

**Isolierung und Charakterisierung der
ER-residenten Aminopeptidase ERMP1 und
Untersuchung ihrer Funktion in der Prozessierung
MHC I restringierter CTL Epitope**

Dissertation

zur Erlangung des Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg Universität
Mainz

vorgelegt von

Nadja Akkad
geboren in Karlsruhe

Mainz 2011

Dekan: Univ.-Prof. Dr.

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr.

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr.

Tag der mündlichen Prüfung: 23.03.2012

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Doktorarbeit ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Mainz, den

Nadja Akkad

Danksagung

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Das angeborene Immunsystem	2
1.1.2 Das adaptive Immunsystem	3
1.2 Struktur und Eigenschaften der MHC Moleküle	4
1.3 Antigen Prozessierung	7
1.3.1 Antigen Prozessierung für MHC I-Moleküle	8
1.3.2 Quelle für Peptide.....	8
1.3.3 Cytosolische Prozesse: Proteasome und cytosolische Proteasen.....	9
1.3.4 TAP.....	10
1.3.5 Prozesse im endoplasmatischen Retikulum	12
1.4 Zielsetzung.....	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	18
2.2 Lösungen und Medien	18
2.3 Zellkultur.....	20
2.3.1 Verwendete Zell-Linien.....	20
2.3.2 Zell-Kultivierung.....	21
2.3.3 Bestimmung der Zellzahl	21
2.3.4 Zellen einfrieren und auftauen.....	22
2.3.5 Herstellung muriner BMDCs und Milzzellen.....	22
2.3.6 Gewebeisolierung und Herstellung von Einzelzellsuspensionen.....	23
2.4 Aufreinigung der mikrosomalen Fraktion und zugehörige Assays	24
2.4.1 Mikrosomen-Aufreinigung ⁶¹	24
2.4.2 NADPH-Cytochrom P450 Reduktase (EC1.6.2.4)	25
2.4.3 Laktat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27)	25
2.5 SDS-PAGE, Coomassie Färbung und Western Blot	26
2.5.1 Proteinbestimmung und Probenvorbereitung für SDS-PAGE.....	26
2.5.2 SDS-PAGE.....	26
2.5.3 Colloidale Coomassie Färbung der SDS Gele ⁶⁶	27

2.5.4 Western Blot	28
2.5.5 Immunreaktiver Nachweis von Proteinen mittels ECL (enhanced chemiluminescence)	29
2.6 Chromatographische Auftrennung der mikrosomalen Fraktion und Test auf Aktivität von mikrosomalen Aminopeptidasen	29
2.6.1 Auftrennung der Proteine mittels Anion Exchange Chromatography (MonoQ HR 5/5, Amersham).....	30
2.6.2 Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivitäten und -Spezifitäten der mikrosomalen Fraktionen	30
2.7 Isolierung der Aminopeptidasen mittels BlueNative PAGE und Identifizierung durch Massenspektrometrie	31
2.7.1 BlueNative PAGE ⁷⁰	31
2.7.2 Tryptischer Verdau der Gelbanden, „In-Gel Verdau“	32
2.7.3 Analyse der tryptisch verdauten Proben durch ESI Massenspektrometrie	33
2.8 Klonierung von murinem ERMP1 in verschiedene Expressionsvektoren.....	33
2.8.1 Grundlegende molekularbiologische Methoden ⁷²	34
2.9 Expression und Aufreinigung von rekombinantem ERMP1	42
2.9.1 E. coli	42
2.9.2 Baculoviren in Sf9 Zellen	43
2.9.3 Säugerzellen	45
2.10. Aufreinigung von Antikörpern	48
2.10.1 Affinitätschromatographie des Antiserums über eine N-hydroxysuccinimide (NHS) aktivierte Säule	48
2.10.2 IgG Aufreinigung von Y3 und 25-D1.16 Hybridomüberstand.....	48
2.11 Intrazelluläre Färbung von BMDCs für die Fluoreszenz-Mikroskopie	49
2.12 Auswirkungen der Genexpression von ERMP1 auf die MHC I Expression der Zelloberfläche ..	49
2.12.1 Gene silencing von ERMP1 mittels RNAi	49
2.12.2 Überexpression von ERMP1 mittels pcDNA3.1(+)	50
2.12.3 RAP („reverse analysis of processing“) Konstrukte	50
2.13 FACS Analyse	51
2.13.1 Färbung der Zellen	52
3. Ergebnisse	53
3.1 Isolierung der mikrosomalen Fraktion	53
3.2 Aminopeptidase-Aktivität in Mikrosomen und Cytosol	55
3.3 Identifizierung der Aminopeptidasen	58
3.3.1 Chromatographische Aufreinigung	58

3.3.2 Massenspektrometrische Analyse	61
3.4 Aminopeptidasen in murinen Mikrosomen.....	63
3.4.1 IRAP	63
3.5 ERMP1	64
3.5.1 Klonierung der ERMP1 ER Domäne (ERMP1 ₍₈₈₋₃₉₃₎) in den bakteriellen Expressionsvektor pASK-IBA2 Vektor	65
3.5.2 Aufreinigung und Test des Antiserums.....	68
3.5.3 Gewebespezifische Expression von ERMP1 in der Maus.....	69
3.5.4 Intrazelluläre Lokalisation von ERMP1 in murinen BMDCs (bonemarrow derived dendritic cells).....	71
3.5.6 Induktion der Expression von ERMP1 durch IFN- γ auf Proteinebene	72
3.5.7 Klonierung von ERMP1 ₍₁₋₈₉₈₎ für die Expression in Säugerzellen und verschiedene Ansätze für die Aufreinigung des Proteins	73
3.5.8 Klonierung von ERMP1 für die Expression in Insektenzellen durch Baculoviren.....	78
3.5.9 Einfluss von ERMP1 auf die MHC I Expression.....	81
4. Diskussion	88
5. Zusammenfassung.....	100
6. Literatur	102
7. Abbildungen und Tabellen.....	110
8. Abkürzungsverzeichnis	113
9. Publikationen und Lebenslauf	116

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Im Laufe der Evolution haben alle mehrzelligen Organismen Strategien entwickelt, um sich vor Bakterien, Viren, Parasiten oder malignen Veränderungen zu schützen. Bevor ein Pathogen in den Körper eindringen kann, muss es mechanische Barrieren wie die Epidermis mit deren Behaarung und die Schleimhäute durchdringen. Diese werden des Weiteren durch chemische Barrieren wie einen niedrigen pH-Wert und antibakterielle Proteine wie das Lysozym unterstützt. Kommt es trotz dieses Schutzes zu einer Infektion, reagiert das angeborene Immunsystem schnell, aber auf eher unspezifische Art und Weise.

In Säugern existiert ein zweites Abwehrsystem, das adaptive Immunsystem. Seine Abwehrmechanismen verlaufen zunächst langsamer, da es auf verschiedenste Weise rückgekoppelt ist, aber dafür mit einer hohen Spezifität und Nachhaltigkeit. Die adaptive Immunantwort wird ausgelöst, wenn die angeborene Immunantwort eine Infektion nicht eliminieren kann oder wenn eine zweite Infektion mit einem bereits bekannten Erreger stattfindet.

Beide Abwehrmechanismen basieren auf der Aktivität spezieller Zellen, die dem Knochenmark entspringen, den Leukozyten.

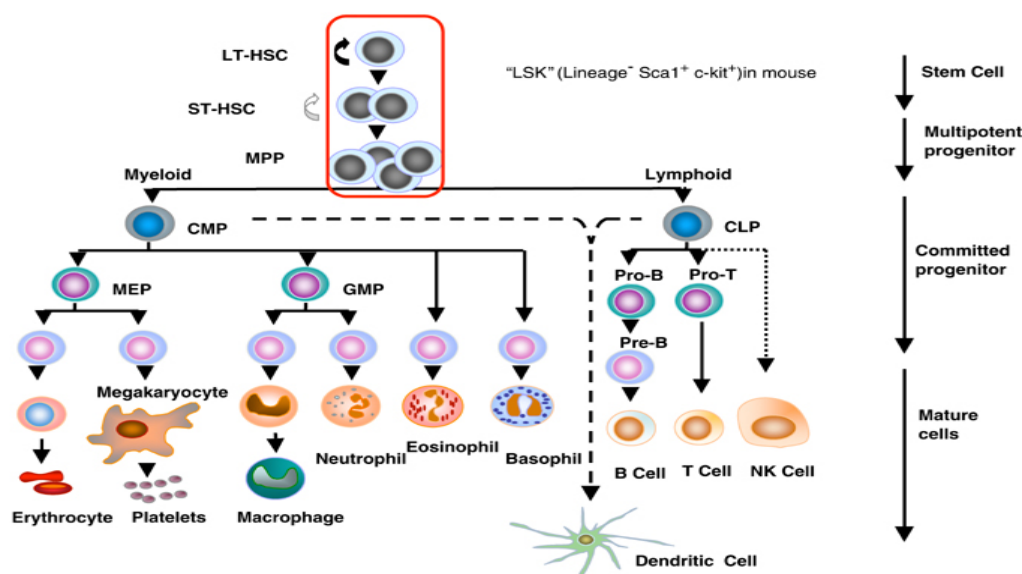


Abbildung 1: Schema der Hämatopoese aus pluripotenten Stammzellen. "common myeloid progenitor" (CMP), "common lymphoid progenitor" (CLP)¹.

Aus den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen entwickeln sich zwei Arten von Stammzellen, die lymphatischen und die myeloiden Vorläuferzellen (Abbildung 1). Aus der lymphatischen Vorläuferzelle entwickeln sich B- und T- Lymphozyten, die Zellen des adaptiven Immunsystems. Aus der myeloiden Vorläuferzelle entwickeln sich die Zellen des angeborenen Immunsystems: die Granulozyten (neutrophile, eosinophile, basophile), Makrophagen und Mastzellen. Außerdem entstehen aus ihr die immunologisch weniger interessanten zellulären Bestandteile des Blutes wie Erythrozyten und Thrombozyten. Schließlich entsteht aus der myeloiden Vorläuferzelle eine Art von Zellen, die eine Sonderstellung einnimmt, die dendritischen Zellen. Dies sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APCs) und die einzigen Zellen, die naive T-Zellen aktivieren können. Sie stellen die Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem her.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Im Falle einer Infektion des Körpers bilden die Zellen des angeborenen Immunsystems die erste Verteidigungslinie. Sie verhindern eine Ausbreitung der Infektion und sorgen für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems, falls die Pathogene nicht beseitigt werden konnten. Makrophagen sind die ersten Zellen, die mit ihren Rezeptoren verbreitete Oberflächen-Strukturen von Bakterien erkennen und diese durch Phagozytose eliminieren. Aktivierte Makrophagen und Granulozyten schütten Cytokine aus und vermitteln so die typischen Entzündungsreaktionen am Ort der bakteriellen Infektion. Außerdem sezernieren sie Chemokine und lotsen dadurch weitere Effektorzellen an den Entzündungsherd.

Der Wirkmechanismus des angeborenen Immunsystems beruht auf der Erkennung von konservierten Merkmalen von Pathogenen, sogenannten „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs). Die Rezeptoren für diese konservierten Strukturen werden in der Keimbahn kodiert. Im Gegensatz zu den hochvariablen T-Zell Rezeptoren besitzt jeder Rezeptortyp dieselbe Spezifität. Diese kann beispielsweise gegen das Lipopolysaccharid der gramnegativen Bakterien, gegen bestimmte Zuckerstrukturen oder virale DNA und RNA gerichtet sein. Sowohl Makrophagen, als auch B-Zellen und dendritische Zellen tragen diese Toll-like Rezeptoren (TLRs) auf der Zelloberfläche oder in Endosomen. Nach der Bindung ihres Liganden lösen die TLRs stark konservierte Signaltransduktionswege aus, z.B. führt die Aktivierung von TLR4 durch das Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien zur Bindung an das „myeloid differentiation primary-response protein 88“ (MyD88). Die Phosphorylierung verschiedener „IL-1R associated Kinases“ (IRAKs) und des „tumor necrosis factor receptor-associated factor 6“ (TRAF6) führt zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors

NF- κ B und dessen Translokation in den Nukleus. Hier bewirkt NF- κ B die Transkription verschiedener proinflammatorischer Cytokine wie IL-6, IL-12 und TNF- α und damit zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems.

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Die vom adaptiven Immunsystem vermittelte Immunität beruht auf Lymphozyten mit individuellen antigenspezifischen Rezeptoren und der damit erworbenen Fähigkeit Pathogene spezifisch zu erkennen und zu bekämpfen. Die Vielzahl der T- und B-Zell-Rezeptoren entsteht durch somatische Rekombination, d.h. durch Umlagerung der V(D)J Elemente. Eine weitere Eigenschaft des adaptiven Immunsystems ist die Fähigkeit ein immunologisches Gedächtnis auszubilden, das es dem Körper ermöglicht, auf eine wiederholt auftretende Infektion schneller zu reagieren. Dies geschieht auf zellulärer Ebene durch sogenannte „memory T-cells“ und auf humoraler Ebene, d.h. durch die Produktion löslicher B-Zell-Rezeptoren, den Antikörpern.

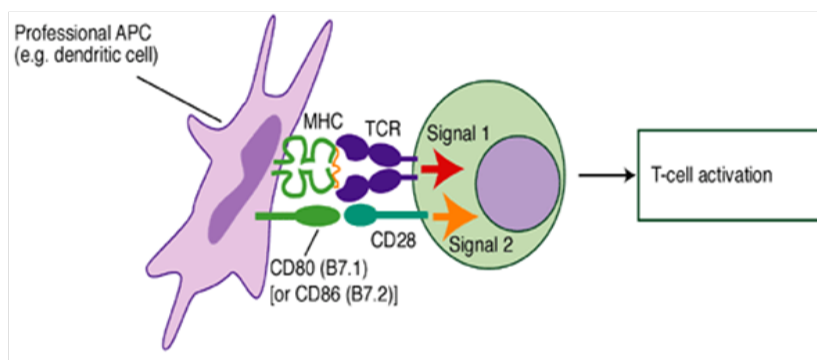


Abbildung 2: Schema der Aktivierung naiver T-Zellen über den T-Zellrezeptor und kostimulatorische Moleküle durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) wie z.B. dendritische Zellen².

Die meisten nukleären Zellen präsentieren Fragmente zellulärer Proteine (die Epitope) in Verbindung mit „major histocompatibility complex“ (MHC) Molekülen auf der Zelloberfläche. T-Zellen können mit ihrem spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) zwischen Fremd und Selbst unterscheiden. Um potentiell autoreaktive T-Lymphozyten zu entfernen, werden sie in einem frühen Entwicklungsstadium im Thymus selektiert, ein Vorgang, der zentrale Toleranzinduktion genannt wird. T-Lymphozyten kontrollieren den Körper und untersuchen die MHC Moleküle auf Epitope, die vom üblichen Repertoire abweichen. Dies können Epitope fremden Ursprungs sein, wie es beispielsweise bei einer viralen Infektion der Zelle der Fall wäre, oder aber, die Epitope entspringen

endogenen Proteinen, die durch eine maligne Erkrankung abweichende Proteinsequenzen aufweisen. Abbildung 2 zeigt die Aktivierung naiver T-Zellen durch die Antigen-präsentierende (APC) dendritische Zelle über den MHC I/TCR-Komplex und die kostimulatorischen Moleküle CD80/86-CD28². Dieser Komplex wird auch als immunologische Synapse bezeichnet. Erkennt eine T-Zelle „ihr“ Antigen in Kombination mit dem MHC Molekül, das zusammen mit kostimulatorischen Molekülen von einer APC präsentiert wird, proliferiert sie und entwickelt ihre Effektor-Funktion.

Man unterscheidet CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die den entsprechenden Korezeptor exprimieren. CD8⁺ T-Zellen („cytotoxic T-lymphocytes“, CTLs) töten durch die Ausschüttung von Perforin und Granzymen die infizierte oder veränderte Zelle. Die verschiedenen Subpopulationen der CD4⁺ T-Zellen, wie die T-Helfer-Zellen (T_H-Zellen) schütten Cytokine aus, die die Aktivität der CD8⁺ T-Zellen erhöhen (T_H1: IFN- γ , IL-12), oder durch die B-Zellen aktiviert werden und spezifische Antikörper produzieren (T_H2: IL-4, 5, 6, 10 und 13). CD4⁺, FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen (T_{regs}), vermitteln durch die Ausschüttung von Cytokinen die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz und verhindern eine Überreaktion des Immunsystems.

1.2 Struktur und Eigenschaften der MHC Moleküle

Der „major histocompatibility complex“ (MHC) ist ein polygener und hoch polymorpher Genlocus der Vertebraten (Abbildung 3). Die ca. 7×10^6 bp große Region auf Chromosom 6 (beim Menschen) und Chromosom 17 (bei der Maus) kodiert ca. 200 Gene, von denen etwa 20 % eine Rolle für das Immunsystem spielen. Darunter befinden sich die schweren Ketten der MHC Moleküle der Klassen I und II, Komponenten der Antigen-Prozessierungs Maschinerie (z.B. Immunoproteasom-Untereinheiten, „transporter associated with antigen processing (TAP), Tapasin) und verschiedene Cytokine (z.B. „tumor nekrosis factor“, TNF). Die humanen MHC I Gene heißen „*Human Leukocyte Antigen*“ HLA-A, -B und -C, bei der Maus bezeichnet man sie als H-2K, -D und -L. Die humanen MHC II Gene heißen HLA-DR, -DP und -DQ, bei der Maus bezeichnet man sie als H-2A und H-2E.

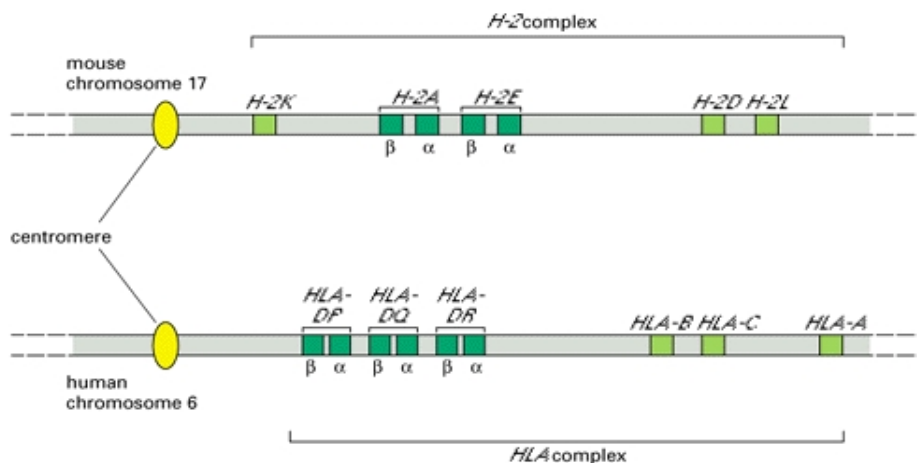


Abbildung 3: Organisation der MHC Genloci bei Mensch (unten) und Maus (oben)³.

MHC II Moleküle bestehen aus je einer α und β -Kette, die nicht kovalent verbundenen sind und beide die Membran durchspannen (Abbildung 4). Der hochvariable peptidbindende Spalt wird durch die α_1 und β_1 Domänen gebildet und ist an den Seiten geöffnet. Das hat zur Folge, daß die Enden der gebundenen Peptide überhängen und die mindestens 13 AS langen Epitope in ihrer Länge variabel sein können. MHC II Moleküle präsentieren ihre Epitope, die von exogenen Proteinen stammen, den $CD4^+$ T-Zellen. Sie werden grundsätzlich nur auf APCs exprimiert, Ausnahmen sind aktivierte humane T-Zellen und Epithelzellen des Thymus.

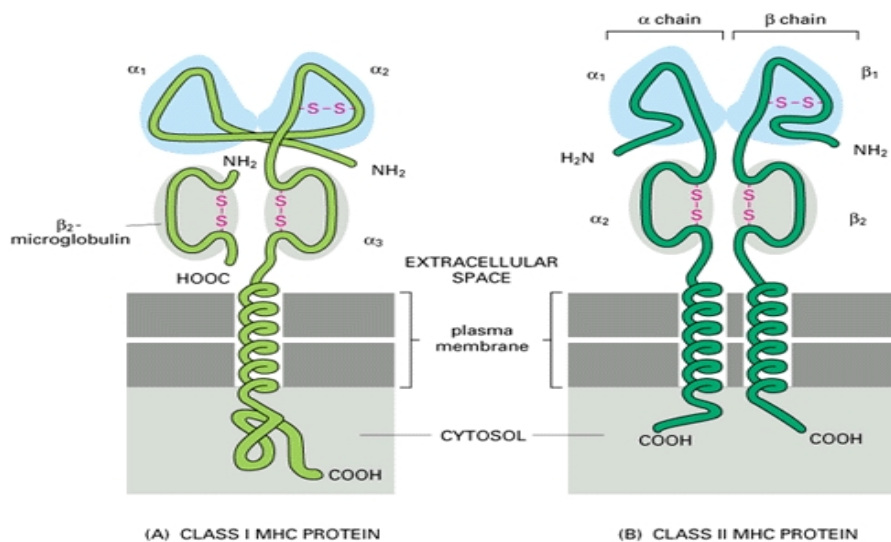


Abbildung 4: Aufbau der MHC Klasse I und Klasse II Moleküle³.

MHC Moleküle der Klasse I sind Heterodimere aus einer ca. 44 kD großen α -Kette und einem nicht-kovalent gebundenen Serumprotein, dem ca. 12 kD großen β_2 -Mikroglobulin (Abbildung 4). Die MHC I Moleküle sind nur über eine Transmembran-Domäne in der Zellmembran verankert, wo sie konstitutiv auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden. Erst durch die Bindung ihrer Epitope sind die MHC Moleküle auf der Zelloberfläche stabil⁴.

MHC I Moleküle bilden mit ihren $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Domänen die Peptid-Bindungs-Tasche⁵. Durch diese geschlossene Tasche sind die präsentierten Epitope in ihrer Länge begrenzt⁶. Je nach MHC Haplotyp sind die Epitope 8-11 Aminosäuren (AS) lang. MHC I Moleküle präsentieren endogene oder virale Peptidfragmente den $CD8^+$ T-Zellen. Diese Präsentation ist für die Aktivierung zytotoxischer $CD8^+$ T-Lymphozyten (CTL) und die Homöostase unabdingbar⁷. CTLs erkennen mit ihrem T-Zell Rezeptor die Struktur aus Epitop-Sequenz und MHC Klasse I Molekül⁸. Die Peptide und damit auch die CTL Antwort sind also MHC-restringiert.

Durch die Polygenie des MHC und die Polymorphie der MHC-Allele, die kodominant exprimiert werden, trägt jedes Individuum bis zu sechs verschiedene MHC I Moleküle und bis zu acht verschiedener MHC II Moleküle auf seiner Zelloberfläche. Da die MHC Ketten gerade in den Domänen, die die Peptidbindungsfurche bilden eine hohe Polymorphie zeigen, ist das Spektrum an Peptiden, die gebunden werden können extrem breit. Dies bedeutet für den Organismus, daß die Wahrscheinlichkeit sehr hoch ist, daß seine MHC Moleküle Peptide aus verschiedensten Antigenen präsentieren können.

H_3N^+	R	G	Y	V	Y	Q	Q	L	COO^-
H_3N^+	S	I	I	N	F	E	K	L	COO^-
H_3N^+	A	P	G	N	Y	P	A	L	COO^-

H_3N^+	T	Y	Q	R	T	R	A	L	V	COO^-
H_3N^+	S	Y	F	P	E	I	T	H	I	COO^-
H_3N^+	K	Y	Q	A	V	T	T	T	L	COO^-
H_3N^+	S	Y	I	P	S	A	E	K	I	COO^-

Figure 3-19 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Abbildung 5: Peptidliganden verschiedener muriner MHC I Moleküle. Oben: H2-K^b, unten: H2-K^{d9}.

MHC I Moleküle binden Peptide mit deren freiem C-Terminus und N-Terminus. Andere Seitenketten dienen als zusätzliche Verankerung. Die Analyse eluierter MHC I Liganden zeigt eine Anreicherung bestimmter Aminosäuren in diesen sogenannten Anker-Positionen (Abbildung 5). Jedes MHC I Allel

besitzt seine eigenen Anforderungen an die Epitope, die es binden kann. Die Epitope besitzen hydrophobe oder basische Aminosäuren (AS) am C-Terminus, wie z.B. Leucin. Weitere Anker-Positionen sind P2 und P5¹⁰. Diese Anforderungen führen zu Sequenzmotiven für die einzelnen MHC I Allele.

1.3 Antigen Prozessierung

Die Peptid-Liganden der MHC-Moleküle für die Präsentation an die T-Zellen entstehen aus intakten Proteinen durch den Vorgang der Antigen-Prozessierung. Dabei entstehen Peptide für MHC Klasse I und MHC II- Moleküle aus verschiedenen Quellen und auf unterschiedlichen Wegen (Abbildung 6). Im Allgemeinen werden intrazelluläre Proteine und Proteine cytosolischer Pathogene auf MHC I-Molekülen, während extrazelluläre Proteine und Proteine endosomaler Pathogene auf MHC II-Molekülen präsentiert werden. Eine Ausnahme ist die Fähigkeit CD8⁺ dendritischer Zellen, extrazellulär aufgenommene und in Phago-Lysosomen verdaute Antigene auf MHC I Molekülen zu präsentieren. Dieser Vorgang wird „Cross-presentation“ genannt.

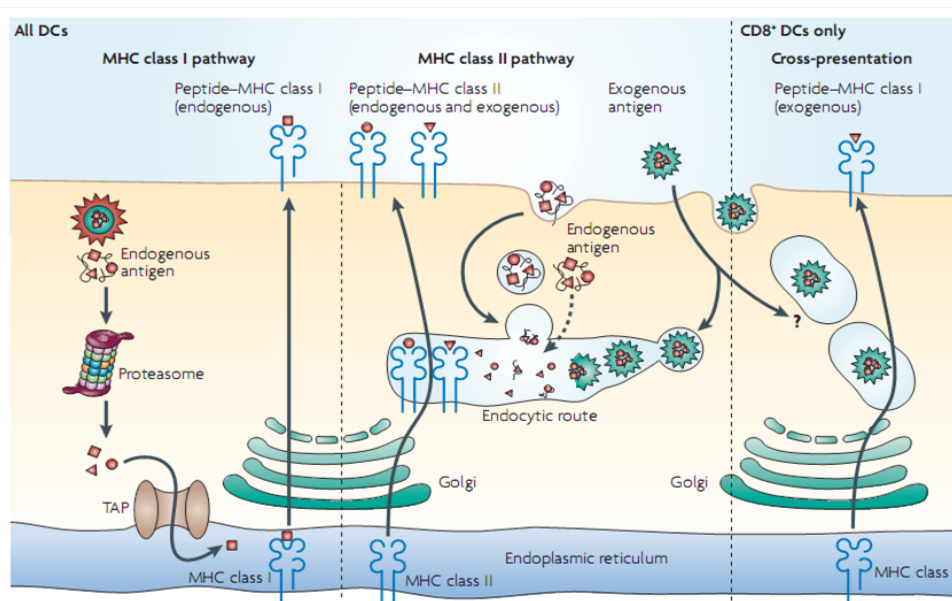


Abbildung 6: Übersicht über die verschiedenen Quellen für Proteine, Abbauege und beteiligter Zellkompartimente für die Beladung von MHC I und MHC II Molekülen¹¹.

Im Folgenden soll sich auf die direkte Antigen-Prozessierung für MHC Klasse I Moleküle beschränkt werden.

1.3.1 Antigen Prozessierung für MHC I-Moleküle

Die effiziente Generierung von Epitopen aus endogenen Proteinen für die Präsentation auf MHC I Molekülen ist essentiell für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems. CD8⁺ T-Zellen müssen durch die Erkennung krankhaft veränderter oder viraler Proteine über ihren spezifischen T-Zell Rezeptor aktiviert werden, um ihre Effektorfunktion erfüllen zu können. Generierung und Präsentation von CTL-Epitopen auf MHC Klasse I Molekülen ist das Resultat eines komplexen proteolytischen Prozesses. Er beginnt im Cytosol und endet im endoplasmatischen Retikulum, wo die CTL Epitope durch ER-residente Aminopeptidasen auf die passende Länge von 8-11 AS getrimmt werden um anschließend auf MHC I Moleküle geladen zu werden¹². Die Peptid/MHC I Komplexe gelangen über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche und bieten den zirkulierenden cytotoxischen T-Zellen so ein Abbild des Zustandes der betreffenden Zelle, nur so können sie infizierte oder maligne Zellen erkennen und lysieren¹³. Einen Überblick über die Vorgänge der direkten Antigen Prozessierung für MHC Klasse I gibt Abbildung 6 (links).

1.3.2 Quelle für Peptide

Peptide für die Präsentation auf MHC I Molekülen entstehen durch die Proteolyse von endogenen Proteinen oder Virus-assoziierten Proteinen durch das Proteasom und andere cytosolischen Proteasen¹⁴. Die Generierung von hochaffinen Antigenpeptiden aus Proteinen ist ein wenig effektiver Prozess und es wurde gezeigt, dass z.B. 2000 Ovalbumin Moleküle abgebaut werden müssen, um einen Peptid-MHC I Komplex (pMHC I) zu bilden¹⁵. Grund hierfür sind vor allem die vielfältigen proteolytischen Prozesse im Cytosol, durch die Proteine meist bis auf ihre Aminosäuren abgebaut werden.

Mögliche Quellen für endogene Peptide sind Proteine aus dem normalen zellulären Protein-Umsatzes oder sogenannte „defective ribosomal products“ (DRiPs), also falsch translatierte und/oder falsch gefaltete Proteine¹³. So kann gewährleistet werden, dass sowohl wenig abundante oder sehr kurz- oder langlebige Proteine, als auch Proteine aus Kompartimenten möglichst effektiv präsentiert werden können. Nach Schätzungen bilden DRiPs bis zu 70 % des Ausgangsmaterials für Peptide, die als Antigene dienen können¹⁵.

1.3.3 Cytosolische Prozesse: Proteasome und cytosolische Proteasen

Das Proteasom ist eine multikatalytische Endopeptidase (Threonin-Protease) im Cytosol und im Nukleus der Zelle. Das Proteasom ist für die initiale Proteolyse der über Lysin₄₈ Poly-Ubiquitinierung markierten Proteine des normalen zellulären Protein-Umsatzes verantwortlich¹⁶. Zudem generiert es den passenden C-Terminus der allermeisten Epitope¹⁷. In manchen Fällen (<5 %) wird schon das reife Epitop alleine durch das Proteasom generiert und benötigt kein zusätzliches Trimming durch andere Proteasen¹⁸.

Das konstitutive Proteasom (26S) und das Immunoproteasom (Abbildung 7) bestehen aus dem proteolytisch aktiven 20S Kern, der aus vier Heptameren Ringen aufgebaut ist und zwei 19S Regulatoren (PA700, eine ATPase), die unter ATP-Verbrauch den Eintritt der Proteine in das Innere des Komplexes kontrollieren¹⁹. Die proteolytischen Zentren sitzen in den Ringen, die aus β -Untereinheiten aufgebaut sind, genauer in den $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ Untereinheiten. Peptidbindungen werden auf der Carboxyl-Seite von bestimmten Aminosäuren (AS) hydrolysiert. Die drei proteolytischen Untereinheiten weisen dabei unterschiedliche Spezifität für diese Aminosäuren auf. Man spricht dem Proteasom deshalb Trypsin-ähnliche (schneidet nach Arginin und Lysin), Chymotrypsin-ähnliche (Leucin, Isoleucin, Methionin, Valin, Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan) und Caspase-ähnliche (Glutaminsäure, Asparaginsäure) Eigenschaften zu²⁰.

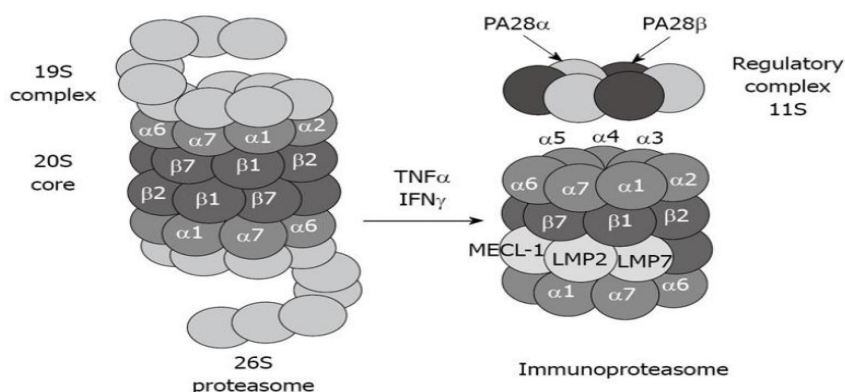


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Aufbaus des konstitutiven (links) und des nach Stimulation durch $\text{IFN-}\gamma$ gebildeten Immunoproteasoms (rechts)²¹.

Im Falle einer Infektion durch Pathogene wird von NK-Zellen, $\text{T}_\text{H}1$ Zellen und CD8^+ T-Zellen $\text{IFN-}\gamma$ sezerniert. $\text{IFN-}\gamma$ führt über die JAK/STAT Kaskade zur Induktion vieler Komponenten des MHC I Prozessierungsweges wie z.B. TAP, ERAP 1 und 2, MHC Klasse I Molekülen selbst und zur Expression eines veränderten Proteasoms, dem Immunoproteasom²². Hier werden β -Untereinheiten durch

LMPs (low molecular weight proteins) ersetzt. LMP 2 ersetzt die $\beta 1$ Untereinheit, LMP7 ersetzt $\beta 5$ und MECL-1 ersetzt $\beta 2$. Der 19S Regulator wird durch den „proteasome activator complex“ (PA28) ersetzt, wobei auch Hybrid-Proteasome auftreten, die sowohl den 19S Komplex als auch PA28 besitzen. PA28 lässt die Proteine ohne ATP Verbrauch ins Innere des Komplexes und verändert auch die Schnittpräferenz des 20S Kerns. Das Immunoproteasom generiert aufgrund veränderter Schnittpräferenzen mehr Peptide, die als Epitope dienen können, als das konstitutive Proteasom²³.

Das Proteasom generiert Peptide mit einer Länge von 3-22 AS. Davon sind viele Peptide (ca. 70 %) ²⁴ zu kurz, um als Epitope zu dienen und werden noch im Cytoplasma in ihre Aminosäuren zerlegt. Zudem werden auch längere Peptide durch cytoplasmatische Peptidasen zerstört. Dabei folgt der Abbau der Polypeptide gemäß den Längenpräferenzen dieser Proteasen; zunächst durch Tripeptidyl-Peptidase II (TPP II), die drei AS vom N-Terminus zugleich entfernt, gefolgt vom Abbau durch Thimet Oligopeptidase (TOP) und dem Abbau zu einzelnen Aminosäuren durch Leucin-Aminopeptidase (LAP), Puromycin-sensitive Aminopeptidase (PSA) und Bleomycin Hydrolase (BH)²⁵. Das Cytosol ist eine sehr aggressive Umgebung für Proteine und letztendlich kann nur ein sehr kleiner Teil (circa 1 %) der durch das Ubiquitin-Proteasom System generierten Peptide durch den Transport ins ER für die Antigen-Präsentation genutzt werden^{22;26;27}. Viele dieser Peptide (15-25 %) sind N-terminal verlängerte Epitope-Vorläufer, und werden im ER-Lumen durch Aminopeptidasen getrimmt.

1.3.4 TAP

Um überhaupt auf MHC I Molekülen präsentiert zu werden, müssen die im Cytosol gebildeten Peptide in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert werden. Dies geschieht durch den „transporter associated with antigen processing“ (TAP), ein ATP-binding cassette (ABC) Transporter aus TAP1 und TAP2 Heterodimeren²⁸. Er durchspannt die ER Membran und transportiert unter ATP Verbrauch Peptide durch einen ATP abhängigen Prozess in das Lumen des ER (Abbildung 8). TAP defiziente Zellen exprimieren kaum stabile MHC I Moleküle auf der Zelloberfläche²⁹.

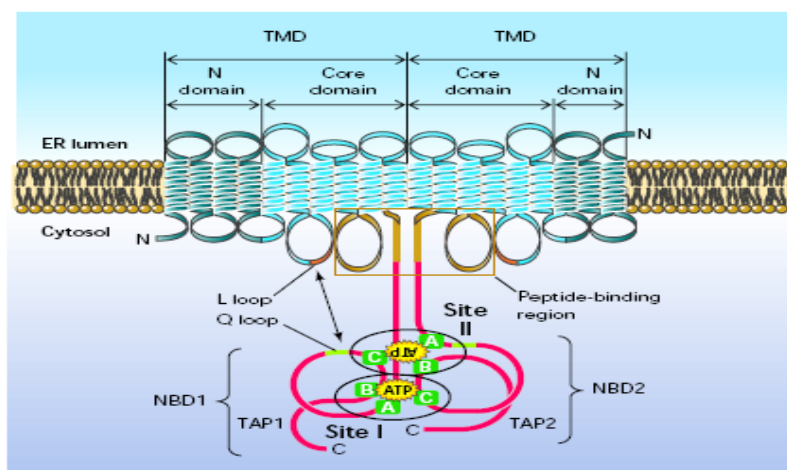


Abbildung 8: Schematischer Aufbau des integralen TAP1/2 Heterodimers in der ER Membran. "transmembrane domain" (TMD), "nucleotide binding domain" (NBD)³⁰.

Die Selektivität des TAP Transporters ist eher abhängig von der Sequenz als von der Länge der Peptide. Seine bevorzugten Substrate sind Peptide von 8-16 AS (also ähnlich wie die ideale Länge für Beladung von MHC I Molekülen), es können aber Peptide mit bis zu 25 AS transportiert werden³¹. Die Seitenketten der bevorzugt transportierten Peptide weisen besonders in den ersten drei N-terminalen und der letzten C-terminalen Position bestimmte Motive auf (Abbildung 9), aber auch andere Positionen haben einen Einfluss.

Murine		Position								
TAP		1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	-0.4	-0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.2	0.3	
C	0.0	-0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	-0.2	-0.1	-0.4
D	0.0	0.1	0.5	-0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	1.2	
E	0.1	0.0	0.4	-0.2	0.0	0.1	0.0	0.1	1.4	
F	0.3	0.1	-0.7	0.0	-0.2	-0.2	-0.4	-0.3	-1.4	
G	0.0	0.3	0.3	0.3	0.0	0.0	0.1	0.1	0.9	
H	0.1	0.1	-0.4	0.2	0.0	-0.1	0.0	-0.1	-0.2	
I	0.0	0.0	-0.4	0.1	-0.1	-0.1	-0.1	0.0	0.7	
K	-0.1	-0.1	0.0	0.0	0.1	0.2	0.4	0.1	1.0	
L	0.0	0.2	0.1	0.2	-0.1	-0.2	-0.1	0.1	-0.6	
M	-0.2	-0.2	-0.3	0.2	-0.1	-0.1	-0.1	-0.1	-1.2	
N	-0.2	0.1	0.3	0.0	0.1	-0.1	0.0	0.1	0.2	
P	0.8	0.9	0.8	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	-0.1	
Q	0.0	-0.2	0.4	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	
R	-0.3	-0.5	0.0	-0.1	0.1	0.2	0.1	-0.2	0.9	
S	-0.2	-0.1	0.2	0.0	0.1	0.1	0.2	0.0	0.5	
T	-0.1	0.0	-0.1	-0.1	0.0	0.1	0.2	0.1	0.6	
V	-0.1	-0.2	-0.3	0.0	-0.1	0.0	0.2	0.2	-0.3	
W	0.2	-0.3	-0.4	-0.3	-0.1	-0.1	-0.2	-0.3	-1.1	
Y	0.2	-0.1	0.6	0.0	-0.1	-0.1	-0.4	0.5	-1.0	

Human		Position								
TAP		1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	-0.7	-0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	0.2	
C	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.0
D	0.6	0.6	0.8	-0.1	0.1	0.1	0.5	0.1	0.8	
E	0.7	0.0	0.7	0.0	0.2	-0.1	0.3	0.2	0.7	
F	0.4	-0.2	-0.5	-0.2	-0.1	0.0	-0.2	0.1	-1.1	
G	0.1	0.5	0.7	0.2	0.3	0.1	0.6	-0.2	0.6	
H	0.1	0.1	-0.1	-0.1	0.0	0.0	-0.1	0.2	0.2	
I	0.0	-0.2	-0.3	0.0	-0.2	-0.3	-0.4	0.2	0.2	
K	-0.4	-0.2	0.0	-0.1	0.0	-0.1	0.2	0.1	-0.2	
L	-0.2	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.0	-0.3	0.0	-0.4	
M	-0.2	-0.2	-0.3	-0.2	-0.1	0.1	-0.3	0.0	-0.1	
N	-0.6	0.3	0.4	0.2	0.2	-0.1	0.1	0.1	0.6	
P	0.6	1.3	0.1	0.0	-0.3	-0.1	-0.4	0.0	0.0	
Q	0.2	-0.4	0.2	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	
R	-0.6	-0.6	-0.2	-0.1	-0.1	-0.3	0.0	-0.2	-0.6	
S	-0.2	-0.1	0.0	0.1	0.2	0.1	0.4	-0.2	1.0	
T	-0.1	0.0	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	-0.2	0.3	
V	-0.2	-0.2	-0.3	0.1	0.2	0.0	-0.1	0.0	-0.1	
W	0.2	-0.3	-0.7	-0.1	-0.3	0.1	-0.2	-0.3	-0.4	
Y	0.2	-0.3	0.8	-0.1	-0.1	0.1	-0.4	0.0	1.3	

Abbildung 9: Einfluss der Seitenketten und Positionen der Aminosäuren im Peptid auf die Affinität des murinen (links) und humanen (rechts) TAP-Transporters. Rot: negativer Einfluss, grün: positiver Einfluss der AS auf den Peptidtransport³².

Dabei unterscheiden sich TAP-Dimere murinen und humanen Ursprungs, z.B. bevorzugt murines TAP aromatische oder hydrophobe C-Termini (F, W, M) während humanes TAP Peptide mit aromatischen

und basischen C-Termini (F, Y, R) besser transportiert. Ihnen gemein ist, dass z.B. Prolin in Position P1 und P2 den Transport dramatisch vermindert. Solche Peptide werden nur mit einer N-terminalen Verlängerung effizient transportiert und benötigen weiteres Trimming durch ER-residente Aminopeptidasen^{26;33}. Es wurde gezeigt, dass die TAP Affinität zusammen mit der MHC I Bindungsaffinität ein gutes Maß für die Vorhersage von T-Zell-Epitopen aus Polypeptiden darstellt³⁴.

1.3.5 Prozesse im endoplasmatischen Retikulum

Das endoplasmatische Retikulum ist ein eukaryotisches Zellkompartiment, der Ort der Protein- und Lipidbiosynthese. Hier findet die posttranslationale Faltung von Proteinen und deren Modifikation durch N-Glykosylierung statt, sowie der Export von Proteinen durch sekretorische Vesikel zum Golgi-Apparat³⁵. Außerdem ist das ER für die Qualitätssicherung von Proteinen und die Rückführung missgefalteter oder akkumulierter Proteine über Sec61 in das Cytoplasma durch „ER associated degradation“ (ERAD) verantwortlich³⁶.

1.3.5.1 Der „peptide loading complex“ und Transport der pMHC I Moleküle an die Zelloberfläche

TAP ist Teil eines großen Proteinkomplexes im ER, dem „petide loading complex“ (PLC), der neu gebildete MHC I Moleküle mit einem hochaffinen prozessierten Peptid belädt (Abbildung 10). Außer TAP gehören die schweren Ketten der MHC I Moleküle, β_2 -Mikroglobulin, Tapasin, Calreticulin/Calnexin und ERp57 und Bap31 zu diesem Komplex³⁷.

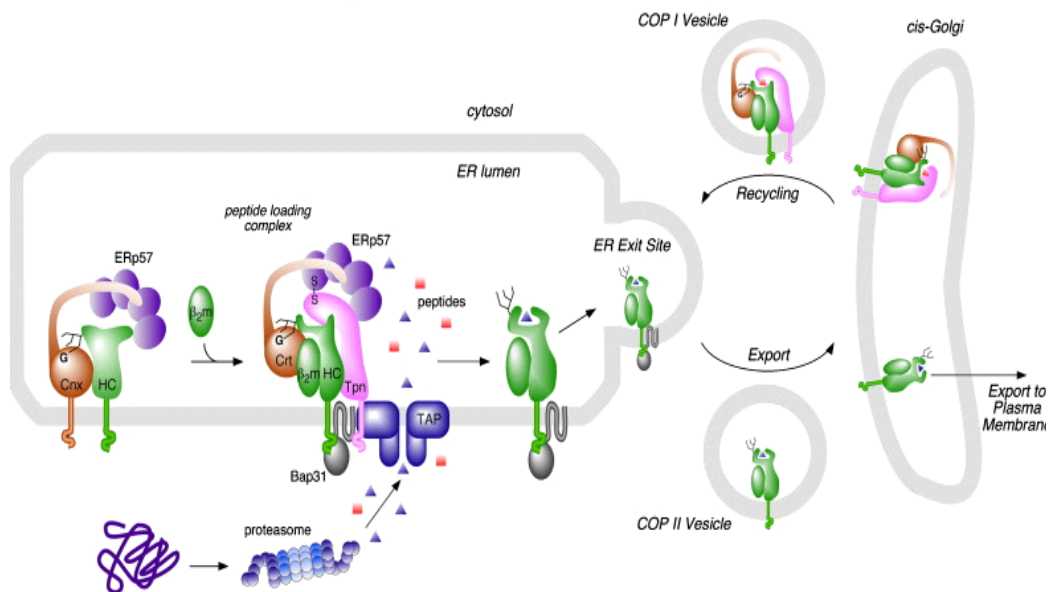


Abbildung 10: Beladung von MHC I Molekülen durch den "peptide loading complex" und Export der beladenen MHC I/Peptid Komplexe an die Zelloberfläche³⁸.

Der erste Schritt der MHC I Beladung beginnt mit der Bindung der schweren Ketten der MHC I Moleküle und Calnexin. Calnexin (Cnx) ist ein membrangebundenes Chaperon, das die korrekte Faltung der schweren Kette der MHC I Moleküle und die Assoziation mit β_2 -Mikroglobulin unterstützt. Calnexin rekrutiert dann ERp57, das die Disulfid-Brücke zwischen der $\alpha 2$ und $\alpha 3$ Domäne der schweren Ketten des MHC I Moleküls und damit die Peptidtasche bildet³⁹. Danach assoziiert β_2 -Mikroglobulin mit der korrekt gefalteten schweren Ketten und Calnexin wird durch das Chaperon Calreticulin (Crt) ersetzt⁴⁰. Zusätzlich assoziiert Tapasin und bildet eine Brücke zwischen dem MHC I Molekül mit Calreticulin und ERp57 und dem TAP1/2 Dimer. Durch TAP transportierte Peptide mit der korrekten Länge werden nun auf das neu geformte MHC I Molekül geladen oder werden gegebenenfalls vorher durch ER-residente Aminopeptidasen auf die passende Länge getrimmt. Wie Untersuchungen mit Tapasin-defizienten Mäusen zeigten, selektiert Tapasin Peptide mit einer hohen Halbwertszeit und hoher Affinität und trägt so zur Bildung stabiler pMHC I Komplexen bei⁴¹. Die Bindung des Peptids bewirkt eine Konformationsänderung im MHC I Molekül und schließlich bewirkt ERp57 die Bildung einer zweiten Disulfidbrücke in der $\alpha 2$ Domäne, die das Peptid „einschließt“. Mit genügend affinen Peptiden beladene MHC I Moleküle lösen sich vom PLC und assoziieren mit dem Export-Rezeptor Bap31. Dann verlassen sie das ER in sekretorischen COP II Vesikeln, erreichen den cis-Golgi Apparat und werden von dort an die Zelloberfläche transportiert³⁸.

1.3.5.2 Trimming im ER

TAP transportiert Peptide in das Lumen des ER, die größer sind als 8 AS. Diese sind zumeist N-terminal verlängert, da das Proteasom nur den korrekten C-Terminus generiert. Diese Peptide müssen aufgrund der strikten MHC I Bindungsmotive ein oder mehrere Male durch Aminopeptidasen N-terminal getrimmt werden. 2001 wurde erstmals eine Rolle für eine luminaire Metalloprotease bei der Generierung des aus Ovalbumin stammenden Epitops SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₃) beschrieben⁴², wobei das verantwortliche Enzym selber aber nicht identifiziert werden konnte. Mehrere Gruppen fanden IFN- γ induzierbare Aminopeptidase-Aktivitäten in aufgereinigten Mikrosomen aus Maus, Ratte und Mensch^{24;43;44}, was auf eine Rolle dieser Enzyme im MHC Klasse I Prozessierungsweg hinweist. Dabei zeigte sich auch, dass die Enzyme bestimmte Aminosäuren bevorzugt trimmen konnten. Die Leucin trimmende Aminopeptidase wurde als ERAP1 (human) oder deren murines Homolog ERAAP identifiziert.

ERAAP/ERAP1 („ER aminopeptidase associated with antigen processing“, oder auch „adipocyte-derived leucine aminopeptidase“ (A-LAP)) ist eine Metalloprotease mit einem HEXX(H)₁₈E Zn²⁺ bindenden Motiv und einem GAMEN Exopeptidase Motiv, die für die proteolytische Aktivität essentiell sind. Zusammen mit der „insulin regulated aminopeptidase“ (IRAP) auch „leucyl/cystinyl aminopeptidase“ (P-LAP) genannt und der „leukocyte-derived aminopeptidase“ (L-RAP oder ERAP2) gehört ERAP1 zur Oxytocinase Subfamilie der M1 Aminopeptidasen (Abbildung 11). Ihnen gemein ist, dass sie weder eine X-Pro, noch eine Pro-X Bindung hydrolysieren können⁴⁵.

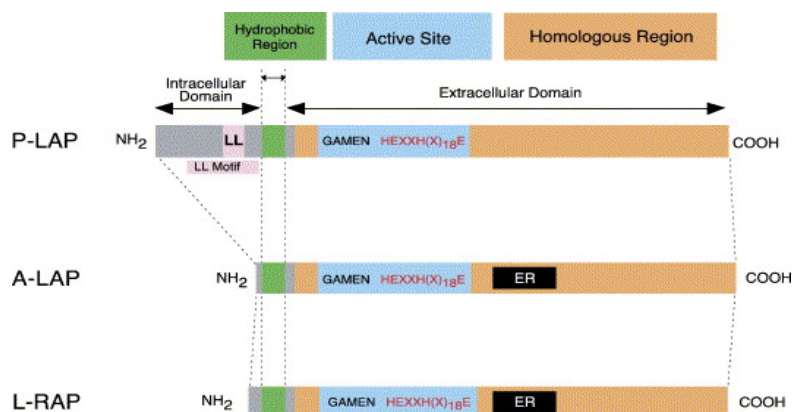


Abbildung 11: Die drei Mitglieder der Oxytocinase Unterfamilie der M1 Aminopeptidasen IRAP, ERAP1 und ERAP2. Die aktive Domäne mit GAMEN Motiv und dem Zn²⁺ bindenden Motiv, A-LAP (ERAP1) und L-RAP (ERAP2) mit ER-Retentions-Signal⁴⁶.

Im humanen System sind zwei ER-residente Aminopeptidasen bekannt: ERAP1 und ERAP2. Im murinen System fehlt ERAP2 und es wurde nach genomischer Sequenzanalyse auch kein Homolog gefunden. Beide Enzyme sind membranständige luminaire Aminopeptidasen und werden ubiquitär in Geweben exprimiert. Beide werden, wie viele Proteine, die in der MHC I Präsentationsmaschinerie eine Rolle spielen, durch IFN- γ in ihrer Expression reguliert. ERAP1 schneidet bevorzugt Leucin, gefolgt von Methionin und Cystein. ERAP2 besitzt eine Präferenz für die basischen AS Arginin und Lysin (Abbildung 12).

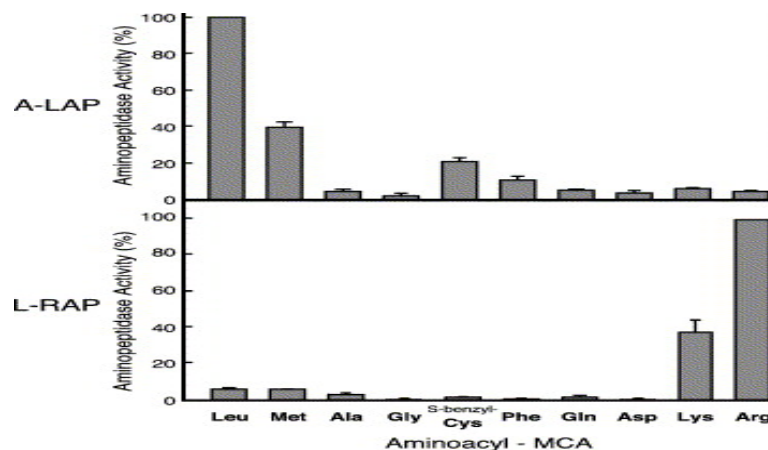


Abbildung 12: Aminosäure-Präferenzen der Enzyme ERAP1 (A-LAP) und ERAP2 (L-RAP) ⁴⁶.

ERAP1 und auch ERAP2 trimmen N-terminal verlängerte Epitop-Vorläufer und generieren dadurch reife CTL-Epitope. Dabei bilden die beiden Enzyme teilweise auch heterodimere Komplexe, die z.B. Epitope aus dem HIV gp160 Protein gemeinsam schneiden⁴⁴. ERAP1 wird dabei ein „molecular ruler mechanism“ zugesprochen, da es bevorzugt Peptide von 9 oder mehr AS trimmt. Dies soll verhindern, dass Epitope im ER zerstört werden^{44;47;48}.

Es wurde gezeigt, dass die Überexpression von ERAAP die Prozessierung und Präsentation von pMHC I Komplexen auf der Zelloberfläche fördert und ERAAP knockdown das Gegenteil bewirkt. Dabei werden bei knockdown instabil gebundene und auch ungewöhnliche Peptide präsentiert⁴⁹. Der knockdown hat Auswirkungen auf die globale MHC I Präsentation. H2-K^k restringierte Epitope wurden nach ERAAP knockdown um 23 % weniger präsentiert, H2-L^d restringierte sogar um 44 %. Dies lässt sich durch die H2-L^d eigene Peptid-Präferenz erklären. H2-L^d bindet bevorzugt Epitope mit Prolin in Position zwei, also Peptide, die in ihrer reifen Form so gut wie nicht von TAP transportiert werden und unbedingt Trimming im ER benötigen⁴³.

In vitro Experimente mit ERAAP spezifischer siRNA zeigten aber auch gegenteilige Effekte in Bezug auf die Präsentation spezifischer Epitope auf verschiedenen Allelen. So wurde bei ERAAP knockdown

die Präsentation von drei der fünf untersuchten Epitope um 15-65 % reduziert, wohingegen die Präsentation zweier anderer Epitope um 33-40 % erhöht wurde⁴³. Diese Ergebnisse legen nahe, dass ERAAP *in vivo* zum Einen die pMHC I Präsentation fördert, indem es den MHC I Molekülen mehr hochaffine Epitop-Peptide zur Verfügung stellt, zum Anderen die Präsentation verschlechtert, indem es Epitope zerstört⁴⁴. ERAAP defiziente Mäuse präsentieren viele ungewöhnliche und instabile pMHCI Komplexe und zeigen eine veränderte Immunodominanz⁵⁰.

1.4 Zielsetzung

Mehrere Arbeitsgruppen haben bereits Hinweise auf weitere Aminopeptidase-Aktivitäten neben ERAAP/ERAP1 und ERAP2 in isolierten Mikrosomen gefunden. Aber sowohl die der Aktivität zugrundeliegenden Enzyme, als auch der Einfluss dieser Aminopeptidasen auf die MHC I restringierte Antigen-Prozessierung ist bislang unklar⁵¹. Ziel dieser Arbeit war es, die Aufreinigung des endoplasmatischen Retikulums aus Zellhomogenisat zu optimieren, um das ER auf weitere IFN- γ induzierbare Aminopeptidase-Aktivitäten zu überprüfen und die verantwortlichen Enzyme zu identifizieren. Um die Aktivität der Enzyme biochemisch genauer zu untersuchen, sollten sie in einem geeigneten System rekombinant exprimiert und anschließend aufgereinigt werden. Danach sollte die Spezifität der rekombinanten Enzyme durch fluorogene Substrate oder durch den *in vitro* Verdau von N-terminal verlängerten CTL-Epitopen charakterisiert werden. Desweiteren sollte ein geeigneter Antikörper generiert werden, um die intrazelluläre Lokalisation über die Koloalisation mit anderen ER-residenten Proteinen durch Fluoreszenz Mikroskopie nachweisen zu können. Da die Induzierbarkeit der Proteinexpression durch proinflammatorische Cytokine ein Kennzeichen der Komponenten im MHC I Prozessierungsweg darstellt, sollte auch dies für die identifizierten Aminopeptidasen mittels Western Blot untersucht werden. Für Proteasen, die die Anforderungen für Aminopeptidasen in der MHC I restringierten Antigenprozessierung erfüllen, sollte die globale MHC I Expression und die Präsentation des OVA₍₂₅₇₋₂₆₃₎ Peptids nach RNA Interferenz oder Überexpression mittels FACS Analyse untersucht werden.

Die zentrale Funktion der MHC I Liganden für die Aktivierung der CD8⁺ Zellen des adaptiven Immunsystem macht es notwendig, die Regeln ihrer Entstehung zu erkennen. Die Mechanismen der Entstehung von CTL Epitopen sind z.B. für das Design von künstlichen Impfstoffen bedeutend, da die Spezifität des finalen Trimmings *in vivo* die Größe der CTL-Antwort und somit die Immunodominanz der Epitope beeinflusst. Die detaillierte Charakterisierung weiterer Aminopeptidasen wäre ein wichtiger Schritt zum Verständnis der Antigenprozessierung generell und der Generation von CTL Epitopen durch N-terminales Trimming im ER.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Verbrauchsmaterialien waren von Greiner bio-one (Frickenhausen).

2.2 Lösungen und Medien

ACK-Puffer: 150 mM NH_4Cl , 1 mM KHCO_3 , 0,1 mM EDTA, pH 7,3, (0,22 μm filtriert)

Annealing-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, pH 8

Bakterieller Lysepuffer: 100 mM Tris/HCl, 500 mM Saccharose, 5 mM MgCl_2 , 5 mM MgSO_4 , 2 mg/ml Polymyxin B sulfat, 1 mg/ml Lysozym, pH 8

Colloidales Coomassie: 0,12 % Coomassie brilliant blue G-250 (Pierce), 10 % H_3PO_4 , 10 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 % MeOH

Coomassie-Fixierlösung: 50 % EtOH, 10 % Eisessig

Denaturierungspuffer: TBS, 8 M Urea, 50 mM DTT

FACS-Puffer: PBS, 1 % BSA, 0,1 % NaN_3

Glycin Puffer: 100 mM Glycin, pH 2,7

ISCove's: DMEM (Pan Biotech, Aidenbach), NaHCO_3 , HEPES, AS-Mischung, Cystein, Natriumselenit, Penicillin, Streptomycin

MonoQ-Puffer Mikrosomen (Abbildung 24) A: 10 mM Tris, 1 mM MgCl_2 , 0,5 mM DTT, pH 7,8, B: A mit 1 M NaCl

MonoQ-Puffer Mikrosomen (Abbildung 25): 50 mM Tricin, 50 mM Imidazol, 1 % reduziertes Triton X-100, pH 8, B: A mit 1M NaCl

NHS-Elution alkalisch: 100 mM Triethylamin, pH 11,5

NHS-Elution sauer: 100 mM Glycin, pH 2,5

NHS-Kopplungspuffer: 200 mM NaHCO₃, 500 mM NaCl, pH 8,3

NHS-Liganden Waschpuffer 1: 500 mM Ethanolamin, 500 mM NaCl, pH 8,3

NHS-Liganden Waschpuffer 2: 100 mM Na-Acetat, 500 mM NaCl, pH 4

NHS-Serum Bindungspuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5

NHS-Waschpuffer: 10mM Tris/HCl, pH 8,8

Ni²⁺ Puffer A: PBS, 20 mM Imidazol, pH7

Ni²⁺ Puffer B: PBS, 500 mM Imidazol, pH 7

PA-Puffer: 20 mM HEPES/KOH, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 250 mM Saccharose, pH 7,6

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4, (0,22 µm filtriert)

ResourceQ/MonoQ recombinant A: 20 mM Tris, 0,25 % *n*-octyl-β-D-glucosid, pH 7

ResourceQ/MonoQ recombinant B: 20 mM Tris, 0,25 % *n*-octyl-β-D-glucosid, 1 M NaCl, pH 7

Rückfaltungspuffer: 50 mM Tris/HCl, 50 µM ZnSO₄, 400 mM L-Arginin, 1,25 mM GSH, 0,25 mM GSSG, pH 8

S200-Puffer: 20 mM Tris, 0,25 % *n*-octyl-β-D-glucosid, pH 7

Saccharose-Kissen: PA-Puffer mit 0,25 M, 0,5 M, 0,75 M, 1 M, 1,25 M und 2 M Saccharose in PA-Puffer (0,45µm filtriert)

SDS-Ladepuffer (5x): 8 % TBS pH8,8, 100 mM DTT, 20 % SDS, 0,7 % EDTA, 0,2 % Bromphenolblau in Glycerin

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl, 190 mM Glycin, 1 % SDS

StrepTag Elutionspuffer E: 100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 2,5 mM Desthiobiotin, pH 8

StrepTag Regenerationspuffer: 100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM HABA, pH 8

StrepTag Waschpuffer W: 100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 8

TAE-Puffer: 40 mM Tris/Acetate, 1 mM EDTA, pH 8,5

TALON Co²⁺ Elutionspuffer: 50 mM Na-Phosphat, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7

TALON Co²⁺ Equilibrierungs-/Waschpuffer: 50 mM Na-Phosphat, 300 mM NaCl, pH 7

TBS/(TBST): 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8, (+ 0,05 % Tween20)

Triton Waschpuffer: 100 mM Tris/HCl, 500 mM Sucrose, 5 mM MgCl₂, 5 mM MgSO₄, 0,5 % Triton X-100

Trypanblau: 0,5 % Trypanblau in PBS

Urea Waschpuffer: 100 mM Tris/HCl, 500 mM Sucrose, 5 mM MgCl₂, 5 mM MgSO₄+ 3 M Urea

Urea-Puffer: 7 M Urea, 2 M Thiourea, 1,5 mM DTT

Western Blot Transferpuffer nach Towbin: 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 8,3

2.3 Zellkultur

2.3.1 Verwendete Zell-Linien

EL4 (ATCC TIB-39, murines T-Zell Lymphom, aus C57BL/6N⁵²)

RAW309 (ATCC TIB-51, murine Makrophagen/Monozyten Zell-Linie, F1 Hybrid C57BL/6 und Balb/C⁵³)

E.G7-OVA (ATCC CRL-2113, EL4 stabil transfiziert mit pAc-neo-OVA⁵⁴)

Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) Insektenzellen⁵⁵

Y3 (ATCC CRL-1631, mouse IgG_{2bκ} produzierendes Hybridom⁵⁶)

25-D1.16 (mouse IgG_{1κ} produzierendes Hybridom⁵⁷)

2.3.2 Zell-Kultivierung

Alle Zellkultur-Arbeiten wurden unter einer HERAsafe Sicherheitswerkbank (Thermo Fisher, Bonn) durchgeführt.

Die verwendeten Zell-Linien wurden in Iscove's Medium mit 5 % FCS (BioWhittaker, Köln; hitzeinaktiviert), 2 mM Glutamin und 1 mM Pyruvat kultiviert (TM 5 %). Das Y3 und das 25-D1.16 Hybridom wurde in HAT-Sektionsmedium (Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine, Gibco, Karlsruhe) mit 5 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. E.G7-OVA transgene Zellen wurden in TM 5 % mit 1 mg/ml G418 (PAA, Cölbe) gehalten.

Sf9 Zellen wurden in Spodopan Medium (Pan Biotech) mit 5 % FCS und Penicillin/Streptomycin bei 27° C ohne CO₂ kultiviert. Alle anderen Zelllinien wurden in einem HERAcell Inkubator (Thermo Fisher) bei 37° C und 5 % CO₂ kultiviert und alle 2-3 Tage gesplittet. Zusätzlich wurden als „Backup“ von allen Zell-Linien in 6-Well-Platten mit einer fortlaufenden 1:5 Verdünnung mitgeführt.

RAW309 Zellen wurden zum splitten mit Trypsin/EDTA (Invitrogen, Karlsruhe) oder PBS mit 2 mM EDTA (4° C) von den Zellkulturflaschen oder -platten abgelöst und bei 500 x g und 4° C für 5 min zentrifugiert (Multifuge 3LR, Thermo Scientific).

2.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden abzentrifugiert (400 x g, 4 min) und in 5-10 ml PBS aufgenommen. Dann wurden 10-20 µl diese Zellsuspension mit Trypanblau (Merck, 0,4 % in PBS) auf 100 µl verdünnt. Tote Zellen sind so blau gefärbt, wohingegen lebende Zellen unter dem Mikroskop farblos bleiben. In einer Neubauer-Zählkammer wurden 4 Großquadrate ausgezählt (Olympus CKX 41, Hamburg) und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$(\text{Anzahl der Zellen} / 4) \times 1 \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellen/ml}$$

2.3.4 Zellen einfrieren und auftauen

Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen abzentrifugiert ($400 \times g$, 4 min) und 5×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium (FCS, 10 % DMSO) resuspendiert. Je 1 ml dieser Zellsuspension wurde in ein Cryovial pipettiert und die Vials unter Verwendung einer Einfrierbox (gefüllt mit Isopropanol, Nalgene, Roskilde) bei -80°C eingefroren. Es ist für die Viabilität der Zellen wichtig, dass hier möglichst zügig gearbeitet wird, da DMSO toxisch für die Zellen ist. Nach 2 bis 3 Tagen wurden die Cryovials in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Cryovials dem Stickstoff entnommen, bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und die Zellen sofort in vorgewärmtes Medium gegeben. Um das DMSO zu entfernen wurden die Zellen abzentrifugiert und dann in eine kleine Zellkulturflasche ausgesät.

2.3.5 Herstellung muriner BMDCs und Milzzellen

Die Inzucht Stämme C57BL/6 und BALB/c wurden in der zentralen Versuchstier Einrichtung (ZVTE, Mainz) gezüchtet. Verwendete Mäuse wurden gemäß §4 des deutschen TierSchG durch zervikale Dislokation getötet.

2.3.5.1 murine BMDCs (*bone marrow derived dendritic cells*)⁵⁸

Nach Entfernung des Fells wurden die Hinterläufe entfernt und der Ober- und Unterschenkelknochen präpariert. Die Knochen wurden am Ende aufgeschnitten und das Knochenmark mit Hilfe einer Kanüle in eine Petrischale mit PBS, 1 % FCS gespült. Das Knochenmark wurde gründlich resuspendiert und so eine Einzelzell-Suspension hergestellt. Die Suspension wurde abzentrifugiert und mit ACK Puffer eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt (3 min Inkubation bei RT). Die Lyse wurde durch die Zugabe von 10 ml PBS, 1 % FCS abgestoppt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in BMDC-Medium (TM 5 %, 1,5 % GM-CSF) aufgenommen und durch ein $40 \mu\text{m}$ Zellsieb (BD, Heidelberg) gegeben. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Knochenmarkszellen mit BMDC-Medium auf eine Dichte von $7,5 \times 10^5/\text{ml}$ eingestellt und 4 ml dieser Zellsuspension pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät, was 3×10^6 Zellen pro Well entspricht.

An Tag 2 und 4 wurden 3 ml verbrauchtes Medium entfernt und durch 3 ml frisches BMDC-Medium ersetzt. Dabei wurde an Tag 2 das Well gründlich gespült, bevor das Medium abgenommen wurde (die DCs sind noch adhären), an Tag 4 wurde der Überstand vorsichtig abgenommen ohne zu spülen (die DCs gehen in Suspension). An Tag 6 sind die BMDCs bereit für Versuche.

Bevor die BMDCs für Versuche benutzt wurden, wurde durch FACS Analyse die Reinheit (CD11c) und der Aktivierungszustand (CD80, CD86) durch FACS Analyse bestimmt.

2.3.5.2 Milz-Zellen⁵⁹

Nach Entfernung des Fells wurde die Milz präpariert⁶⁰ und mit Hilfe eines Spritzen-Stempels durch ein 40 µm Zellsieb gedrückt. Die Zellen wurden mit PBS, 1 % FCS aus dem Sieb gespült, die Suspension abzentrifugiert und mit ACK Puffer eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt (3 min bei RT). Die Lyse wurde durch die Zugabe von 10 ml PBS, 1 % FCS abgestoppt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in TM 5 % aufgenommen, gezählt und für Versuche verwendet.

2.3.6 Gewebeisolierung und Herstellung von Einzelzellsuspensionen

Mäusen wurden Gehirn, Thymus, Lymphknoten, Herz, Leber, Niere, Milz und Ovarien entfernt und mit einem Skalpell zerkleinert. Die Gewebestücke wurden in 2 ml HBSS (Gibco, Karlsruhe) aufgenommen und mit der Medimachine (Dako, Hamburg) in Medicon Gefäßen (BD, Heidelberg) zu Einzelzellsuspensionen zerkleinert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, mit ACK-Puffer eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt (3 min bei RT) und dann für Western Blots verwendet.

2.4 Aufreinigung der mikrosomalen Fraktion und zugehörige Assays

2.4.1 Mikrosomen-Aufreinigung⁶¹

Alle Schritte wurden bei 4° C, im Kühlraum und/oder auf Eis durchgeführt, um proteolytische Aktivität auch ohne die Zugabe von Protease-Inhibitoren zu verringern.

Bis zu 6 l EL4 Zellkultur wurden abzentrifugiert (Sorvall RC-3, 500 x g, 5 min) und mit PA-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in minimalem Volumen PA-Puffer mit 250 mM Saccharose resuspendiert. Die Zellen wurden mit einem Elvehjem-Potter homogenisiert, der in einen Akku-Schrauber eingespannt war (ca. 15-20 min bei höchster Drehzahl). Die Lyse der Zellen wurde mittels Trypanblau-Färbung kontrolliert. Das Homogenisat wurde bei 1000 x g für 10 min abzentrifugiert, wobei Zelltrümmer und Zellkerne pelletiert wurden. Im nächsten Schritt wurden die Mikrosomen vom Zell-Lysat getrennt, dafür wurde der Überstand der ersten Zentrifugation bei 15.000 x g in einer Tischzentrifuge (Biofuge fresco Heraeus, Hanau) für 15 min zentrifugiert. In dieser Zeit wurde der Saccharose-Dichtegradient durch Unterschichten in Ultrazentrifugen-Röhrchen (Herolab, Wiesloch) vorbereitet.

Tabelle 1: Saccharose Gradient für die Dichtezentrifugation

Volumen	Saccharose-Konzentration
1 ml	0,5 M
1 ml	0,75 M
1,5 ml	1 M
1,5 ml	1,25 M
1 ml	2 M

Als letztes wurde das Zelllysate auf den Gradienten geschichtet und die Zentrifugen Röhrchen mit den Rotoreinsätzen austariert. Mit einem SW40Ti Schwingrotor (Beckman Coulter, Krefeld) wurde das Zelllysate bei 150.000 x g (35.000 rpm) bei 4° C für 2 h zentrifugiert (Kontron/Centrifuge T-1065). Nach der Zentrifugation wurden die Zentrifugenröhrchen von unten angestochen und die Fraktionen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt.

Für die Etablierung der Aufreinigung wurden die Fraktionen auf die Aktivität verschiedener Marker-Enzyme, wie die NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase (endoplasmatisches Retikulum) und die Laktat-Dehydrogenase (Cytosol), untersucht. Zusätzlich wurden die Fraktionen mittels Western Blot auf die Anreicherung von gp96 (einem ER-Chaperon) untersucht⁶². Die mikrosomale Fraktion sammelte sich an der Grenze zwischen 2 M und 1,25 M Saccharose, was durch die hohe Aktivität der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase und der Anreicherung von gp96 in dieser Fraktion verifiziert wurde.

Die Mikrosomen wurden durch Zugabe von 1 % *n*-octyl- β -D-glucosid (Roth, Karlsruhe) und 15 min Inkubation im Ultraschall-Bad (Bandelin Sonorex, Mörfelden) auf Eis lysiert.

2.4.2 NADPH-Cytochrom P450 Reduktase (EC1.6.2.4)

Für die Aktivitätsbestimmung dieses ER-Marker Enzyms⁶³ in den UZ-Gradienten Fraktionen wurde das Cytochrome c Reductase (NADPH) Assay Kit (Sigma) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Ansätze wurden auf das 96-Well-Platten Format umgerechnet. Der Assay wurde als Kinetik bei einer Absorption von 550 nm am SPECTRAFluor Plus Reader (TECAN, Crailsheim) gemessen.

2.4.3 Laktat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27)

LDH katalysiert den letzten Schritt der Glykolyse im Cytosol. Die Bestimmung der LDH-Aktivität diente als Kontrolle für die vollständige Abtrennung des Cytosols⁶⁴.

150 μ l 100 mM Tris/HCl, pH 7,1 wurden in 96-Wells vorgelegt. Von den Gradienten-Fraktionen wurden 4 μ l/Well (1:20) zugegeben. Dann wurde Pyruvat in einer finalen Konzentration von 10 mM zugegeben und die Platte 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde NADH in einer finalen Konzentration von 0,3 mM zugegeben und die Abnahme der Absorption bei 340 nm mit minimalem Intervall im SPECTRAFluor Plus Reader gemessen.

2.5 SDS-PAGE, Coomassie Färbung und Western Blot

2.5.1 Proteinbestimmung und Probenvorbereitung für SDS-PAGE

Zellen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen abzentrifugiert (975 x g, 4 min, 4° C), 1x mit PBS gewaschen und mit Urea-Puffer lysiert. Das Lysat wurde nochmals abzentrifugiert (16.000 x g, 10 min, 4° C) und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Meist wurde bei zu vergleichenden Proben eine Proteinbestimmung durchgeführt. Dafür wurde die Absorption am SPECTRAFluor Plus Reader (TECAN) gemessen. Es wurde das Roti®-Nanoquant Kit (Roth, Messung bei 590 nm und 450 nm) oder der 660 nm Protein Assay (Pierce, Rockford) nach den Angaben der Hersteller verwendet. Auf jeder 96-Well-Platte wurde eine BSA Eichgerade (von 0-2 mg/ml BSA) in Duplikaten mitgeführt, anhand deren Steigung die Proteinkonzentration in den Proben ermittelt werden konnte. Die gewünschte Proteinmenge wurde in neue Reaktionsgefäße überführt, die Proben mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt und bei 65°-95° C für 5 min im Heizblock (Rotilabo H250, Roth) inkubiert.

2.5.2 SDS-PAGE

Um komplexe Proteingemische unter denaturierenden Bedingungen der Größe nach aufzutrennen wurden selbstgegossene SDS-Gele zusammen mit dem BioRad Mini Protean System verwendet⁶⁵. Zunächst wurde das Trenngel gegossen, dessen Acrylamid-Konzentration sich nach der Größe der zu trennenden Proteine richtet. Um Blasenbildung zu vermeiden wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet, bevor es polymerisiert. Danach wurde das Trenngel mit einem 4 %-igem Sammelgel überschichtet und der Kamm gesteckt, der nach der Polymerisation die Probentaschen bildet.

Tabelle 2: Pipettierschema für SDS-Gele

	10 % Trenngel	4 % Sammelgel
dH ₂ O	4,8 ml	3,2 ml
1,5 M Tris-HCL, pH 8,6	2,5 ml	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	1,2 ml
10 % SDS	100 µl	50 µl
40 % Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	2,5 ml	0,5 ml
TEMED	20 µl	10 µl
10 % APS	100 µl	50 µl

Das Gel wurde in das Mini-PROTEAN System (BioRad) eingesetzt, das System mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt und die Proben aufgetragen. Für die Größenbestimmung wurden 5 µl Prestained Protein-Ladder (Fermentas, #1811) mitgeführt. Die Gelelektrophorese erfolgte für ca. 1,5 h bei 40 mA pro Gel. Nach dem Gellauf konnten entweder alle Proteine mittels Colloidal-Coomassie-Färbung sichtbar gemacht werden, oder ein Western Blot durchgeführt werden, bei dem spezifische Primärantikörper und HRP gekoppelte Sekundärantikörper benutzt werden, um Proteine sichtbar zu machen.

2.5.3 Colloidale Coomassie Färbung der SDS Gele⁶⁶

Das Gel wurde in eine Färbeschale überführt und 1 h in Fixierlösung geschwenkt. Danach wurde das Gel mit Colloidal-Coomassie bedeckt und ÜN bei RT gefärbt. Das Gel wurde am nächsten Tag solange mit dH₂O entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden und der Hintergrund genügend entfärbt war. Coomassie Gele wurden auf weißem Hintergrund mit dem GelDoc System (BioRad) dokumentiert.

2.5.4 Western Blot

Durch Western Blot können elektrophoretisch getrennte Proteine auf einer Membran immobilisiert und sichtbar gemacht werden, wobei das Trennmuster des SDS-Geles erhalten bleibt^{67;68}. Mithilfe spezifischer Primärantikörper und „horseradish peroxidase“ (HRP)-gekoppelter Sekundärantikörper lassen sie sich enzymatisch nachweisen.

Eine PVDF-Membran (0,45 µm, Millipore) wurde auf Gelgröße zugeschnitten und für ca. 30 s mit Methanol aktiviert. Danach wurde die Membran für 15 min in Blotpuffer äquilibriert. Gel und Membran wurden zwischen mit Blotpuffer angefeuchtete Whatman-Papiere gelegt, wobei Luftblasen ausgestrichen wurden. Dieses „Sandwich“ wurde in eine Transferapparatur gelegt, sodass das Gel auf der Seite der Kathode zu liegen kam und die Membran auf der Seite der Anode. Sobald Strom angelegt wurde, wurden die Proteine auf die Membran transferiert.

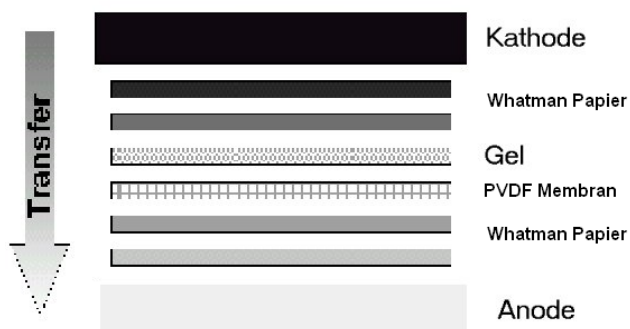


Abbildung 13: Aufbau eines Western Blots. Modifiziert nach⁶⁹.

Für den Western Blot wurde entweder das SemiDry System von BioRad verwendet (55 mA pro Gel für 4 h) oder das XCell SureLock System von Invitrogen (270 mA für 1,5 h). Nach dem Blot wurde die Membran für 1 h mit 5 % Milchpulver in TBST geblockt, 3x5 min mit TBST auf einem Kippschüttler gewaschen und anschließend mit primären Antikörper in verschiedenen Verdünnungen in TBST mit 5 % Skim-Milch oder 0,2-3 % BSA ÜN bei 4° C inkubiert. Anschließend wurde die Membran wieder 3x5 min in TBST gewaschen und mit HRP gekoppeltem Sekundär-Antikörper in TBST + 5 % Skim-Milch für 1 h bei RT inkubiert. Abschließend wurde wieder 3x5 min mit TBST und 1x5 min in TBS gewaschen.

Tabelle 3: Verwendete Primär- und Sekundär Antikörper für Western Blots

Name des Antikörpers	Größe der detektierten Bande
ERMP1 (polyklonales Antiserum, Eurogentech)	101 kD, ca. 36 kD
ERAAP (R&D, AF2500)	105 kD
β -Aktin-HRP (Sigma Aldrich, A3854)	42 kD
goat α -rabbit-HRP (cell signaling, #7074)	-
donkey α -goat-HRP (santa cruz, sc-2020)	-

2.5.5 Immunreaktiver Nachweis von Proteinen mittels ECL (enhanced chemiluminiscence)

Chemiluminiszenz ist durch eine chemische Reaktion ausgelöste Emission von Licht. Durch Anwesenheit des Enzyms HRP und einem Peroxid-Puffer wird Luminol oxidiert und bildet einen angeregten Zustand, der Licht emittiert. Indem die Membran mit HRP-Substrat (SuperSignal West Dura Extended Duration, Pierce) benetzt wurde, konnten spezifische Proteinbanden sichtbar gemacht werden, da an Stellen mit gebundenem Sekundärantikörper Chemilumineszenz entstand. Die Emission konnte mit dem BioRad GelDoc System detektiert werden.

2.6 Chromatographische Auftrennung der mikrosomalen Fraktion und Test auf Aktivität von mikrosomalen Aminopeptidasen

Die mikrosomale Fraktion wurde mit 1 % *n*-octyl- β -D-glucosid versetzt, 15 min im Ultraschallbad auf Eis lysiert und durch 0,22 μ m Spritzenfilter (GHP Acrodisc, Pall, Dreieich) filtriert, um Membranbruchstücke zu entfernen. Das typische Volumen der gereinigten und filtrierten Fraktion betrug 600-800 μ l mit 2-3 μ g/ml Gesamtprotein.

Die chromatographische Auftrennung wurde bei 4° C mit einem ÄKTApurifier System (GE Healthcare, Freiburg) durchgeführt. Alle verwendeten Puffer wurden über 0,22 μ m Bottletop-Filter (VWR, Darmstadt) filtriert und durch 5 min Inkubation im Ultraschallbad entgast.

2.6.1 Auftrennung der Proteine mittels Anion Exchange Chromatography (MonoQ HR 5/5, Amersham)

Die Säule wurde mit MonoQ-Puffer A äquilibriert (5 CV), mit 100 % MonoQ-Puffer B gewaschen (2 CV), nochmals äquilibriert und schließlich die ER-Fraktion, die 1:10 mit Puffer A verdünnt wurde über eine „Superloop“ in das System injiziert.

Nach der Beladung der Säule und Auswaschen der ungebundenen Proteine (2 CV) wurde ein Stufen-Gradient von 50 % in 20 min und dann von 80 % in 5 min angelegt. Das Eluat wurde in Fraktionen von 1 ml in einer 96-Deepwell Platte (Corning, Wiesbaden) fraktioniert. Dabei eluierten die schwach negativ geladenen Proteine schon bei niederen Salzkonzentrationen zu Beginn des Gradienten und die stark negativen Proteinen erst bei hoher Salzkonzentration.

2.6.2 Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivitäten und -Spezifitäten der mikrosomalen Fraktionen

2.6.2.1 AMC-Assay

Zur Bestimmung der Umsatzraten der in den Fraktionen enthaltenen Aminopeptidasen wurden verschiedene fluorogene Aminosäuren Substrate angeboten. Die 20 proteinogenen Aminosäuren sind an eine C-terminale fluorogene Gruppe, das 7-Amido-4-methylcoumarin (AMC, Bachem) gebunden. Die Abspaltung der Aminosäure und damit die Bildung des freien AMC kann durch Anregung bei 360 nm (Excitation) durch einen Anstieg der Fluoreszenz bei 465 nm (Emission) gemessen werden. Die Aktivität der Aminopeptidasen wurde in einer 96-Well-Platte mit flachem Boden bei 37° C am SPECTRAFluor Plus Reader (TECAN) gemessen. Der Anstieg der Fluoreszenz wurde als Kinetik für insgesamt 1 h gemessen. Die Geschwindigkeit der Umsatzraten für jede einzelne Aminosäure wurde über den linearen Anstieg der RFU über die Zeit bestimmt.

Tabelle 4: Pipettierschema des AMC-Assays

	Probe	Blank
Fraktion	1-10 µl	-
BSA (10 mg/ml)	20 µl	20 µl
PA-Puffer/PBS	ad 100 µl	ad 100 µl
AMC-Substrat (finale Konzentration 100 µM)	100 µl	100 µl

2.6.2.2 Peptidverdaus

Für die Aktivitätsmessung mit Peptidsubstraten wurden zehn Peptide mit der Sequenz X-RGYVYQGL (wobei X entweder für die Aminosäure E, P, S, Q, I, R, L, F, M oder W stehen kann) synthetisiert (Schafer, Kopenhagen). 2 µl jedes Peptids (1 µg/µl in dH₂O) wurden mit 2 µl gereinigtem Cytosol oder 20 µl aufgereinigten Mikrosomen gemischt und mit PA-Puffer auf ein Volumen von 500 µl gebracht. 50 µl Aliquots wurden bei 37°C für 0 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 90 min oder 120 min inkubiert und die Reaktion durch die Zugabe von 1 % FA (Ameisensäure) gestoppt. Die Proben wurden dann in einem Waters Q-ToF Premier Massenspektrometer (Waters, Eschborn) analysiert und die relative Menge an intaktem Peptid über die Integration des m/z (Masse/Ladung) Peaks bestimmt.

2.7 Isolierung der Aminopeptidasen mittels BlueNative PAGE und Identifizierung durch Massenspektrometrie

2.7.1 BlueNative PAGE⁷⁰

Die von den ÄKTA Säulen eluierten und proteolytisch aktiven Fraktionen wurden in Vivaspin 500-Säulen (Sartorius, Göttingen) auf ca. 20-30 µl aufkonzentriert und mit 4x NativePAGE Sample-Puffer (Invitrogen) versetzt. Das XCell SureLock Mini-Cell (Invitrogen) wurde mit NativePAGE Novex Bis-Tris 3-12 % Gradientengelen (Invitrogen) bestückt und mit 1x NativePAGE Running Buffer + 1x NativePAGE Cathode Additive (innere Kammer) und 1 x NativePAGE Running Buffer (äußere Kammer)

befüllt. Die Proben wurden aufgetragen und für 3 h eine Spannung von 150 V angelegt. Der gesamte Gellauf wurde auf Eis durchgeführt.

Nach Auftrennung der Proteine wurde das Gel in eine Färbeschale überführt, mit dH₂O gespült und für 30 min bei 37° C unter leichtem Schütteln mit 100 µM AMC-Substrat in PA-Puffer inkubiert. Die aktiven Aminopeptidasen im Gel spalten die AMC-Substrate und die freiwerdende Fluoreszenz im Gel konnte mit dem GelDoc System (BioRad, München) unter der UV-Lampe sichtbar gemacht werden. Die fluoreszierenden Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, zerkleinert, in spezielle low-bind Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) überführt und bis zur Weiterbehandlung bei -20° C gelagert.

2.7.2 Tryptischer Verdau der Gelbanden, „In-Gel Verdau“

Zuerst wurden die Gelbanden durch wiederholtes Waschen mit 50 mM NH₄HCO₃ in 50 % ACN und anschließendem Waschen in 100 % ACN und Inkubation im Ultraschallbad entfärbt. Dann wurden die Gelstücke in 50 mM NH₄HCO₃ in dH₂O mit 1,5 mg/ml DTT bei 1 h bei 56° C inkubiert und so Disulfidbrücken reduziert. Danach wurden die Gelstücke für 45 min im Dunkeln in 50 mM NH₄HCO₃ in dH₂O mit 10 mg/ml IAA inkubiert, die Thiolgruppen der Proteine alkyliert und so eine Reoxidation verhindert. Nach weiteren Waschschritten mit 50 mM NH₄HCO₃ in 50 % ACN und 100 % ACN wurde die Flüssigkeit durch Trocknung in einer Speedvac (Savant SVC 100) komplett entfernt und Trypsin (Promega, Mannheim) in einer Konzentration von 20 ng/µl in 50 mM NH₄HCO₃ in dH₂O zugegeben. Die Proben wurden für 30 min bei 4° C inkubiert und anschließend die nicht aufgenommene Flüssigkeit entfernt und 50 mM NH₄HCO₃ in dH₂O zugegeben, dass die Gelstücke gerade bedeckt waren. Die Gelstücke wurden ÜN bei 37° C inkubiert. Trypsin ist eine Serin-Protease, die Proteine spezifisch C-terminal von Lysin und Arginin schneidet und so Proteine in Peptide mit einem definierten N-Terminus und statistisch gleicher Größe schneidet. Diese Peptide können nun im Massenspektrometer analysiert werden⁷¹.

Am nächsten Tag wurde der Überstand in ein neues low-bind Gefäß überführt und die trypsinierten Peptide durch Inkubation mit 50 % und 100 % ACN im Ultraschallbad aus den Gelstücken eluiert. Die eluierte Peptid-Lösung wurde nun bei -80° C eingefroren und in der Speedvac auf ein Volumen von ca. 20 µl reduziert. Die so vorbereitete Probe wurde in Glasvials (Waters, Eschborn) mit dH₂O, 1 % FA verdünnt und konnte nun massenspektrometrisch analysiert werden.

2.7.3 Analyse der tryptisch verdauten Proben durch ESI Massenspektrometrie

Die aus dem Gel gewonnenen Proben wurden mit einem Waters Q-ToF Premier ESI (Elektrospray Ionisierung) in positivem V-Modus in einer Expression-Analyse gemessen. Die Expressions-Analyse ermöglicht, im Gegensatz zur DDA-Messung („data dependent acquisition“), die Detektion von Peptiden aus einem komplexen Gemisch. Dazu wurden die tryptisch verdauten Peptide aus den Proben mit dem Waters NanoAcquity UPLC System über eine „reverse phase“-HPLC C₁₈ Säule aufgetrennt. Puffer A enthielt 0,1 % Ameisensäure in dH₂O und Puffer B 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril. Die im Elektrospray ionisierten und deshalb geladenen Peptide wurden im Q-TOF (Quadrupol-„time of flight“) anhand ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses getrennt und anschließend detektiert. Das Massenspektrometer wurde dabei mit einer Glu-Fibrinogen Lösung (500 fmol und 300 nl/min) kalibriert, die über den Referenz-Sprayer eingespritzt wurde. Gleichzeitig wurden die ionisierten Peptide zusätzlich in der Kollisions-Zelle fragmentiert und ihre Fragment-Ionen aufgenommen. Dadurch erhielt man Sequenzinformationen, die durch Computeranalyse mit der MassLynx Software (Waters) jedem einzelnen Peptid und diese wiederum durch Datenbanksuche (Swissprot, Ensembl, Uniprot o.ä.) dem zugehörigen Protein zugeordnet werden konnten.

2.8 Klonierung von murinem ERMP1 in verschiedene Expressionsvektoren

Die Planung und theoretische Durchführung der Klonierungen wurde mit der Vector NTI Software von Invitrogen durchgeführt. Es wurden zwei Varianten von ERMP1 aus muriner cDNA in verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Das full-length Protein (ERMP1₍₁₋₈₉₈₎) mit einer N-terminalen Kozak-Sequenz wurde in Fusion mit einem C-terminalen His-Tag kloniert. Die kodierende Sequenz des gesamten murinen Proteins wurde in die Expressionsvektoren pVL1393 (Insektenzellen, Orbigen), pcDNA3.1(+) (Säugerzellen, Invitrogen) und pIRES2_eGFP (Säugerzellen, Clontech) kloniert. Wegen des hohen G+C-Gehaltes mussten die Basen 1-280 synthetisch hergestellt werden (GenScript, Piscataway). Die erste luminale (ER)-Domäne des Proteins (ERMP1₍₈₈₋₃₉₃₎) mit den Zink-Bindungsstellen und der aktiven Domäne wurde mit einem C-terminalen Strep-Tag kloniert. Die kodierende Sequenz der ER-Domäne wurde in die Expressionsvektoren pASK_IBA2 (*E.coli*, IBA) und pVL1393_Mellitin (Insektenzellen, Orbigen) kloniert. Der pVL1393 Vektor wurde dafür mit einer n-terminalen „honeybee“ Melittin-Sequenz versehen, die die Sekretion des Proteins in den Zellkultur Überstand ermöglicht.

2.8.1 Grundlegende molekularbiologische Methoden⁷²

2.8.1.1 Isolierung von RNA und reverse Transkription zur Herstellung von cDNA

EL4 Zellen wurden in RNase-freien 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Roth) geerntet (500 x g, 4° C, 4 min) und 1x mit PBS gewaschen. Das Zell-Pellet wurde in 1 ml TRIzol (Invitrogen) resuspendiert. Die Proben wurden gevortext und 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde 200 µl Chloroform (Roth, 4° C) zugegeben und gevortext, bis die Probe milchig wurde. Dann wurden die Proben 15 min bei RT inkubiert und bei 12.500 x g bei 4° C für 15 min abzentrifugiert. Der ÜS mit der RNA wurde in ein neues RNase-freie Gefäß überführt, 1,5 µl Glykogen (20 µg/µl) zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 500 µl Isopropanol (Roth, 4° C) zugegeben, gevortext und 10 min bei RT inkubiert. Die RNA wurde durch zentrifugieren (12.500 x g, 4° C, 15 min) pelletiert. Der ÜS wurde abgekippt und das Pellet 2x mit 1 ml 75 % EtOH (-20°C, in DEPC-dH₂O) gewaschen (8500 x g, 10 min, 4° C).

Die Gesamt-RNA wurde in DEPC-dH₂O aufgenommen und die RNA Konzentration mit dem Nanodrop (Thermo Scientific, Dreieich) gemessen. Für die reverse Transkription wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt.

Tabelle 5: Pipettierschema der reversen Transkription von Gesamt-RNA

Komponente	Menge
Gesamt-RNA	1 µg in DEPC-dH ₂ O
5x Puffer (Fermentas)	4 µl
Oligo dT18 Primer (100 µg/ml, Fermentas)	1 µl
N ₆ Primer (20 µg/ml, Fermentas)	1 µl
dNTP Mix (2,5 mM each, Fermentas)	2 µl
DEPC-dH ₂ O	ad 19 µl

Die Reaktionsgefäße wurden für 5 min bei 55° C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde 1 µl M-MuLV Reverse Transkriptase (Fermentas) zugegeben und die Proben 1 h bei 42° C im Wasserbad inkubiert. Es wurden 80 µl dH₂O zugegeben und die so generierte cDNA als Template für PCRs eingesetzt.

2.8.1.2 PCR

Diese Methode ermöglicht die Amplifikation geringster DNA Mengen⁷³. Eine typische Reaktion besteht aus der Template-DNA, einer thermostabilen DNA Polymerase, zwei Oligonukleotid Primern dNTPs, Puffer und MgCl₂. Im Thermocycler (Peqlab, Erlangen) wird die DNA einer Abfolge von verschiedenen Temperaturen unterworfen. Jeder Zyklus besteht aus der Denaturierung der DNA in Einzelstränge durch Erhitzen auf 95° C, danach erfolgt die Anlagerung des gegenseitig orientierten Primerpaares bei einer Annealing-Temperatur, die sich nach der Sequenz der Primer richtet und nach folgender Formel errechnet werden kann:

$$T_m = 64.9^\circ \text{C} + 41^\circ \text{C} \times (\text{Anzahl von G's und C's im Primer} - 16.4) / N, \text{ wobei } N \text{ die Länge des Primers ist.}$$

Im Elongationsschritt wird die DNA Sequenz zwischen den Primern in Anwesenheit von dNTPs bei 68° oder 72° C (je nach verwendeter DNA-Polymerase) neu synthetisiert und dient im nächsten Zyklus zusätzlich als Matrize.

Für PCR Screenings wurde die GoTaq DNA-Polymerase (Promega, Mannheim) verwendet, für Klonierungs-PCRs die PfuUltra® II Fusion HS (Stratagene, La Jolla) oder die Platinum High Fidelity Tag (Invitrogen, Karlsruhe), die zusätzlich eine „proofreading“ Exonuklease-Aktivität besitzen.

Tabelle 6: typischer PCR Ansatz

Komponente	Menge
Template DNA	25-100 ng
Sense Primer [100 pM]	1 µl
Antisense Primer [100 pM]	1 µl
dNTP Mix [10 mM each]	1 µl
DNA Polymerase	0,5-1 µl
10x Polymerase Puffer	2,5 µl
MgCl ₂ [25 mM]	1,5 µl
dH ₂ O Ultrapure	ad 25 µl

Tabelle 7: typisches Thermocycler Programm

PCR-Schritt	Temperatur und Dauer
Denaturierung	95° C, 3 min
Loop 25-35x:	
Denaturierung	95° C, 30 s
Primer Annealing	variabel, 45 s
Elongation	68° C oder 72° C, 1 min/kb
finale Elongation	68° C oder 72° C, 3 min

2.8.1.3 Overlapping PCR

Mit dieser speziellen Art der PCR können längere Nukleotidfragmente, die in 15-25 bp überlappend sind, zusammengefügt werden. Die überlappenden Fragmente wurden in einer PCR Reaktion angesetzt, allerdings bestand hier ca. die Hälfte des Ansatzes aus den Templates. Die PCR wurde für 10-15 Zyklen mit der Annealing-Temperatur der Überlappungen gefahren, die beiden Fragmente dienen sich hier gegenseitig als Primer. Danach wurden die endständigen Primer hinzugegeben und die PCR mit deren Annealing-Temperatur für 20 Zyklen fortgeführt. Auf diese Art und Weise wurden die einzelnen Teile der ca. 2700 bp langen ERMP1 cDNA zur kompletten Sequenz vereinigt.

2.8.1.4 Mutagenese mittels PCR

Mit dieser speziellen PCR können Punktmutationen in DNA-Sequenzen eingeführt werden. Die Primer werden als mutierte Sequenz inkorporiert. Dazu setzt man die gewünschte Punktmutation in die Mitte der exakt komplementären Primer ein und fügt auf beiden Seiten 15-20 Basen Originalsequenz hinzu. Die PCR wird mit einer relativ kleinen Menge an Template (5-25 ng) angesetzt.

Die PCR Reaktion wurde anschließend mit Dpn I verdaut. Dieses Enzym verdaut ausschließlich methylierte DNA (hier das Template). Mutierte DNA, die aus der PCR entstanden ist wird nicht verdaut und kann nun durch Transformation in *E. coli* eingebracht werden.

2.8.1.5 Verwendete PCR-Primer und Oligonukleotide

Primer und sonstige Oligonukleotide wurden von ThermoHybaid (Ulm) bezogen.

Tabelle 8: Liste der verwendeten PCR Primer und Oligonukleotide

Name des Primers	Sequenz (5'→3')
muERMP1 IBA2 fwd	ATGGTAGGTCTCAGCGCTCATGCTCCCATGCCGGTACTC
muERMP1 IBA2 rev	ATGGTAGGTCTCAAATGCAGCGGCTGGTGCTGAGCCG
ER-Domäne Baculo fwd	TAGGATCCCAGCGGCTGGTGCTGAG
ER-Domäne Baculo rev	TAGAATTCTTATTTTTCGAACTGCGGGTG
5' Kozak	GCGGCCGCGGGATCCTCAACCATGGAGTGAGCTCGGAGTCA GC
3' His	GAATTCCTAATGGTGATGGTGATGATGTGAGCCAAACACAAA GAGACTGTAGGTGGA
RAP Mutagenese fwd	GGCCGCGCAAGTAACGAGAATATGGAAACAATGTTAGAGCAA TTA(TAC/TTC/GCC)AGTATTATAAATTCGAAA
RAP Mutagenese rev	AGCTTTTCGAAATTTATAATACTG(TAT/AAT/GCT)AATTGCTCT AACATTGTTTCCATATTCTCGTTACTTGCG
Melittin Insert fwd	GATCAACATGAAATTCTTAGTCAACGTTGCCGTTGTTTTATGG TCGTATACATTTCTTACATCTATGCGGATCGAG
Melittin Insert rev	GATCCTCGATCCGCATAGATGTAAGAAATGTATACGACCATAA AAACAACGGCAACGTTGACTAAGAATTCATGTT
Plan A Teil2 fwd	GGCTGGTGCTGAGCCGG
Plan A Teil 2 rev	CCCATGCCGGTACTCAGACG
Plan B Teil 2 fwd	GGCTGCTGGTGTCGGAGG
Plan B Teil 2 rev	CAAATCTTCCTGGGCACCG
Plan B Teil 3 fwd	CGGTGCCCAAGGAAGATTTG
full length aus cDNA rev	ATTAAAACACAAAGAGACTGTAGGTGG

2.8.1.6 Annealing von Oligonukleotiden

Eine Möglichkeit zur Insertion größerer DNA-Fragmente in ein existierendes Konstrukt ist das Annealing von synthetischen Oligonukleotiden. Dafür müssen komplementäre Oligonukleotide synthetisiert werden, die an ihren Enden die Überhänge der gewünschten Restriktionsenzyme tragen. Diese entsprechen denen im zu veränderten Konstrukt. Auf diese Weise wurde die Melittin-Sequenz in den pVL-Expressionvektor eingefügt. Zum Annealing der komplementären Stränge wurden je 100 pmol beider Oligonukleotide in 100 µl Annealing-Puffer für 5 min auf 95° C erhitzt und dann bei RT langsam abgekühlt. Von diesem Ansatz wurden 0,1 µl für die Ligation mit dem geschnittenen Vektor eingesetzt.

2.8.1.7 Plasmidverdau durch Endonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II sind bakterielle Enzyme, die DNA in bestimmten palindromischen Sequenzen von 4-8 Basenpaaren schneiden. Es entstehen Überhänge, über die ligiert werden kann. Alle Endonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs oder Fermentas bezogen. Es wurden die mitgelieferten 10x Puffer verwendet.

Ca. 2-5 µg DNA wurde mit 10x Puffer und 4-10 U Enzym für 1-2 h oder ÜN beim Temperaturoptimum des Enzyms inkubiert. Dabei ist zu beachten, daß der Anteil an Enzym maximal 5 % des Gesamtvolumens betragen sollte und bei Enzymen mit „Star-activity“ nicht überverdaut werden sollte, da sonst unspezifisch geschnitten wird.

2.8.1.8 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose (AppliChem, Darmstadt) wurde je nach gewünschter Konzentration zu 1x TAE-Puffer gegeben und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose gelöst war. Die Konzentration der Agarose richtete sich dabei nach der gewünschten Trennungskapazität, wobei für kleinere Fragmente eine höhere Konzentration eingesetzt wurde. Anschließend wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben, das in die DNA interkaliert und sie im Gel unter UV Licht sichtbar macht. Die Flüssigkeit wurde in eine Gelform gegossen und der Probenkamm gesteckt. Nach erfolgter Aushärtung konnte der Kamm gezogen werden und das Gel wurde in eine mit 1x TAE Puffer befüllte Elektrophorese

Kammer (BioRad) gelegt. Die Proben wurden 1:10 mit Orange Loading Dye (Fermentas) versetzt und in die Taschen gegeben.

Je nach Größe der erwarteten Fragmente wurden als DNA-Molekulargewichtsmarker auf dem Gel mitgeführt. Dafür wurden der GeneRuler 1 kb plus oder der O`GeneRuler 100 bp plus (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Um zusätzlich die Menge an DNA abschätzen zu können wurden die Molekulargewichtsmarker in einer definierten Menge aufgetragen (siehe Hersteller). Die Auftrennung erfolgte bei 80-100 V für 30-60 min. Das Gel kann anschließend mit dem GelDoc System (BioRad) unter UV Licht dokumentiert werden.

2.8.1.9 Gelelution von DNA Fragmenten

Die gewünschte Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Um DNA Fragmente aus Agarose Gelen aufzureinigen wurde das NucleoSpin Extract II Kit von Macherey-Nagel (Düren) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.8.1.10 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Vor der Ligation eines Inserts mit einem Vektor wurde der 5`-ständige Phosphatrest des linearisierten Vektors mit Hilfe der Antarctic Phosphatase (NEB, Ipswich) entfernt. Dadurch kann die Religation des Vektors verhindert werden und eine Ligation von Vektor und Insert wird begünstigt.

Dafür wurde 15 µl einer Gelelution des linearisierten Vektors mit 2 µl Antarctic Phosphatase 10x Puffer und 3 µl Enzym für 20 min bei 37° C inkubiert und das Enzym anschließend durch Inkubation bei 65° C hitzeinaktiviert.

2.8.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4 DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3`-Hydroxy- und 5`-Phosphatenden. Bei dieser Reaktion liegt das Insert in 3-5-fachem Überschuß zum Vektor vor. Dazu wurde vorher die DNA Menge in einem Agarose-Gel abgeschätzt.

Vektor und Insert wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:5 in einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt und 2 µl 10x T4 DNA-Ligase-Puffer (aliquotiert und nur 1x zu verwenden) und 1 µl T4 DNA-Ligase (NEB) zugegeben. Der Ansatz wurde dann entweder bei RT für 2 h oder ÜN bei 16° C inkubiert.

Bei der Ligation von PCR Produkten in den pCR2.1-TOPO Vektor (Invitrogen), der für Subklonierungen verwendet wurde um Teilstücke der Klonierungen zu sichern, wurden die PCR Produkte mit einem A-Überhang versehen (GoTaq Polymerase, Promega) und dann mit Hilfe der dem Vektor beigemengten Topoisomerase nach den Angaben des Herstellers ligiert.

2.8.1.12 Transformation von *E. coli* Bakterien und Blue-White Screening

Bei der Transformation von Bakterienzellen werden Plasmide durch einen Hitzeschock in die Zellen eingeführt, wo sie dann extrachromosomal vorliegen und autonom repliziert werden können. Für die Transformation von Klonierungsvektoren (wie z.B. pCR2.1-TOPO) wurden chemisch kompetente TOP10 *E. coli* Zellen von Invitrogen verwendet. Für die Proteinexpression mit *E. coli* Bakterien mit den IBA Vektoren wurden *E. coli* Rosetta DE3 Zellen (Novagen) verwendet- Die Transfektion wurde in beiden Fällen wie folgt durchgeführt:

Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, 10 µl eines Ligationsansatzes hinzupipettiert, kurz gevortext und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden für 35 s bei 42° C im Wasserbad inkubiert und danach sofort wieder auf Eis gestellt. Es wurden 450 µl SOC-Medium (Invitrogen) zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 37° C und 200 rpm geschüttelt. 50 µl dieses Ansatzes wurden mit Hilfe eines Drigalski-Spatels auf eine LB-Agar Platte ausplattiert, der Rest wurde bei 1500 x g für 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 50 µl abgenommen, die pelletierten Bakterien darin resuspendiert und wiederum auf eine LB-Agar Platte ausplattiert. Der LB-Agar wurde vor dem Gießen der Platten mit Antibiotikum versehen, die Wahl der Platten richtete sich nach der jeweiligen Resistenz des transformierten Vektors. Bei den Vektoren pCR2.1-TOPO und pASK-IBA2 wurden 100 µg/ml Ampicillin zugegeben. Bei der Verwendung von *E. coli* Rosetta DE3 Zellen wurden zusätzlich 34 µg/ml Chloramphenicol zugegeben. Bei der Transformation mit pCR2.1-TOPO wurden vor dem Ausplattieren der Bakterien 40 µl [40 µg/ml] ausplattiert. Tragen die Transfektanden einen religierten Vektor ohne Insert, ist der LacZα ORF intakt und die exprimierte β-Galactosidase hydrolysiert das X-Gal zu einem blauen Farbstoff. Die beimpften Platten wurden ÜN bei 37° C inkubiert.

2.8.1.13 Plasmidisolierung aus Bakterien und Anlegen von Dauerkulturen

Von den mit transformierten Bakterien beimpften Platten wurden Einzelzellklone gepickt. Dazu wurden mit Pipettenspitzen einzelne Kolonien in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum beimpft und ÜN bei 37° C und 200 rpm geschüttelt.

Je nach Verwendungszweck wurden entweder 5 ml LB-Medium beimpft, um eine geringe Menge DNA zu isolieren („Mini-Präp“, Peqlab Plasmid Kit) oder 200-400 ml um größere Mengen zu isolieren („Maxi-Präp“, Invitrogen HighPure Maxi Kit). Nach der Isolation wurde die DNA-Konzentration und - Reinheit photometrisch (Biophotometer plus, Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) und 280 nm (Proteinverunreinigung) bestimmt.

Von den isolierten Plasmiden wurde zumeist ein Kontrollverdau angesetzt, um anhand der Fragmentgrößen die Insertion und die Orientierung des Inserts zu bestimmen, bevor das Plasmid zur Sequenzierung eingeschickt wurde. Sequenzierungen wurden von der Firma GATC (Konstanz) durchgeführt und die Ergebnisse mit den Sequenzen der Vector NTI Software verglichen.

Bei positiver Sequenzierung wurde ein Glycerin-Stock angelegt. Dafür wurden 300 µl der Bakteriensuspension (frisch angeimpft und ÜN bei 37° C und 200 rpm geschüttelt) mit 700 µl 50 % Glycerol in einem Cryovial vermischt und bei -80° C eingefroren.

2.8.1.14 Phenol-Chloroform Fällung von DNA

Die Phenol-Chloroform-Fällung von DNA diente der Entfernung störender Enzymen. Zum Beispiel wurden Restriktionsendonukleasen vor einer Transfektion der Vektor-DNA aus der Reaktionsmischung des Verdau entfernt. Die Reaktionsmischung wurde dazu mit TE-Puffer auf 200 µL verdünnt und danach mit der gleichen Menge Phenol (1:1) versetzt und für 1 min gevortext. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation für 3 min bei 9500 x g. Die wäßrige Phase wurde danach in ein neues 1,5 ml Versuchsgefäß überführt, mit 1 Volumen Chloroform versetzt, gevortext und nochmals 3 min bei 9500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut überführt und zur Fällung mit 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5) und 2 Volumen absolutem Isopropanol versetzt. Die Lösung wurde mehrmals invertiert und 1 h bei -80° C inkubiert. Durch 30 minütige Zentrifugation bei 16.000 x g ließ sich die DNA als Pellet gewinnen. Der ethanolische Überstand wurde verworfen und

die DNA 2x mit eiskaltem 70 %-igem EtOH gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in dH₂O gelöst.

2.9 Expression und Aufreinigung von rekombinantem ERMP1

2.9.1 *E. coli*

Für die Expression von ERMP1₍₈₈₋₃₉₃₎ in *E. coli* wurde das IBA-Vektor System von IBAbioTAGnology (IBA, Göttingen) verwendet. Die Expressions-Kassette steht bei dem verwendeten Vektor pASK-IBA2 unter der Kontrolle des tetA-Promotors. Durch die Zugabe des Induktors Anhydrotetrazyklin wird die klonierte Sequenz und damit das heterologe Protein exprimiert. Durch pASK-IBA2 exprimierte Proteine werden mit einer OmpA Signalsequenz versehen und deshalb in das Periplasma der Bakterienzelle abgegeben. Das rekombinante Protein wurde mit einem C-terminalen Strep-Tag (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) fusioniert. Eine schematische Ansicht des Vektors gibt Abbildung 14.

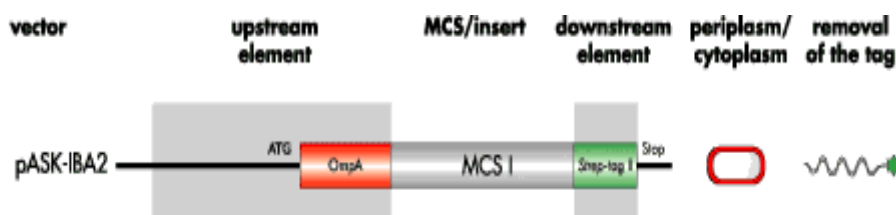


Abbildung 14: Schematische Ansicht des pASK_IBA2 Vektors.

2.9.1.1 Expression in *E. coli*⁷⁴

Zuerst wurden die nötige Menge an Anhydrotetrazyklin und der Zeitpunkt der größten Proteinexpression bestimmt. Dazu wurden 500 ml LB-Ampicillin-Medium mit 50 ml ÜN Kultur des gewünschten *E. coli* Rosetta DE3 (Novagen) Klons beimpft und bei 30° C oder 37° C bei 200 rpm inkubiert. Niedrige Temperaturen vermindern die Bildung sogenannter „inclusion bodies“, Einschlüsse von falsch gefaltetem Protein. Jede Stunde wurde etwas Bakteriensuspension entnommen und die OD_{550nm} bestimmt. Bei einer OD von 0,6 wurden verschiedene Konzentrationen Anhydrotetrazyklin zur Bakteriensuspension gegeben und weiter inkubiert. Nach der Induktion wurden nach 2 h, 4 h, 6 h und nach Inkubation über Nacht Proben genommen. Danach wurde das

Lysat in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (16.000 x g, 10 min, 4° C). Der ÜS und das Pellet wurden getrennt mit SDS-Lade-Puffer versetzt, mit einem SDS-PAGE Gel getrennt und das Gel anschließend Coomassie gefärbt. Die stärkste Expression konnte nach 6 h Inkubation mit 200µg/ml Anhydrotetracyclin erzielt werden. Allerdings befand sich das rekombinante Protein fast vollständig im Pellet, d.h. in „inclusion bodies“.

2.9.1.2 Aufreinigung von ERMP1₍₈₈₋₃₉₃₎ aus „inclusion bodies“

Nicht korrekt gefaltete Fusionsproteine aggregieren zu sogenannten „inclusion bodies“ innerhalb des bakteriellen Zytoplasmas. Zum Aufreinigen der Proteine wurde das Bakterien-Pellet in 5 ml/g bakteriellem Lysepuffer resuspendiert. Die Bakterien wurden durch Sonifizieren mittels Ultraschallstab (Sonopuls, Bandelin, Berlin) lysiert und dann für 10 min bei 10.000 x g und 4° C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml/g Triton Waschpuffer resuspendiert und wieder für 10 min bei 10.000 x g und 4° C zentrifugiert. Es wurde noch 2x mit Triton Waschpuffer gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 20 ml/g Urea Waschpuffer aufgenommen, 30 min bei RT inkubiert und bei 10.000 x g und 4° C für 15 min zentrifugiert. Es wurde noch 2x mit Urea Waschpuffer gewaschen. Zuletzt wurde das Pellet in 50 ml Denaturierungspuffer aufgenommen und ÜN bei 4°C langsam gerührt.

Danach wurde die Suspension in eine Spritze aufgezogen und unter starkem Rühren schnell in 500 ml Rückfaltungspuffer (pH 8) gespritzt. Die Lösung wurde abzentrifugiert (30 min bei 10.000 x g und 4° C) und der Überstand in 50 ml Amicon Säulen (10 kDa, Millipore, Schwalbach) aufkonzentriert. Das zurückgefaltete, aber enzymatisch inaktive Protein wurde für die Herstellung des polyklonalen Antiserums gegen ERMP1 verwendet.

2.9.2 Baculoviren in Sf9 Zellen

Die cDNA Sequenz des full-length Protein ERMP1₍₁₋₈₉₈₎ mit einer N-terminalen Kozak-Sequenz wurde in Fusion mit einem C-terminalen His-Tag in den Baculo-Expressionsvektor pVL1393 (Orbigen, San Diego) kloniert. Die ER-Domäne ERMP1₍₈₈₋₃₉₃₎ wurde mit einem C-terminalen Strep-Tag in den modifizierten Expressionsvektor pVL1393_Mellitin kloniert. Die Generierung der rekombinanten Baculoviren erfolgte in Kooperation mit Peter van Endert, Institut National de la Sante et de la

Recherche Medicale, Paris. Die rekombinanten Viren wurden vereinzelt, die homologe Rekombination des Inserts in die Virus-DNA wurde mittels PCR verifiziert und „high titer“ Virus-Stocks generiert.

2.9.2.1 Infektion der Sf9 Zellen

Sf9 Zellen wurden bei einer Dichte von 60-70 % Konfluenz mit „high titer“ Virus in 10 ml FCS freiem Medium infiziert. Für 60 min bei RT wurden die Zellkulturflaschen jede 15 min geschwenkt, um eine optimale Verteilung des Virus zu erreichen. Danach wurden 25 ml FCS freies Medium zugegeben und die Zellen für vier Tage bei 27° C inkubiert. Infektion der Zellen machte sich durch eine Vergrößerung des Umfangs der Zellen und durch ein vermehrtes Ablösen von der Zellkulturflasche bemerkbar. Nach vier Tagen wurden die Zellen geerntet (ERMP1₍₁₋₈₉₈₎) und lysiert oder im Fall von ERMP1₍₈₈₋₃₉₃₎ der Zellkulturüberstand gesammelt.

2.9.2.2 Native Aufreinigung von Strep-Tag Fusionsproteinen mittels Affinitätschromatographie

Strep-Tag Affinitätschromatographie wurde genutzt, um ERMP1₍₈₈₋₃₉₃₎ sowohl aus Bakterien-, als auch aus Insektenzellen aufzureinigen. Sobald die optimalen Bedingungen für die Expression des jeweiligen Fusionsproteins etabliert waren, wurden der Zellkulturüberstand gesammelt und Zelltrümmer durch Abzentrifugieren entfernt (1000 x g, 10 min, 4° C).

Die Säule (Superflow cartridge H-PR oder Strep-Macroprep, IBA) wurde mit 2 Säulenvolumen (CV) Puffer W (ohne EDTA, da Metalloproteasen aufgereinigt wurden) äquilibriert. Danach wurde der Zellkulturüberstand geladen, native Proteine mit fusioniertem StrepTag binden mit hoher Affinität an Strep-Taktin. Abbildung 15 gibt einen schematischen Überblick über die Bindung des rekombinanten Proteins an die Säule.

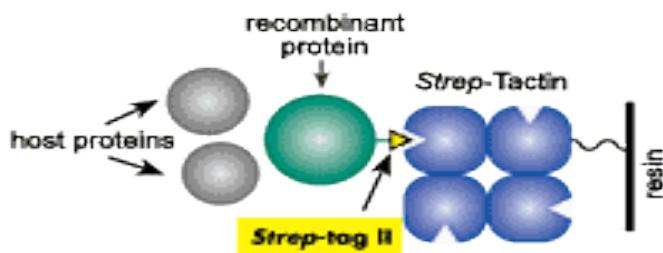


Abbildung 15: Schematischer Überblick über die Bindung des Strep-Tags (WSHPQFEK) und der Strep-Taktin Matrix der Säule.

Danach wurde die Säule 5x mit 1 CV Puffer W gewaschen um ungebundene Proteine zu entfernen und anschließend 3x mit 1 CV Puffer E eluiert. Die Säule wurde mit 5 CV Puffer R (IBA) regeneriert und bei 4°C aufbewahrt. Die Waschschrte und die Fraktionen der Elution wurden im SDS-Gel getrennt und Coomassie gefärbt, um die Aufreinigung zu kontrollieren. Der Rest wurde in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Von den Eluaten wurde ein AMC Aktivitäts-Assay durchgeführt.

ERMP1₍₁₋₈₉₈₎ exprimierende Zellen wurden mit 1% Triton-x, 1 % *n*-octyl-β-D-glucosid und 1% CHAPS und mit dem Ultraschallstab auf Eis lysiert. Danach folgte eine Aufreinigung über eine Ni²⁺ Säule.

2.9.3 Säugerzellen

Die cDNA Sequenz des full-length Protein ERMP1₍₁₋₈₉₈₎ mit einer N-terminalen Kozak-Sequenz wurde in Fusion mit einem C-terminalen His-Tag in den pcDNA3.1(+)⁷⁵ Expressionsvektor (Invitrogen) für eukaryotische Zellen kloniert. Für die Überexpression von ERMP1 in RAW309 Zellen wurden die Zellen mit dem Vektor pcDNA3.1(+) stabil transfiziert.

2.9.3.1 Transfektion von eukaryotischen Zelllinien durch Elektroporation

Für die Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Expressionsvektoren oder shRNA wurde der GenePulser II von BioRad verwendet. Die Einstellungen des Gerätes (μF und V) für eine maximale Transfektionseffizienz und Viabilität der Transfektanden wurde durch Transfektion von 5 μg

pMAX_eGFP Vektor (Lonza, Köln) austitriert und an Tag eins oder zwei nach Transfektion im FACS überprüft.

Einen Tag vor Transfektion wurden die Zellen gesplittet. Die Zellen wurden geerntet und 1x mit PBS gewaschen. Dann wurden sie in ISCOVE's (RT, ohne Zusätze) auf 10×10^6 Zellen/ml eingestellt. Es wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen (in 250 μ l) mit 5 μ g Plasmid transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen sofort in TM 5 % überführt und bei 37° C inkubiert. Für EL4 Zellen wurden 230 V und 975 μ F angelegt, für RAW309 Zellen 240 V und 960 μ F. Es wurden Transfektionseffizienzen von 25-40 % der lebenden Zellen erreicht.

2.9.3.2 Herstellung stabiler Zell-Linien und Einzelzellklonierung

Für die Generierung stabil transfizierter Zelllinien wurde zunächst eine „killing curve“ mit dem Antibiotikum titriert, dessen Resistenz im verwendeten Vektor kodiert ist. Dazu wurden 5×10^3 EL4 oder RAW309 Wildtyp Zellen in 12-Well-Platten ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen des entsprechenden Antibiotikums (pcDNA3.1(+): G418 (PAA, Cölbe) von 50-1500 μ g/ml. pLKO.1: Puromycin (Calbiochem, Darmstadt) von 0,5-10 μ g/ml) inkubiert. Dicht bewachsene Wells wurden täglich gesplittet und verbrauchtes Medium ersetzt. Gewählt wurde diejenige Konzentration, bei der alle WT Zellen nach sechs Tagen abgetötet waren. Das entsprach einer Konzentration von 500 μ g/ml G418 oder 2,5 μ g/ml Puromycin für RAW309 und 800 μ g/ml G418 und 4 μ g/ml Puromycin bei EL4. Nach der Transfektion wurden die Zellen 24 h in TM 5% belassen und danach mit dem Antibiotikum inkubiert. Sobald die untransfizierten Zellen abgestorben waren, wurden die Transfektanden als „batch cultures“ verwendet, oder in 96-Well-Platten bis zu einer (statistischen) Konzentration von 0,3 Zellen/Well verdünnt und für 2-3 Wochen bei 37°C inkubiert, bis Einzelzell-Klone identifiziert und expandiert werden konnten. Die Überexpression (pcDNA3.1) oder der knockdown (pLKO.1) wurden mittels Western Blot verifiziert.

2.9.3.3 Native Aufreinigung von ERMP1₍₁₋₈₉₈₎-HisTag mittels magnetischer TALON Beads (IMAC)

RAW309 Zellen wurden stabil mit dem pcDNA3.1(+)_ERMP1₍₁₋₈₉₈₎_HisTag Vektor transfiziert und mit G418 selektiert. Die Klone 40C2 und 40C6 zeigten im Western Blot die größte Überexpression und wurden expandiert. Die Zellen wurden in Equilibrierungs-/Waschpuffer aufgenommen und mit 1 % n-

octyl- β -D-glucosid Octylglucosid und Ultraschall lysiert. Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Clontech, Saint-Germain-en-Laye) durch „immobilized metal ion chromatography“ (IMAC) mit Co^{2+} oder Ni^{2+} .

2.9.3.4 Native Aufreinigung von ERMP1₍₁₋₈₉₈₎ mittels Ni^{2+} HisTrap, ResourceQ, Superdex 200 10/300 GL und MonoQ

RAW309 Zellen wurden stabil mit dem pcDNA3.1(+)_ERMP1₍₁₋₈₉₈₎_His Vektor transfiziert und mit G418 selektiert. Die Klone 40C2 und 40C6 zeigten im Western Blot die größte Überexpression und wurden expandiert. Die Zellen wurden geerntet und in Ni^{2+} Puffer A mit 1 % *n*-octyl- β -D-glucosid und 0,5 % CHAPS mit dem Ultraschallstab lysiert. Das Lysat wurde bei 3000 x g für 10 min bei 4° C abzentrifugiert. Der Überstand wurde 1:10 mit Ni^{2+} Puffer A verdünnt und über das ÄKTA System auf eine äquilibrierte Ni^{2+} His Trap Säule (5 ml, GE Healthcare) geladen. Die Säule wurde gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm die Basislinie erreicht hatte und dann die gebundenen Proteine mit 100 % Ni^{2+} Puffer B eluiert. Das Eluat (10 ml) wurde im AMC Assay auf Aktivität gegen Alanin, Phenylalanin, Arginin und Lysin überprüft. Das enzymatisch aktive Eluat wurde mit einer mit ResourceQ/MonoQ recombinant A-Puffer äquilibrierten ResourceQ Säule (GE Healthcare) aufgetrennt und die aktiven Fraktionen vereint. Das Eluat wurde mit einer 15 ml Amicon Säule auf 1 ml aufkonzentriert. Eine S200 Säule wurde mit S200-Puffer äquilibriert (mindestens 2 CV) und das ResourceQ Eluat über eine 1ml Loop in das System injiziert. Bei einem konstanten Fluß von 1 ml/min S200-Puffer wurden zuerst die größeren Proteine eluiert, dann folgten die kleineren, die mit den Poren des Superdex Materials interagieren können. Die Proteine wurden fraktioniert und die Fraktionen auf Aminopeptidase-Aktivität überprüft. Die zwei aktiven Fraktionen wurden einzeln über eine MonoQ Säule aufgetrennt. Dafür wurden die Fraktionen mit ResourceQ/MonoQ recombinant A-Puffer 1:10 verdünnt und auf eine äquilibrierte MonoQ Säule geladen. Die Säule wurde mit 5-10 CV Puffer A gewaschen und die gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten von MonoQ rekombinant Puffer B in 30 min eluiert. Die Fraktionen (1 ml) wurden im AMC-Assay auf Aminopeptidase Aktivität überprüft.

2.10. Aufreinigung von Antikörpern

Das zurückgefaltete ERMP1₍₈₈₋₃₉₃₎ wurde der Firma EUROGENTEC (Serang, Belgien) übersandt. Es wurden zwei Kaninchen mit jeweils 100 µg des Proteins immunisiert und im Abstand von 7 Tagen 2x geboostet. Prä-Immunsera und Immunsera wurden im ELISA gegen das zurückgefaltete Protein getestet. Das Antiserum wurde über eine NHS-activated Sepharose Säule (GE Healthcare) gereinigt, die zuvor mit dem Antigen gekoppelt wurde.

2.10.1 Affinitätschromatographie des Antiserums über eine N-hydroxysuccinimide (NHS) aktivierte Säule

Das Antigen wurde mit einer Konzentration von 5 mg/ml in NHS-Kopplungspuffer aufgenommen und die Säule nach den Angaben des Herstellers beladen. Dann wurde die Säule mit 5 ml NHS-Bindungspuffer gewaschen, das Serum 1:10 in NHS-Bindungspuffer verdünnt und 1-fach Protease Inhibitoren (Roche, Penzberg) zugegeben. Das Serum wurde ÜN bei 4° C zirkulär über die Säule gepumpt. Dann wurde die Säule mit 5 CV NHS-Bindungspuffer gewaschen. Das gebundene IgG wurde anschließend mit 5 CV Glycin-Puffer eluiert und danach die Säule mit NHS-Waschpuffer gewaschen, bis der Durchfluss einen pH von 8,8 hatte. Danach wurde das übrige IgG mit 5 CV alkalischem Elutionspuffer eluiert. Die Eluate wurden vereinigt, neutralisiert und mit Amicon Filtern aufkonzentriert. Die Spezifität und Sensitivität des Antikörpers wurde im Western Blot überprüft.

2.10.2 IgG Aufreinigung von Y3 und 25-D1.16 Hybridomüberstand

Die Aufreinigung des Hybridomüberstandes 25-D1.16 erfolgte mit dem ÄKTA System über eine Protein G Säule (GE Healthcare). Die Protein G Säule wurde mit 3-4 CV PBS äquilibriert und der Hybridomüberstand auf die Säule geladen. Nach erneutem Waschen mit 3-4 CV PBS wurde das IgG mit Glycin Puffer eluiert und der pH des Eluats auf pH 7 eingestellt. Die Säule wurde in 20 % EtOH bei 4°C gelagert.

2.11 Intrazelluläre Färbung von BMDCs für die Fluoreszenz-Mikroskopie

BMDCs wurden an Tag sechs geerntet, 1x mit PBS gewaschen und in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/Kammer in TM 5 % mit 100 ng/ml LPS in Lab-Tek Objektträger (Nalgene, Tuntenhausen) gesät und ÜN bei 37° C inkubiert. Das Medium wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen mit 1 % PFA in TM 5 % bei 4° C für 2 h fixiert. Die Kammern wurden 3x mit TBST gewaschen und die Zellen für 2 h mit TBST + 5% BSA und Fc-Block (eBiosciences, #14-0161) geblockt. Nach dem Blocken wurden die Zellen wiederum 3x mit TBST gewaschen und der primäre AK in TBST mit 2 % BSA für 1 h bei 4° C inkubiert. Nach 3x Waschen mit TBST wurde der sekundäre AK in TBST mit 2 % BSA für 1 h bei 4° C inkubiert und nochmals 3x mit TBST gewaschen. Abschließend wurden die Zellen mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride, Sigma-Aldrich) für 10 min bei 4° C inkubiert, 3x gewaschen und die mit PBS gefüllten Kammern mit einem Olympus Fluoreszenz-Mikroskop (IX81, Hamburg)⁷⁶ untersucht und mit der Cell^R Software analysiert.

Tabelle 9: Antikörper für die Fluoreszenz-Mikroskopie

Primär AK	Sekundär AK (alle Invitrogen)
ERMP1 (polyklonales Antiserum, Eurogentech)	F(ab') ₂ goat α-rabbit IgG Alexa Fluor 488
TAP (sc-11464, Santa Cruz)	donkey α-goat IgG Alexa Fluor 594
H2-K ^d -Biotin (BD, SF1-1.1.1)	Streptavidin Alexa Fluor 594
Fc-block (#14-0161-81, eBiosciences, San Diego)	-

2.12 Auswirkungen der Genexpression von ERMP1 auf die MHC I Expression der Zelloberfläche

2.12.1 Gene silencing von ERMP1 mittels RNAi

Für den knockdown der ERMP1 Proteinexpression wurde die Mission shRNA TRCN0000032403, XM_358328.1101s1c1 mit der spezifischen Sequenz CCG GGT TTG AGA TGT TCA CTC CTA TCT CGA GAT AGG AGT GAA CAT CTC AAA CTT TTT G (Sigma-Aldrich, Steinheim) und ein unspezifischer Kontroll-shRNA Vektor (Sigma-Aldrich, #SHC002) verwendet. Die transfizierten Zellen wurden mit Puromycin selektiert.

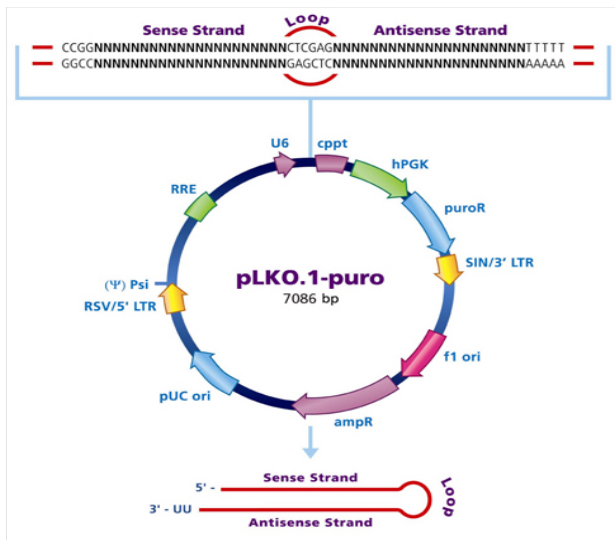


Abbildung 16: Schematische Abbildung des pLKO.1-puro Vektors mit siRNA Insert.

2.12.2 Überexpression von ERMP1 mittels pcDNA3.1(+)

Für die Überexpression von ERMP1₍₁₋₈₉₈₎ wurden Zellen mit dem pcDNA3.1_ERMP1_His Vektor stabil transfiziert. Als Kontrolle wurde der entsprechende Leervektor transfiziert. Die Transfektanten wurden mit G418 selektiert.

2.12.3 RAP („reverse analysis of processing“) Konstrukte

Mithilfe der RAP-Minigenkonstrukte konnte die Expression von SIINFEKL auf H2-K^b unter Einfluss der gesamten MHC I Prozessierungsprozesse in der Zelle untersucht werden⁷⁷. Unter der Kontrolle des CMV Promotors beginnt die Proteintranslation beim ATG des Ubiquitins und das Influenza NP₍₃₆₆₋₃₇₄₎ Epitop ASNENMETM wird zusammen mit dem N-terminal verlängerten Ovalbumin₍₂₅₇₋₂₆₄₎ Epitop SIINFEKL exprimiert. Durch die anschließende IRES Sequenz erfolgt eine bicistronische Expression des eGFP-Proteins. Eine Übersicht über das Genkonstrukt gibt Abbildung 17. Die Peptidbindung zwischen dem Glycin des Ubiquitins und dem darauf folgenden Arginin wird durch deubiquitinierende Proteasen gespalten und das RAP Konstrukt freigesetzt. Durch die Schnittpräferenzen des Proteasoms entsteht daraus eine Mischung aus verschiedenen CTL Vorläuferepitopen wie LEQLESIINFEKL, EQLESIINFEKL, LESIINFEKL und ESIINFEKL. Der korrekte C-Terminus entsteht unabhängig vom Proteasom durch das Stop Codon.

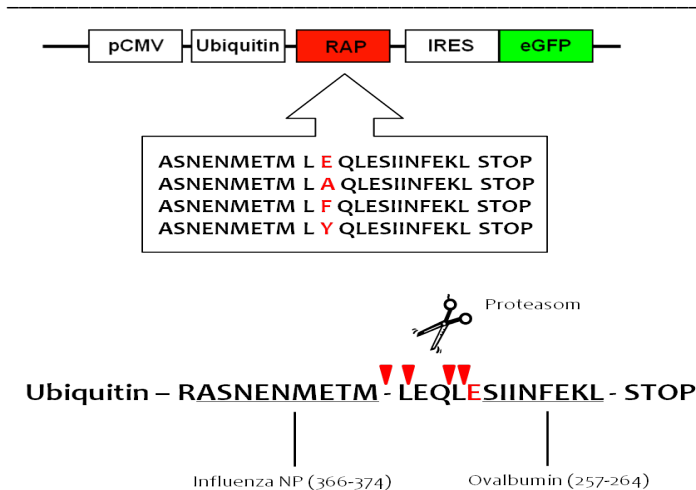


Abbildung 17: Schematische Darstellung der generierten RAP Konstrukte im pIRES2_eGFP Vektor. pCMV: Promotor des Cytomegalie Virus, RAP: "reverse analysis of processing" Konstrukt, IRES: "internal ribosome entry site", eGFP: "enhanced green fluorescent protein" (oben). Detaillierter Aufbau des RAP Konstrukts mit N-terminaler Extension und möglichen Schnittstellen des Proteasoms (unten).

Um den sequenzspezifischen Einfluss von ERMP1 auf die Expression der SIINFEKL Epitope aus den exprimierten Vorläufern zu untersuchen wurde das Konstrukt zusätzlich durch ortsgerichtete Mutagenese an der Stelle P-1 vor dem eigentlichen SIINFEKL Epitop modifiziert. Außer der Originalsequenz mit Glu (E) an P-1 wurden mit den Aminosäuren Ala (A), Phe (F) und Tyr (Y) an Position P-1 Konstrukte generiert, die die Aminosäure-Präferenzen von ERMP1 widerspiegeln. Die SIINFEKL Expression wurde an Tag zwei nach Transfektion durch die Färbung mit 25-D1.16 und anschließender FACS-Analyse überprüft⁵⁷.

2.13 FACS Analyse

Die Oberflächenexpression von MHC I Molekülen ist direkt proportional zur Bereitstellung von Peptid-Liganden aus dem MHC I Prozessierungsweg und letztlich aus dem endoplasmatischen Retikulum. Wenn eine geringere Menge oder wenig affine MHC I Liganden generiert werden sinkt auch die Anzahl an MHC I Molekülen auf der Zelloberfläche, da sie ohne Ligand nicht stabil exprimiert werden können. Um die MHC I Moleküle quantifizieren zu können, wurden die Zellen mit verschiedenen Antikörpern gegen H2-Haplotypen gefärbt und im FACS untersucht.

2.13.1 Färbung der Zellen

Die Zellen wurden 1x in FACS-Puffer gewaschen und in 100 µl FACS-Puffer/Ansatz in 96-Well-Platten aliquotiert. Die Platte wurde bei 500 x g für 3 min abzentrifugiert, ausgeklopft und die Zellen für 30 min bei 4° C in 100 µl/Well FACS Puffer mit entsprechendem Antikörper inkubiert. Danach wurden die Zellen 1x mit FACS-Puffer gewaschen und für 30 min bei 4° C mit den gelabelten AK inkubiert, nochmals gewaschen und im LSR II Flowzytometer (BD, Heidelberg) analysiert. Zur Diskriminierung von lebenden und toten Zellen wurden die Proben kurz vor der Messung durch die Zugabe von Propidiumiodid gefärbt.

Tabelle 10: Antikörper für die FACS Analyse

Primärantikörper	Sekundärantikörper
H2-D ^b -Biotin (BD, 28-14-8)	SA-APC (BD, Heidelberg)
H2-K ^d - Biotin (BD, SF1-1.1)	SA-APC (BD, Heidelberg)
H2-D ^d - Biotin (BD, 34-2-12)	SA-APC (BD, Heidelberg)
H2-L ^d - Biotin (BD, 28-14-8)	SA-APC (BD, Heidelberg)
Y3-Biotin	SA-APC (BD, Heidelberg)
25-D1.16 (Hybridomüberstand)	goat α-mouse-APC (Jackson, Suffolk)
CD11c-APC (BD, Heidelberg)	-
CD80-FITC (BD, Heidelberg)	-
CD86-PE (BD, Heidelberg)	-
Fc block (eBiosciences, San Diego)	-

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung der mikrosomalen Fraktion

Um die spezifische Aminopeptidaseaktivität des endoplasmatischen Retikulums (ER) zu untersuchen und die dafür verantwortlichen Enzyme zu isolieren, musste zunächst das Zellorganell möglichst kontaminationsfrei aufgereinigt werden. Damit die Mikrosomen intakt isoliert werden konnten, wurden die Zellen ohne Zugabe von Detergenzien mechanisch aufgeschlossen und Zelldebris, Nuklei und Mitochondrien durch differentielle Zentrifugation entfernt. Das geklärte Zelllysats wurde anschließend auf einen Saccharose-Gradienten geschichtet, und die Zellbestandteile während der Ultrazentrifugation gemäß ihrer Dichte aufgetrennt. Eine schematische Übersicht über die Aufreinigung gibt Abbildung 18.

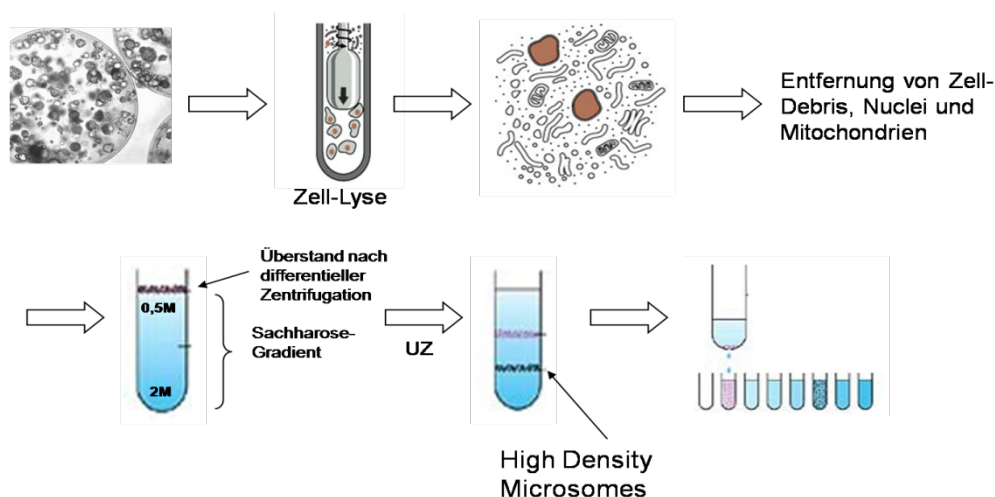


Abbildung 18: Schema der Mikrosomen-Isolierung, UZ: Ultrazentrifuge. Modifiziert nach⁷⁸.

Die Stufen des Saccharose-Gradienten wurden zunächst in Dichte und Volumen variiert, so dass eine größtmögliche Reinheit des ER erreicht werden konnte. Um die Anreicherung des ERs in den Fraktionen nachweisen zu können, wurden diese auf das ER Marker-Protein NADPH Cytochrom P450 Reduktase untersucht. Die Abtrennung des Cytosols, in dem eine große Anzahl an Proteasen aktiv ist, wurde durch Testen der Fraktionen auf Laktat-Dehydrogenase verifiziert (Abbildung 19).

Die im Folgenden dargestellten Aktivitäten der zwei Markerenzyme resultierten aus einem Saccharose Gradienten aus 1 ml 2 M, 1,5 ml 1,25 M, 1,5 ml 1 M, 1 ml 0,75 M und 1 ml 0,5 M Kissen, der durch Unterschichten der 2 M Schicht hergestellt wurde.

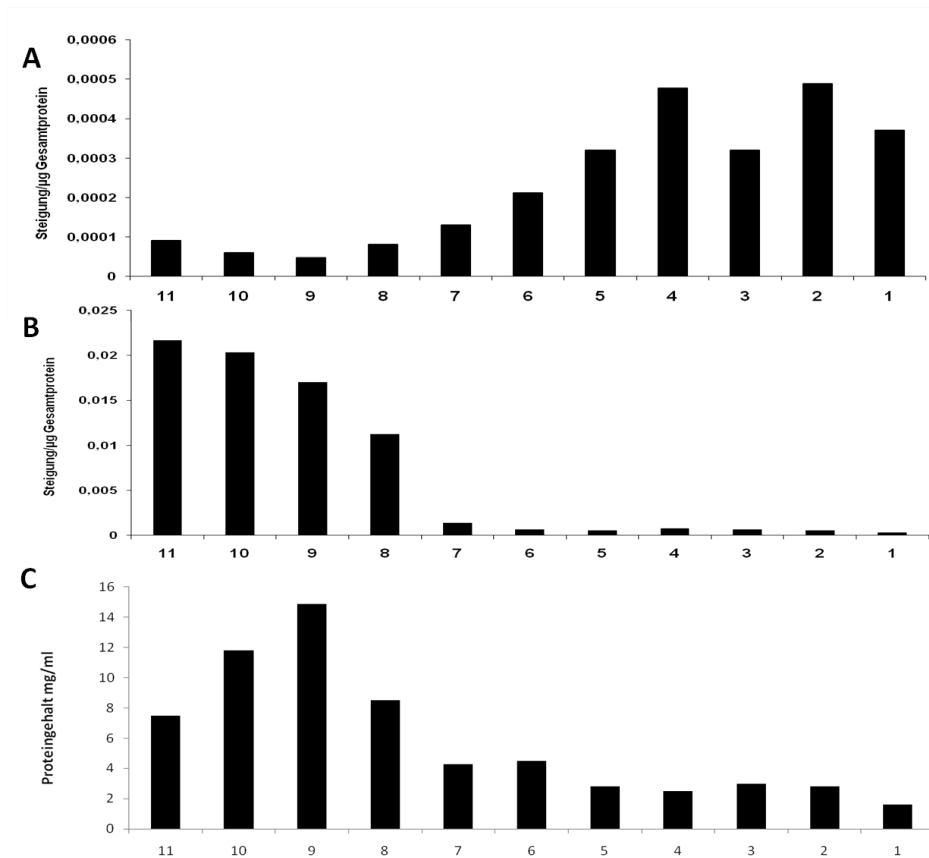


Abbildung 19: A) Aktivität des ER-Markerenzyms NADPH Cytochrom P450 Reduktase in den Fraktionen des Saccharose-Gradienten (Probe 1 in der Grafik entspricht der Fraktion bei 2 M Saccharose). B) Aktivität des cytosolischen Markerenzyms Laktat-Dehydrogenase in den Fraktionen des Saccharose-Gradienten. Beide Aktivitäten stehen im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt der Fraktion (C).

Abbildung 19a zeigt die Aktivität der P450 Reduktase im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt der Fraktionen des Saccharose-Gradienten. Das Markerenzym konzentriert sich in den unteren Schichten des Gradienten; an der Grenze zwischen 2 M und 1,25 M (Fraktion 2) und 1,25 M und 1 M Saccharose (Fraktion 4) zeigt sich die höchste Aktivität. Für die folgenden Versuche wurde Fraktion Nr. 2 verwendet, da sie die höchste relative Aktivität des Markerenzyms im Verhältnis zum Gesamtprotein enthielt. Vermutlich handelt es sich hier um „high density microsomes“, die mit Ribosomen assoziiert sind⁷⁹.

Abbildung 19b zeigt die LDH-Aktivität der im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt der Fraktionen des Saccharose-Gradienten. Wie man der Grafik entnehmen kann, konzentriert sich die Aktivität des Enzyms in den oberen Fraktionen des Gradienten mit niedrigem Saccharose-Gehalt. Das Cytosol konnte somit problemlos abgetrennt werden. Fraktion 2, die über der 2 M Saccharose Schicht lag und für alle nachfolgenden Versuche verwendet wurde, war frei von cytosolischem Material.

Zusätzlich zu den enzymatischen Analysen sollte die Aufreinigung des ERs über Western Blot verifiziert werden. Abbildung 20 zeigt einen Western Blot gegen das luminale ER Chaperon Calretikulin. Aufgetragen wurden jeweils 20 µl des geklärten Zelllysats vor der Ultrazentrifugation, der vereinigten Fraktionen 11-8 (Cytosol) und der Fraktion 2 (ER). Die spezifische Calretikulin-Bande von 60 kDa wurde durch die Ultrazentrifugation deutlich in Fraktion 2 angereichert, ist aber auch im Zell-Lysat schon zu erkennen. Die stärkere Bande bei 47 kDa ist vermutlich ein Degradationsprodukt des Proteins, da die Aufreinigung ohne Proteaseinhibitoren durchgeführt wurde.

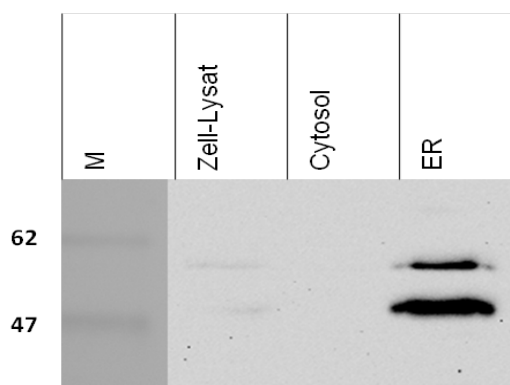


Abbildung 20: Western Blot gegen den ER-spezifischen Marker Calretikulin (spezifische Bande bei 60 kDa).

3.2 Aminopeptidase-Aktivität in Mikrosomen und Cytosol

Im Anschluss an die ER-Isolierung wurde zunächst die Aminopeptidase-Aktivität der gesamten Mikrosomen-Fraktion untersucht. Wie gezeigt werden konnte, zeigen Cytosol und ER distinkte Muster in ihren Aminopeptidase-Spezifitäten, die durch ihr Zusammenspiel in der Lage sind, hochaffine MHC I Liganden zu prozessieren⁸⁰. Dafür wurden Aliquots der mit dem Detergenz n-Octyl-β-D-glucopyranosid lysierten Fraktion 2 mit den 20 proteinogenen, an das Fluorophor AMC gekoppelten, Aminosäuren inkubiert. Die Freisetzung der Fluoreszenz, die von freiem AMC ausgeht, wurde in einer Kinetik gemessen. Einzel-Aminosäure Substrate dienen hier als Ersatz für Polypeptide, die physiologischen Substrate der Aminopeptidasen. Sie ermöglichen eine unkomplizierte Messung

der Aktivität. Abbildung 21 zeigt das Aminopeptidase Profil der EL4-Mikrosomen. Gezeigt ist die Umsatzrate der einzelnen Aminosäuren bestimmt durch die anfängliche lineare Steigung der RFU („relative fluorescence unit“) über die Zeit.

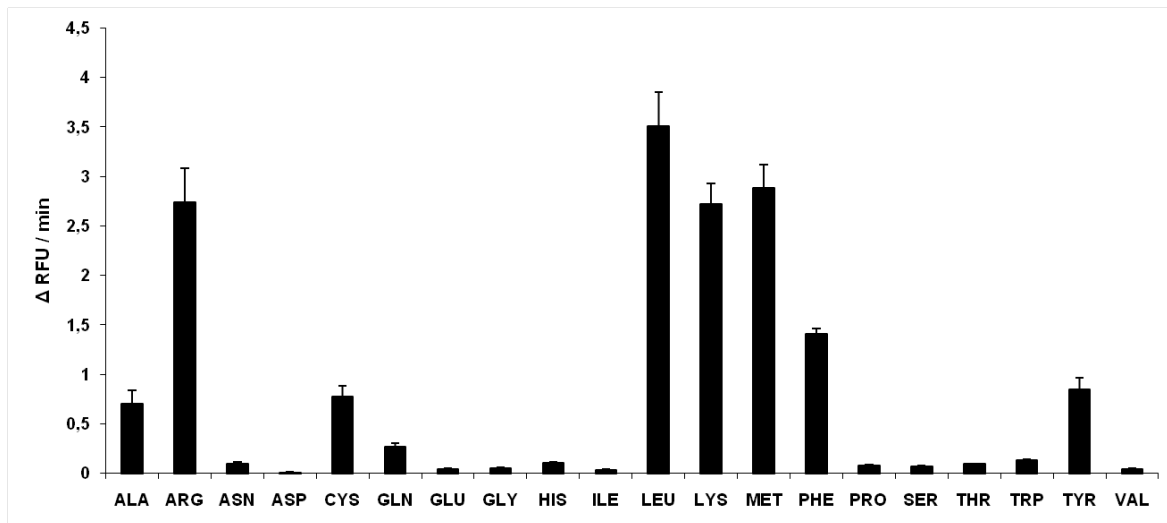


Abbildung 21: Aminopeptidasen-Spezifität der gesamten Mikrosomen-Fraktion muriner T-Lymphomzellen (EL4). Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei technischen Replikaten +/- der Standardabweichung.

Von den 20 getesteten Aminosäuren konnten nur neun in signifikantem Maß im ER umgesetzt werden, wobei die höchsten Umsatzraten bei Leucin, Methionin, Lysin und Arginin gemessen wurden. Weniger stark geschnitten wurden Phenylalanin, Alanin, Cystein, Tyrosin und Glutamin. Im Gegensatz dazu wird z.B. Prolin nicht im ER umgesetzt. Die Abwesenheit der Prolin-Aktivität ist daher auch ein gutes Maß für die Reinheit des ERs, da im Cytosol eine hohe Prolin-spezifische Aminopeptidase-Aktivität nachweisbar ist⁸⁰.

Als nächstes sollte getestet werden, ob die Abbauraten, die mit den nicht-physiologischen Aminosäure-Substraten ermittelt werden konnten, sich auch im Umsatz von oligomeren Peptiden widerspiegeln. Zehn 9-mer Peptide, die sich nur in der N-terminalen Aminosäure unterscheiden (H-XRGYVYQGL-OH, wobei X für E, P, S, Q, I, R, L, F, M, oder W stehen kann), wurden mit Cytosol (Abbildung 22a) und ER-Fraktion (Abbildung 22b) inkubiert und der zeitliche Verlauf des Abbaus über die Quantifizierung des intakten Peptids durch Massenspektrometrie bestimmt.

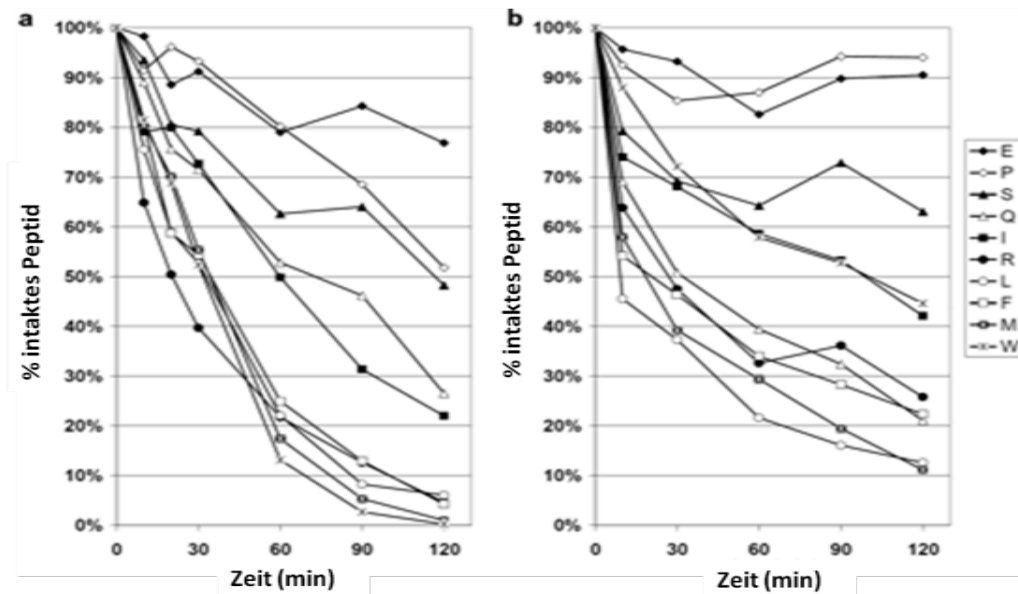


Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der Polypeptid-Verdaus mit aufgereinigtem Cytosol (a) und aufgereinigtem ER (b)⁸⁰. Gezeigt ist der Prozentsatz des intakten Nonamers im zeitlichen Verlauf des Verdaus.

Die Hierarchie des Abbaus ist $R > W, M > L, F > I, Q > S, P > E$ im Cytosol und $L, M > F, R, Q > I, W > S > E, P$ im ER. Wie schon mit den AS-Substraten gezeigt werden konnte wird Prolin im ER überhaupt nicht umgesetzt, die höchsten Aktivitäten wurden bei Leucin, Methionin, Phenylalanin und Arginin beobachtet. Auffällig ist jedoch die hohe Umsatzrate von Glutamin und Isoleucin in diesem Ansatz, obwohl mit den Einzel-Substraten keine entsprechende Aktivität nachweisbar war. Im Großen und Ganzen konnte mit diesem Versuch die Spezifitäten des ERs aus Abbildung 21 verifiziert werden. In Abbildung 23 wurde die Aminopeptidase-Aktivität der gesamten EL4-Mikrosomen und rekombinantem ERAAP verglichen. ERAAP ist die einzige bislang beschriebene Aminopeptidase im ER der Maus. Um die Aktivitäten vergleichen zu können, wurde die höchste Aktivität (LEU) als 100% gesetzt und alle anderen prozentual dargestellt.

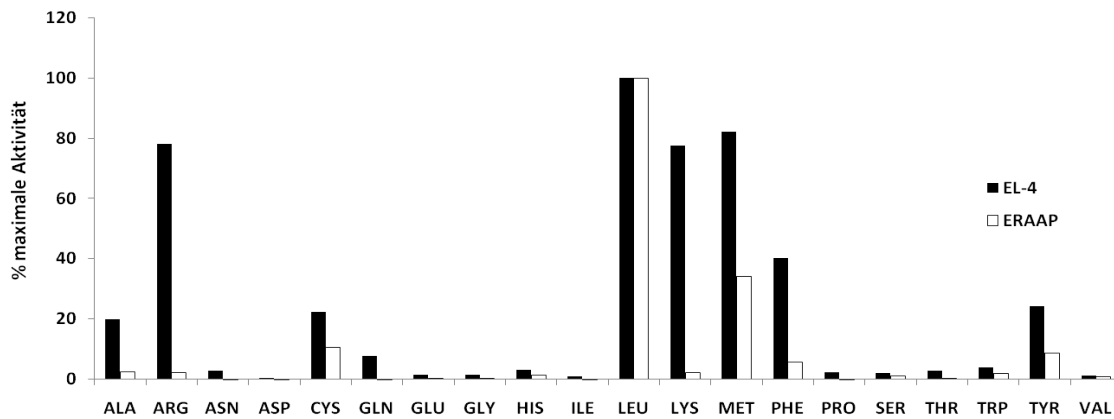


Abbildung 23: Vergleich der gesamten Amino-peptidase-Aktivität muriner Mikrosomen mit der Aktivität der rekombinant exprimierten Amino-peptidase ERAAP. Die Mittelwerte aus drei technischen Replikaten wurden auf die höchste Aktivität (LEU) normalisiert und als Prozent dieses Umsatzes dargestellt.

Wie in Abbildung 23 zu erkennen ist, kann nicht die gesamte Aktivität der EL4-Mikrosomen durch ERAAP erklärt werden, das bevorzugt Leucin und Methionin schneidet. Besonders fällt auf, dass Lysin und Arginin, die im humanen System von ERAP2 geschnitten werden, nicht von ERAAP umgesetzt werden konnten. Auch die Aktivität gegen die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin, wie auch gegen Alanin kann nicht allein durch ERAAP erklärt werden. In EL4-Mikrosomen müssen demnach noch andere Amino-peptidasen vorhanden und aktiv sein.

3.3 Identifizierung der Amino-peptidasen

3.3.1 Chromatographische Aufreinigung

Um diese Amino-peptidasen zu isolieren und zu identifizieren musste die Mikrosomen-Fraktion noch weiter separiert werden. Dafür wurden die mit Octyl- β -D-glucopyranosid und Ultraschall lysierten Mikrosomen auf eine MonoQ HR 5/5 Anionentauscher-Säule geladen und die enthaltenen Proteine mit steigenden NaCl-Gradienten gemäß ihrer Ladung chromatographisch aufgetrennt.

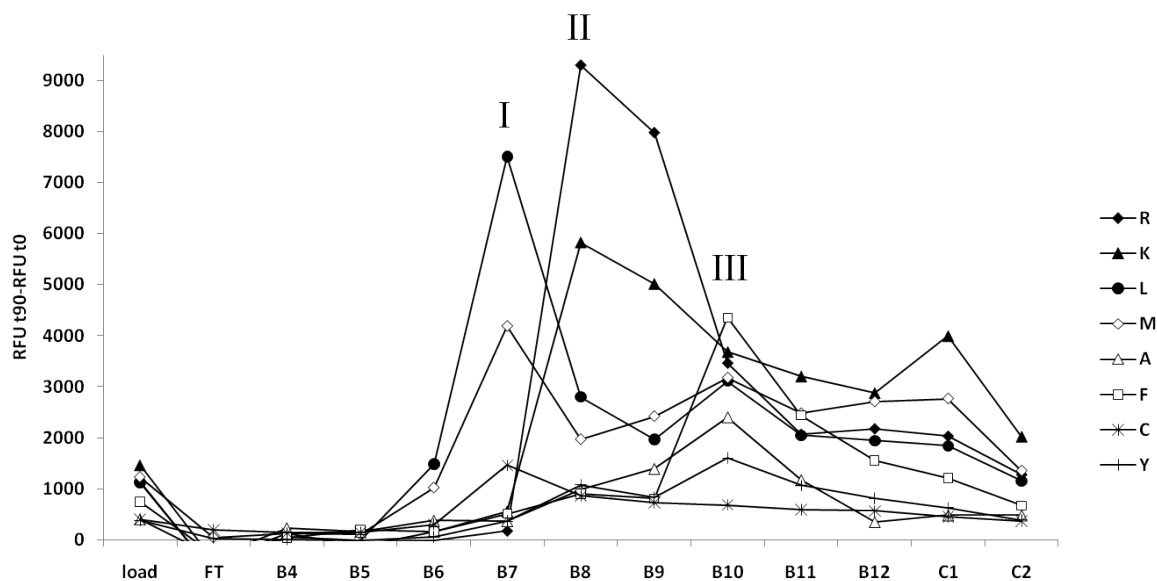


Abbildung 24: AMC Assay der chromatographisch aufgetrennten EL4-Mikrosomen. Die fraktionierten Proben wurden einzeln auf ihre Aminopeptidase-Aktivität untersucht (load: geladene Probe, FT: Durchfluss der MonoQ HR 5/5-Säule). Gezeigt sind die RFU nach 90 min Messung abzüglich des Ausgangswertes bei t=0 min.

Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen gesammelt und auf Aminopeptidase-Aktivität untersucht. In Abbildung 24 sieht man die Aktivität dieser Fraktionen für den Umsatz der nach Abbildung 21 relevanten Aminosäuren Arginin (A), Lysin (K), Leucin (L), Methionin (M), Alanin (A), Phenylalanin (F), Cystein (C) und Tyrosin (Y). Es sind deutlich drei Aktivitäts-Peaks zu erkennen, die vermutlich unterschiedlichen Proteasen zugeordnet werden können. Der erste Peak zeigt eine Präferenz für Leucin, Methionin und in geringerem Maße auch Cystein und kann deshalb ERAAP zugeordnet werden (Abbildung 23). Der zweite Peak enthält eine Protease, die bevorzugt Arginin und Lysin schneidet. Die Aktivität ähnelt somit der von ERAP2 im humanen System. Bislang wurde jedoch kein Homolog zu ERAP2 in der Maus gefunden. Der dritte Peak hat relativ zu den anderen die geringste Aktivität, aber das breiteste Aktivitätsspektrum gegen die getesteten Aminosäuren. Die enthaltene Protease kann Phenylalanin, Methionin, Leucin und Alanin schneiden und füllt somit die verbleibende Lücke in der Aktivität der murinen Mikrosomen. Aus dieser MonoQ-Aufreinigung konnten die drei verantwortlichen Enzyme allerdings noch nicht identifiziert werden.

Aus diesem Grund wurde bei den folgenden Aufreinigungen mehr Ausgangsmaterial (6×10^9 EL4) eingesetzt. Die Pufferzusammensetzung wurde geändert und es wurde reduziertes Triton X-100 zugesetzt, um die unspezifische Adsorption der Proteine auf der Säule zu verhindern. Die reduzierte Form des Detergenz wurde gewählt, um die Absorption bei 280 nm durch den Puffer zu vermindern und die Elution der Proteine besser beobachten zu können. In Abbildung 25 sieht man das

Chromatogramm der MonoQ Aufreinigung mit reduziertem Triton X-100. Bei einer Flussrate von 1 ml/min wurde ein linearer NaCl-Gradient von 0-50 % in 20 min, dann 50-80 % in weiteren 5 min und schließlich auf 100 % Puffer B angelegt.

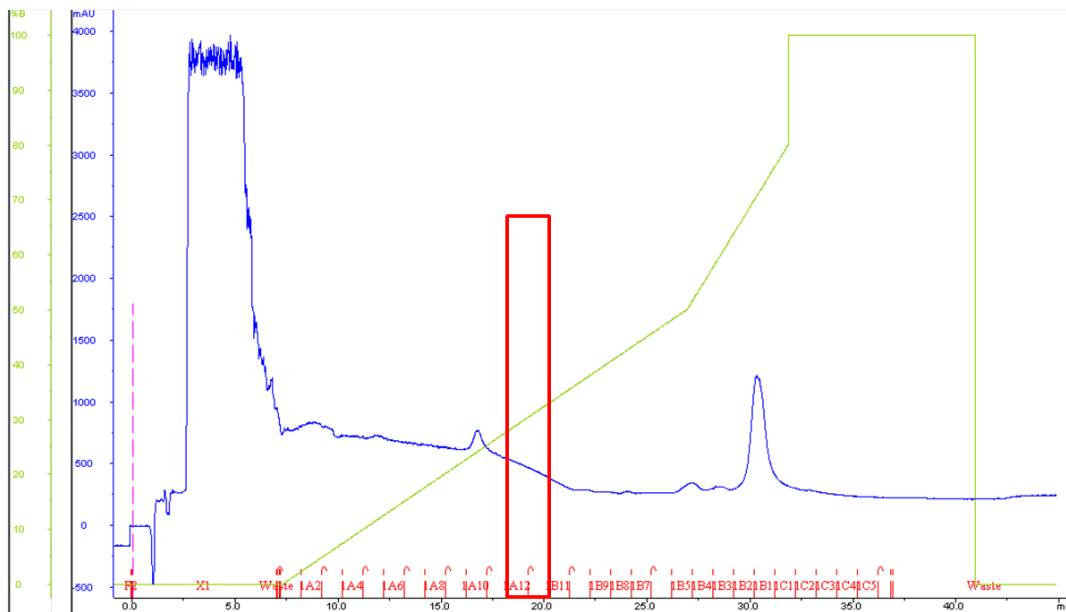


Abbildung 25: Chromatogramm der Mikrosomen-Aufreinigung über die MonoQ HR 5/5-Säule mit reduziertem Triton X-100. Gezeigt ist die Absorption der eluierten Proteine bei 280 nm und der angelegte NaCl-Gradient. Die markierten Fraktionen A12 und B12 wurden in den folgenden Versuchen weiter untersucht.

Auch hier wurden 1 ml Fraktionen gesammelt und nach dem MonoQ Lauf auf Aminopeptidase-Aktivität untersucht. Diese aktivsten Fraktionen (A12 und B12) eluierten bei 25-30 % Puffer B von der Säule. Die gesamte Proteinabsorption lag bei ca. 250 mAU, was einer Proteinkonzentration von ungefähr 250 µg/ml entspricht.

Die Fraktionen A12 und B12 wurden mit Vivaspin Zentrifugalkonzentratoren auf ca. 20-30 µl aufkonzentriert und komplett auf ein natives PAGE-Gel aufgetragen. Nach einer „blue native“-Gelelektrophorese, die auf Eis durchgeführt wurde, um die Peptidase-Aktivität während des Laufes zu minimieren, wurde das gesamte Gel in 100 µM Phenylalanin-AMC Substrat bei 37° C inkubiert und schließlich unter UV-Licht betrachtet bis die fluoreszierenden Banden sichtbar wurden.

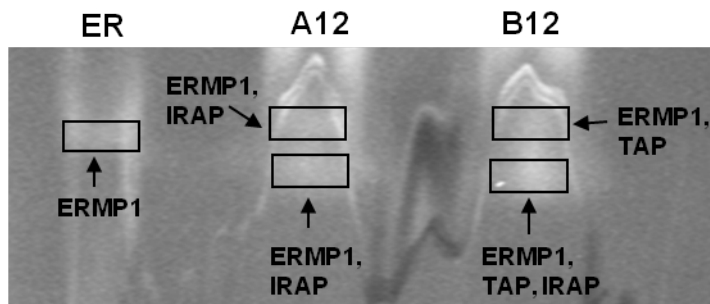


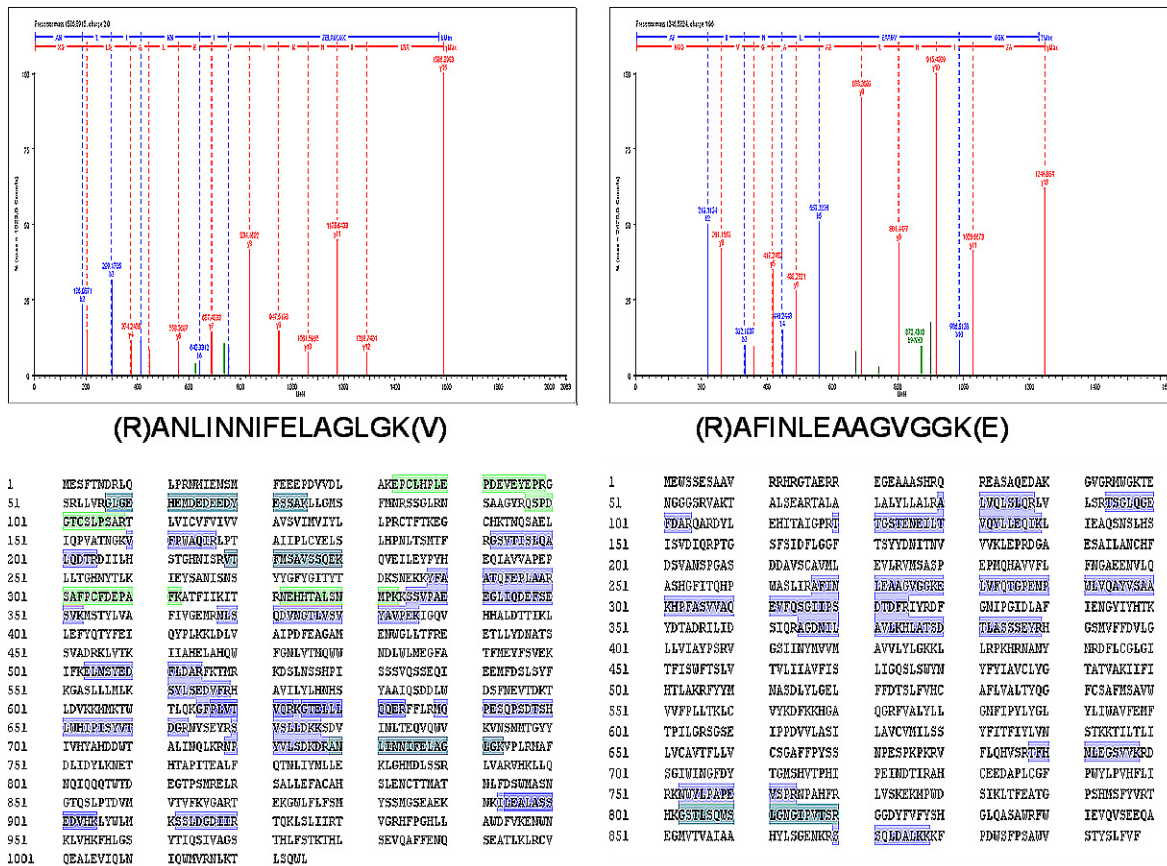
Abbildung 26: „blue native“-PAGE, gefärbt mit Phenylalanin-AMC Substrat (100 μ M) für 30 min, unter UV-Licht. Markiert sind die fluoreszierenden Banden, die im Massenspektrometer analysiert wurden.

Abbildung 26 zeigt die Aufnahme dieses Gels unter UV-Licht. Die fluoreszierenden Banden, die für die massenspektrometrische Analyse aus dem Gel ausgeschnitten wurden sind markiert. Anders als beim SDS-PAGE kann mit dieser Methode keine Aussage über das Molekulargewicht der Enzyme getroffen werden, da die Probe nicht denaturiert wurde und die nativen Proteine sowohl ihre Tertiärstruktur besaßen, als auch eventuell vorhandene Proteinkomplexe erhalten blieben. Um die für die Aminopeptidase-Aktivität verantwortlichen Proteine zu identifizieren, wurden die ausgeschnittenen Gelstücke anschließend tryptisch verdaut und für die Massenspektrometrie vorbereitet.

3.3.2 Massenspektrometrische Analyse

Die aus dem Gel gewonnenen Proben wurden mit einem Waters Q-ToF Premier ESI (Elektrospray Ionisierung) in positivem V-Modus in einer Expression-Analyse gemessen. Dadurch erhielt man Sequenzinformationen, die durch Computeranalyse jedem einzelnen Peptid und diese wiederum durch Datenbanksuche dem zugehörigen Protein zugeordnet werden konnten.

Auf diese Weise konnten in den Banden des nativen Gels sowohl die „Leucyl-cystinyl aminopeptidase“ (IRAP, Lnpep, Refseq: NM_172827.3), als auch die „Endoplasmic reticulum metallopeptidase 1“ (ERMP1, Fxna, Refseq: NM_001081213.1) nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten in den Banden viele ER-residente Proteine wie z.B. ERAAP, TAP, Calretikulin und schwere Ketten von MHC Klasse I Molekülen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



3.4 Aminopeptidasen in murinen Mikrosomen

3.4.1 IRAP

Die Versuche mit IRAP wurden in Kooperation mit Peter van Endert (Faculté de Médecine René Descartes, Paris) durchgeführt, dessen Arbeitsgruppe schon weiterführende Versuche im Bezug auf die Rolle dieser Aminopeptidase bei der „crosspresentation“ durchgeführt hat⁸¹.

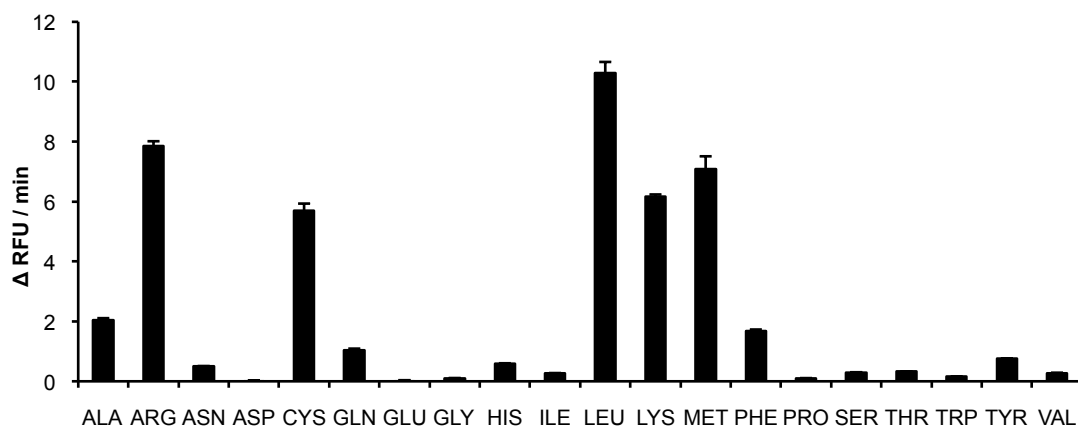


Abbildung 28: Aminosäure-Spezifität des in Baculoviren exprimierten rekombinanten IRAP. Gezeigt sind die Mittelwerte (+/- STW) der Änderung der RFU über die Zeit, gemessen in Triplikaten.

Rekombinantes, affinitätsgereinigtes IRAP wurde für einen AMC-Aktivitäts-Assay aus Paris zur Verfügung gestellt (Abbildung 28). Wie erwartet schneidet IRAP Arginin und Lysin (Abbildung 24, Peak II), kann aber im Gegensatz zur beobachteten Aktivität in den chromatographisch aufgetrennten Mikrosomen Leucin sogar besser schneiden. Mit den AMC-Substraten ist auch Methionin ein gut umgesetztes Substrat von IRAP.

Vergleicht man nun die in der chromatographischen Auftrennung der Mikrosomen erhaltenen Peaks I-III (Abbildung 24) mit der Gesamtaktivität muriner Mikrosomen (Abbildung 21), so wird ersichtlich, dass ERMP1 in Peak III vor allem für die Aktivität gegen Alanin (A), die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (F) und Tyrosin (Y) und Glutamin (Q) verantwortlich ist. Da IRAP jedoch keine ER residente Aminopeptidase ist, sondern in einem gesonderten endosomalen Kompartiment lokalisiert ist⁸¹, trägt ERMP1 anscheinend auch stark zur Aktivität gegen Lysin (K) und Arginin (R) im ER bei (Abbildung 29).

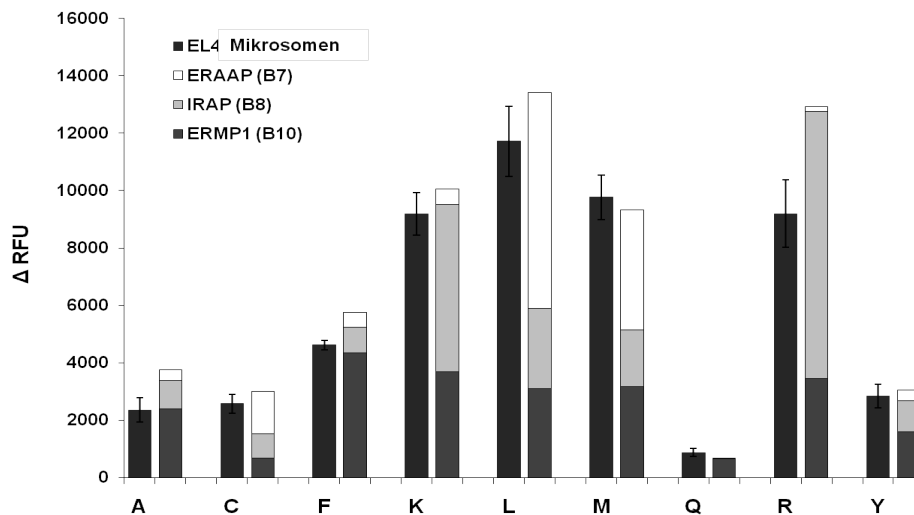


Abbildung 29: Vergleich der Aktivität muriner Mikrosomen (schwarz) und der durch Anionentausch separierten Peaks. Peak I entspricht Fraktion B7 (ERAAP, weiß), Peak II entspricht Fraktion B8 (IRAP, hellgrau) und Peak III entspricht Fraktion B10 (ERMP1, dunkelgrau).

3.5 ERMP1

Erst kürzlich wurde nachgewiesen, dass ERMP1 eine Rolle bei der Entwicklung der Ovarien der Ratte spielt⁸². Die Rolle dieser Aminopeptidase in der MHC Klasse I Prozessierung wurde bisher noch nicht untersucht. Dabei erfüllt sie viele Voraussetzungen für eine Epitop henerierende Aminopeptidase im endoplasmatischen Retikulum.

Das 898 AS große Transmembranprotein ist eine Metallopeptidase und gehört zur Protease-Familie M28. Abbildung 30 zeigt die Aminosäuresequenz des murinen ERMP1. Die Bereiche des Proteins, die in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums hereinreichen, sind unterstrichen. ERMP1 durchspannt insgesamt sieben Mal die Membran des ERs. Das aktive Zentrum (ASP₂₀₁ und GLU₂₄₅) und die zwei Zink-Bindungsstellen (HIS₁₉₉, ASP₂₁₁, GLU₂₄₆, GLU₂₇₂ und HIS₃₄₈) liegen in der ersten großen ER-Domäne (AS 88-393) innerhalb des ER-Lumens⁸³.


```

1  MEWSSESAAV RRHRGTAERR EGEAAASHRQ REASAQEDAK GVGRMWGKTE NGGGSRVAKT
61  ALSEARTALA LALYLLALRA LVQLSLQRLV LSRTSGLQGE FDARQARDYL EHITAIGPRT
121 TGSTENEILT VQYLLEQIKL IEAQSNLSLHS ISVDIQRPTG SFSIDFLGGF TSYYDNITNV
181 VVKLEPRDGA ESAILANCHF DSVANSPGAS DDAVSCAVML EVLRVMSASP EPMQHAVVFL
241 FNGAENVLQ ASHGFIQHP WASLIRAFIN LEAAGVGGKE LVFQTGPENP WLQAYVSAA
301 KHPFASVVAQ EVFQSGIIPS DTDRIYRDF GNIPGIDLAF IENGYYHTK YDTADRILID
361 SIQRAGDNIL AVLKHLATSD TLASSSEYRH GSMVFFDVLG LLVIAYPSRV GSIINYMVVM
421 AVVLYLGKKL LRPKHRNANY MRDFLCGLGI TFISWFTSLV TVLIIAVFIS LIGQSLSWYN
481 YFYIACLYG TATVAKIIFI HTLAKRFYYM NASDLYLDEL FFDTSLFVHC AFLVALTYQG
541 FCSAFMSAVW VVFPLLTKLC VYKDFKKHGA QGRFVALYLL GMFIPYLYGL YLIWAVFEMF
601 TPILGRSGSE IPPDVVLASI LAVCMILSS YFITFIYLVN STKKTILTLL LVCAVTFLLV
661 CSGAFFPISS NPESPKPKRV FLQHSRSTFH NLEGSVVKRD SGIWINGFDY TGMSHVTPhi
721 PEINDTIRAH CEEDAPLCGF PWYLPVHFLI RKNWYLPAPV VSPRNPAHFR LVSKEKMPWD
781 SIKLTFEATG PSHMSFYVRT HKGSTLSQWS LGNGIPVTSR GGDYFVFYSH GLQASAWRFW
841 IEVQVSEQA EGMVTVAIAA HYLGENKRS SQDALKKKF PDWSFPSAWV STYSLFVF

```

Abbildung 30: Sequenz des murinen ERMP1. Unterstrichen sind die endoplasmatischen Bereiche des Enzyms. Quadrate: aktive Zentren, Kreise: Zink-Bindungsstellen⁸³.

3.5.1 Klonierung der ERMP1 ER Domäne (ERMP1₍₈₈₋₃₉₃₎) in den bakteriellen Expressionsvektor pASK-IBA2 Vektor

Um das Protein biochemisch näher charakterisieren zu können, sollte das Enzym zunächst rekombinant exprimiert und dann aufgereinigt werden. Die ER Domäne mit dem aktiven Zentrum (AS 88-393) wurde in den bakteriellen Expressionsvektor pASK-IBA2 kloniert. Die N-terminale OmpA-Sequenz bewirkt eine Expression des Proteins im Periplasma der Bakterien, was eine bessere Löslichkeit und eine einfachere Aufreinigung des rekombinanten Proteins ermöglichen soll. Das C-terminale Strep-Tag (-WSHPQFEK) ermöglicht eine spezifische Aufreinigung über eine Strep-Taktin Säule. Abbildung 31 zeigt die schematische Darstellung des bakteriellen Expressionskonstruktes.

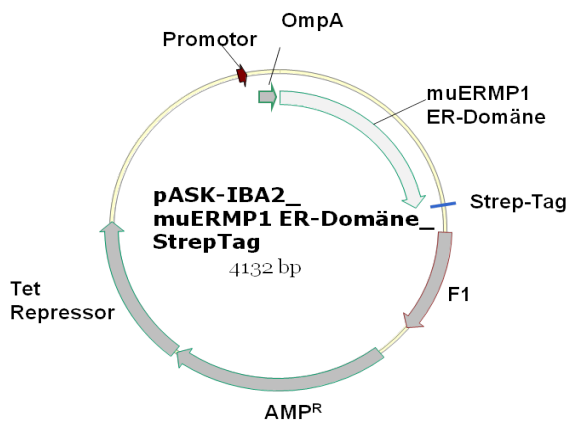


Abbildung 31: Schematische Darstellung des bakteriellen Expressionsvektors pASK-IBA2 mit der ERMP1 ER Domäne (ERMP1₍₈₈₋₃₉₃₎) in Fusion mit Strep-Tag. Kloniert wurden die AS 88-393 des gesamten Proteins.

Zunächst wurde der kompetente *E. coli* Stamm Rosetta-Gami (DE3) mit dem Expressionskonstrukt transformiert und auf einer Agar-Platte mit Selektionsantibiotika ausplattiert. Durch Zugabe von Anhydrotetracyclin wurde die Proteinexpression induziert. Vorversuche zeigten die größte Proteinexpression nach 4 h Induktion bei 30° C (Daten nicht gezeigt). Der Überstand der lysierten Bakterien wurde über eine Strep-Taktin Säule gegeben, gewaschen und mit Desthiobiotin eluiert. In Abbildung 32 (links) ist das SDS-PAGE Gel der Induktion des Vektors zu sehen. Es wurden gleiche Volumina aufgetragen. Nach 4 h Induktion ist die ca. 36 kDa große Bande des rekombinanten Proteins gut zu erkennen. Nach der Aufreinigung war das rekombinante Protein weder im Durchfluss noch im Eluat der Strep-Taktin Säule zu detektieren. Das gesamte Protein befand sich im Bakterienpellet, es akkumuliert also in unlöslichen Aggregaten, den sogenannten „inclusion bodies“. Um es aus diesen Aggregaten aufzureinigen, wurde das Pellet mehrmals mit Triton X-100 gewaschen und die jeweiligen Überstände vereinigt (Abbildung 32, rechts).

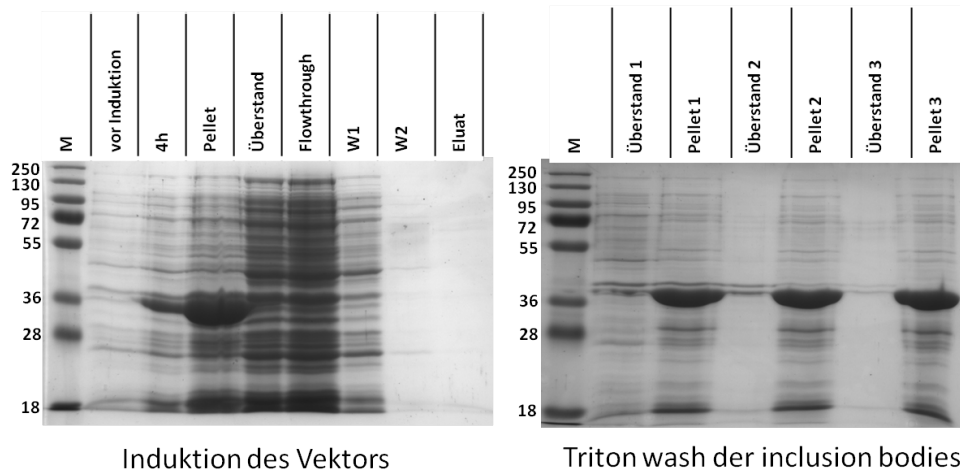


Abbildung 32: SDS-PAGE der Induktion von ERMP1₍₈₈₋₃₉₃₎ aus dem pASK-IBA2 Vektor und Aufreinigung des Bakterien-Überstandes (links) und des Pellets (rechts).

Auch die vereinigten Überstände der Triton-X Waschung wurden über eine Strep-Taktin Säule aufgereinigt. Auf das in Abbildung 33 (links) gezeigte Gel wurden gleiche Volumina aufgetragen. Im Eluat war eine schwache Bande des rekombinanten Proteins zu erkennen. Das Eluat zeigte allerdings keine Aktivität gegen AMC Substrate. Aus diesem Grund wurden zusätzlich die gewaschenen „inclusion bodies“ mit Harnstoff denaturiert und dann durch ein schnelles Verdünnen in verschiedenen Puffern versucht, die Tertiärstruktur des Proteins und damit seine native Form wiederherzustellen. Die größte Löslichkeit des Proteins wurde in Rückfaltungspuffer mit GSH/GSSH (reduziertes/oxidiertes Glutathion), pH 8 ohne NaCl erreicht. Auch das nun in Lösung befindliche Protein zeigte keine Aminopeptidase-Aktivität.

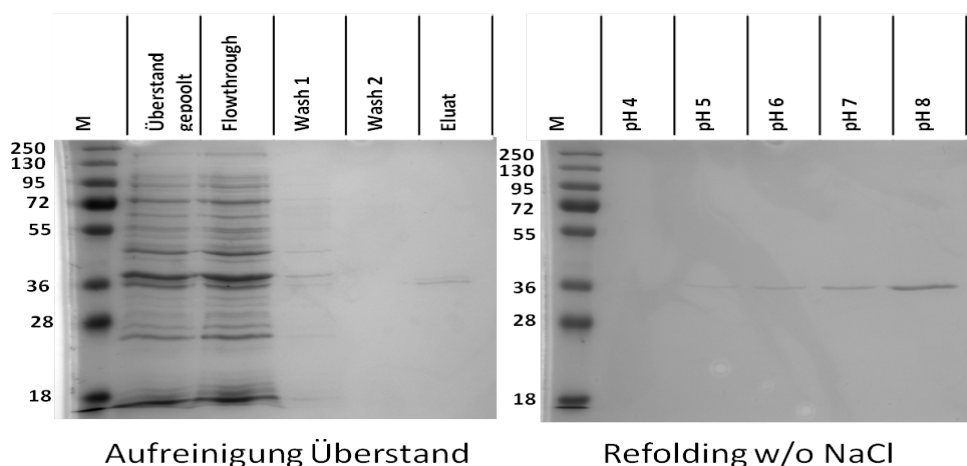


Abbildung 33: SDS-PAGE der aufgereinigten Überstände der „inclusion bodies“ (links) und der Aufreinigung der renaturierten ERMP1 ER-Domäne aus den denaturierten „inclusion bodies“.

3.5.2 Aufreinigung und Test des Antiserums

Mit 100 µg des renaturierten Proteins wurden von der Firma Eurogentec im Abstand von 14 Tagen Kaninchen immunisiert und zwei Mal „geboostet“. Nach vier Wochen wurden das Präimmun-Serum und das polyklonales Antiserum gewonnen.

Die Seren wurden zunächst in einem Western Blot gegen das bakterielle rekombinante Protein und EL4-Gesamtzelllysat getestet. In Abbildung 34 sieht man die Western Blots gegen 10 ng ER-Domäne und 20 µg EL4-Lysat. Das Präimmun-Serum (links) zeigte keine Reaktivität gegen das rekombinante Protein. Auch der Sekundärantikörper allein zeigte kein Signal (rechts). Das Antiserum (Mitte) reagierte mit der ER Domäne und zeigt eine spezifische Bande bei ca. 36 kDa. Im EL4-Lysat zeigt sich die spezifische Bande des gesamten Proteins bei ca. 100 kDa.

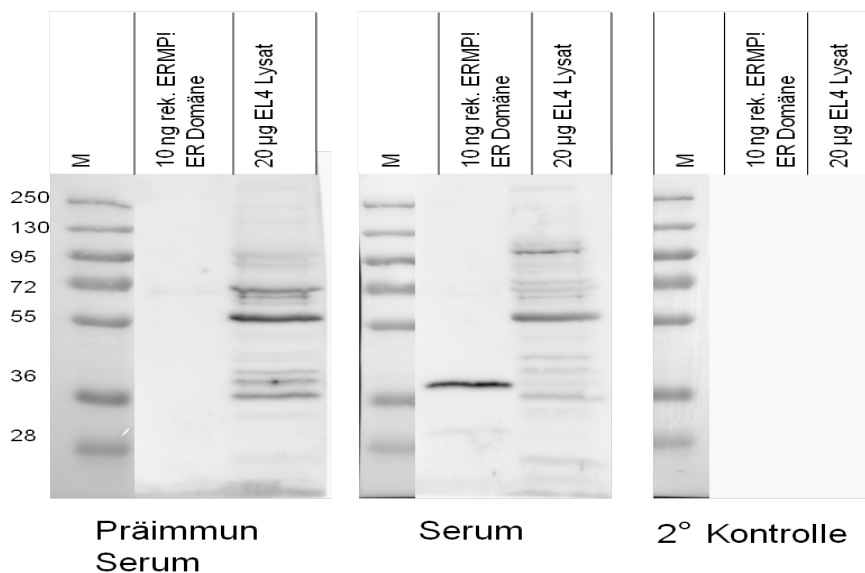


Abbildung 34: Western Blot mit unbehandeltem polyklonalem Antiserum. Links: Kontrolle mit Präimmunserum, Mitte: Blot mit polyklonalem Antiserum und Sekundärantikörper, rechts: Sekundärantikörper Kontrolle.

Im EL4-Lysat waren jedoch noch zu viele unspezifische Banden zu erkennen. Deshalb wurde eine Affinitätsaufreinigung des polyklonalen Serums gegen das Antigen durchgeführt. Dazu wurde das rekombinante Protein an eine NHS aktivierte Säule gekoppelt und der affinitätsgereinigte polyklonale Antikörper nach Inkubation mit dem Antigen auf der Säule und mehreren Waschschritten eluiert.

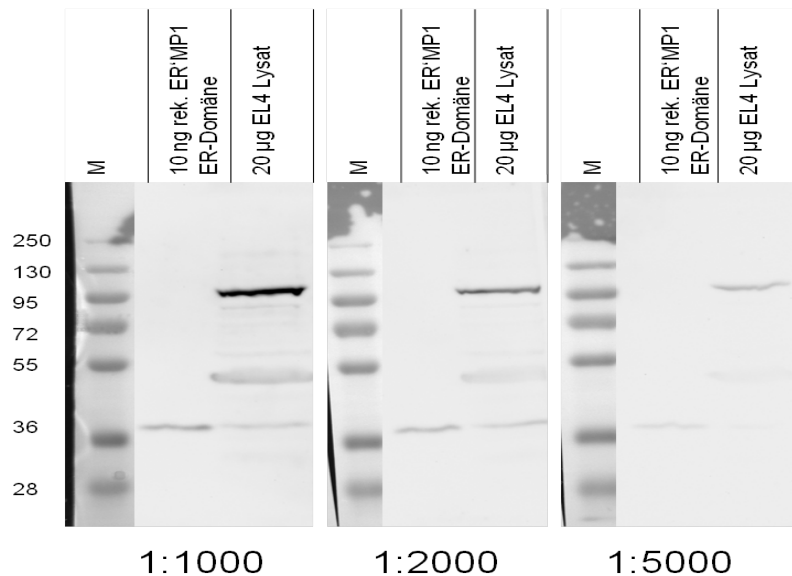


Abbildung 35: Western Blots mit dem polyklonalen Antiserum gegen ERMP1 nach der Affinitätschromatographie gegen die ER-Domäne des Proteins. Das Antiserum wurde in den angegebenen Verdünnungen eingesetzt, der Sekundär-Antikörper immer 1:1000.

Abbildung 35 zeigt die Titration des affinitätsgereinigten Antiserums gegen das rekombinante Protein und EL4-Gesamtzelllysat. Es ist zu erkennen, dass die unspezifischen Banden im Vergleich zu den Western Blots ohne Aufreinigung deutlich an Intensität und Anzahl abgenommen haben. Die spezifische Bande des gesamten Proteins bei 100 kDa ist klar zu erkennen. Das aufgereinigte polyklonale Serum wurde in den folgenden Western Blots mit einer Verdünnung von 1:1500 eingesetzt.

3.5.3 Gewebespezifische Expression von ERMP1 in der Maus

Zunächst sollte die gewebespezifische Expression der Aminopeptidase ERMP1 in verschiedenen Geweben der Maus untersucht werden. Dazu wurden die Organe einer C57/BL6 Maus präpariert und Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Zellen wurden lysiert, eine Proteinbestimmung durchgeführt und jeweils 20 µg Gesamtprotein auf ein Gradientengel (8-14%) aufgetragen. Abbildung 36A zeigt den Western Blot der untersuchten Gewebe. Da sich die üblichen Ladekontrollen (z.B. β -Aktin oder α -Tubulin) als ungeeignet erwiesen, weil die Proteine nicht in allen untersuchten Geweben nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt), wurde ein zweites Gel identisch beladen und die gesamten Proteine Coomassie gefärbt (Abbildung 36B).

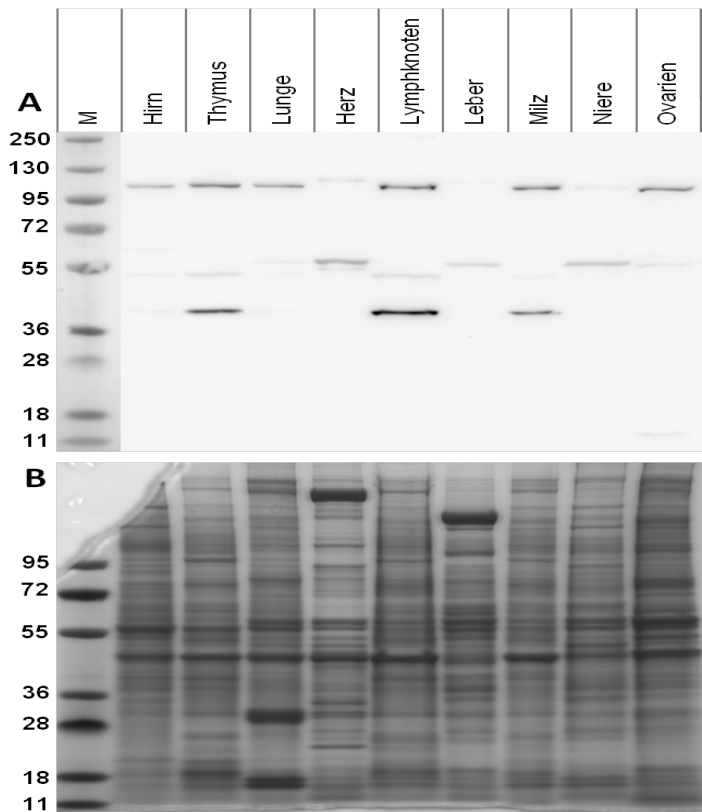


Abbildung 36: ERMP1 Western Blot von verschiedenen Geweben aus der C57/BL6 Maus (A) und Coomassie gefärbtes SDS-PAGE-Gel (B) als Ladekontrolle.

Auffällig ist die starke Expression von ERMP1 in den lymphoiden Geweben wie Thymus, Lymphknoten und Milz. Dies könnte ein Hinweis auf eine Rolle im Immunsystem und insbesondere bei der Antigenprozessierung sein. Wie schon beschrieben wird ERMP1 auch in den Ovarien exprimiert⁸². In Leber und Niere ist das Protein kaum nachweisbar und auch im Herzmuskel ist es eher schwach exprimiert. Außerdem zeigt es hier ein etwas höheres Molekulargewicht, was eventuell auf ein anderes Glykosylierungsmuster hinweisen könnte. Auch das homologe humane ERMP1 konnte auf Proteinebene nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Interessant in den Spuren mit lymphoidem Gewebe ist die prominente Bande bei ca. 36 kDa, was der Größe der rekombinanten ER-Domäne entspricht. Ob es sich hierbei um eine lösliche Form des Proteins handelt konnte nicht bestätigt werden. Es ist auch möglich, dass die kurze Bande ein Degradationsprodukt des 100 kDa Proteins darstellt. Auch die Aminopeptidase ERAP1 bildet solche Bruchstücke (Peter van Endert, persönliche Kommunikation).

3.5.4 Intrazelluläre Lokalisation von ERMP1 in murinen BMDCs (bonemarrow derived dendritic cells)

Mit dem funktionellen Antiserum konnte nun auch die intrazelluläre Lokalisation von ERMP1 durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen überprüft werden. Dazu wurden BMDCs aus BALB/c Mäusen auf speziellen Objektträgern ausgesät und ÜN mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Die DCs wurden fixiert und permeabilisiert und nach der Blockierung des Fc-Rezeptors mit verschiedenen Antikörpern und den passenden Sekundär-Antikörpern gefärbt.

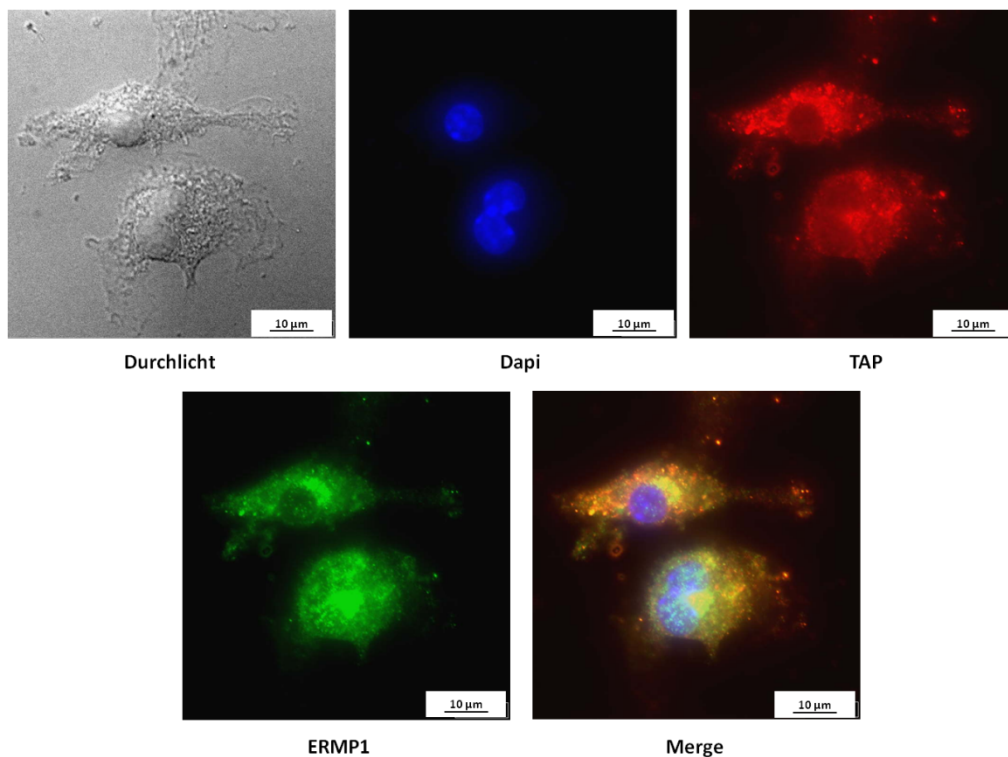


Abbildung 37: Fluoreszenzmikroskopische und Durchlicht Aufnahmen (60-fache Vergrößerung) von BALB/c BMDCs, gefärbt mit ERMP1 Antiserum/ α -rabbit AlexaFluor488 (grün) und α -TAP/ α -goat AlexaFluor594 (rot). Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Kolokalisation von TAP und ERMP1 erscheint gelb (merge).

Die Proben wurden im Fluorenmikroskop untersucht. Abbildung 37 zeigt die Fluoreszenzaufnahmen der TAP und ERMP1 gefärbten Zellen. TAP ist ein transmembranes ER-Protein, die rote Färbung zeigt die typische Verteilung des endoplasmatischen Retikulums um den Zellkern. Die grüne Färbung gegen ERMP1 zeigt das gleiche Muster. Die entsprechenden Sekundärkontrollen waren negativ (Daten nicht gezeigt).

Zusätzlich zu TAP sollte die Assoziation von ERMP1 mit MHC Klasse I Molekülen gezeigt werden. Abbildung 38 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der H2-K^d und ERMP1 gefärbten Zellen. Der H2-K^d Antikörper reagiert mit der schweren Kette des MHC Klasse I Moleküls. Die rote Färbung zeigt die typische Verteilung des endoplasmatischen Retikulums, in dem die MHC Klasse I Moleküle mit Peptiden beladen werden und schon mit Peptiden beladene H2-K^d Moleküle, die auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Das grüne Signal zeigt wiederum die Lokalisation der Aminopeptidase im ER. Die jeweiligen Sekundärkontrollen waren negativ (Daten nicht gezeigt).

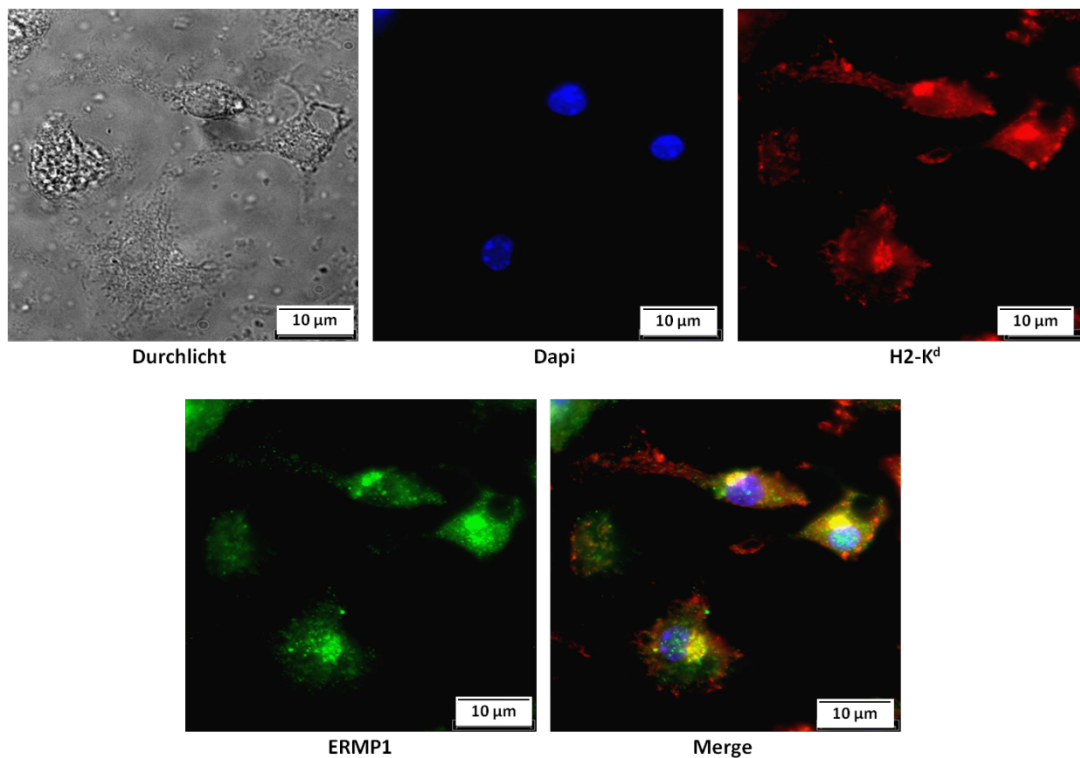


Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopische und Durchlicht Aufnahmen (60-fache Vergrößerung) von BMDCs, gefärbt mit ERMP1 Antiserum/ α -rabbit AlexaFluor488 (grün) und α -H2-K^d-Biotin/Streptavidin-AlexaFluor594 (rot). Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Kolokalisation von H2-K^d und ERMP1 erscheint gelb (merge).

3.5.6 Induktion der Expression von ERMP1 durch IFN- γ auf Proteinebene

Eine weitere Eigenschaft der MHC Klasse I Prozessierungs-Maschinerie ist die Induzierbarkeit der Expression einzelner Komponenten durch IFN- γ ⁸⁴. So wird zum Beispiel die Expression von TAP und auch die der Aminopeptidasen ERAAP/ERAP1 und ERAP2 durch IFN- γ gesteigert.

Um diesen Effekt auch für ERMP1 zeigen zu können, wurden Milzzellen aus C57/BL6 Mäusen mit rekombinantem IFN- γ stimuliert. Abbildung 39 zeigt einen Western Blot von C57/BL6 Milzzellen, die

für 15 h mit 150 U/ml IFN- γ stimuliert wurden. Wie in der Abbildung zu sehen ist, wird die Expression von ERMP1 durch die Zugabe von IFN- γ gesteigert. Die Auswertung mit der BioRad Software QuantityOne ergab eine 4,8-fache Steigerung der Proteinexpression unter Einfluss von IFN- γ . Als interne Kontrolle wurde zusätzlich ein Immunoblot gegen ERAAP durchgeführt. Für diese ER residente Aminopeptidase wurde die Induzierbarkeit der Expression durch IFN- γ schon beschrieben und konnte auch in diesem Versuchsansatz gezeigt werden. Es wurden 4 μ g Gesamtprotein der lysierten Zellen aufgetragen und zusätzlich ein Immunoblot gegen β -Aktin als Ladekontrolle durchgeführt.

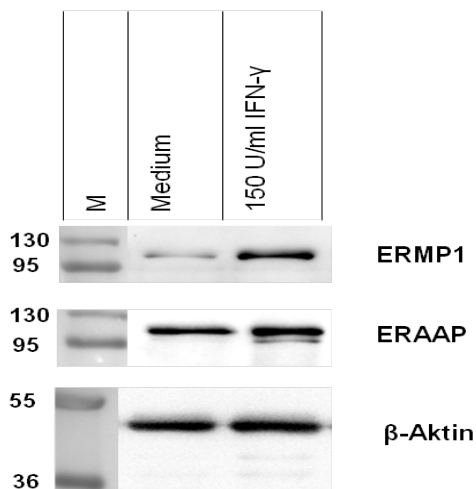


Abbildung 39: Western Blot stimulierter C57/BL6 Milzzellen gegen ERMP1. Unter den Blots gegen ERMP1 und ERAAP (110 kDa) der zugehörige Blot gegen β -Aktin (42 kDa) als Ladekontrolle.

3.5.7 Klonierung von ERMP1₍₁₋₈₉₈₎ für die Expression in Säugerzellen und verschiedene Ansätze für die Aufreinigung des Proteins

Da in Bakterien kein aktives ERMP1 exprimiert werden konnte, wurde die gesamte kodierende Sequenz des Enzyms in Fusion mit einem His-Tag in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1(+) kloniert. Wegen des hohen G/C Gehaltes musste die N-terminale Sequenz synthetisiert werden. Die Expression des Proteins steht hier unter der Kontrolle des CMV Promotors. Der Vektor kodiert für die Resistenz gegen das Antibiotikum G418, transfizierte Zellen können so selektiert werden. Da Säugerzellen im Gegensatz zu Prokaryoten Proteine glykosylieren können, könnte ERMP1 mit diesem Ansatz in seiner aktiven Form exprimiert werden. Abbildung 40 zeigt die schematische Darstellung des Expressionskonstruktes.

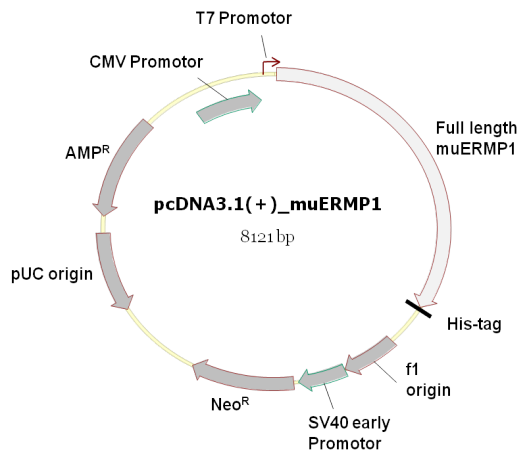


Abbildung 40: Schematische Darstellung des eukaryotischen Expressionsvektors pcDNA3.1(+) mit murinem ERMP1 und C-terminalem His-Tag.

Die Makrophagen-Zelllinie RAW309 wurde mit dem eukaryotischen Expressionskonstrukt transfiziert und mit G418 selektiert. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass nach sechs Tagen alle Wildtyp Zellen bei dieser Antibiotika-Konzentration sterben. Nach einer Woche unter Selektion wurde die Kultur durch Verdünnungsreihen in einer 96-well Platte vereinzelt und die erhaltenen Einzelzellklone expandiert. Die so generierten Zelllinien wurden im Western Blot auf ihre ERMP1-Expression hin untersucht. Abbildung 41 zeigt den Western Blot gegen ERMP1 und β -Aktin als Ladekontrolle. Es wurden 10 μ g Gesamt-Protein aufgetragen. Ganz links wurde Zelllysate der Wildtyp Zelllinie aufgetragen, in den übrigen Spuren Lysat der Einzel-Zellklone. Trotz der Resistenz gegen das Selektionsantibiotikum G418 exprimieren nicht alle Klone das rekombinante Protein. Nur die Klone 40C9, 40C2, 40C12 und 40C11 zeigen eine erhöhte Expression.

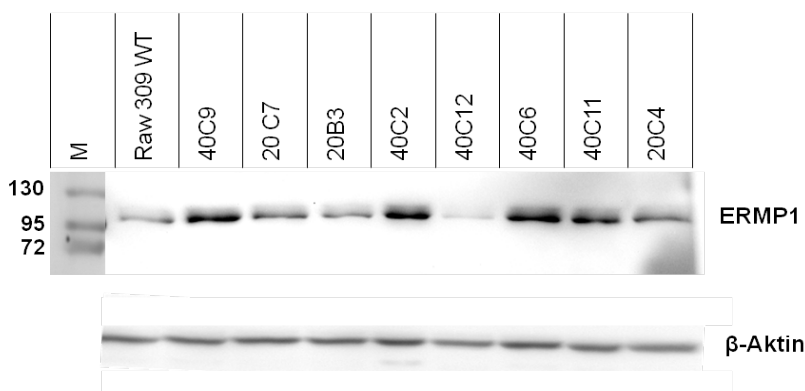


Abbildung 41: Western Blot der mit pcDNA_ERMP1 transfizierten und G418 selektierten Überexpressions-Klone. Es wurden 10 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Darunter der Western Blot gegen β -Aktin als Ladekontrolle (42 kDa).

Zunächst sollte das rekombinante Protein mittels IMAC-Affinitätschromatographie (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography) mit magnetischen Talon Co^{2+} -Beads aus dem Zelllysät aufgereinigt werden. Das 6x Histidin-Tag hat eine hohe Affinität zu doppelt positiv geladenem Kobalt oder Nickel, bildet Komplexe mit den Kationen und kann so aus dem heterogenen Zelllysät aufgereinigt werden. Für die Aufreinigung wurde der Klon 40C6 und als Kontrolle die Wildtyp Zellen hochgezogen. Die Zellen wurden mit Hilfe von 1 % n-Octyl- β -D-glucopyranosid und Ultraschall-Behandlung lysiert und das Protein unter nativen Bedingungen aufgereinigt. Das gebundene Protein wurde mit Imidazol von den Beads eluiert. Abbildung 42 (links) zeigt den Western Blot dieser Aufreinigung. Es ist zu erkennen, dass nur ein kleiner Teil des rekombinanten Proteins an den Beads binden kann. Aufgrund der hohen Bindungs-Kapazität (750 μg Protein/1 ml Beads) sollte es nicht an einer Überladung des Materials liegen, sondern möglicherweise an einer sterischen Hinderung des His-Tags. In einem AMC-Assay (Abbildung 42, rechts) wurde sowohl das Eluat des Wildtyps als auch das des Klons auf seine Aminopeptidase-Aktivität untersucht. Klon 40C6 zeigt eine erhöhte Aktivität vor allem gegen Arginin, Lysin, Phenylalanin und Methionin im Vergleich zum Wildtyp, was die Ergebnisse der Aufreinigung aus Mikrosomen verifiziert (siehe Abbildung 24).

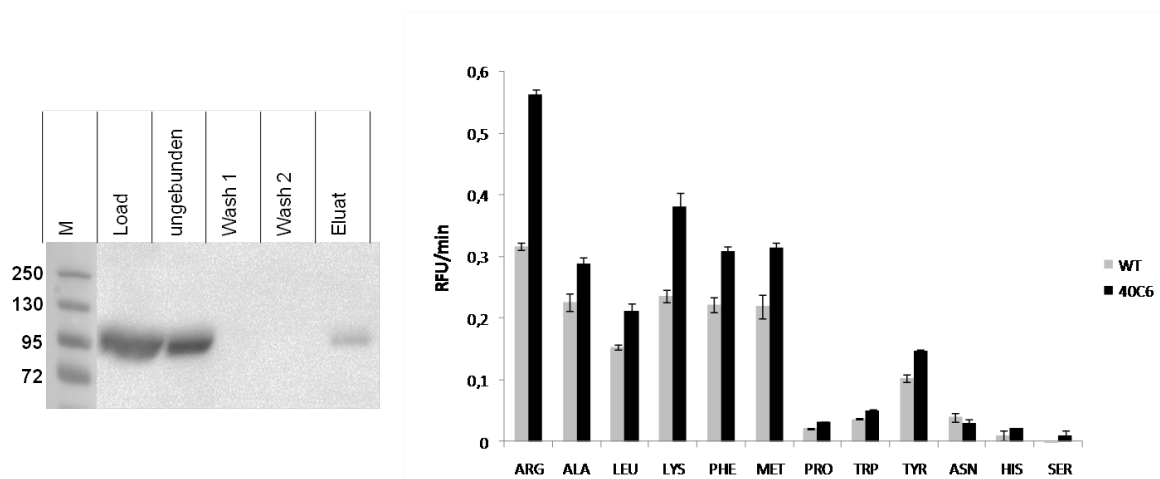


Abbildung 42: Western Blot der Aufreinigung des ERMP1 mit His-Tag mittels magnetischen Co^{2+} -Beads (links) und Aminopeptidase Aktivität des Eluats (rechts, Wildtyp und Klon 40C6). Gezeigt sind die Mittelwerte dreier technischer Replikate \pm Standardabweichung.

Die Menge an gewonnenem Protein war allerdings zu gering für Peptid Verdaus N-terminal verlängerter Epitop-Vorläufer und deren Analyse durch Massenspektrometrie, wie es mit aufgereinigtem Cytosol und ER durchgeführt wurde. Zudem sind die magnetischen Beads aus Kostengründen nur für die Aufreinigung kleinerer Mengen einsetzbar. Deshalb sollte in einem weiteren Ansatz das rekombinante ERMP1 über eine Ni^{2+} -Sephrose Säule aufgereinigt werden.

Die Vorgehensweise war ähnlich wie bei den Co^{2+} -Beads, da es sich wiederum um eine IMAC Aufreinigung handelt. Das geklärte Zelllysate wurde auf eine Ni^{2+} -Säule geladen und das rekombinante Protein durch Imidazol eluiert. Abbildung 43 zeigt den Western Blot und das zugehörige, mit Coomassie gefärbte SDS-PAGE Gel dieser Aufreinigung. Da im Ni^{2+} Eluat noch sehr viel unspezifisches Protein vorhanden war, musste das Eluat noch über weitere Säulen aufgereinigt werden. Zunächst wurde das Eluat über eine ResourceQ Säule aufgetrennt, das Eluat aufkonzentriert und durch eine Gelfiltrationssäule nach der Proteingröße aufgetrennt. Die Fraktionen wurden auf Aminopeptidase Aktivität untersucht. Auch dieser weitere Schritt ergab nicht die gewünschte Reinheit der Fraktionen. Als vierter Reinigungsschritt folgte eine MonoQ Säule. Von dieser Säule eluierten zwei aktive Fraktionen, von denen der zweite das rekombinante ERMP1 enthielt. Das Protein konnte so also angereinigt werden, leichtere Verunreinigungen sind allerdings immer noch vorhanden.

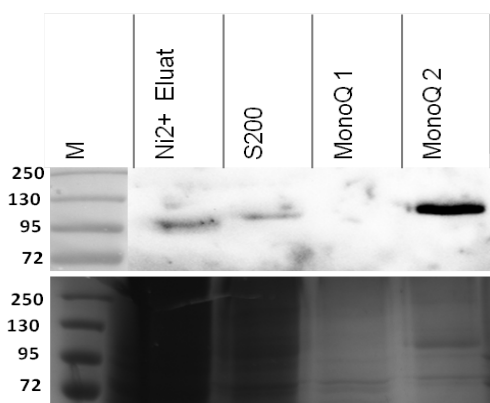


Abbildung 43: Western Blot (oben) und mit Coomassie gefärbtes SDS-PAGE Gel (unten) der Ni^{2+} -Säulen Aufreinigung von rekombinantem ERMP1 mit His-Tag aus dem überexprimierenden Klon 40C6.

Abbildung 44 zeigt die Aminopeptidase-Aktivität der Fraktion MonoQ 2 im AMC Assay. Alanin, Methionin und Phenylalanin werden bevorzugt geschnitten, aber auch Leucin und Tyrosin werden umgesetzt. Dies passt zumindest qualitativ zum Profil des dritten Peaks, der die bislang unbekannte Aminopeptidase enthielt (Abbildung 24 und Abbildung 29) und auch zur Aufreinigung mit magnetischen Co^{2+} -Beads (Abbildung 42).

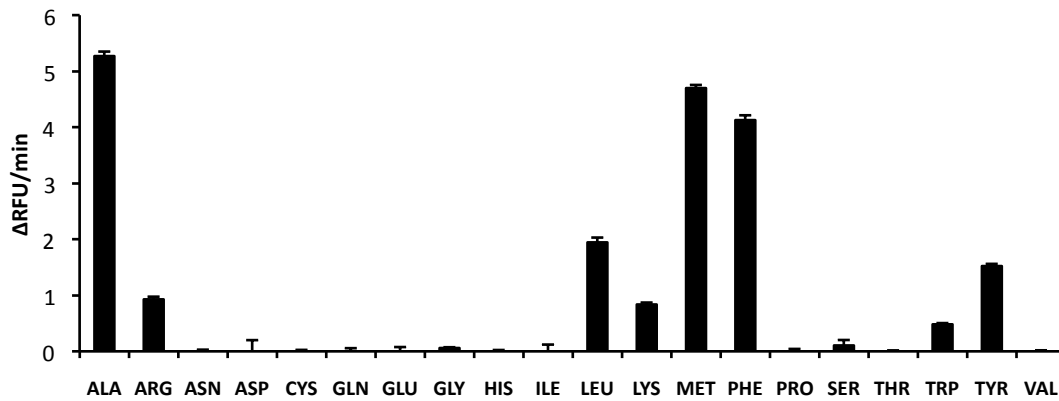


Abbildung 44: Aminopeptidase-Aktivität der Fraktion "MonoQ Peak 2". Gezeigt sind die Mittelwerte dreier technischer Replikate +/- Standardabweichung.

Wie im Coomassie gefärbten Gel zu sehen ist, verunreinigen weitere unbekannte Proteine die Fraktion. Aus diesem Grund wurde der AMC-Assay mit verschiedenen Protease Inhibitoren und einem Proteasom-spezifischen Substrat (Succinyl-LLVY-AMC) wiederholt (Abbildung 45). Auf diese Weise kann ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Aktivität aus einer kontaminierenden Protease resultiert. PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) ist ein Serin/Cystein-Protease Inhibitor, der zum Beispiel Trypsin und Chymotrypsin irreversibel inhibiert. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, hat die Zugabe dieses Inhibitors keinen Einfluss auf die beobachtete Aktivität. Lactacystin (LC) ist ein irreversibler Proteasom Inhibitor. Auch die Zugabe von Lactacystin hatte keinen Einfluss auf die beobachtete Aminopeptidase-Aktivität. Succinyl-LLVY-AMC (ein N-terminal blockiertes Tetrapeptid, das vom Proteasom nach dem Tyrosin geschnitten wird) wurde in keinem Ansatz umgesetzt.

ERMP1 ist eine Zink-abhängige Aminopeptidase und sollte durch die Zugabe von EDTA inhibiert werden. Die Zugabe des Komplex-bildenden EDTA, das zweifach positive Kationen bindet, verringert je nach untersuchter Aminosäure die Aktivität um 30-60 %. Somit kann die beobachtete Aktivität dem rekombinanten ERMP1 zugeordnet werden.

ERMP1 schneidet also vor allem Alanin, die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Methionin und Tyrosin und außerdem Leucin.

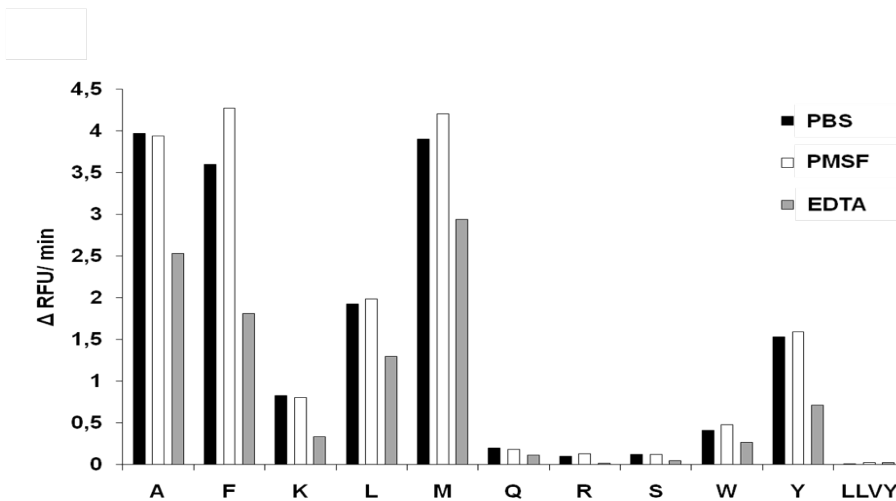


Abbildung 45: Amino-peptidase-Aktivität der Fraktion „MonoQ Peak 2“ mit verschiedenen Inhibitoren und dem Proteasom Substrat Succinyl-LLVY-AMC

3.5.8 Klonierung von ERMP1 für die Expression in Insektenzellen durch Baculoviren

Da auch aus dem RAW309 Klon 40C6 noch nicht genügend rekombinantes Protein und vor allem reines Protein gewonnen werden konnte, wurde die ERMP1 Protein-kodierende Sequenz mit einem C-terminalen His-Tag aus dem pcDNA3.1(+) Vektor in den pVL1393 Baculovirus-Expressionsvektor umklontiert. Baculoviren haben den Vorteil, dass sie die hohe Proteinexpression von Bakterien mit der Fähigkeit der Säugerzellen zur Protein-Glykosylierung kombinieren. Das System ist hervorragend geeignet, um komplexe membrangebundene Proteine, die posttranslationell modifiziert werden müssen, zu exprimieren. Da vor allem die Größe und die sieben Transmembrandomänen des gesamten ERMP1-Proteins die Expression erschweren sollten, wurde zudem die ERMP1 ER-Domäne mit C-terminalem Strep-Tag aus dem bakteriellen Expressionsvektor pASK-IBA2 in den pVL1393 Vektor umklontiert und zusätzlich eine N-terminale Melittin-Signalpeptid hinzugefügt. Die Melittin-Sequenz ermöglicht eine Sekretion von löslichen Proteinen in das Zellkulturmedium⁸⁵. Abbildung 46 gibt einen schematischen Überblick über die generierten Baculovirus Expressionskonstrukte.

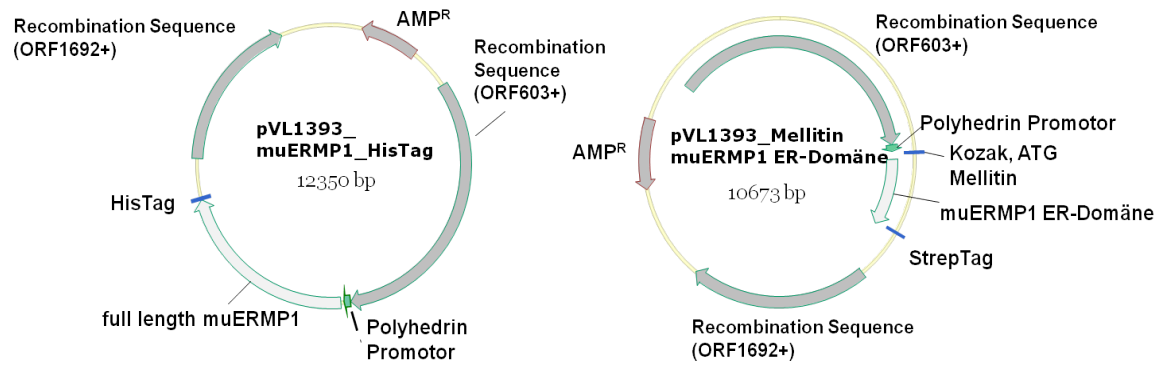


Abbildung 46: Schematische Darstellung der zwei generierten pVL1393 Baculovirus Expressionskonstrukte. Links gesamtes ERMP1₍₁₋₈₉₈₎ mit C-terminalem His-Tag, rechts die ER-Domäne ERMP1₍₈₈₋₃₉₃₎ mit C-terminalem Strep Tag und N-terminalem Melittin Signal-Peptid.

Zunächst wurden die rekombinanten Virusklone via PCR auf die homologe Rekombination der kodierenden Sequenzen überprüft. Dabei wurde ein Primer in die „recombination sequence“ gelegt, der zweite in das Insert, sodass nur homolog rekombinierte Baculoviren ein PCR-Signal ergaben. Diese Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Peter van Endert (Faculté de Médecine René Descartes, Paris) durchgeführt. Aus jeweils einem positiven Klon wurde ein „high titer“ Virus hochgezogen, mit dem *Spodoptera frugiperda* (Sf9) Zellen in FCS-freiem Medium infiziert wurden.

Abbildung 47 zeigt das mit Coomassie gefärbte Gel und den ERMP1 Western Blot der Aufreinigung der ER-Domäne (36 kDa). Man sieht, dass das rekombinante Protein stark exprimiert wird. Teilweise wird es in das Zellkulturmedium sezerniert, viel Protein ist aber auch noch im Zellpellet eingeschlossen (Spur ganz rechts). Der Mediumüberstand wurde über eine Strep-Taktin Macroprep-Säule gegeben. Aufgrund des pH Wertes von 8, der aber für die Bindung an die Säule benötigt wird, fiel eine große Menge Protein im Durchfluss aus, das Pellet enthielt aber kaum rekombinantes Protein, welches in der Fraktion E2 eluiert. Der Aktivitäts-Assay zeigte keinerlei Aminopeptidase-Aktivität in dieser Fraktion. Vermutlich kann die kurze Form ihre Tertiärstruktur nicht korrekt ausbilden, unabhängig davon, ob sie in Bakterien- oder Insektenzellen exprimiert wird.

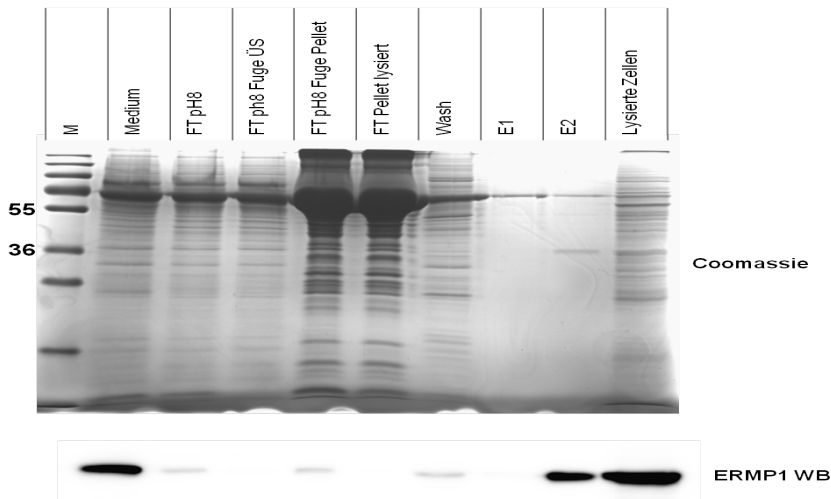


Abbildung 47: Coomassie gefärbtes SDS-PAGE Gel und Western Blot gegen ERMP1 der Strep-Tag Aufreinigung der ER-Domäne (36 kDa) aus infizierten Sf9 Zellen (FT: Säulendurchfluss).

Es wurden deshalb auch Sf9 Zellen mit dem zweiten Virus infiziert, der das gesamte Protein mit c-terminalem His Tag exprimiert. Abbildung 48 zeigt den Western Blot dieser Aufreinigung. Die Zellen wurden in Equilibrierungspuffer mit 1 % Triton-X, 1 % 1 % *n*-octyl- β -D-glucosid und 1 % CHAPS lysiert. Das rekombinante Protein, das sich zunächst in Lösung befand konnte jedoch auch durch die Zugabe dieser Detergenzien in Lösung gehalten werden und fiel unabhängig vom pH Wert des Puffers nach wenigen Minuten aus. Die Größe der rekombinanten Bande von über 250 kDa im Pellet nach Lyse der Sf9 Zellen spricht ebenfalls für die Akkumulation falsch gefalteten Proteins.

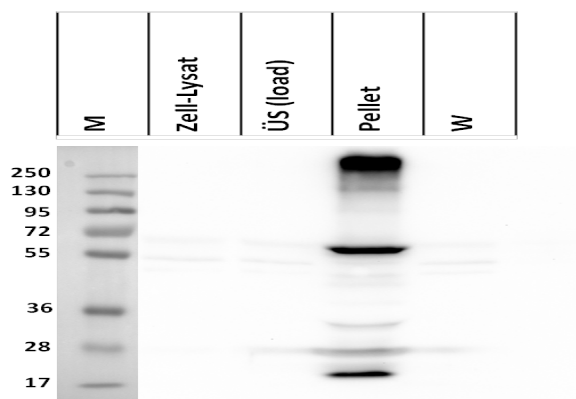


Abbildung 48: ERMP1 Western Blot der Aufreinigung von ERMP1₍₁₋₈₉₈₎ aus Sf9 Zellen.

3.5.9 Einfluss von ERMP1 auf die MHC I Expression

3.5.9.1 Einfluss auf die globale MHC I Expression auf der Zelloberfläche

Um zu untersuchen, welche Auswirkung eine veränderte Expression von ERMP1 auf die globale Präsentation der MHC Klasse I Moleküle hat, wurde die komplette kodierende Sequenz aus dem pcDNA3.1(+) Vektor in den eukaryotischen Expressionsvektor pIRES2_eGFP Vektor umkloniert. Der Vorteil dieses Vektors ist, dass seine „internal ribosome entry site“ (IRES) die bicistronische Expression des Zielgens und des „enhanced green fluorescent proteins“ (eGFP) erlaubt. Auf diese Weise ist es möglich, ausschließlich die ERMP1 überexprimierenden Zellen im FACS zu untersuchen. Um möglichst viele MHC I Haplotypen untersuchen zu können, wurden die drei Zelllinien EL4 (H2-K^b, H2-D^b), RAW309 (H2-K^d, H2-D^d und H2-L^d) sowie E.G7-OVA (H2-K^b/SIINFEKL) mit dem Expressionsvektor und dem Leervektor als Kontrolle transfiziert. Am Tag zwei nach Transfektion wurden die Zellen mit biotinylierten, Haplotyp-spezifischen Antikörpern und sekundär mit Streptavidin-APC (Allophycocyanin) gefärbt. Die E.G7 Zellen wurden mit aufgereinigtem 25-D1.16 Hybridom-Überstand (erkennt SIINFEKL in Assoziation mit H2-K^b) und sekundär mit goat- α -mouse-APC gefärbt. Bei der FACS Messung wurden nur die Propidiumiodid (PI) negativen (das heißt die lebenden) und eGFP positiven Zellen ausgewählt und gemessen.

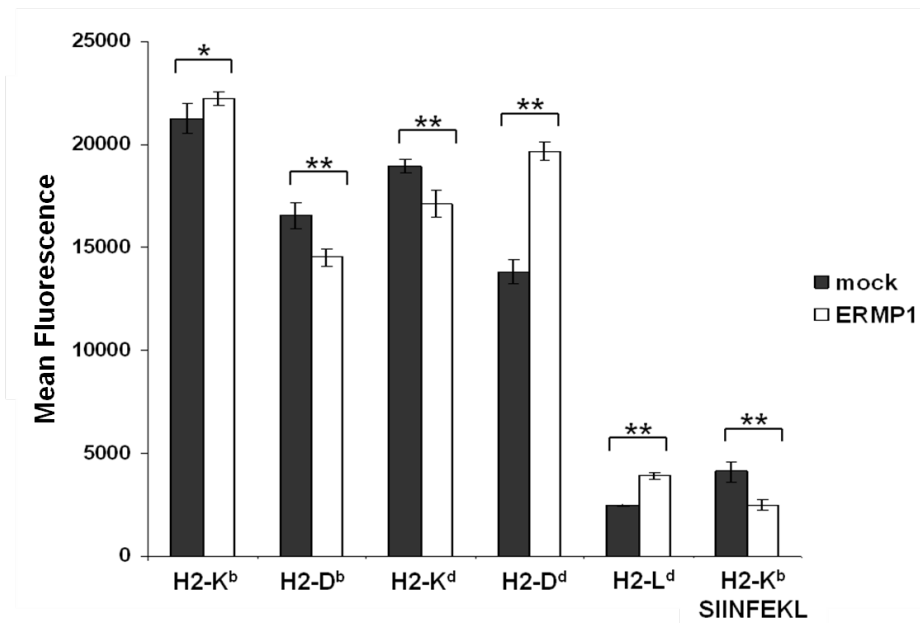


Abbildung 49: MHC Klasse I Expression verschiedener Zell-Linien mit Überexpression von ERMP1. EL4: H2-K^b und H2-D^b, RAW309: H2-K^d, H2-D^d und H2-L^d, E.G7: H2-K^b [SIINFEKL]. Schwarz: Leervektor Kontrolle, weiß: ERMP1 Überexpression. Gezeigt sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung aus fünf biologischen Replikaten aus einem von zwei repräsentativen Versuchen.

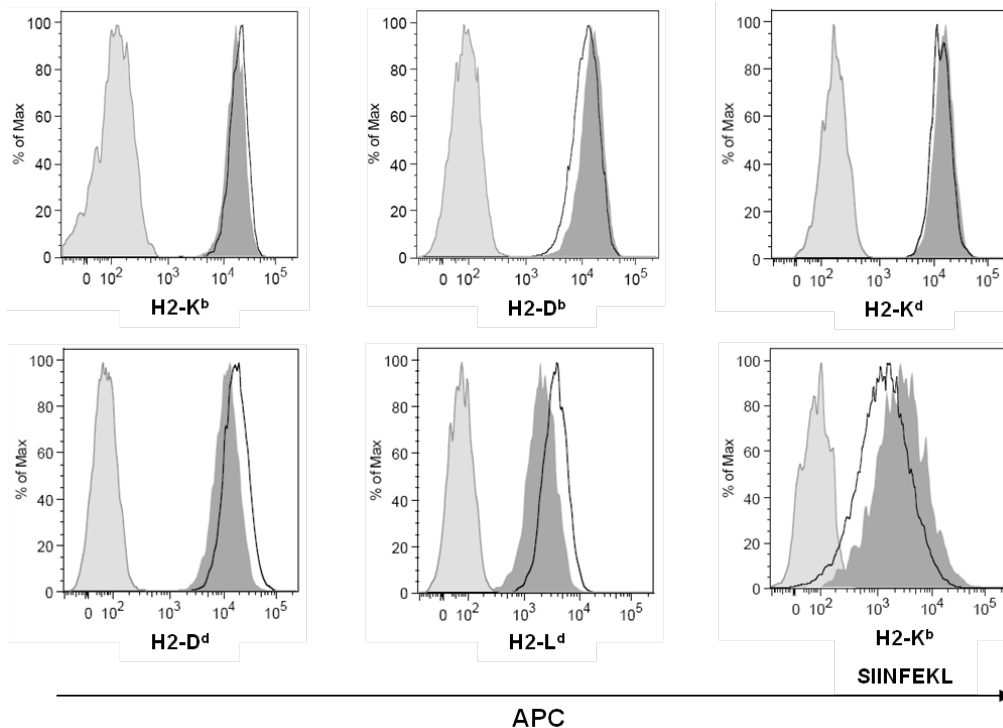


Abbildung 50: Zu Abbildung 49 korrespondierende überlagerte Histogramm für die verschiedenen MHC Klasse I Haplotypen. Helles grau: Sekundärkontrolle, dunkles Grau: mock, schwarze Linie: ERMP1 Überexpression.

Abbildung 49 zeigt die MHC Klasse I Expression der verschiedenen Zelllinien mit ERMP1 Überexpression im Vergleich zu den mit Leervektor (mock) transfizierten Zellen. Gezeigt ist eines von zwei repräsentativen Experimenten mit fünf biologischen Replikaten. Abbildung 50 zeigt die korrespondierenden FACS Daten als überlagerte Histogramme. In hellem Grau das Histogramm der Sekundärkontrolle zur Bestimmung der unspezifischen Bindung des Streptavidin-APC Antikörpers, in dunklem Grau das Histogramm der mit Kontrollvektor transfizierten Zellen und als schwarze Linie die ERMP1 überexprimierenden Zellen.

Die Überexpression von ERMP1 beeinflusst die MHC I Expression in Haplotyp-spezifischer Weise. So wird zum Beispiel die Expression von H2-D^b vermindert, es werden also Epitope so weit getrimmt, dass sie zu kurz für die Präsentation sind. Die Expression von H2-D^d hingegen wird durch die Überexpression der Aminopeptidase gesteigert, durch die Überexpression werden also H2-D^d restringierte Epitope effizienter generiert.

SIINFEKL ist ein H2-K^b restringiertes Epitop aus Ovalbumin und wird von den stabil transfizierten E.G7-Zellen in Verbindung mit diesem MHC I Haplotyp auf der Zelloberfläche präsentiert. Die Generierung dieses Epitops wird durch die Überexpression von ERMP1 verringert. ERMP1 scheint also sowohl Epitope zu generieren, als auch Epitope zu zerstören.

3.5.9.2 Einfluss von ERMP1 auf die Präsentation von H2-K^b/SIINFEKL

Um die Expression von SIINFEKL bei veränderter ERMP1 Expression näher zu untersuchen, wurde ein in unserem Institut etablierter pIRES2_eGFP Vektor modifiziert. Der Vektor exprimiert N-terminal verlängerte Minigene des SIINFEKL Epitops. Unter der Kontrolle des CMV Promotors beginnt die Proteintranskription beim ATG des Ubiquitins und das Influenza NP₍₃₆₆₋₃₇₄₎ Epitop ASNENMETM wird zusammen mit dem N-terminal verlängerten Ovalbumin₍₂₅₇₋₂₆₄₎ Epitop SIINFEKL exprimiert. Durch die anschließende IRES Sequenz erfolgt eine bicistronische Expression des eGFP-Proteins. Außer der Originalsequenz mit Glu (E) an P-1 wurden Konstrukte generiert, die die Aminosäure-Präferenzen von ERMP1 widerspiegeln, nämlich mit den Aminosäuren Ala (A), Phe (F) und Tyr (Y) an Position P-1. Aus den Konstrukten werden durch das Proteasom im Cytosol der Zelle die SIINFEKL Epitope als N-terminal verlängerte Vorläufer-Epitope gebildet (siehe auch 2.12.3 RAP („reverse analysis of processing“) Konstrukte).

Da das Epitop SIINFEKL H2-K^b restringiert ist wurden für die Versuche EL4-Zellen zunächst mit Konstrukten für die ERMP1-Überexpression oder den „knockdown“ und mit den entsprechenden Kontrollen transfiziert. Um stabile Kulturen zu erhalten wurden die transfizierten Zellen mit Antibiotika selektiert. Dabei wurde für die Überexpression (pcDNA3.1(+) und pcDNA3.1_ERMP1) 800 µg/ml G418 zugegeben und für den „knockdown“ (scramble shRNA und ERMP1 spezifische shRNA) 4 µg/ml Puromycin. Die benötigten Antibiotikakonzentrationen wurden in Vorversuchen durch eine „killing curve“ ermittelt, bei der Wildtyp EL4-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der entsprechenden Antibiotika kultiviert wurden. Gewählt wurde die minimale Konzentration, bei der alle nicht transfizierten Zellen nach sechs Tagen starben (Daten nicht gezeigt).

Um den „knockdown“ bzw. die Überexpression zu verifizieren, wurden zunächst Western Blots mit den stabilen Kulturen durchgeführt. Abbildung 51 zeigt die Western Blots für die Überexpression (links) und den „knockdown“ (rechts) von ERMP1. Es wurden gleiche Zellzahlen aufgetragen und zusätzlich als Ladekontrolle ein Blot gegen β-Aktin durchgeführt.

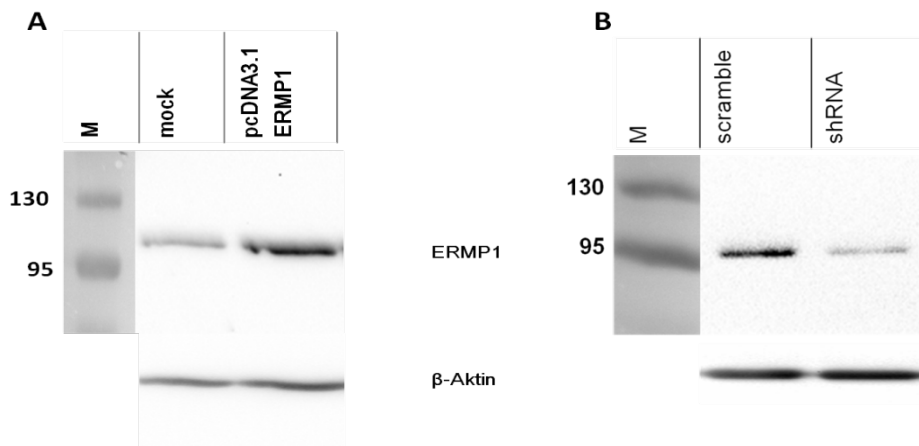


Abbildung 51: ERMP1 Western Blots der stabil transfizierten EL4 Kulturen. Links: EL4 transfiziert mit pcDNA3.1_ERMP1 und dem Leervektor als Kontrolle (mock), rechts: EL4 transfiziert mit ERMP1 spezifischer shRNA und scramble shRNA als Kontrolle. Es wurden $0,5 \cdot 10^6$ Zellen lysiert und aufgetragen. Western Blot gegen β -Aktin (42 kDa) als Ladekontrolle.

Die stabilen Kulturen wurden dann einzeln mit den vier RAP-Konstrukten transfiziert und zwei Tage nach Transfektion mit aufgereinigtem Hybridom-Überstand 25-D1.16 und sekundär mit goat- α -mouse-APC gefärbt.

Abbildung 52 zeigt die „gating strategy“ der FACS-Messung. Nachdem die EL4-Zellpopulation im FSC/SSC („forward scatter“ und „side-scatter“) ausgewählt wurde, wurden alle toten Zellen verworfen, indem auf die PI negativen (das heißt lebenden) Zellen gated wurde. Von den lebenden Zellen wurden nur diejenigen betrachtet, die im eGFP-Kanal positiv waren (hier 12,7% der lebenden Zellen), das heißt nur solche Zellen, die das RAP Konstrukt auch exprimieren. Die Fluoreszenz dieser Zellen wurde im APC-Kanal gemessen und durch die Auswertung mit der FlowJo 8.8.6 Software die Mittelwerte des Quotienten von APC/eGFP bestimmt. Der Quotient ist ein Maß für die SIINFEKL-Epitope (APC), die aus den exprimierten Vorläufer-Epitopen (eGFP) generiert werden können.

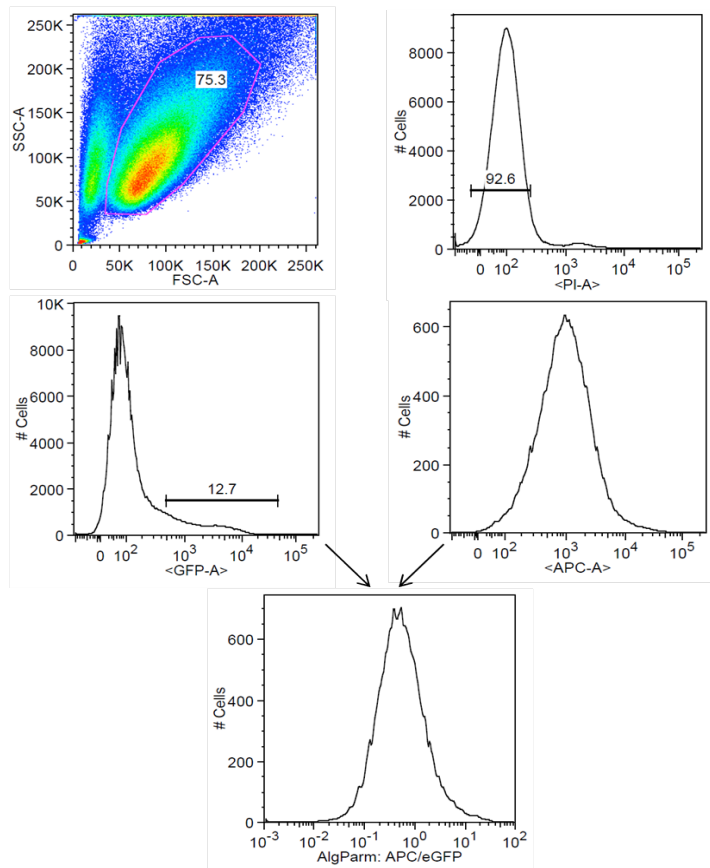


Abbildung 52: „gating strategy“ der FACS Messung und Auswertung der Daten der RAP transfizierten stabilen EL4 Kulturen mit veränderter ERMP1 Expression mittels des Quotienten von APC/eGFP.

Abbildung 53A zeigt die SIINFEKL Expression der stabilen „knockdown“ Kulturen im Vergleich zu den mit scramble shRNA transfizierten EL4-Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte von je vier stabilen Kulturen, die einzeln mit den verschiedenen RAP-Vektoren transfiziert wurden. Die SIINFEKL Expression wird durch ERMP1 „knockdown“ erhöht, unabhängig von der Sequenz des transient transfizierten RAP-Konstruktes. Allerdings ist der Effekt je nach Aminosäure an Position P-1 mehr oder weniger deutlich. Je nach Aminosäure an Position P-1 erhöht sich die Expression des Ovalbumin-Epitops um 61 % (Phenylalanin), 52 % (Alanin), 48 % (Tyrosin). Bei der Original-Sequenz mit Glutaminsäure (E) an P-1 sind es nur 39 %. Dies spiegelt die Aminosäure-Spezifität der untersuchten Aminopeptidase ERMP1 wieder, die wie in Abbildung 45 gezeigt vor allem Alanin und Phenylalanin schneidet, Tyrosin weniger und Glutamin praktisch nicht. In den überlagerten Histogrammen (Abbildung 53B) ist dieser Effekt noch deutlicher zu sehen, die Verschiebung der Histogramme mit Glutaminsäure ist am wenigsten ausgeprägt, bei Phenylalanin ist der Effekt am größten. Auffällig ist, dass die SIINFEKL Expression an sich bei den RAP Konstrukten mit aromatischen Aminosäuren an P-1 (Phe und Tyr) in etwa nur zwei Drittel der Expression mit Glutamin oder Alanin an Position P-1 beträgt.

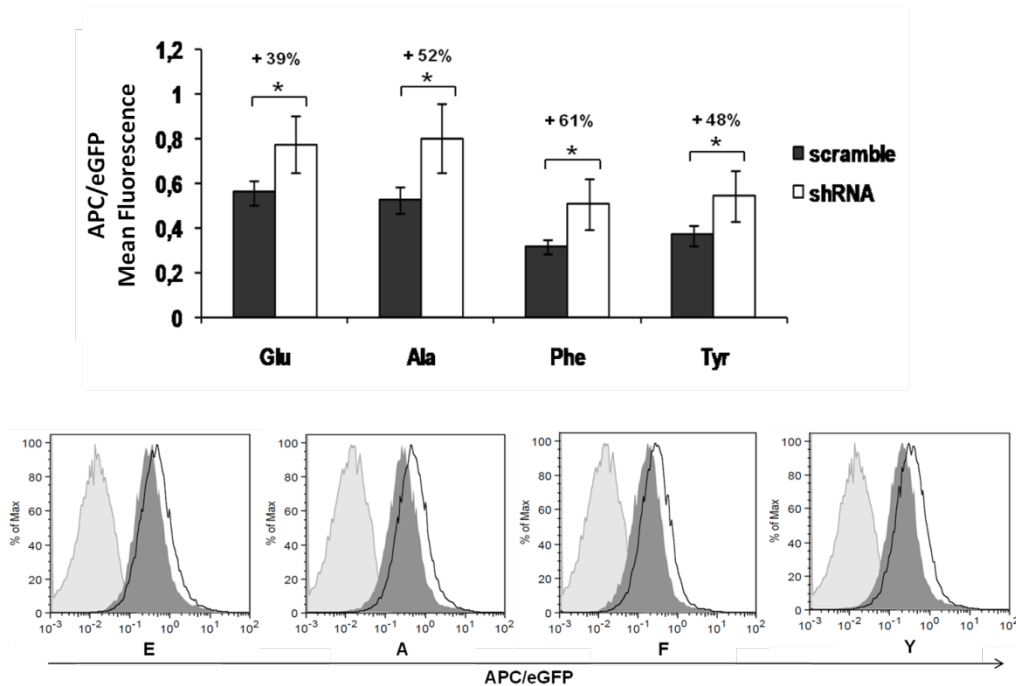


Abbildung 53: SIINFEKL-Expression der stabilen „knockdown“ Kulturen im Vergleich zu den scramble-shRNA transfizierten EL4-Zellen. (A) Mittelwerte des Quotienten von APC/eGFP von jeweils vier Kulturen (* = $p < 0,05$). (B) Representative FACS Rohdaten als überlagerte Histogramme. Helles Grau: Sekundär-Kontrolle, dunkles Grau: scramble-shRNA, schwarze Linie: ERMP1 „knockdown“.

Als Kontrolle wurde dieses Experiment auch mit den stabilen ERMP1 überexprimierenden EL4-Kulturen durchgeführt. Aus Abbildung 54 wird ersichtlich, dass die Überexpression von ERMP1 den gegenteilige Effekt auf die SIINFEKL Expression hat, wie der „knockdown“. Die Überexpression verringert die SIINFEKL-Expression aus den Minigenkonstrukten unabhängig von der Sequenz des transfizierten RAP-Konstruktes. Dieses Ergebnis bestätigt auch das in Abbildung 49 gezeigte Ergebnis der transienten Überexpression von ERMP1, welche auch die Generierung und Präsentation von SIINFEKL in E.G7-Zellen aus dem gesamten Ovalbumin verringert.

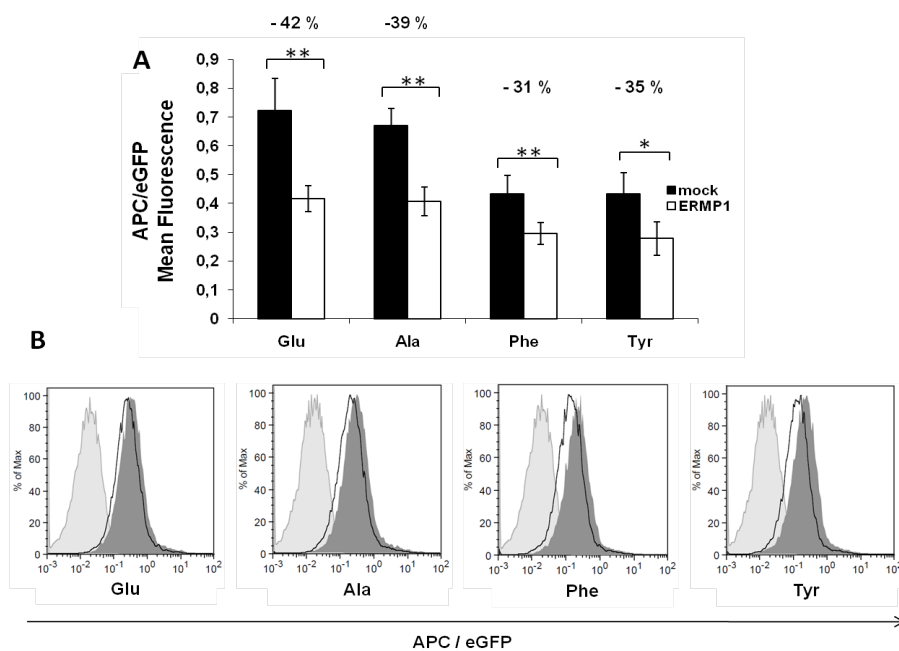


Abbildung 54: SIINFEKL-Expression bei stabiler Überexpression von ERMP1 im Vergleich zu Leervektor transfizierten EL4-Zellen. (A) Mittelwerte des Quotienten von APC/eGFP von jeweils fünf Kulturen (* = $p < 0,05$, ** = 0,005). (B) Representative FACS Rohdaten als überlagerte Histogramme. Helles Grau: Sekundär-Kontrolle, dunkles Grau: Leervektor, schwarze Linie: Überexpression von ERMP1.

4. Diskussion

Der Spezifität der Aminopeptidasen, die in den an der Antigen-Prozessierung beteiligten Kompartimenten der Zelle (Cytosol und ER) lokalisiert sind, spiegelt sich in den jeweiligen Umsatzraten der N-terminalen Aminosäuren wieder. In Relation zum Cytosol birgt das endoplasmatische Retikulum sowohl in Ausmaß, als auch in der Anzahl der im Kompartiment lokalisierten Proteasen wenig proteolytische Aktivität⁸⁰. Bisher wurde in der Maus eine (ERAAP), im Menschen zwei eng verwandte (ERAP1 und ERAP2) Aminopeptidasen beschrieben, wobei ERAAP und ERAP1 homologe Enzyme darstellen. In Mikrosomen der Maus werden hauptsächlich Leucin-, Methionin-, Lysin- und Arginin-Reste entfernt. Außerdem können Phenylalanin-, Alanin-, Cystein- und Tyrosin-Reste geschnitten werden (siehe Abbildung 21 und Abbildung 22). Betrachtet man jedoch die Spezifität von ERAAP (Leucin, Methionin und Cystein, siehe Abbildung 23 und⁴⁶) wird klar, dass es auch im murinen System noch eine oder mehrere zusätzliche Aminopeptidasen in diesem Kompartiment geben muss. Schon in früheren Arbeiten konnten in den Mikrosomen der Ratte nach Auftrennung mittels Anionentauscher-Chromatographie drei Peaks beobachtet werden, die Aktivität gegen Aminosäuresubstrate (Leucin-AMC, Arginin-AMC) oder N-terminal verlängerte Vorläuferepitope zeigten²⁴. In ähnlichen Versuchen mit humanen B-Zell Mikrosomen konnten vier Peaks identifiziert werden, von denen der letzte nur in Gegenwart von Detergenzien eluierte, Leucin schneiden konnte und durch IFN- γ induzierbar war⁴⁴.

In dieser Arbeit konnten nach Verringerung der Komplexität der Mikrosomen-Fraktion durch chromatographische Auftrennung und native Gelelektrophorese zwei weitere Vertreter der membrangebundenen Aminopeptidasen der Maus identifiziert werden, die „insulin regulated aminopeptidase“ (IRAP) und die „endoplasmic reticulum metalloprotease 1“ (ERMP1).

Die Funktion von IRAP wurde in Adipocyten und Muskelzellen am besten untersucht, wird aber in den meisten Geweben exprimiert^{86;87}. Das Homolog der „placental leucine aminopeptidase“, (P-LAP) ist ein Zn^{2+} -abhängiges, membranständiges Enzym und wie ERAP1 und ERAP2 ein Mitglied der M1 Familie der Aminopeptidasen. IRAP werden viele verschiedene Funktionen zugeschrieben⁸⁸. *In vitro* degradiert es verschiedene Peptid-Hormone wie Bradykinin, Vasopressin oder Oxytocin⁸⁹. Mit Hilfe von IRAP defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass Vasopressin ein physiologisches Substrat von IRAP darstellt. Obwohl IRAP in dieser Arbeit in den durchgeführten Mikrosomen-Präparationen identifiziert werden konnte, liegt es in der Zelle nicht im endoplasmatischen Retikulum vor, sondern zusammen mit dem Glucose-Transporter Glut4 in speziellen endosomalen Vesikeln. Nach Aktivierung

durch Insulin translozieren diese Vesikel an die Zelloberfläche und fördern so die Aufnahme von Glukose in die Zelle und auch die proteolytische Aktivität an der Zelloberfläche⁹⁰. IRAP defiziente Mäuse weisen eine verminderte Glut4 Expression auf, haben eine gestörte Glukose-Aufnahme in Muskel- und Fettzellen, zeigen aber keine veränderte Glukose-Homöostase^{91;92}. Erst vor Kurzem konnte gezeigt werden, dass IRAP auch bei der Antigen-Prozessierung für MHC I Moleküle involviert ist⁸¹. Dabei spielt IRAP bei der klassischen, direkten Präsentation keine Rolle, aber beeinflusst die „cross-presentation“ von exogenen Proteinen auf MHC I. Knockdown der IRAP Expression reduziert die Präsentation von SIINFEKL aus exogen aufgenommenem Ovalbumin *in vitro* und *in vivo*⁸¹. IRAP schneidet bevorzugt Arginin und Lysin, aber wie ERAAP auch Leucin und Methionin, jedoch in geringerem Maße⁸⁹ (Abbildung 28).

ERMP1 komplettiert nach den Ergebnissen dieser Arbeit die beobachtete Aminopeptidase-Aktivität muriner Mikrosomen und schließt die Lücke für Alanin, Phenylalanin und Tyrosin (Abbildung 29). ERMP1 (FxnA) wurde erst kürzlich beschrieben, die einzige Publikation zeigt die Notwendigkeit des bislang hypothetischen Enzyms für die strukturelle Organisation der Eierstöcke bei Nagern⁸². Die Ergebnisse der Autoren lassen vermuten, ERMP1 prozessiere Proteine, die in Signalwegen für die Organisation von somatischen Zellen und Oocyten in Ovarialfollikel von Bedeutung sind. Bei der Entwicklung der Ovarien, die bei der Ratte 48 h nach Geburt beginnt, konnte eine erhöhte mRNA Translation beobachtet werden, die nach Beendigung des Entwicklungsprozesses an Tag sechs wieder auf ein niedrigeres Level reguliert wurde. Im Gegenzug bewirkt die durch siRNA knockdown vermittelte Ausschaltung des Enzyms die Bildung von pathologischen Zellaggregaten und einen allgemeinen Verlust der normalen Organisation der Ovarien. Diese Aminopeptidase ist wie Aminopeptidase S (*Streptomyces griseus*) Mitglied der M28 Familie der Metallopeptidasen⁹³. Jedes Zink-Ion ist durch 3 Aminosäuren und ein H₂O Molekül tetraedrisch koordiniert, wobei ein Aspartat beide Zink-Ionen bindet. ERMP1 durchspannt die Membran des endoplasmatischen Retikulums insgesamt sieben Mal, die proteolytisch aktive Domäne liegt wie die Zn²⁺-bindende Region im Lumen des ER (siehe Abbildung 30).

Um die Spezifität von ERMP1 mit synthetischen Aminosäure-Substraten und schließlich auch mit N-terminal verlängerten Epitop-Vorläufern näher untersuchen zu können, sollte das Enzym in einem geeigneten System überexprimiert und anschließend aufgereinigt werden. Die Überexpression und nachfolgende Aufreinigung rekombinanter Multi-Transmembran-Proteine ist eine herausfordernde Aufgabe. Um rekombinante Proteine für strukturelle Untersuchungen oder biochemische Charakterisierung einsetzen zu können, werden sie im Milligramm-Maßstab und in genügender Reinheit benötigt. Im Gegensatz zu löslichen Proteinen, die oft auch unter nichtphysiologischen Bedingungen in Lösung bleiben, erschweren die stark hydrophoben integralen Domänen eines

Membranproteins sowohl die Überexpression, als auch die korrekte Faltung des Proteins. Infolgedessen kommt es zur Einbuße der nativen Tertiärstruktur, der Bildung von Aggregaten und dem Verlust der enzymatischen Aktivität. Die hydrophobe Natur integraler Membran-Proteine erhöht auch den Verlust während der Aufreinigung, die Zugabe von Detergenzien zu den verwendeten Puffern kann diesem entgegenwirken^{94;95}.

Es stehen verschiedene Systeme zur heterologen Proteinexpression zur Verfügung. Eine Übersicht gibt Tabelle 11. Am gebräuchlichsten ist die Überexpression in *E.coli*. Die prokaryotischen Zellen wachsen schnell und in kostengünstigen Medien und es existieren eine Vielzahl an induzierbaren Vektoren und genetisch veränderten Bakterienstämmen. Die Expression von biologisch aktiven Säuger-Proteinen in Prokaryoten wird durch fehlende posttranslationale Modifikationen (PTMs), insbesondere von Glykosylierungen erschwert und oft treten sogenannte „inclusion bodies“ auf. Dies sind Aggregate aus falsch gefalteten Proteinen, die erst aufwändig denaturiert und zurückgefaltet werden müssen, um ihre native Struktur zurückzuerhalten⁹⁶. Auch bei der Expression der 305 AS großen ERMP1 ER Domäne, die ohne Transmembran-Domänen als lösliches Protein exprimiert werden sollte, lag das gesamte rekombinante Protein in *E.coli* in „inclusion bodies“ vor (Abbildung 32). Nach Denaturierung durch Harnstoff und Zurückfaltung konnte das Protein zwar in Lösung gebracht werden, es war jedoch keinerlei Aktivität messbar (Abbildung 33). Der Verlust der Aktivität kann auf mehrere Ursachen zurückgeführt werden. Zunächst ist es möglich, dass die Struktur der ER-Domäne durch die restlichen Aminosäuren stabilisiert wird, und es nicht möglich ist, nur ein Teilstück des Proteins in nativem Zustand zu generieren. Außerdem könnte die fehlende Phosphorylierung und Glykosylierung in Prokaryoten zu einer Konformationsänderung führen, die sich negativ auf die proteolytische Aktivität des Enzyms auswirkt.

Das zweite System, das in dieser Arbeit zur Expression von ERMP1 verwendet wurde, war das Sf9/Baculovirus System. *Spodoptera frugiperda*-Zellen werden mit homolog rekombinierten Baculoviren transduziert und es kommt zur massiven Expression des heterologen Proteins. Vorteile dieses Expressionssystems sind die hohe Transduktionseffizienz der Viren und die für gewöhnlich hohen Expressionsraten rekombinanter Proteine (25-50 % des Zell-Gesamtproteins)⁹⁷. Desweiteren bieten die Insektenzellen den Säuger-Zellen ähnliche Glykosylierung, Phosphorylierung und Faltung der Proteine⁹⁸. Daher, und weil beide bisher bekannten ER-residenten Aminopeptidasen (ERAP1/ERAAP⁹⁹, ERAP2⁴⁴) und auch IRAP⁸¹ im Sf9/Baculovirus System aktiv exprimiert werden konnten, wurden zusätzlich die beiden Baculovirus-Expressionskonstrukte (ERMP1₍₁₋₈₉₈₎ und ERMP1₍₈₈₋₃₉₃₎) generiert. Um die Aufreinigung zu erleichtern, wurde die ERMP1 ER-Domäne mit einer Melittin Signalsequenz versehen, die die Sekretion des löslichen Proteins in den Zellkulturüberstand ermöglichen soll⁸⁵. Die ER-Domäne wurde zwar stark exprimiert und auch sekretiert, war aber wie

auch schon in *E. coli* enzymatisch nicht aktiv (Abbildung 47). Das Protein benötigt also vermutlich eine komplexe Tertiärstruktur, die von der aktiven Domäne allein nicht gebildet werden kann. Auch mit dem zweiten Expressionskonstrukt (ERMP1₁₋₈₉₈), das für die komplette Sequenz des murinen Enzyms kodiert, konnte eine starke Expression des rekombinanten Proteins in Sf9 Zellen beobachtet werden, das Protein konnte jedoch auch durch die Zugabe hochkonzentrierter Detergenzien nicht in Lösung gehalten werden und akkumulierte (Abbildung 48).

Tabelle 11: Überblick über die gebräuchlichsten Expressionssysteme für rekombinante Proteine⁹⁸.

Characteristics	<i>E. coli</i>	Yeast	Insect cells	Mammalian cells
Cell growth	rapid (30 min)	rapid (90 min)	slow (18-24 h)	slow (24 h)
Complexity of growth medium	minimum	minimum	complex	complex
Cost of growth medium	low	low	high	high
Expression level	high	low - high	low - high	low - moderate
Extracellular expression	secretion to periplasm	secretion to medium	secretion to medium	secretion to medium
Protein folding	refolding usually required	refolding may be required	proper folding	proper folding
N-linked glycosylation	none	high mannose	simple, no sialic acid	complex
O-linked glycosylation	no	yes	yes	yes
Phosphorylation	no	yes	yes	yes
Acetylation	no	yes	yes	yes
Acylation	no	yes	yes	yes
gamma-Carboxylation	no	no	no	yes

Zuletzt blieb nur die Expression des gesamten Proteins in Säugerzellen. Stabil exprimierende Säuger-Zelllinien sind nur schwer zu generieren. Nach der Transfektion wurden die RAW309-Zellen einem Selektionsdruck ausgesetzt und stabil transfizierte Zellen durch limitierende Verdünnungsreihen vereinzelt. Die erhaltenen rekombinanten Zelllinien mussten im Western Blot auf die Überexpression von ERMP1₍₁₋₈₉₈₎ überprüft werden. Wie aus Abbildung 41 ersichtlich wird, wurde das rekombinante ERMP1 Protein trotz vorhandener Resistenz nur in einem Teil der Einzelzellklone überexprimiert. Die Menge des exprimierten Proteins ist im Vergleich zu Bakterien- oder Insektenzellen sehr gering, aber nur in Säuger-Zellen konnte die native Form des Proteins generiert werden und es kam zu keiner Aggregatsbildung. Das enzymatisch aktive Protein konnte nach mehreren chromatographischen Schritten angereinigt werden, die Aktivität des Enzyms deckt sich gut mit der in der Mikrosomen Präparation beobachteten Aktivität in Peak III (Abbildung 24 und Abbildung 44). ERMP1 zeigt im Vergleich zu ERAP1 eine geringere enzymatische Aktivität, jedoch ein breiteres Spektrum von umgesetzten Aminosäuren. Für eine größere Menge Enzyms, das zum Verdau von Epitop-Vorläufern

genutzt werden könnte, müssten z.B. A20 Zellen (ein murines B-Zell Lymphom) stabil transfiziert und vereinzelt werden, die wie Insektenzellen in Suspension gezogen werden können.

Obwohl die in *E. coli* exprimierte ERMP1 ER-Domäne enzymatisch nicht aktiv war, konnte das gereinigte Protein im Folgenden zur Immunisierung von Kaninchen genutzt werden. Der in Kaninchen generierte polyklonale und anschließend affinitätsgereinigte Antikörper ermöglichte es, sowohl die intrazelluläre Lokalisation von ERMP1 im Fluoreszenz-Mikroskop, als auch die Expression des Proteins im Western Blot genauer zu untersuchen. Im Gegensatz zur Gruppe um Ojeda, die die intrazelluläre Lokalisation des Enzyms mit einem Flag-Tag fusionierten, rekombinanten Protein untersuchten, konnte in dieser Arbeit auch die Lokalisation des endogenen Proteins im endoplasmatischen Retikulum bestätigt werden. Im Fluoreszenz-Mikroskop zeigt die Färbung die typische netzartige Struktur um den Nukleus. ERMP1 kolokalisiert fast vollständig mit den anderen ER-residenten Komponenten des MHC Klasse I Prozessierungs-Weges, nämlich TAP und endosomalen MHC I Molekülen (Abbildung 37 und Abbildung 38). Die Gruppe um Ojeda konnte zeigen, dass ERMP1 auf mRNA-Ebene vor allem in den Ovarien, der Niere und zwei Arealen des Gehirns translatiert wird. Auf Proteinebene jedoch konnte in dieser Arbeit die stärkste Expression des Proteins in Thymus, Milz und Lymphknoten nachgewiesen werden (Abbildung 36). Zusammengenommen lässt dies auf eine breite Gewebeverteilung des Enzyms schließen. Zudem konnte nun die Expression von ERMP1 in Milzzellen unter Einfluß des proinflammatorischen Cytokins IFN- γ untersucht werden. Wie viele Komponenten des MHC Klasse I Prozessierungsweges wird die Expression von ERMP1 durch IFN- γ um fast das fünffache gesteigert (Abbildung 39). ERMP1 erfüllt also die prinzipiellen Kriterien einer zweiten trimmende Aminopeptidase im murinen System: es ist eine ER residente Aminopeptidase mit einer luminalen aktiven Domäne, die Expression wird durch Stimulation durch IFN- γ gesteigert und die gewebespezifische Verteilung zeigt eine vermehrte Expression in lymphoiden Geweben.

Nun sollte untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß ERMP1 eine Funktion im Bezug auf die Generierung MHC I restringierter T-Zell Epitope hat. Die Generierung stabiler MHC Klasse I Moleküle und ihre Expression auf der Zelloberfläche ist abhängig von der Bereitstellung hochaffiner Liganden im endoplasmatischen Retikulum. Durch die Quantifizierung der Expression von MHC I auf der Zelloberfläche können wiederum Rückschlüsse auf die Generierung von Liganden im ER gezogen werden. Die Rolle von ERAP1 in der MHC I Antigen-Prozessierung konnte schon vielfach gezeigt werden. Experimente mit ERAP1 spezifischer siRNA zeigten jedoch widersprüchliche Effekte im Bezug auf die resultierende MHC I Expression. So konnte die Reduktion von ERAP1 in unbehandelten humanen HeLa Zellen die Expression von HLA Molekülen steigern, und ERAP1 Überexpression in COS-Zellen hatte einen destruktiven Einfluss auf HLA-Liganden¹⁰⁰. Im Gegensatz dazu konnte eine andere Gruppe nach ERAP1 Reduktion durch siRNA in humanen HeLa- und HEK-Zellen eine Reduktion der

HLA Expression beobachten⁴⁴. Nach Stimulation durch IFN- γ präsentierten siRNA behandelte HeLa Zellen, die transgen das murine H2-K^b Molekül exprimieren, weniger H2-K^b. In Abwesenheit von IFN- γ hingegen, hat ERAP1 keinen Einfluss auf die Expression dieses MHC I Moleküls¹⁰⁰. Die MHC I Haplotypen H2-K^k und H2-L^d werden nach der Reduktion der ERAP1 Expression in murinen Zellen um 20-45 % weniger präsentiert⁴³. Der Einfluss von ERAP1 in der MHC I Präsentation variiert demnach mit untersuchtem MHC I Molekül und dem physiologischen Zustand der Zelle. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ähnliches auch für ERMP1 zu gelten scheint. Zunächst wurde der Einfluss der Überexpression von ERMP1 auf die globale MHC I Expression untersucht (Abbildung 49). Betrachtet man die globale MHC I Expression in ERMP1 überexprimierenden Zellen, bewirkt die Aktivität von ERMP1 teilweise eine Reduktion der MHC I Expression (H2-D^b, H2-K^d), es zerstört also Epitope. Teilweise führt die Überexpression aber auch zu einer verbesserten Peptid-Versorgung und damit zu einer erhöhten Expression von MHC I (H2-L^d, H2-D^d). ERMP1 hat jedoch wenig Einfluss auf die Expressionslevel von H2-K^b. Besonders H2-L^d restringierte Peptide benötigen N-terminales Trimming, also das Entfernen von Aminosäuren zur Generierung passender Epitope für MHC Klasse I. Da etwa 20 % der H2-L^d restringierten Epitope ein X-Pro-X Motiv aufweisen (wobei X für jede Aminosäure stehen kann), Peptide mit Prolin in zweiter Position aber nur sehr ineffizient von TAP transportiert werden, gelangen sie zu einem großen Teil als N-verlängerte Vorläufer ins ER und benötigen dann zwingend Trimming, um eine korrekte Länge zu erreichen¹². Unter diesem Aspekt ist es besonders interessant, dass die Überexpression von ERMP1 in RAW309-Zellen zu einer erhöhten H2-L^d Expression führt. Die Überexpression von ERMP1 hat also einen Haplotyp-spezifischen Einfluss auf die globale MHC I Expression, im Vergleich zum Wildtyp werden sowohl Epitope zerstört, als auch vermehrt generiert.

ERAP1 schneidet bevorzugt Peptide mit 8 oder mehr AS, kürzere Peptide werden bedeutend langsamer angegriffen. Ob Vorläufer-Epitope geschnitten werden, während sie frei im ER Lumen vorliegen, oder erst, wenn sie schon an MHC I Moleküle gebunden sind, konnte noch nicht abschließend geklärt werden⁹⁹. Dieser „molecular ruler“ Mechanismus beruht auf der dreidimensionalen Struktur des Enzyms, besonders die Bindung längerer Peptide bewirkt eine Konformationsänderung und damit eine Steigerung der proteolytischen Aktivität¹⁰¹. Solch ein Mechanismus konnte für ERMP1 bislang nicht gezeigt werden.

Die Gesamtaktivität des endoplasmatischen Retikulums ergibt sich aus dem Zusammenspiel der ER residenten Aminopeptidasen, die sich in ihren Spezifitäten ergänzen. So schneidet ERAP1 Leucin und Methionin, ERAP2 vor allem Arginin und Lysin¹⁰². Es konnte gezeigt werden, dass ERAP1 und ERAP2 im nativen PAGE-Gel heterodimere Komplexe bilden. Zudem generieren ERAP1 und ERAP2 *in vitro* Epitope in Kooperation, die die einzelnen Aminopeptidasen nicht generieren können. Das

Zusammenspiel der Aminopeptidasen im endoplasmatischen Retikulum ist eine Balance zwischen Generierung von Epitopen und deren Zerstörung⁴⁴. Auch ERMP1 konnte zusammen mit ERAAP in einer Bande eines nativen PAGE Gels gefunden werden (Abbildung 26), ob es sich hierbei um heterodimere Komplexe handelt, konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Immunopräzipitationen mit dem affinitätsgereinigten ERMP1-Antiserum ergaben keine direkten Hinweise (Daten nicht gezeigt).

Um den Einfluss von ERMP1 auf die Präsentation eines spezifischen Epitops nachzuweisen, wurde in dieser Arbeit das gut untersuchte immundominante Modell-Epitop SIINFEKL aus Ovalbumin gewählt. In anderen Arbeiten konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Eliminierung von ERAP1 durch siRNA eine Reduktion der Präsentation des Modell-Epitops SIINFEKL um bis zu 70 % zu Folge hat, wobei es keinen Einfluss auf die generelle H2-K^b Expression zeigt^{43;100}. Dies ist sowohl der Fall bei der Generation von SIINFEKL aus dem gesamten Ovalbumin Protein, sowie aus Minigenkonstrukten, die N-terminal verlängertes SIINFEKL exprimieren¹⁰⁰. Die Überexpression von ERAP1 durch einen Vektor oder durch die Zugabe von IFN- γ hingegen steigert die Präsentation des Modell-Antigens SIINFEKL auf der Zelloberfläche²⁴. Auf die „cross-presentation“ von löslichem Ovalbumin hat ERAP1 keinen Einfluss, wohl aber von an Beads gekoppeltem Ovalbumin^{81;103}. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ERMP1 im Gegensatz zu ERAP1 einen destruktiven Einfluss auf die Generierung von SIINFEKL aus Minigen-kodierten verlängerten Epitop-Vorläufern und auch aus gesamten Ovalbumin (siehe Abbildung 49 und Abbildung 54) hat. Durch die Überexpression der Protease wird das minimale Epitop SIINFEKL weiter abgebaut, es kommt zu einer Reduktion der Präsentation von H2-K^b/SIINFEKL auf der Zelloberfläche. Dabei zeigten sich sequenzspezifische Unterschiede. Die Expression von SIINFEKL aus Minigenkonstrukten, die in Position-1 vor dem minimalen Epitop Aminosäuren exprimierten, die bevorzugt von ERMP1 entfernt werden (F, M und Y), wurde stärker beeinflusst, als die aus dem Minigenkonstrukt mit der Originalsequenz ESIINFEKL (Abbildung 54). Obwohl ERMP1 bei den Versuchen mit synthetischen AMC-Substraten Glutaminsäure (E) nicht entfernen konnte, wurde im ER auch die Originalsequenz effizient getrimmt. Gleiches konnte auch in Versuchen mit ERAP1 beobachtet werden¹⁷. Im Gegenzug dazu bewirkt die Reduktion der ERMP1 Expression durch siRNA einen Anstieg der SIINFEKL Präsentation (Abbildung 53).

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte bei der Betrachtung der Oberflächenexpression weiterer definierter Epitope in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass auch ERAAP in siRNA behandelten murinen Zellen sowohl Epitope zerstört (z.B. die Minor H Antigene SVL9, SSVGVWYL und SI9, SCILLYIVI), als auch deren Präsentation fördert (SEL8, SLVELTSL und ACL9, ASPCNSTVL)⁴³. Im Gegensatz zur Generation von SIINFEKL, auf die es einen förderlichen Einfluss hat, kann also angenommen werden, dass ERAAP trotz „molecular ruler“ Mechanismus auch destruktiv auf MHC I

Liganden wirkt. Der Einfluss der Aminopeptidasen bei der Präsentation muss für mehrere spezifische Epitope untersucht werden, da er sowohl von der Sequenz der Ursprungsproteine¹⁰⁴, als auch vom Bindungsmotiv der MHC I Haplotypen abhängt¹⁰. Das Zusammenspiel mehrerer Komponenten (Peptidsequenz, Proteasom-Schnittstellen, TAP-Transport, Trimming-Aktivität cytosolischer und ER-residenter Aminopeptidasen und exprimierte MHC I Haplotypen) und der Zustand der Zelle (+/- IFN- γ) bestimmt die Expression einzelner Epitope und bewirkt die hohe Variabilität der Antigen-Prozessierung und Präsentation. Um den Einfluss von ERMP1 auf die Expression weiterer Epitope betrachten zu können, sollen im Rahmen der Weiterführung des Projektes shRNA behandelte MC57-Zellen und Kontrollen mit LCMV infiziert werden und dann mit verschiedenen LCMV-spezifischen CTL-Linien inkubiert werden. Diese werden *ex vivo* durch wiederholte Peptidstimulation generiert. In einem „chromium release assay“ kann dann die Rate an lysierten Zellen für jedes Epitop verglichen werden und damit Rückschlüsse auf die Menge an präsentiertem Epitop gezogen werden. Die Epitope wurden so gewählt, dass in ihrer N-terminalen Sequenz Aminosäuren enthalten sind, die von ERMP1 entfernt werden können. Diese Versuche befinden sich im Moment in Arbeit.

Die Situation im standardisierten Zellkultursystem lässt sich nicht ohne Weiteres auf die Situation *in vivo* übertragen. Um genauere Einblicke auf die Art und Weise zu gewinnen, wie sich der Verlust von ER-residenten Aminopeptidasen auf den Epitop-Pool auswirkt, muss der Phänotyp *in vivo* untersucht werden. Mehrere Gruppen haben deshalb schon den Einfluss von ERAAP durch die Generierung von ERAAP-defizienten Mäusen auf H-2^b Hintergrund studiert. Die fehlende Trimmingaktivität im ER führte *in vivo* zu einer Reduktion der H2-K^b/D^b Moleküle in allen hämatopoetischen Zellen (aber nicht in *ex vivo* generierten Fibroblasten) um 40-50 %^{50,105}. *Ex vivo* generierte MEF-Zellen („mouse embryonic fibroblasts“) aus ERAAP^{-/-} Mäusen zeigten eine verringerte SIINFEKL Präsentation, wohingegen das LCMV (Lymphocytic Choriomeningitis Virus) gp33 Epitop in ERAAP^{-/-} Mäusen verstärkt generiert wurde. Bei Infektionen mit LCMV oder Influenza A zeigten ERAAP^{-/-} Mäuse eine normale Kontrolle der viralen Infektion¹⁰³, es konnte aber eine veränderte Hierarchie in der Immunodominanz bekannter LCMV Epitope beobachtet werden. Eine detaillierte Untersuchung des Peptidreservoirs in ERAAP^{-/-} Mäusen zeigte, dass ohne ERAAP viele Peptide nicht präsentiert werden und die Zellen im Gegenzug andere, ungewöhnliche und instabile Peptid/MHC-Komplexe präsentieren. Indem sie die Fähigkeit der T-Zellen ausnutzten, Fremd und Selbst zu unterscheiden, konnten Hammer et al. zeigen, dass die Immunisierung von Wildtyp-Mäusen mit Milzzellen aus ERAAP^{-/-} Mäusen (und vice versa) eine starke Immunantwort auslöst, die sowohl die CD8⁺ T-Zell-Antwort als auch die von B-Zellen generierten Antikörper betrifft⁴⁹. Da auch die Immunisierung von Wildtyp Mäusen mit ERAAP^{-/-} Zellen eine starke CTL-Antwort auslöste, folgerten die Autoren, dass ERAAP-defiziente Mäuse nicht nur manche Peptide nicht präsentieren, sondern stattdessen auch

völlig andere Peptid/MHC I Komplexe auf der Zelloberfläche exprimieren. In den ansonsten genetisch identischen Mäusen resultierte das eingeschränkte N-terminale Trimming im ER in der Präsentation veränderter Selbst-Peptide. Die Primärsequenzen dieser Peptide (z.B. zusätzliche AS am N-Terminus) wurden nicht bestimmt.

Analog zu diesen Arbeiten sollen in Zukunft ähnliche Versuche mit ERMP1 defizienten Mäusen durchgeführt werden. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist noch keine ERMP1^{-/-} Maus beschrieben worden. Das murine Gen für ERMP1 besitzt 15 Exons und umfasst die Basenpaare 29.682.704-29.722.905 des reversen Stranges auf Chromosom 19. Die aktive Domäne ist in Exon zwei lokalisiert. Über EUCOMM (European Conditional Mouse Mutagenesis Program) sind genetisch modifizierte, heterozygote embryonale Stammzellen (ES) mit C57BL/6 Hintergrund, jedoch mit brauner Fellfarbe zu erwerben. Abbildung 55 zeigt die schematische Übersicht des murinen ERMP1 Genes auf Chromosom 19 und die des modifizierten Locus in den genetisch veränderten EUCOMM Stammzellen. Der knockout wird gerichtet und konditionell erfolgen. Somit besteht keine Gefahr, dass weibliche Mäuse aufgrund der Rolle von ERMP1 bei der Ovarien-Organisation steril sind¹⁰⁶.

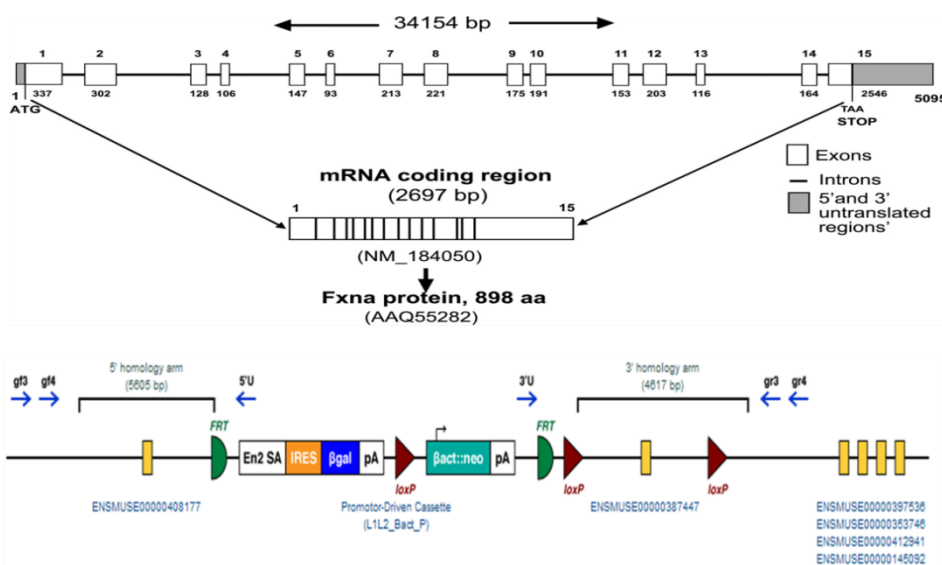


Abbildung 55: Schematischer Überblick über den genomischen Locus von ERMP1^{49;82} (oben) und des EUCOMM Konstruktes in genetisch veränderten Stammzellen¹⁰⁷ (unten).

ERMP1 defiziente Tiere werden im Moment in Kooperation mit der zentralen Versuchstiereinrichtung der Universität Mainz (ZVTE) generiert. Die ES Zellen wurden in C57BL/6 Blastocysten injiziert und durch Verpflanzung der Blastocysten in scheinchwangere Mäuse konnten zwei chimäre Tiere generiert werden. Diese Founder-Tiere wurden mit Wildtyp C57BL/6 Mäusen gekreuzt. Zunächst soll die homologe Rekombination in der F1-Generation mittels Southern Blot

validiert werden. Dazu wurden mehrere DNA-Sonden generiert, die sowohl im Genom des Wildtyps, als auch in dem der ES binden können. Nach Verdau der genomischen DNA durch das Restriktionsenzym Bam HI werden wegen einer zusätzlichen Schnittstelle in der Selektionskassette unterschiedliche Fragmentgrößen generiert (WT: 8,5 kb, ES: 8,5 kb und 2,5 kb), die mit der radioaktiv (^{32}P) markierten Sonde detektiert werden können. Einen Überblick über die Strategie des Southern Blots gibt Abbildung 56.

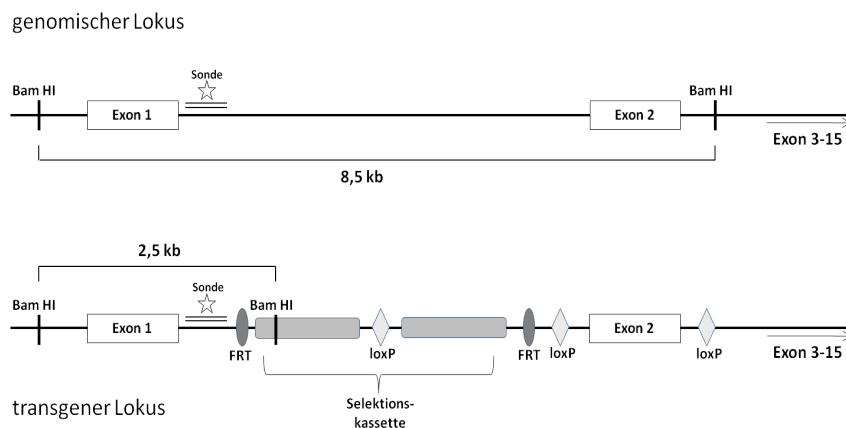


Abbildung 56: Southern Blot Strategie für die Validierung der homologen Rekombination in den EUComm ERMP1 Stammzellen.

Falls bei der Entwicklung des Embryos aus den injizierten Blastocysten eine Keimbahn-Transmission stattgefunden hat, sind diese Mäuse heterozygot für den genomisch veränderten Locus. Um die Targeting-Kassette zu entfernen, werden die positiv getesteten Tiere mit Flp-Deleter Mäusen gekreuzt. Diese exprimieren ubiquitär die Flp-Rekombinase aus *S. cerevisiae*, und es kommt zur Deletion der, von den zwei FRT-Sequenzen („Flp recombination target“) eingeschlossenen Sequenz (siehe Abbildung 55). Um den konditionellen knockout zu ermöglichen, wurden in Intron 1-2 und Intron 2-3 loxP („locus of crossover P1“) Sequenzen inseriert. Verpaart man nun die „gefloxten“ Mäuse mit Cre-Rekombinase („causes recombination“) exprimierenden Mäusen¹⁰⁸, kommt es zur Deletion von Exon zwei, welches die aktive Domäne von ERMP1 kodiert und zudem zu einer Verschiebung des Leserasters. Der Verlust des Proteins könnte dann mittels Western Blot nachgewiesen werden. Durch das Cre/loxP System ist es möglich, die Deletion nur in einem bestimmten Gewebe oder Zelltyp zu induzieren. Dazu wurden verschiedenste Cre-Mausstämme generiert, die die Cre Rekombinase unter Kontrolle eines spezifischen Promotors exprimieren. Im Fall von ERMP1 bietet sich eine Verpaarung mit CD11c-Cre Mäusen an¹⁰⁹. In diesem Maus-Stamm wird die Cre-Rekombinase in CD8⁻ und CD8⁺ dendritischen Zellen, dendritischen Zellen aus dem Lymphknoten, Lunge und Epidermis und plasmacytoiden dendritischen Zellen exprimiert. Eine

weitere Möglichkeit wäre die Verpaarung mit CD45-Cre Mäusen¹¹⁰. In diesem Stamm wird Cre in allen hämatopoetischen Zellen (außer Erythrocyten und Blutplättchen) exprimiert, was einen breiteren knockdown von ERMP1 und eventuell einen stärker ausgeprägten Phänotyp im Bezug auf das Immunsystem der Mäuse zur Folge hätte.

Ziel ist es, mit Hilfe von konditionellen ERMP1^{-/-} Mäusen eine zu ERAAP vergleichbare Rolle für ERMP1 beim Trimming von CTL Epitopen im ER *in vivo* zu zeigen. Mit einer ERMP1 defizienten Maus wäre es möglich, die Expression von MHC I auf der Zelloberfläche gesamter Milzzellen oder auf *ex vivo* generierten und angereicherten Subpopulationen (BMDCs, Mastzellen, Tregs, CD4/CD8⁺ T-Zellen) quantitativ zu bestimmen. Außerdem könnte man den Einfluss von ERMP1 im Bezug auf Anzahl und Funktionalität von CD8⁺ T-Zellen und z.B. die Rolle von ERMP1 in APCs und die Funktion dieser Aminopeptidase bei der direkten Aktivierung von naiven T-Zellen und beim „cross-priming“ untersuchen. Durch Immunopräzipitation von MHC I Molekülen aus Wildtyp und ERMP1^{-/-} Mäusen, der Elution der präsentierten Peptide und anschließender Analyse der Liganden im Massenspektrometer könnte eine Aussage über die quantitativen und qualitativen Unterschiede im MHC I Ligandom getroffen werden. Mit Hilfe spezifischer Antikörper könnte dies für jeden MHC I Haplotyp gesondert durchgeführt werden. Dieser Ansatz ermöglicht im Gegensatz zur quantitativen Analyse von MHC I Moleküle via FACS-Analyse oder mittels CTL Antwort auch eine Analyse der Sequenz und PTMs der präsentierten Epitope^{111;112}. Denkbar wäre auch die Generierung ERAAP/ERMP1 doppelt defizienter Tiere, die es ermöglichen würden, den Gesamteinfluss des N-terminalen Trimmings auf die MHC I Antigen Prozessierung zu bestimmen.

Die Trimming-Aktivität im ER hat Einfluss auf die Immunodominanz HIV-spezifischer T-Zell Epitope¹¹³ und der Immunevasion von Tumoren. Tumorzellen und auch Viren nutzen verschiedenste Strategien, um dem Immunsystem des Wirtes zu entkommen. Eine dieser Strategien ist die Störung des MHC Klasse I Präsentationsweges, die schwere klinische und immunologische Konsequenzen hat¹¹⁴. Defizite in der MHC I Epitopgenerierung haben eine vermehrte Metastasierung des Tumors und eine ungünstigere Prognose zur Folge¹¹⁵. So konnte gezeigt werden, dass in vielen Tumorgeweben oder -zellen eine veränderte Expression von ERAP1/2 vorliegt. 64 % der unveränderten Gewebeproben exprimieren die zwei Aminopeptidasen, wohingegen nur 21 % der untersuchten Tumorgewebe ERAP1 und 33 % ERAP2 exprimieren. Dies hat meist ebenso eine verminderte MHC I Expression in Tumorgeweben zur Folge¹¹⁶. Unter diesem Aspekt wäre es interessant, die ERMP1 Expression in gesunden Geweben und Tumorgeweben zu analysieren.

CTLs sind in der Lage, viral infizierte, aber auch bösartig veränderte Zellen zu erkennen und spezifisch zu lysieren. In den letzten Jahren wurden im Bereich der T-Zell Immunotherapie einige Fortschritte gemacht. Die Immuntherapie von Krebs kann aufgeteilt werden in passive und aktive Immunisierung. Erstere erfolgt durch Transfer von autologen, *ex vivo* expandierten „tumour infiltrating lymphocytes“ (TILs) oder gentechnisch veränderten T-Zellen. Im letzten Fall werden autologe Lymphozyten retroviral mit einem spezifischen T-Zell-Rezeptor transduziert (z.B. gegen das Melanom spezifische MART-1 Epitop¹¹⁷) und dem Patienten zugeführt. Daneben existiert die aktive Immunisierung durch Vakzinierung. Dazu werden entweder autologe, letal bestrahlte Tumorzellen oder mit Tumorlysaten beladene (oder mit Tumor mRNA transfizierte) DCs als Impfstoff verwendet. Außerdem werden mit definierten Epitopen aus „tumor associated antigens“ (TAAs) beladene, oder deren cDNA exprimierende DCs als Impfstoffe eingesetzt. Die Effektivität der T-Zell vermittelten Immunotherapie gegen Krebs (und auch bei der Immunisierung gegen Mikroorganismen) ist somit von der optimalen Immunstimulation durch TAAs, bzw. der darin enthaltenen CTL Epitope abhängig. Die Auswahl der TAAs ist daher maßgebend für den Erfolg der Therapie, da die Größe und Qualität der Immunreaktion vom Antigen-Profil des Tumors und dem HLA-Profil des Patienten abhängt. Die wichtigsten Kriterien sind dabei die spezifische Expression der TAAs in Tumorgewebe verschiedenen Ursprungs und das Vorhandensein mehrerer CTL und auch T_H-Zell Epitope¹¹⁸.

Neben der direkten Identifizierung von MHC Liganden aus Tumorgewebe durch spezifische CTL Klone und massenspektrometrischer Analyse des Ligandoms werden Computer Algorithmen eingesetzt, um Epitope aus bekannten TAA vorherzusagen. Die wichtigsten Determinanten der *in silicio* Vorhersagen sind die MHC Bindungsaffinität der Epitope, die TAP Affinität der Epitop-Vorläufer und das proteasomale Schnittmuster der TAAs¹¹⁹. Obwohl geschätzte 30 % der Proteasom Edukte N-terminale Verlängerungen aufweisen, werden in den für die *in silicio* Vorhersage von Tumorepitopen verwendeten Computer-Algorithmen das N-terminale Trimming im Cytosol und im ER nicht miteinbezogen. Tiefere Einblicke in die Abläufe der MHC Klasse I restringierten Antigenprozessierung im ER werden es ermöglichen, die Vorgänge im ER in der Vorhersage der Epitope zu berücksichtigen und damit zu verbessern¹¹⁸.

5. Zusammenfassung

Die effiziente Generierung von CTL Epitopen aus viralen oder krankhaft veränderten intrazellulären Proteinen und die Präsentation dieser Epitope auf MHC I Molekülen auf der Zelloberfläche ist essentiell für die Aktivierung CD8⁺ T-Zellen. CTLs erkennen diese Peptide in Kontext mit den MHC I Molekülen über ihren spezifischen T-Zell Rezeptor und sind erst danach in der Lage, infizierte oder veränderte Zellen zu lysieren. Die Bildung von CTL Epitopen ist das Ergebnis eines komplexen proteolytischen Prozesses im Cytosol (proteasomale Degradation Ubiquitin-markierter Proteine) und im ER (Trimming hoch affiner MHC I Liganden). Im murinen System ist die „endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing“ (ERAAP) die bislang einzige beschriebene ER-residente Aminopeptidase, die N-terminal verlängerte Epitopvorläufer schneidet. Die Analyse der Aminopeptidaseaktivitäten in isolierten murinen Mikrosomen weist jedoch auf das Vorhandensein zumindest einer weiteren Aminopeptidase im ER der Maus hin.

Nach Anreicherung des endoplasmatischen Retikulums aus Zellhomogenisat und anschließender chromatographischer Auftrennung desselben, konnten in dieser Arbeit drei proteolytische Aktivitäten detektiert werden. Neben der schon bekannten ER-residenten Aminopeptidase ERAAP und der, in speziellen endosomalen Vesikeln lokalisierten, Aminopeptidase IRAP konnte durch massenspektrometrische Analyse die Aminopeptidase ERMP1 detektiert werden, die in Verbindung mit der Antigenprozessierung MHC I restringierter CTL Epitope bislang nicht beschrieben wurde. Mittels Charakterisierung der Spezifität, der Untersuchung der gewebespezifischen Expression wie auch der intrazellulären Lokalisation und der Regulation der Proteinexpression wurde geprüft, ob ERMP1 ein potentieller Kandidat für eine weitere trimmende Aminopeptidase im murinen System sein kann. Durch diese Untersuchungen wurde ersichtlich, dass ERMP1 künstliche Aminosäuresubstrate umsetzen kann, in lymphoiden Geweben besonders stark exprimiert wird und mit TAP und MHC I Molekülen im ER kolokalisiert. Da die Expression von ERMP1 zudem durch die Stimulation von Milzzellen durch das proinflammatorische Zytokin IFN- γ gesteigert werden konnte, was eine wichtige Eigenschaft der im MHC I Weg implementierten Moleküle darstellt, konnte angenommen werden, dass ERMP1 Teil des MHC I restringierte Antigenprozessierungsweges ist. Um dies zu überprüfen wurde die Expression von ERMP1 durch RNA Interferenz und Überexpression beeinflusst und daraufhin die Veränderung der MHC I Oberflächenexpression bestimmt. Die Expression von ERMP1 beeinflusst die MHC I Expression auf eine Haplotyp abhängige Weise und hat Auswirkungen auf die Präsentation des immundominanten OVA Epitops SIINFEKL.

Um weitere Erkenntnisse über die Funktion von ERMP1 im MHC I Prozessierungsweg zu erlangen, sollen weitere spezifische Epitope unter Einfluss von RNA Interferenz untersucht werden und nachgewiesen werden, dass ERMP1 für die Generation eines reifen Epitops essentiell ist. Da N-terminales Trimming die Hierarchie von immundominanten Epitopen verändern kann, muss der Einfluss dieser Aminopeptidase auf die Präsentation von CTL Epitopen und deren Auswirkung auf die CD8⁺ T-Zell Antwort mit Hilfe von ERMP1 defizienten Mäusen *in vivo* untersucht werden.

6. Literatur

1. Larsson,J. and S.Karlsson. 2005. The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene* 24:5676-5692.
2. Harber,M., A.Sundstedt, and D.Wraith. 2000. The role of cytokines in immunological tolerance: potential for therapy. *Expert. Rev. Mol. Med.* 2:1-20.
3. Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and James D.Watson. 1994. *Molecular Biology of the Cell*, 3rd edition. Garland Science, New York.
4. Elliott,T., J.Elvin, V.Cerundolo, H.Allen, and A.Townsend. 1992. Structural requirements for the peptide-induced conformational change of free major histocompatibility complex class I heavy chains. *Eur. J. Immunol.* 22:2085-2091.
5. Madden,D.R., J.C.Gorga, J.L.Strominger, and D.C.Wiley. 1992. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* 70:1035-1048.
6. Saper,M.A., P.J.Bjorkman, and D.C.Wiley. 1991. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 219:277-319.
7. Kieper,W.C. and S.C.Jameson. 1999. Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naive T cells in response to self peptide/MHC ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:13306-13311.
8. Pease,L.R., R.M.Horton, J.K.Pullen, H.D.Hunt, T.J.Yun, E.M.Rohren, J.L.Prescott, S.M.Jobbe, and K.S.Allen. 1993. Amino acid changes in the peptide binding site have structural consequences at the surface of class I glycoproteins. *J. Immunol.* 150:3375-3381.
9. Kenneth M.Murphy,P.T.M.W. 2007. *Janeway's Immunobiology-Seventh Edition*. Garland Sciences, New York.
10. Falk,K., O.Rotzschke, S.Stevanovic, G.Jung, and H.G.Rammensee. 2006. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. 1991. *J. Immunol.* 177:2741-2747.
11. Villadangos,J.A. and P.Schnorrer. 2007. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat. Rev. Immunol.* 7:543-555.
12. Serwold,T., S.Gaw, and N.Shastri. 2001. ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules. *Nat. Immunol.* 2:644-651.
13. Yewdell,J.W., E.Reits, and J.Neefjes. 2003. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 3:952-961.
14. Shastri,N., S.Cardinaud, S.R.Schwab, T.Serwold, and J.Kunisawa. 2005. All the peptides that fit: the beginning, the middle, and the end of the MHC class I antigen-processing pathway. *Immunol. Rev.* 207:31-41.
15. Princiotta,M.F., D.Finzi, S.B.Qian, J.Gibbs, S.Schuchmann, F.Buttgereit, J.R.Bennink, and J.W.Yewdell. 2003. Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity.* 18:343-354.
16. Hershko,A. and A.Ciechanover. 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67:425-479.

17. Hearn,A., I.A.York, C.Bishop, and K.L.Rock. 2010. Characterizing the specificity and cooperation of aminopeptidases in the cytosol and endoplasmic reticulum during MHC class I antigen presentation. *J. Immunol.* 184:4725-4732.
18. Chapatte,L., C.Servis, D.Valmori, O.Burlet-Schiltz, J.Dayer, B.Monsarrat, P.Romero, and F.Levy. 2004. Final antigenic Melan-A peptides produced directly by the proteasomes are preferentially selected for presentation by HLA-A*0201 in melanoma cells. *J. Immunol.* 173:6033-6040.
19. Whitby,F.G., E.I.Masters, L.Kramer, J.R.Knowlton, Y.Yao, C.C.Wang, and C.P.Hill. 2000. Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* 408:115-120.
20. Rock,K.L., I.A.York, T.Saric, and A.L.Goldberg. 2002. Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv. Immunol.* 80:1-70.
21. Bardag-Gorce,F. 2010. Effects of ethanol on the proteasome interacting proteins. *World J. Gastroenterol.* 16:1349-1357.
22. Strehl,B., U.Seifert, E.Kruger, S.Heink, U.Kuckelkorn, and P.M.Kloetzel. 2005. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol. Rev.* 207:19-30.
23. Eleuteri,A.M., R.A.Kohanski, C.Cardozo, and M.Orlowski. 1997. Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). Replacement of X, Y, and Z subunits by LMP7, LMP2, and MECL1 and changes in properties and specificity. *J. Biol. Chem.* 272:11824-11831.
24. Saric,T., S.C.Chang, A.Hattori, I.A.York, S.Markant, K.L.Rock, M.Tsujimoto, and A.L.Goldberg. 2002. An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol.* 3:1169-1176.
25. Stoltze,L., M.Schirle, G.Schwarz, C.Schroter, M.W.Thompson, L.B.Hersh, H.Kalbacher, S.Stevanovic, H.G.Rammensee, and H.Schild. 2000. Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat. Immunol.* 1:413-418.
26. Saveanu,L., O.Carroll, Y.Hassainya, and E.P.van. 2005. Complexity, contradictions, and conundrums: studying post-proteasomal proteolysis in HLA class I antigen presentation. *Immunol. Rev.* 207:42-59.
27. Kloetzel,P.M. 2004. The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim. Biophys. Acta* 1695:225-233.
28. Deverson,E.V., I.R.Gow, W.J.Coadwell, J.J.Monaco, G.W.Butcher, and J.C.Howard. 1990. MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Nature* 348:738-741.
29. Townsend,A., C.Ohlen, J.Bastin, H.G.Ljunggren, L.Foster, and K.Karre. 2007. Pillars article: Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 1989. 340: 443-448. *J. Immunol.* 179:4301-4306.
30. Abele,R. and R.Tampe. 2004. The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing. *Physiology. (Bethesda.)* 19:216-224.
31. Androlewicz,M.J. and P.Cresswell. 1996. How selective is the transporter associated with antigen processing? *Immunity.* 5:1-5.
32. Burgevin,A., L.Saveanu, Y.Kim, E.Barilleau, M.Kotturi, A.Sette, E.P.van, and B.Peters. 2008. A detailed analysis of the murine TAP transporter substrate specificity. *PLoS. One.* 3:e2402.

33. Neisig,A., J.Roelse, A.J.Sijts, F.Ossendorp, M.C.Feltkamp, W.M.Kast, C.J.Melief, and J.J.Neefjes. 1995. Major differences in transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent translocation of MHC class I-presentable peptides and the effect of flanking sequences. *J. Immunol.* 154:1273-1279.
34. Peters,B., S.Bulik, R.Tampe, P.M.van Endert, and H.G.Holzhutter. 2003. Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors. *J. Immunol.* 171:1741-1749.
35. Lehner,P.J., E.W.Hewitt, and K.Romisch. 2000. Antigen presentation: peptides and proteins scramble for the exit. *Curr. Biol.* 10:R839-R842.
36. Thomas Pollard, William Earnshaw, and Jennifer Lippincott-Schwartz. 2007. Cell Biology. W.B. Saunders.
37. Neefjes,J.J., G.J.Hammerling, and F.Momburg. 1993. Folding and assembly of major histocompatibility complex class I heterodimers in the endoplasmic reticulum of intact cells precedes the binding of peptide. *J. Exp. Med.* 178:1971-1980.
38. Chapman,D.C. and D.B.Williams. 2010. ER quality control in the biogenesis of MHC class I molecules. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21:512-519.
39. Farmery,M.R., S.Allen, A.J.Allen, and N.J.Bulleid. 2000. The role of ERp57 in disulfide bond formation during the assembly of major histocompatibility complex class I in a synchronized semipermeabilized cell translation system. *J. Biol. Chem.* 275:14933-14938.
40. Koch,J. and R.Tampe. 2006. The macromolecular peptide-loading complex in MHC class I-dependent antigen presentation. *Cell Mol. Life Sci.* 63:653-662.
41. Howarth,M., A.Williams, A.B.Tolstrup, and T.Elliott. 2004. Tapasin enhances MHC class I peptide presentation according to peptide half-life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:11737-11742.
42. Komlosch,A., F.Momburg, T.Weinschenk, N.Emmerich, H.Schild, E.Nadav, I.Shaked, and Y.Reiss. 2001. A role for a novel luminal endoplasmic reticulum aminopeptidase in final trimming of 26 S proteasome-generated major histocompatibility complex class I antigenic peptides. *J. Biol. Chem.* 276:30050-30056.
43. Serwold,T., F.Gonzalez, J.Kim, R.Jacob, and N.Shastri. 2002. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419:480-483.
44. Saveanu,L., O.Carroll, V.Lindo, V.M.Del, D.Lopez, Y.Lepelletier, F.Greer, L.Schomburg, D.Fruci, G.Niedermann, and P.M.van Endert. 2005. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.* 6:689-697.
45. Kennedy,J. and N.Turan. 1999. Handbook of Proteolytic Enzymes, Alan J. Barrett, Neil D. Rawlings & J. Fred Woessner (Eds.), Academic Press, 1998, pp. xxx + 1666, ISBN: 0-12-079370-9. *Bioseparation* 8:340-341.
46. Tsujimoto,M. and A.Hattori. 2005. The oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases. *Biochim. Biophys. Acta* 1751:9-18.
47. Rock,K.L., I.A.York, and A.L.Goldberg. 2004. Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat. Immunol.* 5:670-677.
48. Chang,S.C., F.Momburg, N.Bhutani, and A.L.Goldberg. 2005. The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102:17107-17112.

49. Hammer, G.E., F.Gonzalez, E.James, H.Nolla, and N.Shastri. 2007. In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides. *Nat. Immunol.* 8:101-108.
50. York, I.A., M.A.Brehm, S.Zendzian, C.F.Towne, and K.L.Rock. 2006. Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) trims MHC class I-presented peptides in vivo and plays an important role in immunodominance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:9202-9207.
51. Groothuis, T.A., A.C.Griekspoor, J.J.Neijsen, C.A.Herberts, and J.J.Neefjes. 2005. MHC class I alleles and their exploration of the antigen-processing machinery. *Immunol. Rev.* 207:60-76.
52. GORER, P.A. 1950. Studies in antibody response of mice to tumour inoculation. *Br. J. Cancer* 4:372-379.
53. Raschke, W.C., S.Baird, P.Ralph, and I.Nakoinz. 1978. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 15:261-267.
54. Moore, M.W., F.R.Carbone, and M.J.Bevan. 1988. Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 54:777-785.
55. Vaughn, J.L., R.H.Goodwin, G.J.Tompkins, and P.McCawley. 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 13:213-217.
56. Galfre, G., C.Milstein, and B.Wright. 1979. Rat x rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fd portion of mouse IgG. *Nature* 277:131-133.
57. Porgador, A., J.W.Yewdell, Y.Deng, J.R.Bennink, and R.N.Germain. 1997. Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity*. 6:715-726.
58. Dearman, R.J., M.Cumberbatch, G.Maxwell, D.A.Basketter, and I.Kimber. 2009. Toll-like receptor ligand activation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology* 126:475-484.
59. Kruisbeek, A.M. 2001. Isolation of mouse mononuclear cells. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 3:Unit.
60. Reeves, J.P. and P.A.Reeves. 2001. Removal of lymphoid organs. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 1:Unit.
61. Walter, P. and G.Blobel. 1983. Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. *Methods Enzymol.* 96:84-93.
62. Liu, B., J.Dai, H.Zheng, D.Stoilova, S.Sun, and Z.Li. 2003. Cell surface expression of an endoplasmic reticulum resident heat shock protein gp96 triggers MyD88-dependent systemic autoimmune diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:15824-15829.
63. Kamin, H., B.S.Masters, Q.H.Gibson, and C.H.Williams, Jr. 1965. Microsomal TPNH-cytochrome c reductase. *Fed. Proc.* 24:1164-1171.
64. Goddard, I., A.Florin, C.Mauduit, E.Tabone, P.Contard, R.Bars, F.Chuzel, and M.Benahmed. 2003. Alteration of lactate production and transport in the adult rat testis exposed in utero to flutamide. *Mol. Cell Endocrinol.* 206:137-146.
65. Gallagher, S.R. 2007. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 6:Unit.
66. Candiano, G., M.Bruschi, L.Musante, L.Santucci, G.M.Ghiggeri, B.Carnemolla, P.Orecchia, L.Zardi, and P.G.Righetti. 2004. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25:1327-1333.

-
67. Kurien,B.T. and R.H.Scofield. 2003. Protein blotting: a review. *J. Immunol. Methods* 274:1-15.
 68. Towbin,H. and J.Gordon. 1984. Immunoblotting and dot immunobinding--current status and outlook. *J. Immunol. Methods* 72:313-340.
 69. 2011. <http://www.vu-wien.ac.at/i123/virokurs/westblott1.jpg>. *Internet Communication*.
 70. Wittig,I., H.P.Braun, and H.Schagger. 2006. Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* 1:418-428.
 71. Smith,B.J. 1994. Enzymatic methods for cleaving proteins. *Methods Mol. Biol.* 32:289-296.
 72. Sambrook,J. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
 73. Mullis,K., F.Faloona, S.Scharf, R.Saiki, G.Horn, and H.Erich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1:263-273.
 74. Schmidt,T.G. and A.Skerra. 2007. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protoc.* 2:1528-1535.
 75. Ghosh,S. 2000. Cholesteryl ester hydrolase in human monocyte/macrophage: cloning, sequencing, and expression of full-length cDNA. *Physiol Genomics* 2:1-8.
 76. Weisshart,K., V.Jungel, and S.J.Bridson. 2004. The LSM 510 M. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 5:135-154.
 77. Emmerich,N.P., A.K.Nussbaum, S.Stevanovic, M.Priemer, R.E.Toes, H.G.Rammensee, and H.Schild. 2000. The human 26 S and 20 S proteasomes generate overlapping but different sets of peptide fragments from a model protein substrate. *J. Biol. Chem.* 275:21140-21148.
 78. 2011. <http://teach.maryville.edu/kbruzzini/Cell%20Biology/Lecture%201/celllysis.jpg>. *Internet Communication*.
 79. Fujii-Kuriyama,Y., M.Negishi, R.Mikawa, and Y.Tashiro. 1979. Biosynthesis of cytochrome P-450 on membrane-bound ribosomes and its subsequent incorporation into rough and smooth microsomes in rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* 81:510-519.
 80. Schatz,M.M., B.Peters, N.Akkad, N.Ullrich, A.N.Martinez, O.Carroll, S.Bulik, H.G.Rammensee, E.P.van, H.G.Holzhtutter, S.Tenzer, and H.Schild. 2008. Characterizing the N-terminal processing motif of MHC class I ligands. *J. Immunol.* 180:3210-3217.
 81. Saveanu,L., O.Carroll, M.Weimershaus, P.Guermonprez, E.Firat, V.Lindo, F.Greer, J.Davoust, R.Kratzer, S.R.Keller, G.Niedermann, and E.P.van. 2009. IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science* 325:213-217.
 82. Garcia-Rudaz,C., F.Luna, V.Tapia, B.Kerr, L.Colgin, F.Galimi, G.A.Dissen, N.D.Rawlings, and S.R.Ojeda. 2007. Fxna, a novel gene differentially expressed in the rat ovary at the time of folliculogenesis, is required for normal ovarian histogenesis. *Development* 134:945-957.
 83. 2011. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q3UVK0>. *Internet Communication*.
 84. Zhou,F. 2009. Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *Int. Rev. Immunol.* 28:239-260.
 85. Tessier,D.C., D.Y.Thomas, H.E.Khouri, F.Laliberte, and T.Vernet. 1991. Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene* 98:177-183.

86. Rogi,T., M.Tsujimoto, H.Nakazato, S.Mizutani, and Y.Tomoda. 1996. Human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase. A new member of type II membrane-spanning zinc metallopeptidase family. *J. Biol. Chem.* 271:56-61.
87. Chai,S.Y., R.Fernando, G.Peck, S.Y.Ye, F.A.Mendelsohn, T.A.Jenkins, and A.L.Albiston. 2004. The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cell Mol. Life Sci.* 61:2728-2737.
88. Albiston,A.L., G.R.Peck, H.R.Yeatman, R.Fernando, S.Ye, and S.Y.Chai. 2007. Therapeutic targeting of insulin-regulated aminopeptidase: heads and tails? *Pharmacol. Ther.* 116:417-427.
89. Matsumoto,H., T.Rogi, K.Yamashiro, S.Kodama, N.Tsuruoka, A.Hattori, K.Takio, S.Mizutani, and M.Tsujimoto. 2000. Characterization of a recombinant soluble form of human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur. J. Biochem.* 267:46-52.
90. Shepherd,P.R. and B.B.Kahn. 1999. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 341:248-257.
91. Keller,S.R. 2003. The insulin-regulated aminopeptidase: a companion and regulator of GLUT4. *Front Biosci.* 8:s410-s420.
92. Keller,S.R., A.C.Davis, and K.B.Clairmont. 2002. Mice deficient in the insulin-regulated membrane aminopeptidase show substantial decreases in glucose transporter GLUT4 levels but maintain normal glucose homeostasis. *J. Biol. Chem.* 277:17677-17686.
93. Rawlings,N.D. and A.J.Barrett. 1995. Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol.* 248:183-228.
94. Eshaghi,S., M.Hedren, M.I.Nasser, T.Hammarberg, A.Thornell, and P.Nordlund. 2005. An efficient strategy for high-throughput expression screening of recombinant integral membrane proteins. *Protein Sci.* 14:676-683.
95. Tate,C.G. 2001. Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. *FEBS Lett.* 504:94-98.
96. Baneyx,F. 1999. Recombinant protein expression in Escherichia coli. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10:411-421.
97. Jarvis,D.L. 2009. Baculovirus-insect cell expression systems. *Methods Enzymol.* 463:191-222.
98. Fernandez,J.M. and J.P.Hoeffler. 1999. Gene expression systems : using nature for the art of expression. Academic Press, San Diego.
99. Kanaseki,T., N.Blanchard, G.E.Hammer, F.Gonzalez, and N.Shastri. 2006. ERAAP synergizes with MHC class I molecules to make the final cut in the antigenic peptide precursors in the endoplasmic reticulum. *Immunity.* 25:795-806.
100. York,I.A., S.C.Chang, T.Saric, J.A.Keys, J.M.Favreau, A.L.Goldberg, and K.L.Rock. 2002. The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat. Immunol.* 3:1177-1184.
101. Nguyen,T.T., S.C.Chang, I.Evnouchidou, I.A.York, C.Zikos, K.L.Rock, A.L.Goldberg, E.Stratikos, and L.J.Stern. 2011. Structural basis for antigenic peptide precursor processing by the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. *Nat. Struct. Mol. Biol.*
102. Tanioka,T., A.Hattori, S.Masuda, Y.Nomura, H.Nakayama, S.Mizutani, and M.Tsujimoto. 2003. Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. *J. Biol. Chem.* 278:32275-32283.

103. Firat,E., L.Saveanu, P.Aichele, P.Staeheli, J.Huai, S.Gaedicke, A.Nil, G.Besin, B.Kanzler, E.P.van, and G.Niedermann. 2007. The role of endoplasmic reticulum-associated aminopeptidase 1 in immunity to infection and in cross-presentation. *J. Immunol.* 178:2241-2248.
104. Evnouchidou,I., F.Momburg, A.Papakyriakou, A.Chroni, L.Leondiadis, S.C.Chang, A.L.Goldberg, and E.Stratikos. 2008. The internal sequence of the peptide-substrate determines its N-terminus trimming by ERAP1. *PLoS. One.* 3:e3658.
105. Yan,J., V.V.Parekh, Y.Mendez-Fernandez, D.Olivares-Villagomez, S.Dragovic, T.Hill, D.C.Roopenian, S.Joyce, and K.L.Van. 2006. In vivo role of ER-associated peptidase activity in tailoring peptides for presentation by MHC class Ia and class Ib molecules. *J. Exp. Med.* 203:647-659.
106. Bockamp,E., M.Maringer, C.Spangenberg, S.Fees, S.Fraser, L.Eshkind, F.Oesch, and B.Zabel. 2002. Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol Genomics* 11:115-132.
107. 2011. <http://www.knockoutmouse.org/genedetails/MGI:106250>. *Internet Communication*.
108. Sauer,B. 1998. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 14:381-392.
109. Caton,M.L., M.R.Smith-Raska, and B.Reizis. 2007. Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8- dendritic cells in the spleen. *J. Exp. Med.* 204:1653-1664.
110. Yang,J., D.Hills, E.Taylor, K.Pfeffer, J.Ure, and A.Medvinsky. 2008. Transgenic tools for analysis of the haematopoietic system: knock-in CD45 reporter and deleter mice. *J. Immunol. Methods* 337:81-87.
111. Mester,G., V.Hoffmann, and S.Stevanovic. 2011. Insights into MHC class I antigen processing gained from large-scale analysis of class I ligands. *Cell Mol. Life Sci.* 68:1521-1532.
112. Yewdell,J.W. 2005. The seven dirty little secrets of major histocompatibility complex class I antigen processing. *Immunol. Rev.* 207:8-18.
113. Tenzer,S., E.We, A.Burgevin, G.Stewart-Jones, L.Friis, K.Lamberth, C.H.Chang, M.Harndahl, M.Weimershaus, J.Gerstoft, N.Akkad, P.Klenerman, L.Fugger, E.Y.Jones, A.J.McMichael, S.Buus, H.Schild, E.P.van, and A.K.Iversen. 2009. Antigen processing influences HIV-specific cytotoxic T lymphocyte immunodominance. *Nat. Immunol.* 10:636-646.
114. Yewdell,J.W. and J.R.Bennink. 1999. Mechanisms of viral interference with MHC class I antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15:579-606.
115. Kamphausen,E., C.Kellert, T.Abbas, N.Akkad, S.Tenzer, G.Pawelec, H.Schild, E.P.van, and B.Seliger. 2010. Distinct molecular mechanisms leading to deficient expression of ER-resident aminopeptidases in melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.*
116. Fruci,D., P.Giacomini, M.R.Nicotra, M.Forloni, R.Fraioli, L.Saveanu, E.P.van, and P.G.Natali. 2008. Altered expression of endoplasmic reticulum aminopeptidases ERAP1 and ERAP2 in transformed non-lymphoid human tissues. *J. Cell Physiol* 216:742-749.
117. Morgan,R.A., M.E.Dudley, J.R.Wunderlich, M.S.Hughes, J.C.Yang, R.M.Sherry, R.E.Royal, S.L.Topalian, U.S.Kammula, N.P.Restifo, Z.Zheng, A.Nahvi, C.R.de Vries, L.J.Rogers-Freezer, S.A.Mavroukakis, and S.A.Rosenberg. 2006. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314:126-129.
118. Kessler,J.H. and C.J.Melief. 2007. Identification of T-cell epitopes for cancer immunotherapy. *Leukemia* 21:1859-1874.

-
119. Nielsen, M., C. Lundegaard, O. Lund, and C. Kesmir. 2005. The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage. *Immunogenetics* 57:33-41.

7. Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Schema der Hämatopoese aus pluripotenten Stammzellen.	1
Abbildung 2: Schema der Aktivierung naiver T-Zellen über den T-Zellrezeptor und kostimulatorische Moleküle	3
Abbildung 3: Organisation der MHC Genloci bei Mensch und Maus	5
Abbildung 4: Aufbau der MHC Klasse I und Klasse II Moleküle.	5
Abbildung 5: Peptidliganden verschiedener muriner MHC I Moleküle.....	6
Abbildung 6: Übersicht über die verschiedenen Quellen für Proteine, Abbauege und beteiligter Zellkompartimente für die Beladung von MHC I und MHC II Molekülen	7
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Aufbaus des konstitutiven und des nach Stimulation durch IFN- γ gebildeten Immunoproteasoms	9
Abbildung 8: Schematischer Aufbau des integralen TAP1/2 Heterodimers in der ER Membran.	11
Abbildung 9: Einfluss der Seitenketten und Positionen der Aminosäuren im Peptid auf die Affinität des murinen und humanen TAP-Transporters..	11
Abbildung 10: Beladung von MHC I Molekülen durch den "peptide loading complex"	13
Abbildung 11: Die drei Mitglieder der Oxytocinase Unterfamilie der M1 Aminopeptidasen IRAP, ERAP1 und ERAP2.	14
Abbildung 12: Aminosäure-Präferenzen der Enzyme ERAP1 (A-LAP) und ERAP2 (L-RAP)	15
Abbildung 13: Aufbau eines Western Blots.	28
Abbildung 14: Schematische Ansicht des pASK_IBA2 Vektors	42
Abbildung 15: Schematischer Überblick über die Bindung des Strep-Tags (WSHPQFEK) und der Strep-Taktin Matrix	45
Abbildung 16: Schematische Abbildung des pLKO.1-puro Vektors mit siRNA Insert.....	50
Abbildung 17: Schematische Darstellung der generierten RAP Konstrukte im pIRES2_eGFP Vektor.....	51
Abbildung 18: Schema der Mikrosomen-Isolierung.	53
Abbildung 19: Aktivität des ER-Markerenzym NADPH Cytochrom P450 Reduktase und des cytosolischen Markerenzym Laktat-Dehydrogenase	54
Abbildung 20: Western Blot gegen den ER-spezifischen Marker Calretikulin	55
Abbildung 21: Aminopeptidasen-Spezifität der gesamten Mikrosomen-Fraktion muriner T-Lymphomzellen	56
Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der Polypeptid-Verdaus mit aufgereinigtem Cytosol und aufgereinigtem ER.....	57
Abbildung 23: Vergleich der gesamten Aminopeptidase-Aktivität muriner Mikrosomen mit der Aktivität der rekombinant exprimierten Aminopeptidase ERAAP.	58
Abbildung 24: AMC Assay der chromatographisch aufgetrennten EL4-Mikrosomen.....	59
Abbildung 25: Chromatogramm der Mikrosomen-Aufreinigung über die MonoQ HR 5/5-Säule mit reduziertem Triton ...	60
Abbildung 26: „blue native“-PAGE, gefärbt mit Phenylalanin-AMC Substrat	61
Abbildung 27: MS/MS Daten der tryptisch verdauten Proteinbanden aus dem fluoreszierenden „blue native“-PAGE.....	62
Abbildung 28: Aminosäure-Spezifität des in Baculoviren exprimierten rekombinanten IRAP..	63
Abbildung 29: Verleich der Aktivität muriner Mikrosomen und der durch Anionentausch separierten Peaks.	64
Abbildung 30: Sequenz des murinen ERMP1.	65
Abbildung 31: Schematische Darstellung des bakteriellen Expressionsvektors pASK-IBA2 mit der ERMP1 ER Domäne (ERMP1 ₍₈₈₋₃₉₃₎)	66
Abbildung 32: SDS-PAGE der Induktion von ERMP1 ₍₈₈₋₃₉₃₎ aus dem pASK-IBA2 Vektor und Aufreinigung	67

Abbildung 33: SDS-PAGE der aufgereinigten Überstände der „inclusion bodies“ und der Aufreinigung der renaturierten ERMP1 ER-Domäne aus den denaturierten „inclusion bodies“.	67
Abbildung 34: Western Blot mit unbehandeltem polyklonalem Antiserum..	68
Abbildung 35: Western Blots mit dem polyklonalen Antiserum gegen ERMP1 nach der Affinitätschromatographie gegen die ER-Domäne des Proteins.	69
Abbildung 36: ERMP1 Western Blot von verschiedenen Geweben aus der C57/BL6 Maus	70
Abbildung 37: Fluoreszenzmikroskopische und Durchlicht Aufnahmen von BALB/c BMDCs, gefärbt mit ERMP1 Antiserum und TAP	71
Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopische und Durchlicht Aufnahmen von BMDCs, gefärbt mit ERMP1 Antiserum und H2-K ^d	72
Abbildung 39: Western Blot stimulierter C57/BL6 Milzzellen gegen ERMP1, ERAAP und Aktin	73
Abbildung 40: Schematische Darstellung des eukaryotischen Expressionsvektors pcDNA3.1(+) mit murinem ERMP1	74
Abbildung 41: Western Blot der mit pcDNA_ERMP1 transfizierten und G418 selektierten Überexpressions-Klone	74
Abbildung 42: Western Blot der Aufreinigung des ERMP1 mit His-Tag mittels magnetischen Co ²⁺ -Beads und Aminopeptidase Aktivität des Eluates	75
Abbildung 43: Western Blot und mit Coomassie gefärbtes SDS-PAGE Gel der Ni ²⁺ -Säulen Aufreinigung von rekombinantem ERMP1 aus dem überexprimierenden Klon 40C6	76
Abbildung 44: Aminopeptidase-Aktivität der Fraktion "MonoQ Peak 2"	77
Abbildung 45: Aminopeptidase-Aktivität der Fraktion „MonoQ Peak 2“ mit verschiedenen Inhibitoren und dem Proteasom Substrat Succinyl-LLVY-AMC	78
Abbildung 46: Schematische Darstellung der zwei generierten pVL1393 Baculovirus Expressionskonstrukte	79
Abbildung 47: Coomassie gefärbtes SDS-PAGE Gel und Western Blot gegen ERMP1 der Strep-Tag Aufreinigung der ER-Domäne aus infizierten Sf9 Zellen	80
Abbildung 48: ERMP1 Western Blot der Aufreinigung von ERMP1 ₍₁₋₈₉₈₎ aus Sf9 Zellen.	80
Abbildung 49: MHC Klasse I Expression verschiedener Zell-Linien mit Überexpression von ERMP1	81
Abbildung 50: Zu Abbildung 49 korrespondierende überlagerte Histogramm für die verschiedenen MHC Klasse I Haplotypen.	82
Abbildung 51: ERMP1 Western Blots der stabil transfizierten EL4 Kulturen.	84
Abbildung 52: „gating strategy“ der FACS Messung und Auswertung der Daten der RAP transfizierten stabilen EL4 Kulturen mit veränderter ERMP1 Expression mittels des Quotienten von APC/eGFP	85
Abbildung 53: SIINFEKL-Expression der stabilen „knockdown“ Kulturen im Vergleich zu den scramble-shRNA transfizierten EL4-Zellen	86
Abbildung 54: SIINFEKL-Expression bei stabiler Überexpression von ERMP1 im Vergleich zu Leervektor transfizierten EL4-Zellen	87
Abbildung 55: Schematischer Überblick über den genomischen Lokus von ERMP1 und das EUCOMM Konstrukt in genetisch veränderten Stammzellen	96
Abbildung 56: Southern Blot Strategie für die Validierung der homologen Rekombination in den EUCOMM ERMP1 Stammzellen.	97

Tabelle 1: Saccharose Gradient für die Dichtezentrifugation	24
Tabelle 2: Pipettierschema für SDS-Gele	27
Tabelle 3: Verwendete Primär- und Sekundär Antikörper für Western Blots	29
Tabelle 4: Pipettierschema des AMC-Assays	31
Tabelle 5: Pipettierschema der reversen Transkription von Gesamt-RNA	34
Tabelle 6: typischer PCR Ansatz	35
Tabelle 7: typisches Thermocycler Programm	36
Tabelle 8: Liste der verwendeten PCR Primer und Oligonukleotide	37
Tabelle 9: Antikörper für die Fluoreszenz-Mikroskopie	49
Tabelle 10: Antikörper für die FACS Analyse	52
Tabelle 11: Überblick über die gebräuchlichsten Expressionssysteme für rekombinante Proteine ⁹⁸	91

8. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
A, Ala	Alanin
ABC	ATP-binding cassette
ACK	Lysepuffer für Erythrocyten
ACN	Acetonitril
AK	Antikörper
A-LAP	adipocyte-derived leucine aminopeptidase
AMC	7-Amido-4-methylcoumarin
APC	antigenpräsentierende Zelle oder Allophycocyanin
APS	Ammonium Persulfat
AS	Aminosäure
ATG	Startcodon
ATP	Adenosintriphosphat
BH	Bleomycin Hydrolase
BH	Bleomycin Hydrolase
BMDCs	bone-marrow derived dendritic cells
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
C	Celsius
C, Cys	Cystein
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CLP	common lymphoid progenitor
CMP	common myeloid progenitor
CMV	Cytomegalievirus
Cnx	Calnexin
Co	Kobalt
Cre	causes recombination
Crt	Calretikulin
CTL	cytotoxic T- Lymphocyte
CV	column volume
D, Asp	Asparaginsäure
d.h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
DEPC	Diethylenepycarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRiPs	defective ribosomal products
DRiPs	defective ribosomal products
DTT	Dithiothreitol
E, Glu	Glutaminsäure
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAAP	ER aminopeptidase associated with antigen processing
ERAD	ER associated degradation
ERAP1/2	ER aminopeptidase 1/2
ERMP1	Endoplasmic Reticulum Metalloprotease 1
ES	embryonale Stammzellen
ESI	Elektrospray Ionisierung
EtOH	Ethanol

F, Phe	Phenylalanin
FA	Ameisensäure
FACS	fluorescence activated cell sorter
Fc	fragment crystallizable
FCS	Fötales Kälber Serum
FoxP3	forkhead box P3
FRT	Flp recombination target
FSC/SSC	forward scatter/side scatter
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ ms}^{-2}$)
G, Gly	Glycin
GF	Gelfiltration
GSH/GSSG	reduziertes/oxidiertes Glutathion
h	Stunde
H, His	Histidin
HABA	Hydroxy-Azophenylbenzoic-Acid
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HGPRT	Hypoxanthin-Guaninphosphoribosyltransferase
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
I, Ile	Isoleucin
IAA	Iodacetamid
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
IRAP	insulin regulated aminopeptidase
IRES	internal ribosome entry site
JAK/STAT	Janus Kinase/ Signal Transducer and Activator of Transcription
K, Lys	Lysin
kDa	Kilo-Dalton
L, Leu	Leucin
LAP	Leucin-Aminopeptidase
LCMV	Lymphocytic Choriomeningitis Virus
LDH	Laktat Dehydrogenase
LMP	low molecular weight protein
loxP	locus of crossover P
LPS	Lipopolysaccharid
L-RAP	leukocyte-derived aminopeptidase
LSM	Laser Scan Mikroskopie
M	mol/l, Molarität
M, Met	Methionin
mA	Milliampère
mAU	milli absorption unit
MEF	mouse embryonic fibroblasts
MetOH	Methanol
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
N, Asn	Asparagin
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
ng	Nanogramm
NHS	N-hydroxysuccinimid
Ni	Nickel
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame

Ova	Ovalbumin
P, Pro	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Para-Formaldehyd
pH	Säuregrad
PI	Propidiumiodid
P-LAP	leucyl/cystinyl aminopeptidase
PLC	Peptide loading complex
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNPP	p-Nitrophenyl-Phosphat
PSA	Puromycin-sensitive Aminopeptidase
PSA	Puromycin-sensitive Aminopeptidase
PTM	posttranslationale Modifikationen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q TOF	Quadrupol mit Flugrohr
Q, Gln	Glutamin
R, Arg	Arginin
RAP	reverse analysis of processing
RFU	relative fluorescence unit
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolution per minute
RT	Raumtemperatur
S, Ser	Serin
SA	Streptavidin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> Zellen
shRNA	short hairpin Ribonukleinsäure
t	Zeit
T, Thr	Threonin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAP	transporter associated with antigen processing
TBS	Tris Buffered Saline
TCR	T-Zell Rezeptor
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
TLR	Toll like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TOP	Thimet Oligopeptidase
TPPII	Tripeptidyl-Peptidase II
TRAF6	tumor necrosis factor receptor-associated factor 6
T _{regs}	regulatorische T-Zellen
U	unit
ÜN	über Nacht
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
V, Val	Valin
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
Y, Tyr	Tyrosin

9. Publikationen und Lebenslauf

Stefan Tenzer, Hayley Crawford, Robert Gifford, Sreenu B. Vattipally, Phillip Pymm, Mirjana Weimershaus, Anne Burgevin, Tulio de Oliveira, Jan Gerstoft, **Nadja Akkad**, Lars Fugger, Mark Pagel, Hansjörg Schild, Peter van Endert & Astrid K.N. Iversen. Human Leukocyte Antigen class I and II variants drive HIV evolution.

Nature Immunology, Manuskript in Vorbereitung

Sven Brosch, Stefan Tenzer, **Nadja Akkad**, Beate Lorenz, Hansjörg Schild and Esther von Stebut. Priming of Leishmania-reactive CD8+ T cells in vivo does not require LMP7-containing immunoproteasomes

Journal of Investigative Dermatology, in Revision

Kamphausen, E, C Kellert, T Abbas, **N Akkad**, S Tenzer, G Pawelec, H Schild, P van Endert and B Seliger. 2010. Distinct molecular mechanisms leading to deficient expression of ER-resident aminopeptidases in melanoma

Cancer Immunology, Immunotherapy

Tenzer, S., E.We, A.Burgevin, G.Stewart-Jones, L.Friis, K.Lamberth, C.H.Chang, M.Harndahl, M.Weimershaus, J.Gerstoft, **N.Akkad**, P.Klenerman, L.Fugger, E.Y.Jones, A.J.McMichael, S.Buus, H.Schild, E.P.van, and A.K.Iversen. 2009. Antigen processing influences HIV-specific cytotoxic T lymphocyte immunodominance

***Nature Immunology* 10:636-646.**

Schatz, M.M., B.Peters, N.Akkad, N.Ullrich, A.N.Martinez, O.Carroll, S.Bulik, H.G.Rammensee, E.P.van, H.G.Holzthutter, S.Tenzer, and H.Schild. 2008. Characterizing the N-terminal processing motif of MHC class I ligands

***Journal of Immunology* 180:3210-3217.**

