarität von aromatischen Ringen überprüft. Die Strukturuntersuchungen schließen die Packungsqualität, Seitenkettenrotamere, Wasserstoffbrücken und „Backbone“ – Qualität ein. Das Ergebnis des *WhatCheck* – Laufs erlaubt jedoch keinerlei Aussage darüber, ob eine Struktur energetisch oder biologisch sinnvoll ist [119].

2.9.3.2 Procheck

Die *Procheck* – Programmsuite nimmt eine detaillierte Überprüfung der Stereochemie einer Proteinstruktur vor. Die Ausgabe ist eine Anzahl von Plots im Postscript – Format sowie eine zusammenfassende „*residue by residue*“ – Liste. Hierdurch ergibt sich eine Aufstellung der Qualität der Struktur verglichen mit Strukturen gleicher Auflösung. Zudem werden Bereiche gekennzeichnet, die nähere Untersuchungen erfordern [120].

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden Abläufe der Antigen - Prozessierung und der nachfolgenden Peptid - Beladung von MHC - Klasse II Molekülen untersucht. Um frühe Vorgänge der Antigen - Präsentation aufzuklären, wurden drei verschiedene methodische Ansätze verfolgt.

Mittels protein - biochemischer Untersuchungsmethoden wurde die Prozessierung des Modellantigens Ovalbumin in Makrophagen und Dendritischen Zellen aus Knochenmarkskulturen untersucht. Durch die Edmann - Sequenzierung eines in den Zellen proteolytisch abgebauten Ovalbumin - Peptides wurden weitere Sequenz - Informationen über die Spaltstellen des Fragmentes gewonnen.

Molekularbiologische Untersuchungen zeigten das Expressionsmuster verschiedener lysosomaler Proteinasen in durch M-CSF generierten Knochenmarks - Makrophagen, die unterschiedlich stimuliert wurden.

Durch biophysikalisch - theoretische Analysen wurden mechanistische Studien auf Molekülebene durchgeführt, die Einblick in das potentielle Bindungsverhalten von Peptiden an MHC - Klasse II Molekülen ermöglichten. Durch die Einführung des *Molecular Modeling* konnten diese Studien an MHC Klasse II - Molekülen der Ratte durchgeführt werden. Durch Konformationsvergleiche konnte ein potentieller DM - Wirkmechanismus auf molekularer Ebene diskutiert werden.

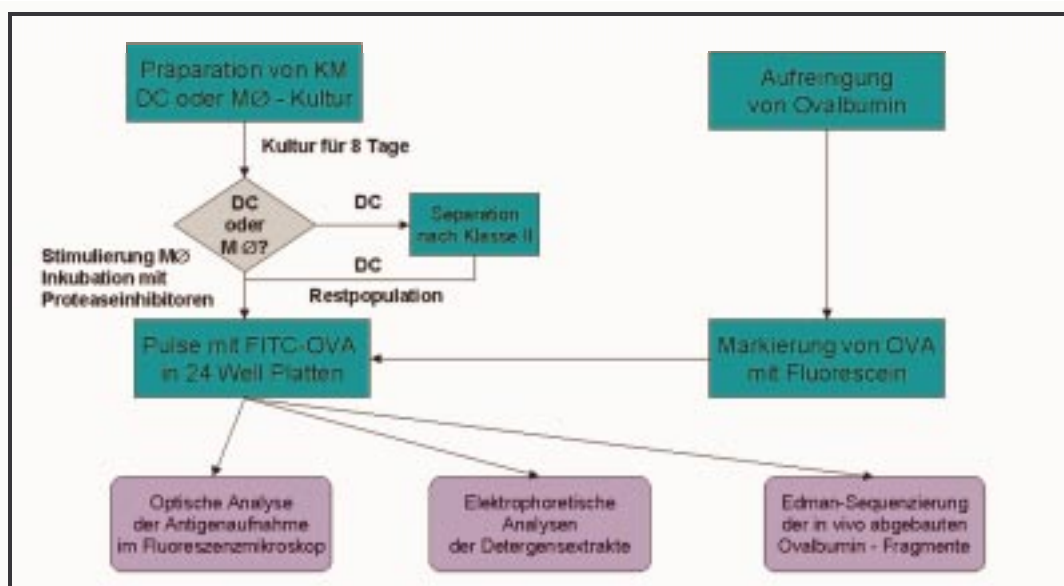


Abb. 9 Schematische Darstellung der proteinchemischen Untersuchungen

3.1 Proteinbiochemische und molekularbiologische Untersuchungen

Mit Hilfe proteinchemischer Methoden wurde die Prozessierung des Modellantigens Ovalbumin in Makrophagen und DC's untersucht. Um den Abbau untersuchen zu können, wurde das Ovalbumin - Molekül mit Fluorescein markiert. Das markierte Ovalbumin, FITC-OVA, wurde mit einer definierten Zellzahl in 24 Well Platten inkubiert. Um einen möglichen Einfluss des Aktivierungszustandes der Zelle auf die Degradierung des Modellantigens FITC-OVA zu untersuchen, wurde ein Teil der Makrophagen mit γ - Interferon oder LPS stimuliert. Durch Kinetikanalysen konnte der Abbau des markierten Ovalbumin verfolgt werden. Durch Präinkubation mit Proteinase- Gruppen spezifischen Inhibitoren wurde versucht, die an der Prozessierung beteiligten Proteinase einzugrenzen. Für den Nachweis der Ovalbuminfragmente wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen in PBS in den 24 Well Platten mit Hilfe von Detergentien lysiert. Dieses Solubilisat wurde gelelektrophoretisch getrennt und ausgewertet. Die Abb. 9 gibt einen schematischen Überblick über den Versuchsablauf.

3.1.1 Aufreinigung des Modellprotein Ovalbumin

Um Aussagen über die Prozessivität des Modellproteins Ovalbumin zu treffen, war es wichtig, über ein definiertes Ausgangsmaterial zu verfügen. Das in höchster Reinheit käuflich erhältliche Ovalbumin (OVA Grade VII) zeigte für den Einsatz in Prozessierungsstudien einige Nachteile : Durch die Aufreinigungsprozedur wurde das Protein demanosyliert, was eine effiziente rezeptorvermittelte Endozytose verhinderte. Zweitens wurde das Molekül durch die chemische Behandlung thermisch instabil. So zeigten Experimente, dass wiederholtes Auftauen und Einfrieren des gelösten Moleküls zu dessen Fragmentierung führte. Um ein eindeutig charakterisiertes, natives Protein zu erlangen, wurde Ovalbumin in geringer Reinheit (OVA Grade II) gekauft und durch Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt. Hierbei wurde die Tatsache ausgenutzt, dass die Hauptverunreinigungen Conalbumin und Lysozym nicht an die anionische Matrix binden. Durch dieses Verfahren konnte reines Ovalbumin gewonnen werden. Eine nachfolgende Gelfiltration brachte keinen weiteren Reinigungseffekt.

Die Abb. 10 zeigt die Chromatogramme der analytischen und präparativen Aufreinigung von Ovalbumin. Um die ungefähren Elutionsbedingungen zu bestimmen, wurde zuerst in einem analytischen Lauf die Retentionszeit von OVA Grade II bestimmt. Diese wurde mit der Retentionszeit von OVA Grade VII verglichen. Da die Retentionszeit an einer Ionenaustauschermatrix unter identischen Bedingungen (Puffer, Gradient und Konzentration) abhängig ist,

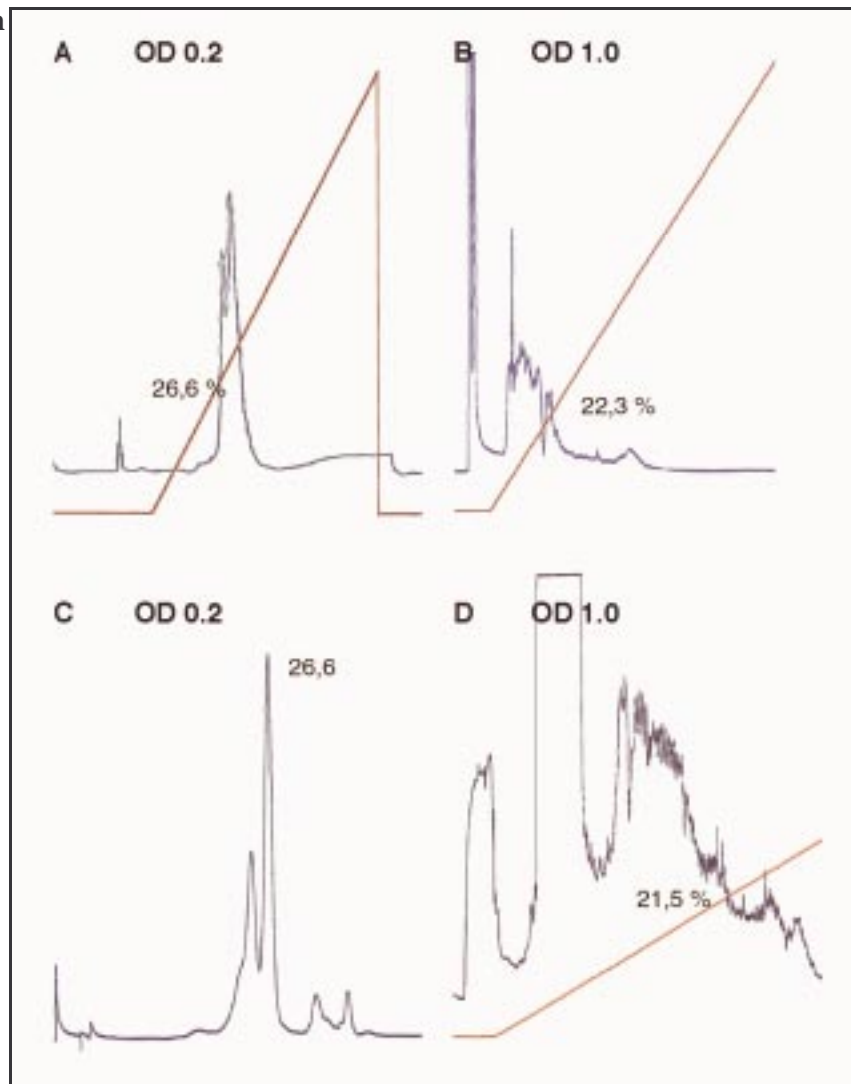


Abb. 10 Chromatographische Aufreinigung von OVA Grade II

Alle Absorbionsmessungen erfolgten bei 280 nm A: Analytische Aufreinigung von 100 µg OVA Grade II über Poros HQ/F-Anionenaustauscher. 4 ml/min, 0-100 % in 20 CV B: Präparative Reinigung von 50 mg OVA Grade II mit POROS HQ/F-Säule. 4 ml/min, 0-100 % in 20 CV. C: Gelfiltration an Superose 12 mit Peak-Eluat aus B. D: Präparative Reinigung von 1 g OVA Grade II mit MonoQ 10/10-Säule.

des Proteins) nur noch von den Moleküleigenschaften abhängig ist, eluieren identische Proteine am selben Punkt im Elutionsgradienten. Obwohl OVA Grade VII fast vollständig demansyliert vorliegt, ist der Elutionspunkt bei der Anionenaustausch-Chromatographie nahezu identisch. In der Abb. 10-A ist der analytische Lauf von 100µg OVA Grade II gezeigt. Dieses Chromatogramm ist nahezu identisch mit dem Lauf von

OVA Grade VII [121]. Somit wurde gewährleistet, dass es sich um dasselbe Protein handelt. In einem nächsten Lauf wurde die präparative Reinigung an der POROS HQ/F-Säule untersucht. Für die verwendete Säule ist ein maximales Bindevermögen von ca. 40 mg Protein angegeben. Da ein Großteil der Verunreinigungen von OVA Grade II nicht an die Matrix bindet, wurden 50 mg Ausgangsmaterial eingesetzt. Der präparative Ansatz zeigte einige Unterschiede zum analytischen Lauf. Zum einen eluiert das Material früher als beim analytischen Lauf, zum anderen wird ein breiter Elutionspeak erhalten. Eine Konzentrationsbestimmung ergab, dass ca. 12 mg Protein von der Säule eluiert werden konnten. Dies entspricht ungefähr 25% des Ausgangsmaterials.

Um das Material näher zu charakterisieren, wurde von dem Säuleneluat eine Gelfiltration an Superose 12 durchgeführt (Abb. 10-C). Hierfür wurden 12,5 µg eingesetzt, um einen Vergleich mit den in der Diplomarbeit [121] gewonnenen Daten zu ermöglichen. Im Gegensatz zu OVA Grade VII zeigt das gereinigte Protein neben dem bekannten Hauptpeak bei 26,6 Min. Retentionszeit einen weiteren Peak, der früher eluiert. SDS-Page Analysen konnten jedoch keinen Unterschied der beiden Peaks aufzeigen, so dass es sich beim ersten Peak vermutlich um eine stärker manosylierte Form des Ovalbumins handelt. Ausgehend von diesen Daten wurde eine präparative Reinigung von einem Gramm OVA Grade II an einer Mono Q- Matrix durchgeführt. Das erhaltene Chromatogramm ähnelt dem an der POROS HQ/F erhaltenen Ergebnis. Der frühere Elutionszeitpunkt ist mit der unterschiedlichen Matrix zu erklären.

SDS-PAGE Analysen zeigen die hohe Reinheit des eluierten Materials. Unterschiede im Aufreinigungsvermögen der POROS HQ/F und der Mono Q- Matrix konnten nicht festgestellt werden. Die Abb. 11-A zeigt die silbergefärbten Eluate der Anionenaustauschchromatographie. Obwohl in den Spuren 2-5 eine hohe Probenkonzentration eingesetzt wurde, zeigt sich dennoch die hohe Reinheit des OVA - Proteins gegenüber dem Ausgangsmaterials in Spur 1. Die Bandenunschärfe ist auf die hohen Salzkonzentration der Proben nach der Anionenaustausch - Chromatographie sowie der Manosylierung von OVA zurückzuführen. Zudem kommt es unter diesen Bedingungen zu Artefakten beim Nachweis der Proteine durch Silberfärbung [156]. Verdünnt man die Proben, so zeigt sich eine nahezu 100%ige Reinheit des OVA - Proteins (Spur 6 und 7). Gegenüber dem käuflich erworbenen Material (Spur 8) zeigen sich keine Abbauprodukte. In der Abb. 11-B wurden die beiden Peak - Eluate der Gelfiltration weiter untersucht. Hierbei zeigte sich, dass beide Peak - Eluate ein identisches Molekulargewicht aufwiesen, obwohl sie

unterschiedliche Retentionszeiten in der Gelfiltration hatten. Dies ist auf den unterschiedlichen Manosylierungsgrad des Moleküls zurückzuführen. Hierdurch wird der Stokes'sche Radius des Moleküls verändert, so dass es in der Gelfiltration früher eluiert.

In weiteren Testen wurde die Stabilität von gereinigtem OVA untersucht. So zeigte sich, dass es auch nach wiederholtem Auf- und Abtauens des Materials nicht zu Fragmentie-

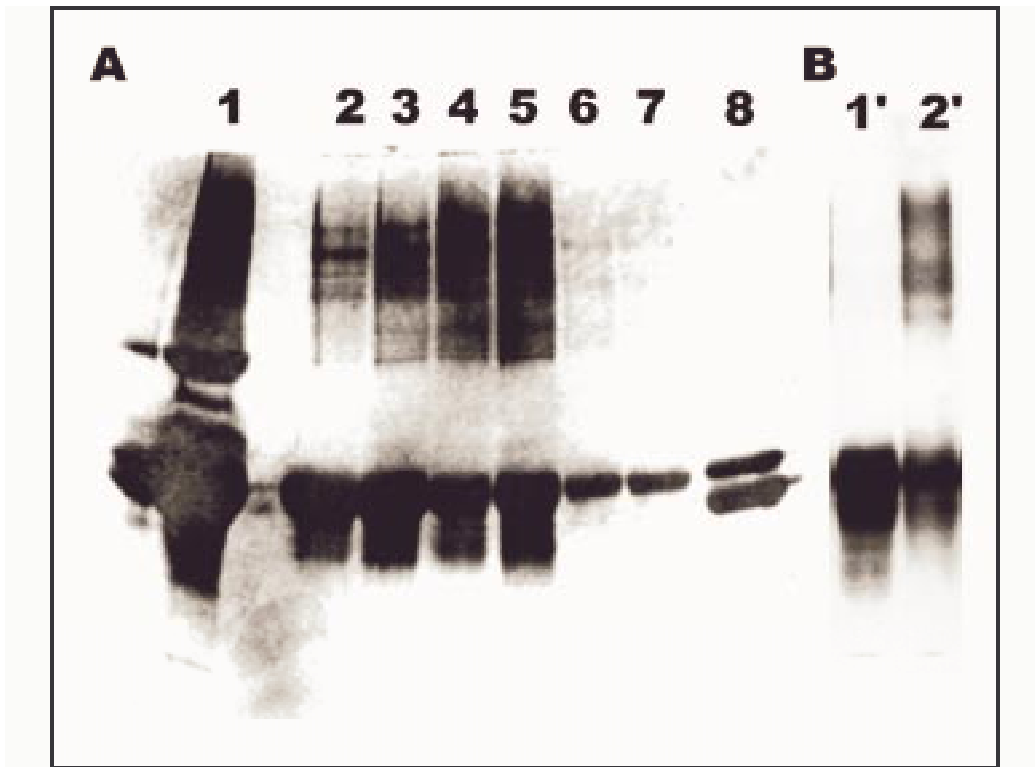


Abb. 11 SDS-PAGE Analyse von gereinigtem OVA Grade II

A: Vergleich der Peak-Eluate der Anionenaustausch - Chromatographie an POROS HQ/F und MONO Q - Matrix. Der Protein - Nachweis erfolgte durch Silver-Staining.

1 = Ausgangsmaterial OVA Grade II, 2+3 Peak Eluat 1 u. 2 der präparativen Reinigung an POROS HQ/F, 4+5 Peak Eluat 1 u. 2 der präparativen Reinigung an Mono Q, 6+7 = Pool der Peak Eluate 2+3 bzw. 4+5, 1:10 verdünnt, 8 = OVA Grade VII

B: Peak Eluat 1 und 2 der Gelfiltration an Superose 12.

rungen kam. Ebenso konnte die thermische Stabilität des gereinigten OVA nachgewiesen werden, eine 24h Inkubation in Acetatpuffer bei pH 4,6 und 37°C führte zu keinen nachweisbaren Abbauprodukten (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der hohen Reinheit nach der Anionentauscherchromatographie konnte auf nachfolgende Reinigungsschritte verzichtet werden. Das gereinigte OVA verfügte über eine genügende Reinheit für die nachfolgenden Testsysteme. Die verschiedenen Eluate wurden für weitere Versuche gepoolt, in Phosphatpuffer umdialysiert und in Aliquoten zu je 10 mg/ml bei -20°C gelagert.

3.1.2 Markierung und Nachweis von Ovalbumin

Für die in vivo Untersuchungen war es notwendig, dass Protein zu markieren. Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde als Markierungsreagens bereits Digoxigenin erfolgreich eingesetzt [121]. Dieses Reagens hat aber zwei gravierende Nachteile. Zum einen ist das Digoxigenin toxisch, so dass bei der Handhabung zahlreiche Sicherheitsvorkehrungen zu treffen sind. Zum anderen zeigt der Nachweis ein schlechtes Signal zu Hintergrund - Verhältnis, so dass die Nachweisgrenze bei ca. 500 pg lag. Als Alternative bot sich die Markierung mit dem Fluoreszenz - Farbstoff Fluorescein an. Auch dieses Molekül ist als NHS - Ester zu beziehen, so dass es über den gleichen Mechanismus wie die Digoxigenin- Gruppe an das Protein gekoppelt werden konnte. Das markierte Molekül konnte auf zwei Arten nachgewiesen werden: Über eine Chemilumineszenz - Reaktion, bei der ein mit Peroxidase gekoppelter anti-FITC - Antikörper ein spezifisches Substrat umsetzt. Dies führt zu einer Chemilumineszenz in Form einer kalten Lichtemission. Die Signale konnten über einen Röntgenfilm detektiert werden. Bei der direkten Methode wurde die chromophore Gruppe FITC durch UV-Licht angeregt. Die Fluoreszenz - Emission wurde mittels einer CCD - Kamera aufgenommen.

Wie die Abb. 12 zeigt, besteht hinsichtlich der Nachweisgrenze kein Unterschied zwischen dem direktem Nachweis durch Fluoreszenz und dem indirekten Nachweis mittels Chemilumineszenz. Hierbei wurde bei beiden Systemen lange exponiert, um die maximale Nachweisgrenze zu ermitteln. Mit beiden Systemen können Proteine bis in den unteren Picogrammbereich nachgewiesen werden. Insgesamt zeigt jedoch die Fluoreszenz die schärferen Nachweise, da die Chemilumineszenz zu Überstrahlungen

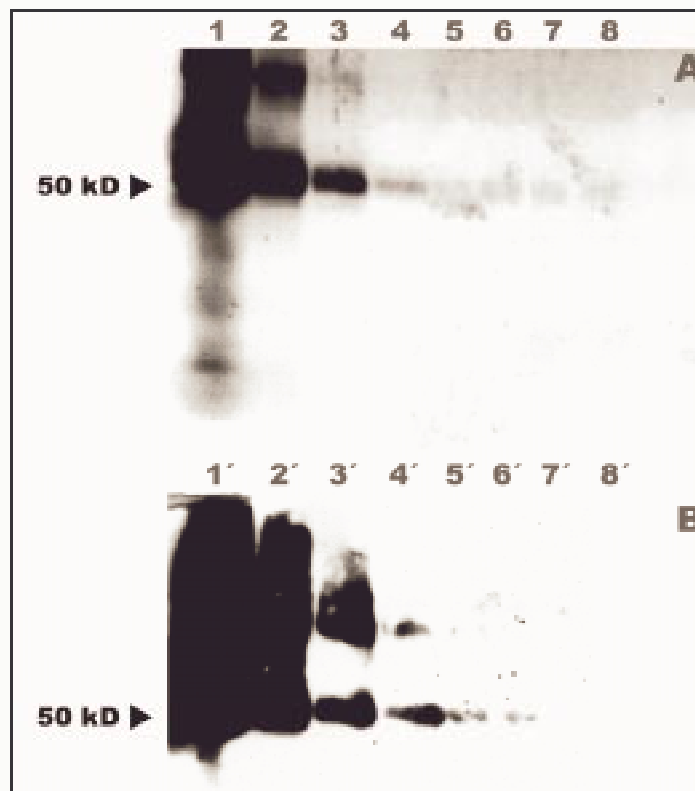


Abb. 12 Vergleich Fluoreszenz und Chemiluminiszenz
 A: Direkter Nachweis von FITC-OVA durch Fluoreszenzaktivierung bei 302 nm und Aufnahme der Lichtemission mit einer CCD-Kamera.
 B: Nachweis mittels einer Chemiluminiszenzreaktion, die durch einen direkt gegen FITC gerichteten Mouse – anti FITC Antikörper vermittelt wird.
 Es wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe von 4 µg FITC-OVA (Spur 1 bzw. 1') bis 0,4 pg (Spur 8 bzw. 8') angesetzt.

die schärferen Nachweise, da die Chemiluminiszenz zu Überstrahlungen neigt. Dagegen ist die Fluoreszenz jedoch erheblich empfindlicher gegenüber Verschmutzungen wie z.B. durch Staub, was sich als nachteilig für die Dokumentation erwies. Beide Systeme sind mit dem DIG- System[121] vergleichbar, verfügen aber über ein deutlich besseres Signal- zu Hintergrund- Verhältnis. Mit der Markierung von OVA mit Fluorescein (FITC-OVA) konnten die Zellversuche durchgeführt werden, da sich Degradierungsfragmente empfindlich nachweisen lassen. Besonders der direkte Nachweis war hierfür sehr gut geeignet, da es zu keinerlei Kreuzreaktivitäten der gegen FITC gerichteten Antikörper mit zelleigenen Proteinen kommen konnte.

Das markierte Material hat ein Molekulargewicht von 50 kD gegenüber 45 kD des Ausgangsmaterial. Da die gekoppelte FITC – Gruppe ein Molekulargewicht von ca. 0,5 kD hat, trägt das Ovalbumin demnach ca. zehn FITC- Gruppen pro Molekül.

3.1.3 In vitro Verdauung von FITC markiertem Ovalbumin

Für den Einsatz in den Zellversuchen war es nötig zu untersuchen, ob die enzymatische Verdauung des FITC- markierten Proteins mit Kathepsin B und D zu den bereits durch Vorarbeiten bekannten Abbauprodukten[121] des DIG- Ovalbumin führt. Wie in Abb. 13 zu sehen ist, zeigt auch das FITC - markierte Ovalbumin eine deutliche pH- Abhängigkeit. Die enzymatische Verdauung von FITC- OVA mit Kathepsin B zeigt nur ein schwaches Abbauprodukt im Bereich um 40 kD, dieses wird jedoch von der Ausgangsbande überstrahlt (Spur B). Zusätzlich ist eine sehr schwache Bande bei 38 kD sichtbar. Bei pH 4,6 zeigt das Kathepsin B eine deutlich stärkere Wirkung auf das markierte Protein: So sind die Banden bei 40 kD und 38 kD deutlich zu erkennen. Ferner zeigen sich zwei weitere Banden bei 28 kD und 20 kD (Spur B'). Die Reaktion mit Kathepsin D ergibt bei pH 5,9 fünf Abbauprodukte, drei Abbauprodukte bei 42 kD, 38 kD und 20 kD sind stark ausgeprägt, die Banden bei 30 kD und 22 kD sind schwach sichtbar (Spur C). Beim sauren pH- Wert von 4,6 resultieren ebenfalls fünf Abbauprodukte, im Gegensatz zur Verdauung bei pH 5,9 gibt es aber eine Veränderung in der Stärke der einzelnen Banden. Insgesamt sind alle Banden schwächer ausgeprägt (Spur C').

Bei der Doppelverdauung von FITC- OVA mit Kathepsin B und D ergibt sich bei pH 5,9 das gleiche Bild wie bei der Verdauung mit Kathepsin D (Spur D). Bei pH 4,6 zeigen sich zusätzliche Banden im Bereich um 30 kD (Spur D'). Auch hier ähnelt das erhaltene Bandenmuster dem mit Kathepsin D erhaltenen Muster.

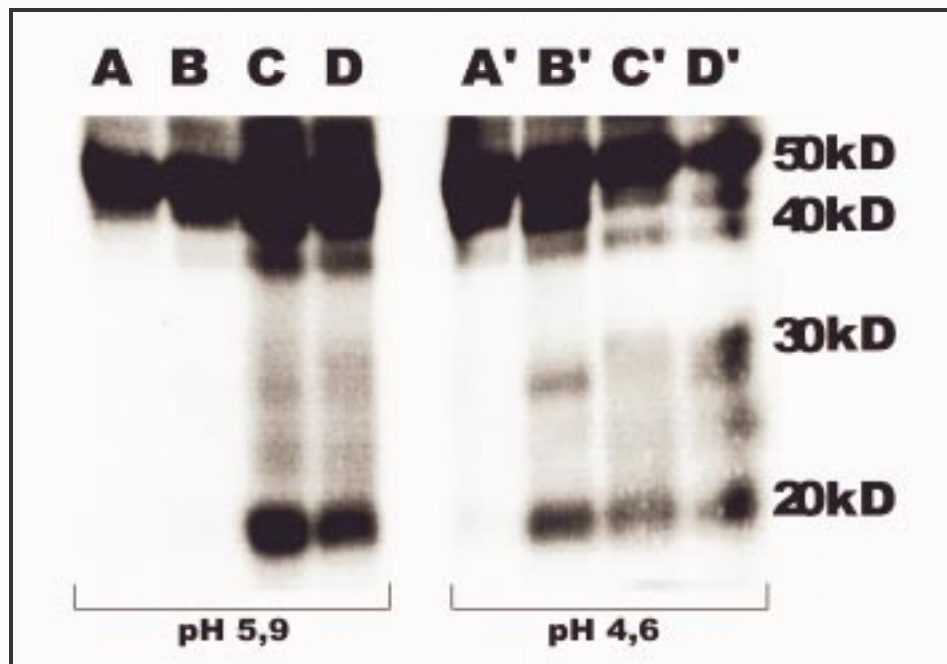


Abb. 13 Enzymatische in vitro Verdauung von FITC-markiertem Ovalbumin

Es wurden 1µg FITC-OVA mit 1µg Kathepsin B und/oder 1µg Kathepsin D für 4h bei 37°C in einem Endvolumen von 40µl enzymatisch verdaut. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden die Proben kurz abzentrifugiert, mit Laemmli- Puffer versetzt und in der 1D-SDS- PAGE aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte durch Fluoreszenz- Aktivierung. A= FITC-OVA, B= FITC-OVA + KAT B, C= FITC-OVA+KAT D, D= FITC-OVA+KAT D+B bei pH 5,9. A',B',C',D' bei pH 4,6.

Der Verdau von FITC- Ovalbumin mit den Proteinasen Kathepsin B und D zeigt das bereits aus der Diplomarbeit bekannte Abbaumuster, welches auch mit DIG- und Biotin - markiertem Ovalbumin erhalten wurde [121]. Unterschiede in den Molekulargewichten der erhaltenen Banden lassen sich mit dem unterschiedlichen Molekulargewicht des Markierungsrestes erklären.

3.1.4 2D – Analyse von enzymatisch abgebauten FITC- Ovalbumin

Um vergleichen zu können, ob das in den Zellen verdaute Ovalbumin die gleichen Fragmente ergibt wie das in vitro enzymatisch abgebaute Molekül, wurden die Ansätze zweidimensional aufgetrennt (Abb. 14 A-D). Hierdurch wird neben dem Molekulargewicht der isoelektrische Punkt als zweiter Messparameter eingeführt. Diese hochauflösende Methode erleichtert die Identifikation von gleichen Peptiden mittels Gelelektrophorese.

Da sich die durch enzymatische Behandlung erhaltenen Bandenmuster in der 1D- Analyse stark ähnelten (Abb. 13), wurden nur die Ansätze bei pH 4,6 untersucht. Auffällig war, dass die entstandenen Fragmente in einem engen pI- Bereich lagen, der zwischen fünf und sechs lag.

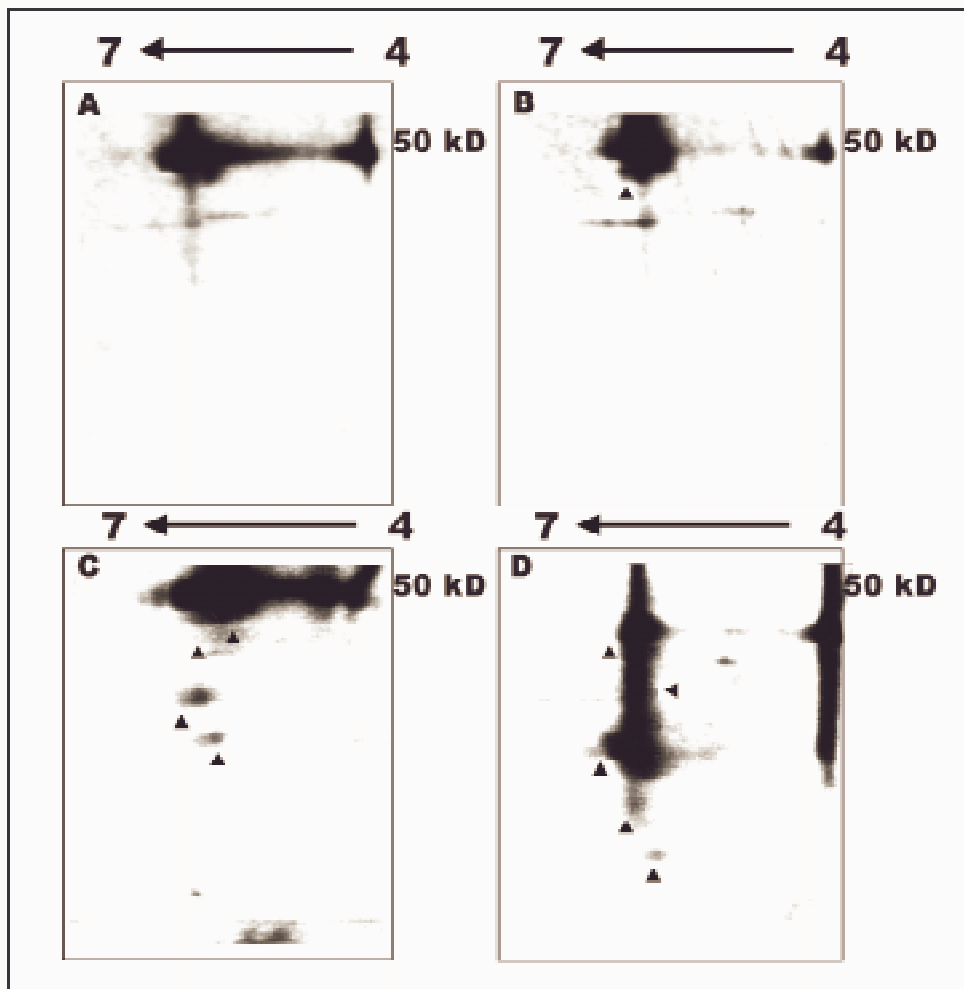


Abb. 14 2D-Analyse von enzymatisch abgebautem FITC – Ovalbumin
 1µg FITC Ovalbumin wurde mit Kathepsin B und/oder Kathepsin D für 4h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Trennung in der ersten Dimension nach dem isoelektrischen Punkt. Die Trennung in der zweiten Dimension erfolgte nach dem Molekulargewicht in der SDS-PAGE. Der Nachweis erfolgte durch Fluoreszenzaktivierung der FITC-Gruppe und Aufzeichnung der Signale mit einer CCD - Kamera.
 A= FITC-OVA, B= FITC-OVA + Kat. B, C= FITC-OVA + Kat. D, D= FITC-OVA + Kat. B + D
 Gezeigt ist nur der pI-Bereich von 4-7.

Die Abb. 14a zeigt die zweidimensionale Auftrennung von FITC- OVA. Ovalbumin hat einen theoretischen pI von 5.1. Die zweidimensionale Auftrennung zeigt, dass der Hauptteil des Proteins bei diesem pI fokussiert. Aufgrund der Manosylierung zeigt sich

das Material in der zweidimensionalen Analyse als äußerst heterogen. Ein Teil des Materials fokussiert bereits bei einem pI von vier. Möglicherweise ist dies auch eine Folge der Markierung von OVA mit FITC.

Eine klare Fokussierung war nicht zu erreichen, da aufgrund der geringen Menge an abgebautem Protein eine hohe Konzentration an Ausgangsmaterial eingesetzt werden musste. Zudem musste sehr lange belichtet werden, bis die Spots sichtbar wurden. Dadurch kam es zu einer deutlichen Überbelichtung im Bereich des Ausgangsmaterials.

Beim Kathepsin B - Verdau sind die typischen Abbauprodukte mit einem Molekulargewicht von 40 kD und 38 kD zu erkennen. Diese zeigen einen geringfügig erhöhten pI von ca. 5,3. Zusätzlich ist das 28 kD Fragment mit einem pI von ca. 5,1 nachweisbar, das in der 1D- Analyse (Abb. 13, Spur B') gefundene 20 kD Fragment jedoch nicht (Abb. 14 B).

Der enzymatische Abbau mit Kathepsin D zeigt die typischen Abbaufragmente mit einem Molekulargewicht von 42 kD, 38 kD und 30 kD (Abb. 14 C). Zusätzlich ist das Fragment mit ca. 28 kD gegenüber der 1D-Analyse (Abb. 13, Spur C') deutlich zu erkennen. Auch hier ist wie beim Kathepsin B - Verdau das 20 kD- Fragment nicht nachweisbar. Der isoelektrische Punkt der Abbauprodukte liegt auch hier zwischen fünf bis sechs. Das 30 kD Abbauprodukt zeigt dabei den basischsten pI mit ca. 5,0, das 42 kD Fragment mit einem pI von ca. 5,9 den sauersten Wert. Die anderen Fragmente zeigen einen isoelektrischen Punkt von ca. 5,3 bis 5,5.

Beim Doppelverdau mit Kathepsin B und D konnte in der zweiten Dimension keine klare Trennung der Spots erreicht werden, da einzelne Spots bei der Fluoreszenzaktivierung stark überstrahlen. Die Spots bei 42 kD und 38 kD zeigen einen pI von ca. 5,1, das basische Fragment bei 5,9 ist nicht mehr nachweisbar. Dieses Fragment mit einem Molekulargewicht von 42 kD unterscheidet sich hinsichtlich des pI von dem 42 kD Fragment des Kathepsin D- Verdau. Zusätzlich sind im Bereich um 30 kD und einem pI um 5,1 zahlreiche Spots nachweisbar, die sich jedoch nicht klar auflösen lassen. Auffällig beim Doppelverdau mit Kathepsin B und D ist der eingeschränkte pI- Bereich der Fragmente, die alle zwischen ca. 5,0-5,4 liegen.

Die 2D-Analyse des enzymatischen Abbaus von FITC- Ovalbumin zeigt, dass Unterschiede im pI bei den Abbaufragmenten trotz identischen Molekulargewichts vorliegen.

3.1.5 Molekularbiologische Untersuchungen

Das Prozessierungsverhalten von Makrophagen kann durch den Einfluss von Zytokinen wie γ - Interferon oder bakteriellen Stoffen wie LPS vielfältig beeinflusst werden. Eine Möglichkeit besteht darin, dass durch die Aktivierung der Makrophagen das Expressionsmuster der lysosomalen Proteinase verändert wird. Dies würde einen direkten Einfluss auf die Prozessierung von Proteinantigenen zeigen. Daher wurde das Expressionsmuster der wichtigsten Proteinase untersucht. Der Nachweis wurde mittels RT-PCR durchgeführt. Diese Methode zeigt gegenüber den traditionellen proteinchemischen Nachweismethoden den Vorteil der hohen Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit.

3.1.5.1 RNA – Isolation aus Knochenmarks - Makrophagen

In einem ersten Schritt wurde aus unstimulierten sowie LPS- bzw. γ - Interferon stimulierten Makrophagen RNA isoliert. Um zu überprüfen, ob die gewonne RNA intakt ist, wurde diese gelelektrophoretisch in einem Agarose – Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

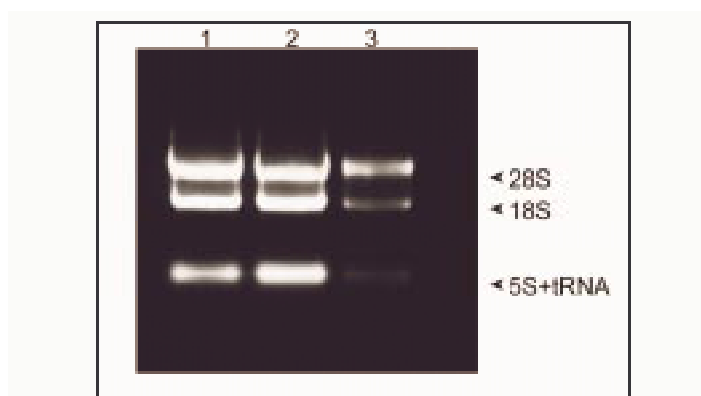


Abb. 15 Integritätsprüfung der isolierten RNA
Jeweils 3 μ l der frisch isolierten RNA wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.
1: unstimulierte MØ; 2: γ -INF stimulierte MØ; 3: LPS stimulierte MØ

Wie die Abb. 15 zeigt, ist die RNA bei allen drei Aktivierungszuständen intakt. Dies zeigt zudem, dass die Zellen durch die Stimulierung nicht apoptotisch geworden sind. Apoptotische Zellen beginnen mit dem vollständigen Abbau ihrer Nukleinsäuren [122], so dass mittels dieses Testes die Vitalität von Zellen überprüft werden kann. Dabei muss aber darauf geachtet werden, dass extrem sauber gearbeitet wird, da nicht inaktivierte

RNasen während der Isolation zu falschen Ergebnissen führen. Während von unstimulierten und γ - Interferon stimulierten Makrophagen ausreichende Mengen an RNA gewonnen wurden, konnte von den LPS - stimulierten Makrophagen nur eine geringe Menge an RNA gewonnen werden. Die Tab. 11 gibt einen Überblick über die gewonnene Menge an RNA in Relation zur Zellzahl.

	<i>Zellzahl</i>	<i>RNA in μg</i>
MØ	4×10^7	9,4
γ - INF MØ	$3,2 \times 10^7$	14
LPS - MØ	$8,8 \times 10^6$	1

Tab. 11 Isolierte RNA – Menge in Relation zur Zellzahl

3.1.5.2 RT – PCR Nachweis lysosomaler Proteinasen

Für den RT-PCR Nachweis wurden je 1 μ g RNA mittels des ThermoScript – Systems in cDNA umgeschrieben. Durch geeignete Primer konnten nun Proteinasen gezielt auf mRNA – Ebene nachgewiesen werden. Für die Beteiligung an der Prozessierung im endo- / lysosomalen System sind unter anderen die SH – Proteinase Kathepsin B, L, S, H [123], die erst kürzlich entdeckte Proteinase Legumain [124] sowie die sauren Proteinase Kathepsin D und E [123] beschrieben worden. Auf diese Proteinase wurde in allen drei Aktivierungsstadien mittels PCR der Nachweis geführt. Um zu prüfen, ob

<i>Test</i>	<i>bp</i>	<i>Forward – Primer</i>	<i>Reverse-Primer</i>	<i>unstimulierte MØ</i>	<i>γInterferon stimulierte MØ</i>	<i>LPS – stimulierte MØ</i>
Aktin	500	5' GTG GGC CGC TCT AGG CAC CA 3'	5' TAG CCC TCG TAG ATG GGC ACA G 3'	+	+	+
Kathepsin B	969	5' GTC CTT GAT CCC TCT CTC TTG 3'	5' GAA TCT TCC CCA GTA CTG CTG 3'	+	+	+
Kathepsin H	336	5' ATC CGC AAG TGA GGT AAA TAA 3'	5' CAA GCA GTT GGC CTG TGC AGC 3'	+	+	+
Kathepsin L	984	5' GGC TGT CCT CTG CTT GGG AAC 3'	5' CAC GAC AGG ATA GCT GGC CGC 3'	+	+	+
Kathepsin S	1009	5' GCA ATA GCT AGC AAT CCC GCA 3'	5' GTT TTG GGT GCC CCT GGT GTG 3'	+	+	+
Legumain	840	5' GAT GGA GGC AAG CAC TGG GTG 3'	5' GGT GAG GTC AAG GTG TGT GAC 3'	+	+	+
Kathepsin D	438	5' AAC TAA TGC TTG GCG GCA CT 3'	5' ACG GTG TAG TAG CAG CCA AT 3'	+	+	+
Kathepsin E	468	5' AAC CTT GTG GCT CTG CCT AT 3'	5' CGG AGG TTG AAT GTC AAG TC 3'	+	+	+

Tab. 12 RT – PCR Analyse lysosomaler Proteinasen

die jeweilige cDNA - Präparation intakt war, wurde stets ein Test auf Aktin durchgeführt. Die Tab. 12 gibt das Ergebnis der RT-PCR Analysen wieder. Während die PCR bei unstimulierten und γ - Interferon stimulierten Makrophagen starke Signale ergaben, waren diese bei den LPS stimulierten Makrophagen stets schwächer.

Ein Unterschied im Expressionsmuster der gängigen lysosomalen Proteinase konnte bei unterschiedlich stimulierten Knochenmarks - Makrophagen nicht festgestellt werden. Sowohl die Tests auf die SH - Proteinase Kathepsin B, H, L, S sowie Legumain als auch die Tests auf die Aspartat - Proteinase Kathepsin D und E ergaben positive Resultate.

Die Makrophagen exprimieren auf mRNA - Ebene die gleiche Ausstattung an den Leitproteinase des endo- / lysosomalen Systems. Weitere Tests auf die Proteinase Kathepsin O, W, K und U ergaben negative Resultate.

3.1.6 Aufnahme von FITC-OVA durch KMMØ

Die Markierung des Proteinantigens mit Fluorescein bot den Vorteil, die endozytische Aufnahme des Ovalbumins in die Zellen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen zu können. Hierzu wurden Knochenmarkszellen für 11 Tage in Gegenwart von M-CSF kultiviert, um KMMØ zu erhalten. Ein Teil der Knochenmarkskulturen wurde zusätzlich von Tag 8 an mit γ -Interferon stimuliert. Nach Umsetzen der Knochenmarkskulturen an Tag 11 in 24 - Well Platten wurden die Zellen für 4h mit 25 μ g FITC-OVA/1x10⁶ Zellen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und unter dem Fluoreszenz - Mikroskop untersucht.

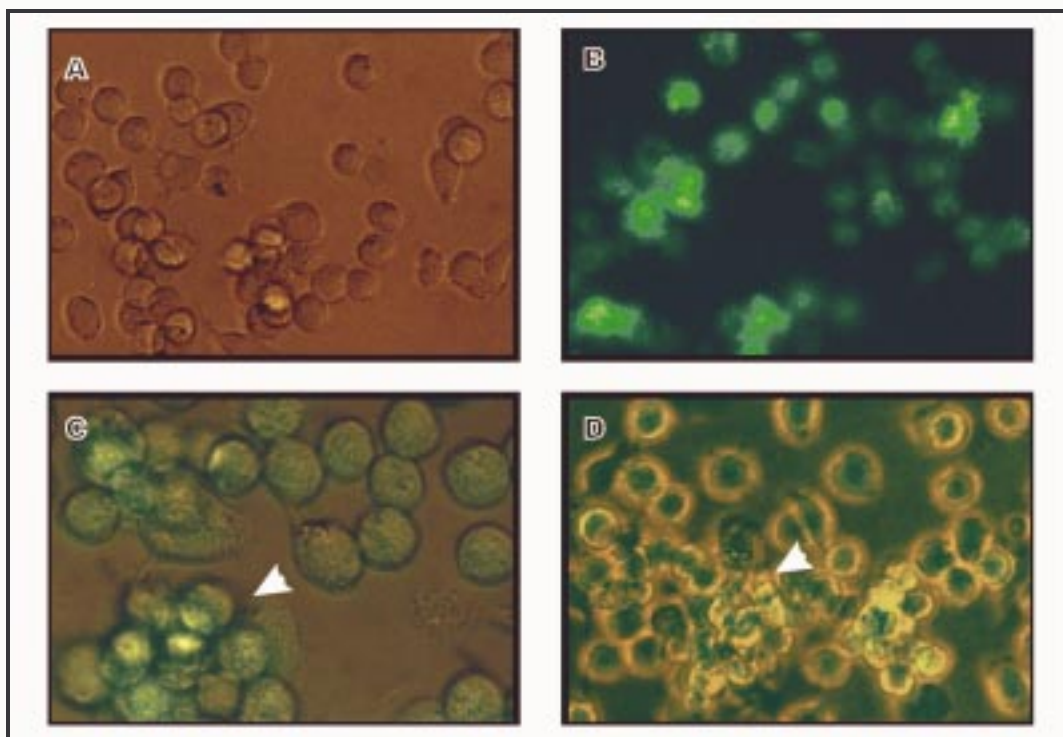


Abb. 16 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Antigenaufnahme

Die Aufnahmen wurden von elf Tage kultivierten Knochenmarksmakrophagen gemacht, die an Tag 10 in 24 Well-Platten in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml umgesetzt wurden. 25 μ g FITC-OVA/Well wurden für 4h zugegeben. Vor der Aufnahme wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in Makrophagenmedium aufgenommen. Alle Aufnahmen wurden am Invertmikroskop FLUOVERT (LEITZ) im Durchlicht erstellt bei einer Vergrößerung von 400x .

A: Durchlichtaufnahme einer 11 Tage KMMØ-Kultur , nur sichtbares Licht

B: Flureszenzaufnahme einer 11 Tage KMMØ-Kultur, nur UV-Licht Aktivierung

C: Flureszenzaufnahme einer 11 Tage KMMØ-Kultur, UV-Licht Aktivierung + sichtbares Licht

D: Flureszenzaufnahme einer 11 Tage KMMØ-Kultur, die für 72h mit γ -INF stimuliert wurde; UV-Licht Aktivierung + sichtbares Licht.

Die Pfeile zeigen auf Zellcluster

So konnte gezeigt werden, dass es hinsichtlich der Aufnahme Unterschiede zwischen den einzelnen Zellen gibt (Abb. 16). Zellen, die in Clustern vorliegen, nahmen eine größere Menge an Antigen auf als Zellen, die einzeln vorlagen. Dieses konnte sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten Knochenmarksmakrophagen gezeigt werden. Langzeitversuche zeigten zudem, dass die Fluoreszenz in den Zellen auch 72h nach Proteingabe noch messbar war. Dies weist auf eine lange Persistenz des Antigens oder des Proteinmarkers FITC in den Zellen hin.

Auffällig ist weiterhin, dass die γ -INF stimulierten Zellen größere Cluster ausbilden als die unstimulierten Zellen (Abb. 16 C+D). Dies deutet auf eine stärkere Endozytose - Aktivität bei diesen Zellen hin. Die Aufnahme des markierten Proteins zeigt keinerlei toxische Auswirkung auf die Vitalität der Zellen (Abb. 16 A). Die Abb. 16 B zeigt deutlich, dass nach dem Waschen der Zellen das zugegebene Antigen ausschließlich in den Zellen nachweisbar ist. Die Hintergrundstrahlung ist äußerst gering. Damit war für die weite-

ren Versuche sichergestellt, dass das prozessierte FITC-OVA aus den Zellen stammt und nicht durch evtl. im Medium vorhandene Proteinasen gespalten wurde.

3.1.7 Solubilisierungsbedingungen für FITC-OVA gepulste Zellen und Trennbedingungen für die Zellsolubilisate

Für die weiteren Versuche war es notwendig, die Bedingungen des Zellaufschlusses zu untersuchen. Da beim Zellaufschluss zahlreiche intrazelluläre Proteinasen freigesetzt werden, ist es nötig Proteinaseinhibitoren einzusetzen. Als Aufschlussmethode bietet sich bei eukaryontischen Zellen neben mechanischem Aufschluss die Solubilisierung durch Detergentien an. Letztere Methode ist bereits in unserem Labor etabliert und interferiert nicht mit nachfolgenden Analysemethoden. Neben der Wahl des Detergens ist auch die eingesetzte Zellzahl wichtig. Diese sollte in Hinblick auf Versuche mit dendritischen Zellen möglichst gering sein, da sich diese Zellen nur schwer in großer Zellzahl und Reinheit gewinnen lassen. Um auszuschließen, dass während der Solubilisierung freiwerdende Proteinasen das Proteinantigen abbauen, wurden zwei verschiedene Inhibitoren – Cocktails eingesetzt. Die minimal einzusetzende Proteinmenge wurde bereits in Vorarbeiten [121] ausgetestet. Für die Versuche wurden Knochenmarkszellen nach dem Standardprotokoll mit M-CSF für 11 Tage kultiviert. An Tag 11 wurden unterschiedliche Zellzahlen mit 25µg FITC – OVA für 4h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen nach unterschiedlichen Protokollen solubilisiert. Die Zellsolubilisate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und der Nachweis der FITC - markierten Fragmente erfolgte durch Aktivierung der Fluoreszenz mittels UV-Licht. Um zweidimensionale Gelanalysen durchführen zu können, wurden nichtionische Detergentien eingesetzt.

Wie die Abb. 17 A zeigt, ist es mit dem nichtionischen Detergens Nonident P40 nicht möglich, Abbaufragmente bei den gewählten Zellzahlen nachzuweisen. Zudem zeigt sich, dass nur eine geringe Menge des Ausgangsmaterials nachweisbar ist. Erkennbar ist, dass die Menge des eingesetzten Ausgangsmaterials mit zunehmender Zellzahl abnimmt. Das Detergens Nonident P40 zeigte sich als nicht geeignet, um eine genügende Menge von FITC – OVA Fragmenten in Lösung zu halten.

Als weiteres nichtionisches Detergens wurde Triton X 100 eingesetzt. Bei der Solubilisierung mit Triton X 100 zeigt sich eine deutlich stärkere Bande des Ausgangsmaterials gegenüber der Solubilisierung mit Nonident P40 (Abb. 17 B). Abbaufragmente sind jedoch auch hier erst bei einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen nachweisbar. Bei dendritischen Zellen

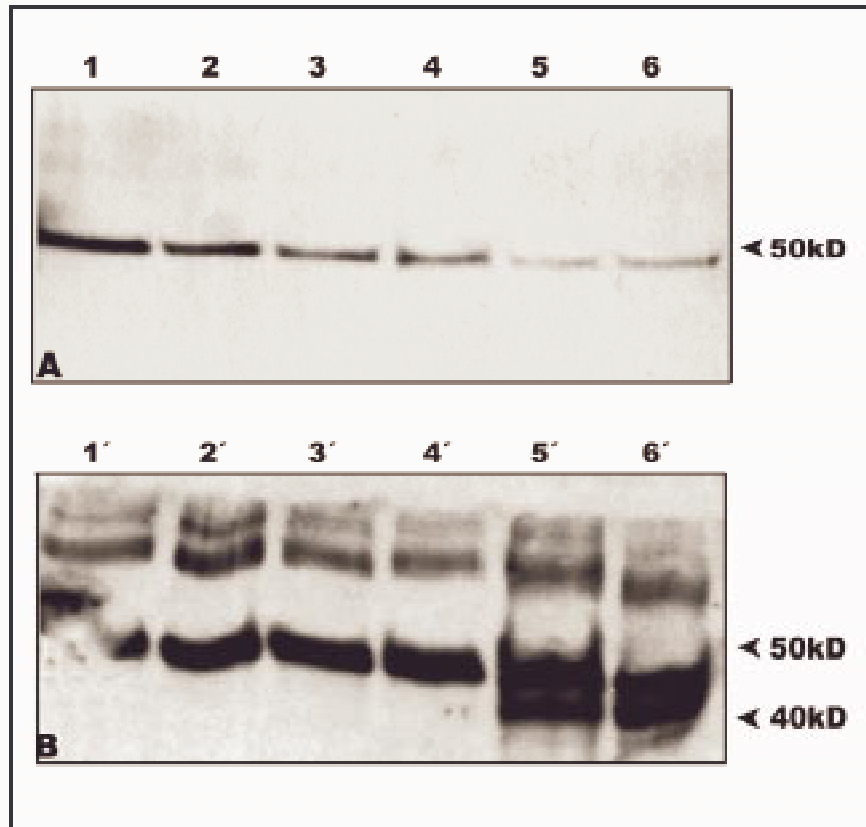


Abb. 17 Einfluß der Detergentien und der Zellzahl auf den Nachweis von in vivo prozessierten Fragmenten von FITC-OVA

Zu unstimulierten KMMØ wurde pro Well 25 µg FITC-OVA für 4h gegeben. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit dem entsprechenden Detergens solubilisiert. Die Trennung der Fragmente erfolgte in der SDS-PAGE mit 10% Tricin-Gelen. Der Nachweis erfolgte durch Fluoreszenzaktivierung und Aufnahme der Signale mit einer CCD-Kamera.

A: Solubilisierung mit 1% nichtionischen Detergens Nonident P40

B: Solubilisierung mit 1% nichtionischem Detergens Triton X 100

1+2: 1×10^4 Zellen, 3+4 1×10^5 Zellen, 5+6 1×10^6 Zellen

1,3,5 :CBZ-Phe-Ala+Pepstatin als Inhibitor-Cocktail bei der Zell-Solubilisierung

2,4,6: Complete – Inhibitorset bei der Zell-Solubilisierung

konnte jedoch eine untere Zellgrenze von 5×10^5 Zellen festgestellt werden (siehe Kap. 3.1.13). Auffällig war zudem, dass bei der Solubilisierung mit Triton X 100 auch die hochmolekularen Aggregate von Ovalbumin nachgewiesen werden.

Ein Einfluss der unterschiedlichen Inhibitor- Cocktails (CBZ-PHE-ALA/Pepsatin A bzw. Complete) konnte nicht nachgewiesen werden. Beide Inhibitoren wurden in so hohen Konzentrationen eingesetzt, das eine Aktivität der freigesetzten Proteinase unwahrscheinlich ist. Zudem werden durch den basischen pH von 8,5 die meisten lysosomalen

Proteinasen inhibiert. Durch den Einsatz von EDTA werden zudem die Metalloproteasen inhibiert. Für die weiteren Versuche wurde bei der Solubilisierung der Zellen stets der Proteinase – Inhibitor Cocktail Complete eingesetzt. Zusammenfassend ergibt sich durch den Einsatz des nichtionischen Detergens Triton X 100 mit dem Inhibitor- Cocktail Complete der optimale Solubilisierungspuffer für die weiteren Versuche. Die optimale Zellzahl liegt bei 1×10^6 Zellen.

Für die Trennung der Zellsolubilisate in der SDS – PAGE wurden Tricin – Gele eingesetzt [93]. Diese boten gegenüber den herkömmlichen Glycin – Gelen nach Laemmli [92] den Vorteil der höheren Auflösung im Molekulargewichtsbereich von 1-100 kD. Nachteilig ist jedoch die geringere Schärfe der Banden. Zudem sind die Gele sehr empfindlich gegenüber hohen Salzkonzentrationen im Probenpuffer. Für die Kinetikanalysen wurde der direkte Fluoreszenz – Nachweis gewählt, da so densitometrische Auswertungen möglich waren. Die verwendete CCD – Kamera verfügt über eine lineare Kennlinie, während Röntgenfilme eine exponentielle Kennlinie haben. Da das vorhandene Imagingsystem jedoch nur eine begrenzte Auflösung hat, wurde aus drucktechnischen Gründen bei den Kinetikexperimenten auf eine Darstellung der SDS – Gele weitgehend verzichtet.

Diese ersten Experimente zeigten, dass mit dem gewählten Experimentalansatz in KMMØ generierte Abbaufragmente von FITC-OVA in der SDS – PAGE getrennt werden können und durch Fluoreszenzaktivierung nachgewiesen werden können. Dabei zeigte sich nach einem vierstündigen FITC-OVA Pulse bereits ein Abbaufragment mit einem Molekulargewicht von 40 kD.

3.1.8 Kinetik der Antigenprozessierung durch Knochenmarksmakrophagen

Um ein grundlegendes Verständnis über die dynamischen Prozesse der Antigenprozessierung zu erhalten, wurden Kinetikexperimente durchgeführt. Mit Hilfe dieser Experimente sollte geklärt werden, in welchem Zeitraum das Modellantigen FITC - Ovalbumin durch intrazelluläre Proteinasen degradiert wird. Durch diese Information könnte der Ort der Prozessierung innerhalb des Endo-/lysosomalen Apparates angenähert werden. Grundlegende Arbeiten über die Endozytose zeigten eine klare Korrelation zwischen dem Aufenthalt in bestimmten intrazellulären Kompartimenten und der Zeit seit Aufnahme des Antigens[125]. Zusätzlich wurde der Einfluss der Makrophagenaktivierung auf die Prozessierung untersucht. Hierzu wurden die Knochenmarksmakrophagen einerseits mit γ - Interferon, andererseits mit dem bakteriellen Oberflächenantigen LPS stimuliert.

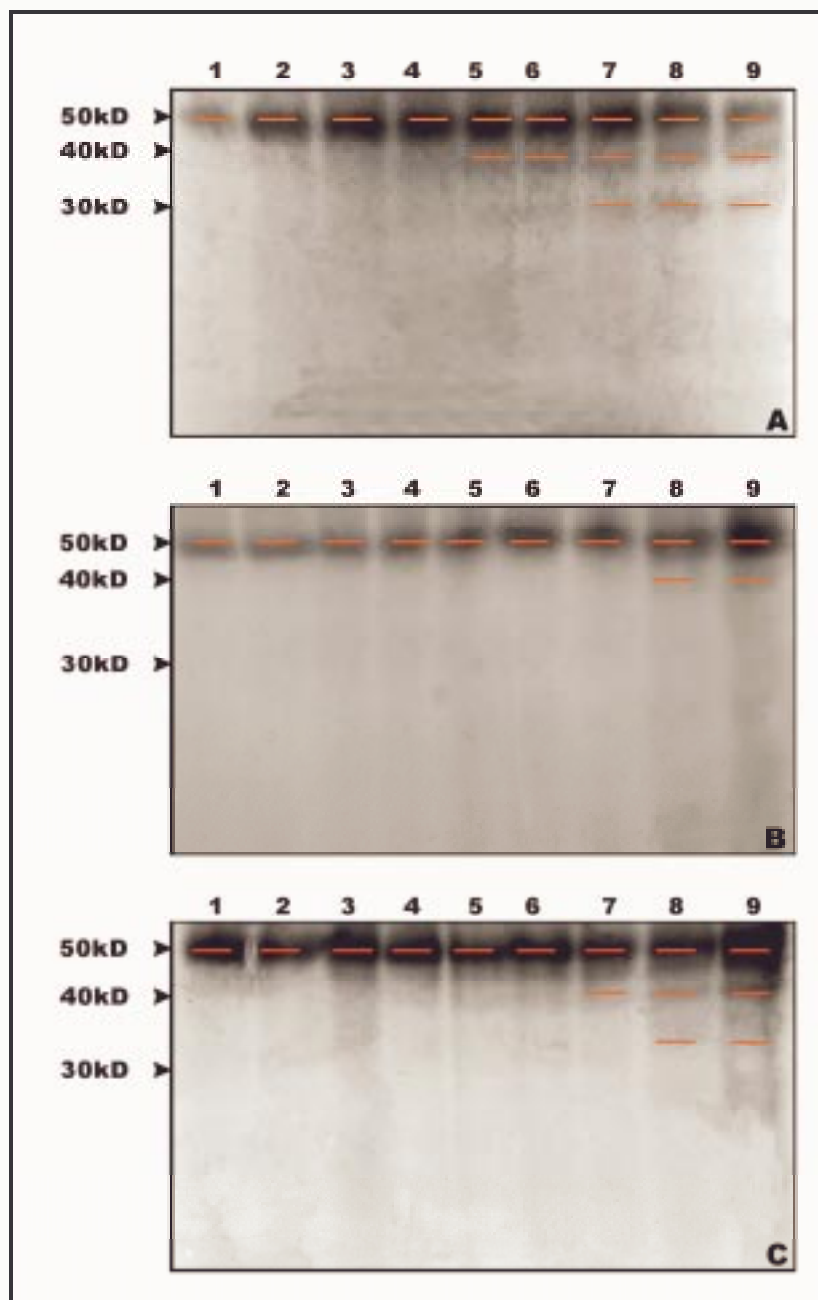


Abb. 18 Kinetikanalyse der Antigenprozessierung durch KMMØ

KM-Zellen wurden für 11 Tage in Gegenwart von M-CSF kultiviert. An Tag 10 wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in 24 Well-Platten umgesetzt. Antigenzugabe von $25 \mu\text{g}$ FITC-OVA für die angegebene Zeitdauer. Die Zell-Solubilisierung erfolgte in den Platten. Nachweis durch Fluoreszenzaktivierung und Aufnahme der Signale mit einer CCD-Kamera.

A: unstimulierte Makrophagen . B: LPS-Stimulation für 72h, $1 \mu\text{g/ml}$ C: Stimulation mit 20U rry-IFN für 72h.

1=5min, 2=10min, 3=20min, 4=30min, 5=40min, 6=50min, 7=60min, 8=120min, 9=240min Antigenpulse

Aus drucktechnischen Gründen wurde die Lage der Banden mit roten Linien gekennzeichnet.

Um einen besseren Einblick über das Abbauverhalten gewinnen zu können, wurde nach Trennung der Fragmente in der SDS - PAGE eine densitometrische Auswertung der Gele durchgeführt. Diese bietet gegenüber der rein optischen Auswertung der Gele den Vor-

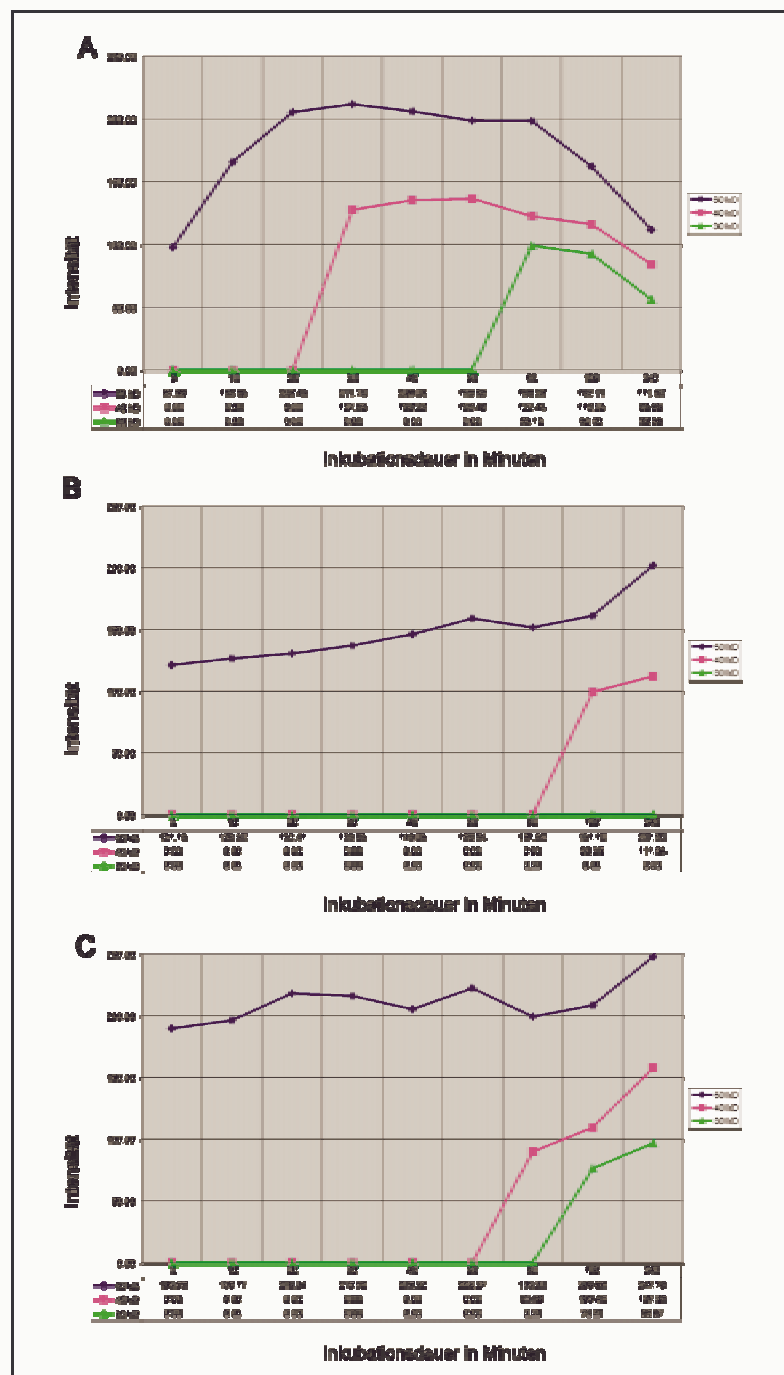
teil, die Signalstärke der Banden quantifizieren zu können. In der Abb. 18 ist die Kinetikanalyse von Makrophagen gezeigt.

In der Abb. 19 A ist die densitometrischen Auswertung der Kinetikanalyse für unstimulierte Knochenmarksmakrophagen gezeigt. Die ersten Abbaufragmente von FITC-OVA sind nach ca. 30 min. mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kD erkennbar. Die Stärke diese Abbaufragmentes nimmt bis zu einer Antigenpulse- Dauer von 50min zu und nimmt dann wieder ab. Ab einer Inkubationsdauer von 60 min. ist ein weiteres Abbaufragment von FITC-OVA mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kD nachweisbar. Dieses FITC-OVA Fragment hat schwächere Signale als das 40 kD Fragment und liegen mengenmäßig nur geringfügig über der Nachweisgrenze des Nachweissystems. Kleinere Fragmente konnten nicht nachgewiesen werden.

Die LPS- stimulierten Knochenmarksmakrophagen zeigen eine verzögerte Abbaukinetik (Abb. 19 B). Hier ist das 40 kD- FITC-OVA Fragment erst nach einem Antigenpulse von zwei Stunden schwach nachweisbar. Nach einer vierstündigen Inkubation ist das 40 kD- Fragment stärker nachweisbar. Das 30 kD- FITC-OVA Fragment ist auch nach vier Stunden Pulsedauer nicht nachweisbar. Auch durch den indirekten, antikörpervermittelten Nachweis konnten die Fragmente nicht stärker nachgewiesen werden.

Einen gegenteiligen Effekt auf die Antigenprozessierung zeigt die Aktivierung der Knochenmarksmakrophagen mit γ - Interferon. Das 40 kD- Abbaufragment ist nach sechzigminütigem Antigenpulse nachweisbar und wird mit zunehmender Inkubationsdauer immer stärker (Abb. 19 C). Auch das 30 kD - Abbauprodukt ist gegenüber den LPS - stimulierten Makrophagen nachweisbar. Dieses Fragment ist bereits nach 120 min schwach nachweisbar und nimmt mit zunehmender Inkubationsdauer an Signalstärke zu.

Insgesamt zeigt der Versuch einen deutlich messbaren Einfluss der Aktivierung von Knochenmarksmakrophagen auf die Prozessierung durch LPS und γ - Interferon. LPS- Aktivierung führt zu einer verzögerten Prozessierung von FITC-OVA, während γ - Interferon nur zu einer leichten Verzögerung der Prozessierung im Vergleich zu unstimulierten Makrophagen führt.



3.1.9 Einfluß des Aspartat- Proteinase - Inhibitors Pepstatin A auf die Kinetik der Antigenprozessierung

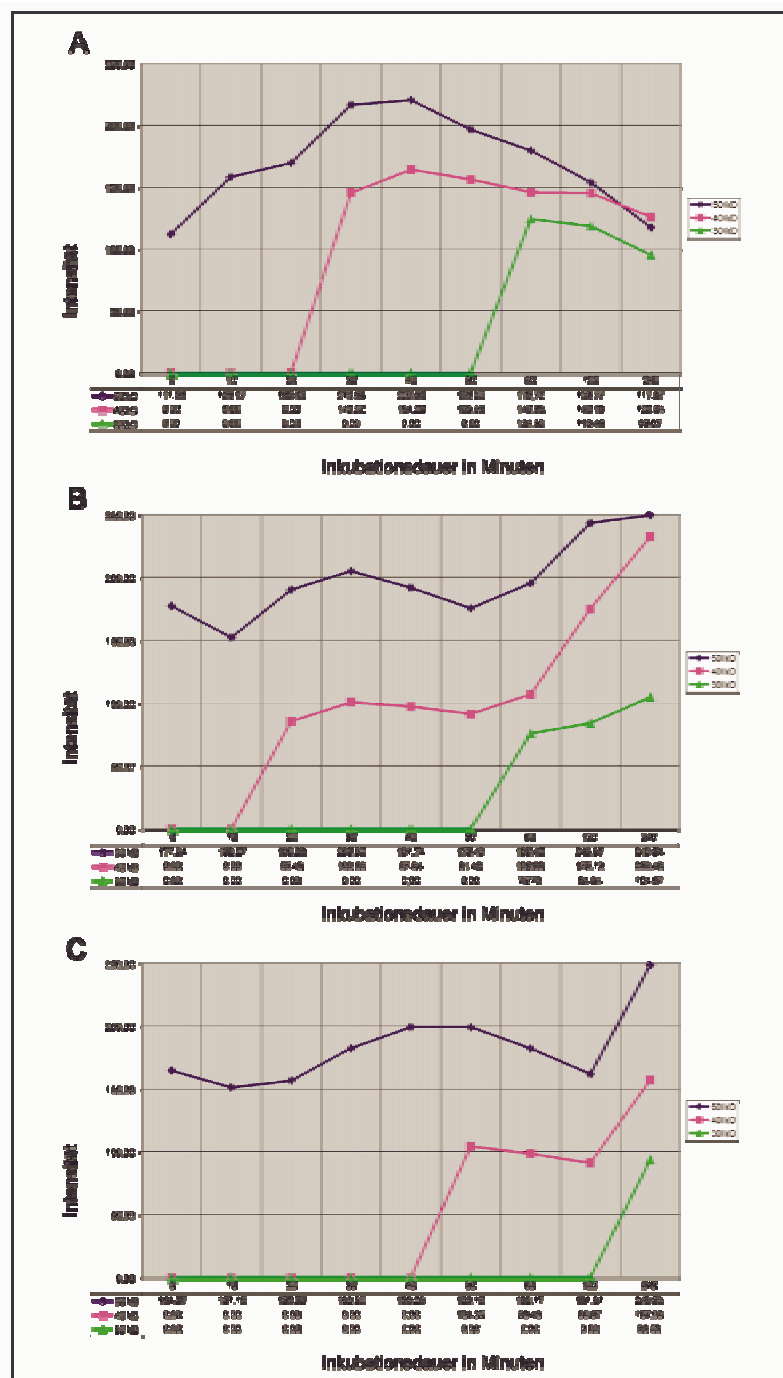


Abb. 20 Einfluß von Pepstatin A auf die Kinetik der Antigenprozessierung
 KM-Zellen wurden für 11 Tage in der Gegenwart von M-CSF kultiviert. An Tag 10 wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in 24 Well-Platten umgesetzt. Die Stimulation mit LPS bzw. γ -INF erfolgte von Tag 8 an und wurde bis zur Zellsolubilisierung durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zellen vor Versuchsablauf für 20h mit $10 \mu\text{g/ml}$ Pepstatin A vorinkubiert. Die Antigenzugabe von $25 \mu\text{g}$ FITC-OVA erfolgte für die angegebene Zeitdauer. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurde die Zellsolubilisierung in den Platten durchgeführt. Die Solubilisate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis der Fragmente erfolgte durch Fluoreszenzaktivierung, die Signale wurden mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet. Die Blots wurden densitometrisch ausgewertet. Es wurden für jede Bande 4080 Pixel ($0,1 \text{ inch}^2$) vermessen und der durchschnittliche Grauwert gegenüber der Zeit aufgetragen. Auf der Abszisse ist die Inkubationsdauer, auf der Ordinate der mittlere Grauwert der Banden mit einem Molekulargewicht von 50 kD (blau), 40 kD (pink) und 30 kD (grün) aufgetragen.
 A=unstimulierte MØ; B= LPS – Stimulation für 72h, $1 \mu\text{g/ml}$; C= Stimulation mit 20U $r\gamma$ -IFN für 72h

Um Hinweise auf die an der Antigenprozessierung beteiligten Enzyme zu erhalten, wurde die Kinetikanalyse unter dem Einfluss des Aspartat- Proteinaseinhibitors Pepstatin A durchgeführt. Pepstatin A inhibiert die lysosomalen Proteinase Kathepsin D und E. Die Wirksamkeit des Proteinaseinhibitors unter den gewählten Bedingungen ist in [126] beschrieben worden. Bei der eingesetzten Konzentration sind keine toxischen Nebenwirkungen festzustellen. Ein Einfluss auf die generierten FITC-OVA Peptide durch den Proteinaseinhibitor Pepstatin A konnte jedoch bei keinem Aktivierungszustand der Knochenmarksmakrophagen festgestellt werden. Die Fragmente stimmen vom Molekulargewicht her mit den ohne Einfluss des Inhibitors entstandenen überein. Es konnten nur Abbau - Fragmente von FITC-OVA mit einem Molekulargewicht von 40 kD und 30 kD nachgewiesen werden.

Wie die Kinetikanalyse in Abb. 20 A für unstimulierte Knochenmarksmakrophagen zeigt, ist keinerlei Einfluss des Proteinaseinhibitors Pepstatin A feststellbar. Auch hier sind Abbaufragmente mit einem Molekulargewicht von 40 kD bereits nach einer halben Stunde messbar. Mit Zunahme der Antigen- Inkubationsdauer nimmt die Signalstärke dieses Fragments leicht ab. Das Maximum des Signals liegt bei einem Antigenpulse von fünfzig Minuten, danach nimmt die Stärke wieder ab. Nach einer sechzigminütigem Inkubationsdauer kann das 30 kD Fragment nachgewiesen werden. Die Signalstärke dieses Fragments nimmt mit zunehmender Inkubationsdauer leicht ab. Fragmente mit niedrigerem Molekulargewicht sind nicht nachweisbar.

Gegenüber den ohne Inhibitor behandelten LPS- stimulierten Makrophagen ist das 40 kD Fragment bereits nach einer Inkubationsdauer von zwanzig Minuten nachweisbar (Abb.20 B). Die Signalstärke dieses Fragments nimmt mit zunehmender Antigenpulse-Dauer kontinuierlich zu. Ein Maximum wird nach vierstündigem Pulse erreicht, eine weitere Zunahme nach längerer Proteingabe ist nicht messbar. Das 30 kD Fragment ist nach sechzig Minuten nachweisbar, mit zunehmender Dauer der Antigengabe nimmt das Signal leicht zu.

Ein Effekt des Proteinaseinhibitors Pepstatin A auf die Kinetik der Antigenprozessierung ist auch bei den mit γ - Interferon stimulierten Knochenmarksmakrophagen messbar (Abb. 20 C). Das 40 kD Abbaufragment ist nach fünfzig Minuten nachweisbar, die Signalstärke nimmt bis zum Maximum bei 240 Minuten zu. Das 30 kD Fragment ist erst nach vier Stunden nachweisbar.

3.1.10 Kinetikanalyse der Antigenprozessierung unter dem Einfluß des SH-

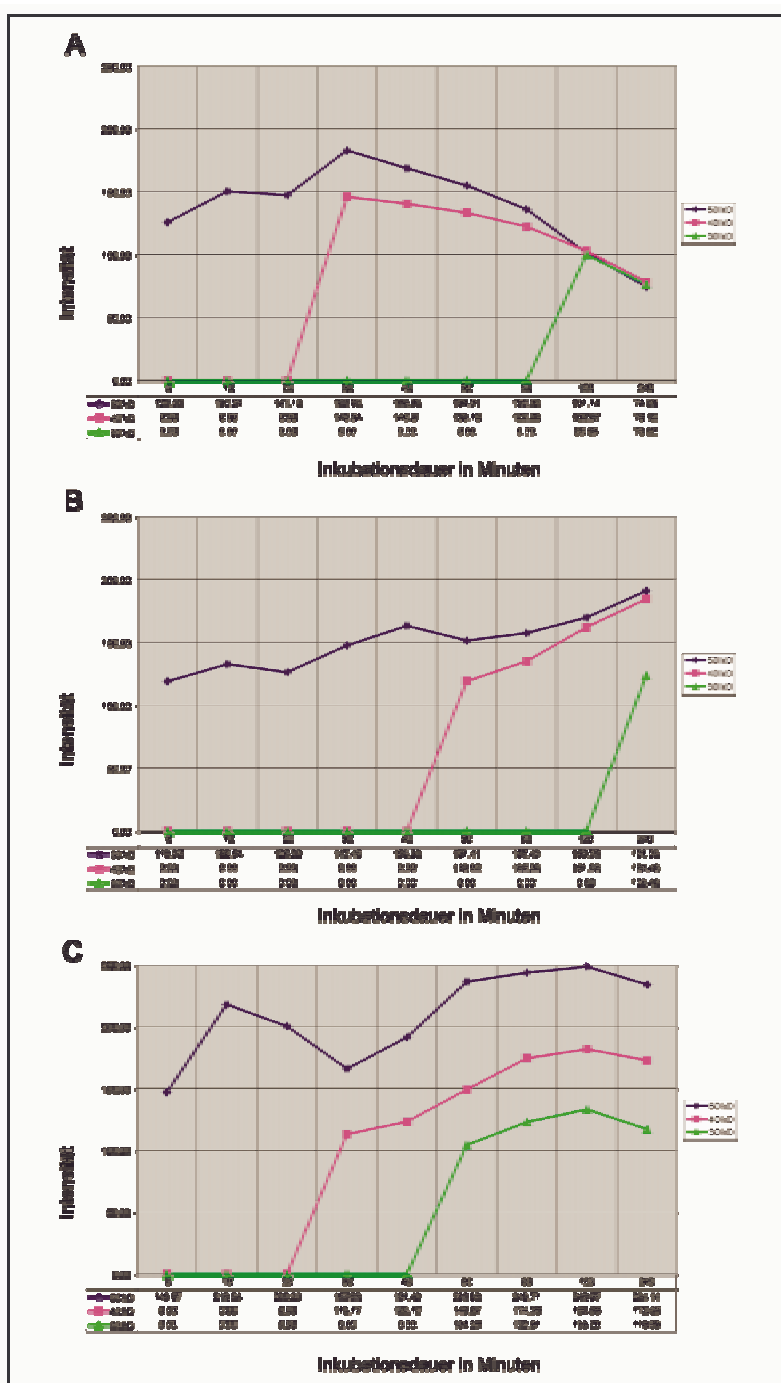


Abb. 21 Kinetik der Antigenprozessierung in der Gegenwart von Leupeptin
 KM-Zellen wurden für 11 Tage in der Gegenwart von M-CSF kultiviert. An Tag 10 wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in 24 Well-Platten umgesetzt. Die Stimulation mit LPS bzw. γ -INF erfolgte von Tag 8 an und wurde bis zur Zellsolubilisierung durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zellen vor Versuchsablauf für 20h mit $20 \mu\text{g/ml}$ Leupeptin vorinkubiert. Die Antigenzugabe von $25 \mu\text{g}$ FITC-OVA erfolgte für die angegebene Zeitdauer. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurde die Zellsolubilisierung in den Platten durchgeführt. Die Solubilisate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis der Fragmente erfolgte durch Fluoreszenzaktivierung, die Signale wurden mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet. Die Blots wurden densitometrisch ausgewertet. Es wurden für jede Bande 4080 Pixel ($0,1 \text{ inch}^2$) vermessen und der durchschnittliche Grauwert gegenüber der Zeit aufgetragen. Auf der Abzisse ist die Inkubationsdauer, auf der Ordinate der mittlere Grauwert der Banden mit einem Molekulargewicht von 50 kD (blau), 40 kD (pink) und 30 kD (grün) aufgetragen.
 A=unstimulierte MØ; B= LPS – Stimulation für 72h, $1 \mu\text{g/ml}$; C= Stimulation mit $20 \text{U } \gamma\text{-INF}$ für 72h

Proteinase - Inhibitors Leupeptin

Neben den Aspartat- Proteinasen stellen die SH- Proteinasen die zweite Gruppe der lysosomalen Endoproteinase dar. In einem weiteren Versuch wurde daher der Einfluss des SH- Proteinaseinhibitors Leupeptin auf die Antigenprozessierung untersucht. Leupeptin zeigt bereits in einer Konzentration von 1 µg/ml einen Einfluss auf die Antigenprozessierung [127]. In früheren Arbeiten in unserem Labor wurde bei einer Konzentration von 20 µg/ml keinerlei Proteinaseaktivität der SH- Proteinase Kathepsin B in Knochenmarksmakrophagen mehr gemessen [126], so dass in diesem Versuch der Inhibitor in dieser Konzentration eingesetzt wurde.

Auch unter dem Einfluss des Proteinaseinhibitors Leupeptin zeigen die unterschiedlich stimulierte Makrophagen die von ohne Inhibitor - Einfluss bekannten Abbaufragmente von FITC-OVA mit einem Molekulargewicht von 40 kD bzw. 30 kD (Abb. 21 A-C). Es konnten nur FITC-OVA Fragmente nachgewiesen werden, die vom Molekulargewicht her mit den ohne Inhibitoreinfluss generierten übereinstimmen.

Bei unstimulierten Makrophagen sind erste Abbauprodukte von FITC-OVA mit einem Molekulargewicht von 40 kD nach einer halben Stunde nachweisbar. Die Stärke des Signals nimmt mit zunehmender Inkubationsdauer ab. Nach einer zweistündigen Antigengabe ist zusätzlich das Abbau - Fragment von FITC-OVA mit einem Molekulargewicht von 30 kD zu sehen. Dieses FITC-OVA Abbauprodukt gibt jedoch nur ein äußerst schwaches Signal (Abb. 21 A).

Bei LPS- stimulierten Knochenmarksmakrophagen ist das typische FITC-OVA Abbau - Fragment mit einem Molekulargewicht von 40 kD nach einem Antigenpulse von fünfzig Minuten nachweisbar (Abb. 21 B). Die Signalstärke dieses FITC-OVA Abbauprodukts wird mit zunehmender Inkubationsdauer immer stärker. Das FITC-OVA Fragment mit einem Molekulargewicht von 30 kD ist erst nach vierstündiger Proteingabe messbar. Dieses zeigt dann jedoch ein recht starkes Signal.

Die γ - Interferon stimulierten Knochenmarksmakrophagen zeigen bereits nach zwanzigminütiger Inkubation erste Abbaufragmente von FITC-OVA (Abb. 21 C). So ist das FITC-OVA Fragment mit einem Molekulargewicht von 40 kD zu diesem Zeitpunkt bereits klar nachweisbar. Die Signalstärke dieses Fragments nimmt mit zunehmender Inkubationsdauer deutlich zu und erreicht nach zweistündiger Antigengabe das Signalmaximum. Auch das leichtere Abbauprodukt von FITC-OVA mit einem Molekulargewicht von 30 kD

ist nach einem fünfzigminütigem Pulse sichtbar. Dieses FITC-OVA Fragment zeigt ein Signalmaximum nach einer zweistündigen Inkubation.

3.1.11 Einfluß verschiedener Proteinaseinhibitoren auf die Antigenprozessierung

Um die an der Antigenprozessierung beteiligten Proteinase näher charakterisieren zu können, wurden weitere Inhibitoren eingesetzt. Die endo - / lysosomalen Proteinase lassen sich nach der reaktiven Gruppe im Zentrum des Enzyms in zwei Untergruppen unterteilen: Thiol (SH)- Proteinase, die einen Cysteinrest im aktiven Zentrum tragen und Aspartat (saure) - Proteinase, bei denen die Carboxygruppen von Asparaginsäureresten an der Katalyse beteiligt sind. Serin- Proteinase sind zytosolische Proteinase, Metalloproteinase sind dagegen hauptsächlich an der Zelloberfläche zu finden[125]. Die letztgenannten Gruppen sind vermutlich nicht an der MHC Klasse II restringierten Antigenprozessierung beteiligt.

Für die Hemmung von Aspartat - Proteinase steht zur Zeit lediglich der bereits eingesetzte Inhibitor Pepstatin A zur Verfügung. Dieses ist darauf zurückzuführen, dass die sauren Proteinase aufgrund ihres Wirkmechanismus extrem pH - empfindlich sind. Bei pH - Werten über pH 7,0 sind die Aspartat- Proteinase inaktiv [123]. Um auch solche saure Proteinase hemmen zu können, die sich von Pepstatin A nur in sehr hohen Konzentrationen inhibieren lassen, wurde eine fünffach höhere Konzentration eingesetzt. Hierbei zeigten sich jedoch bereits toxische Auswirkungen auf die Zellen; die Zellvitalität nahm nach 20h Inkubation um bis zu 30% ab.

Zusätzlich zum SH - Proteinaseinhibitor Leupeptin wurde der Inhibitor E-64d eingesetzt, der die gesamte Familie der Calpaine und Papaine inhibiert. Auch hier wurden unterschiedliche Dosen eingesetzt, da für diesen Inhibitor eine eingeschränkte Zellmembranpermeabilität beschrieben wurde [128]. Um die beteiligten Proteinase weiter einschränken zu können, wurde zusätzlich der spezifische Kathepsin Inhibitor CAT3 eingesetzt. Dieser Inhibitor ist selektiv gegen die Kathepsin- Proteinase B,L und S gerichtet. Auch dieser Inhibitor wurde in unterschiedlichen Dosen eingesetzt.

Bei allen Versuchen wurde der Inhibitor sechzehn Stunden vor Antigengabe zugesetzt, um zu gewährleisten, dass der Inhibitor die intrazellulären Proteinase inhibierte. Das Proteinantigen wurde für vier Stunden zugegeben. Die Kinetikexperimente zeigten, dass zu diesem Zeitpunkt unabhängig vom Aktivierungszustand der Knochenmarks-

makrophagen deutliche Abbauprodukte des FITC- Ovalbumins nachweisbar sind. Die Inhibitoren wurden während des Antigenpulses weiter zugegeben.

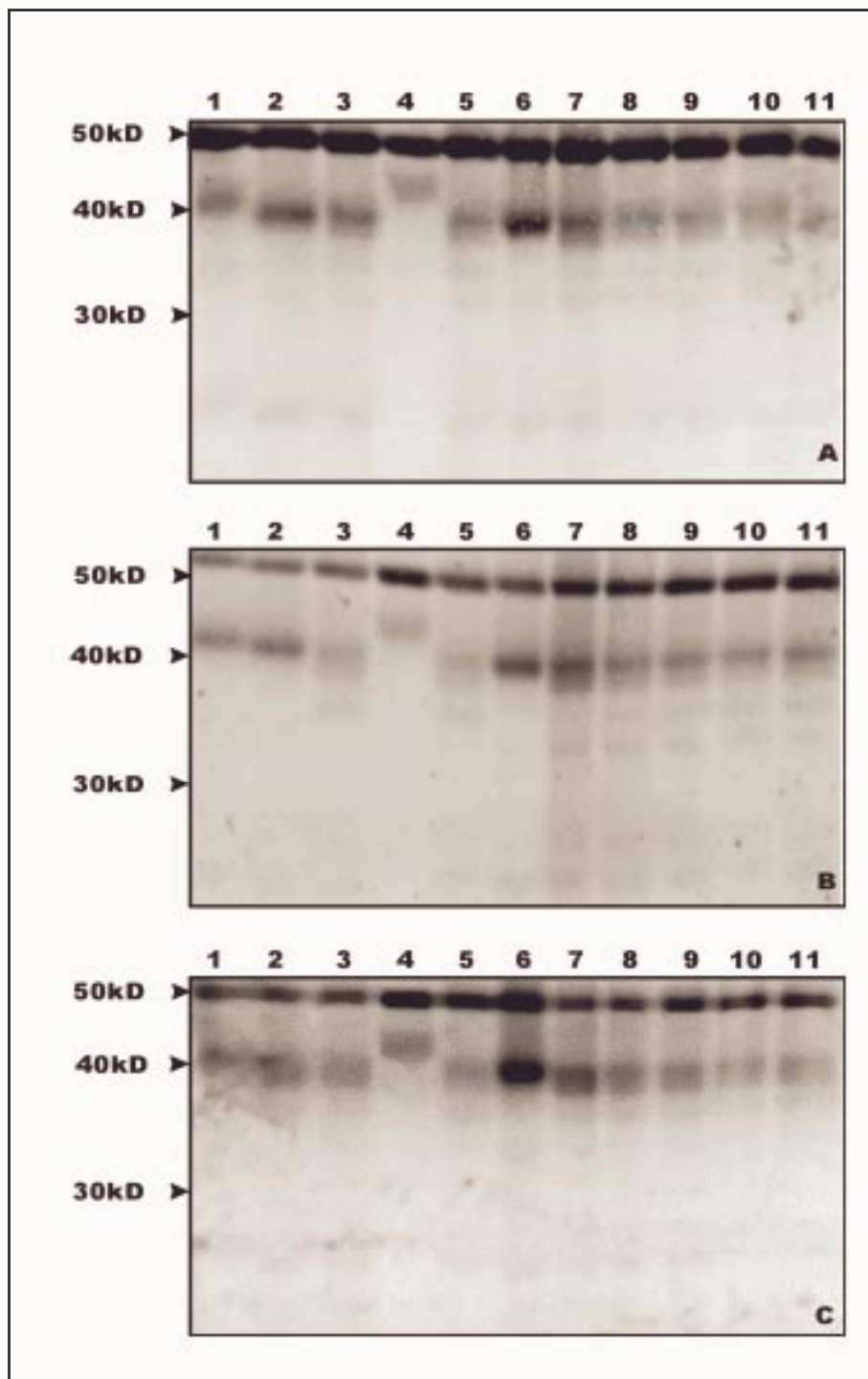


Abb. 22 Einfluß verschiedener Proteinaseinhibitoren auf die Antigenprozessierung durch KMMØ

KM-Zellen wurden für 11 Tage in der Gegenwart von M-CSF kultiviert. An Tag 10 wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in 24 Well-Platten umgesetzt. Die Stimulation mit LPS bzw. γ -INF erfolgte von Tag 8 an und wurde bis zur Zellsolubilisierung durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zellen vor Versuchsablauf für 20h mit den angegebenen Inhibitoren vorinkubiert. Die Antigenzugabe von $25 \mu\text{g}$ FITC-OVA erfolgte für 4h. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsolubilisierung in den Platten durchgeführt. Die Solubilisate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis der Fragmente erfolgte durch Fluoreszenzaktivierung, die Signale wurden mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet. A=unstimulierte MØ; B= LPS – Stimulation für 72h, $1 \mu\text{g/ml}$; C= Stimulation mit 20U rry-IFN für 72h

1= $200 \mu\text{g/ml}$ E-64, 2= $100 \mu\text{g/ml}$ E-64, 3= $30 \mu\text{g/ml}$ E-64, 4= $100 \mu\text{g/ml}$ Pepstatin A, 5= $20 \mu\text{g/ml}$ Pepstatin A, 6= $400 \mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 7= $20 \mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 8= $5 \mu\text{g/ml}$ CAT3, 9= $1 \mu\text{g/ml}$ CAT3, 10= $0.7 \mu\text{g/ml}$ CAT3

Wie die Abb. 22 zeigt, ist ein Einfluss auf die Prozessierungsaktivität durch Thiol- Proteaseinhibitoren nicht nachweisbar. Dies ist unabhängig vom Aktivierungsgrad der Makrophagen. Der Inhibitor E-64 zeigt jedoch einen Einfluss auf die Menge an aufgenommenen Antigenen. So ist die FITC- Ovalbumin Ausgangsbande mit einem Molekulargewicht von 50 kD bei den LPS- aktivierten Makrophagen deutlich schwächer als bei den unstimulierten MØ. Auch die γ - Interferon stimulierten Makrophagen zeigen in der Gegenwart von E-64 eine schwächere Antigenaufnahme.

Der CAT3 Inhibitor in unterschiedlichen Konzentrationen zeigt nur einen geringen Einfluss auf die Menge des aufgenommenen Antigens. So sind die Ausgangsbanden bei LPS- (Abb. 22 B) und γ - Interferon (Abb. 22 C) stimulierten Makrophagen nur unwesentlich schwächer als bei den unstimulierten Makrophagen. Ein Einfluss auf die Prozessierungsaktivität der Knochenmarksmakrophagen in Gegenwart des Proteinaseinhibitors CAT3 ist jedoch nicht messbar.

Leupeptin zeigt dagegen bei einer hohen Konzentration einen Effekt auf das 40 kD Abbauprodukt. Dieses ist bei allen drei Aktivierungszuständen stärker ausgeprägt als normal. Zudem führt Leupeptin bei beiden Konzentrationen zu einer Zunahme der Antigenaufnahme bei γ - Interferon aktivierten Makrophagen. Dieser Effekt ist bei den unstimulierten Makrophagen nicht zu beobachten. Bei den LPS- stimulierten Makrophagen tritt ein gegenteiliger Effekt auf. Hier ist eine Abnahme der Antigenaufnahme zu beobachten.

Einen klaren Einfluss auf die Prozessierungsaktivität zeigt jedoch die Gabe von Pepstatin A in der hohen Dosis von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. So ist das Abbauprodukt mit einem Molekulargewicht von 40 kD nicht mehr nachweisbar. Statt dessen ist ein schwereres Fragment mit einem Molekulargewicht von 45 kD nachweisbar. Dieses ist bei allen Aktivierungszuständen deutlich sichtbar. Zudem beeinflusst Pepstatin A bei LPS- und γ - Interferon stimulierten Makrophagen die Antigenaufnahme. So ist bei der hohen Konzentration des Inhibitors eine Zunahme der Aufnahme zu beobachten, die bei der niedrigeren Dosis schwächer ausgeprägt ist.

3.1.12 Zweidimensionale Analyse der Antigenprozessierung durch unstimulierte Makrophagen

Um nachzuweisen, ob die Proteinaseinhibitoren Pepstatin A und Leupeptin einen qualitativen Einfluss auf die Prozessierung des Proteinantigens FITC-OVA zeigen, wurden zweidimensionale Gelelektrophoresen durchgeführt.

Hierbei wird als zweiter Trennparameter der isoelektrische Punkt des Proteins/ Peptids ausgenutzt, an dem die elektrische Mobilität annähernd Null ist. Aufgrund der beschränkten Ladekapazität der Rundgele konnte nur die halbe Probenmenge gegenüber der SDS - PAGE aufgetragen werden. Zudem konnte die Probe nicht abzentrifugiert werden, da trotz 8M Harnstoff im Probenpuffer die Abbaufragmente ausfielen. Dieses führte zu einer Beeinflussung des Laufverhaltens in der ersten Dimension. Zusätzlich musste aufgrund dieser technischen Einschränkungen sehr lange belichtet werden. Dadurch kam es zu erheblichen Überstrahlungen, die Auswertung nahezu unmöglich machten.

Wie bereits bei der 2D - Analyse der *in vitro* Verdauung (Kapitel 3.1.4) zeigt sich die starke Heterogenität des FITC - OVA in der zweidimensionalen Analyse. Eine reproduzierbare zweidimensionale Trennung der in Makrophagen generierten FITC-OVA Fragmente konnte jedoch nicht bewerkstelligt werden. So sind die einzelnen Peaks so schwach, dass sie nicht klar nachweisbar sind. Schwache Fluoreszenz ist bei 40 kD und einem pI von 5,3 nachweisbar, ebenso ist ein sehr schwacher Peak bei ca. 30 kD und einem pI von 4,5 sichtbar. Für diese Peaks musste aber bereits extrem lange belichtet werden, so dass der FITC-OVA Peak mit einem Molekulargewicht von 50 kD stark überstrahlte. Auch hier ist ein schlechtes Laufverhalten des FITC - OVA in der zweidimensionalen Elektrophorese zu beobachten. Aufgrund der technischen Beschränkungen des O'Farrell 2-D Elektrophorese Systems konnte auch nicht eine größere Probenmenge aufgetragen werden. Aufgrund der extrem schwachen Signale und der schlechten Dokumentationsmöglichkeit der Daten wurde auf weitergehende Experimente verzichtet.

3.1.13 Prozessierung von FITC - OVA durch dendritische Zellen

Dendritische Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Initiierung der erworbenen Immunantwort. Daher war es von Interesse, die Antigenprozessierung von FITC-OVA in dendritischen Zellen zu untersuchen. Zudem stand ein effizientes Kultursystem für diese Zellen zur Verfügung [86]. Da sich jedoch entgegen der Makrophagen - Kultur nur wenige dendritische Zellen in hoher Reinheit gewinnen lassen, wurde für den Versuch nur

die halbe Zellzahl an dendritischen Zellen eingesetzt. Vorversuche zeigten, dass auch bei dieser Zellzahl der Abbau von FITC-OVA messbar war. Zudem wurden die Zeitschritte vergrößert. Die Versuche wurden gemäß dem Makrophagen - Protokoll durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.8). Im Gegensatz zur KMMØ - Kultur differenzieren sich unter dem Einfluss von GM-CSF neben dendritischen Zellen auch Granulozyten und Makrophagen aus Knochenmarkszellen aus. Da die DC als einzige Zellen in diesem Kultursystem konstitutiv MHC Klasse II - Moleküle auf der Zelloberfläche exprimieren, konnten die dendritischen Zellen anhand dieses Oberflächenmarkers von den anderen Zellen separiert werden. Für die Versuche wurden stets die DC und die MHC Klasse II - negative Restpopulation untersucht.

Die Dendritischen Zellen zeigen ein ähnliches Aufnahmeverhalten wie die γ - Interferon

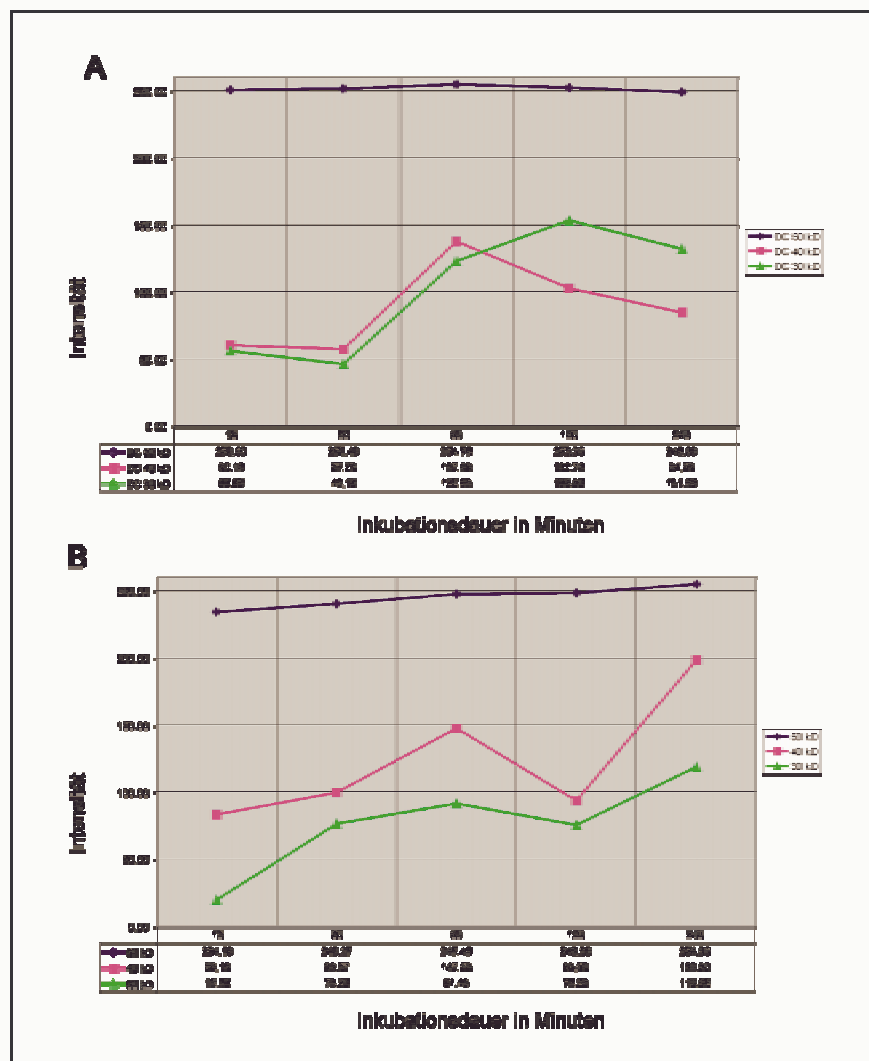


Abb. 23 Prozessierung von FITC – OVA durch DC's und GM-CSF - MØ
 KM-Zellen wurden für 8 Tage in der Gegenwart von 2ng rmGM-CSF kultiviert. Nach der Zellernte erfolgte eine Zellseparation mittels Magnetbeadselektion. Es wurden 5×10^5 DC und 1×10^6 Zellen der Restpopulation eingesetzt und in 24 Well Platten umgesetzt. Die Antigenzugabe von $25 \mu\text{g}$ FITC-OVA erfolgte für die angegebene Zeitdauer. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurde die Zellsolubilisierung in den Platten durchgeführt. Die Solubilisate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis der Fragmente erfolgte durch Fluoreszenzaktivierung, die Signale wurden mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet. Die Blots wurden densitometrisch ausgewertet. Es wurden für jede Bande 4080 Pixel ($0,1 \text{ inch}^2$) vermessen und der durchschnittliche Grauwert gegenüber der Zeit aufgetragen. Auf der Abszisse ist die Inkubationsdauer, auf der Ordinate der mittlere Grauwert der Banden mit einem Molekulargewicht von 50 kD (blau), 40 kD (pink) und 30 kD (grün) aufgetragen.
 A: Dendritische Zellen; B: GM – CSF MØ

stimulierten Makrophagen. Erste Abbauprodukte mit einem Molekulargewicht von 40 kD sind jedoch bereits bei einer Inkubationszeit der Zellen mit dem FITC-OVA von 15 min nachweisbar. Das 40 kD Fragment wird mit zunehmender Inkubationszeit stärker und erreicht ein Maximum an Intensität nach einer einstündigen Inkubation. Danach

nimmt die Intensität der 40 kD Bande wieder ab. Ein Fragment mit einem Molekulargewicht von 30 kD ist nach fünfzehn Minuten nachweisbar. Auch dieses nimmt an Intensität mit zunehmender Inkubationsdauer zu. Das Maximum wird nach zwei Stunden erreicht, danach nimmt die Intensität der Bande wieder ab (Abb. 23 A).

Die MHC Klasse II – negative Restpopulation nach der Magnetbeadseparation, die hauptsächlich aus Makrophagen und Granulozyten besteht, zeigt ein Abbauprofil ähnlich den unstimulierten Makrophagen. Obwohl hier gegenüber den DC's die doppelte Zellzahl eingesetzt wurde, zeigen sich keinerlei Unterschiede in der Intensität der Signale. Das 40 kD Fragment ist ebenfalls nach 15 min nachweisbar, zeigt jedoch bereits nach einer Stunde das Intensitätsmaximum und nimmt mit weiterer Inkubationsdauer wieder ab. Das Maximum an Intensität wird nach vier Stunden erreicht. Die gleiche Kinetik zeigt auch das Fragment mit einem Molekulargewicht von 30 kD. Dieses ist schwächer als das 40 kD – Fragment (Abb. 23 B).

Beiden Versuchen ist gemein, dass die Fragmente nur schwach nachgewiesen werden konnten. Trotz halber Zellzahl zeigen sich die DC's hinsichtlich der Prozessierungsleistung den Makrophagen gleichwertig. Fragmente mit niedrigeren Molekulargewichten konnten aufgrund des steigenden Hintergrunds nicht nachgewiesen werden.

3.1.14 Edmann – Sequenzierung der aus MØ isolierten Fragmente von FITC-OVA

Um weitere Informationen über die an der Prozessierung beteiligten Proteinasen zu gewinnen, wurden mehrere 24-well Platten mit ausplattierten Makrophagen nach dem Standardprotokoll für 4h mit FITC – OVA inkubiert. Nach der Solubilisierung der Zellen wurde das Solubilisat abgezogen, vereinigt und mittels einer *Centricon* mit einem Ausschlussvolumen von 10 kD aufkonzentriert und auf einem präparativen Polyacrylamid - Gel aufgetrennt. Nach Blotten der Proteine auf eine Sequenziermembran und wurde das 40 kD FITC-OVA Fragment von Hr. Prof. Meyer, Inst. f. Physiol. in Bochum nach dem Edmann – Verfahren N - terminal ansequenziert. Aufgrund der hohen Salzkonzentration nach der Ankonzentrierung konnten die Banden nur schlecht voneinander getrennt werden und liegen enger beieinander (Abb. 24).

Die N - terminale Aminosäuresequenz der Bande mit einem Molekulargewicht von 40 kD konnte mittels einer Edmann - Poolsequenzierung bestimmt werden. Es konnten für

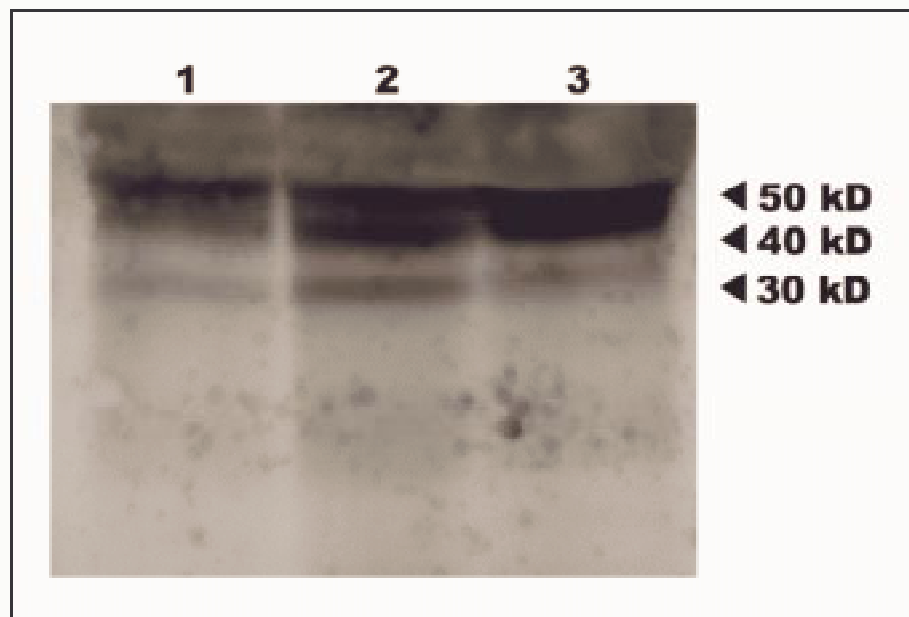


Abb. 24 Sequenziermembran der in vivo Prozessierung von FITC-OVA
KM-Zellen wurden für 11 Tage in der Gegenwart von M-CSF kultiviert. An Tag 10 wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in 24 Well-Platten umgesetzt. Die Antigengabe von $25 \mu\text{g}$ FITC-OVA pro Well erfolgte für 4h. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsolubilisierung in den Platten durchgeführt. Die Solubilisate $2,4 \times 10^7$ KMMØ wurden vereinigt und aufkonzentriert. Das Solubilisat wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Sequenziermembran geblottet. Der Nachweis der Fragmente erfolgte durch Fluoreszenzaktivierung, die Signale wurden mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet. 1: $250 \mu\text{l}$ Solubilisat, 2: $500 \mu\text{l}$ Solubilisat, 3: $750 \mu\text{l}$ Solubilisat

neun Positionen Aminosäuren bestimmt werden, jedoch nicht für die erste Position. An der Position zwei konnten sechs Aminosäuren einwandfrei identifiziert werden, an der Position vier konnten fünf bestimmt werden. Ab der Position sechs konnten maximal drei Aminosäuren bestimmt werden. In der Tab. 13 sind die sequenzierten Aminosäuren wiedergegeben.

<i>Position</i>	<i>Aminosäure</i>
1	
2	LYS, VAL, GLN, ARG, ASN, PRO
3	VAL, LEU, PHE
4	ALA, TYR, LYS, SER, GLN
5	GLU, ASP, LEU, ILE
6	LEU, PHE
7	LEU, ALA, GLY
8	LYS, ILE
9	ASN, HIS
10	TYR

Tab. 13 Poolsequenzierung der 40 kD – Bande

Ausgehend von den Sequenzdaten konnte innerhalb der Ovalbumin ein eindeutiges Fragment identifiziert werden, das eine Länge von neun Aminosäuren hat. Eine Suche mittels des FASTA - Algorithmus in den gängigen SRS - Protein Datenbanken mit diesem Fragment ergaben, dass es eindeutig der Ovalbuminsequenz zugeordnet werden kann. Weitere Treffer der FASTA - Suche wurden nur in Prokaryonten gefunden.

ASP₁₃-VAL₁₄-PHE₁₅-LYS₁₆-GLU₁₇-LEU₁₈-LYS₁₉-VAL₂₀-HIS₂₁-HIS₂₂

Abb. 25 Ergebnis der Edmann - Sequenzierung

Insgesamt konnten sechs Aminosäuren über eine Sequenzlänge von zehn Aminosäuren durch die Poolsequenzierung bestimmt werden. Ausgehend von dieser Sequenzinformation wurde versucht, die Schnittstelle den bekannten endo- / lysosomalen Proteinase zuzuordnen, soweit deren Sequenzspezifität ermittelt wurde. Die Tab. 12 gibt die Sub-

Positionen	<i>Substratspezifität</i>										
	P4	—	P3	—	P2	—	P1	— —	P1'	—	P2'
OVA-Sequenz	GLU	—	PHE	—	CYS	—	PHE	—	ASP	—	VAL
Kathepsin D	XX	—	XX	—	HP	—	HP	—	HP	—	CH
Kathepsin E	PRO	—	XX	—	XX	—	HP	—	HP	—	XX
Kathepsin L	XX	—	XX	—	HP	—	XX	—	XX	—	XX
Kathepsin S	XX	—	XX	—	HP	—	XX	—	XX	—	XX

Tab. 14 Substratspezifität von endo-/lysosomalen Proteinase

P ist die Aminosäureposition relativ zur Schnittstelle, die zwischen P1-P1'liegt. HP = hydrophobe Aminosäuren, CH = geladene Aminosäuren. Kathepsin D und L haben an der Position P2 eine Präferenz für Leucin oder aromatische Aminosäuren. Kathepsin S zeigt an der Position P2 eine Spezifität für verzweigte aliphatische Aminosäuren und Methionin.

stratspezifität von bekannten endo- / lysosomalen Endoproteinase wieder [129]. Die Sequenz zeigt jedoch keine Übereinstimmung zu Substraterkennungs- - Sequenzen von bekannten Proteinase. Es kann aufgrund des Sequenzmusters davon ausgegangen werden, dass eine andere als die oben aufgeführten Proteinase für den Schnitt verantwortlich ist.

Das Molekulargewicht des FITC-OVA nach dem ersten Schnitt ergibt ein Fragment mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kD. Da außer dem N-Terminus keine FITC - Koppelungsstellen abgespalten werden, müsste das Molekulargewicht des Fragmentes ca. 46 kD betragen. Da in der SDS - PAGE ein Molekulargewicht von 40 kD ermittelt wurde, ist ein weiterer Schnitt bei einer Aminosäure - Position um 300 zu erwarten. In diesem Se-

quenzbereich sind nur wenige Lysine vorhanden, so dass sich damit der fehlende Nachweis dieses Fragmentes erklären ließe.

Um die strukturelle Lage der ermittelten Schnittstelle innerhalb der Ovalbuminstruktur zu ermitteln, wurden die Aminosäuren mittels des Computerprogramms Rasmol gekennzeichnet. Dabei zeigte sich, dass die Schnittstelle innerhalb einer α - Helix liegt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Schnittstelle an der Oberfläche des Proteins liegt und gut zugänglich ist (Abb. 26).

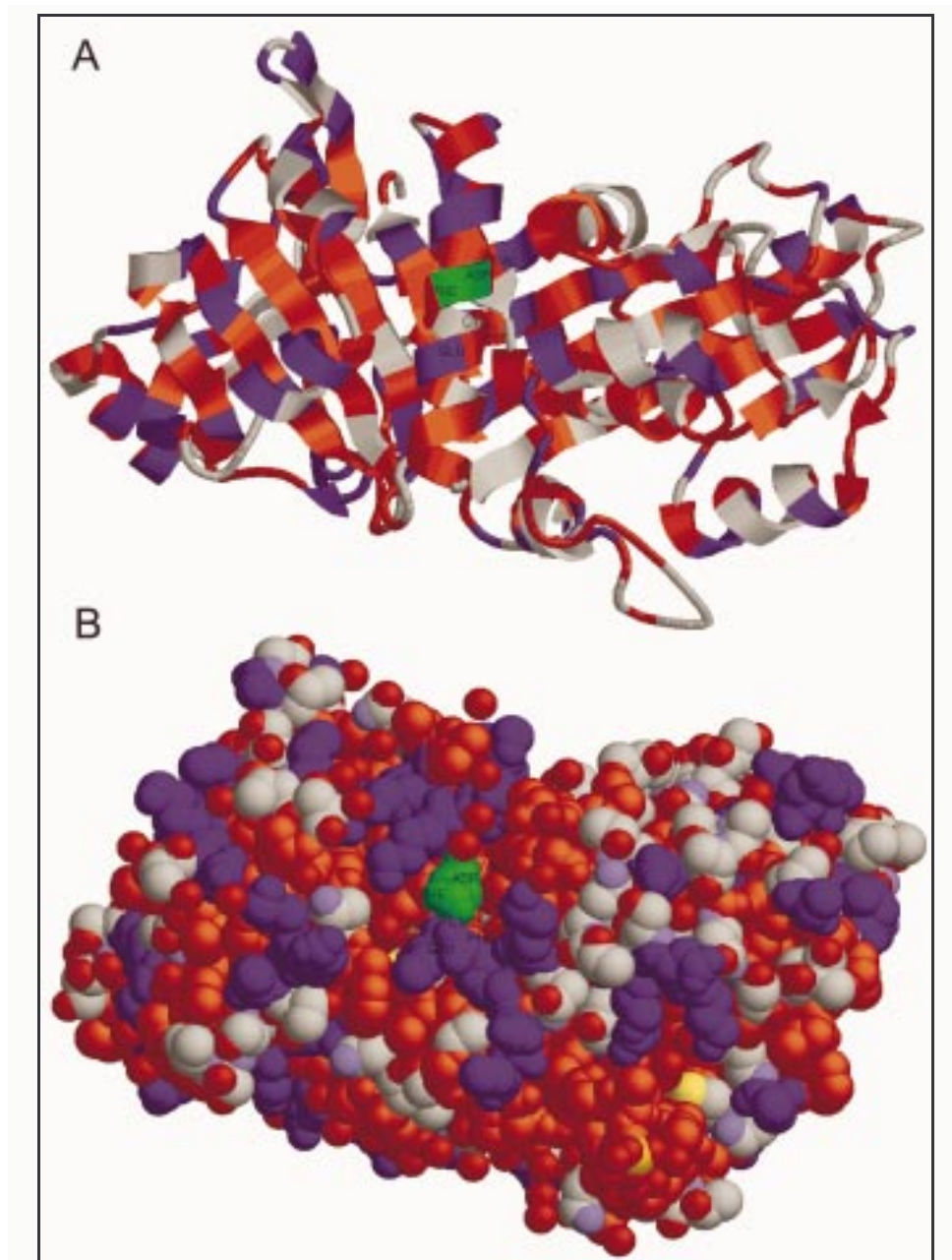


Abb. 26 Lage der Schnittstelle in der Ovalbumin – Struktur
Hydrophobe Aminosäuren sind rot, geladene Blau eingefärbt. Die P1'- Position ist grün markiert.

A: Sekundärstruktur-Darstellung des Ovalbumin-Moleküles. B: Spacefill-Darstellung

3.2 Biophysikalisch – theoretische Untersuchungen

Um mechanistische Aussagen über die Vorgänge der Antigen - Beladung bei MHC Klasse II - Molekülen vorhersagen zu können, ist es nötig, Einblicke in die räumliche Struktur der beteiligten Moleküle zu gewinnen. Während von humanen und murinen Klasse II - Molekülen 3D-Molekülstrukturen durch Röntgenstrukturanalyse ermittelt wurden (Tab.

15), liegen von Ratten MHC Klasse II- und DM-Molekülen keinerlei Strukturdaten vor. Die Ermittlung von Röntgenstrukturdaten erfordert einen hohen experimentellen Aufwand, und ist vor allem von guten Kristallen der zu untersuchenden Moleküle abhängig. Hierfür werden erhebliche Mengen an reinstem Protein benötigt. In dieser Arbeit wurde ein anderer Ansatz zur Gewinnung von Strukturinformationen der an der Antigenpräsentation beteiligten MHC Klasse II - Proteine gewählt. Da die beteiligten Moleküle Spezies übergreifend sowohl über eine hohe Sequenz- als auch Strukturhomologie verfügen, ist es möglich, mittels des komparativen *Molecular Modelling* Strukturinformationen zu errechnen.

Die komparative Proteinstruktur - Modellierung nutzt experimentell ermittelte Strukturinformationen anderer Proteine mit ähnlicher Aminosäure - Sequenz. Dies ist möglich, da kleine Änderungen in der Proteinsequenz in den meisten Fällen nur zu geringfügigen Strukturänderungen führen [130].

<i>PDB-Code</i>	<i>Molekül</i>	<i>Organismus</i>	<i>Auflösung</i>	<i>Dimere</i>	<i>Ref.</i>
1DLH	HLA-DR1	Human	2,80 Å	2	[131]
1SEB	HLA-DR1	Human	2,70 Å	2	[132]
1AQD	HLA-DR1	Human	2,45 Å	4	[133]
1A6A	HLA-DR3	Human	2,75 Å	1	[134]
2SEB	HLA-DR4	Human	2,50 Å	1	[135]
1IAO	H2-I-A ^d	Murin	2,60 Å	1	[136]
2IAD	H2-I-A ^d	Murin	2,40 Å	1	[136]
1IAK	H2-I-A ^k	Murin	1,90 Å	1	[137]
1IEA	H2-I-E ^k	Murin	2,30 Å	1	[138]
1IEB	H2-I-E ^k	Murin	2,70 Å	1	[138]

Tab. 15 Übersicht der Template – Strukturen

Die Qualität der durch komparative Modellierung erhaltenen Proteinmodelle liegt deutlich über der durch andere Methoden errechneten Strukturen. Die erhaltenen Strukturen zeigen eine Standardabweichung von 1Å für Sequenzen, die über hohe Homologien zu bekannten Strukturen verfügen [139]. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist eine genaue Kenntnis der Referenzstrukturen (Templates) unabdingbar.

3.2.1 Struktur der kristallisierten MHC Klasse II und DM-Moleküle

MHC Klasse II- und DM Röntgen - Strukturdaten liegen sowohl von humanen als auch von murinen Molekülen in unterschiedlichen Auflösungen vor. Einen Überblick über die vorhandenen Strukturen gibt Tab. 15

<i>Kette</i>	<i>Länge</i>	<i>Typ</i>	<i>Aminosäuren</i>	<i>Kette</i>	<i>Länge</i>	<i>Typ</i>	<i>Aminosäurem</i>
α	5	α - Helix	46 - 50	β	12	α - Helix	52 - 63
α	21	α - Helix	56 - 76	β	13	α - Helix	65 - 77
				β	8	α - Helix	79 - 86
α	11	β - Faltblatt	5 - 15	β	12	β - Faltblatt	7 - 18
α	9	β - Faltblatt	19 - 27	β	11	β - Faltblatt	23 - 33
α	7	β - Faltblatt	29 - 35	β	8	β - Faltblatt	35 - 42
α	6	β - Faltblatt	39 - 44	β	6	β - Faltblatt	45 - 50
α	7	β - Faltblatt	88 - 94	β	7	β - Faltblatt	98 - 104
α	11	β - Faltblatt	103 - 113	β	10	β - Faltblatt	113 - 122
α	8	β - Faltblatt	133 - 140	β	4	β - Faltblatt	141 - 144
α	10	β - Faltblatt	144 - 153	β	10	β - Faltblatt	154 - 163
α	7	β - Faltblatt	118 - 124	β	7	β - Faltblatt	128 - 134
α	7	β - Faltblatt	160 - 166	β	8	β - Faltblatt	169 - 176
α	5	β - Faltblatt	174 - 178	β	7	β - Faltblatt	184 - 190

Tab. 16 Konsensus - Lage der Sekundärstrukturen von MHC Klasse II

Um die Zahl der Randbedingungen für das Molecular Modelling zu erhöhen, wurden die Sekundärstrukturen der vorhandenen Strukturen untersucht. Bei den in der PDB abgelegten Strukturen sind die Sekundärstrukturen mit dem DSSP - Algorithmus ermittelt worden [140]. Dieser effiziente Algorithmus ermittelt α - Helix und β - Faltblattstrukturen anhand der Wasserstoffbrückenbindungen, welche für die jeweilige Struktur eine charakteristische Anordnung haben. Die Tab. 16 zeigt die Verteilung der α - Helices in den durch Röntgenstrukturanalyse ermittelten MHC Klasse II Strukturen. Der Vergleich aller Strukturen zeigt, dass die α - Kette des Klasse II - Moleküls über zwei, die β - Kette über drei charakteristische Helices verfügt. Abweichungen in der Länge der einzelnen Helices und deren Anzahl ist auf die unterschiedlichen Auflösungen der Röntgenstrukturen zurückzuführen. Für die α - Kette ergeben sich folgende beiden Helices: α 46-50 mit einer Länge von 5 AS und α 56-76 mit einer Länge von 21 AS. Die β - Kette zeigt drei Helices mit Längen von 12, 13 und 8 AS : β 52-63, β 65-77 und β 79-86. Die Helix der β - Kette wird häufig auch als eine einzige, durchgängige Helix angesehen [132]. Diese Helices sind am Aufbau der „Seitentaschen,, der Peptidbindungsgrube beteiligt. Die Faltblattstrukturen lassen sich dagegen in zwei Gruppen einteilen: Eine Gruppe ist am Aufbau des „Bodens,, der Peptidbindungsgrube beteiligt, die andere bildet die Immunglobulindomäne aus. Die Faltung der Immunglobulindomäne ist familienspezifisch und nicht auf die MHC Klasse II - Moleküle beschränkt. Alle Faltblattstrukturen sind vom antiparallelen Typ. Die Tab.

16 gibt einen Überblick über die Lage der β - Faltblattstrukturen in den bekannten MHC Klasse II - Molekülen. Sowohl in der α - als auch in der β - Kette kommen drei Gruppen von antiparallelen Faltblättern vor. Jede dieser Gruppe besteht aus drei bis vier einzelnen Faltblättern. Abweichungen in der Anzahl zwischen den einzelnen Molekülen sind in der unterschiedlichen Auflösung der einzelnen Moleküle und dem äußerst exakten Algorithmus begründet. Für die Bindungsgrube findet sich eine Gruppe von AS α 5-15, α 19-27, α 29-35 und α 39-44 für die α -Kette, sowie β 7-18, β 23-33, β 35-42 und β 45-50 für die β -Kette. Für die Immunglobulindomäne finden sich folgende beiden Paarungen: α 88-94, α 103-113, α 133-140, α 144-153 sowie α 118-124, α 160-166, α 174-178 für die α -Kette und β 98-104, β 113-122, β 141-144, β 154-163 sowie β 128-134, β 169-176, β 184-190 für die β -Kette. Die Zahl der Randbedingungen läßt sich weiter erhöhen, indem die Lage der Cis - Peptide und der Disulfid - Brücken explizit angegeben werden. So gibt es für die α -Kette eine, für die β -Kette zwei typische Disulfid - Brücken. Eine Disulfid - Brücke ist typisch für die Immunglobulindomäne, die zweite Brücke der β - Kette liegt in der Bindungsgrube. Die nachfolgende Tab. 17 zeigt die Lage der Bindungen in allen MHC Klasse II - Strukturen. Die Lage ist in allen bekannten Strukturen, sowohl in hu-

	$\alpha 1$	$\beta 1$	$\beta 2$
Bindung	CYS107-CYS163	CYS15-CYS79	CYS117-CYS173

Tab. 17 Lage der Disulfid-Brücken in MHC Klasse II Strukturen

manen als auch in murinen, hochkonserviert.

Ein weiteres, strukturell wichtiges Merkmal ist die Lage der Cis - Peptide. Im Normalfall stehen die Aminosäurereste in trans - Position zueinander, da dies die energetisch günstigere Position ist. Ausnahmen von dieser Regel stellen häufig AS - Prolin Peptidbindungen dar. Hier ist die Cis - Stellung aufgrund der eingeschränkten Drehwinkel häufig die energetisch begünstigte Position. Auch die Lage der Cis - Peptide ist in den MHC Klasse II - Molekülen hoch konserviert. Die Tab. 18 listet die Position der Cis - Peptide in allen Strukturen auf. Ausnahmen ist die erste Cis - Peptid Bindung an der Position AS 15-16 : Bei der HLA-DR3-Struktur ist an der Position 16 kein Prolin vorhanden. Bei den beiden Maus Molekülen H2-I-A^d bildet sich an der Position AS 15-16 kein Cis - Prolin aus.

	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\beta 1$
Bindung	15-16	113-114	123-124

Tab. 18 Lage der Cis-Peptide in MHC Klasse II Molekülen

3.2.1.1 Topologiediagramm des MHC Klasse II Molekül

Ausgehend von den Strukturdaten der Klasse II Moleküle konnten Topologie - Diagramme für die α - und β - Kette aufgestellt werden. Diese Topologie -Diagramme geben die Randbedingungen für das komparative Modellierung der RT1B und RT1D - Moleküle graphisch wieder.

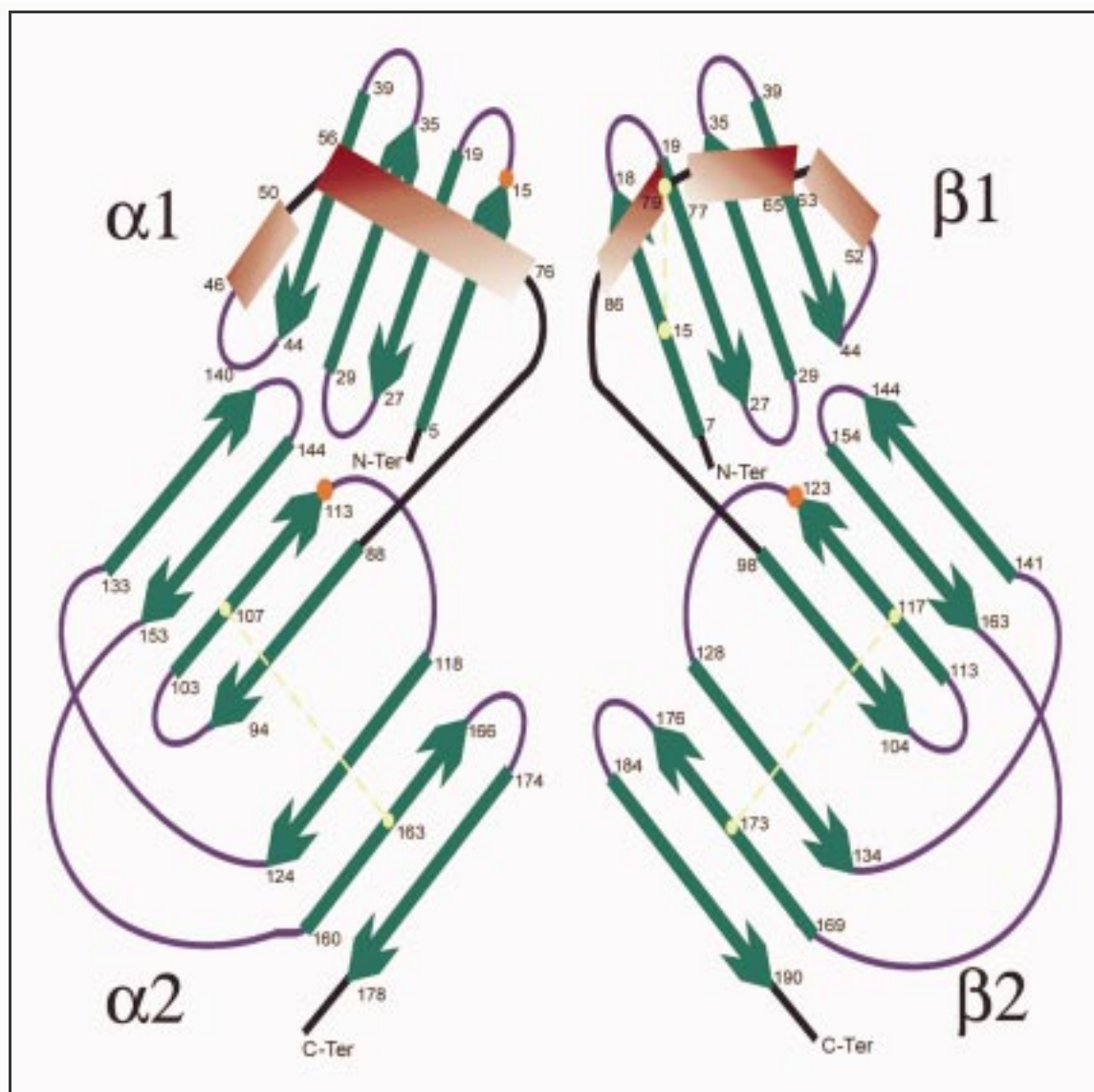


Abb. 27 Topologiediagramm der MHC Klasse II Moleküle

Dargestellt ist die 2D-Darstellung der Sekundärstrukturen innerhalb der MHC Klasse II – Moleküle.

Cis-Peptide sind durch rote Punkte, α -Helices durch braune Rechtecke, β -Faltblätter durch grüne Pfeile und Loops sind blau dargestellt. Es sind die durchschnittlichen Positionen der Sekundärstrukturen dargestellt.

Die Abb. 27 zeigt das Topologie - Diagramm, welches den Durchschnitt der MHC Klasse II - Strukturdaten wiedergibt. Anhand des Topologiediagramms ist die Lage der Sekundärstrukturen zueinander leicht erkennbar. So zeigen die Immunglobulindomänen $\alpha 2$ und $\beta 2$ die typische Ineinander - Schachtelung der Faltblätter, die zusätzlich durch eine

Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. In der β 1-Domäne ist die Lage der Disulfidbrücke leicht zu erkennen, die das erste β -Faltblatt mit der dritten α -Helix verbindet. Ebenso ist leicht ersichtlich, dass die Cis - Peptide an den Enden von Sekundärstrukturen lokalisiert sind.

3.2.1.2 Sequenzvergleich der aufgelösten Strukturen mit RT1B – Sequenzen

Die Qualität des durch komparatives *Molecular Modelling* erzeugten Molekülmodells ist in erster Linie von den verwendeten Templates und deren Alignment mit der Zielsequenz abhängig. Um für das RT1B- und RT1D-Allel die jeweilig günstigsten Template - Strukturen auswählen zu können, wurden zuerst alle Sequenzen miteinander aligned. Die Abb. 28 zeigt eine graphische Repräsentation des Alignments in Form eines Stammbaumes.

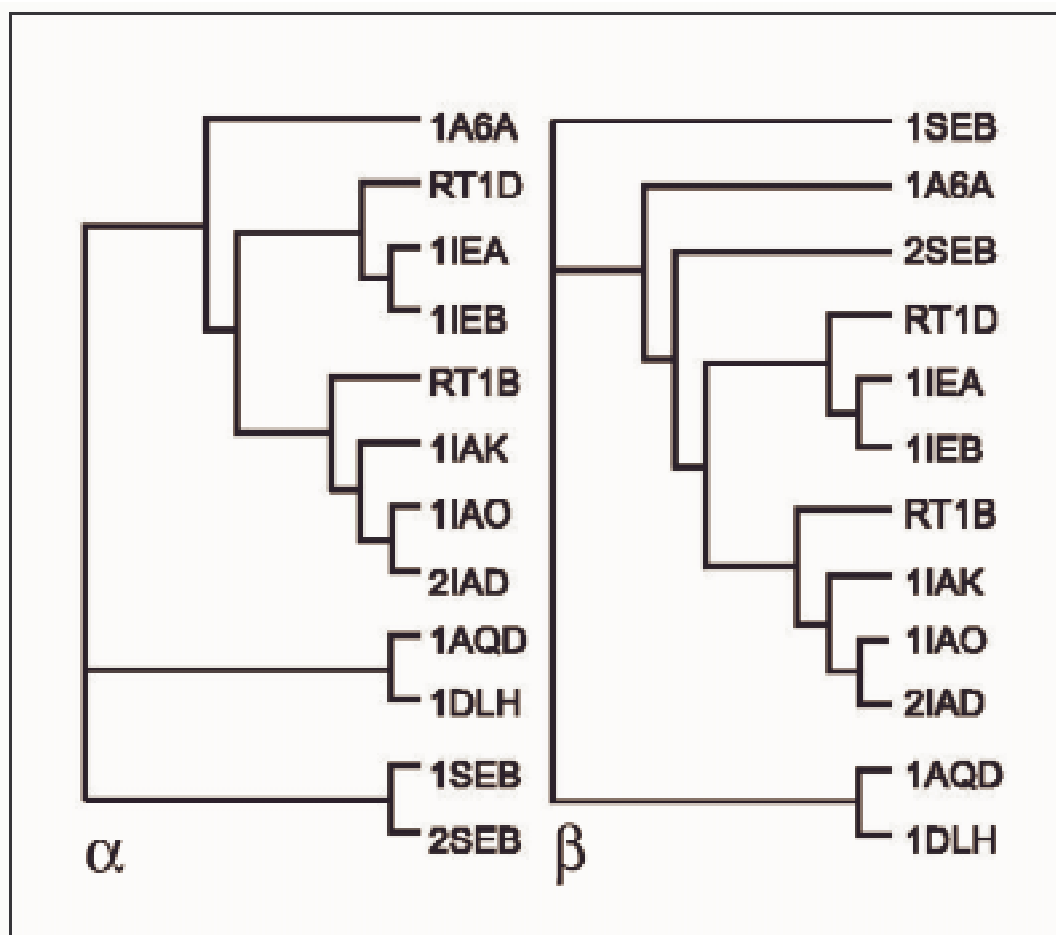


Abb. 28 Sequenzvergleich der Template- und Target- Strukturen

Ausgehend vom ClustalX-Alignment wurden je ein Stammbaum für die α - und die β -Kette der MHC Klasse II-Moleküle aufgezeichnet. Die Stammbäume geben die relative Ähnlichkeit der Sequenzen wieder. Es sind die PDB-Codes der Templates angegeben.

Auffällig ist, dass sich die Stammbäume für die α - und die β - Kette voneinander unterscheiden. Bei beiden Ratten Komplexen RT1B und RT1D ist jedoch die Ähnlichkeit zu den Maus - Komplexen H2 I-A bzw. H2 I-E deutlich zu erkennen. Grundlage für das Alignment waren die folgenden Lewis Ratten - Sequenzen aus den Datenbanken: RT1Ba : Pir S04363 [141], RT1Bb : Pir S16999 [142], RT1Da : TREMBL RNAJ2998_1 [143] und RT1Db : Pir S10989 [144].

In der Abb. 29 ist das Alignment der α - Kette wiedergegeben. Deutlich ist die hohe An-

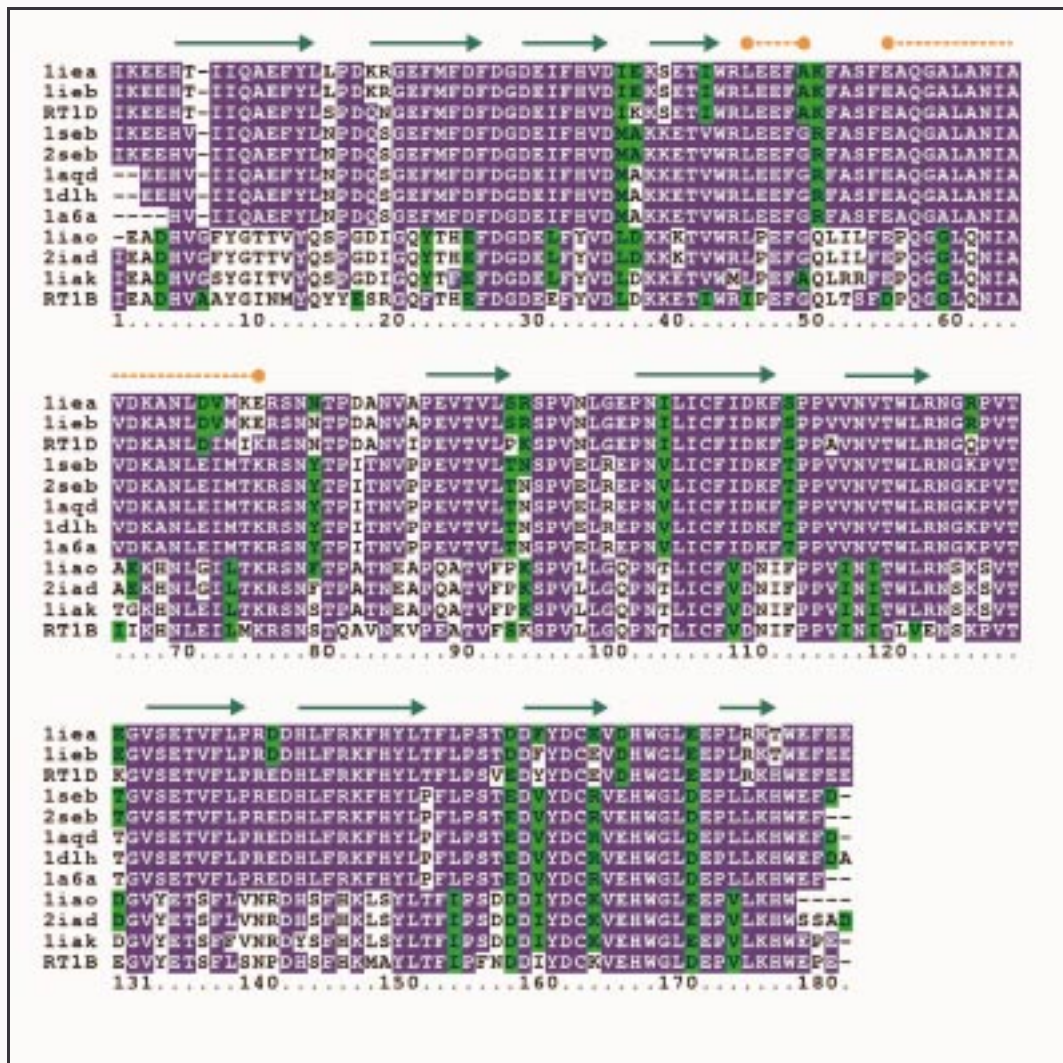


Abb. 29 Sequenzalignment der Template MHC Klasse II α -Ketten mit dem löslichen Anteil der Lewis RT1.BI bzw. RT1.DI Sequenz

Das Alignment wurde mit ClustalX erstellt. Blau gekennzeichnete AS geben identische Bereiche wieder, grün homologe Bereiche. Grüne Pfeile symbolisieren Blattstrukturen, orange Helices.

zahl an identischen Aminosäuren zu erkennen. Der große Teil der polymorphen Aminosäuren ist in den Loop - Bereichen lokalisiert, während die konservierten Aminosäuren in den Sekundärstruktur-Bereichen liegen. Die Immunglobulindomäne ab AS 88 zeigt einen höheren Anteil an identischen Aminosäuren als die Bindungsgrube. Die dennoch

hohe Homologie in der Bindungsgruben - Domäne ist auf den limitierten Polymorphismus der α -Kette zurückzuführen. Starke Unterschiede zeigen sich in den murinen I-E und Ratten RT1D und zu den murinen I-A und Ratten RT1B -Sequenzen an den Aminosäurepositionen 2-25. Hier sind die Sequenzen der ersten Gruppe zueinander sehr ähnlich, unterscheiden sich aber deutlich von denen der zweiten Gruppe. Dies ist auf die unterschiedlichen Isotypen zurückzuführen. HLA-DR, I-E und RT1D stellen den einen, HLA-DQ, I-A und RT1B den anderen Isotyp dar

In einem weiteren Alignment wurden die β - Ketten der MHC Klasse II - Moleküle miteinander verglichen. Wie der Stammbaum der Sequenzen bereits andeutet, gibt es im Vergleich zu den α - Ketten Unterschiede in den Ähnlichkeiten der Sequenzen zueinander. Die Abb. 30 zeigt das Alignment der MHC Klasse II β - Ketten.

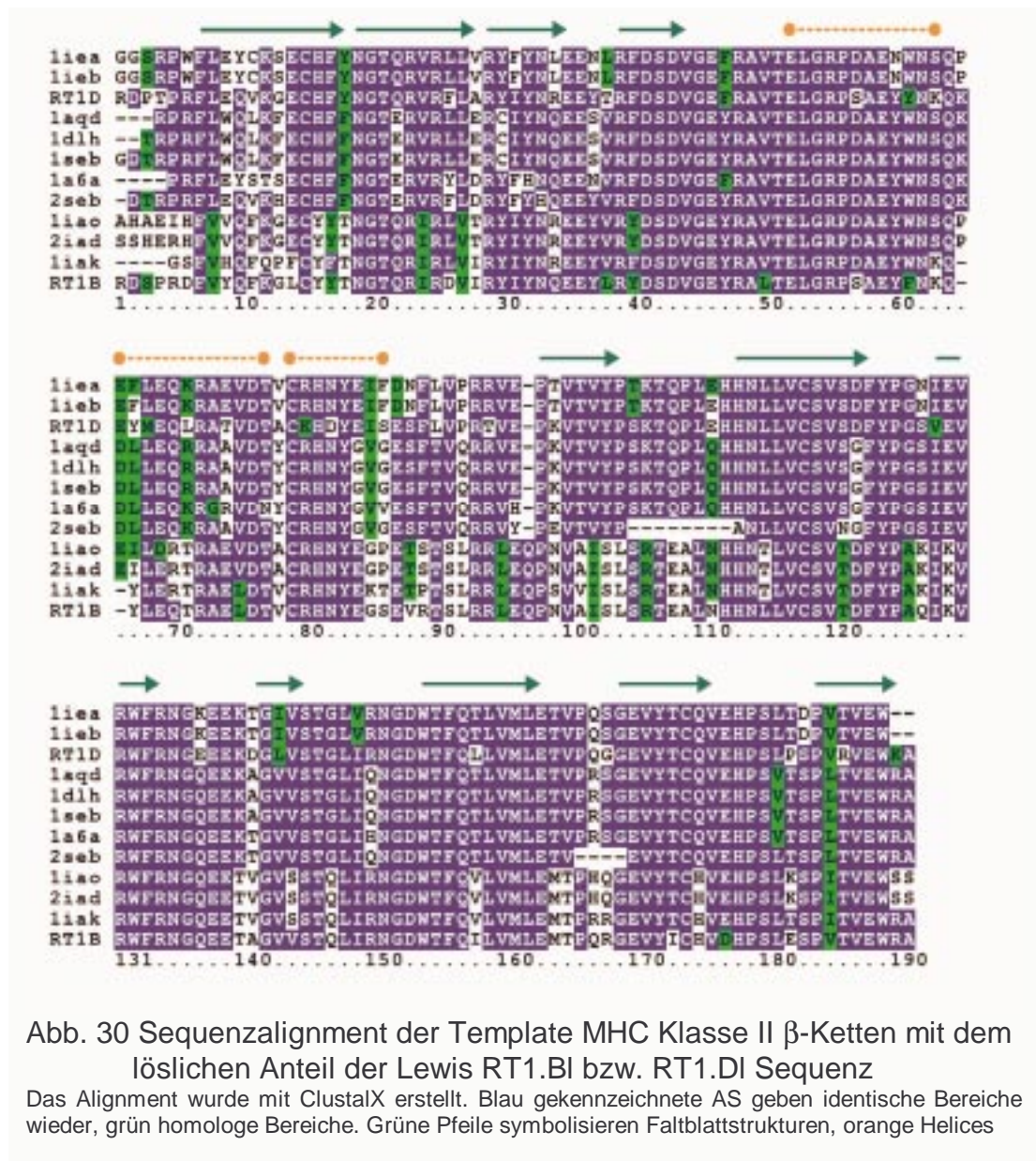


Abb. 30 Sequenzalignment der Template MHC Klasse II β -Ketten mit dem löslichen Anteil der Lewis RT1.BI bzw. RT1.DI Sequenz

Das Alignment wurde mit ClustalX erstellt. Blau gekennzeichnete AS geben identische Bereiche wieder, grün homologe Bereiche. Grüne Pfeile symbolisieren Blattstrukturen, orange Helices

Auch bei der β - Kette ist die Immunglobulindomäne stark konserviert. Die Bindungsgrube zeigt starken Polymorphismus, besonders bei den Faltblättern. Die erste Helix ist dagegen stark konserviert. Auffällig sind zwei Deletionen bei H2-I-A- und RT1B-Molekülen. Diese Deletionen liegen in helicalen Bereichen. Besonders auffällig ist der Austausch der AS 61 von Tryptophan zu Phenylalanin. Das Tryptophan 61 zeigt in den aufgelösten Strukturen stets in die Bindungsgrube und geht mit der Imidazol - Gruppe eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Peptid - Backbone ein. Die anderen polymorphen Positionen sind homologe Austausche. Das Alignment der β - Ketten zeigt zudem deutlich die Unterschiede zwischen beiden Allelen sowie die hohe Homologie von RT1.B^l und H2-I-A^k.

Beide Alignments zeigen, dass als Templates für das komparative Modelling des RT1.B-Komplexes nur die murinen H2 -I-A Komplexe in Frage kommen, da es gegenüber den HLA - DR und H2 -I-E Haplotypen Insertionen in der α - und Deletionen in der β - Kette gibt, die in der Bindungsgrube lokalisiert sind.

3.2.2 Komparatives Modelling des RT1.B – Komplexes

Ausgehend vom Alignment der Sequenzen von den Strukturen mit den PDB - Codes 1IAO, 2IAD, 1IAK und der RT1.B^l - Sequenz wurde mit dem Programm Modeller 4 ein komparatives Molecular Modelling durchgeführt. In einer ersten Phase wurden Modelle ohne Optimierungen errechnet, um die Qualität des Alignments zu überprüfen. Die Modelle wurden sowohl durch optische Visualisierungen mit RASMOL als auch mit PROCHECK überprüft. Während dieser Phase wurde das Alignment von Hand angepasst, da das Programm Modeller 4 beide Ketten der Moleküle nur als eine Sequenz mit einem Trennzeichen akzeptiert. Als besonders problematisch erwiesen sich die N- und C - Termini der Sequenzen, da es hier die größten Unterschiede in den Sequenzlängen gibt. Es zeigte sich, dass die Qualität des Molekülmodells entscheidend vom Sequenzalignment abhängt. Besonders empfindlich reagiert der Algorithmus von Modeller 4 auf Insertionen bzw. Deletionen. Dies wurde deutlich, als die Struktur 1DLH (HLA-DR) zusätzlich zum Alignment aufgenommen wurde. Ebenso zeigte sich, dass die errechneten Moleküle eine Verbesserung in der Strukturgeometrie aufwiesen, wenn drei Templates ausgewählt wurden. Nachteilig war jedoch, dass die Rechenzeit mit jedem zusätzlichen Template exponentiell anstieg. Nach der initialen Phase wurden mehrere Modelle mit voller Optimierung gerechnet. Nach Vergleich der stereochemischen Eigenschaften mit PROCHECK

wurde das beste Modell ausgewählt und weiter untersucht. Die Abb. 31 zeigt den Ramachandran - Plot des RT1.B¹ -Modell.

Etwa 90% aller Aminosäuren liegen in energetisch begünstigten Bereichen, 9,4 % der Aminosäuren haben Drehwinkel, die in den sogenannten erweiterten Bereichen liegen. Nur 0,6 % der AS liegen in einer ungünstigen Konformation vor. Nach [120] liegt ein Protein in einer guten stereochemischen Konfiguration vor, wenn mindestens 90% der Ami-

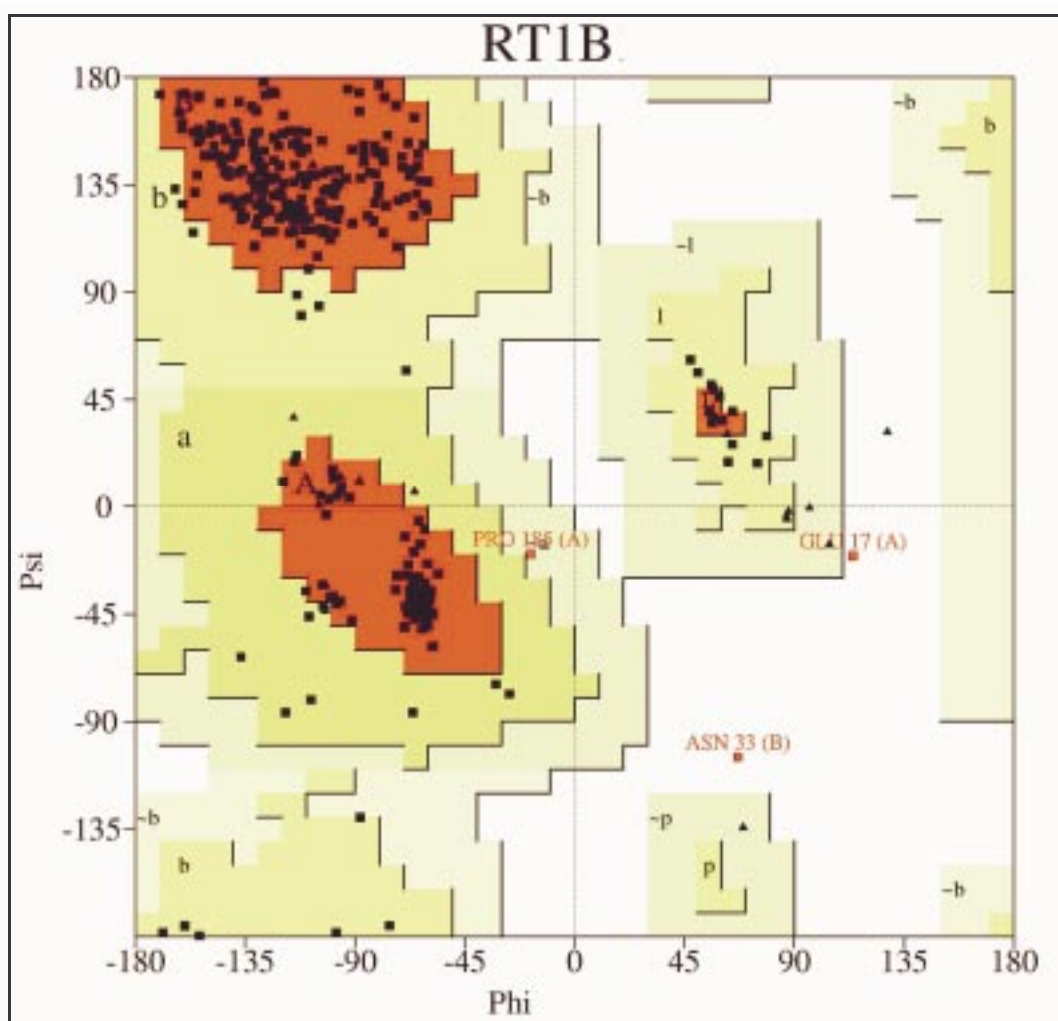


Abb. 31 Ramachandran-Plot des RT1B¹ - Molekülmodells

Der Plot zeigt die ϕ - ψ Winkel aller Aminosäuren des RT1.B-Modells. Die gekennzeichneten AS haben energetisch ungünstige Winkel. Die roten Bereiche geben die energetisch günstigsten Bereiche an. A,B,L: favourisierte Bereiche; a,b,l,p: erweiterte Bereiche, ~a,~b,~l,~p: großzügig erlaubte Bereiche.

nosäuren ϕ - ψ - Drehwinkel in den erlaubten Bereichen haben. Weitere Überprüfungen mit PROCHECK zeigten, dass das Molekülmodell über gute stereochemische und energetische Eigenschaften verfügt.

Die optische Überprüfung der Modellstruktur wurde mit dem Programm MOLSCRIPT vorgenommen. Mit diesem Programm können Sekundärstrukturen optisch aufbereitet werden. Die Lage der Sekundärstrukturen wird durch das Programm nach einem DSSP - ähnlichen Algorithmus automatisch ermittelt. Wie die Abb. 32 zeigt, verfügt das errechnete RT1.B¹ - Molekül über die typische Quartärstruktur der MHC Klasse II Moleküle.

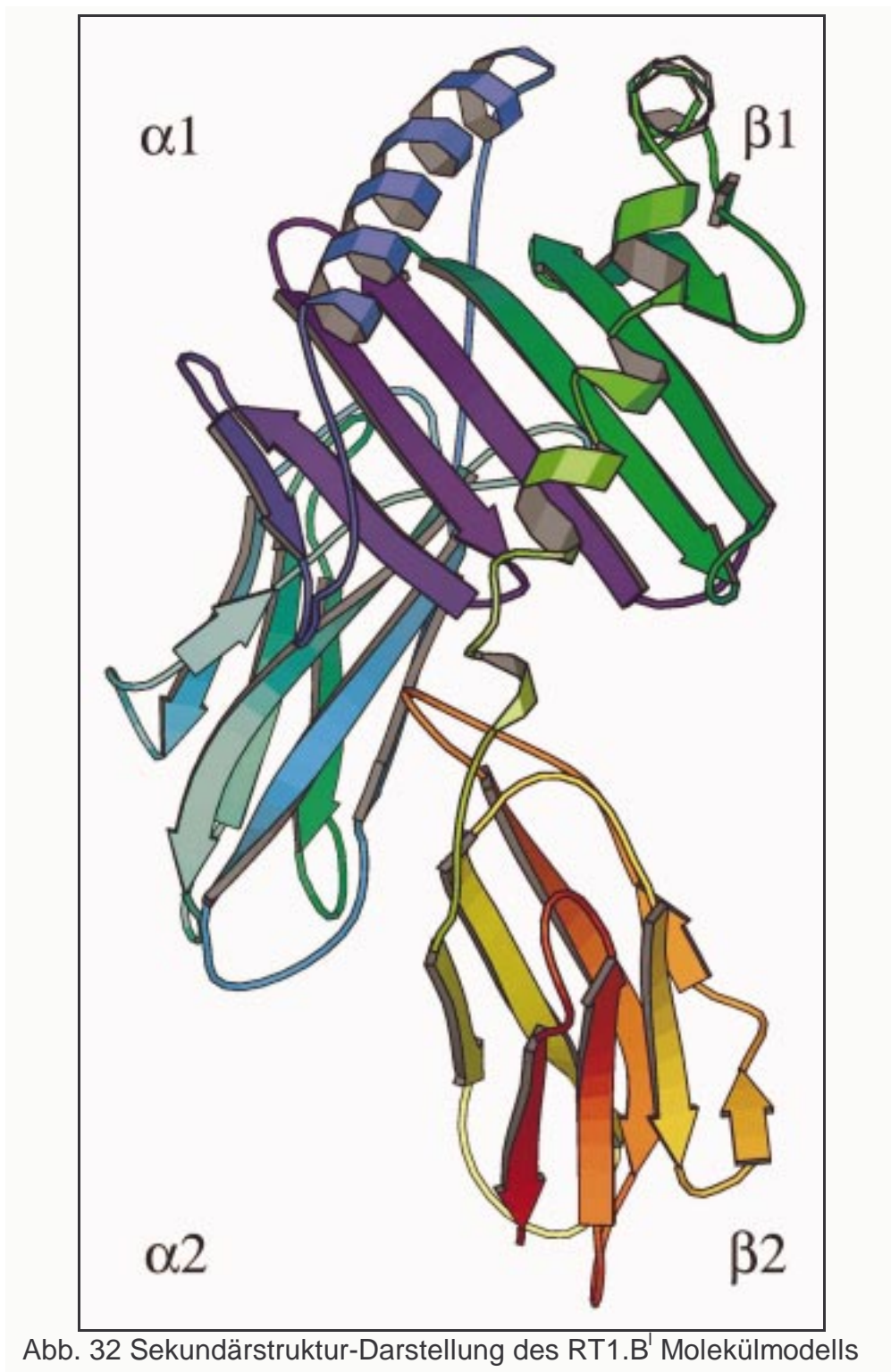


Abb. 32 Sekundärstruktur-Darstellung des RT1.B¹ Molekülmodells

Deutlich ist bei beiden Ketten die Aufteilung in zwei Domänen erkennbar. Die Bindungsgrube wird anteilig von beiden Ketten aus β - Faltblättern als „Boden“ und α - Helices als Seitenwände gebildet. Auffällig ist ferner, dass auch ohne gebundenes Peptid die gleiche Raumstruktur energetisch günstig ist. Die optische Darstellung mit Hilfe von

MOLSCRIPT zeigt, dass das errechnete Molekül über eine hohe strukturelle Homologie zu den aufgelösten MHC Klasse II 3D-Strukturen verfügt.

3.2.2.1 Peptidbindungsgrube des RT1.B^I Moleküls

Ausgehend von diesen Ergebnissen konnte mit der Untersuchung der Bindungsgrube begonnen werden. Hierzu musste zunächst die Nummerierung der Aminosäuren an den durch die 1DLH Struktur vorgegeben Standard angepasst werden. Die PDB - Datei wurde mit Hilfe der CCP4-Programmsuite so angepasst, dass sowohl die Insertion in der α - Kette als auch die beiden Deletionen in der β - Kette berücksichtigt wurden. Ferner wurden die Kettenbezeichner dem Standard angepasst. Die Verteilung der konservierten und polymorphen Aminosäuren bestimmt im wesentlichen den Charakter der Bindungsgrube. So sind in allen bisher aufgelösten Strukturen die konservierten Asparagine 62 und 69 in der $\alpha 1$ - Helix und 82 in der $\beta 1$ - helicalen Region so positioniert, dass ihre γ - Amidgruppe Wasserstoffbrückenbindungen mit der Hauptkette des gebunden Peptides eingeht. Im Gegensatz zu den übrigen Strukturen ist das Tryptophan $\beta 61$ im RT1.B^I Molekül nicht konserviert, sondern gegen ein Phenylalanin ausgetauscht. Da die Imidazol - Stickstoffgruppe somit wegfällt, kann an dieser Position keine Wasserstoffbrücke mit der Peptid - Backbone ausgebildet werden. Etliche Kluster von polymorphen Aminosäuren sind für die Peptid - Spezifität der unterschiedlichen MHC Klasse II Moleküle verantwortlich.

Der erste Cluster (α 31,52; β 86,89,90) ist für die Variabilität der Peptid - Seitenketten-tasche P1 verantwortlich. Hier wird bei RT1.B^I und H2 I-A^{k/d} eine polare Umgebung für die Seitenkette aufgebaut. Drei weitere polymorphe Kluster finden sich drei, fünf und zwischen sieben bis acht AS weiter entlang des gebundenen Peptides. Diese Kluster werden aufgebaut von den Aminosäuren β 13,26,28,71,74,78; α 66, β 9, 11, 30 und β 37, 38, 58. In der Abb. 33 sind die konservierten und polymorphen Aminosäuren, die eine wichtige Rolle bei der Peptidbindung ausüben, in einer Backbone - Darstellung der Bindungsgrube gekennzeichnet. Bei dieser und den folgenden Abbildungen wird von oben auf die Bindungsgrube geblickt. Seitenketten des Peptides, die vom T - Zellrezeptor erkannt werden, sind in Richtung des Betrachters ausgerichtet.

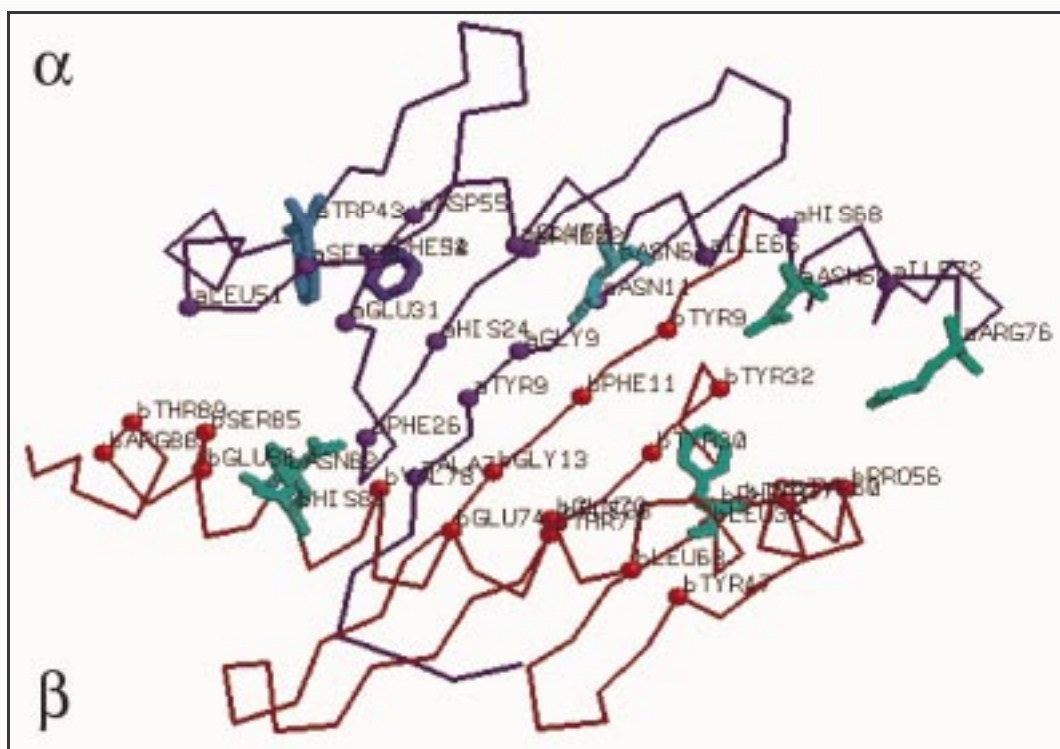


Abb. 33 Bindungsgrube des RT1.B¹ Moleküls in Backbone Darstellung
Dargestellt sind die polymorphen Positionen als farbige Kreise. Die konservierten Positionen sind mit Seitenketten dargestellt.

Um Aussagen über die Beteiligung der α bzw. β Kette an der Ausbildung der Peptid - Bindungstaschen zu treffen, wurde die Fläche berechnet, die dem Lösungsmittel zugänglich ist. Durch die grafische Darstellung dieser Fläche lassen sich die potentiellen Taschen leicht erkennen. Die Abb. 34 zeigt die Beteiligung beider Ketten an der Ausbildung der Taschen.

An der rechten Seite lässt sich eine tiefe Tasche erkennen, die von beiden Ketten ausgebildet wird. Eine sehr große Tasche lässt sich in der Mitte erkennen. Hier passt theoretisch eine Seitenkette quer in die Bindungsgrube. Um jedoch eine Aussage über mögliche Präferenzen für bestimmte Aminosäuren zu ermöglichen, wurden die einzelnen Aminosäuren nach ihren physikochemischen Eigenschaften eingefärbt. Die basischen Aminosäuren Arginin, Histidin und Lysin wurden blau, die sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure rot, die neutralen Aminosäuren grau und die polaren Aminosäuren grün eingefärbt. Anschließend wurde wieder die dem Lösungsmittel zugängliche Fläche errechnet und das Ergebnis in der Abb. 34 grafisch dargestellt

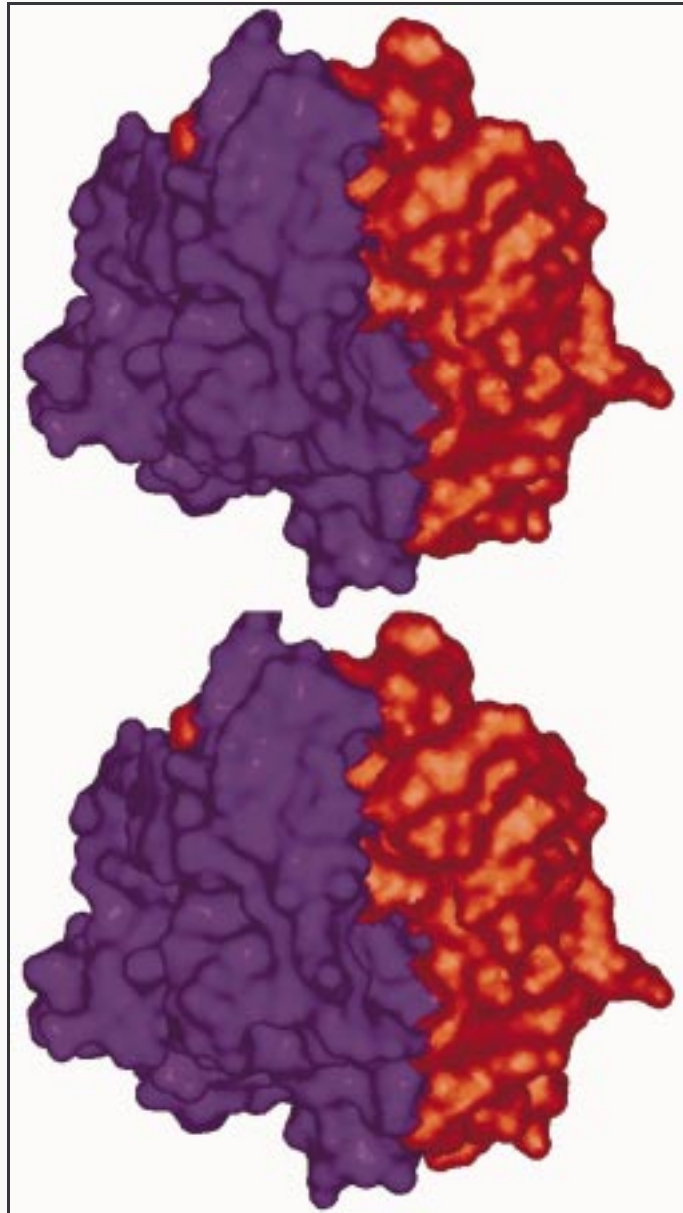


Abb. 34 Solvent-Accessible-Area der Bindungsgrube
Dargestellt ist die dem Lösungsmittel zugängliche Fläche in Stereo - Darstellung.
Blick von oben auf die Bindungsgrube. α - Kette blau, β -Kette rot angefärbt.

Anhand dieser Darstellung läßt sich für die erste Bindungstasche eine Präferenz für große, polare Aminosäuren wie Lysin, Arginin sowie für die sauren Aminosäuren ableiten. Ebenfalls könnte Glycin an der Position P1 binden. Nach der typischen Drehung des Peptides zeigen die Aminosäuren an den Positionen P2 und P3 aus der Bindungsgrube heraus. An der Stelle P4 binden bevorzugt unpolare Aminosäuren. Die Position P5 zeigt wieder Richtung T - Zellrezeptor. An P6 ist eine Tasche für polare Aminosäuren. An

P7 ist keine Präferenz erkennbar. P8 ist wiederum Richtung Rezeptor orientiert. P9 hat Präferenz für kleine Aminosäuren, und an P10 ist eine starke Präferenz für die sauren Aminosäuren vorhanden, die mit der Hauptkette eine Salzbrücke ausbilden können.

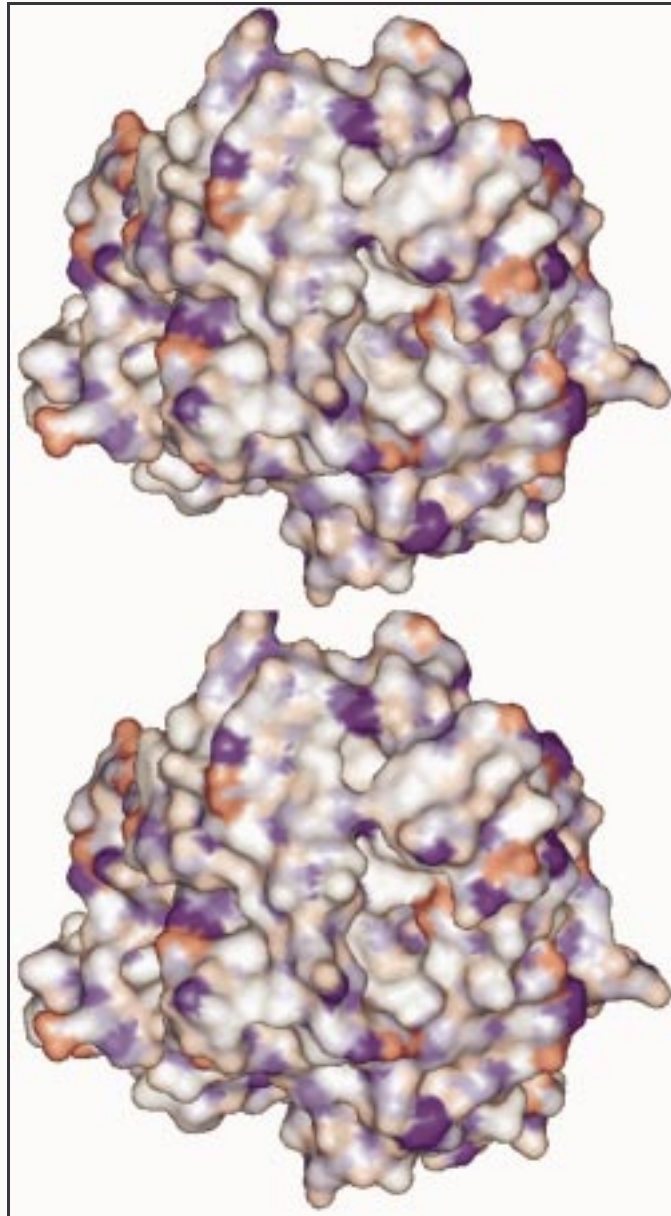


Abb. 35 Darstellung der zugänglichen Fläche in der Bindungsgrube des RT1.B¹-Modells

Dargestellt als stereoptische Abbildung ist die dem Lösungsmittel zugängliche Oberfläche der Bindungsgrube. Die AS sind nach Ladungen eingefärbt: negativ geladene AS blau, positiv geladene AS rot.

3.2.3 *Docking* von Peptiden in die Bindungsgrube des RT1.B^I – Modells

Die Spezifität der Peptid- Bindung an MHC Moleküle ist durch Bindungsmotive definiert. Diese Motive bestehen aus mehreren relativ konservierten Ankerpositionen. Die Identifikation der Peptidbindungsmotive wird erschwert durch Größenheterogenität und degenerierte Aminosäurebenutzung an den Ankerpositionen [145]. Zur Zeit werden verschiedene Ansätze verfolgt, um MHC Klasse II – Motive zu ermitteln: Screening von „random peptide“ Phagenbanken [146], oder Peptidbanken [147], pool [148] und individuelle [149] Sequenzierung von natürlichen MHC Klasse II – Liganden, sowie die extensive Substitutionsanalyse von bekannten antigenen Peptiden [150]. Diese Studien wurden hauptsächlich an humanen HLA – DR und murinen I-E Molekülen durchgeführt. Die hiervon angeleiteten Motive zeigen eine Nonamer – Sequenz mit Ankerpositionen an den Stellen P1, P4, P6 und P9. Dagegen sind die Peptidmotive von vielen anderen MHC Klasse II – Produkten wie die murinen I-A – Moleküle sowie des Ratten MHC nur unzureichend charakterisiert [152]. Das *Molecular Modelling* des Ratten RT1.B^I – Moleküls ergibt eine weitere Methode, das Bindungsverhalten von Peptiden auf molekularer Ebene zu studieren. Zudem sind Analysen von verschiedenen starken Bindern sowie deren Einfluss auf die Konformation der MHC Klasse II – Moleküle möglich. Das genaue Studium der *van der Waals* – Kontakte und der Wasserstoffbrücken – Bindungen zwischen Ligand und Rezeptor ermöglicht die exakte Peptidbindungsspezifität zu ermitteln.

3.2.3.1 *Docking* von Peptiden mit Hilfe von *AutoDock 3*

Das Programm *AutoDock 3* besteht aus einer Vielzahl von Unterprogrammen, um ein automatisiertes *Docking* von Liganden an Rezeptoren zu ermöglichen. Bevor die Simulation gestartet werden kann, müssen die Strukturdateien in das PDBQS – Format konvertiert werden. Hierzu müssen die Wasserstoffatome, Lösungsparameter und partiale Atomladungen zu den Koordinatendateien addiert werden. Zudem müssen die freien Torsionen des Liganden definiert werden. Hierzu stehen Hilfsprogramme zur Verfügung [151]. Nachdem die nötigen Parameterdateien erstellt sind, kann die Simulation gestartet werden. Für das automatisierte *Docking* standen drei verschiedene Algorithmen zur Verfügung.

Die *Metropolis*- oder *Monte Carlo simulated annealing*- Methode ist eine schnelle Technik für die Konfigurationssuche. Hierbei wird der Rezeptor statisch gehalten.

Das Substrat wird nach dem Zufallsprinzip im freien Raum um den Rezeptor bewegt. Bei jedem Simulationsschritt werden beim Liganden die Freiheitsgrade nach dem Zufallsprinzip verändert: Translation des Schwerpunktes, Orientierung sowie Rotation der dihedralen Winkel. Von dieser neuen Konfiguration wird dann die Energie evaluiert und mit den vorhergehenden Schritten verglichen. Ist die Energie niedriger, so wird die neue Konfiguration akzeptiert. Die Akzeptanz von Konfigurationen ist von der Simulationstemperatur abhängig. Je höher sie angesetzt wird, desto mehr Konfigurationen werden akzeptiert. Wichtig für diese Simulationsmethode ist, dass eine initiale Konfiguration gefunden wird. Während dies mit kleinen, zyklischen Substraten wie z.B. dem Trypsin - Inhibitor (1HVR) bei der Trypsin- Struktur schnell gelang, konnte mit dem HEL₅₀₋₆₂ - Peptid und dem I-A^k - Molekül keine solche initiale Konfiguration gefunden werden. Auch Einschränkungen in der Flexibilität des Liganden und Einschränkung der freien Torsionen auch Nicht- Backbone Torsionen brachte keinen Erfolg. Eine Erhöhung der simulierten Annealing - Temperatur auf 2000K führte ebenfalls nicht zu einem positiven Ergebnis. Nach einer erfolglosen Suche nach einer initialen Konfiguration von 96h wurden die Versuche mit dem Metropolis - Algorithmus abgebrochen.

Der *Global - Local - Search* Algorithmus des AutoDock Programms war unter LINUX nicht lauffähig. Dies liegt mit dem enormen Stack - Bedarfs des Algorithmus zusammen. Zudem konnten im Quellcode weitere Speicherzuordnungs - Fehler gefunden werden.

Mit Hilfe des genetischen Algorithmus konnten mehrere Substrat - Ligand Konformationen errechnet werden. Eine genaue Analyse dieser Komplexe zeigte jedoch, dass alle Konformationen nicht dem I-A^k - HEL entsprachen (Abb. 36). Teilweise zeigten die Komplexe auch sterische Hinderungen. Auch hier wurden alle Parameter durchgespielt, es konnte jedoch kein *Docking* des HEL - Peptides in der Bindungsgrube des MHC Klasse II - Moleküls erreicht werden.

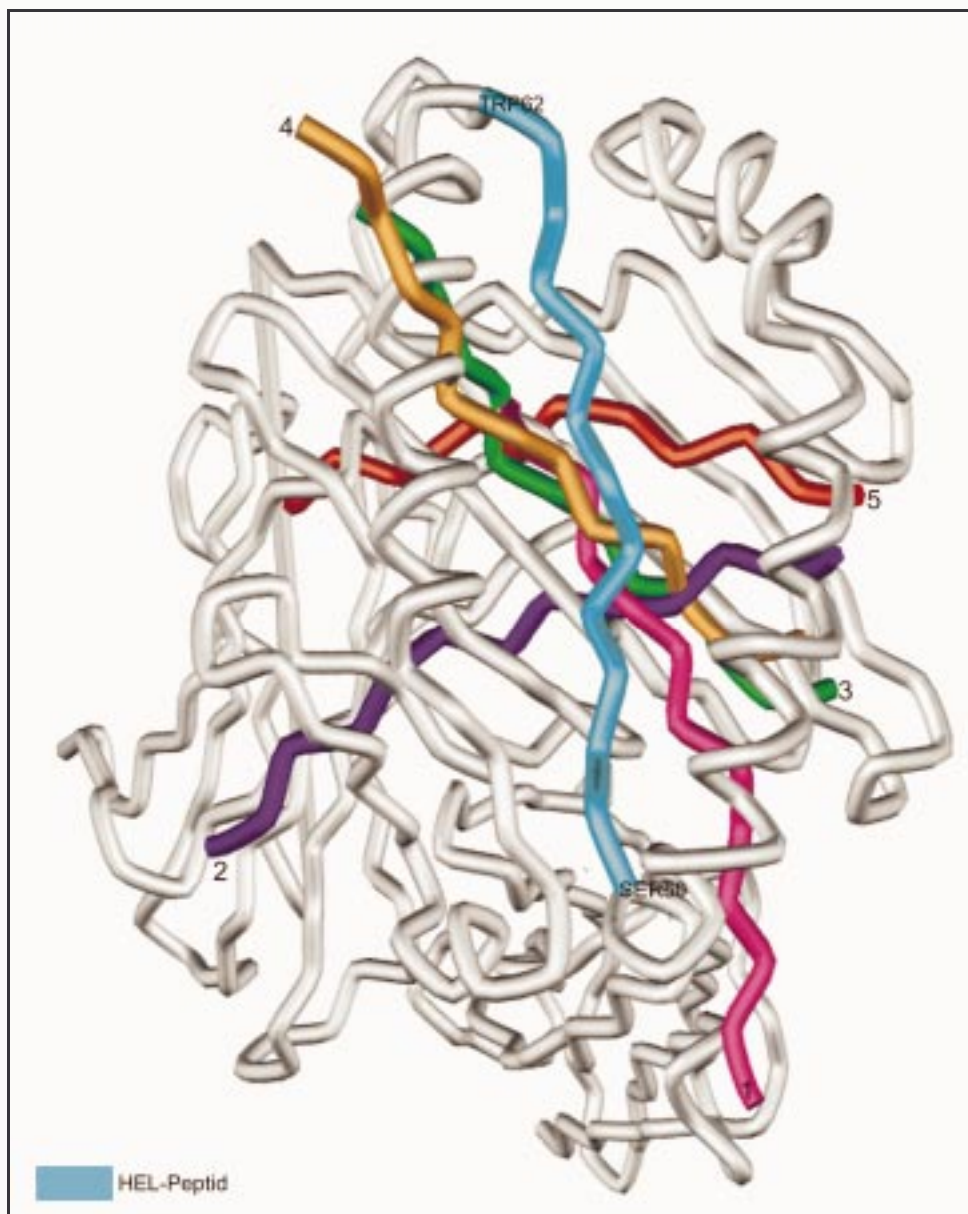


Abb. 36 Ergebnisse des automatischen Dockings HEL₅₀₋₆₂ mit I-A^k. Gezeigt ist die Backbone Darstellung des I-A^k – Moleküls mit den *gedockten* Peptiden (1-5). Die Orientierung des HEL-Peptides in der Röntgenstruktur ist in Türkis dargestellt.

3.2.3.2 *Docking* von Peptiden in der Bindungsgrube des RT1.B^l – Moleküles mit Hilfe des Programmes Modeller 4

Ausgehend von der murinen I-A^k – Struktur wurde der RT1.B^l – Peptid - Komplex modelliert. Dabei wurde die Tatsache ausgenutzt, dass die MHC Klasse II – gebundenen Peptide alle die gleiche Konformation aufweisen [38]. Dadurch ist die Konformation des gebundenen Peptides weitgehend unabhängig von dessen Sequenz. Im initialen Prozess des komparativen Modellings wird die Struktur des Targets abhängig von der Template – Struktur aufgebaut. Die Analyse der Modelle zeigte, dass die modellierten Peptide die

Poly - Prolin II Konformation aufwiesen. Die Peptide lagen jedoch nicht besonders gut in der Bindungsgrube des RT1.B¹ - Modells. Eine nachfolgende Energieminimierung mit *Minimize* führte dazu, dass die Peptide sich optimal in die Bindungsgrube einpassten.

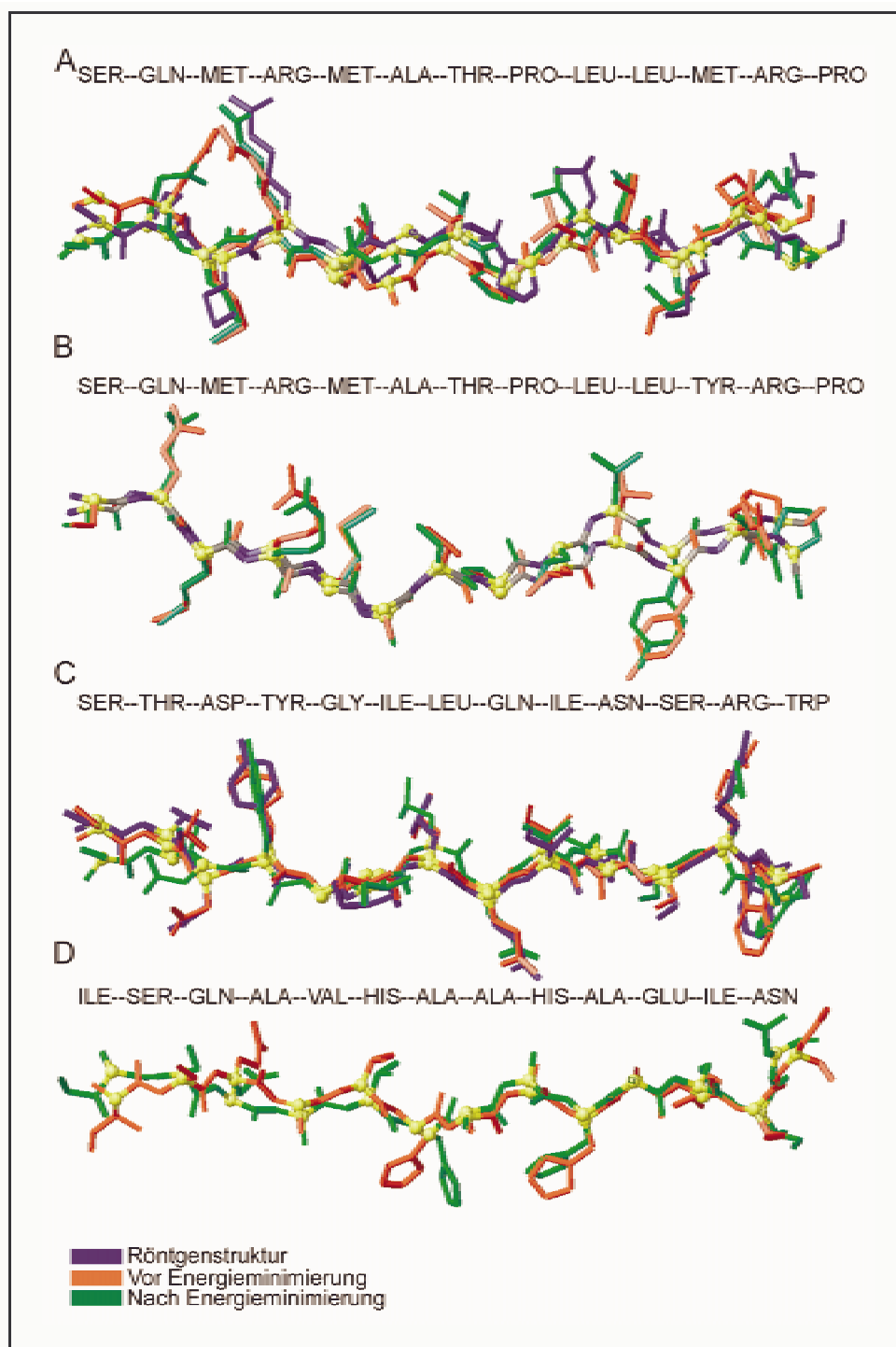


Abb. 37 3D - Alignment der modellierten Peptide

Dargestellt ist eine Überlagerung der an RT1.B¹ gebundenen Peptide nach Modellierung mit Modeller 4 vor und nach der Energieminimierung. Wenn möglich, wurde die Struktur zusätzlich mit Peptiden aus Röntgenstrukturanalysen überlagert. Die C α - Atome sind in Gelb dargestellt. Die korrespondierende Sequenz ist oberhalb der Struktur angegeben.

A: CLIP₈₈₋₁₀₀ : B: CLIP_{m88-100} MET98->TYR98 : C: HEL₅₀₋₆₂ D: OVA₃₂₃₋₃₃₅

Als Peptide für das Modelling wurde das in der Bindungsgrube von MHC Klasse II - Molekülen bindende Peptid der invarianten Kette CLIP₈₈₋₁₀₀ und eine Mutante, CLIPm ausgewählt. Das CLIPm hat einen Austausch von MET98 gegen TYR98 und bindet etwa 100fach schwächer an das RT1.B - Molekül als CLIP [152]. Der CLIP - MHC Klasse II Komplex stellt ein wichtiges Zwischenstadium in der Reifung der MHC Klasse II - Moleküle dar. Das Ratten - CLIP zeigt deutliche strukturelle Unterschiede zum humanen CLIP, was zum Teil auf Sequenzunterschiede zurückzuführen ist (Abb. 37 A). Die Minimierung zeigt deutlich, dass es kaum Änderungen an der Backbone - Konformation gibt. Die meisten strukturellen Unterschiede zeigen sich in der Anordnung der Seitenketten - Atome. Die CLIP - Mutante zeigt deutliche Konformationsunterschiede nach der Energieminimierung (Abb. 37 B). Dies ist besonders im Bereich des TYR₉₈ sichtbar, wo sich das C α deutlich verschiebt.

Als weiteres Peptid für das Modelling wurde das HEL₅₀₋₆₂ - Peptid ausgewählt, um Vergleiche mit der Referenzstruktur I-A^k - HEL₅₀₋₆₂ aufstellen zu können. Das HEL₅₀₋₆₂ - Peptid zeigt nach Energieminimierung im Bereich der Aminosäuren 50 - 54 deutliche Konformationsänderungen gegenüber der Röntgenstruktur und dem nicht minimierten Peptid (Abb. 37 C). Besonders die aromatische Gruppe des Tyrosins zeigt eine deutliche Drehung um 90°. Im hinteren Bereich des Peptides sind nur geringe Konformationsänderungen zu beobachten.

Das OVA₃₂₃₋₃₃₅ - Peptid wurde ausgewählt, das es als hochaffiner RT1.B^l - Binder beschrieben wurde [152]. Auch hier sind nach der Energieminimierung deutliche Konformationsänderungen im N- terminalen Bereich des Peptides zu beobachten. Gegenüber dem HEL - Peptid gehen diese Änderungen jedoch bis in den mittleren Bereich. Hier zeigt die Seitengruppe des HIS328 und HIS331 die größten Konformationsänderungen.

Mit Ausnahme der CLIP - Mutante zeigen alle Peptide nach der Energieminimierung im Carboxy - terminalen Bereich die geringsten Konformationsverschiebungen. Besonders auffällig ist die Verschiebung des SER96 aus der Bindungsgrube hinaus in Richtung des T- Zell - Rezeptors. Dies ist möglicherweise eine der Ursachen für das schlechte Bindungsverhalten der CLIP- Mutante.

3.2.4 Potentielle Energie der RT1.B^I – Peptid Komplexe

Von den generierten RT1.B^I – Peptid Komplexen wurde mit Hilfe des Programms *Analyze* die potentielle Energie berechnet. Dies sollte Aufschluss über die Energetik der Komplexe vor und nach der Energieminimierung geben. Zudem könnte die Bindungsaffinität

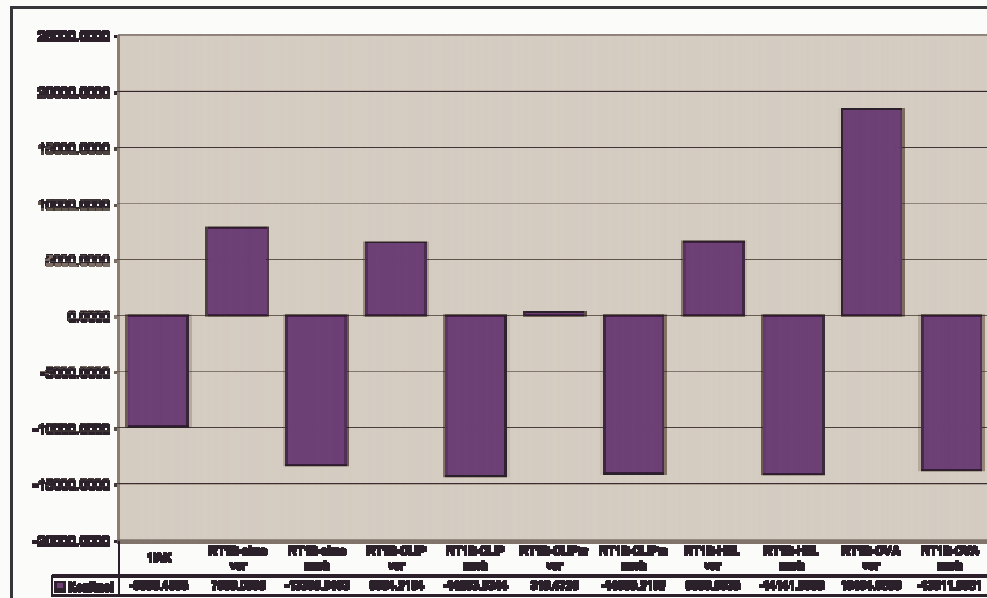


Abb. 38 Potentielle Energie der RT1.B – Peptid Komplexe vor und nach Energieminimierung

der Peptid – Liganden zu den MHC Klasse II – Molekülen einen starken Einfluss auf die Energetik der Komplexe haben. Zum Vergleich wurde die potentielle Energie des I-A^k – HEL₅₀₋₆₂ – Komplexes berechnet. Im Gegensatz zu den errechneten Modellen sind in dieser Struktur jedoch zusätzlich Wassermoleküle und Zuckerreste enthalten.

Alle RT1.B^I – Moleküle zeigten nach der Energieminimierung eine deutliche Abnahme der potentiellen Energie. Alle Moleküle zeigten eine Energie von ca. -14.000 Kcal/mol, Der Unterschied zwischen dem leeren RT1.B^I – Molekül und dem RT1.B^I – CLIP Komplex betrug ca. 1.000 Kcal/mol. Die Differenz zwischen dem RT1.B^I – CLIP – Komplex und dem RT1.B^I – CLIPm – Komplex betrug 200 Kcal/mol. Das RT1.B^I – OVA – Modell zeigte dagegen eine potentielle Energie nach Minimierung von -13.811 Kcal/mol.

Gegenüber den minimierten RT1.B^I – Modellen hatte die Röntgenstruktur des I-A^k – HEL₅₀₋₆₂ - Komplexes eine deutlich höhere potentielle Energie von -9.888 Kcal/mol. Dies ist möglicherweise auf die in der Koordinatendatei vorhandenen Wassermoleküle zurückzuführen, die nicht immer in der optimalen Orientierung vorliegen oder Kristallisations – Artefakte darstellen.

Ein Zusammenhang zwischen der Bindungsaffinität der Peptide zum RT1.B^I - Molekül und der potentiellen Energie der Komplexe lässt sich jedoch nicht ableiten. Alle Komplexe zeigten ähnliche Energiewerte, so dass die Modelle als energetisch gleichberechtigt zu betrachten sind. Die Bindungsaffinität der Peptide wird somit von anderen Faktoren maßgeblich beeinflusst.

3.2.5 Konformationsvergleich des I-A^k-HEL₅₀₋₆₂ und RT1.B^I-HEL₅₀₋₆₂ – Komplexes

Ein Vergleich der Bindungsgrube des RT1.B^I - Moleküls mit dem I-A^k - Molekül könnte weitere Aufschlüsse über das Bindungsverhalten der MHC Klasse II - Moleküle geben. Zu diesem Zweck wurde eine Überlagerung der beiden Moleküle mit Hilfe des Programms *Modeller 4* errechnet und in *Backbone* - Darstellung abgebildet.

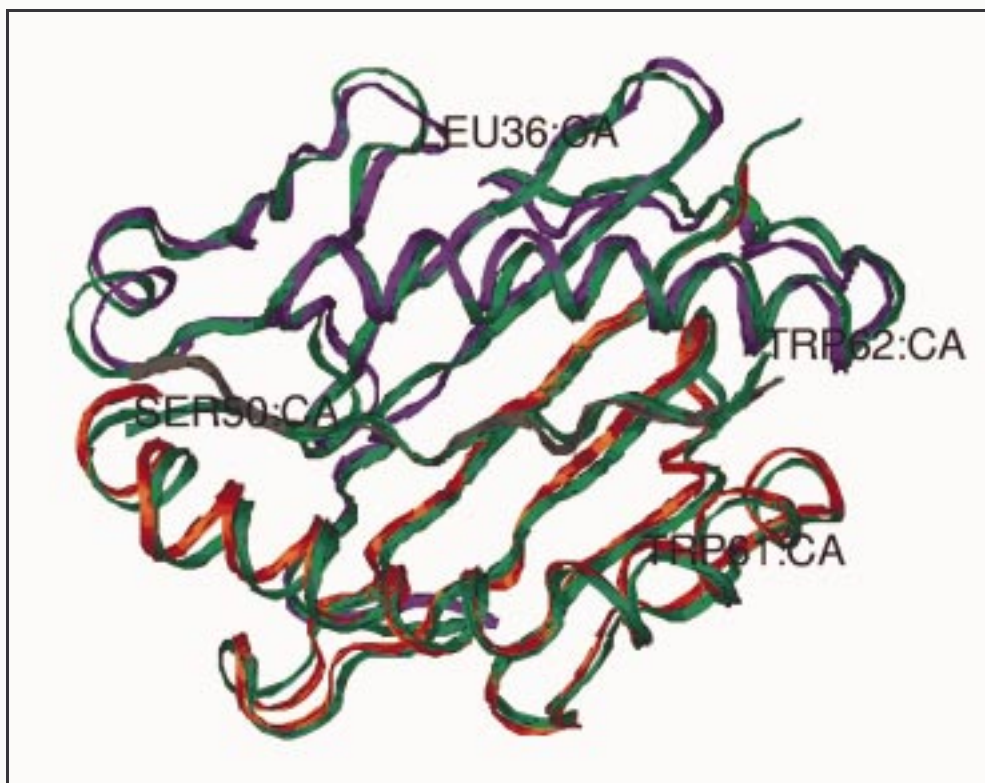


Abb. 39 Überlagerung des RT1.B^I – HEL₅₀₋₆₂ und I-A^k-HEL₅₀₋₆₂ – Komplexes
Dargestellt ist nur die C_α - Backbone der Bindungsgrube der Moleküle. Blick von oben auf die Bindungsgrube. Das I-A^k-HEL – Molekül ist in grün dargestellt. Die α-Kette des RT1.B – Modells ist blau, die β-Kette in rot dargestellt. Das Peptid ist in grau dargestellt.

Wie die Abb. 39 zeigt, ist die Faltung beider Moleküle sehr ähnlich. Eine größere Differenz ist nur im Loop bei LEU38 in der α -Kette des RT1.B - Moleküls zu sehen. Leichtere Abweichungen zwischen der Template- und Targetstruktur sind im Bereich der α - Helix β 52 - β 65 zu sehen, wobei das TRP- β 61 den größten Unterschied zeigt. Weitere strukturelle Abweichungen zeigen sich im Bereich um α 50 und β 19.

Das Peptid zeigt die größte Abweichung im Bereich des Carboxy - Terminus. Besonders das SER50 zeigt beim RT1.B^l - Modell eine deutliche Divergenz zur Bindung im I-A^k Molekül auf. Die restlichen Aminosäuren mit Ausnahme des TRP62 zeigen große strukturelle Homologie zur Struktur des I-A^k - Moleküls.

3.2.6 Konformationsvergleich des RT1.B^l-CLIP und RT1.B^l-CLIPm - Modells

Da die beiden CLIP - Peptide einen großen Unterschied in der Bindungsaffinität zum RT1.B^l - Molekül aufweisen, wurde von beiden Komplexen eine Überlagerung errechnet. Hierdurch sollte untersucht werden, ob es Konformationseinflüsse durch RT1.B *High*

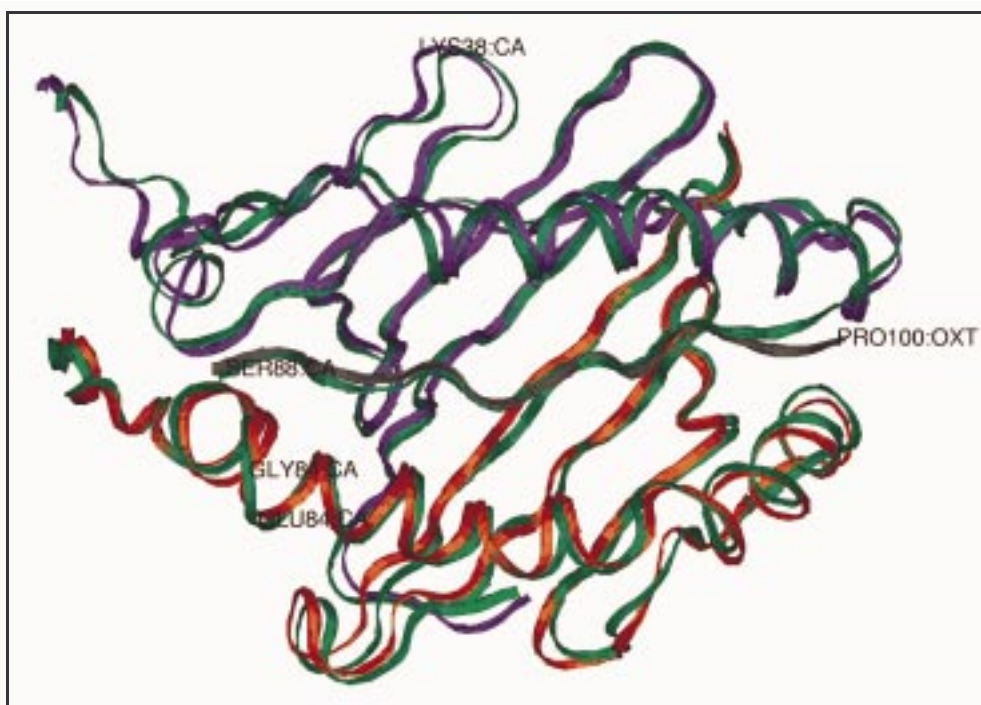


Abb. 40 Überlagerung des RT1.B^l - CLIP und RT1.B^l - CLIPm Komplexes
Dargestellt ist nur die Backbone der Bindungsgube der Moleküle. Blick von oben auf die Bindungsgrube. Das RT1.B^l - CLIP - Molekül ist in grün dargestellt. Die α -Kette des RT1.B-CLIPm - Modells ist blau, die β -Kette in rot dargestellt. Das Peptid ist in grau dargestellt.

und *Low* - Bindern gibt.

Wie die Überlagerung der Strukturen zeigt (Abb. 40), gibt es nur geringe Konformationsunterschiede zwischen den beiden Komplexen. Unterschiede in der Konformation zeigen sich bei den Aminosäuren LYS α 39, GLY β 84A und GLU β 84. Eine weitere Abweichung zeigt sich im Bereich um die Aminosäure β 19. Leichtere Differenzen zwischen beiden Strukturen zeigen sich in der α - Helix zwischen der Aminosäure β 52- β 65.

Die Peptide zeigen in der Backbone - Konformation mit Ausnahme des N- terminalen PRO100 keine strukturellen Abweichungen. Hier zeigen sich jedoch bei den Seitenketten deutliche Differenzen.

Weitere Konformationsdifferenzen zwischen beiden Komplexen sind jedoch nicht auszumachen. Zudem zeigt sich eine hohe strukturelle Homologie zu dem RT1.B¹ - HEL - Komplex.

3.2.7 Molekulare Kontakte zwischen dem RT1.B Molekül und dem CLIP-Peptid

Die an MHC Klasse II - Moleküle gebundenen Peptide gehen intensive Kontakte mit ihrem Rezeptor ein. Neben *van der Waals* - Kontakten und hydrophoben Wechselwirkungen

AS	Atom	Wasserstoff- Brücke	van der waals Kontakte
SER88	N O OG	GLN α 50 O, GLN α 50 OE1, LEU α 51 O SER α 53 OG, GLN α 50 OE1 GLY β 84A O, LEU α 51 O	SER α 53, GLY β 84A SER α 53, GLN α 50, THR α 52, GLY β 84 $^{\circ}$, LEU α 51 GLN α 50,, GLU β 84, GLY β 84A , ARG β 88
GLN 89	N O OE1 NE2	HIS β 81 NE2	SER α 53, GLN α 50, HIS β 81,THR α 52, GLY β 84A,LEU α 51 SER α 53, ASN β 82, THR α 52, HIS β 81 ASN β 82 SER α 53, HIS β 81
MET 90	N O SD	SER α 53 O	SER α 53, HIS β 81, ASN β 82, THR α 52 ASP α 55, SER α 53,HIS β 81, ASN β 82 SER α 53, GLU α 31, GLU β 86, THR α 52, SER β 85
ARG91	N O NE NH1 NH2	ASN β 82 OD1 ASN β 82 ND2 THR β 77 O	SER α 53, ASN β 82, VAL β 78 GLY α 9A, VAL β 78 THR β 77, ASN β 82 ASP β 76 THR β 77
MET92	N O SD		TYR α 9, ASN β 82 GLU β 74, TYR α 9. ASN β 82 GLN α 61, ASN α 62, GLU β 74, TYR α 9
ALA93	N O	TYR α 9 O	ASN α 62, GLU β 74, ASN α 11, ASNA62, GLY α 58, GLU β 74, GLY α 9A, TYR α 9
THR94	N O OG1	GLU β 74 OE2 TYR β 30 OH GLU β 74 OE2	ASN α 62, TYR β 90, TYR α 9, THR β 71 GLU β 74, TYR β 47, THR β 71, GLU β 74 TYR β 30, GLN β 70, TYR β 47, THR β 71
PRO95	N O		ASN α 62, TYR β 30, GLU β 74 ASN α 69, ASN α 62, TYR β 30
LEU96	N O	TYR β 30 OH ASN α 69 ND2	ASN α 69 ILE α 65, TYR β 9
LEU97	N O		ASN α 69, TYR β 30 HIS α 68, TYR β 67, ASN α 69
MET98	N O SD	ASN α 69 OD1 HIS α 68 O	ILE α 65 HIS α 68, ASN α 69 ASN α 69, TYR β 9, TYR β 37, SER β 57
ARG99	N O NE NH1 NH2	ARG α 76 NH2 GLU β 59 OE1 PRO β 56 O, GLU β 59 OE1	HIS α 68, ASN α 69 SER β 57 PRO β 56, ARG α 76, GLU β 59 PRO β 56, LYS β 63
PRO100	N O OXT		ARG α 76 ARG α 76, GLU β 59 ARG α 76, SER β 57

Tab. 19 Atomare Kontakte des CLIP₈₈₋₁₀₀-Peptides mit RT1.B¹

gen werden auch zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen MHC Klasse II - Molekül und Peptid ausgebildet. Diese wurden mit dem Programm *Contact* ausgerechnet.

Besonders intensive Kontakte in Form von Wasserstoffbrücken - Bindungen mit dem RT1.B^I - Molekül werden von den Aminosäuren SER88, ARG91, THR94, LEU96 und ARG99 ausgebildet. Die einzigen Aminosäuren des Peptides, die keine Wasserstoffbrücken - Bindungen mit dem RT1.B^I - Molekül ausbilden, sind die Aminosäure MET92 und LEU97. *Van der Waals* - Kontakte werden von allen Aminosäuren des CLIP - Peptides ausgebildet (Tab. 19). In der Abb. 41 ist eine graphische Repräsentation der Wechselwirkungen des Peptides mit dem RT1.B^I Molekül dargestellt. Hier sind zusätzlich hydrophobe Kontakte dargestellt.

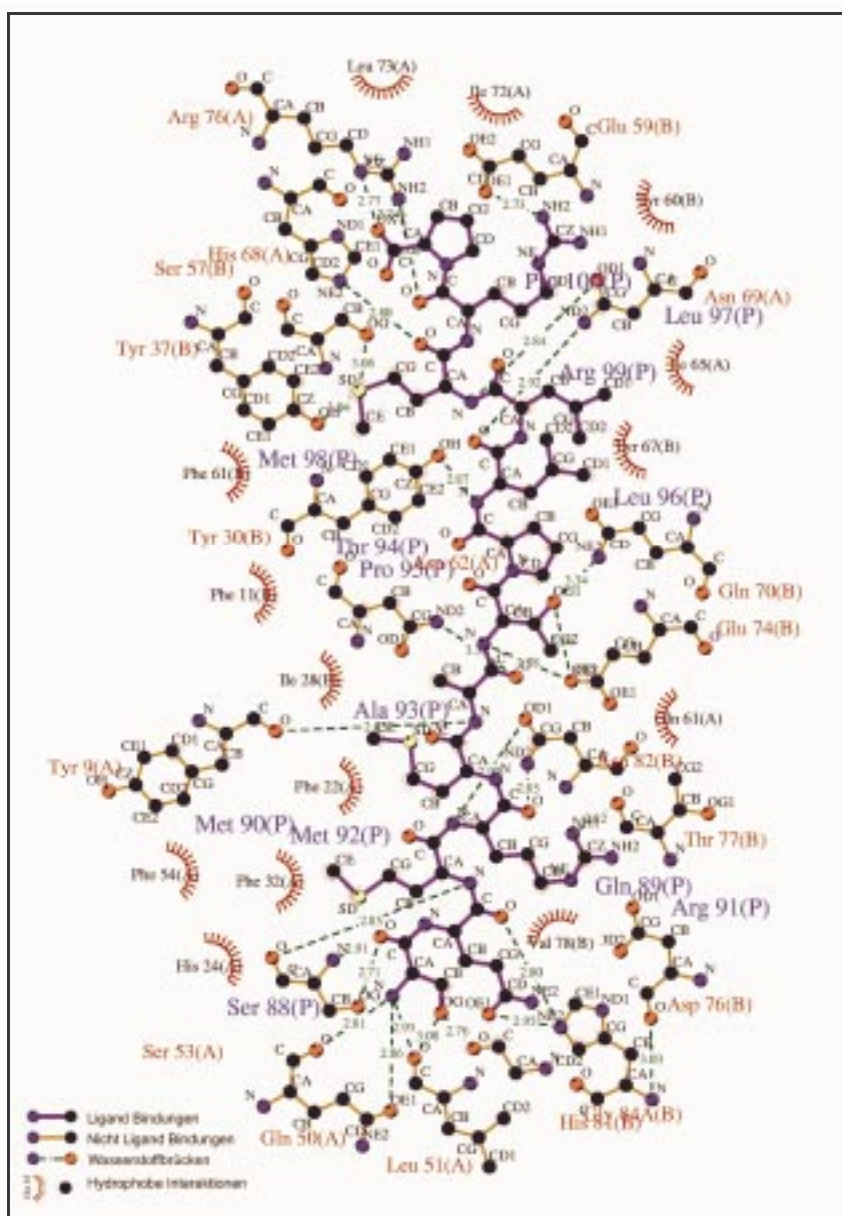


Abb. 41 Molekulare Kontakte zwischen CLIP₈₈₋₁₀₀ und RT1.B¹

Besonders auffällig sind die zahlreichen intermolekularen Wechselwirkungen im C- und N-terminalen Bereich des Peptides mit dem MHC Klasse II - Molekül. Das SER88 zeigt ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken - Bindungen. Auch das ARG98 zeigt zahlreiche Wechselwirkungen. Hydrophobe Interaktionen werden von zahlreichen Atomen des Peptides mit dem RT1.B¹ Molekül ausgebildet. Zahlreiche Wasserstoffbrücken - Bindungen werden mit den bei MHC Klasse II - Molekülen hochkonservierten Aminosäuren HISβ81, ASNβ82 und ASNα69 ausgebildet. Im Gegensatz zum I-A^k - HEL - Komplex wird keine Wasserstoffbrücken - Bindung zwischen Peptid und MHC Klasse II - Molekül ausgebildet.

det. Die Aminosäuren PRO95 und LEU97 bilden keinerlei Wasserstoffbrücken mit dem RT1.B^I – Molekül aus.

3.2.8 Intermolekulare Wechselwirkungen zwischen RT1.B^I und CLIPm

Ein Vergleich der molekularen Wechselwirkungen von CLIPm und CLIP mit dem RT1.B^I – Molekül sollte erste Aufschlüsse über die veränderte Bindungsaffinität der beiden Peptide ermöglichen.

AS	Atom	Wasserstoff- Brücke	van der waals Kontakte
SER88	N	LEU α51 O	SERα53, GLYβ84A, GLNα50
	O	SER α53 N	SERα53, GLYβ84A, LEUα51
	OG	GLY β84A O	LEUα51,, GLYβ84
GLN 89	N		SERα53, GLYβ84A
	O		SERα53, GLYβ84A, HIS β81
	OE1		ASNα55, SERα53
MET 90	NE2	ASPα55 OD2	SERα53, GLNα57, ASPα55
	N	SER α53 O	SERα53, SERβ85, GLUβ86
	O	HIS β81 NE2	SERβ55, SERα53, ASNβ82
ARG91	SD		SERα53, GLUα31, GLUβ86, THRα52, THRβ89
	N	ASN β82 OD1	SERα53, SERβ85, VALβ78, THRβ77, GLUβ86
	O	ASN β82 ND2	GLYα9A, VALβ78, TYRα9, GLUβ86
MET92	NE		THRβ77, GLUβ74
	NH1	THR β77 O	GLUβ74
	NH2		THRβ77, GLUβ74
ALA93	N		TYRα9, ASNβ82, GLYα9A
	O		GLUβ74, TYRα9, ASNα62
	SD		ASNα62, GLYα58
THR94	N	TYR α9 O	ASNα62, GLUβ74, GLYα9A
	O		ASNα11, ASNA62, GLY α58, GLUβ74, GLYα9A, TYRα9
	OG1	GLU β74 OE1	ASNα62, GLNβ70
PRO95	N		GLUβ74, TYRβ30, TYRβ47
	O	GLU β70 NE2	GLUβ74
	O		ASNα62, TYRβ30
LEU96	N		GLBβ70, ASNα62
	O		ASNα69
	O	ASN α69 ND2	ILEα65, TYRβ9
LEU97	N		ASNα69, TYRβ60, TYRβ67
	O	TYR β60 OH	HISα68, TYRβ67, ASNα69, SERβ57
	O	ASNα69 OD1	HISα68, ILEα65, SERβ57, TYRB60
TYR98	N	HIS α68 NE2	TYRβ60, ASNα69
	O		HISα68, ASNα69, SERβ57
	O		HISα68, PROβ56, SERβ57
ARG99	NE		PROβ56, ARGα76, GLUβ59, SERβ57
	NH1	GLU β59 OE1	PROβ56, SERβ57
	NH2	PRO β56 O, GLU β59 OE1	ARGα76, ARGβ55
PRO100	N		ARGα76
	O	ARG α76 NE, ARG α76 NH2	ILEα72, PROβ56
	OXT	ARG α76 NH2	ARGα76, PROβ56

Tab. 20 Wechselwirkungen zwischen CLIPm₈₈₋₁₀₀ und RT1.B^I

tide ermöglichen.

Im Vergleich zum RT1.B^I – CLIP Komplex werden zahlreiche Wasserstoffbrücken - Bindungen zwischen CLIPm und RT1.B^I mit anderen Aminosäuren eingegangen (Tab. 20). Vor allem das SER88 bildet weniger Wasserstoffbrücken - Bindungen aus als das

dungen mit dem RT1.B^I – Molekül ein. Weiterhin geht das CLIPm – Peptid im Bereich der AS88-90 mehr hydrophobe Wechselwirkungen ein als CLIP.

3.2.9 Analyse der Wechselwirkungen zwischen RT1.B^I und HEL₅₀₋₆₂

Die Analyse der Wechselwirkungen zwischen RT1.B^I und HEL₅₀₋₆₂ sollte aufzeigen, ob die prinzipiellen Kontaktstellen des HEL – Peptides mit I-A^k auch im RT1.B^I – Molekül vorhanden sind. Zudem konnte so überprüft werden, ob die errechneten Modelle ein ähnli-

AS	Atom	Wasserstoff- Brücke	van der waals Kontakte
SER50	N	THR α52 O, GLN α50 O, LEU α51 O	SERβ85, PHEα48
	O		GLYα49, THRα52, GLNα50, LEUα51
	OG	LEU α51 O, SER β85 OG	HISβ81, GLNα50, GLYβ84A
THR51	N		HISβ81, LEUα51, SERβ85
	O		SERα53, SERβ85
ASP52	N	SER α53 O	ASPα55, ASNβ82, SERα53, SERβ85
	O		ASPα55, HISα24, ASNβ82, SERα53
	OD1	HIS β81 NE2, SER β85 OG	ASNβ82, HISβ81, SERα53, LEUα51, ASNβ82
	OD2	SER α53 N	ASNβ82, HISβ81, SERα53, LEUα51, ASNβ82
TYR53	N	ASN β82 OD1	HISα24, ASNβ82, VALβ78, SERα53
	O	HIS α24 NE2, ASN β82 ND2	TYRα9, GLYα9A, VALβ78
	OH		THRβ77, HISβ81
GLY54	N		TYRα9, HISα24, ASNβ82,
	O		GLUβ74, TYRα9,
ILE55	N	TYR α9 O	GLUβ74
	O		ASNα62, GLUβ74, GLYα9A, TYRα9
LEU56	N	GLU β74 OE2	ASNα62
	O	GLN β70 NE2	TYRβ47, THRβ71, TYRβ30, ASNα62, GLUβ74
GLN57	N		GLNβ70, TYRβ30, ASNα62, GLUβ74
	O		ASNα69, TYRβ30, ASNα62
	OE1	ASN α69 ND2	ASNα69, TYRβ9, ASNα62
	NE2	ASN α62 O	ASNα69, GLNα61
ILE58	N	TYR β30 OH	TYRβ47, GLNβ70, ASNα69
	O		ASNα69, TYRβ9, TYRβ37
ASN59	N		ASNα69
	O		TYRβ67, HISα68, ASNα69
	OD1		ASNα69, ILEα65, GLNα61
	ND2		GLNα61
SER60	N	ASN α69 OD1	HISα68, SERβ57
	O	HIS α68 NE2	ASNα69
	OG	SER β57 OG	ARGα76, SERβ57, ASNα69, TYRβ9, TYRβ37
ARG61	N		PROβ56, HISα68, SERβ57, ASNα69
	O		PROβ56, HISα68, SERβ57, ASNα69
	NE		GLUβ59, PROβ56
	NH1	GLU β59 OE2	LYSβ63, GLNβ64, PROβ56
	NH2	GLU β59 OE2, PRO β56 O	LYSβ63, ARGβ55
TRP62	N		ARGα76
	O	ARG α76 NH2	PROβ56, ARGα76, SERβ57
	NE1		LYSα75
	OXT	ARG α76 NE	ILEα72, ARGα76

Tab. 21 RT1.B^I – HEL₅₀₋₆₂ Wechselwirkungen

ches Kontaktnetzwerk aufbauen wie die Referenzstruktur (Tab. 21)

Im Vergleich zum I-A^k-HEL₅₀₋₆₂ Komplex bildet das Peptid zahlreiche andere Kontakte mit anderen Aminosäuren des MHC Klasse II - Moleküls aus. So bildet das SER50 mit der AS ARG53 bei I-A^k eine Wasserstoffbrücken - Bindung aus. Das THR51 bildet im Gegensatz zum murinen Komplex keine solche Bindung aus. Das ASP52 geht zwei Wasserstoffbrücken - Bindungen mit den selben Aminosäurepositionen ein, obwohl beim Ratten Komplex das Arginin gegen ein Serin ausgetauscht ist. Das GLY54 geht im murinen MHC Klasse II Komplex Wasserstoffbrückenbindungen mit Wassermolekülen ein, jedoch keine mit I-A^k. Die Wassermoleküle können jedoch nicht modelliert werden. Wasserstoffbrücken - Bindungen von LEU56 bis SER60 sind in beiden Molekülen konser-

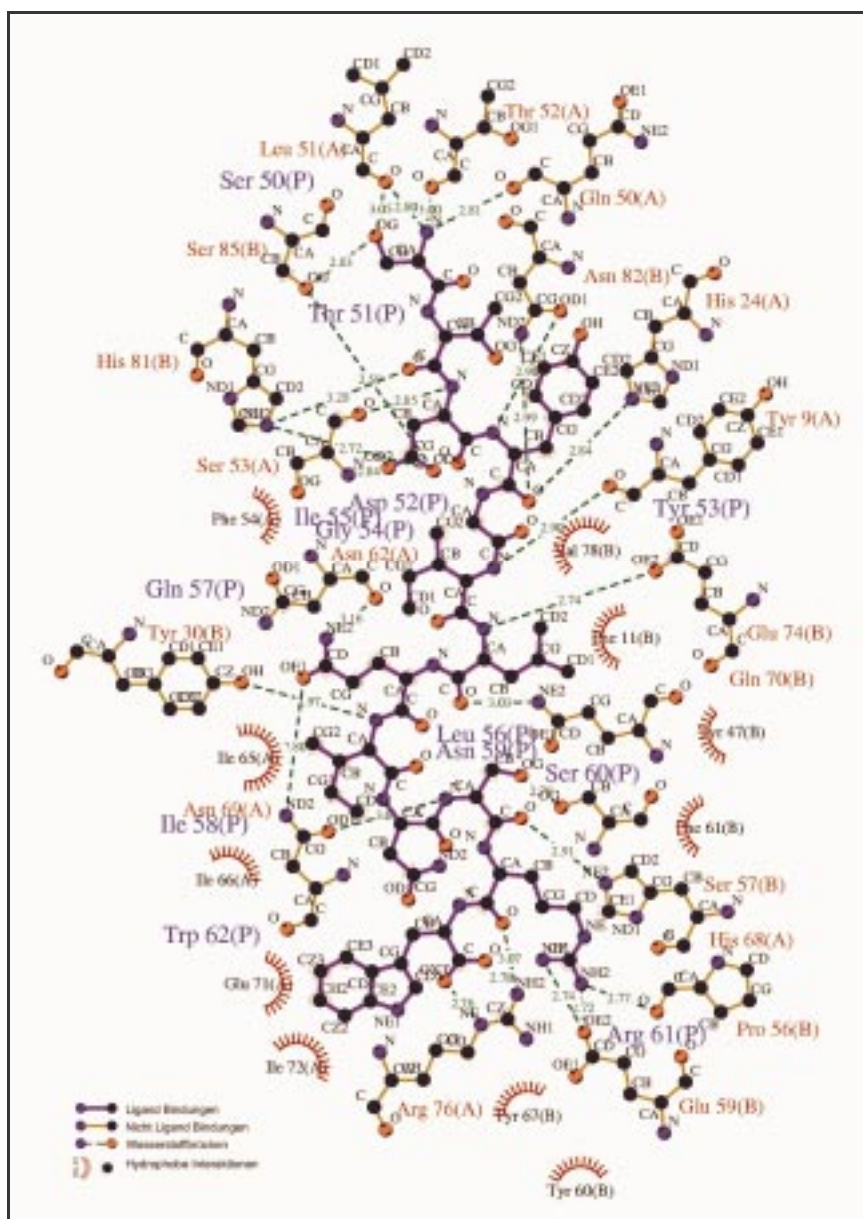


Abb. 43 Intermolekulare Kontakte zwischen RT1.B und HEL₅₀₋₆₂

viert. Während die Aminosäuren ARG61 und TRP62 nur Wasserstoffbrückenbindungen mit H₂O - Molekülen eingehen, bilden diese Aminosäuren bei RT1.B^I intermolekulare Wasserstoffbrücken - Bindungen aus (Abb. 43). Das HEL₅₀₋₆₂ Peptid bildet wie das CLIP₈₈₋₁₀₀ Peptid sowohl im C- als auch im N - terminalen Bereich zahlreiche Wasserstoffbrücken - Bindungen aus. Im Gegensatz zu CLIP hat jedoch nur eine Aminosäure, ASN59, keine Wasserstoffbrücken - Bindungskontakte.

3.2.10 Van der Waals und Wasserstoffbrücken – Kontakte von OVA₃₂₃₋₃₃₅ mit dem RT1.B^I – Molekül

Wie die Edmann - Sequenzierung ergab (Kap. 3.1.14), findet bei den ersten Schritten der Prozessierung von Ovalbumin auch ein Schnitt bei einer Aminosäureposition um die 300 statt. Das dabei generierte Fragment enthält ein dominantes Ovalbumin - Epitop, OVA₃₂₃₋₃₃₉. Dieses wurde als OVA₃₂₃₋₃₃₅ in das RT1.B^I - Modell in der von der Literatur vorgeschlagenen Orientierung einmodelliert [152]. In der Tab. 22 sind die ausgebildeten

AS	Atom	Wasserstoff- Brücke	van der waals Kontakte
ILE323	N	GLN α50 O, THR α52, O, LEU α51 O	PHEα48
	O		SERα53, PHEα48, GLNα50, LEUα51
SER324	N		SERα53, ASPα55, LEUα51,
	O		SERα53
	OG	SER α53 OG, ASP α55 OD1	ASPα55
GLN325	N	SER α53 N	ASNβ82, ASPα55, SERα53
	O	HIS β81 NE2	ASNβ81, SERα53
	OE1	ASN β82 ND2	SERα53, GLUα31, SERβ85, GLUβ86
	NE2	GLUα31 OE1, GLU β86 OE2	SERα53, SERβ85, SERβ90, THRβ89
ALA326	N		VALβ78, ASNβ82, SERα53, HISα24,
	O	HIS α24 NE2	TYRα9, ASNβ82
VAL327	N		TYRα9, ASNβ82, HISα24
	O		GLUβ74, TYRα9,
HIS328	N	TYR α9 O	GLUβ74, ASNα62, CYSβ79,
	O		GLUβ74, ASNα11, GLYβ13, ASNα62, TYRα9
	ND1	GLU β74 OE1	THRβ71, ASPβ26, CYSβ79, GLYβ13, CYSβ15
	NE2	ASP β26 OD1	THRβ71, GLUβ74, CYSβ79, GLYβ13, LEUβ14, CYSβ15
ALA329	N	GLU β74 OE1	ASNα62, GLNβ70, ASNα62, TYRα9
	O		TYRβ90, ASNα62, GLUβ74
ALA330	N	ASN α62 OD1	GLUβ74, ASNα11
	O		GLNα61, ASNα62, GLNβ70, GLUβ74
HIS331	N		ASNα69, TYRβ30, ASNα62
	O	ASN α69 ND2	TYRβ9, ILEα65, TYRβ30
	ND1	TYR β47 OH, TYR β30 OH	TYRβ67, THRβ71, GLUβ74
	NE2	GLU β74 OE2	TYRβ67, TYRβ47, THRβ71, TYRβ30
ALA332	N	TYR β67 OH	ASNα69
	O	ASN α69 OD1	TYRβ60
GLU333	N	ASN α69 OD1	TYRβ60,
	O		TYRβ60, ASNα69
	OE1	SERβ57 OG, TYR β37 OH	ARGα76, LEUβ53, TYRβ9
	OE2	ARG α76 NH2, SER β57 OG	ARGα76, LEUβ53, TYRβ37, TYRβ9
ILE334	N		SERβ57
	O	ARG α76 NH2	LYSα75, ARGα76, SERβ57
ASN335	N		LYSα75, ARGα76
	O		LYSα75, GLUα71
	OD1	HIS α68 NE2	LYSα75, GLUα71, GLUα71
	ND2		LYSα75, GLUα71
	OXT	LYS α75 NZ	ILEα72, GLUα71, ARGα76

Tab. 22 Kontakte des OVA-Peptides mit RT1.B^I

intermolekulare Kontakte zwischen RT1.B und dem OVA-Peptid aufgeführt.

Auch das OVA-Peptid geht an der Position P-2 (ILE323), Wasserstoffbrücken – Bindungen mit dem RT1.B^I – Molekül ein. Die einzige Aminosäure des OVA-Peptids, die keine Wasserstoffbrückenbindung mit dem RT1.B^I – Molekül eingeht, ist VAL327. Im Vergleich zu den anderen drei untersuchten Peptiden geht OVA₃₂₃₋₃₃₅ die meisten

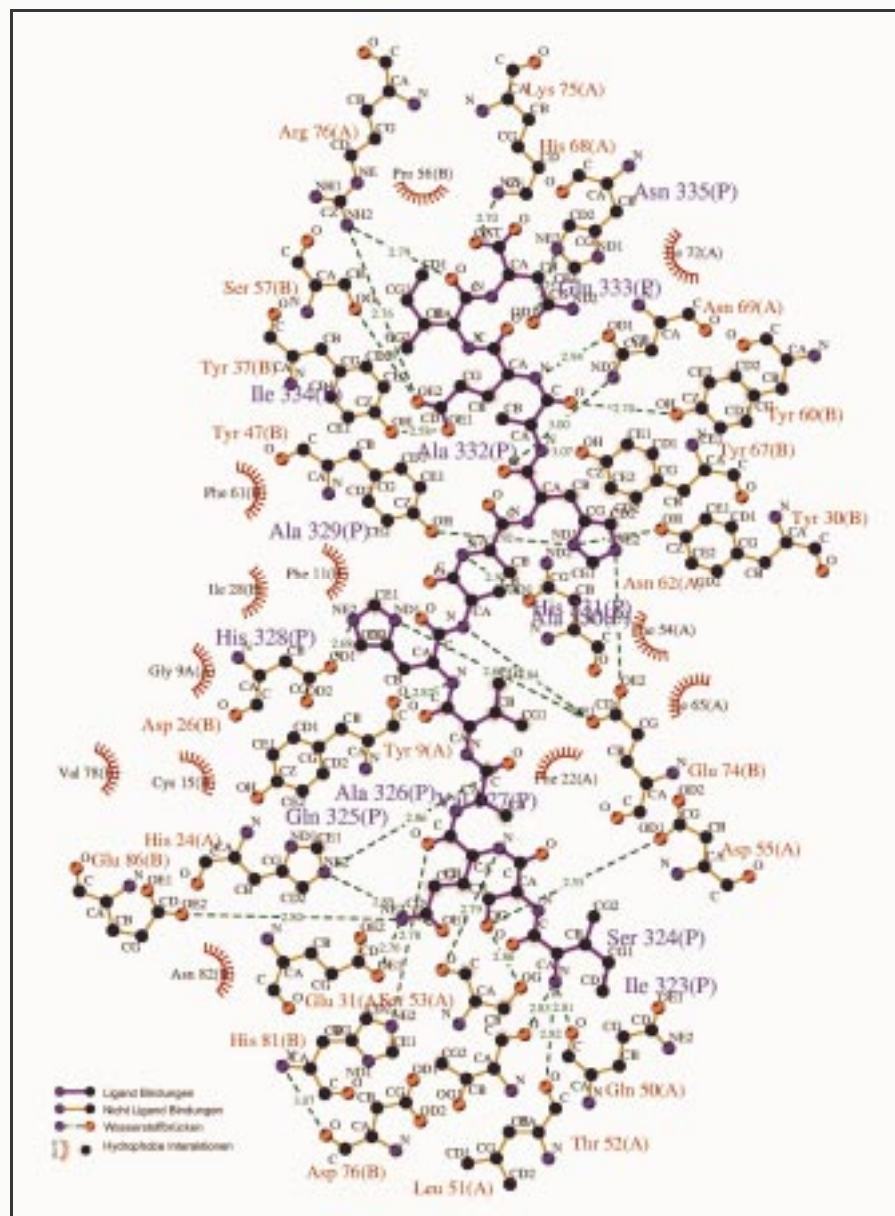


Abb. 44 Schema der OVA₃₂₃₋₃₃₅ – RT1.B^I Interaktionen

Wasserstoffbrücken – Bindungen mit dem MHC Klasse II – Molekül ein. Sehr starke Wechselwirkungen werden von der an der P1 – Position gelegenen Aminosäure Glutamin (325) mit dem RT1.B^I – Molekül eingegangen. Von dieser Aminosäure werden fünf Wasserstoffbrücken ausgebildet. Die Abb. 44 zeigt eine schematische Darstellung der

Wechselwirkungen von RT1.B^I mit dem OVA-Peptid. Auch die beiden Aminosäuren HIS331 und GLU333 gehen intensive Wechselwirkungen vermittelt durch Wasserstoffbrücken – Bindungen mit dem RT1.B^I – Molekül ein. HIS328 und ALA332 gehen weniger solche Bindungen ein, je zwei pro Aminosäure. Auch das N – terminale Asparagin 335 geht Wasserstoffbrücken – Bindungen mit dem RT1.B^I – Molekül ein. Zudem bilden sich zwischen dem OVA-Peptid und RT1.B zahlreiche *van der Waals* Kontakte aus.

3.2.11 Vergleich der Anzahl der intermolekularen Wechselwirkungen der vier untersuchten Peptide mit dem RT1.B^I - Molekül

Ein mögliches Kriterium für die Bindungsaffinität der Peptide zum RT1.B^I – Molekül ist die Zahl der ausgebildeten Wasserstoffbrücken – Bindungen und *van der Waals* – Kontakte. Ein Vergleich der Kontaktanzahl und der in der Literatur angegebenen Affinität

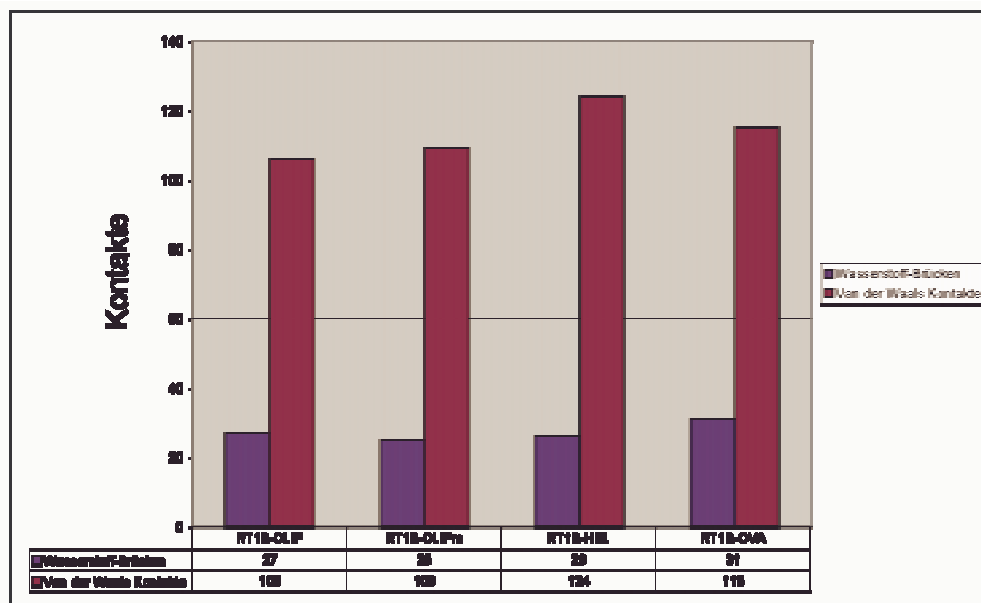


Abb. 45 Vergleich der ausgebildeten intermolekularen Kontakte zwischen Peptid und RT1.B^I

der Peptide zu RT1.B sollte Aufschluss über diese Kriterium geben.

In der Abb. 45 ist ein Vergleich der Kontakte graphisch wiedergegeben. Das OVA₃₂₃₋₃₃₉ und CLIP₈₈₋₁₀₀ – Peptid sind in der Literatur als sog. RT1.B^I – „*High-Binder*“ mit hoher Bindungsaffinität beschrieben worden [152]. Das CLIP – Peptid bildet 27 Wasserstoffbrücken- Bindungen mit dem RT1.B^I – Molekül aus, das OVA – Peptid sogar 31. Die CLIP- Mutante CLIPm ist als schlechter RT1.B^I – Binder beschrieben worden, dessen

Bindungsaffinität 200x schlechter ist als die des normalen CLIP - Peptides [152]. Das CLIPm - Peptid bildet zwei Wasserstoffbrücken weniger aus als CLIP, nämlich 25. Dagegen bildet CLIPm 109 *van der Waals* - Kontakte mit RT1.B^I gegenüber 106 bei CLIP aus. Das OVA - Peptid zeigt 115 solcher Wechselwirkungen mit dem MHC Klasse II - Molekül.

In der Literatur sind keine Bindungsaffinitäten für das HEL₅₀₋₆₂ - Peptid zu RT1.B^I beschrieben worden. Jedoch liegen solche Daten für das HEL₄₆₋₆₁ - Peptid vor [153]. Dieses Peptid ist dort als schlechter RT1.B^I - Binder beschrieben worden. Das HEL₅₀₋₆₂ - Peptid geht mit dem RT1.B^I - Molekül 26 Wasserstoffbrücken - Bindungen ein und sogar 124 *van der Waals* - Kontakte.

Ein mögliches Kriterium für die Entscheidung, ob ein Peptid ein „*High-Binder*“ oder eine geringe Affinität zu RT1.B^I ausbildet, könnte die Anzahl der Wasserstoffbrücken - Bindungen sein. Peptide, die weniger als 27 solcher Wechselwirkungen mit RT1.B^I eingehen, sind dann RT1.B^I „*Low-Binder*“. Solche mit mindestens 27 Wasserstoffbrücken - Bindungen wären dann formal gesehen Peptide mit einer hohen Bindungsaffinität zum RT1.B^I -Molekül.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die endosomale Aufnahme des Modellproteins FITC-OVA und dessen Prozessierung in Makrophagen und dendritischen Zellen, den Hauptrepräsentanten antigenpräsentierender Zellen untersucht. Durch Kinetikexperimente konnten Kenntnisse über den Ablauf der proteolytischen Spaltung von FITC-OVA in unterschiedlich aktivierten Makrophagen und in den dendritischen Zellen gewonnen werden. Mittels Inhibitions - Studien konnten der initiale Vorgang der Spaltung des Modellproteins weiter aufgeklärt und neue Aspekte der Antigenprozessierung ermittelt werden. Die Edmann - Sequenzierung eines in Makrophagen generierten Abbaufragments ergab die exakte Lage einer Spaltstelle innerhalb der Ovalbumin - Struktur. Auf der Grundlage von Röntgenstrukturdaten von bekannten MHC Klasse II - Molekülen konnte durch *Molecular Modelling* eine Struktur des Ratten MHC Klasse II - Moleküls RT1.B^I ermittelt werden. Das berechnete Molekülmodell ermöglichte ein tieferes Verständnis der Peptidbindung in der Bindungsgrube des RT1.B^I - Moleküls.

Der Synthese- und Expressionsweg der MHC Klasse II - Moleküle ist intensiv untersucht und in Teilen gut verstanden. Über die Vorgänge der Antigen - Prozessierung und die Vorgänge der Peptid - Beladung liegen vergleichsweise wenig Daten vor. Über folgende Aspekte besteht in der Literatur ein Konsens [Review in 129]:

- Die Antigenpräsentierenden Zellen nehmen Proteinantigene mittels Pinozytose, rezeptorvermittelte Endozytose, Makropinozytose oder Phagozytose auf.
- Nach Internalisierung des Antigens wird dieses in endo-/lysosomalen Kompartimenten durch Exo- und Endoproteinasen abgebaut.
- Im Peptid - Bindungskompartiment MIIC wird CLIP, ein Peptid der invarianten Kette, gegen Peptidfragmente in der Bindungsgrube des MHC Klasse II - Moleküls in einer DM - vermittelten Reaktion ausgetauscht.
- Die Peptide werden vor oder nach ihrer Bindung in der Peptidbindungsgrube auf die typische Länge von 10-20 Aminosäuren gekürzt.
- Der MHC Klasse II - Peptid Komplex wird zur Zelloberfläche der Antigenpräsentierenden Zelle transportiert und dort dem T - Zell Rezeptor einer T - Helferzelle dargeboten.

Die beteiligten Moleküle und der exakte Mechanismus der Peptid – Generierung in den endo- / lysosomalen Kompartimente sind bisher wenig bekannt. Neben den Proteinase Kathepsin B und D wird in der Literatur neuerdings auch eine Beteiligung der Kathepsine L und S sowie der Proteinase Legumain diskutiert [129, 34]. Eine Beteiligung verschiedener *Heatshock* – Proteine wird ebenso angenommen. Neuere Studien deuten vor allem auf eine Beteiligung des Chaperons HSC73 bei der MHC Klasse II – vermittelten Antigenpräsentation hin [154]. Neben der invarianten Kette kommt dem *DM* – Genprodukt eine besondere Bedeutung zu. Dieses ist essentiell für die Peptid – Beladung und fungiert als eine Art Peptideditor [155]. Die Struktur von murinen und humanen DM konnte aufgeklärt werden [55, 56]. Die Strukturdaten ließen jedoch keinen Rückschluss auf den Wirkmechanismus des Moleküls zu.

In Vorarbeiten wurde ein Testsystem entwickelt, das die Untersuchung der Antigen – Prozessierung in Zellen erlaubt [121]. Das Testsystem erlaubt die Untersuchung der Zeitkinetik des Proteinabbaus. Dieses Testsystem wurde in dieser Arbeit erweitert, so dass der Nachweis der Fragmente direkt erfolgen konnte. Die Verwendung des hochauflösenden Elektrophorese – Systems nach Schägger und Jagow erlaubte eine bessere Trennung der Fragmente [93]. Durch densitometrische Vermessungen konnten die Ergebnisse quantifiziert werden.

4.1 Technische Limitationen des *in vivo* Testsystems

Für die Untersuchung der intrazellulären Prozessierung von Proteinen ist es notwendig, diese zu markieren. In Vorarbeiten wurde ein DIG - Marker [121] zur Markierung der Proteine verwendet. Der Nachweis von DIG mit einer durch alkalische Phosphatase - vermittelten Chemilumineszenzreaktion zeigte ein recht hohes, diffuses Hintergrundrauschen. Dies entsteht durch unspezifisches Binden des Nachweisantikörpers, an den die alkalische Phosphatase gekoppelt ist, an die PVDF - Membran. Durch den hohen Hintergrund lag die Nachweisgrenze bei ca. 100ng, was sich für die durchgeführten Versuche als zu niedrig erwies. Um die Nachweisgrenze zu erhöhen, wurde ein Primär - Sekundär Antikörper- Nachweissystem auf Basis der Peroxidase erprobt, das ebenfalls eine Chemilumineszenzreaktion auslöst. Durch die Verwendung eines Sekundärantikörpers wird im allgemeinen ein Verstärkungseffekt erreicht, da mehrere Sekundärantikörper am Primärantikörper binden können. Der verwendete Primärantikörper war ebenfalls ein polyklonaler α -DIG Schafsantikörper. Hierdurch konnte das markierte Ovalbumin bis in den Pikogrammbereich bei geringem Hintergrund nachgewiesen werden. Für das *in vivo* Testsystem erwies sich dieses Nachweissystem als ungeeignet. So zeigten sich die verwendeten Sekundärantikörper als extrem kreuzreaktiv. Nach längerer Belichtung konnten zahlreiche Zellproteine nachgewiesen werden. Daher wurde in dieser Arbeit ein weiterer Marker, FITC, eingeführt. Der Nachweis von FITC bot gegenüber dem DIG - System einige Vorteile.

4.1.1 Nachweis der markierten Proteine

Ein Hauptproblem des Testsystems ist der Nachweis von geringen Proteinmengen im unteren Nanogrammbereich. Für den FITC - Marker gibt es zwei Nachweismöglichkeiten. Neben dem antikörpervermittelten Chemilumineszenz - Nachweis kann der Farbstoff FITC auch durch Fluoreszenzaktivierung nachgewiesen werden. Die Lichtemissionen des angeregten FITC werden in diesem Fall mit einer CCD - Optik aufgenommen. Die kommerziell erhältlichen polyklonalen anti-FITC Antikörper zeigten zahlreiche Nachteile. Die direkt mit einem Enzym gekoppelten Antikörper konnten das reine FITC - OVA im Western Blot gut nachweisen, zeigten jedoch bei dem *in vivo* Testsystem zahlreiche unspezifische Banden. Zudem war dabei die Hintergrundfärbung hoch. Der indirekte Nachweis über einen monoklonalen anti FITC Primärantikörper, der durch einen an POD - gekop-

pelten – Sekundärantikörper nachgewiesen wird, zeigte die bereits bekannte Kreuzreaktivität der verwendeten Sekundärantikörper. Des Weiteren hatten die monoklonalen anti-FITC Antikörper im Western Blot nur eine geringe Affinität zu dem FITC – Marker.

Der direkte Nachweis über Fluoreszenzaktivierung der FITC - Gruppen hatte dagegen zahlreiche Vorteile. Da nur das zugesetzte Modellprotein über Fluoreszenzgruppen verfügt, ist jede Kreuzreaktivität durch Antikörper ausgeschlossen. Die Banden sind zudem bei einer präparativen Präparation auch mit dem Auge sichtbar, so dass sie für eine Sequenzierung aus der Membran leicht ausgeschnitten werden können.

Die Stärke der Fluoreszenz zeigte jedoch eine Abhängigkeit von der verwendeten PVDF – Membran. Verschiedene Chargen an PVDF – Membranen zeigten einen unterschiedlich starken Hintergrund beim Nachweis. Teilweise konnte nur ein sehr schwacher Kontrast erreicht werden. Zudem ist der Nachweis sehr empfindlich gegen Staubpartikel, da diese im UV-Licht stark emittieren. Die verwendeten Lösungen beim Transfer der separierten Proteine auf die PVDF – Membran sowie die Waschlösungen müssen mit sehr reinem H₂O partikelfrei angesetzt werden. Eine weitere Limitation war durch die verwendete CCD – Kamera gegeben. Diese verfügt nur über eine geringe Auflösung von 640x480 Punkten bei 256 Graustufen. Hier wäre eine hochauflösende CCD – Optik mit mindestens 1024x768 Pixel bei 16 Millionen Farben von Vorteil. Eine farbige CCD – Optik würde es zudem ermöglichen, die grüne Fluoreszenz des angeregten FITC herausfiltern zu können. Damit könnte der Hintergrund vollständig eliminiert werden. Des Weiteren zeigt der Nachweis keine so starken Überstrahlungen [156].

4.1.2 Trennung der komplexen Zellsolubilisate in der Gelelektrophorese

Das verwendete Elektrophoresesystem hat einen erheblichen Einfluss auf die Trennung von komplexen Proteingemischen [156]. Für die hochauflösende eindimensionale Gelelektrophorese ist eine akribische Probenvorbereitung notwendig, um die maximale Auflösung zu erhalten. Das Laemmli – Elektrophorese System [92a] zeigte sich für die angestrebten Untersuchungen als ungeeignet [121], da das System bei der Auftrennung von Zellsolubilisaten eine schlechte Trennung im Bereich von 1-50 kD aufwies. Die nachzuweisenden Peptide der *in vivo* Prozessierung lagen in diesem Molekulargewichtsbereich. Das Schagger – Jagow Elektrophoresesystem basiert auf dem Leition Tricin und einem diskontinuierlichen Puffersystem [93]. Das Tricin Gelsystem zeigt einige Vorteile gegenüber dem *Laemmli* – System. Die Separation von Proteinen im Molekulargewichtsbereich

zwischen 1-100 kD kann mit einem 10% Gel bei einer niedrigen Konzentration an Crosslinker erreicht werden. Auf die Herstellung von Gradientengelen kann verzichtet werden, ein Vorteil für den Nachweis im Gel oder beim Elektroblothing. Zudem zeigt sich das Tricin - System im Gegensatz zum *Laemmli* - System weniger störanfällig bei hohen Probenmengen und Salzkonzentrationen des Probenpuffers.

Im Vergleich zu Glycin - Gelen nach *Laemmli* sind bei den Tricin - Gelen jedoch unschärfere Banden in Kauf zu nehmen. Zudem liegen die Banden unterschiedlichen Molekulargewichts abhängig von der Ionenstärke des Probenpuffers verschieden weit auseinander. Bei sehr hohen Ionenstärken wie bei den Proben für die Edmann - Sequenzierung liegen die Banden sehr nahe beieinander. Außerdem dauert die Trennung der Proteingemische im Tricin - System wesentlich länger und es sind höhere Stromstärken erforderlich.

Die zweidimensionale Trennung (erste Dimension IEF, zweite Dimension SDS - PAGE) komplexer Zellsolubilisate nach O'Farrell erwies sich als nahezu unmöglich. Ein Großteil der Proteine blieb bei der Auftrennung in den Rundgelen am oberen Rand der Rundgele hängen und wurde daher während der IEF nicht getrennt. Dies ist auf das komplexe Zellsolubilisat zurückzuführen. Möglicherweise verhindern Teile der Zellmembran das Eindringen der Proteine in die Gelmatrix. Ein Abzentrifugieren der Proben vor der Separation war nicht möglich, da ein Großteil der markierten Proteine und Proteinfragmente wegen ihres hydrophoben Charakters zusammen mit Zellwandbruchstücken ausfiel. Möglicherweise gibt es starke hydrophobe Wechselwirkungen des FITC - Markers mit den lipophilen Bestandteilen der Zellmembran. Die beschränkte Ladekapazität der Rundgele verhinderte zudem den Auftrag einer genügenden Probenmenge.

Um die eindimensionale Auftrennung der FITC - markierten Proteinfragmente und deren Nachweis bei geringsten Mengen zu verbessern sind andere Techniken vielversprechend. Chromatographische Verfahren wie die „*High Performance Size Exclusion Chromatographie* (HPSEC)“ mit einem Detektor kombiniert mit einer Fluoreszenzaktivierungseinheit konnten von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich für den Nachweis geringster Proteinmengen eingesetzt werden [157]. Auch der Einsatz der Kapillar - Elektrophorese könnte die Trennung und den Nachweis verbessern. Für zweidimensionale Trennungen sei hier auf das IPG - System verwiesen [158] .

4.1.3 Solubilisierungsbedingungen der Modellantigen – gepulsten Zellen

Einer der kritischen Punkte des Testsystems und ein entscheidender Faktor für dessen Reproduzierbarkeit ist die Solubilisierung der antigengepulsten Zellen. Bei der Lyse der Zellen ist darauf zu achten, dass freigesetzte zellulären Proteinasen und Peptidasen inaktiviert werden. Um diese Bedingung zu gewährleisten, wurde vor der Solubilisierung der Zellen ein komplexes Gemisch an Protease – Inhibitoren zugesetzt. Als zufriedenstellend erwies sich der Einsatz des Inhibitorgemisches *Complete* der Firma Roche. Hiermit wird durch die optimal aufeinander abgestimmte Kombination von Proteaseinhibitoren die vollständige Inaktivierung der Proteasen gewährleistet. Durch die Wahl des Lysepuffers mit einem pH von 8,0 und dem Zusatz von EDTA ist eine weitere Inhibition gewährleistet. Durch den hohen alkalischen pH ist die Reaktivität der sauren Proteinasen wie Kathepsin D inhibiert; saure Proteinasen sind nur bei einem pH kleiner als 7,0 aktiv. Das EDTA verhindert durch Komplexierung von zweiwertigen Metallionen die Funktion der membranständigen Metalloproteinasen. Durch diese Wirkkombination ist sichergestellt, dass der Abbau des FITC markierten Modellproteins intrazellulär erfolgt und kein Solubilisierungsartefakt darstellt.

Um Inkonsistenzen durch das Abernten und Umsetzen der Zellen zu verhindern, wurde die Solubilisierung direkt in den 24 Well – Platten durchgeführt. Um störendes Serumprotein zu entfernen, wurden die Zellen vor der Lyse zweimal mit PBS – gewaschen. Durch die hohe Adhärenz der Zellen an die beschichteten Kulturplatten konnte der Zellverlust minimiert werden. Als minimale Menge an Solubilisierungspuffer wurde 100µl verwendet. Für die Elektrophorese wurde jeweils 50µl des Solubisates mit der gleichen Menge an SDS – Probenpuffer versetzt. Hierdurch konnte eine hohe Reproduzierbarkeit des Systems erreicht werden. Die beiden Parameter Zellzahl und Puffermenge konnten durch das eingesetzte System weitgehend konstant gehalten werden.

4.2 In vivo Prozessierung von FITC – OVA

Die effiziente Beladung von MHC Klasse II – Molekülen mit Peptiden erfordert den proteolytischen Abbau sowohl der invarianten Kette als auch der antigenen Proteine [129]. Neuere Studien zeigen, dass für den Abbau der invarianten Kette die Cystein – Proteinase Kathepsin S und L essentiell sind. Die invariante Kette wird durch diese Proteinase in einem mehrstufigen Prozess abgebaut [159]. Als Endprodukt der Degradation von Ii werden MHC Klasse II – CLIP Komplexe erhalten [29a]. Diese stellen eine wichtige Zwischenstufe in der MHC Klasse II restringierten Antigenpräsentation dar.

Weit weniger ist über die am proteolytischen Abbau von Proteinantigenen beteiligten Proteinase und Chaperone bekannt. Während in früheren Studien besonders die lysosomalen Proteinase Kathepsin D und B diskutiert wurden [160] [161], geraten in neueren Studien zunehmend weitere Proteinase in den Fokus der Forschung [129]. Neben den Cysteinproteinase Kathepsin L und S werden auch die saure Proteinase Kathepsin E [162] sowie Legumain diskutiert [34]. Die Rolle von Exoproteinase wird zudem in Betracht bezogen, insbesondere die Tripeptidylpeptidase [163].

Um die Prozesse, die am proteolytischen Abbau von Proteinen beteiligt sind, näher zu erforschen, wurden in dieser Arbeit Experimente mit dem Modellprotein FITC-OVA durchgeführt. Diese bauten auf früheren Arbeiten auf [121]. In Kinetikexperimenten wurde versucht, die Kompartimente des endo-/lysosomalen Abbaus von FITC – OVA näher zu bestimmen. Durch den Einsatz von Proteinase - Inhibitoren wurde versucht, die an der Degradierung von FITC-OVA beteiligten Proteinase zu ermitteln. Die Experimente wurden an kultivierten KMMØ und DC's der Lewis – Ratte durchgeführt. Dabei wurden zudem verschiedene Aktivierungsstadien der KMMØ berücksichtigt. Die präparative Isolierung eines *in vivo* generierten Abbaufragmentes und dessen N – terminale Sequenzierung ergab schließlich Informationen über den potentiellen Abbaumechanismus von FITC – OVA.

4.2.1 Persistenz von FITC – OVA in KMMØ

Da das FITC markierte Ovalbumin nach UV - Aktivierung eine intensive Fluoreszenz emittiert, konnte die Aufnahme von FITC – OVA in KMMØ mikroskopisch beobachtet werden. FITC – OVA konnte bereits wenige Minuten nach Antigenzugabe in den Makrophagen beobachtet werden. Mit Langzeitversuchen konnte gezeigt werden, dass

die Fluoreszenz auch nach 72h noch messbar ist. Dies deutet auf eine lange Persistenz des Antigens bzw. seiner Fragmente in den KMMØ hin. Die gelelektrophoretischen Analysen zeigten, dass im Rahmen der gemessenen Zeiten nur ein kleiner Bruchteil des aufgenommenen FITC - OVA in den Zellen abgebaut wird. Auch 24h nach Antigenzugabe war in den Zellen durch Gelelektrophorese noch intaktes Protein nachzuweisen.

Die lange Persistenz des intakten Proteins in den Zellen ist von grundlegender immunologischer Bedeutung. Hiermit wird gewährleistet, dass die immunkompetenten, Antigenpräsentierenden- Zellen das Antigen vom Ort des ersten Kontakts zu den T - Zellarealen transportieren können oder solange das Antigen speichern können, bis weitere immunkompetente T-Zellen zum Ort der Entzündung gelangt sind . Hier kann dann die Immunantwort moduliert werden [164]. Dieser Mechanismus ist in Kontext mit der Peptidpersistenz bei Langerhans - Zellen zu stellen. In einer neuen Studie in unserem Labor konnte gezeigt werden, dass MHC Klasse II - gebundene Peptide in Langerhans - Zellen persistieren [165]. In den meisten Arbeiten wird die Peptidpersistenz durch eine Konser-vierung des MHC Klasse II - Peptid diskutiert. Hier wird besonders die irreversible Assoziation der Peptide mit MHC Klasse II favorisiert [166].

Durch die Persistenz des intakten FITC-OVA in den Zellen kann auch ein weiterer Mechanismus diskutiert werden. Da stets nur ein geringer Teil des Antigens abgebaut wird, steht immer das für die Beladung nötige Peptid zu Verfügung, bevor es durch Exopeptidasen vollständig abgebaut wird. Durch die Editierfunktionen von HLA - DM [71] wird immer das Peptid an MHC Klasse II gebunden, das die höchste Affinität zu diesem aufweist. Dies korreliert im besonderen mit dendritischen und Langerhans - Zellen. Diese können nur in einem frühen Reifungsstadien Proteine effizient internalisieren. Mit zunehmender Reifung verlieren die DC's und LC's diese Fähigkeit und transportieren immer mehr MHC Klasse II - Peptid Komplexe an die Oberfläche [24]. Durch die Persistenz des intakten Proteins ist somit gewährleistet, das während der Ausreifung immer genügend antigenes Peptid zur Verfügung steht.

Über die Ursache der langen Persistenz des intakten Proteins in KMMØ und DC's kann nur spekuliert werden. Möglicherweise gibt es in den endo-/lysosomalen Kompartimenten zahlreiche konkurrierende Abbaureaktionen. Auch eine geringe Affinität der Protein-asen zu dem Substrat könnte für die Persistenz ursächlich sein. Die lange Persistenz konnte nicht nur bei FITC - OVA, sondern auch bei DIG markiertem Ovalbumin beo-

bachtet werden [121]. Durch den Marker werden unter Umständen die Proteinase in ihrer Funktionalität inhibiert.

4.2.2 Abbaukinetik von FITC – OVA in KMMØ und DC

Für ein tiefergehendes Verständnis der Antigenprozessierung ist eine genaue Kenntnis der Abbaukinetik von Proteinantigenen nötig. Da das endo-/ lysosomale System in seinen Grundzügen gut verstanden ist, ist es möglich über eine Korrelation mit der Zeit den Abbauort innerhalb des endo- / lysosomalen Systems zu bestimmen [125]. Sind Fragmente innerhalb von fünfzehn Minuten nachweisbar, so werden diese bereits in den frühen Endosomen generiert. Bis zu einer Inkubationszeit von fünfzig Minuten entstehen die Fragmente in den späten Endosomen. Bei längere Dauer sind die Fragmente lysosomalen Ursprunges.

Wie die Experimente an KMMØ zeigten, ist die Abbaukinetik von FITC – OVA abhängig von deren Aktivierungsstadium. Vor allem LPS – stimulierte Makrophagen zeigten bei Gabe von Proteinaseinhibitoren eine Veränderung der Abbau - Kinetik. Möglicherweise werden durch die Proteinaseinhibitoren weitere, komplexe Vorgänge des endo-/lysosomalen Systems beeinflusst. Da die beteiligten Gene jedoch weitgehend unbekannt sind, gibt es in der Literatur hierzu keine weitere Information.

Gemeinsam ist allen Kinetikexperimenten an KMMØ und DC's, das nur zwei Abbauprodukte von FITC – OVA nachweisbar sind. Ein Fragment mit 40 kD sowie ein 30 kD Abbauprodukt, das jedoch erst später nachweisbar ist.

Die Makrophagen zeigen nach dreißig Minuten ein erstes Abbauprodukt. Dies weist daraufhin, dass die Prozessierung von FITC – OVA in den späten Endosomen beginnt. Das leichtere Fragment von 30 kD ist frühestens nach fünfzig Minuten nachweisbar. Die weitere Prozessierung des FITC – OVA findet demnach in den Lysosomen statt. Auch andere Studien zur Antigenprozessierung an B-Zellen zeigten, dass Abbaufragmente erst nach längere Inkubation mit dem Antigen nachweisbar sind [167]. Hier wurde eine ähnliche Abbaukinetik beobachtet. Auch Abbaustudien mit radioaktiv markierten Ovalbumin zeigten eine vergleichbare Kinetik [168].

Ein Vergleich der Abbaukinetik in DC's und Makrophagen zeigte nur geringe Unterschiede. So war bei den DC's und der DC depletierten Restpopulation, die hauptsächlich

lich aus Makrophagen und Granulozyten besteht, das schwerere Abbauprodukt mit 40 kD schon nach fünfzehn Minuten schwach nachweisbar. Auch das leichtere 30kD - Fragment ist früher nachweisbar, wenn auch nur sehr schwach.

Dendritische Zellen zeichnen sich durch eine erhöhte Präsentationsleistung und die Fähigkeit zur Primärstimulation von T-Zellen aus [18]. Diese Zellen verfügen über sehr effiziente Mechanismen zur Aufnahme von Antigenen. Besonders bemerkenswert ist die Fähigkeit zur Makropinozytose und die Aufnahme von Glykoproteinen über Mannoserezeptoren [169]. Dies ermöglicht es den DC's innerhalb von kürzester Zeit viel Antigen aufzunehmen und zu konzentrieren. Daher ist es möglich, dass durch die rezeptorvermittelte Endozytose eine höhere Konzentration an FITC-OVA in die DC aufgenommen wird und die Abbauprodukte trotz geringerer Zellzahl nachzuweisen sind.

Bemerkenswert bei den Kinetikversuchen ist, dass es keinerlei qualitative Unterschiede im Abbau des FITC - OVA durch verschieden aktivierte KMMØ und DC gibt. In allen Fällen sind die gleichen Abbauprodukte nachweisbar, ein frühes Fragment mit 40 kD und ein weiteres Produkt mit 30 kD. In früheren Studien zur Antigenprozessierung konnte bei verschiedenen B - Zell - Klonen kein qualitativer Unterschied festgestellt werden [167]. Der RT-PCR - Nachweis einiger bekannter Proteinase zeigte, dass die Makrophagen diese Enzyme unabhängig von ihrem Aktivierungsgrad alle für die Antigenprozessierung beschriebenen Proteinase exprimieren. Dies konnte in unserer Arbeitsgruppe auch für d0 und d3 Langerhans - Zellen nachgewiesen werden. Quantitative Unterschiede im Expressionsgrad sind mit der RT-PCR jedoch nicht nachweisbar, dies müsste durch eine kompetitive PCR erfolgen [170].

4.2.3 Einfluß von Proteinase - Inhibitoren auf die Prozessierung von FITC-OVA

Um Hinweise auf die an der Prozessierung von FITC - OVA beteiligten Proteinase zu erhalten, wurden gezielte Proteinaseinhibitions - Versuche durchgeführt. Hierbei wurde der Einfluss von zwei Breitbandinhibitoren, Pepstatin A und Leupeptin auf die Kinetik der Antigenprozessierung untersucht. Pepstatin A ist ein Inhibitor von sauren Proteinase wie Kathepsin D, Leupeptin ist ein potenter Inhibitor von SH - Proteinase wie Kathepsin B [171]. Für die Kinetikexperimente wurden beide Inhibitoren in einer für die Zellen nicht toxischen Konzentration eingesetzt. Bei dieser Konzentration ist in einer früheren Arbeit über die Prozessierung von Conalbumin durch Makrophagen die Wirksamkeit der Inhibitoren beschrieben worden [172]. Mittels dieser Experimente sollte

festgestellt werden, ob entweder eine SH- oder eine saure Proteinase für die ersten Prozessierungsschritte von FITC – OVA verantwortlich ist.

Beide Inhibitoren zeigten in *in vitro* Assays, dass sie die enzymatische Degradierung von Ovalbumin durch Kathepsin B oder D vollständig inhibieren können [121,168]. Die Inhibitionsversuche zeigten, dass in den für die Kinetikexperimente gewählten Konzentrationen kein Einfluss auf die Qualität des Abbaus von FITC – OVA messbar ist. So entstehen auch in der Gegenwart der Inhibitoren die gleichen Abbauprodukte mit einem Molekulargewicht von 30 kD und 40 kD. Bei den unstimulierten Makrophagen ist auch keine Veränderung in der Kinetik erkennbar. Hier zeigt sich das gleiche Bild wie bei den nicht mit Proteinaseinhibitoren behandelten Zellen.

Ein starker Einfluss der Inhibitoren auf die Kinetik der Prozessierung ist bei den LPS – stimulierten Makrophagen messbar. Während bei den LPS – stimulierten KMMØ in Abwesenheit der Inhibitoren das 40 kD - Fragment erst nach zwei Stunden nachweisbar ist, kann es unter dem Einfluss von Leupeptin bereits nach 50 Minuten nachgewiesen werden. Ist während des FITC-OVA Pulse Pepstatin A zugegen, so ist das 40 kD – Fragment bereits nach zwanzig Minuten nachweisbar. In beiden Fällen ist das 30 kD – Fragment nachweisbar, unter Leupeptin – Einfluss nach 120 min, bei Pepstatin A nach 60 min.

LPS ist ein Endotoxin gram- negativer Bakterien und beschleunigt inflammatorische Prozesse [173]. LPS aktiviert Makrophagen und Endothelzellen. Dabei stimuliert LPS die Freisetzung wichtiger Mediatoren wie TNF und freier Radikale [174]. Zudem werden zahlreiche Gene nach Aktivierung translatiert [175]. So könnten nach LPS – Aktivierung zelleigene Proteinaseinhibitoren wie Cystatin C freigesetzt werden [176]. Hierdurch werden große Teile des endo- lysosomalen Prozessierungsapparates inhibiert, so dass das FITC – OVA nur sehr langsam abgebaut wird. Dadurch dauert es länger, bis sich für den Nachweis genügend Material angesammelt hat. In einer neuen Studie konnte gezeigt werden, dass LPS die Prozessierung von boviner RNase und Hühner – Lsozym in Makrophagen inhibiert [177]. Hier wurde auch gezeigt, dass LPS die Endozytoseleistung von KMMØ reduziert. Durch Gabe von Proteinaseinhibitoren wird die Prozessierungsaktivität von unstimulierten Makrophagen wiederhergestellt. Dabei wirkt Pepstatin A stärker als Leupeptin. Durch die Inhibitoren wird möglicherweise der weitere Abbau von Vorstufen der zelleigenen Proteinase - Inhibitoren wie z.B. Cystatin A blockiert. Der

mehrstufige Abbau von Proteinen, der zum bioaktiven Wirkstoff führt, ist häufig beschrieben worden. Als klassisches System gilt die Aktivierung von Insulin, die über drei Schritte erfolgt [198]. Möglicherweise wird auch die verstärkte Sekretion von Prostaglandin [178] oder NO [179] durch die Inhibitoren verhindert, die beide einen negativen Effekt auf die MHC Klasse II - Expression ausüben. Hier kann ein Einfluss auf Synthesestufen oder benötigte Enzyme durch die Proteinaseinhibitoren nicht ausgeschlossen werden.

Bei den γ -Interferon stimulierten Makrophagen ist solch starker Einfluss der Proteinaseinhibitoren Pepstatin A und Leupeptin nicht messbar. Auch in diesem Fall gibt es keine qualitativen Unterschiede bei den generierten Fragmenten. Die Prozessierung von FITC - OVA konnte nicht inhibiert werden. Auch bei der Abbau - Kinetik zeigen die γ -Interferon stimulierten KMM \emptyset keine großen Unterschiede zu unstimulierten Makrophagen. Einzig das 40 kD - Fragment ist erst nach fünfzig Minuten nachweisbar. Pepstatin A zeigt keinen Einfluss auf die Kinetik der Antigenprozessierung bei unstimulierten Makrophagen. Das 40 kD FITC-OVA Fragment ist nach fünfzig Minuten nachweisbar. Bei γ - Interferon stimulierten KMM \emptyset ist kein Einfluss von Pepstatin A auf die Kinetik der Antigenprozessierung zu messen. Bei Leupeptin behandelten γ -KMM \emptyset stellt sich dagegen wieder die selbe Kinetik wie bei unstimulierten, nicht mit Inhibitoren behandelten Makrophagen ein. Hier gilt möglicherweise ein ähnlicher Mechanismus wie bei den LPS - stimulierten Makrophagen.

4.2.4 Gezielte Inhibition von endo- /lysosomalen Proteinase

Insgesamt zeigten die Kinetikexperimente, dass durch die Proteinase - Inhibitoren in der gewählten Inhibitor - Konzentration ein Abbau von FITC - OVA in Makrophagen nicht blockiert werden konnte. Ähnliches ist auch in der Literatur bei vergleichbaren Studien zur Antigenprozessierung festgestellt worden [167,168]. Studien an *Knock-out* Mäusen haben gezeigt, dass weder Kathepsin B noch Kathepsin D für die Antigenprozessierung notwendig sind [180]. In neueren Studien wird neben Kathepsin S [129] auch Kathepsin E eine wichtige Rolle bei der Antigenprozessierung zugeschrieben [181]. Möglicherweise sind auch weitere Proteinase an der Prozessierung beteiligt. Hier könnte die erst kürzlich entdeckte Proteinase Legumain eine wichtige Rolle spielen [34]. Zudem könnte auch ein komplexes, Multi - Domänen Enzym mit proteolytischer und Chaperon Aktivität an der Prozessierung beteiligt sein [182].

Um die beteiligten Proteinase weiter einzuengen, wurden weitere Proteinase – Inhibitoren eingesetzt. Nach jeweils vierstündiger Inkubation wurden der Abbau von FITC – OVA untersucht. Dabei zeigte sich, dass einzig Pepstatin A in sehr hoher Konzentration den Abbau von FITC – OVA teilweise inhibieren konnte. In diesem Fall entstand ein Fragment mit einem Molekulargewicht von 45 kD. Alle anderen Proteinase – Inhibitoren, vor allem die SH – Inhibitoren konnten den Abbau von FITC – OVA auch in sehr hohen Konzentrationen nicht inhibieren. Für den initialen Schnitt von FITC – OVA scheint eine saure Proteinase verantwortlich zu sein, die sich nur in hohen Dosen von Pepstatin A inhibieren lässt. Der Inhibitionsversuch legte eine zweistufigen Abbauprozess mit schnell aufeinander folgenden Schnitten nahe. Eine weitere Eingrenzung der am Abbau von FITC – OVA beteiligten Proteinase wurde durch die Edmann – Sequenzierung des 40 kD – Fragmentes versucht.

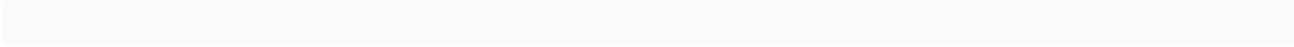
4.2.5 Sequenzierung des intrazellulär generierten FITC-OVA 40 kD – Fragmentes

Die N – terminale Sequenzierung des 40 kD – Fragmentes erbrachte Hinweise dafür, dass der proteolytische Abbau von FITC – OVA in zwei schnell aufeinander folgenden Schritten erfolgt. Das Zwischenprodukt mit einem Molekulargewicht von 45 kD ist nur durch die Inhibition einer Pepstatin A sensitiven Proteinase zugänglich. Es kann jedoch ausgehend von der Sequenz nicht entschieden werden, welcher der beiden Schnitte der erste ist.

Die Sequenzierung ergab, dass eines der dominanten RT1.B^I OVA – Epitope, das OVA₃₂₃₋₃₃₉ als eines der ersten Peptide im Verlauf der Prozessierung von Ovalbumin gebildet wird. Das gebildete Fragment ist größer als das an RT1.B^I gebundene OVA – Peptid [183]. Das abgespaltene Peptid ab Aminosäureposition 300 bindet vermutlich im ganzen an das RT1.B^I – Molekül und wird möglicherweise terminal von Exopeptidasen getrimmt [36]. Dabei bleibt das Core – Peptid in der Bindungsgrube des RT1.B^I – Moleküls erhalten. Das OVA₃₂₃₋₃₃₉ Peptid ist als hochaffin – bindendes Peptid für RT1.B^I beschrieben worden [184].

Die Sequenzierung erbrachte keinen Aufschluss über die an der Prozessierung beteiligten Proteinase. Ein Vergleich der Schnittsequenz mit der Substratspezifität von bekannten endo-/lysosomalen Proteinase erbrachte keinerlei Übereinstimmung. Es ist davon auszugehen, dass eine Proteinase mit noch nicht bekannter Spezifität für die proteolytische Spaltung verantwortlich ist. Ein potentieller Kandidat ist die Proteinase Le-

gumain [34]. Auch eine Abspaltung von Di- und Tripeptiden durch Exopeptidasen ist vorstellbar. Hier ist besonders Kathepsin H zu erwähnen, da dessen Expression durch Stimulation mit γ -Interferon in M \emptyset heraufreguliert wird [185].



4.3 „*Molecular Modelling*“-Methoden

Das komparative Protein – Modelling nutzt experimentell ermittelte Proteinstrukturen als „Templates“ um die Konformation eines anderen, sogenannten „Target“ - Proteins mit homologer Aminosäuresequenz vorausszusagen [186]. Diese Annäherung ist möglich, da eine kleine Änderung in der Sequenz normalerweise nur zu kleinen Änderungen in der dreidimensionalen Struktur führt [187]. Die Molecular Modelling Programme beruhen zur Zeit auf newtonschen Algorithmen.

4.3.1 Klassische Mechanik beim *Molecular Modelling*

Systeme auf atomarer Ebene gehorchen im allgemeinen mehr den Gesetzen der Quanten- als den der klassischen Mechanik. Demzufolge müsste stets die *Schrödinger* - Gleichung für solche Systeme gelöst werden. Dies ist zur Zeit nur für wenige Atome und deren Elektronen möglich. Daher wird als Näherung stets ein klassischer Ansatz gewählt.

In der newtonschen Mechanik kann ein Partikel jede Energie aus einem Kontinuum von Energiewerten annehmen. In der Quantenphysik ist die Energie dagegen gequantelt und kann nur diskrete Energiewerte annehmen. Bei sehr niedrigen Temperaturen sind die Abstände zwischen den einzelnen, diskreten Energien größer als die thermische Energie. Daher kann das System bei diesen Temperaturen nur wenige Zustände einnehmen. Mit steigender Temperatur werden immer mehr Zustände thermisch erreichbar. Die „Diskretheit“ der einzelnen Zustände wird dabei immer unschärfer und das System verhält sich nach klassischen Gesetzen [188].

Für einen klassischen Oszillator sind die gequantelten Energien separiert durch $\Delta E = hf$ mit h als Plank'sche Konstante und f als die Frequenz der harmonischen Schwingungen. Klassisches Verhalten wird erreicht bei Temperaturen für die $k_B T \gg hf$ mit k_B als Boltzmann - Konstante und $k_B T = 0,6$ kcal/mol bei 300 K. Setzt man $hf = 0,6$ kcal/mol so ergibt sich $f = 6,25/\text{ps}$. Damit ist für Bewegungen mit charakteristischen Zeiten von ps oder länger bei Raumtemperatur die klassische Mechanik als Approximation ausreichend.

4.3.2 *Molecular Modelling* Algorithmen

Alle jetzigen komparativen Modelling Methoden vollziehen vier sequentielle Schritte [189]. Der erste Schritt beinhaltet, verwandte Proteine mit bekannten 3D – Strukturen zu ermitteln. Im zweiten Schritt wird die Zielsequenz mit den bekannten Strukturen „aligned“ und die Template – Strukturen ausgewählt. Als nächstes wird ausgehend vom Alignment ein Strukturmodell für die „Target“ – Sequenz errechnet. Als letzter Schritt wird das berechnete Modell nach einer Vielzahl von Kriterien evaluiert. Wenn nötig, wird das Alignment korrigiert und die Schritte solange wiederholt, bis ein zufriedenstellendes Modell errechnet wurde.

Der Hauptunterschied der verschiedenen komparativen Modelling – Methoden liegt im Algorithmus für die Berechnung des 3D – Models ausgehend vom Alignment. Hier lassen sich drei grundsätzliche Methoden unterscheiden: *Modelling using rigid-body assembly*, *Modelling by segment matching* und *Modelling by satisfaction of spatial restraints* [190].

Die *Rigid-Body* Methode konstruiert das Modell aus wenigen *Core* – Regionen und die Loops und Seitenketten von verwandten Strukturen. Der Zusammenbau des Modells passt die *Rigid-Bodies* in ein sogenanntes Gerüst ein, das durch den Durchschnitt der Backbone $C\alpha$ - Atome der konservierten gebildet wird [191].

Die *Segment-matching* Methode beruht auf approximierten Positionen der konservierten Atome der Templates. Ausgehend von diesen Positionen werden die anderen Atomkoordinaten errechnet. Hierbei wird eine Datenbank genutzt, die kurze Segmente von Strukturen, Energie oder geometrische Regeln enthält [192].

Die in dieser Arbeit genutzte Methode gehört zur dritten Gruppe und ist im Programm Modeller implementiert worden [193]. Hierbei werden räumliche Beschränkungen erfüllt, die aus dem Alignment der „Template“ – Strukturen mit der „Target“ – Sequenz abgeleitet werden. Hierbei werden vor allem Distanz- und dihedrale Winkelbeschränkungen berücksichtigt. Das Modell wird dann durch Optimierung der Objekt – Funktion errechnet.

4.3.3 Qualität der komparativen *Modelling* Methoden

Das komparative Modelling ist zur Zeit die einzige Methode, die Modelle mit einem R.M.S (Quadratwurzelfehler) – Fehler kleiner als zwei Å ergibt [194]. Die typischen Strukturfehler lassen sich in vier Kategorien unterteilen: Fehler in der Anordnung der Seitenketten, Verzerrungen in homologen Regionen (z.B. Loops, Helices), Fehler bei Insertionen

sowie Fehler in inkorrekt „alignten“ Regionen (z.B. Loops und längere Segmente mit niedriger Sequenzidentität zu den Templates) [195].

Eine Konsequenz dieser Fehler ist, dass das komparative Modelling zu Modellen mit einer RMS - Abweichung von nur einem Angstrom von 90% der Hauptketten - Aminosäuren führt, wenn eine mindestens 40%ige Identität der Targets zu den Templates vorliegt [195]. In diesem Bereich der Sequenzähnlichkeit ist ein korrektes Alignment entscheidend für die Qualität der Modelle. Zudem sollten nicht zu viele Lücken und Insertionen zwischen Templates und Targets bestehen. Die Differenzen zwischen den Referenzstrukturen sollten sich auf Loops und Seitenketten beschränken. Mit höherer Identität der Aminosäuren steigt die Qualität der Modelle weiter an. Typische Modellfehler und inakkurat modellierte Regionen werden von den gebräuchlichen Evaluierungsmethoden identifiziert [196].

Im Vergleich zu automatischen Alignmentmethoden werden bessere Modelle erzielt, wenn das Alignment sorgfältig von Hand überprüft und editiert wird [190]. Beim Modelling der RT1.B^I - Komplexe konnte festgestellt werden, dass ein inkorrektes Alignment zu falschen Modellen führt. So zeigten sich deutliche Verschiebungen in den Sekundärstrukturen. Besonders kritisch war der Carboxy - Terminus des Moleküls, da die Templates in diesem Bereich unterschiedliche Anfangspositionen hatten. Durch die Insertionen und Deletionen in den RT1.B^I - Sequenzen gegenüber den HLA-DR und I-E - Molekülen, konnten mit diesen Templates keine fehlerfreien Modelle generiert werden. Dies war nur mit den murinen I-A - Strukturen als Referenz möglich. Hiermit konnten weitgehend fehlerfreie Modelle generiert werden. Eine nachfolgende Energieminimierung konnte die Qualität der Modelle weiter verbessern.

Insgesamt ergibt das Modelling Modelle, deren Qualität zwischen denen einer Röntgenstrukturanalyse und einem NMR - Experiment liegt [190]. Aufgrund der hohen Sequenzidentität zwischen RT1.B^I und I-A^k sowie der hohen Auflösung der Referenzstruktur 1IAK von 1,9 Å sind die erzielten Ergebnisse für die gewünschte Fragestellung brauchbar.

4.3.4 Docking von Peptiden in das RT1.B - Molekül

Die besondere Herausforderung bei der Vorhersage von Protein - Ligand Komplexen liegt darin, mittels rechnerischer Methoden Koordinaten für den gebundenen Komplex zu ermitteln. Hierbei sollen auch die Konformationsänderungen von Ligand und Rezeptor er-

mittelt werden [197]. Bei den zur Zeit verfügbaren Programmen wird die Struktur des Proteins, des Liganden, starr gehalten. Das Substrat kann dagegen flexibel sein, jedoch nur in geringem Ausmaß. Das verwendete Programm AutoDock 3 erlaubt zweiunddreißig flexible Torsionen [115]. Hiermit können jedoch nur kleine Substrate flexibel gehalten werden. Um typische MHC Klasse II - Substrate in die Bindungsgrube einpassen zu können, ist die gesamte C α - Backbone des Peptides starr zu halten. Die Substrate von MHC Klasse II - Molekülen zeigen zwar alle eine grundlegende Backbone Konformation, diese ist jedoch nicht starr [38 b].

Das Scheitern des „Dockings“ von Peptiden in das leere RT1.B^I - Molekül mit AutoDock 3 kann mehrere Ursachen haben. Zum einen könnte die Flexibilität von Ligand und/oder Rezeptor zu niedrig sein. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Bindung des Peptids im MHC Klasse II Molekül eine Konformationsänderung hervorruft. Dies würde einen „*induced fit*“ implizieren, wie er für viele Enzym-Substrat Komplexe beschrieben ist [198]. Die Peptid - RT1.B^I Komplexe zeigen sowohl untereinander als auch gegenüber dem leeren Protein Konformationsunterschiede. Diese sind jedoch nur gering und zeigen sich hauptsächlich in den Loop - Bereichen. Auch Programmfehler könnten für das Scheitern verantwortlich sein. Während das Docking mit kleinen Substraten bis zu 60 Atomen gelang, könnten die Peptide mit mehr als 100 Atomen zu groß sein. Dies könnte zu internen Programmfehlern führen. Auch das Fehlen von Peptidtaschen in der Bindungsgrube des RT1.B^I - Moleküls im Vergleich zum HLA-DR Molekül könnte für das Fehlschlagen des automatischen Peptid - Dockings verantwortlich sein. Es könnte ein wichtiger, initialer Strukturanker fehlen. In einer Dockingstudie eines Antikörper - Hämagglutinin - Komplexes konnte keines der zur Zeit verfügbaren Programme eine korrekte Struktur ermitteln [199]. Auch hier sind keine tiefen Taschen in beiden Strukturen vorhanden. Viele Enzym - Substrat Komplexe zeigen an der Interaktionsstelle solche Taschen. Möglicherweise sind die zur Zeit verfügbaren Methoden auf solche Strukturanker angewiesen.

Das direkte Modelling von RT1.B^I - Molekülen mit Peptiden brachte dagegen nach einer nachfolgenden Energieminimierung stereochemisch sehr gute Modelle hervor. Teilweise zeigte das HEL - Peptid die gleichen Wasserstoffbrückenbindungen im RT1.B^I und I-A^k - Molekül. Dieser Befund weist daraufhin, dass die Modelle sehr nahe an den tatsächlichen Strukturen liegen. Die Fehler, die Modeller 4 beim Peptid aufgrund des falschen Alignment macht, werden durch die Energieminimierung wieder wettgemacht. Das Ver-

fahren, die Peptide direkt mit dem RT1.B^I – Molekül zu modellieren brachte zudem den Vorteil, dass auch das Substrat flexibel gehalten wurde. Dieses Verfahren ist jedoch nur möglich, wenn die initialen Koordinaten des Liganden festgesetzt werden. Aufgrund der hohen strukturellen Homologie der MHC Klasse II – Moleküle und der Peptide untereinander ist dies möglich [38 b].

4.4 Bindung von Peptiden an das RT1.B^I – Molekül

MHC Klasse II – Moleküle können eine Vielzahl von verschiedenen Peptiden binden [200]. Die Bindung von Peptiden ist spezifisch für bestimmte Allele und Isotypkomplexe. Die Allelspezifität wird größtenteils durch polymorphe Taschen in der Bindungsgrube der MHC Klasse II - Moleküle determiniert. In diese Taschen passende Peptide sollten hochaffin gebunden werden. Bindungsmotive für das RT1.B^I – Molekül wurden in früheren Studien in Kenntnis der Röntgenstruktur von HLA - DR und der Sequenzanalyse von eluierten Peptiden abgeleitet [152,184]. Diese Studien zeigten jedoch, dass es schwierig ist, für das RT1.B^I – Molekül aus den bekannten Daten ein Bindungsmotiv abzuleiten. Neuere Röntgenstrukturanalysen der murinen RT1.B^I Homologen I-A^d und I-A^k zeigten, dass diese MHC Klasse II - Moleküle im Vergleich zu humanen HLA – DR und murinen I-E Molekülen über keine großen Ankertaschen verfügen [136,137]. Daher wurden auf der Basis der murinen I-A – Moleküle Modelle für das RT1.B^I Molekül mit gebundenem Peptid mittels *Molecular Modelling* abgeleitet. Hierbei wurden neben den HEL₅₀₋₆₂ und OVA₃₂₃₋₃₃₅ – Peptiden auch das wichtige Zwischenprodukt in der Reifung von MHC Klasse II – Molekülen [134], RT1.B – CLIP untersucht.

4.4.1 Vergleich der Bindung von CLIP₈₈₋₁₀₀ und CLIPm₈₈₋₁₀₀

Die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten von CLIP₈₈₋₁₀₀ und CLIPm₈₈₋₁₀₀ erlauben es, die Unterschiede zwischen *low*- und *high*-Bindern herauszuarbeiten. Die MHC Klasse II – CLIP – Komplexe sind zudem von besonderem Interesse, da sie als SDS – instabil beschrieben wurden [66a-b]. Mit Hilfe des Molecular Modellings wurde versucht, die molekulare Basis für diesen Effekt bei den RT1.B^I – Molekülen zu untersuchen. Ein Vergleich der verschiedenen errechneten Ratten – MHC –Komplexe ergab, dass es nur geringfügige Unterschiede zwischen den einzelnen Modellen gab. Ähnliches wurde auch beim Vergleich der HLA – DR1-HA und DR3-CLIP – Struktur beobachtet. Auch gab es nur geringe

konformelle Unterschiede [134]. Eine strukturelle Grundlage für die SDS – Instabilität konnte auch bei den RT1.B^I – Molekülen nicht gefunden werden.

Ein Vergleich des RT1.B – CLIP Komplexes mit der CLIP – Mutante zeigte, dass sich der einzelne Austausch einer Aminosäure auf die gesamte Bindung des Peptides auswirkt. Dies deutet daraufhin, dass es bei den RT1.B^I – Molekülen einen *induced – fit* Mechanismus gibt. Nicht nur das Peptid zeigt konformelle Änderungen, sondern auch das RT1.B^I – Molekül. So zeigen sich deutliche Unterschiede in der Ausbildung von Wasserstoffbrücken – Bindungen. Zudem werden auch andere *van der Waals* – Kontakte ausgebildet. Besonders signifikant sind die Unterschiede am Carboxyterminus und im Bereich um die ausgetauschte Aminosäure. Dies ist zum Teil darauf zurückzuführen, dass sich das mutierte Peptid bei den Seitenketten anders faltet. Die geringere Bindungsaffinität des CLIP_{m88-100} ist möglicherweise auf die geringere Zahl der Wasserstoffbrücken – Bindungen des CLIP – SER88 mit dem RT1.B^I – Molekül zurückzuführen. Ähnlich wie das zu HLA – DR gering affine humane CLIP liegt das CLIP_m tiefer in der Bindungsgrube als CLIP [134]. Besonders das N – terminale PRO100 geht zahlreiche Wasserstoffbrücken – Bindungen mit dem RT1.B^I – Molekül ein.

4.4.2 Vergleich des I-A^k – HEL und RT1.B – HEL – Komplexes

Die RT1.B^I – Peptid – Komplexe wurden durch komparatives Modelling mit dem I-A^k – Molekül abgeleitet. Daher ist eine große Ähnlichkeit der Moleküle untereinander zu erwarten. Ein Konformationsvergleich der beiden Moleküle konnte diese Erwartung bestätigen.

Beide Moleküle gehen ähnliche Kontakte mit dem HEL₅₀₋₅₂ – Peptid ein, besonders im Bereich der konservierten Aminosäuren. Es ist daher zu erwarten, dass das RT1.B^I – Molekül ein ähnliches Bindungsmotiv ausbildet wie das I-A^k – Molekül. So bilden beide eine ähnliche Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen aus. Das HEL – Peptid ist jedoch nur als *low-Binder* für RT1.B^I beschrieben [153], für I-A^k jedoch als *High-Binder* [137]. Ähnlich wie bei den beiden CLIP- Peptiden ist auch hier keine direkte strukturelle Basis für das unterschiedliche Bindungsverhalten zu erkennen.

Bei den bisherigen Betrachtungen über die Bindungsaffinität der einzelnen Peptide wurden die H₂O – Moleküle außer acht gelassen. Die Kristallstruktur des I-A^k – Moleküls zeigt, dass zahlreiche Peptid – MHC Klasse II – Interaktionen durch Wassermoleküle

vermittelt werden [137]. Solche vermittelten Kontakte sind jedoch nur in dieser Struktur berücksichtigt. Dies kann mit der hohen Auflösung dieser Struktur zusammenhängen.

4.4.3 Analyse des RT1-B^I – OVA₃₂₃₋₃₃₅ Komplexes und hypothetischer Wirkmechanismus von DM

Das OVA₃₂₃₋₃₃₅ – Peptid ist in mehreren Studien als RT1.B^I *High-Binder* beschrieben worden [152,153]. Bei den untersuchten Peptid – RT1.B^I – Komplexen bildet das OVA – Peptid die meisten Wasserstoffbrücken – Bindungen aus. So werden vier Wasserstoffbrücken mehr ausgebildet als beim ebenfalls als *High-Binder* beschriebenen CLIP – Peptid. Während CLIP jedoch in Gegenwart von DM gegen andere Peptide ausgetauscht wird, ist die hohe Anzahl an Wasserstoffbrücken – Bindungen als Kriterium sowohl für hohe Bindungsaffinität als auch DM – Resistenz zu deuten. Als einziges untersuchtes Peptid bildet das OVA – Peptid mit jeder Aminosäure Wasserstoffbrückenbindungen mit dem RT1.B^I – Molekül aus. In einer neueren Studie wurde vor allem die Ausbildung einer Wasserstoffbrücken – Bindung zwischen HIS β81 und gebundenem Peptid als kritisch für die Ausbildung von stabilen MHC Klasse II – Peptid Komplexen festgestellt [201]. Alle untersuchten Peptid – RT1.B^I – Komplexe bilden diese Wasserstoffbrücken – Bindung aus. Die besondere Stabilität von OVA – und CLIP – RT1.B^I – Komplexen ist möglicherweise auf das Ausbilden von Wasserstoffbrücken zu fast allen Aminosäuren zurückzuführen.

Die Studien an verschiedenen RT1.B^I – Peptid Komplexen zeigen einen möglichen Mechanismus für das Peptid – Editing durch DM – Katalyse auf. Da einzig beim OVA₃₂₃₋₃₃₅ – Peptid alle Aminosäuren Wasserstoffbrücken – Bindungen mit RT1.B^I eingehen, ist ein DM – Wirkmechanismus anzunehmen, der diese Bindungen aufspaltet. Zudem deuten die Ergebnisse und weitere Studien [201] auf einen kooperativen Mechanismus der Peptid – Dissoziation hin. Ein ähnlicher kooperativer Mechanismus steuert die Sauerstoffbindung beim Hämoglobin – Molekül [202]. Hier wirkt die Kooperativität jedoch auf der Ebene der Wasserstoffbrücken – Bindungen. Sind von einer Aminosäure des Peptides die Wasserstoffbrücken zur Peptidbindungsgrube bereits gebrochen oder nicht vorhanden, so können hierdurch andere intermolekulare Interaktionen destabilisiert werden. Dies würde besonders Peptide mit weniger guten Bindungsenergien beeinflussen. In früheren Studien wurde gezeigt, dass *High-Binder* relativ resistent gegenüber DM sind [203]. Die DM – Funktion könnte darin liegen, eine oder mehrere Wasserstoffbrücken –

Bindungen zwischen Peptid und MHC Klasse II – Molekül zu destabilisieren oder zu brechen. Durch den kooperativen Mechanismus würden dann weitere intermolekulare Interaktionen leichter brechen, was letztlich zur Peptid – Dissoziation führt [53]. Diese verstärkte Peptid – Dissoziation kann ohne globale Änderungen in der MHC Klasse II – Konformation erreicht werden. Dafür würde das einzelne Brechen einer freien, gut zugänglichen Wasserstoffbrücken – Bindung wie die durch HIS β 81 vermittelte ausreichen [201]. Auf diese Weise könnte auch der Mechanismus der SDS – Instabilität mancher Peptid – MHC Klasse II – Komplexe erklärt werden.

5. Literatur

- 1 **Breckow, J. und R. Greinert:** Biophysik - Eine Einführung; de Gruyter Lehrbuch 1. Aufl.: 207; 1994
- 2 **Abbas, A.K., A.H. Lichtman, & J.S. Pober :** Cellular and Molecular Immunology, 2. ed., W.B. Saunders; 1994
- 3 **Zinkernagel, R.M. & P.C. Doherty :** MHC-restricted cytotoxic T-cells: Studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens during T-cell restricted specificity, function and responsiveness; *Adv. Immunol.* 27:52; 1979
- 4 a **Roitt, I. :** Essential Immunology, 7. ed., Blackwell Scientific Publications; 1991
- b **Keller, R. :** Immunologie und Immunpathologie-Eine Einführung, 2. Aufl., Thieme; 1981
- 5 **Momburg, F. und G. Hammerling:** Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules.; *Adv Immunol.* 68:: 191-256; 1998
- 6 **Unanue, E.R., M.E. Dorff, C.S. David & B. Benacerraf :** The presence of I-region associated antigens on B-cells in molecules distinct from immunoglobulins and H-2K and H-2D; *Proc. Natl. Acad. Sci* 71:5014; 1974
- 7 **Steinmann, R.M. & N.C. Nussenzweig :** Dendritic cells: features and functions; *Immunol. Rev.* 53:127; 1980
- 8 **Stingl, G., K. Tamaki, K. & S.I. Katz :** Origin and function of epidermal Langerhans cells; *Immunol. Rev.* 53:127; 1980
- 9 a **Reske, K., U. Mohle, D. Sun & H. Wekerle :** Synthesis and cell surface display of class II determinants by long-term propagated rat T line cells; *Eur. J. Immunol.* 17:909; 1987
- b **Heuer, J., E. Kölsch & Reske, K. :** Expression and function of class II I-AK antigens on an antigen specific T-suppressor cell clone; *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 126:131; 1986
- c **Reske-Kunz, A.B., K. Reske & E. Rüdte :** Cloned murine Ia⁺ BK-2.6.C.6 T cells function as accessory cells presenting protein antigens to long term cultured antigen-specific T cell lines; *J. Immunol.* 136:2033; 1986
- 10 **Hämmerling, G.H., G. Mauve, E. Goldberg & H.O. McDevitt :** Tissue distribution of Ia-Antigens: Ia in spermatozoa, macrophages and epidermal cells; *Immunogenetics* 1:428; 1975
- 11 **Hertz, L., D.E. McFarlin & B.H. Waksman :** Astrocytes: auxiliary cells for immune responses in the central nerve system?; *Immunol. Today* 11:265; 1990
- 12 **Nunez, G., E.J. Ball & P. Stastny :** Accessory cell function of human endothelial cells. I. A subpopulation of Ia positive cells is required for antigen presentation; *J. Immunol.* 131:666; 1983
- 13 **Austyn, J.M. :** Lymphoid dendritic cells; *Immunology* 62:161; 1987
- 14 **Crowley, M.T., K. Inaba, M.D. Witmer-Pack, S. Gezelter & R.M. Steinman :** Use of the fluorescence activated cell sorter to enrich dendritic cells from mouse spleen; *J. Immunol. Meth.* 133:55; 1990
- 15 a **Steinman, R.M. and Z.A. Cohn :** Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II: functional properties in vitro. *J. Exp. med.* 139: 380; 1974
- b **Steinman, R.M. & Z.A. Cohn :** Identification of a novel cell type in lymphoid organs of mice. I.: Morphology, quantitation, tissue distribution; *J. Exp. Med.* : 137:1142; 1973
- c **Steinman, R.M., D.S. Lustig & Z.A. Cohn :** Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. III. Functional properties in vivo; *J. Exp. Med.* 139:1431; 1974
- 16 **Hart, D.N.J & J.W. Fabre :** Demonstration and characterization of Ia dendritic cells in the intestinal connective tissue of rat heart and other tissues, but not brain; *J. Exp. Med.* 154:347; 1981
- 17 **Steinman, R.M & M.C. Nussenzweig :** Dendritic cells: Features and functions; *Immunol. Rev.* 53:127; 1980

- 18 **Steinman, R.M.** : The dendritic cell system and it's role in immunogenicity; *Annu.Rev.Immunol.* 9:271; 1991
- 19 **Sallusto, F., M.Cella, C. Danieli & A. Lanzavecchia** : Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products; *J.Exp.Med.* 182:389; 1995
- 20a **Scheicher, C., M. Mehlig, H.P. Dienes & K.Reske** : Uptake of microparticle-adsorbed protein antigen by bone marrow-derived dendritic results results in upregulation of Interleukin-1 and Interleukin-12 p40/p35 and triggers prolonged, efficient antigen presentation; *Eur. J. Immunology* 25:1566
- b **Mehlig, M., C.Scheicher, H.P. Dienes & K.Reske** : Development of rat DC by in vitro culture of bone marrow cells; *International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology, Annecy, F; 1994*
- c **Inaba, K., M.Inaba, M.Naito & R.M: Steinman** : Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including Bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo; *J.Exp. Med* 178:479; 1993
- 21 **Xia W., C.E. Pinto & R.L. Kradin** : The antigen-presenting activities of Ia+ dendritic cells shift dynamically from lung to lymph node after an airway challenge with soluble antigen; *J.Exp.Med* 181:1275; 1995
- 22 **Boog, C.J.P., J.J. Neefjes, J. Boes, H.L. Ploegh & C.J.M. Melief** : Specific immune response restored by alteration in carbohydrate chains of surface molecules on antigen-presenting cells; *Eur.J.Immunol* 19:537; 1989
- 23a **Sprent, J., M. Schaefer** : Antigen-presenting cells for CD8+ T cells; *Immunol.Rev.* 117:213; 1990
- b **Springer, T.A.** : Adhesion receptors of the immune system; *Nature* 346:425; 1990
- c **Viola, A. & A. Lanzavecchia** : T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds; *Science* 273:104; 1996
- 24 **Cella, M., F. Sallusto & A. Lanzavecchia** : Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells; *Curr.Opin.Immunol.* 9:10; 1997
- 25 **Metchnikoff, E.**: *Immunity to Infectious Diseases*; Cambridge Univ. Press; 1905
- 26 **Adams, D.O. und Hamilton A. Thomas**: *The Cell Biology of Macrophage Activation*; *Ann. Rev. Immunol.*2: 283-318; 1984
- 27 **Beller, D.I., J.M. Keily und E. R. Unanue**: Regulation of macrophage populations.Preferential induction of Ia-rich peritoneal exudates by immunological stimuli; *J. Immunol.*124: 1426; 1980
- 28 **Cohn, Z.A.**: The activation of mononuclear phagozytes : fact, fancy and future; *J. Immunol.* 121: 813-816; 1978
- 29 a **Cresswell, P.** : Assembly, transport, and function of MHC class II molecules; *Annu. Rev. Immunol.* 12:259; 1994
- b **Pieters, J.** : MHC class II restricted antigen presentation; *Curr.Opin. Immunol.* 9:89; 1997
- 30 **Roche, P.A.** : HLA-DM:An in vitro faciliator of MHC class II peptide loading; *Immunity* 3:259; 1995
- 31 **Fineschi, B. und J. Miller**: Endosomal proteases and antigen processing; *TIBS*22: 377.382; 1997
- 32 **Neefjes, J.**: CIIV, MIIC and other compartments for MHC class II loading; *Eur. J. Immunol.*29: 1421-1425; 1999
- 33 **Deussing, J., W. Roth, P. Saftig, Peters, C., H.L. Ploegh und J. A. Villadangos**: Cathepsin B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation; *Proc. Natl. Acad. Sci.*95: 4516-4521; 1998
- 34 **Manoury, B., E.W. Hewitt, N. Morrice, P.M. Dando, A.J. Barret und C. Watts**: An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation; *Nature*396: 695-699;

- 1998
- 35 **Lindner, R. und E. R. Unanue:** Distinct antigen MHC class II complexes generated by separate processing pathways; *EMBO*16: 6910-6920; 1996
- 36 **Nelson, C.A., I. Vidavsky, N.J. Viner, M.L. Gross und E. R. Unanue:** Amino-terminal trimming of peptides for presentation on major histocompatibility complex class II molecules.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*94: 628-633; 1997
- 37 **Kappes, D. and J.L. Strominger :** Human class II major histocompatibility complex genes and Proteins; *Annu.Rev.Biochem* 57:991; 1988
- 38 a **Stern, L.J., J.H. Brown, T.S. Jardetzky, J.C. Gorga, R.G. Urban, J.L. Strominger & D.C. Wiley :** Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide; *Nature* 368:215; 1994
- b **Jardetzky, T.S., Brown, J.H., J.C. Gorga, L.C. Stern, R.G. Urban, J.L. Strominger, D.C. Wiley :** Crystallographic analysis of endogenous peptides associated with HLA-DR1 suggests a common, polyproline II-like conformation for bound peptides; *Proc.Natl.Acad.Sci.* 93:734; 1996
- 39 **Yamamoto,K., N. Koch, M.Steinmetz & G.J. Hämmerling :** One gene encodes two distinct Ia-associated invariant chains; *J.Immunol.* 134:3461; 1985
- 40 **O'Sullivan, D.M., D.Noonan & V.Quaranta :** Four Ia invariant chain forms derive from a single gene by alternate splicing and alternate initiation of transcription/translation; *J.Exp.Med* 166:444; 1987
- 41 **Glimcher, L.H. & C.J.Kara :** Sequences and factors:A guide to MHC class-II transcription; *Annu.Rev.Immunol.* 10:13; 1992
- 42a **Bertolino, P., M. Staschewski, M.C. trescol Biemont, I.M. Freisewinkel, K. Schenk, I. Chretien, F. Forquet, D. Gerlier, C. Rabourdin Combe, N. Koch :** deletion of a C-terminal sequence of the class II-associated invariant chain abrogates invariant chains oligomer formation and class II antigen presentation; *J. Immunol* 154:5620; 1995
- b **Park, S.J., S. Sadegh Nasserli, D.C.Wiley :** Invariant chain made in E.coli has an exposed N-terminal segment that blocks antigen binding to HLA-DR1 and a trimeric C-terminal segment that binds empty HLA-DR1
- c **Wolf, P.R., H.L. Ploegh :** How MHC class II molecules acquire peptide cargo:biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway; *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:267; 1995
- 43 **Roche, P.A., M.S.Marks &P.Cresswell :** Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain; *Nature* 354:392; 1991
- Cresswell, P. :** Invariant chain structure and MHC class II function; *Cell* 84:505; 1996
- 44 **Warmerdam,P.A., E.O.Long, P.A. Roche :** Isoforms of the invariant chain regulate transport of MHC class II molecules to antigen processing compartments; *J.Cell Biol.* 133:281; 1996
- 45a **Lotteau, V., L.Teyton, A.Peteraux, T.Nilsson, L. Karlsson, S.L. Schmid, V. Quaranta & P.A. Peterson :** Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain; *Nature* 348:600; 1990
- b **Bakke, O. & B.Dobberstein :** MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments; *Cell* 63:707; 1990
- c **Pieters, J., O.Bakke & B. Dobberstein :** The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal sorting signals within ist cytoplasmic tail; *J. Cell Sci.* 106:831; 1993
- 46 **Romagnoli, P. & R.N. Germain :** The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy; *J.Exp.Med* 180:1107; 1994
- 47 **Jasanoff, A., G. Wagner und Don C. Wiley:** Structure of a trimeric domain of the MHC class II-associated chaperonin and targeting protein Ii; *EMBO*17: 6812-6818; 1998
- 48 **Jasanoff, A., S. Song, A.R. Dinner, G. Wagner und Don C. Wiley:** One of Two Unstructured

- Domains of Ii Becomes Ordered in Complexes with MHC Class II Molecules; *Immunity*10: 761-768; 1999
- 49a **Peterson, M. & J. Miller** : Invariant chain influences the immunological recognition of MHC class II molecules; *Nature* 345:172; 1990
- b **Germain, R.N. & L.R. Hendrix** : MHC class II structure, occupancy and surface expression determined by post-endoplasmic reticulum antigen binding; *Nature* 353:134; 1991
- c **Andersson, M.S. & J. Miller** : Invariant chain can function as a chaperone protein for class II major histocompatibility complex molecules; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:2282; 1992
- 50 **Teyton, L., D. O'Sullivan, P.W. Dickson et al.** : Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathway; *Nature* 348:39; 1990
- 51a **Babbitt, B.P., P.M. Allen, G. Matsueda, E. Haber & E.R. Unanue** : Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules; *Nature* 317:359; 1985
- b **Buus, S., S. Colon, C. Smith, J.H. Freed, C. Miles & H.M. Grey** : Interaction between a processed ovalbumin peptide and Ia molecules; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:3968; 1986
- c **Roche, P.A. & P. Cresswell** : Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding; *Nature* 345:615; 1990
- 52a **Cho, S., M. Attaya & J.J. Monaco** : New class II-like genes in the murine MHC; *Nature* 353:573; 1991
- b **Cho, S., M. Attaya, M.G. Brown & J.J. Monaco** : A cluster of transcribed sequences between the Pb and Ob genes of the murine major histocompatibility complex; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:5197; 1991
- c **Kelly, A.P., J.J. Monaco, S. Cho & J. Trowsdale** : A new human HLA-class II related locus, DM; *Nature* 353:571; 1991
- 53 **Mosyak, L., D.M. Zaller und D. Wiley**: The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation.; *Immunity*.9: 377-83; 1998
- 54 **Freemont, D.H., F. Crawford, P. Marrack, W.A. Hendrickson und John Kappler**: Crystal Structure of Mouse H2-M; *Immunity*9: 385-393; 1998
- 55 **Burmeister, W.P., L.N. Gastinel, N.E. Simister, M.L. Blum und P. J. Bjorkmann**: Crystal structure of 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal FC receptor.; *Nature*372: 336-343; 1994
- 56 **Roche, P.A.** : HLA-DM: An in vitro facilitator of MHC class II peptide loading; *Immunity* 3:259; 1995
- 57 **Sanderson, F., M.J. Kleijmeer, A. Kelly, D. Verwoerd, A. Tulp, J.J. Neefjes, J.J. Geuze & J. Trowsdale** : Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation in MHC class II compartments; *Science* 266:1566; 1994
- 58a **Denzin, L.K., N.F. Robbins, C. Carboy-Newcomb & P. Cresswell** : Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2-cells; *Immunity* 1:595; 1994
- b **Karlson, L., A. Peleraux, R. Lindstedt, M. Liljedahl & P.A. Peterson** : Reconstitution of an operational MHC class II compartment in nonantigen-presenting cells; *Science* 266:1569; 1994
- c **Lindstedt, R., M. Liljedahl, A. Peleraux, A. Peterson, L. Karlsson** : The MHC-class II molecule H2-M is targeted to an endosomal compartment by a tyrosine-based targeting motif; *Immunity* 3:561; 1995
- d **Kurth, D., J. Neumann, K. Demleitner, J. Hildmann, M. Mehlig, C. Scheicher, U. Wendling, D. Sun & K. Reske** : Full length cDNA of rat RT1.DMa and RT1.DMb and expression of RT1.DM in dendritic and Langerhans cells.; 1996 (eingereicht)
- 59 **Kornfeld, S. & I. Mellmann** : The biogenesis of lysosomes; *Annu. Rev. Cell Biol.* 5:483; 1989
- 60a **Tulp, A., D. Verwoerd, B. Dobberstein, H.L. Ploegh & J. Pieters** : Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment; *Nature* 369:120; 1994

- b **Amigorena, S., J.R. Drake, P.Webster & I.Mellman** : Transient accumulation of class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes; *Nature* 369:113
- c **Schmid, S.L. & M.R. Jackson** : Making class II presentable; *Nature* 369:103; 1994
- d **West, M.A., J.M. Lucocq & C.Watts** : Antigen processing and class II peptide loading compartments in human B-lymphoblastoid cells; *Nature* 369:147; 1994
- 61a **Peters P.J., J.J. Neefjes, V. Oorschot, H.L. Ploegh & H.J. Geuze** : Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments; *Nature* 349:669; 1991
- b **Pieters, J., H. Horstmann, O. Bakke, G. Griffiths & J.Lipps** : Intracellular transport and localisation of major histocompatibility complex class II molecules and invariant chain; *J. Cell Biol.* 115:1213; 1991
- 62 **Qiu, Y., X.Xu, A. Wandlinger-Ness, D.P. Dalke & S.K. Pierce** : Separation of subcellular compartments containing distinct functional forms of MHC class II; *J. Cell. Biol.* 125:595; 1994
- 63 **Calafat, J., M. Nijenhuis, H.Jansen, A.Tulp, S.Dusseljee, R. Wubbolts & J. Neefjes** : Major histocompatibility complex class II molecules induce the formation of endocytic MIIC-like structures; *J. Cell Biol.* 126:967; 1994
- 64 **Pierre, P., L.K. Denzin, C.Hammond, J.R. Drake, S.Amigorena, P.Cresswell & I.Mellman** : HLA-DM is localized to conventional and unconventional MHC class II containing endocytic compartments; *Immunity* 4:87; 1996
- 65a **Dornmair, K., B.Rothenhäusler & H.M.McConnel** : Structural intermediates in the reactions of antigenic peptides with MHC molecules; *Cold Spring Harb.Symp.quant.Biol.* 54:409; 1989
- b **Germain, R.N. & L.R.Hendrix** : MHC class II structure, occupancy and surface expression determined by post endoplasmic reticulum antigen binding; *Nature* 353:134; 1991
- 66a **Mellins, E., P.Cameron, P.Amaya, M.Goodman, S.Pious, D.Smith & B.Arp** : A mutant human histocompatibility leukocyte antigen DR molecule associated with invariant chain peptides; *J. Exp.Med* 179:541; 1994
- b **Riberdy, J.M, J.R. Newcomb, M.J.Surman, J.A.Barbosa & P.Cresswell** : HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides; *Nature* 360:474; 1992
- 67 **Sette, A., S.Ceman, R.T. Kubo, D.Sakayuchi, E.Appella, D.F. Hunt, T.A.Davis, H.Michel, J.Shabanowitz, R.Rudersdorf, H.M. Gry & R.DeMass** : Invariant chain peptides in most HLA-DR molecules of an antigen-processing mutant; *Science* 258:1801; 1992
- 68 **Morris, P., J.Shaman, M.Attaya, M.Amaya, S.Goodman, C.Bergmann, J.J.Monaco & E.Mellins** : An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules; *Nature* 368:551; 1994
- 69a **Martin, D., G.Hicks, S.K.Memdiratta, H.L.Leva, H.E.Ruley, L.van Kaer** : H2-M mutant mice are defective in the peptide loading of class II molecules, antigen presentation, and T cell repertoire selection; *Cell* 84:543; 1996
- b **Miyazaki, T., P.Wolf, S.Tourne, C.Waltzinger, A.Dierich, N.Darois, H.Ploegh** : Mice lacking H2-M complexes, enigmatic elements of the MHC-class II peptide loading pathway; *Cell* 84:531; 1996
- 70a **Sloan, V.S., P.Cameron, G.Porter, M.Gammon, M.Amaya, E.Mellins & D.M.Zaller** : Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR; *Nature* 375:802; 1995
- b **Denzin, L.K. & P.Cresswell** : HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II $\alpha\beta$ dimers and facilitates peptide loading; *Cell* 82:155; 1995
- 71 **Kropshofer, H., G.J. Hämmerling & A.B. Vogt** : How HLA-DM edits the MHC class II peptide repertoire: survival of the fittest?; *Immuno.Today* 18:2; 1997
- 72 **Denzin, L.K., N.F.Robbins, L.Carboy-Newcomb & P.Cresswell** : Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen processing defect in T2 cells; *Immunity* 1:595; 1994

- 73 Detergents for Membrane Research, Boehringer Mannheim GmbH; 1994
- 74 **Green, G.D.J. & E. Shaw** : Peptidyl-diazomethyl ketones are specific inactivators of thiol proteinases; *J. Biol. Chem* 256:1923; 1981
- 75 **Mehdi, S.**: Cell-penetrating inhibitors of calpain; *TIBS*150-153; 1991
- 76 **Demuth, H.U., A. Schierhorn, P. Bryan, R. Höfk, H. Kirschle und D. Brömme**: N-peptidyl, o-acyl hydroxamates: comparison of the selective inhibition of serine and cysteine proteinases; *Biochim. Biophys. Acta*179-186; 1996
- 77 **Qzato, K., N. Mayer and D.H. Sachs** : Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies to mouse H-2 and Ia antigens; *J. Immunol* 124:533; 1980
- 78 **Burgess, A.W. and D. Metcalf** : The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors; *Blood* 56:947; 1980
- 79a **Metcalf, D., C.G. Begley, G.R. Johnson, N.A. Nicola, M.A. Vadas, A.F. Lopez, D.J. Williamson, G.G. Wong, S.C. Clark and E.A. Wang** : Biological properties in vitro of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; *Blood* 67:37; 1986
- 84b **Metcalf, D., C.G. Begley, G.R. Johnson, N.A. Nicola, E.C. Nice, J. DeLamarter, D.R. Thatcher and J.J. Mermod**: In vitro action on hemopoietic cells of recombinant murine GM-CSF purified after production in *E. coli*: Comparison with purified native GM-CSF; *J. Cell. Physiol.* 128:431; 1986
- 84c **Robinson, B.E., H.E. McGrath and P.J. Quesenberry** : Recombinant murine granulocyte-megacaryocyte colony stimulating activity and augments megacaryocyte colony stimulation by Interleukin - 3 ; *J. Clin. Invest.* 79:1648; 1987
- 84d **Mazur, E.M., J.L. Cohen, G.G. Wong and S.C. Clark** : Modest stimulating effect of recombinant human GM-CSF on colony growth from peripheral blood human megacaryocyte progenitor cells; *Exp. Hematol.* 15 : 1128; 1987
- 84e **Migilaccio, A.R., M. Bruno and G. Migilaccio**: Evidence for direct action of human biosynthetic (recombinant) GM-CSF on erythroid progenitors in serum free cultures ; *Blood* 70:1867; 1087
- 80 **Trinchieri, G. & B. Perussia** : Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects; *Immunol. Today* 6:131; 1985
- 81a **Stanley, E.R. and P.M. Heard** : Factor regulating macrophage production and growth, purification and some properties of the colony-stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells ; *J. Biol. Chem.* 252:4305; 1977
- 86b **Stanley, E.R., D.M. Chen and H.S. Lin** : Induction of macrophages production and proliferation by a purified colony-stimulating factor; *Nature* 274:168; 1977
- 82 **Sun, D.** : Enhanced interferon gamma induced Ia-antigen expression by glial cells after previous exposure to this cytokine; *J. Neuroimmunol.* 34:205; 1991
- 83 **Dresser, D.W. and M.F. Greaves** : Handbcock of experimental Immunology. Ed. D.M. Weier. Volume 2. Blackwell Scientific Publications, London, Ch. 27; 1973
- 84 **Goding, J.P.**: Monoclonal antibodies : Principles and practice. Academic Press Inc., London; 1983
- 85 **Austyn, J.M.** : Lymphoid dendritic cells; *Immunology* 62:161; 1987
- 86 **Mehlig, M.**: Studien zur Identifizierung und Charakterisierung konformer Peptid-Klasse II-Molekülkomplexe aus in vitro propagierten dendritischen Zellen der Ratte. Dissertation am FB Biologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz; 1995
- 87a **Scheicher, C.** : Dendritische Zellen der Maus. Differenzierung und Charakterisierung durch in vitro-Knochenmarkskulturen. Dissertation am FB Biologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz; 1993
- 92b **Scheicher, C., M. Mehlig, R. Zecher and K. Reske** : Dendritic cells from mouse bone marrow : in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte - macrophage colony - stimulating factor; *J. Immunol. Meth* 154:253; 1992

- 88 **Becker, D., A.B. Reske-Kunz, J. Knop and K. Reske:** Biochemical properties of MHC class II molecules endogenously synthesized end expressed by mouse Langerhans cells; Eur. J. Immunol. 21:1214; 1991
- 89 **Opel, B.:** Induktion von Klasse II Molekülen auf Makrophagenkulturen aus Knochenmarkszellen der Ratte. Diplomarbeit am FB Biologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz; 1986
- 90 **Harlow, E. & D.Lane :** Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory; 1988
- 91 **Stryer, L.:** Biochemie. Spektrum Akad. Verlag, 4. Auflage; 1991
- 92a **Laemmli, E.K. :** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; Nature 227:680; 1970
- 97b **Smithies, O.:** Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal adults; Biochemistry 61:629; 1955
- 97c **Raymond, S. & L. Weintraub :** Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis; Science 130:711; 1959
- 97d **Davis, B.J. :** Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins; Ann. N.Y. Acad. Sci 121:404; 1964
- 97e **Ornstein, L. :** Disc electrophoresis I. Background and theory; Ann. N.Y. Acad. Sci 121:321; 1963
- 97f **Summers, D.F., J.V. Maizel, J.E. Darnell :** Evidence for virus specific noncapsid proteins in poliovirus-infected HeLa cells; Proc.Natl.Acad.Sci 54:505; 1965
- 93 **Schägger, H. & G. von Jagow:** Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa; Anal.Biochem. 166:368-379; 1987
- 94 **O'Farrell, P.H.:** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins; J.Biol.Chem.250: 4007; 1975
- 95 **Heukeshoven, J. & R. Dernick :** Elektrophoresis Forum : 22 - 27; 1986
- 96 **McConahey, P.J. & F.J.Dixon :** Radioiodination of proteins by the use of the chloramine - T method; Methods Enzymol. 70:210; 1980
- 97a **Bayer, E.A. & M. Wilchek :** The use of avidin - biotin complex as a tool in molecular biology; Methods Enzymol. 70:151; 1980
- 100b **Guesdon, J.L. & S. Avrameas:** The use of avidin - biotin interaction of immunoenzymatic techniques; J. Histochem. Cytochem 27:1131; 1979
- 98 **Geshoni, J.M. and G.E.Palade :** Review: Protein Blotting: Principles and applications; Anal. Biochem 131:1; 1983
- 99 **Bjerrum, O. und C. Schafer-Nielsen:** Analytical Electrophoresis; M.J. Dunn ed. (VCH Weinheim)315; 1986
- 100 **Trans-Blot Cell Instruction Manual:** Bio Rad Laboratories; 1989
- 101a **Porath, J. & P.Flodin :** Gel filtration: A method for desalting and group separation; Nature 183:1657; 1959
- 103b **Hagel, L. :** Gel filtration. Principles, high resolution methods, and applications; Protein Purification; VCH Publishers Inc. , New York, Weinheim, Cambridge; 1989
- 103c **Andrews, P. :** The gel filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range; Biochem J. 96: 595; 1965
- 102 **Perseptive Biosystems:** The busy researchers guide to biomolecule chromatography; 1996
- 103 **Hagel, L., H. Lundström, T. Anderson :** Properties, in theory and practice, of novel gel filtration media for standard liquid chromatography; J. Chromatogr. 476:329; 1985
- 104 **Afeyan, N.B., N.F. Gordon und I. Mazsaroff:** Flow-through particles for the high - performance

- liquid chromatographic separation of biomolecules : Perfusion Chromatography; J. Chromatogr.519: 1-21; 1990
- 105 **Chomczynski, P. und N. Sacchi:** Single - step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate - phenol - chloroform extraction; Anal. Biochem.162: 156; 1987
- 106 **Saiki, R.K., S.J. Schar, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn und H. A. Erlich:** Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia; Science230: 1350; 1985
- 107 **Veres, G., R.A. Gibbs, S.E. Scherer und C. T. Caskey:** The molecular basis of the sparse fur mouse mutation; Science 415-417; 1987
- 108 **Lawyer, F.C., S. Stoffel, R.K. Saiki, K. Myambo, R. Drummond und D. H. Gelfand:** Isolation, characterisation, and expression in E. coli of the FNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*; J. Biol. Chem. 264: 6427-6437; 1989
- 109 **Sayle, R. :** RASMOL User's Guide; 1994
- 110 **Reik, P., M.D. Handschuhmacher, S.S. Sung, M. Tan, M. Glynias, M.D. Schluchter, J. Novotny, R. Graham :** Evolutionary Conservation of Both the Hydrophilic and Hydrophobic Nature of Transmembrane residues, J. of Theret. Biol., in Press
- 111 **Humphrey, W., Dalke. A., J. Hamer, J. Leech und J. Philips:** VMD Users Guide; Theoretical Biophysics Group, University of Illinois1,3; 1998
- 112 **Kraulis, P.J.:** MolScript: A Program to Produce Both Detailed and Schematic Plots of Protein Structures; J. of Appl. Cryst.24: 946-950; 1991
- 113 **Jeanmougin, F.:** Multiple sequence alignment with Clustal X; TIBS23: 403; 1998
- 114 **Sali, A. und T. L. Blundell:** Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints; J. Mol. Biol.234: 779-815; 1993
- 115 **Goodsell, D.S. und A. J. Olson:** Automated Docking of Substrates to Proteins by Simulated Annealing; Proteins:Str. Func. Genet.8: 195-202; 1990
- 116 **Ponder, J.W.:** TINKER: Software Tools for Molecular Design, Version 3.7; User Guide3.7; 1999
- 117 **Collaborative ComputationalProjectNumber4:** The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography; Acta Cryst. 50: 760-763; 1994
- 118 **Vriend, G.:** WHAT IF: A molecular modeling and drug design program; J.Mol.Graph8: 52-56; 1990
- 119 **Hoof, R.W.W., G. Vriend, E. Sander und E. Abola:** Errors in protein structures; Nature381: 272; 1996
- 120 **Laskowski, R.A., M.W. MacArthur, D.S. Moss und J. M. Thornton:** PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures; J.Appl.Cryst.26: 283-291; 1993
- 121 **Kremmin, H. :** Endozytische und phagozytische Aufnahme von Protein-Antigenen in dendritische Zellen: Einfluß auf die Prozessierung und Präsentation der Antigene; Diplomarbeit am FB Biologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz; 1997
- 122 **Martin, S.J. und R. G. Douglas:** Protease Activation during Apoptosis: Death by a Thousand Cuts; Cell82: 349-352; 1995
- 123 **Bond, J.S. und P. E. Butler:** Intracellular Proteases; Ann. Rev. Biochem.56: 333-364; 1987
- 124 **Bogyo, M. und Hidde L. Ploegh:** A proteasedraws first blood; Nature396: 625-626; 1998
- 125 **Mellmann, I., R. Fuchs und A. Helenius:** Acidification of the Endocytic and Exocytic Pathways; Ann. Rev. Biochem.55: 663; 1986
- 126 **Heppel, G.:** Studien zum Metabolismus und der funktionellen Bedeutung der mit MHC Klasse II Molekülen assoziierten invarianten Kette; Dissertation am FB 21 der Johannes Gutenberg Universität Mainz; 1993

- 127 **Rao, M., N.M. Wassef, C.R. Alving und Krzych:** Intracellular Processing of Liposome-Encapsulated Antigens by Macrophages Depends upon the Antigen; *Infection and Immunity* 63: 2396-2402; 1995
- 128 **Wilcox, D. und R. W. Mason:** Inhibition of cysteine proteinases in lysosomes and whole cells; *Biochem. J.*286: 495-502; 1992
- 129 **Chapman, H.:** Endosomal proteolysis and MHC class II function.; *Curr Opin Immunol.*10: 93-102; 1998
- 130 **Hubbard, T.J.P & T.L. Blundell :** Comparision of solvent inaccessible cores of homologous proteins: Definitions useful for protein modelling; *Prot. Eng.* 1:159-171; 1987
- 131 **Stern, L.J., J.H. Brown, T.S. Jardetzky, J.C. Gorga, R.G. Urban, J.L. Strominger und D. Wiley:** Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide.; *Nature.*368: 215-21; 1994
- 132 **Brown, J.H., T.S. Jardetzky, J.C. Gorga, L.J. Stern, R.G. Urban, J.L. Strominger und D. Wiley:** Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1 [see comments; *Nature.*364: 33-9; 1993
- 133 **Murthy, V.L. und L. Stern:** The class II MHC protein HLA-DR1 in complex with an endogenous peptide: implications for the structural basis of the specificity of peptide binding.; *Structure.*5: 1385-96; 1997
- 134 **Ghosh, P., M. Amaya, E. Mellins und D. C. Wiley:** The Structure of an intermediate in Class II MHC Maturation: CLIP bound to HLA - DR3; *Nature* 378:457; 1995
- 135 **Dessen, A., C.M. Lawrence, S. Cupo, D.M. Zaller und D. C. Wiley:** X-Ray Crystal Structure of HLA - DR4 complexed with a Peptide from Human Collagen II; *Immunity* 7:473; 1997
- 136 **Scott, C.A., P.A. Peterson, L. Teyton und I. A. Wilson:** Crystal Structures of TWO I-AD-Peptide Complexes reveal that High Affinity can be achieved without large anchor residues; *Immunity* 8: 531; 1998
- 137 **Fremont, D.H., D. Monnaie, C.A. Nelson, W.A. Hendrickson und E. R. Unanue:** Crystal Structure of I-AK at 1.9 in Complex with a Dominant Epitope of Lysozyme; *Immunity*8: 305-317; 1998
- 138 **Fremont, D.H., W.A. Hendrickson, P. Marrack und J. Kappler:** Structures of an MHC Class II Molecule with two covalently bound single Peptides; *Science*272: 1001; 1996
- 139 **Topham, C.M., P.Thomas, J.P. Overington, M.S. Johnson, F. Eisenmenger & T.L. Blundell:** An assesment of COMPOSER: a rule-based approach to modelling protein structure; *Biochem.Soc.Symph.* 57, 1-9; 1991
- 140 **Kabsch, W. & Sander, C. :** Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen bonded and geometrical features; *Biopolymers* 22:2577-2637; 1983
- 141 **Syha, J.; W. Henkes, W. & K. Reske:** Complete cDNA sequence coding for the MHC class II RT1.B alpha chain of the LEWIS rat; *Nucleic Acids Res.* 17:3985;1989
- 142 **Syha-Jedelhauser, J.;U.Wendling & K.Reske:**Complete coding nucleotide sequence of cDNA for the class II RT1.B-beta(I) chain of the Lewis rat; *Biochim. Biophys. Acta* 1089:414-416, 1991
- 143 **Vestberg M., U. Brunsberg,K. Bergsteinsdottir,M. Karlsson:** Limited polymorphism in the first domain of the rat MHC class II RT1D molecule; *Immunogenetics* 48:344-349; 1998
- 144 **Syha-Jedelhauser, J & K. Reske:** Title: Sequence of rat cDNA clone pLR-beta-112 coding for the RT1.D-beta' chain; *Nucleic Acids Res.* 18:4598; 1990
- 145 **Rammensee, H.G.:** Chemistry of peptides associated with MHC Class I and Class II molecules; *Curr. Opin. Immunol.*7: 85; 1995
- 146 **Hammer, J., B. Takacs und F. Sinigaglia:** Identification of a motif for HLA - DR1 binding peptides using M13 display libraries; *J. Exp. Med.*176: 1007; 1992

- 147 **Hammer, J., E. Bono, F. Gallazi, C. Belunis, Z. Nagy und F. Sinigaglia:** Precise Prediction of major histocompatibility complex class II peptide interaction based on peptide side chain scanning; *J. Exp. Med.*180: 2353; 1994
- 148 **Falk, K., O. Rotzschke, S. Stefanovic, G. Jung und H. G. Rammensee:** Pool sequencing of natural HLA - DR, DQ and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing and general rules; *Immunogenetics* 39: 230; 1994
- 149 **Vogt, A.B., H. Kropshofer, H. Kallbacher, M. Kalbus, H.H. Rammensee, J.E. Coloigan, Martin und R.:** Ligand motifs of HLA-DRB5*0101 and DRB1*1501 molecules delineated from self-peptides; *J. Immunol.*153: 1665; 1994
- 150 **Reay, P.A., R.M. Cantor und M. M. Davis:** Use of global amino acid replacements to define the requirements for MHC binding and T cell recognition of moth cytochrome c; *J. Immunol.*153: 1665; 1994
- 151 **Olson, A.J.:** AutoDock 3.0 User Guide; User Guide 3: 1-76; 1999
- 152 **Reizis, B., F. Mor, M. Eisenstein, H. Schild, S. Stefanovic, H.G. Rammensee und I. R. Cohen:** The peptide binding specificity of the MHC class II I-A molecule of the Lewis rat, RT1.B1; *Int.Immunol.*8: 1825-1832; 1996
- 153 **Wauben, M.H., M. van der Kraan, M.C. Grosfeld-Stulenmeyer und I. Joosten:** Definition of an extended MHC class II-peptide binding motif for the autoimmune disease-associated Lewis rat RT1.B1 molecule; *Int.Immunol* 9: 281-290; 1997
- 154 **Panjwani, N., O. Akbari, S. Garcia, M. Brazi und Brigitta Stockinger:** The HSC73 Molecular Chaperone: Involvement in MHC Class II Antigen Presentation; *J. Immunol.*163: 1936-1942; 1999
- 155 **Hammerling, G.J., B. Manoury, C. Watts, L. Adorini und A. Lanzavecchia:** Peptide binding and editing: generation of TCR ligands.; *Res Immunol.*149: 863-5; 1998
- 156 **Westermeier, R.:** Electrophoresis in Practise; VCH Weinheim 1. Aufl.; 1993
- 157 **Kropshofer, H., S.O. Arndt, G. Moldenhauer, G.J. Hammerling und A. Vogt:** HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH.; *Immunity.*6: 293-302; 1997
- 158 **Righetti, P.G.:** Immobilized pH gradients: theory and methodology.; Elsevier, 1. Aufl.; 1989
- 159 **Riese, R.J., P.R. Wolf, D. Bromme, L.R. Natkin, J.A. Villadangos, H.L. Ploegh und H. A. Chapman:** Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading; *Immunity* 4: 357-365; 1996
- 160 **vanNoort, J.M. und A. C. M. vanderDrift:** The selectivity of Cathepsin D suggests an Involvement of the Enzyme in the Generation of T-cell-Epitopes; *J.Biol.chem* 264 : 14159; 1989
- 161 **Gradehandt, G. und E. Rüde:** The endo/lysosomal protease cathepsin B is able to process conalbumin fragments for presentation to T cells; *Immunology* 74: 393; 1991
- 162 **Kageyama, T., M. Ichinose und S. Yonezawa:** Processing of the precursors to neurotensin and other bioactive peptides by cathepsin E; *J. Biol. Chem.*270: 19135-19140; 1995
- 163 **Tomkinson, B.:** Tripeptidyl peptidases: enzymes that count; *TIBS* 24: 355-359; 1999
- 164 **Kupper, T.S.:** Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues: mechanisms and speculations; *J. Clin. Invest.*86: 1783-1789; 1990
- 165 **Kulke, M.:** Untersuchungen zur Peptidpersistenz bei epidermalen Langerhans Zellen der Lewis-Ratte; Diplomarbeit am FB Biologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz; 1998
- 166 **Bot, A., S. Bot, S. Antohi, K. Karjalainen und C. Bona:** Kinetics of generation and persistence on membrane class II molecules of a viral peptide expressed on foreign and self Proteins; *J.Immunol.*157: 3436; 1996
- 167 **Davidson, H.W. und C. Watts:** Epitope-directed Processing of Specific Antigen by B Lymphocytes; *J. Cell. Biol.*109: 85-92; 1989

- 168 **Diment, S.:** Different roles for thiol and aspartyl proteases in antigen presentation of ovalbumin; *J. Immunol.*145: 417; 1990
- 169 **Hämmerling, G.J. und E. R. Unanue:** Antigen Presentation in 1998 and at the 10th International Congress of Immunology; *The Immunologist* 7: 19-23; 1999
- 170 **Rappolee, D.A., D. Mark, M.J. Banda, Werb und Z.:** Wound macrophages express TGF- α and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping.; *Science* 241: 708-712; 1988
- 171 **Barrett, A.J. und J. K. McDonald:** Mammalian Proteases: Endoproteases; Academic Press Vol.1; 1980
- 172 **Rao, M., N.M. Wassef, C.R. Alving und Urszula Krzych:** Intracellular Processing of Liposome-Encapsulated Antigens by Macrophages Depends upon the Antigen; *Infection and Immunity* 63: 2396-2402; 1995
- 173 **Shenep, J.L., R.P. Barton und K. A. Mogan:** Role of antibiotic class in the rate of liberation of endotoxin during therapy for experimental Gram - negative bacterial sepsis; *J. Infect. Dis.*151: 1012; 1985
- 174 **Beutler, B. und A. Cerami:** Tumor necrosis, cachexia, shock and inflammation: a common mediator.; *Ann. Rev. Biochem.*57: 505; 1988
- 175 **Lepay, D.A., R.M. Steinmann, C.F. Nathan, H.W. Murray und Z. A. Cohn:** Liver macrophages in murine listeriosis. Cell mediated immunity is correlated with an influx of macrophages capable of generating reactive oxygen intermediates.; *J. Exp. Med.*161: 1503-1512; 1985
- 176 **Pierre, P. und I. Mellman:** Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells.; *Cell.*93: 1135-45; 1998
- 177 **Rose, S.C., D. Askew, E.H. Noss, A. Tobian, A.M. Krieg und C. V. Harding:** CpG Oligodeoxynucleotides Down-Regulate Macrophage Class II MHC Antigen Processing; *J. Immunol.*163: 1188-1194; 1999
- 178 **Steeg, P.S., H.M. Johnson und J. J. Oppenheim:** Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by an interferon-like lymphokine: inhibitory effect of endotoxin; *J. Immunol.*129: 2402; 1982
- 179 **Sicher, S.C., M.A. Vazquez und C. Y. Lu:** Inhibition of macrophage Ia expression by nitric oxide; *J. Immunol.*153: 1293; 1994
- 180 **Deussing, J., W. Roth, P. Saftig, Peters, C., H.L. Ploegh und J. A. Villadangos:** Cathepsin B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation; *Proc. Natl. Acad. Sci.*95: 4516-4521; 1998
- 181 **Bennett, K., T. Levine, J.S. Ellis, R.J. Peansky, I.M. Samloff, J. Kay und B. M. Chain:** Antigen processing for presentation by class II major histocompatibility complex requires cleavage by cathepsin E; *Eur. J. Immunol.*22: 1519-1524; 1992
- 182 **Horwich, A.L., E.U. Weber-Ban und D. Finley:** Chaperone rings in protein folding and degradation; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 11033-11040; 1999
- 183 **Joosten, I., M.H. Wauben, M.C. Holewijn, K. Reske, L.O. Pedersen, C.F. Roosenboom, E.J. Hensen, E.W. van und S. Buus:** Direct binding of autoimmune disease related T cell epitopes to purified Lewis rat MHC class II molecules.; *Int Immunol.*6: 751-9; 1994
- 184 **Wauben, M.H., d.K.M. van, S.M.C. Grosfeld und I. Joosten:** Definition of an extended MHC class II-peptide binding motif for the autoimmune disease-associated Lewis rat RT1.BL molecule.; *Int Immunol.*9: 281-90; 1997
- 185 **Lafuse, W.P., D. Brown, L. Castle und B. S. Zwillig:** IFN- γ increases cathepsin H mRNA levels in mouse macrophages; *J. Leuk. Biol.* 57: 663-669; 1995
- 186 **Rost, B. und C. Sander:** Bridging the protein sequence-structure gap by structure predictions; *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*25: 113-136; 1996

- 187 **Lesk, A.M. und C. H. Chothia:** The response of protein structures to amino-acid sequence changes; *Phil.Trans.R.Soc. London Ser. B* 317: 345-356; 1986
- 188 **Atkins, P.W.:** *Physikalische Chemie*; VCH Weinheim, 1. Aufl.; 1988
- 189 **Sali, A.:** Modeling mutations and homologous proteins.; *Curr Opin Biotechnol.*6: 437-51; 1995
- 190 **Sanchez, R. und A. Sali:** Advances in comparative protein-structure modelling.; *Curr Opin Struct Biol.*7: 206-14; 1997
- 191 **Blundell, T.L., B.L. Sibanda, M.J.E. Sternberg und J. M. Thornton:** Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules.; *Nature* 326: 347-352; 1987
- 192 **Jones, T.H. und S. Thirup:** Using known substructures in protein model building and crystallography; *EMBO* 5: 819-822; 1986
- 193 **Sali, A. und T. L. Blundell:** Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints; *J. Mol. Biol.*234: 779-815; 1993
- 194 **Johnson, M.S., N. Srinivasin, R. Sowdhamini und B. L. Blundell:** Knowledge-based protein modelling; *CRC Crit. Rev.Biochem. Mol. Biol.*29: 1-68; 1994
- 195 **Sali, A., L. Potterton, F. Yuan, V.H. van und M. Karplus:** Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER.; *Proteins.*23: 318-26; 1995
- 196 **Sippl, M.J.:** Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins.; *Proteins* 17: 355-362; 1993
- 197 **Sternberg, M.J.E., H.A. Gabb und R. M. Jackson:** Predictive docking of protein-protein and protein-DNA complexes; *Curr. Opin. Struct. Biol.*8: 250-256; 1998
- 198 **Stryer, L.:** *Biochemie*; Spektrum Verlag, 5. Aufl.; 1988
- 199 **Dixon, J.S.:** Evaluation of the CASP2 docking section; *Proteins Suppl.*198-204; 1997
- 200 **Germain, R.N. und D. H. Margulies:** The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation; *Ann. Rev. Immunol.*11: 403; 1993
- 201 **McFarland, B.J., C. Beeson und A. J. Sant:** Cutting Edge: A Single, Essential Hydrogen Bond Controls the Stability of Peptide-MHC Class II Complexes; *J. Immunol.*163: 3567-3571; 1999
- 202 **Friedmann, J.M.:** Structure, Dynamics, and Reactivity in Hemoglobin; *Science*228: 1273-1280; 1985
- 203 **Vogt, A.B., H. Kropshofer und G. Hammerling:** How HLA-DM affects the peptide repertoire bound to HLA-DR molecules.; *Hum Immunol.*54: 170-9; 1997