

Die Isolierung und Aufreinigung der
Metalloendopeptidase LysN und die Evaluierung der
Spezifität der LysN_{E157D}-Mutante und ihr Einsatz in der
Proteomik
und
Die Mechanismen der Bildung von
“dendritic cell aggresome- like induced structures“
(DALIS)

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Hendrik Berger

geb. 05.03.1981 in Herford

Mainz, Dezember 2012

Aus dem
Institut für Immunologie
Universitätsmedizin Mainz

Dekan:

1. Berichtserstatter:

2. Berichtserstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Eidesstattliche Erklärung:

Ich versichere, dass die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne Benutzung anderer, als der angegebenen Hilfsmittel geschrieben wurde. Wortlaute, Formulierungen und Abbildungen aus von mir benutzten Veröffentlichungen, oder anderen Quellen (auch Internetquellen), habe ich eindeutig als solche gekennzeichnet. Diese Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und noch nicht als Studienleistung zur Bewertung vorgelegt worden. Eine Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens werde ich nicht vornehmen.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir im Detail bekannt und das Verstöße gegen diese Anforderungen mit der Nichterteilung der von mir angestrebten Promotion zur Folge haben können.

Mainz, den

Hendrik Berger

Meiner Familie

Danksagung

I.	Einleitung.....	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Das angeborene Immunsystem.....	3
1.1.2	Das adaptive Immunsystem.....	6
1.2	Signaltransduktion	8
1.2.1	Signalweiterleitung am Beispiel von Toll-Like Rezeptoren.....	9
1.2.1.1	Erkennung von bakteriellem LPS durch den TLR-4	9
1.3	Hapthistokompatibilitätskomplex, Antigenprozessierung und Antigenpräsentation	11
1.3.1	Der Aufbau und die Funktion des Hapthistokompatibilitätskomplex	11
1.3.2	Antigenprozessierung	13
1.3.3	Schritte vom zytosolischen Antigen zum getrimmten Peptid	15
1.3.4	Das Proteasom.....	16
1.3.5	Zytosolische Proteasen und der TAP-Transporter	18
1.3.6	Finale Prozesse der Antigenprozessierung im ER	19
1.4	DALIS.....	20
1.5	Die Bedeutung der PI-3 Kinase und Caspasen bei der DALIS-Bildung.....	22
1.6	Proteomik.....	24
1.6.1	Massenspektrometrie	25
1.6.2	Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS).....	26
1.6.3	Auswertung der MS/MS Daten	28
1.7	Proteasen	29
1.7.1	Serin-Endopeptidasen	29
1.7.2	Proteolytische Enzyme im Zuge MS-basierter Proteomik	30
1.7.3	Die Metalloendopeptidase LysN	32
1.8	Zielsetzung	34
II.	Material und Methoden	35
2.1	Material	35
2.1.1	Geräte	35
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	37
2.1.3	Chemikalien und Medienzusätze.....	38
2.1.4	Puffer, Medien und Medienzusätze	40
2.1.4.1	Medien und Medienzusätze	40
2.1.4.2	Puffer	42
2.1.5	Marker und Enzyme und Inhibitoren	45
2.1.6	Primer.....	46

2.2 Methoden.....	47
2.2.1 Zellkultur	47
2.2.1.1 Zelllinien	47
2.2.1.2 Kultivierung von Zellen und Zelllinien	47
2.2.1.3 Auftauen und Kryokonservierung von Zellen	48
2.2.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl	48
2.2.3 Versuchstiere	49
2.2.4 Isolierung muriner BMDCs.....	49
2.2.4.1 murine BMDCs.....	49
2.2.5 Durchflusszytometrie-Analyse (FACS)	51
2.2.6 Fluoreszenzmikroskopie.....	53
2.2.6.1 Intrazelluläre Färbung für Fluoreszenzmikroskopie.....	53
2.2.7 Aufreinigung von Proteinen und Methoden der Proteinanalytik.....	54
2.2.7.1 Lyse der Zellen.....	54
2.2.7.2 Fällung der Proteine.....	54
2.2.7.3 Bestimmung der Konzentration von Proteinen	55
2.2.8 SDS-PAGE, Coomassie-Färbung und Western-Blot.....	55
2.2.8.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
2.2.8.2 Fixierung und kolloidale Coomassie-Färbung der Gele.....	56
2.2.8.3 Western-Blot und Immundetektion von Proteinen	57
2.2.8.4 Immundetektion	58
2.2.9 Aktivitätsassay von Peptidasen mittels Azocasein	60
2.2.10 Methoden der Klonierung und DNA-Analysen	60
2.2.10.1 Aufreinigung von DNA aus Bakterienkulturen	60
2.2.10.2 Restriktionsverdau von Plasmiden durch Restriktionsendonukleasen	61
2.2.10.3 Analyse von DNA-Molekülen mittels Agarose-Gelelektrophorese	61
2.2.10.4 Gelelektion von DNA-Molekülen	62
2.2.10.5 Dephosphorylierung von aufgereinigten DNA-Fragmenten.....	62
2.2.10.6 Ligation von DNA-Fragmenten	62
2.2.11 Kompetente bakterielle Zellen	63
2.2.11.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen Rosetta-gami Zellen	64
2.2.11.2 Transformation in chemisch kompetente Zellen	64
2.2.12 Blau-Weiß Selektion	65
2.2.13 Isolierung von Plasmiden aus Bakterien und Anlegen von Glycerinstocks	65
2.2.14 Konventionelle Polymerase - Kettenreaktion (PCR).....	66

2.2.15 Ortsgerichtete Mutagenese durch <i>Quickchange</i> – PCR	67
2.2.16 Klonierung der Metalloendopeptidasen in <i>E.coli</i>	68
2.2.16.1 Expression von LysN _{opt} und LysN _{optE157D}	68
2.2.16.2 Aufreinigung von LysN _{opt} und LysN _{optE157D} aus dem Periplasma	69
2.2.16.3 Aufreinigung von LysN _{opt} und LysN _{optE157D} aus dem Zytoplasma	70
2.2.16.4 Aufreinigung aus Einschlusskörperchen (inclusion bodies)	70
2.2.16.5 Zurückfaltung von LysN _{opt} und LysN _{optE157D}	71
2.2.17 Baculoviren in Sf-9 Insektenzellen.....	71
2.2.17.1 Kotransfektion mit linearisierter Baculovirus-DNA	72
2.2.17.2 Plaque Assay und Amplifizierung des Virus.....	72
2.2.18 Methoden der Proteinaufreinigung	73
2.2.18.1 Native Proteinaufreinigung von 6 x His-tag Proteinen und Mono S Aufreinigung	73
2.2.18.2 Denaturierte Proteinaufreinigung von 6 x His-tag Proteinen und Gelfiltration	74
2.2.19 In-Lösungsverdau	75
2.2.20 In-Gel-Verdau	75
2.2.21 Analyse von Peptiden via Nanofluss (nanoflow) LC-ESI-MS/MS Analyse	76
2.2.21.1 Bedingungen des HPLC-Laufs	77
2.2.21.2 Nanofluss LC-ESI-MS/MS Analyse (Tandem-Massenspektrometrie).....	78
2.2.22 Datenbanksuche	79
III. Ergebnisse	81
3.1 LysN _{opt} und LysN _{optE157D}	81
3.1.2 Klonierung in den bakteriellen Expressionsvektor pET-26b(+)......	83
3.1.3 Expression von LysN _{opt} und LysN _{optE157D}	85
3.2 Lokalisation des exprimierten LysN _{opt} und LysN _{optE157D}	86
3.3 Native Aufreinigung aus dem Zytoplasma	87
3.3.1 Aufreinigung des rekombinanten Proteins durch IMAC.....	87
3.3.2 Aufreinigung über Ionentauscher	88
3.4 Massenspektrometrische Bestimmung von LysN _{opt}	93
3.1.1 Klonierung in den bakteriellen Transfervektor pVL1393.....	95
3.1.2 Infektion von Sf-9 Zellen mit Baculoviren.....	96
3.5 Denaturierende Aufreinigung aus Einschlusskörperchen	99
3.5.1 Isolierung der Einschlusskörperchen von LysN _{opt} und LysN _{optE157D}	99
3.5.2 Denaturierende Aufreinigung über das His-Tag mittels IMAC.....	101

3.5.3 Gelfiltration unter denaturierenden Bedingungen	105
3.5.4 Zurückfaltung der rekombinanten Proteine aus denaturierten Einschlusskörperchen	107
3.6 Verdau von Testproteinen mit LysN _{opt} und LysN _{optE157D}	109
3.7 Bestimmung des optimalen Enzym-Substratverhältnis	111
3.8 Optimierung der Bedingungen für den Einsatz von LysN _{opt} und LysN _{optE157D} in proteolytischen Verdaus	112
3.8.1 Aktivität in Gegenwart von denaturierendem Agenz und unterschiedlichen pH- Werten	112
3.8.2 Bestimmung des optimalen Zeitpunktes für den Verdau von Proteinen mittels LysN _{opt} und LysN _{optE157D}	114
3.9 Inhibition der Aktivität durch EDTA und DTT.....	115
3.10 Ermittlung der Spezifität von LysN _{opt} und LysN _{optE157D}	116
3.9 DALIS.....	121
3.9.1 Durchflusszytometrische Analyse der BMDCs	121
3.9.2 Bildung von polyubiquitinylierten Proteinaggregaten im Verlauf der Aktivierung von DCs und Makrophagen.....	123
3.9.3 Verminderte DALIS-Bildung durch Inhibition einzelner Mitglieder der PI-3 Kinase Signaltransduktionskaskade	124
3.9.5 Der Einfluss von Caspasen auf die Bildung von DALIS	129
IV. Diskussion.....	132
4.1 Der Einsatz der Metalloendopeptidasen LysN und LysN _{optE157D} in MS-Analysen ...	132
4.1.1 Die Vorzüge der Metalloendopeptidasen LysN _{opt} und LysN _{optE157D}	132
4.1.2 Vergleich der Expressionssysteme und verschiedener Methoden zur Aufreinigung von LysN _{opt} und LysN _{optE157D}	133
4.1.3 Problematik bei der Wiederherstellung der biologischen Aktivität von denaturierten rekombinanten Proteinen	136
4.1.4 Die Vorzüge von LysN in proteolytischen Verdaus	137
4.1.5 Die Spezifität der mutierten Metalloendopeptidase LysN _{optE157D}	138
4.1.6 LysN in massenspektrometrischen Analysen.....	140
4.2 Korrelation der DALIS-Bildung und der Aktivierung in BMDCs und Makrophagen	144
4.2.1 Das Verhalten der DALIS-Bildung in aktivierten BMDCs und Makrophagen unter Beeinflussung der Aktivierungskaskade.....	145
4.2.2 DALIS-Bildung unter dem Aspekt der Apoptose	146
4.2.3 Mechanismen der DALIS-Bildung und damit verbundene Proteine	148
V. Zusammenfassung.....	150

VI. Abkürzungsverzeichnis	152
VII. Abbildungsverzeichnis	156
VIII. Tabellenverzeichnis	158
IX. Literaturverzeichnis	159
X. Publikationen und Lebenslauf	174

I. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Seit Beginn der Evolution haben Organismen Strategien entwickeln müssen, um sich gegen Infektionen durch Pathogene wie Bakterien, Pilze oder Viren, aber auch Parasiten zu schützen. Der wohl effektivste Mechanismus, uns als Immunsystem bekannt, entwickelte sich dabei in Vertebraten und wurde in den Mammalia perfektioniert. Das Immunsystem ist ein Zusammenspiel aus Zellen, Organen und Molekülen die gemeinsam agieren um den Organismus vor einer Infektion zu schützen, oder diese nach Ausbruch zu bekämpfen. Dabei wird zwischen zwei grundlegenden Mechanismen unterschieden, dem phylogenetisch älteren, angeboren Immunsystem und dem sich erst später in der Wirbeltierklasse der Gnathostomata entwickelten sogenannten erworbenen, oder adaptiven Immunsystem. Dabei ist Letzteres für das von Edward Jenner (1749-1826) beschriebene Phänomen und daraufhin entwickelten Methode der „Vaccination“ verantwortlich. Durch diese Immunisierung ist das adaptive Immunsystem, u.a. dazu befähigt einen Erreger bei erneutem Kontakt schneller zu erkennen und effizienter zu bekämpfen. Das adaptive Immunsystem wird aktiviert, wenn das angeborene Immunsystem den Erreger nicht erfolgreich eliminieren konnte. Eine wichtige Aufgabe im Zuge der Aufrechterhaltung beider Systeme übernehmen die Immunzellen. Die auch als Leukozyten bezeichneten Zellen entspringen aus dem Knochenmark und entwickeln sich in einem Prozess der als Hämatopoese bezeichnet wird¹.

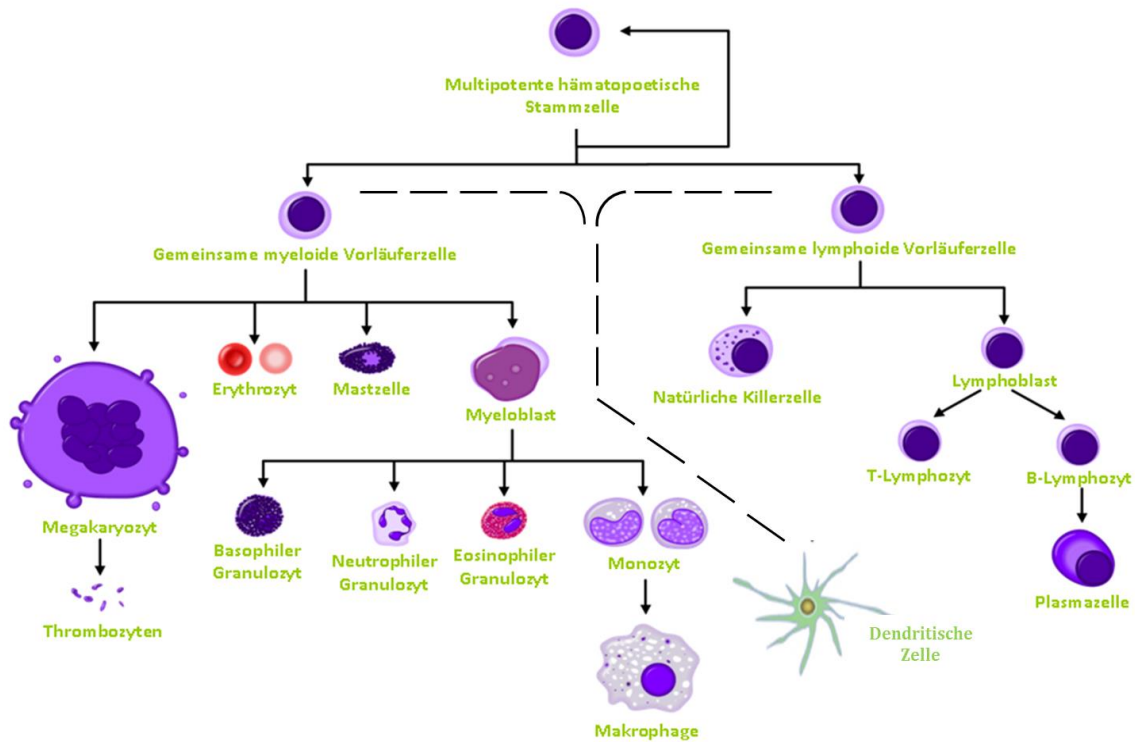


Abbildung 1: Schaubild der Hämatopoese aus pluripotenten Stammzellen

(abgeändert nach <http://doktor-schubert.net/2011/die-blutbildung/>), gefunden 15.12.11

Die pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen gliedern sich zunächst in zwei Linien. Dabei entwickeln sich zum einen lymphoide, zum anderen myeloide Vorläuferzellen². Im Falle der lymphoiden Linie entwickeln sich im Zuge der Leukopoese die Zellen des adaptiven Immunsystems, die B-, und T- Lymphozyten, sowie die natürlichen Killerzellen. Hingegen entstehen im Falle der Myelopoese die Zellen der angeborenen Immunität, nämlich Makrophagen, Mastzellen und Granulozyten. Letztere spalten sich in drei Typen: Basophile, Eosinophile und Neutrophile, die alle verschiedene Aufgaben übernehmen. Darüber hinaus entstehen während der Myelopoese auch Thrombozyten und Erythrozyten. Allerdings sind beide aus rein immunologischer Sicht nicht relevant, weshalb diese Zellen nicht weiter beschrieben werden. Schließlich lässt sich die Entwicklung der dendritischen Zelle (kurz DC, vom engl: *dendritic cell*) auch auf myeloide Vorläufer zurückführen. DCs gehören zu den sogenannten professionellen antigenpräsentierenden Zellen (kurz APC, vom engl. *antigen presenting cell*) und fungieren als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität^{3,4}. Der Großteil der Zellen entwickelt sich im Knochenmark mit Ausnahme der T-Zellvorläufer. Diese migrieren in ein spezielles lymphatisches Organ, den Thymus, um dort zu heranzureifen. Schließlich wandern alle Zellen in den Blutstrom und das Lymphsystem des Organismus ein.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist das erste der beiden Immunsysteme welches nach einer Infektion den Organismus zu schützen versucht. Es ist durch eine schnelle, aber unspezifische Reaktion auf ein Pathogen gekennzeichnet. Im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem, welches hauptsächlich zellvermittelt agiert, zeichnet sich das angeborene Immunsystem auch durch chemische (Lysozym, antibakterielle Peptide, saurer pH, z.B. im Magen), physikalische (Haut, Schleimhäute) und weitere biologische Abwehrmechanismen (Konkurrenzdruck durch kommensale Bakterien) aus. Schaffen es Erreger dennoch diese Komponenten zu überwinden, stellen sich ihnen die Zellen des angeborenen Immunsystems gegenüber. Dieses sind zunächst Monozyten, die zu Makrophagen heranreifen, sobald sie ins Gewebe einwandern. Der Name „Makrophage“ gibt bereits Auskunft über die Eigenschaften des Zelltyps (altgriechisch: makrós = groß und phagein = essen), sie sind Phagozyten. Sie wurden erstmalig von Kranid Slavjanski im Jahr 1863 beschrieben. Makrophagen durchwandern das Blutsystem und werden chemotaktisch zu einem Infektionsherd gelockt. Dort wandeln sie sich unter dem Einfluss von Zytokinen zu Makrophagen um. Dieser Prozess wird noch dadurch verstärkt, dass bereits am Infektionsherd vorhandene Makrophagen Substanzen ausschütten, die weitere Monozyten anlocken. Die Aufnahme des Pathogens erfolgt bei Makrophagen im Gegensatz zur DC rein phagozytotisch. Neben Pathogenen werden auch apoptotische Zellen und zelluläre Überreste phagozytotisch aufgenommen und so abgebaut⁵. Das aufgenommene Material wird umschlossen und in einem als Phagosom bezeichneten Kompartiment in das Zellinnere transportiert, wo es mit dem Lysosom zum Phagolysosom verschmilzt. Das Phagolysosom beinhaltet eine Vielzahl degradierender Enzyme (z.B. Cathepsin, β -Glucosidase) und sorgt für den Abbau des aufgenommenen Materials. Analog zur dendritischen Zelle können Peptidfragmente gebunden an MHC-Moleküle auf der Oberfläche präsentiert werden und so T_H - Zellen aktivieren, somit sind auch Makrophagen, neben DCs, dazu in der Lage als APC zu agieren (siehe 1.1.2 und 1.3.2). Infizierte Makrophagen sezernieren IL-12, welches T_{H1} -Zellen dazu anregt zu proliferieren. Durch Makrophagen aktivierte T-Zellen wiederum können B-Zellen mit entsprechendem Antigen-MHC-Komplex dazu anregen Antikörper zu sezernieren. Diese Antikörper opsonisieren Bakterien, wodurch diese leichter von Phagozyten erkannt und eliminiert werden können, oder neutralisieren es durch ihre Bindung. Ferner können sie das Komplementsystem aktivieren. Neben der Aufgabe als APC und Fresszelle sind sie ferner an der Neubildung von Blutgefäßen, sowie Regeneration von Muskeln beteiligt^{6,7}. Die Phagozyten werden zusammen mit Granulozyten rekrutiert. Diese sezernieren toxische Substanzen, die eindringende Pathogene abtöten können. Des Weiteren scheiden Granulozyten und Makrophagen Chemokine aus, eine besondere Klasse der

Cytokine, die weitere Granulozyten und Makrophagen zum Infektionsherd locken können. In vielen Fällen reicht diese Abwehr schon aus um eine Infektion zu bekämpfen. Ist dies nicht der Fall, kann die Infektion meist so lange eingedämmt werden, bis das adaptive Immunsystem in der Lage ist, zu reagieren. Weitere Zelltypen des angeborenen Immunsystems sind Mastzellen und die natürlichen Killerzellen auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

Ein wichtiger Zelltyp sind die vor allem unter der Haut und Schleimhaut befindlichen DCs. Zusammen mit Makrophagen bilden sie eine Gruppe, die antigenpräsentierenden Zellen (siehe 1.2 und 1.3). DCs wurden bereits 1868 von Paul Langerhans beschrieben, der sie unter der Haut lokalisierte und aufgrund ihres verzweigten Erscheinungsbildes für Nervenzellen hielt. Daher rührt auch ihr Name (griechisch: dendros = Baum), der im Jahre 1973 von Steinmann und Cohn geprägt wurde⁸. Sie entdeckten, dass DCs auch in der Milz und anderen peripheren lymphatischen Organen vorkommen. Heutzutage sind viele Subklassen bekannt. Generell unterscheidet man zwischen myeloiden dendritischen Zellen (mDC) und plasmacytoiden dendritischen Zellen (pDC). Sie unterscheiden sich zum einen durch das äußere Erscheinungsbild, sowie die Sekretion unterschiedlicher Zytokine, ferner exprimieren sie unterschiedliche TLRs. Prinzipiell führen dabei alle Subtypen die gleiche Hauptfunktion aus, nämlich die Antigenaufnahme und deren Präsentation. Unreife DCs befinden sich frei zirkulierend im Blutstrom und der Lymphe, oder sind direkt unter der Haut lokalisiert (Langerhans-Zellen). In diesem Stadium exprimiert die Zelle wenige kostimulatorische Moleküle, die für die Aktivierung von T-Zellen essentiell sind, zudem präsentieren sie nur körpereigene Peptide. In diesem Zustand ist die DC phagozytotisch hoch aktiv. Trifft eine unreife DC auf ein Virus, Bakterium, oder Antigen kann sie dieses über TLRs, oder PRRs erkennen und durch rezeptorvermittelte Endozytose, Phagozytose oder Makropinozytose aufnehmen. Hierdurch wird die Zelle aktiviert und beginnt zu reifen, ferner verliert sie zunehmend die Fähigkeit weitere Antigene aufzunehmen. Die reifende DC migriert durch das Lymphsystem zu den Lymphknoten. Die Migration beruht auf der Expression von Chemokinen und deren Rezeptoren, allen voran dem Chemokinrezeptor CCR7. Zudem wird das aufgenommene Antigen prozessiert, d.h. das Antigen wird in kleinere Fragmente (Peptide) definierter Länge zerlegt. Anschließend werden diese Peptide auf MHC-Moleküle geladen. Diese können je nach Art des aufgenommenen Antigens MHC-Moleküle der Klassen I oder II sein. Zum Beispiel werden extrazelluläre Bakterien über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen und endosomal verdaut, hieraus resultierende Peptidfragmente werden auf MHC-II Moleküle geladen. Hingegen werden Peptide viraler Natur, z.B. bei Infektion der DC auf MHC-I Moleküle geladen. Der beladene Peptid-MHC Komplex wird sodann an die Zelloberfläche transportiert und dort

präsentiert. Einhergehend werden die kostimulatorische Moleküle u.a. CD80, CD86, CD40 und induzierbare Kostimulator-Ligand (kurz ICOS-L, vom engl. *inducible costimulatory ligand*). exprimiert. Die Präsentation von Antigenen führt zur Aktivierung von T-Zellen. Aufgrund dieser Funktion werden DCs als antigenpräsentierende Zelle bezeichnet, wobei eine reife DCs den effektivsten Stimulus für eine T-Zelle darstellt.

Andererseits migrieren nicht nur aktivierte DCs zu den Lymphknoten, sondern auch unreife DCs. Auf ihrer Oberfläche werden nur körpereigene Peptide exprimiert und die Expression von kostimulatorischen Molekülen ist gering. Wird eine T-Zelle im Lymphknoten mit einer solchen DC konfrontiert und trägt den entsprechenden TCR für den Peptid-MHC Komplex fällt diese T-Zelle in einen passiven Zustand, in dem sie nicht aktiviert werden kann. Dieser Zustand wird als Anergie bezeichnet und dient als einer der drei Eckpfeiler der Toleranzinduktion, auch als periphere Toleranz bezeichnet.

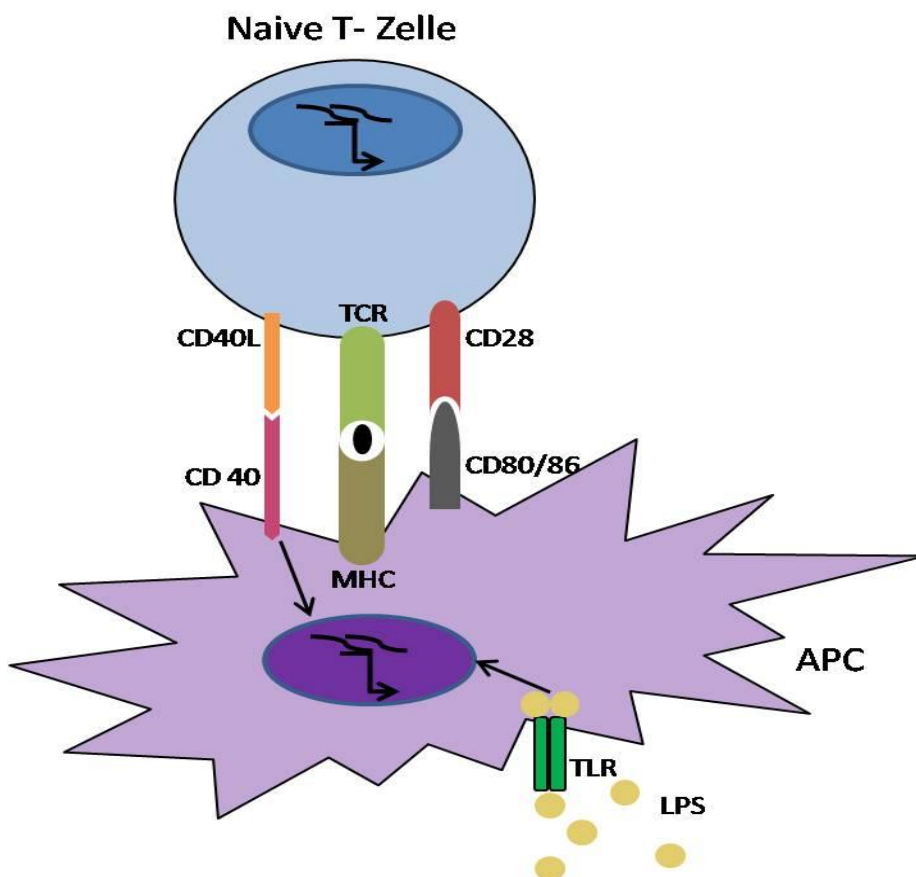


Abbildung 2: Übersicht über die Aktivierung naiver T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen

Die naive T-Zelle exprimiert neben dem TCR auch kostimulatorische Moleküle wie CD40L, oder CD28. Diese werden von den entsprechenden Rezeptoren (CD40 und CD80/86) der APC erkannt und es kommt zur Aktivierung der naiven T-Zelle, wenn TCR und Peptid/MHC Komplex zueinander passen. APC = antigenpräsentierende Zelle, TLR = Toll-like Rezeptor, LPS = Lipopolysaccharid

Zusätzlich zur zellulären Immunität gibt es auch eine als humorale Immunität bezeichnete (vom lat. *humor* „Flüssigkeit“), welche im Falle der angeborenen Immunität vom Komplementsystem übernommen wird. Hierbei handelt es sich um ein System löslicher Plasmaproteine und zellgebundener Proteine. Diese Proteine besitzen enzymatische Aktivität und lassen sich wie in einem Dominoeffekt kaskadenartig gegenseitig aktivieren⁹. Hierdurch können z.B. Erreger durch Antikörper oder Komplementfaktoren für Phagozyten markiert und somit erkennbar gemacht werden. Dieser Prozess wird auch als Opsonisierung bezeichnet. Des Weiteren agieren einige Komponenten des Komplementsystems auch als Chemokine, wodurch Phagozyten zum Infektionsherd gelockt werden können, welche die Eindämmung der Infektion weiter unterstützen.

Die unspezifische Natur des angeborenen Immunsystems lässt sich durch seine Hauptaufgabe, den Körper vor einer Vielzahl unterschiedlicher Pathogene zu schützen, nachvollziehen. Dies kann nur dadurch erreicht werden, wenn als Angriffspunkt generelle, auf vielen Erregern vorkommende Komponenten erkannt werden können. Diese sog. Pathogen-assoziierten molekularen Muster (kurz PAMPs, vom engl. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) sind essentiell mit dem Überleben des Erregers verknüpft. Deshalb können sie im Zuge der Evolution nicht einfach verändert werden, um so einer Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen. Für die Erkennung der PAMPs sind Rezeptoren verantwortlich, die auf jeder Zelle des angeborenen Immunsystems exprimiert werden, da sie in der Keimbahn kodiert sind. Ein bekanntes Beispiel hierfür sind die sog. Toll-ähnlichen Rezeptoren (kurz TLR, vom engl. „*Toll-like* Rezeptoren“) die zur Gruppe der Pathogenerkennungsrezeptoren (kurz PRR, vom engl. *Pattern Recognition Receptors*) gehören.

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem unterscheidet sich vom angeborenen durch eine deutlich höhere Spezifität und Diversität. Zudem hat es die Fähigkeit zur Unterscheidung von Selbst und Fremd und zeichnet sich durch ein immunologisches Gedächtnis aus, welches es ihm erlaubt, einen Erreger bei einer Zweitinfektion schneller und effektiver zu eliminieren. Das immunologische Gedächtnis, sowie die Spezifität werden vor allem durch das Vorhandensein von B- und T- Zellen geformt. Diese speziellen Typen von Lymphozyten entwickeln sich aus der lymphatischen Linie der Hämatopoese und tragen einen T-Zellrezeptor (kurz TCR, vom engl. *T-cell receptor*), bzw. B-Zell Rezeptor auf ihrer Oberfläche. Diese Rezeptoren sind äußerst spezifisch und erkennen nur ein bestimmtes, ihnen zugehöriges Antigen, welche ähnlich wie Schlüssel und Schloss zu ihren Rezeptoren passen. Hier liegt der Hauptunterschied zum angeborenen Immunsystem,

dessen Zellen universelle Strukturen erkennen und nicht erregerspezifische Antigene. B-Zell Rezeptoren sind membrangebundene Antikörper und können frei vorliegende Antigene erkennen und binden, hingegen ist die Bindung des TCR an ein Antigen nur möglich, wenn dieses in Kombination mit einem Protein des Haupthistokompatibilitätskomplexes (kurz MHC, vom engl. *major histocompatibility complex*) vorliegt. Der MHC ist eine Genfamilie die sich in Vertebraten entwickelt hat. Die Genprodukte der Familie werden auf der Oberfläche von Zellen exprimiert und ihre Liganden entstammen entweder von Peptidfragmenten der Zelle oder des eigenen Organismus (Selbstantigene), oder von Antigenen invasiver Pathogene (Fremdantigene). T-Zellen können eine Zielzelle also nur dann erkennen und ihre jeweilige Effektorfunktion erfüllen, wenn der Komplex aus Antigen zusammen mit dem MHC-Molekül auf der Zelloberfläche präsentiert wird.

T-Zellen können weiterhin in zwei Subklassen kategorisiert werden, die durch jeweils ein spezifisches Oberflächenprotein gekennzeichnet sind. Die Oberflächenmoleküle dienen als Korezeptoren und werden als Unterscheidungsgruppen (kurz CD, vom engl. „*clusters of differentiation*“) bezeichnet und gliedern sich in CD4 und CD8. CD8⁺- Zellen übernehmen dabei hauptsächlich die Funktion des Abtötens von infizierten Zellen, indem sie Granzym und Perforin ausschütten. Auf Grund dieser Funktion werden sie auch als CD8⁺-Killerzellen bezeichnet. CD4⁺ dienen hingegen als T-Helfer Zellen (T_H-Zellen) oder regulatorische T-Zellen (T_{Regs}). T_{Regs} modulieren die Immunreaktion, indem sie die Aktivierung des Immunsystems regulieren und notfalls unterdrücken. Dies ist für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems wichtig. Des Weiteren gewährleisten sie eine Toleranz gegenüber Selbstantigenen. T_H-Zellen hingegen lassen sich weiter in T_H1-, T_H2-Zellen und T_H17- Zellen differenzieren^{10;11}. Des Weiteren wurde 2009 eine als T_H9 benannte weitere Subpopulation beschrieben¹². Die Klassifizierung basiert auf der Ausschüttung unterschiedlicher Zytokine nach Antigenkontakt. Dabei sezernieren T_H1-Zellen hauptsächlich Interferon - gamma (IFN-γ) und Interleukin-2 (IL-2). Dadurch unterstützen sie die zelluläre Immunantwort, da die ausgeschütteten Zytokine Makrophagen anlocken. Diese wiederum sezernieren IL-12, welches Makrophagen zu APCs differenzieren lässt und sich somit ihre antimikrobielle Natur verstärkt. Des Weiteren löst IL-12 eine Differenzierung der T-Zellen in Richtung des reaktiven Typs hervor. Somit wird durch die T-Zell-vermittelte Entzündungsreaktion die Bekämpfung des Pathogens auf vielfältige Weise unterstützt. Schließlich bewirkt eine Ausschüttung von IFN-γ die Unterdrückung der T_H2 vermittelten Immunantwort.

T_H2-Zellen wiederum produzieren Interleukine der Untergruppen 4, 5, 6, 10 und 13. Dadurch nehmen sie eine zentrale Rolle in der humoralen Immunität ein, da die sezernierten Zytokine B-Zellen dazu aktivieren Antikörper zu produzieren. IL-10 ist dazu in

der Lage die Funktion von Makrophagen einzuschränken, wodurch die zelluläre Antwort unterdrückt und die humorale Immunität unterstützt wird. B-Zellen wiederum übernehmen in der Unterstützung der humoralen Immunität eine zentrale Rolle ein, da sie Antikörper produzieren. Eine zweite Klasse von B-Zellen hingegen entwickelt sich zu Gedächtniszellen, die im Gegensatz zu Gedächtniszellen des T-Zelltyps dazu befähigt sind freie Antigene zu erkennen, die nicht in einem Komplex mit MHC-Molekülen präsentiert werden. T_H17- Zellen sezernieren hauptsächlich IL-17 und spielen eine wichtige Rolle im Zuge einiger Autoimmunerkrankungen, z.B. rheumatoide Arthritis, aber auch Multipler Sklerose^{11;13}.

1.2 Signaltransduktion

Die Signaltransduktion ist in mehrzelligen Organismen für den Großteil der zellulären Funktionen verantwortlich, zudem für viele biologische Funktionen, wie Proliferation, Immunreaktionen, Transkription von Genen, etc.¹⁴. Dabei kann der Stimulus sowohl durch interne Prozesse (z.B. Blutdruck, Hormone) oder externe Stimuli (alle Sinnesorgane betreffend) ausgelöst werden. Dabei beschreibt der Signaltransduktionsweg den Mechanismus, dass das von einem Reiz ausgelöste Signal verstärkt und kaskadenartig ins Zellinnere übertragen wird, wo es verarbeitet wird. Oft kann es dabei zu einer Amplifikation des Signals innerhalb der verschiedenen Schritte kommen¹⁵. Dabei kann die Initiierung des Prozesses intrazellulär (z.B. durch Ca²⁺-Ionen) oder extrazellulär (Zytokine, Wachstumsfaktoren, etc.) ausgelöst werden, indem der Stimulus an einen Rezeptor innerhalb der Zelle, oder auf ihrer Oberfläche bindet. Dadurch kommt es zur Aktivierung von Enzymen oder sekundären Botenstoffen. Final wird das Signal in den Zellkern übertragen, wo es zu einer Genexpression kommt, die Veränderungen im Zellmetabolismus oder der Proliferation zur Folge haben kann, oder auch den programmierten Zelltod (Apoptose) herbeiführen kann. Dabei kommt es häufig zu sekundären zellulären Effekten, da viele der durch die Ligand/Rezeptor Interaktion ausgelösten transkribierten und translatierten Proteine oft selbst als Transkriptionsfaktoren oder Enzyme agieren.

1.2.1 Signalweiterleitung am Beispiel von Toll-Like Rezeptoren

Ein bekanntes Beispiel für die Signaltransduktion sind zu den PRRs gehörenden Klasse der Toll-like Rezeptoren. Sie sind eine konservierte Klasse von Proteinen, von denen jedes einzelne eine, oder mehrere strukturelle Komponenten von pathogenen Mikroorganismen erkennen kann. Klassifiziert wurden sie von Christiane Nüsslein-Volhard im Jahre 1985, als sie das Gen „Toll“ bei ihren Studien an *Drosophila* entdeckte. Analog spricht man bei Vertebraten von einem Toll-ähnlichen Gen. Heutzutage ist bekannt, dass das konservierte System bei Vertebraten, Invertebraten, als auch Pflanzen Schutz vor bakterieller, sowie fungaler Infektion gewährleistet. Gemeinsam mit den Interleukin-1 Rezeptoren bilden sie eine Superfamilie, die durch das Vorhandensein der TIR-Domäne (Toll- IL-1 Rezeptor). Heutzutage kennt man 13 *TLR*-Gene die in Mäusen und dem menschlichen Organismus exprimiert werden. Im Gegensatz zu den Antigenrezeptoren des adaptiven Immunsystems sind die TLRs zwar deutlich limitierter, jedoch hat sich im Lauf der Evolution gegen fast jeden strukturellen Bestandteil des Pathogens ein TLR entwickelt. Darüber hinaus können TLRs sowohl als oberflächenständige Rezeptoren, als auch intrazellulär auftreten, wo sie z.B. in Endosomen vorkommen und aufgenommene Pathogene erkennen.

1.2.1.1 Erkennung von bakteriellem LPS durch den TLR-4

Der TLR-4 ist ein wichtiger TLR, der bakterielles Lipopolysaccharid (kurz LPS) erkennt¹⁶. Der erste Schritt in der Bildung des TLR-4/LPS Komplex ist Bindung von LPS an das frei im Plasma vorkommende LPS-bindende Protein (LBP)^{17;18}. Im folgenden Schritt wird das nun als Monomer vorliegende LPS vom LBP auf den membranständigen Rezeptor CD14 übertragen. Dieser Komplex ist der eigentliche Ligand des TLR-4. Erst durch die Bindung eines weiteren Moleküls, MD-2, orientiert sich der TLR-4 zielgerichtet auf der Oberfläche der Membran und kann den LPS/CD14 Komplex erkennen und binden. Dabei bildet der TLR-4 Rezeptor ein Dimer. Die Signalübertragung erfolgt sodann über die Bindung des zytoplasmatischen Teils des TLR an die TIR-Domäne des Adaptermoleküls. Die Signalübertragung erfolgt über eine Reihe von Kinasen und es kommt zur Aktivierung von TAK1. Im aktivierten Zustand ist TAK1 in der Lage verschiedene Signalwege des MAP-Kinase (Mitogen-Assoziierte Protein Kinasen) Typs und den NF- κ B Weg einzuleiten. TAK1 ist selbst eine MAPKKK (MAP-Kinase-Kinase-Kinase) die dazu in der Lage ist die Map-Kinasen der p38 Familie und JNK (Jun Kinase) zu phosphorylieren und sie somit zu aktivieren. JNK phosphoryliert im Gegenzug den Transkriptionsfaktor c-Jun, der konstitutiv im Cytoplasma präsent ist. In seinem phosphorylierten Zustand transloziert es in den

Nukleus und dimerisiert dort mit c-FOS um gemeinsam den heterodimeren Transkriptionsfaktor AP-1 zu bilden¹⁹. AP-1 veranlasst u.a. die Synthese der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-12 sowie TNF α ²⁰. Ebenso werden kostimulatorische Oberflächenmoleküle wie CD80 und CD86 synthetisiert. IL-6, CD80 und CD86 sind geläufige Aktivierungsmarker in Zellkulturmethoden, um die Aktivierung von DCs und Makrophagen zu überprüfen. Im Gegensatz zu nicht stimulierten Zellen sind diese deutlich über den beschriebenen Signalweg hoch reguliert. NF- κ B ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor der in unaktivierten Zellen als ein Dimer aus p50Rel und p65Rel vorliegt. Im diesem Falle verbleibt NF κ B im Zytoplasma. Im Falle einer Aktivierung wird die Serin/Threonin-Kinase-I κ B-kinase (IKK) aktiviert, welche aus zwei katalytischen Untereinheiten (IKK α und IKK β) und einer regulatorischen Untereinheit (IKK γ) besteht. Durch die Aktivierung des Komplexes wird I κ B ubiquitinyliert, abgespalten und vom Proteasom degradiert, während das nun frei vorliegende NF κ B in den Nukleus translozieren kann und die Transkription der Zielgene auslösen kann.

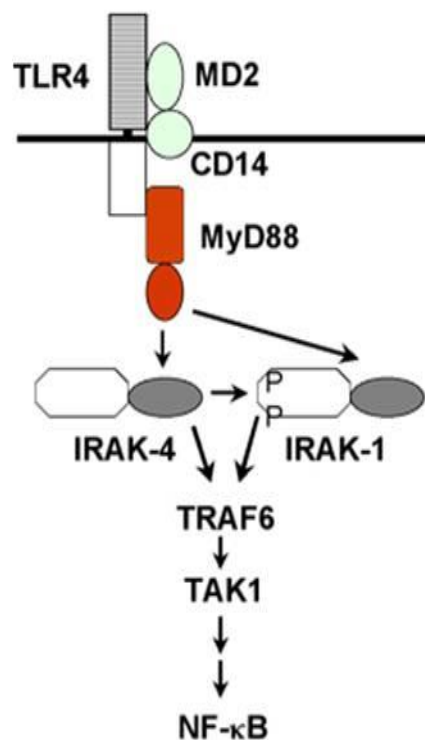


Abbildung 3: LPS induzierter Signaltransduktionsweg des TLR-4 in Mammalia

Gezeigt ist der MyD88 abhängige LPS induzierte Signaltransduktionsweg des TLR-4 mit allen in 1.4.1.1 beschriebenen Komponenten

(abgeädert nach www2.massgeneral.org/anesthesia/research_criticalcare/images/cardiac_link1.gif)

1.3 Haupthistokompatibilitätskomplex, Antigenprozessierung und Antigenpräsentation

Im Folgenden soll der natürliche Prozess der Generierung von Peptiden im Zuge der Antigenprozessierung und die Funktion des Haupthistokompatibilitätskomplexes in diesem Zusammenhang erläutert werden. Dabei werden die einzelnen Schritte im Detail der Reihe nach beleuchtet. Zunächst werden die Quellen erläutert aus denen Peptide entstammen können, gefolgt von der Markierung und Selektion der zytosolischen Antigene aus denen das Proteasom Peptide generiert. Die Peptide werden im Zytosol getrimmt, durch den TAP Transporter in das endoplasmatische Retikulum (ER) geschleust, wo sie schließlich auf MHC-Moleküle geladen werden. Der Peptid-MHC Komplex wird dann durch den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche geleitet, wo die Peptide präsentiert werden.

1.3.1 Der Aufbau und die Funktion des Haupthistokompatibilitätskomplex

Der MHC ist eine Genfamilie innerhalb der Vertebraten, die Oberflächenmoleküle kodiert, die eine Unterscheidung von Selbst und Nichtselbst ermöglichen. Entdeckt wurden sie im Zuge von Transplantationsexperimenten unter Verwendung von Inzuchtmausstämmen²¹. Es handelt sich um eine polygene und äußerst polymorphe Genfamilie. Im menschlichen Genom ist der MHC auf Chromosom 6 lokalisiert, in der Maus hingegen auf Chromosom 17. Die aus immunologischer Sicht wichtigen MHC- Moleküle unterscheiden sich in Funktion und Struktur und werden somit in die Klassen I und II unterteilt. Der MHC Genlocus kodiert die α -Kette von MHC Klasse-I-Molekülen (MHC-I-Moleküle), sowie die α - und β -Ketten der MHC Klasse-II-Moleküle (MHC-II-Moleküle). Die humanen MHC-Gene werden als humane Leukozytenantigene (kurz HLA, vom engl. *human leucocyte antigens*) bezeichnet, bei der Maus hingegen als H-2 Gene. Dabei werden wiederum einzelne Hauptgene unterschieden.

MHC-I-Moleküle befinden sich auf jeder kernhaltigen Zelle des Organismus. Sie bestehen aus einer α -Kette, die wiederum aus drei Domänen besteht ($\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$). Dabei ist $\alpha 3$ die Transmembrandomäne welche das MHC Molekül in der Plasmamembran verankert. Die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen bilden den peptidbindenden Spalt²². Im Falle der MHC-I-Moleküle ist dieser von geschlossener, taschenförmige Struktur, so dass die präsentierten Peptide in ihrer Länge auf ca. 8-12 Aminosäuren (AS) begrenzt sind^{23;24}. Zum MHC-I Komplex gehört mit β_2 - Mikroglobulin eine weitere Komponente, die nicht kovalent mit der α -Kette assoziiert ist. Sie liegt extrazellulär vor und ist nicht in der Plasmamembran verankert. Der gesamte MHC Komplex erreicht seine Stabilität erst durch die Bindung der Liganden²⁵. MHC-I-Moleküle präsentieren vor allem endogene Peptide die körpereigen

sind. Daneben werden Peptide krebserkrankter Zellen, aber auch körperfremde Peptide viraler Natur, oder von Zellen die intrazellulär von Mikroorganismen (z.B. *Mycoplasma*) befallen sind, präsentiert. Peptide die von MHC-Klasse I Molekülen präsentiert werden von zytotoxischen CD8⁺ Zellen erkannt.

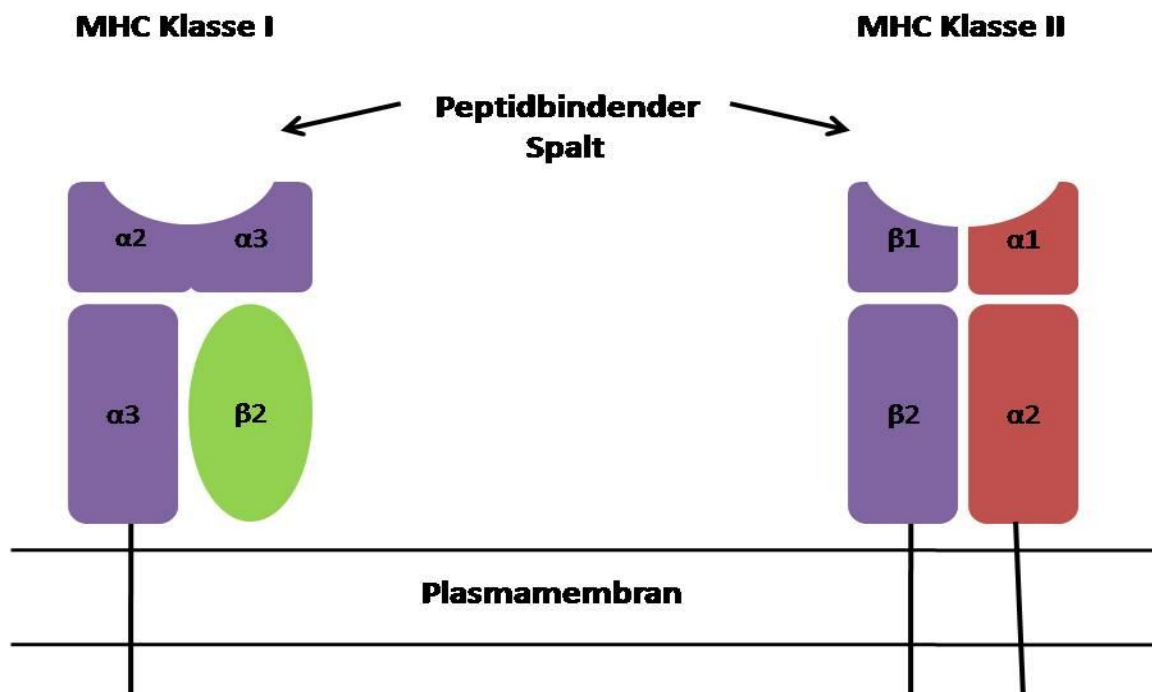


Abbildung 4: Schematische Struktur der MHC-I-, und MHC-II-Moleküle

MHC-II-Moleküle werden nur auf APCs, B-Zellen und Thymuszellen des Stromas exprimiert. Analog zu den MHC-I-Molekülen sind sie membrangebundene Glykoproteine, die sich aber im Aufbau von denen der Klasse I unterscheiden. Sie bestehen aus jeweils einer α -Kette und einer β -Kette. Die Ketten sind nicht kovalent miteinander verbunden und durchspannen die Membran zweimal, dabei tragen $\alpha 2$ und $\beta 2$ die Transmembrandomänen. $\alpha 1$ und $\beta 1$ bilden den peptidbindenden Spalt, welcher im Gegensatz zur Peptidbindetasche der MHC-I-Moleküle nicht geschlossen ist, sondern an beiden Enden geöffnet ist (Abbildung 4). Peptide die von ihm gebunden werden, ist es ermöglicht an beiden Seiten überzuhängen. Somit können sie eine Länge von bis zu 25 AS erreichen, wobei die minimale Länge etwa 12 AS beträgt²⁶. Die Epitope, die von MHC-II-Molekülen präsentiert werden sind von exogener Natur. Beispielsweise nehmen Makrophagen via Phagozytose Pathogene oder infizierte Zellen auf, die im Phagolysosom verdaut werden. Schließlich werden die Pathogene von der Prozessierungsmaschinerie zu Peptiden generiert, auf MHC-II-Moleküle geladen und externalisiert²⁷. Diese Peptide werden durch CD4⁺- T-Zellen erkannt. Die kodominante Expression der HLA- Gene, sowie die Polygenie und die polymorphe Ausprägung die vor allem im Bereich des

peptidbindenden Spalts besonders hoch ist, erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass Peptide aus verschiedensten Antigenquellen durch den MHC präsentiert werden können.

1.3.2 Antigenprozessierung

Antigenprozessierung beschreibt den Prozess aus einem intakten Antigen Peptide zu generieren, die dann im Zuge der Antigenpräsentation von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden.

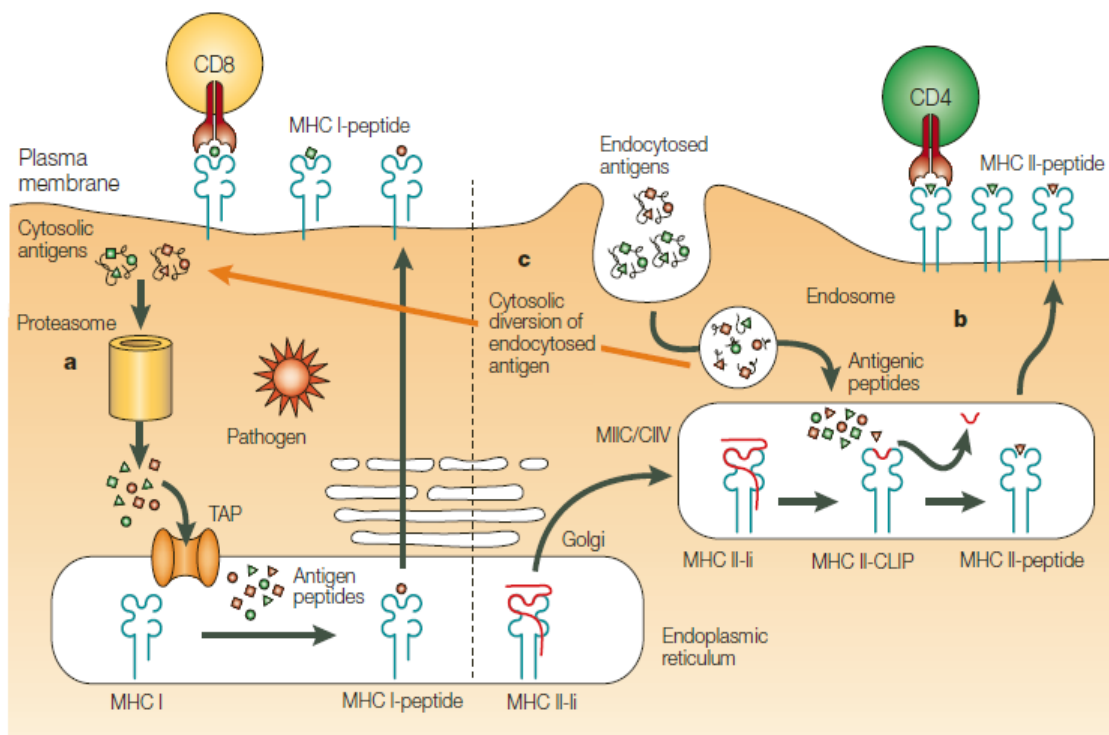


Abbildung 5: Übersicht über die Herkunft der Antigene, der daraus resultierenden Peptide und an der Antigenprozessierung beteiligten Zellkompartimente²⁸

Der Ursprung der resultierenden Peptidliganden ist von unterschiedlicher Natur. MHC-Klasse I Epitope entstehen aus endogenen, zytosolischen Antigenen, die der Klasse II hingegen aus exogenen Pathogenen, die via Phagozytose in die Zelle internalisiert wurden. MHC-I-Peptide werden von $CD8^+$ Zellen erkannt, die Moleküle der MHC-Klasse II hingegen von $CD4^+$ Zellen.

Abbildung 5 gibt eine Übersicht der präsentierten Antigenpeptide, darüber hinaus gibt es ein als Kreuzpräsentation (vom engl. *cross presentation*) bezeichnetes Phänomen. Hier werden Antigene extrazellulär aufgenommen, dann aber nicht auf MCH-Klasse II, sondern auf MHC-I -Moleküle geladen. Kreuzpräsentation wird vor allem von $CD8^+$ - DCs durchgeführt²⁹. Diese können dann in einem als „*Cross-priming*“ beschriebenen Prozess naive zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen stimulieren²⁹.

Im Folgenden wird detaillierter auf die Antigenprozessierung der MHC-I-Moleküle eingegangen. Vom zytosolischen Antigen bis zu dem an der Zelloberfläche präsentierten Peptid sind viele Schritte notwendig. In einem komplexen Prozess werden zytosolische Peptide zunächst proteolytisch verdaut, dabei handelt sich um körpereigene Peptide, oder aber körperfremde. Diese können von virus-infinzierten Zellen stammen, oder von Zellen die mit intrazellulär replizierenden Bakterien infiziert sind. Eine weitere Quelle für endogene Peptide stellen defekte ribosomale Produkte (kurz DRiPs, vom engl. *defective ribosomal products*) dar³⁰⁻³³. Möglicherweise werden bis zu 70 % der Antigene aus DRiPs gebildet³⁴. Hierbei handelt es sich um missgefaltete und falsch translatierte Peptide, z.B. durch Leserasterverschiebungen, aus Introns translatierte Proteine bei denen die mRNA unvollständig gespleißt wurde oder unvollständig gefaltete Proteine. Generell werden DRiPs ubiquitinyliert und vom Proteasom abgebaut³⁵ und die Peptide schließlich präsentiert. Vermutlich stellen DRiPs die Hauptquelle für Selbstantigene und virale Antigene für MHC-Klasse I restringierte Antigenpräsentation dar^{30,32,35,36}. Allerdings werden 99 % dieser Peptide binnen einer Minute zerstört und sind somit für eine spätere Präsentation verloren³⁷. In *Bone-Marrow derived Dendritic Cells* (BMDCs) und Makrophagen wurde *in vitro* das Phänomen der Ausbildung von DC-aggresomähnlichen-induzierbaren Strukturen (kurz DALIS, vom engl. *dendritic cell aggresome-like Induced structures*) beobachtet³⁸. Hierbei handelt es sich um Aggregate die vermutlich aus DRiPs bestehen. Diese transienten Strukturen bilden sich ca. 4 h nach der Stimulation der Zelle und sind ca. 30 h nach der Aktivierung nicht mehr nachzuweisen. In diesem verlängerten Zeitraum ist es der DC möglich auf die DRiPs zugreifen zu können und gleichzeitig mit der Expression der Korezeptoren zu synchronisieren. Somit wird die Chance weiter erhöht, Proteine zu präsentierbaren Peptiden abbauen zu können.

1.3.3 Schritte vom zytosolischen Antigen zum getrimmten Peptid

Der Beginn der Antigenprozessierung findet im Zytosol statt³⁹. Proteine die im Zytosol vorkommen können mit Ubiquitin (Ub) versehen werden und sind somit für den proteasomalen Verdau markiert⁴⁰. Dabei kann zwischen verschiedenen Markierungen mit Ub unterschieden werden. Nur polyubiquitinierte Proteine, deren Ubiquitine über Lys48 verknüpft sind, sind für den Verdau bestimmt⁴¹ (siehe Abbildung 6). Zunächst wird Ub durch das Ubiquitinähnliche-modifizierende aktivierende Enzym 1 (kurz Uba-1, vom engl. *ubiquitin-like modifier Activating enzyme 1*) in einem ATP verbrauchenden Schritt aktiviert. Im zweiten Schritt erhält das Ub-konjugierende Enzym E2 ein Ubiquitinmolekül von Uba-1 und interagiert mit dem Ub-ligierenden Enzym E3. Im letzten Schritt wird das Ub-Molekül auf das Zielprotein übertragen. Dabei ist E2 meistens für die Art der Verknüpfung der Lysinreste verantwortlich, E3 hingegen erkennt das Substrat, welches ubiquitinyliert werden soll.

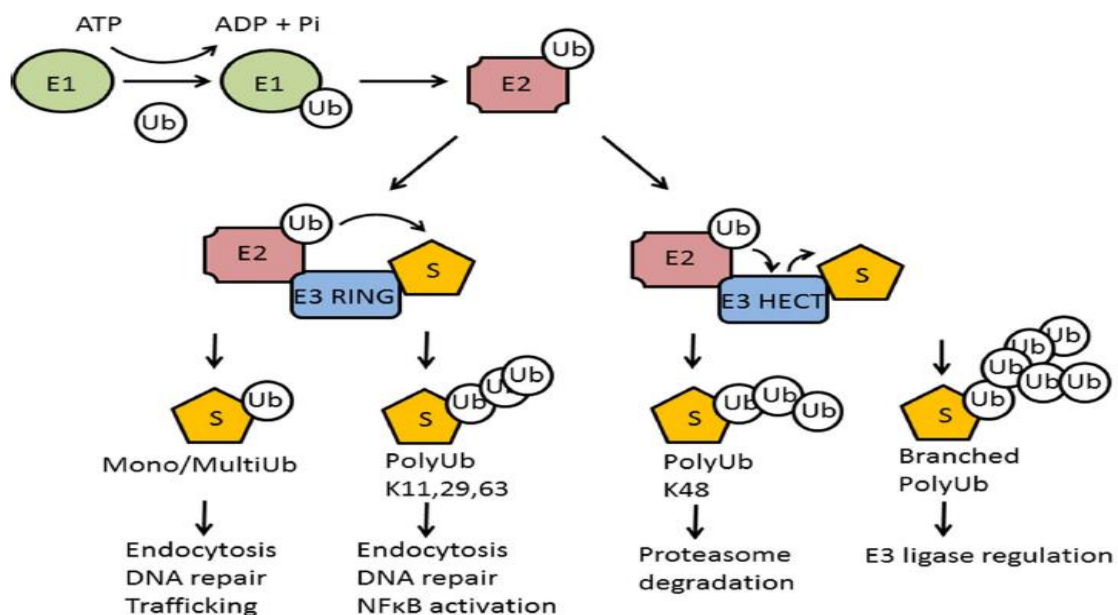


Abbildung 6: Die Ubiquitinylierung von Proteinen und das Schicksal der markierten Proteine⁴²

Polyubiquitinierte Proteine können für die Degradation markiert sein, wenn die Lysine an Position 48 vernetzt sind, sind sie hingegen über das Lysin an Position 63 vernetzt werden sie nicht proteasomal abgebaut, sondern übernehmen Funktionen im Bereich der DNA-Reparatur, oder der Aktivierung des NFκB.

Im Folgenden beginnt das Proteasom mit der Initiierung des Prozesses des proteolytischen Verdau. Die resultierenden Peptidfragmente weisen eine Länge von ca. 4-25 AS auf⁴³ und werden größtenteils durch zytosolische Aminopeptidasen vollständig degradiert. Dabei können sie bis zu einzelnen Aminosäuren hin abgebaut werden, welche wiederum zur Synthese von neuen Proteinen genutzt werden können.

1.3.4 Das Proteasom

Das Proteasom ist ein multikatalytischer Proteinkomplex der aus mehreren Untereinheiten besteht und dem eine Rolle in der Proteinqualitätskontrolle zukommt, indem es für die Degradation von Proteinen verantwortlich ist⁴⁴. Es ist in allen eukaryotischen Zellen zu finden, sowie in allen Archaeen und einigen Bakterien. In seiner Gesamtheit ist er um 2000 kDa groß und setzt sich aus einem Kernelement auch „20S core Partikel“ genannt und zwei 19S Untereinheiten zum 26S Proteasom zusammen. Dabei weist die 20S Untereinheit katalytische Aktivität auf, hingegen fungieren die 19S Untereinheiten als Regulatoren. Sie schließen wie ein Deckel den aktiven Kern und regulieren unter ATP-Verbrauch den Eintritt zum 20S-Komplex, indem sie ubiquitinylierte Proteine erkennen und teilweise schon entfalten⁴⁵. Die 20S Untereinheit ist ein aus vier heptameren Ringen bestehender Komplex ($\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$). Dabei werden die beiden äußeren Ringe von den α -Untereinheiten gebildet und sind vornehmlich struktureller Natur. Hingegen weisen die aus den β -Untereinheiten bestehenden inneren Ringe katalytische Aktivität auf. Der innere Bereich des Proteasoms ist begrenzt, die Öffnungen können sich auf bis zu 12 Å (1200 pm) verengen. Das hat zur Folge, dass nur entfaltete Proteine in das Innere des Proteasoms gelangen, des Weiteren muss das Ub vor dem proteolytischen Verdau entfernt werden⁴⁶. Mittlerweile ist auch die Kristallstruktur des eukaryotischen Proteasoms bekannt⁴⁷. Im Gegensatz zum „Urproteasom“ der Archaeen sind die heptameren Ringuntereinheiten nicht identisch. Lediglich drei der β -Untereinheiten weisen katalytische Aktivität auf, nämlich β_1 , β_2 und β_5 . Somit befinden sich insgesamt sechs katalytische Zentren im Inneren des eukaryotischen Proteasoms. Der katalytische Mechanismus ist bei allen Untereinheiten von ähnlicher Natur, sie hydrolysieren die Peptidbindungen auf der Carboxylseite bestimmter Aminosäuren. Dabei weist jede Untereinheit eine bestimmte Spezifität auf, je nach Art der erkannten Aminosäure. Die β_1 - Untereinheit besitzt Caspase-ähnliche Aktivität, was bedeutet dass sie bevorzugt nach Asparaginsäure (Asp) und Glutaminsäure (Glu) schneidet. Die β_2 - Untereinheit hingegen weist Trypsin-ähnliche Aktivität auf und schneidet somit bevorzugt nach Arginin (Arg) und Lysin (Lys). Schließlich besitzt die β_5 - Untereinheit chymotryptische Aktivität und hydrolysiert nach Isoleucin (Ile), Leucin (Leu), Methionin (Met), Phenylalanin (Phe), Tryptophan (Trp), Tyrosin (Tyr) und Valin (Val)^{48;34}. Durch diese chymotryptische Aktivität werden Peptide generiert, die an ihrem C-Terminus hydrophobe Reste tragen, mit denen eine effektive Bindung an MHC-I-Moleküle möglich ist⁴⁹⁻⁵¹. Neben dem konstitutiven Proteasom existiert in einigen Säugerspezies ein weiterer, als Immunoproteasom, annotierter Typ der Protease. Unter IFN- γ Einfluss werden die katalytischen Untereinheiten β_1 , β_2 und β_5 durch β_{1i} (LMP2), β_{2i} (MECL-1) und β_{5i} (LMP7) ersetzt^{51;52}. Des Weiteren wird das regulatorische Element 19S unter Einfluss von IFN- γ durch den Proteasomaktivator (kurz PA28, auch 11S

Regulator genannt) ersetzt^{53;54}. Allerdings können auch heterodimere Hybrid-Proteasome auftreten, die aus PA28, 20S und einem 19S Element bestehen⁵⁵. Im Gegensatz zum 19S Regulator der für den Einlass von Peptiden in den 20S core Partikel ATP benötigt, ist PA28 ATP-unabhängig. Das Immunoproteasom generiert Peptide, die sich in Spezifität, Eigenschaften und der Anzahl von denen des konstituiven Proteasoms unterscheiden^{56;57}. Mittlerweile ist ein dritter Proteasomtyp entdeckt worden, der ausschließlich Thymus vorkommt. Das sogenannte Thymoproteasom wird exklusiv von den Epithelzellen des Cortex (kurz cTECS, vom engl. *cortical thymic epithelial cells*) exprimiert^{58;59}. Analog zum Immunoproteasom sind die katalytisch aktiven Untereinheiten $\beta 1i$ und $\beta 2i$ vorhanden, allerdings ist die $\beta 5i$ Untereinheit durch $\beta 5t$ ersetzt (vgl. Abbildung 7⁵⁹). Dem Thymoproteasom kommt eine Rolle in der Entwicklung der CD8⁺ Zellen zu, in Abwesenheit der $\beta 5t$ Untereinheit weisen diese ein verändertes Repertoire an TCRs auf. Der genaue Zusammenhang ist noch nicht komplett verstanden. Es konnte allerdings herausgefunden werden, dass das Thymoproteasom auch für die positive Selektion von CD8⁺ Zellen notwendig ist. Durch die herabgesetzte chymotryptische Aktivität dieses Proteasomtyps werden MHC-Klasse I Peptidkomplexe gebildet, die dafür verantwortlich sind, dass Hauptrepertoire von CD8⁺ positiv Zellen zu selektionieren. Studien an thymoproteasomdefizienten Mäusen zeigten, dass ein verändertes Repertoire an MHC-Klasse I Komplexen gebildet wurde, dass nicht in der Lage war einen Großteil der CD8+ Zellen positiv selektionieren zu können⁶⁰.

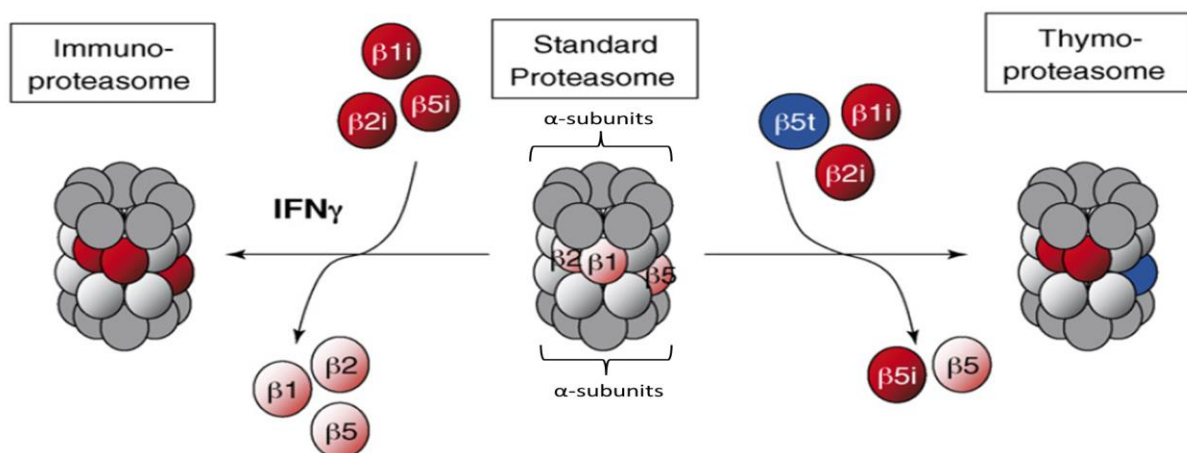


Abbildung 7: IFN- γ induzierter Austausch der Proteasomuntereinheiten und Inkorporation der Untereinheit $\beta 5t$ in das Thymoproteasom (abgeändert nach ⁵⁹)

1.3.5 Zytosolische Proteasen und der TAP-Transporter

Die vom Proteasom generierten Peptide weisen eine Länge von 3-25 AS auf. Somit haben nicht alle Peptide die benötigte Länge von 8-10 AS um als Peptid-Ligand dienen zu können. Viele der Peptide sind zu kurz um an MHC-I-Moleküle gebunden zu werden. Sie werden durch zytosolische Proteasen bis hin zu einzelnen AS degradiert. Andere Peptide wiederum sind zu lang um direkt als Peptidligand zu fungieren⁶¹. Diese Peptide werden weiter getrimmt um an MHC-I-Moleküle binden zu können. Das Trimming wird von mehreren zytosolischen Proteasen bewerkstelligt, die sich in ihren Spezifitäten unterscheiden^{62:63}. Zum einen ist hier die Serinprotease Tripeptidyl-Peptidase II (TPPII) zu nennen, ihrem Namen entsprechend schneidet sie Tripeptide vom N-Terminus der Oligopeptide⁶⁴. Dem Enzym kommt eine wichtige Rolle bei der MHC-Klasse-I Prozessierung zu, indem es neben Endopeptidaseaktivität auch Exopeptidaseaktivität aufweist. Dabei schneidet die Aminopeptidase Peptide unabhängig von ihrer Sequenz. Drei weitere Aminoendopeptidasen prozessieren die Peptide weiterhin, nämlich die Bleomycin Hydrolase, die Leucin-Aminoendopeptidase (LAP) und die Puromycin sensitive Aminoendopeptidase. Dabei wird LAP durch IFN- γ induziert, welches gleichzeitig die Antigenpräsentation erhöht⁶⁵. Man fand heraus, dass LAP eine entscheidende Rolle in der Immunantwort von Pflanzen spielt, indem sie z.B. auf Pathogene, oder Angriff eines saugenden Insektes, wie der Spinnmilbe, Signaltransduktionswege einleitet, die zur Aktivierung von Genen leiten, die das beschädigte Gewebe regenerieren können. Schließlich ist noch die Thimet-Oligopeptidase identifiziert worden, welche dafür verantwortlich gemacht wird den Großteil der zytosolischen Peptide zu degradieren⁶⁶.

Der Antigenpeptid-Transporter (kurz TAP, vom engl. *Transporter associated with antigen processing*) ist ein heterodimeres Transmembranprotein aus der Familie der ABC-Transporter⁶⁷. Es gewährleistet den Transport der getrimmten Peptiden in das endoplasmatische Retikulum (kurz ER). Es setzt sich aus den Proteinen TAP-1 und TAP-2 zusammen, die jeweils eine hydrophobe, in das ER reichende, Transmembrandomäne und eine ATP- bindende (ABC) Domäne aufweisen, welche auf der zytosolischen Seite lokalisiert ist^{68:69}. TAP-1 und TAP-2 bilden die peptidbindende Tasche. Der Transportmechanismus von Peptiden ist ATP-abhängig⁷⁰. Die Spezifität von TAP ist begrenzt, Peptide mit einer Länge von 8-12 AS werden favorisiert transloziert, allerdings können auch längere Peptide gebunden werden. Diese können bis 30 AS lang sein, werden jedoch mit einer deutlich geringeren Effizienz in das ER transportiert^{71:72}.

1.3.6 Finale Prozesse der Antigenprozessierung im ER

Das ER ist ein Zellorganell in eukaryotischen Organismen. Es kann zwischen dem glatten und dem rauhen ER unterschieden werden. Das glatte ER ist Ort der Lipid und Steroidsynthese, im rauhen ER werden Proteine synthetisiert. Es handelt sich um ein System aus Membranen und Vesikeln. Nachdem von TAP selektierte Peptide in das ER transloziert worden sind, werden diese weiterhin modifiziert und schließlich auf MHC I Moleküle geladen. Auf der anderen Seite ist das ER dazu befähigt Proteine die missgefaltet sind, oder eine geringe Affinität für MHC I Peptide haben in einem Adenosintriphosphat (kurz ATP)-abhängigen Schritt zurück das Zytoplasma zu transportieren⁷³. Im humanen System binden neu synthetisierte MHC I α -Ketten nach Eintritt in das ER zunächst an das Chaperon Calnexin. Durch das Zusammenwirken der Chaperone des Peptidbeladungskomplexes wird das komplett gefaltete und mit Peptid beladene MHC-I-Molekül aus dem ER transportiert und gelangt durch den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche, wo das Epitop den CD8⁺ T-Zellen präsentiert wird.

1.4 DALIS

Im Folgenden werden die bereits erwähnten DALIS im Zusammenhang mit der Reifung von DCs und ihrer Funktion als Quelle für Peptide näher betrachtet. Sowohl die Mechanismen die zur Bildung von DALIS führen, als auch die Zusammensetzung dieser Strukturen sind weitgehend unbekannt.

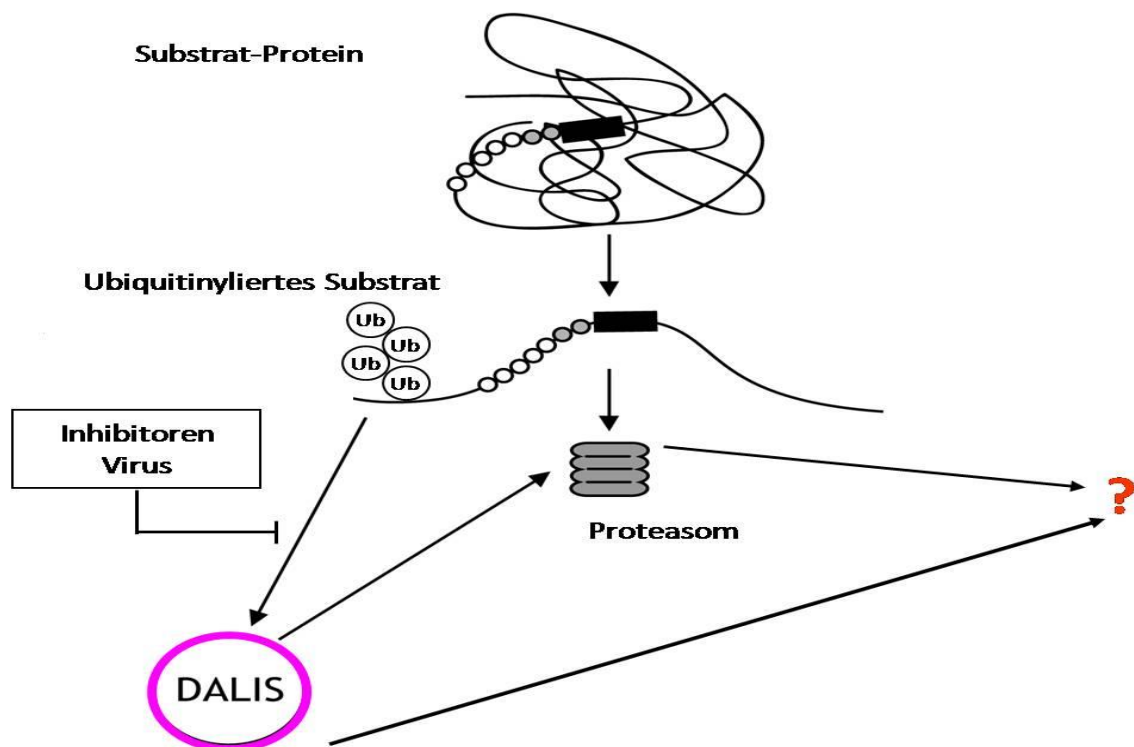


Abbildung 8: Der Zusammenhang von DALIS in MHC-Klasse-I restringierter Antigenpräsentation

Ubiquitinylierte Proteine werden im Zytosol vom Proteasom degradiert, oder in DALIS transient gelagert.

Im Zuge einer proinflammatorischen Stimulation durch LPS können in dendritischen Zellen Aggregate identifiziert werden, die als DALIS beschrieben wurden³⁸. Zusätzlich treten DALIS auch in DCs auf, die mit Influenzavirus infiziert wurden, wobei das Nukleoprotein des Virus in DALIS nachzuweisen war. Später detektierte man DALIS auch in Makrophagen⁷⁴. Zuerst vermutete man, es könne sich um Aggresome (Proteinaggregate, die gebildet werden, wenn die Degradierungsmaschinerie gestört ist) oder Einschlusskörperchen handeln, fand aber heraus, dass sie im Gegensatz zu klassischen Aggresomen nicht perizentrisch lokalisiert sind und nicht von Vimentin umschlossen sind^{75;76}. DALIS sind motile Strukturen, die innerhalb der Zelle zu größeren Aggregaten fusionieren können⁷⁷. Es handelt sich um transiente Strukturen, die ca. vier Stunden nach Stimulation der Zelle gebildet werden und sich im weiteren Zeitverlauf bis auf 3- 5 µm (nach ca. 12-15 h) vergrößern.

Im Folgenden beginnen sie sich wieder zu verkleinern um schließlich nach 24 - 36 Stunden nicht mehr nachweisbar zu sein³⁸. Es wurde gezeigt, dass nach Zugabe des Proteasominhibitors Epoxomicin, DALIS nicht abgebaut werden. Dies impliziert, dass das Proteasom für die Degradation der DALIS verantwortlich ist³⁸. Die Bildung von DALIS ist abhängig von der Synthese von Proteinen, was zu der Annahme führte, dass hauptsächlich neu synthetisierte, ubiquitinylierte Proteine in die Aggregate inkorporiert werden. Tatsächlich konnten in Versuchen mit einem monoklonalen FK2 Antikörper der gegen mono-, und polyubiquitinylierte Proteine gerichtet ist, DALIS spezifisch nachgewiesen werden³⁸. Es wurde durch Versuche mit dem Antibiotikum Puromycin nachgewiesen, dass DALIS aus DRiPs zusammengesetzt sind. Puromycin wird fehlerhafterweise anstelle von Aminosäuren in Proteine eingebaut^{78;79}. Durch Puromycin markierte DRiPs können fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden. Die DRiPs werden in das Zentrum der DALIS eingebaut und aggregieren nicht peripher, was impliziert, dass DALIS durchaus eine organisierte Struktur aufweisen⁷⁷. Die Ergebnisse von Lelouard führten zu Spekulationen, dass dendritische Zellen dazu in der Lage sind, den Abbau von DRiPs durch die Bildung von DALIS zu regulieren, da diese in Regel zügig vom Proteasom degradiert werden⁸⁰. Somit lassen sich DALIS als Antigendepots endogener Peptide verstehen, durch deren Bildung die Zelle längeren Zugriff auf diese Peptide hat, wodurch es ebenfalls zu einer verzögerten Antigenpräsentation kommt. Nach Verschwinden der DALIS hätten die dendritischen Zellen die Lymphknoten in ihrem reifen Status erreicht und könnten somit effektiv T-Zellen aktivieren. Eine weitere Überlegung beschäftigt sich damit, dass DALIS als Stressindikator zu verstehen sind. Sie werden als Antwort auf pathogen-assoziierte molekulare Muster hin gebildet, da in diesem Fall eine stark erhöhte Translation und damit auch DRiPs Bildung zu verzeichnen ist⁸¹. Die genaue Zusammensetzung von DALIS ist bis heute unbekannt, allerdings konnten die Enzyme des Ubiquitinsystems E1, E2_{25K} und die „Chaperon associated Ubiquitin- Ligase“ CHIP in DALIS nachgewiesen werden⁷⁷. Mittlerweile wurden auch Mitglieder der BCL2-assoziierten Athanogene (kurz BAG, vom engl. *BCL2-associated athanogene*) Familie (BAG1 und BAG3) in DALIS identifiziert⁸². Das Ko-Chaperon BAG1 interagiert mittels einer ubiquitinähnlichen Domäne mit dem Proteasom wodurch die Assoziation mit CHIP stimuliert wird⁸³. BAG3 rekrutiert p62 zum CHIP Komplex, wozu es zu einer Degradierung kommt⁸². Die Mechanismen die zur Bildung von DALIS führen sind unbekannt. Allerdings wurde gezeigt das Hitzeschockproteine eine Rolle spielen könnten, da sich DALIS bei Temperaturschwankungen bilden⁸⁴. Die Formation von DALIS ist eng an die Aktivierung der Zelle geknüpft. Durch Inhibition einzelner Mitglieder der Aktivierungskaskade kommt es zur Unterdrückung der DALIS-Bildung⁸⁵ Somit lässt sich sagen, dass die Zelle aktiviert sein muss damit es zu einer DALIS-Bildung kommt.

1.5 Die Bedeutung der PI-3 Kinase und Caspasen bei der DALIS-Bildung

Die Mechanismen, die zur Bildung von DALIS führen, sind weitestgehend unbekannt. Allerdings ist ein klarer Zusammenhang zwischen der Aktivierung der Zelle und der Formation der Polyubiquitinaggregate erkennbar. Fassbender bewies, dass durch Inhibition einzelner Mitglieder der Aktivierungskaskade der BMDCs sowohl die Expression einiger Oberflächenmoleküle herunter reguliert wird, sowie die Bildung von DALIS deutlich verringert ist, oder teilweise komplett ausblieb^{86;85}. In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI-3 Kinase) eine zentrale Rolle bei der DALIS-Bildung zukommt. Die PI-3 Kinase ist eine Lipid-Kinase, der im Organismus Rollen in der Differenzierung, der Proliferation, der Migration als auch dem Überleben der Zelle zukommen. Analog zu anderen Kinasen geht die Aktivierung ihrer Signalmoleküle mit der Phosphorylierung dieser einher.

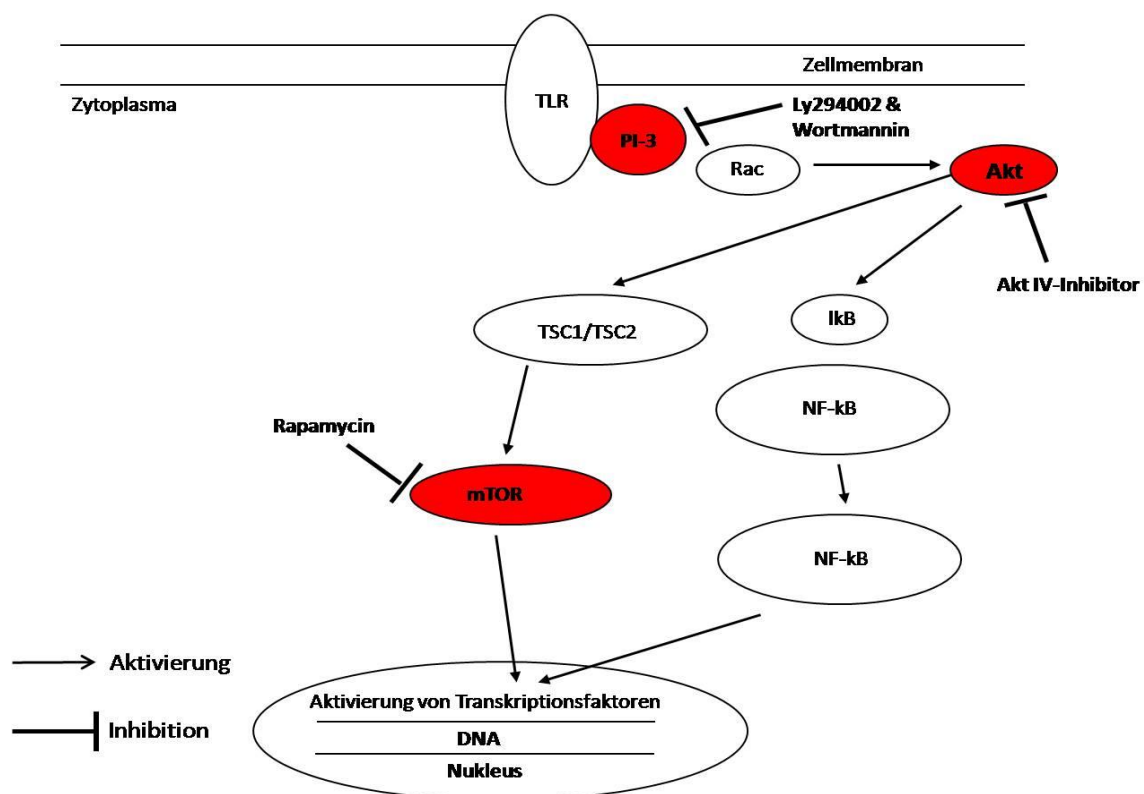


Abbildung 9: Schema der beteiligten Proteine innerhalb der PI-3/Akt Signaltransduktionskaskade

Die PI-3/Akt Signaltransduktionskaskade wird durch Stimulation des TLR ausgelöst. Zunächst wird die PI-3 Kinase aktiviert. Diese kann durch Ly294002 und Wortmannin inhibiert werden. Akt ist ein weiteres Protein innerhalb der Kaskade und wird durch den Akt V-Inhibitor inhibiert. Schließlich wird mTOR durch Rapamycin inhibiert. Durch mTOR und Akt wird der NFκB Weg eingeschlagen und Transkriptionsfaktoren im Nucleus aktiviert. Rot markiert sind die Komponenten, die inhibiert wurden. mTOR = mammalian target of rapamycin; NFκB = nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells; TSC = tuberous sclerosis complex; Rac ist eine GTPase

Ein weiteres Mitglied der PI-3 Kinase Signalkaskade ist Akt (Protein Kinase B). Die Serin/Threonin Kinase überträgt Phosphatgruppen auf ihre Zielmoleküle und sorgt somit für deren Aktivierung. Akt reguliert das Überleben von Zellen, indem es z.B. an das „Downstream-Element“ Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) bindet, welcher schließlich die Transkription der DNA im Nukleus reguliert. Die Serin/Threonin Kinase „mammalian target of rapamycin“ (mTOR) gehört ebenfalls zu der Familie der PI-3 Kinasen und übernimmt zentrale Funktionen in der Signaltransduktion, indem es die Translation initiiert und an der Proliferation und Differenzierung von Zellen beteiligt ist. Rapamycin ist ein potenter Inhibitor für mTOR und findet Anwendung in der Krebstherapie, da es vor allem stark proliferierende Zellen in ihrem Wachstum hemmt.

Es wurde die Vermutung angeführt, dass sich DALIS in BMDCs und Makrophagen nur bilden, wenn diese apoptotisch werden. Das impliziert, dass es in lebenden, vitalen Zellen nicht zur Ausbildung von DALIS kommen kann. Um diesen Aspekt näher zu beleuchten kann die Aktivität einzelner Caspasen untersucht werden. Diese Cystein-Proteasen sind Schlüsselenzyme im Zuge der Apoptose, indem sie diese induzieren können. Ihr Name leitet sich von der englischen Bezeichnung „cysteine-aspartic protease“ ab, da sie Proteine C-terminal nach Aspartat schneiden können.

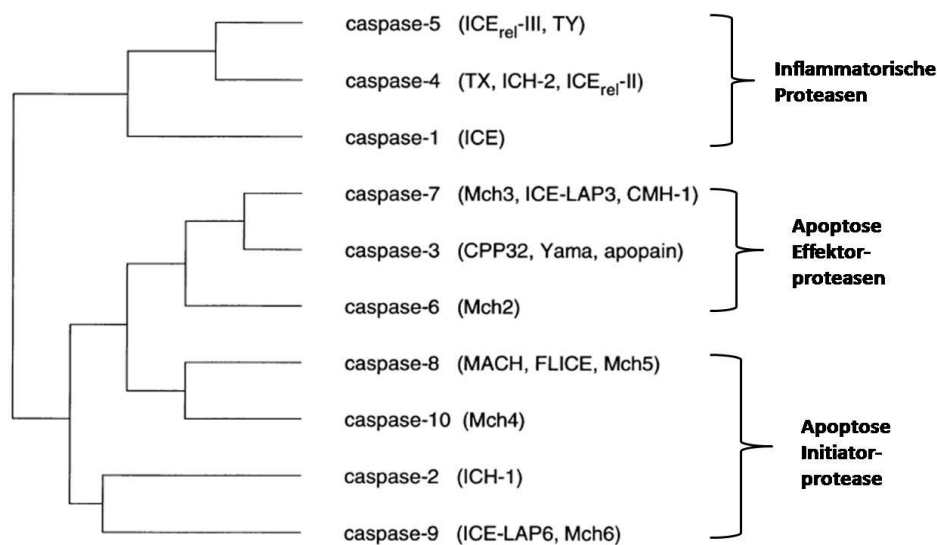


Abbildung 10: Phylogenetischer Stammbaum der humanen Caspasen der CED3 Protease Familie (abgeändert nach⁸⁷)

Caspasen können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden, Initiatorcaspasen und die Effektorcaspasen. Initiatorcaspasen schneiden die Pro-Caspase Vorläufer der Effektorproteasen, welche dadurch aktiviert werden. Daraufhin können Effektorcaspasen ihre entsprechenden Substrate umsetzen und werden im Zuge der apoptotischen Signaltransduktionskaskade in großen Mengen aktiviert^{88;89}. Des Weiteren spielen einige Caspasen im Zuge von inflammatorischen Prozessen eine Rolle (Abbildung 10)⁹⁰.

1.6 Proteomik

Genetik war und ist für viele Naturwissenschaftler von entscheidender Bedeutung. Im Zuge der Entwicklung neuerer Methoden wurde der Fokus auf das Studium des Transkriptoms gelegt. In den letzten Jahren rückte immer mehr die Erforschung des Proteoms, die Proteomik in den Mittelpunkt. Der Begriff wurde erstmals von Wilkins im Jahre 1994 geprägt⁹¹. Proteomik beschreibt den Zustand aller Proteine innerhalb einer Zelle, oder eines Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt unter definierten Bedingungen. Im Vergleich zum relativ statischen Genom ist der Zustand des Proteoms hoch dynamisch, da seine Zusammensetzung und Menge abhängig von den translatierten Proteinen ist, sowie deren Modifikation und deren Degradierung⁹². Ein Beispiel für diese Dynamik und deren Auswirkung sind die Kaulquappe und der ausgewachsene Frosch, die beide mit dem gleichen Genom, aber unterschiedlichem Proteom ausgestattet sind. Proteine sind also als die Hauptregulatoren dieser Diversität anzusehen.

Ein Vorteil der Proteomstudien ist, dass im Gegensatz zur Genetik alternative Spleißformen, sowie posttranslationale Modifikationen (kurz PTMs) untersucht werden können. Dazu gehören u.a. die Glykosylierung, Acetylierung und Methylierung. Eine besondere Rolle kommt der Phosphorylierung zu, da sie bei der Signalweiterleitung innerhalb der Zelle eine zentrale Rolle einnimmt. Man geht davon aus, dass 30 % der Proteine innerhalb einer Zelle zu jedem Zeitpunkt ihrer Expression phosphoryliert sind⁹³.

Im humanen Genom können einige Gene bis zu 100 verschiedene Proteine kodieren. Die Herausforderung in näherer Zukunft wird die Detektion und Quantifizierung aller Proteine mitsamt der PTMs innerhalb einer Zelle, oder eines Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt zu definierten Konditionen sein. Durch die Entwicklung neuer Methoden hat sich das Verständnis des Proteoms merklich verbessert, allerdings ist es noch nicht möglich das Proteom einer Zelle komplett zu definieren. In den letzten Jahren hat sich die Massenspektrometrie (MS) als Analysetechnik zur Strukturaufklärung von Proteinen durchgesetzt.

1.6.1 Massenspektrometrie

MS ist heutzutage eine Schlüsseltechnologie im Feld der Proteomik. Bereits vor knapp 60 Jahren wurden die ersten Massenspektrometer genutzt, um die Struktur von Molekülfragmenten zu studieren⁹⁴. Zunächst war die MS eine analytische Methode in der Physik und Chemie, heutzutage spielt sie auch der Biologie eine wichtige Rolle. MS basiert auf der Messung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Ein Massenspektrometer setzt sich aus drei zentralen Elementen zusammen, der Ionenquelle, dem Analysator, in dem die erzeugten Analytionen nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z) aufgetrennt werden und dem Detektor (siehe Abbildung 11, Bild A).

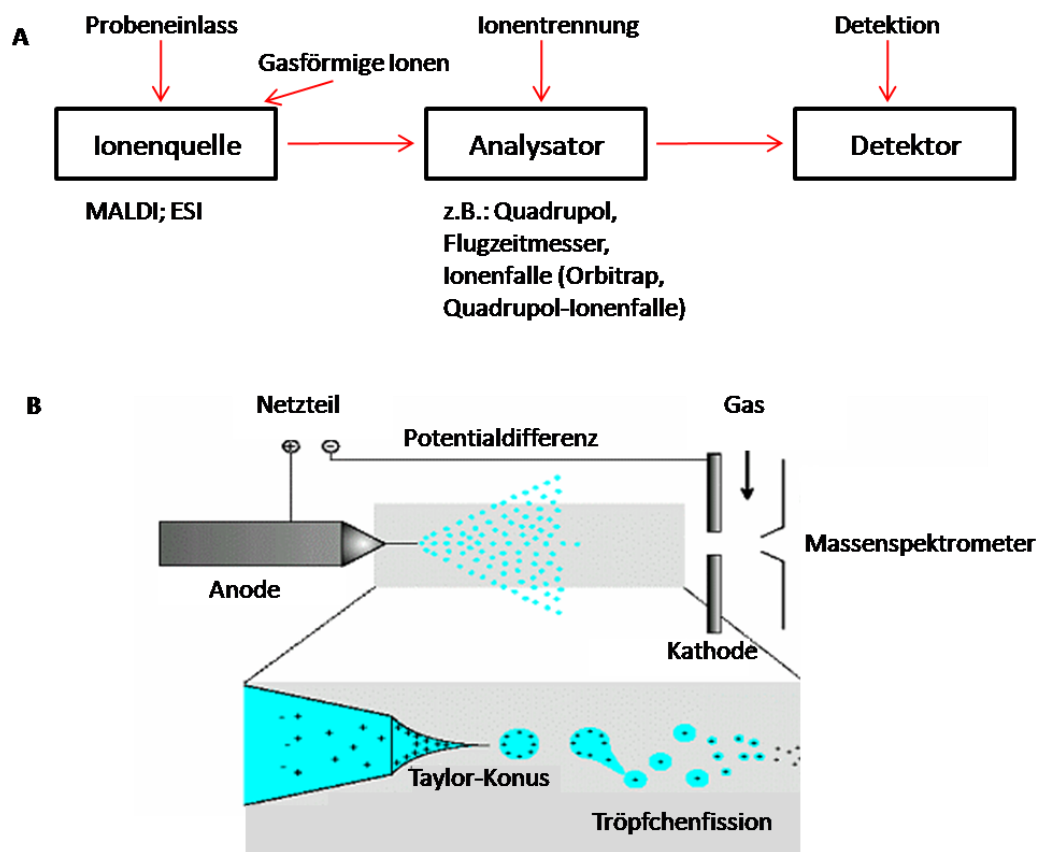


Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers und der Elektrospray-Ionisation

Abbildung A zeigt die drei zentralen Elemente eines Massenspektrometers. Bild B zeigt die schematische Darstellung der Elektrospray-Ionisation und den Übergang des Analyten in die Gasphase (abgeändert nach www.dia.unisa.it)

In der Ionenquelle eines Massenspektrometers muss der Analyt in die Gasphase überführt werden. Es gibt verschiedene Techniken große Biomoleküle, wie z.B. Proteine und Peptide zu ionisieren. Die verbreitetsten Methoden sind die Elektrospray- Ionisierung

(kurz ESI) und die Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation (kurz MALDI, vom engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*).

Beide Methoden werden als schonend bezeichnet, da die Biomoleküle im Zuge der Ionisierung nicht fragmentiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde mit ESI gearbeitet. Hier wird der vorliegende Analyt zunächst ionisiert und dann nebulisiert. Nach Austritt aus der unter Spannung stehenden Kapillare, wird der nebulisierte Analyt durch ein orthogonal zur Kapillare gelegtes elektrisches Feld zum Massenspektrometer geleitet. Dabei bildet sich ein sogenannter Taylor-Konus, in dem die geladenen Tröpfchen zu einem Flüssigkeitsfilament übergehen und in einem Spray auf das Massenspektrometer auftreffen (Abbildung 11, Bild B). Während dieses Prozesses geht der Analyt komplett in die Gasphase über. Dabei wird in der Regel Stickstoffgas eingeleitet, wodurch die Vernebelung des Analyten und die Verdampfung des Lösungsmittels unterstützt werden. Die erzeugten Ionen gelangen in den Analysator, der sie nach ihrem m/z Verhältnis trennt. Analysatoren lassen sich auf Grund ihrer physikalischen Parameter unterscheiden, z.B. Quadrupol Massenspektrometer, Ionenfallen-Massenspektrometer, oder Flugzeit (kurz TOF, vom engl. *Time-of Flight*) Massenspektrometer. Durch die Kombination verschiedener Analysatoren entstehen sogenannte Hybrid-Instrumente, die besonders in der Tandem-Massenspektrometrie genutzt werden (siehe 1.8.2). Schließlich erreichen die separierten Ionen den Detektor. Die eigentliche Auswertung erfolgt über die Interpretation der Spektren und wird heutzutage meistens automatisch durchgeführt. Die identifizierten Peptide können in Datenbanksuchen (siehe auch 1.8.3 und 2.2.23) den Proteinen zugeordnet werden.

1.6.2 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

Um Proteine zu charakterisieren und Molekülstrukturen aufzuklären haben sich zwei Methoden durchgesetzt. Die sogenannte „top-down“ Methode basiert auf der direkten massenspektrometrischen Analyse von intakten Proteinen⁹⁵. In der Praxis hat dies den Nachteil, dass vor allem große Proteine schlecht gemessen werden können, da die Fragmentierung großer Proteine oft erschwert ist. Der „top-down“ Methode steht die „bottom-up“ Methode gegenüber^{96;97}. Hier werden Proteine, die gemessen werden, zunächst enzymatisch in Peptide zerlegt. Der Nachteil dieser Methode ist, dass es zu limitierter Sequenzabdeckung kommen kann, da die genutzten proteolytischen Enzyme eventuell einige Schnittstellen nicht erkennen und somit auslassen. Des Weiteren kommt es durch den enzymatischen Verdau der Proteine in Peptide zu einer deutlich erhöhten Komplexität innerhalb der Probe, weshalb teilweise spezifische Aufreinigungsverfahren vor der MS-Messung angewandt werden müssen, um die gewollten Proteine, oder PTMs

detektieren zu können. Dies ist besonders der Fall wenn gering abundante Proteine analysiert werden sollen.

Um die Komplexität weiterhin zu verringern, können spezifische Trennverfahren unmittelbar vor der massenspektrometrischen Messung durchgeführt werden, wie die Flüssigkeitschromatographie (siehe 2.2.21). Die Fragmentierung von Peptiden im Zuge der „bottom up“ Methode erfolgt mit Hilfe einer besonderen massenspektrometrischen Methode, der Tandem-Massenspektrometrie. Diese hat mittlerweile die größte Bedeutung innerhalb der Proteomik, da hierdurch die Analyse komplexer biologischer Proben erleichtert wird. Tandem-MS, oder MS/MS basiert auf mehreren Schritten in welchen die Peptide in einer Kollisionszelle fragmentiert werden⁹⁸. Die Fragmentionen geben Aufschluss über die Aminosäuresequenz der Peptide. Zusammen mit dem Spektrum der selektierten Vorläufer-Peptide können sie zur Datenbanksuche genutzt werden, um schließlich die Peptide und Proteine zu identifizieren. Es können verschiedene Analysatoren in Serie geschaltet werden, je nach gewähltem Analysator ergeben sich daraus unterschiedliche Techniken der Tandem-MS. Ein Beispiel hierfür ist das in dieser Arbeit genutzte Quadrupol Time-of-Flight (Q-TOF) Massenspektrometer. Das Q-TOF ist eine Kombination aus einem Quadrupol Massenanalysator der an einen time-of-flight Analysator gekoppelt ist⁹⁹. Im Quadrupol durchlaufen die Ionen zentral vier parallele Metallstäbe, die in ihrer Schnittachse ein Quadrat bilden. Die Trennung nach dem m/z -Verhältnis erfolgt durch ein Wechselfeld, so dass nur Ionen mit einer definierten Masse das Feld durchqueren können, andere hingegen werden abgelenkt und nicht weiter analysiert. Diese selektierten Ionen (Parentionen) gelangen in die Kollisionszelle, wo sie durch Kollision mit einem inerten Gas, z.B. Argon, fragmentiert werden. Der Prozess wird als „collision induced dissociation“ (CID), oder „collision activated dissociation“ (CAD) bezeichnet¹⁰⁰. Im Falle von Peptiden führt das mobile Proton an verschiedenen Amidbindungen zur Dissoziation des Peptidrückgrates, wodurch die Fragmentionen entstehen. Ein Auszug über die möglichen Fragmente die entstehen können und deren Nomenklatur gibt Abbildung 12. Werden tryptische Peptide in ESI-Tandem MS Experimenten durch CID fragmentiert, dominieren y -Ionen¹⁰¹, da sie einen basischen Rest am C-Terminus tragen.

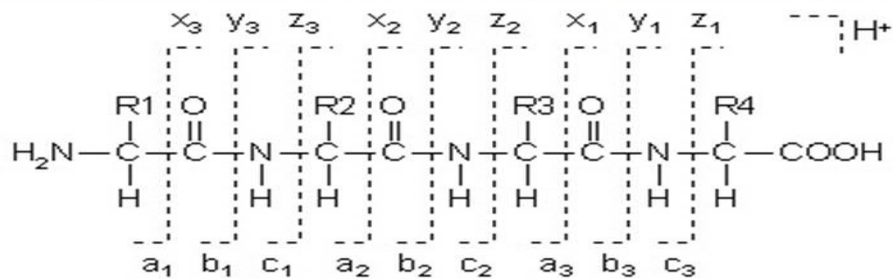


Abbildung 12: Übersicht über die entstehenden Peptidfragmente protonierter Peptide¹⁰²

Peptide, die eine Ladung am N-Terminus haben, werden als *a*, *b*, oder *c*- Ionen bezeichnet. Befindet sich die Ladung hingegen am C-Terminus spricht man von *x*, *y*, oder *z*-Ionen.

Im Flugrohr wird die Flugzeit der zuvor selektierten Ionen bestimmt. Dabei werden die Ionen durch eine angelegte Spannung beschleunigt und die Masse darüber bestimmt, wie lange das Ion nach Eintreten in das Flugrohr benötigt, bevor es auf den Detektor trifft. Diese Flugzeit ist abhängig von der Masse und der Ladung des Ions. Dabei werden alle Fragmentationen des Vorläuferions detektiert. Detektoren verstärken meist den schwachen elektrischen Strom, der entsteht, wenn ein geladenes Teilchen den elektrisch leitenden Detektor trifft. Diese Signale werden letztlich vom Computer in das Massenspektrum (Intensitäts- *m/z* – Diagramm) übersetzt.

1.6.3 Auswertung der MS/MS Daten

Peptid-MS/MS Daten werden in der Regel mit Hilfe von Datenbanken ausgewertet. Es gibt mittlerweile verschiedene Suchalgorithmen (z.B. MASCOT¹⁰³, oder SEQUEST¹⁰¹), die die gemessenen Spektren mit theoretischen Spektren vergleichen, die durch *in silico* Peptide generiert wurden. Dabei nutzt jeder Algorithmus ein eigenes Auswertungssystem um die vergleichenden Peptidspektren zu evaluieren. Datenbanksuchen erleichtern die Identifikation der gemessenen Peptide und Proteine, können aber dadurch limitiert sein, dass nicht alle Proteine und ihre Aminosäuresequenzen identifiziert werden können, bzw. nicht alle Sequenzen in der Datenbank hinterlegt sind. In diesem Fall, oder wenn keinerlei Information über die Aminosäuresequenz bekannt ist, kann die sogenannte *de novo* Sequenzierung genutzt werden, um die Daten auszuwerten. Um *de novo* Sequenzierungen erfolgreich durchführen zu können, müssen die AS-Signale möglichst gänzlich erfasst werden, damit die Sequenz des detektierten Peptids komplett abgedeckt werden kann. Dies stellt sich heutzutage immer noch als schwierig heraus.

1.7 Proteasen

Proteasen, oder Peptidasen sind ubiquitäre Enzyme, die Peptidbindungen von Polypeptidketten, bzw. Proteinen hydrolysieren und sie somit zu Peptiden abbauen. Diese Eigenschaft macht man sich in der bereits erwähnten „bottom-up“ Methode zu nutzen. Dabei generiert jedes Enzym durch seine Eigenschaften Peptide, die sich sowohl in Länge, Ladung, Löslichkeit sowie der Sequenz unterscheiden. Im Laufe der Zeit wurden verschiedenste Proteasen in der Proteomik getestet um eine optimale Sequenzabdeckungen zu erreichen, sowie den Großteil aller PTMs zu detektieren¹⁰⁴. Man unterscheidet Exopeptidasen und Endopeptidasen. Exopeptidasen spalten dabei die Polypeptidkette vom Ende her, wobei Endopeptidasen die Peptidbindung innerhalb einer Polypeptidkette schneiden. Exopeptidasen lassen sich anhand ihrer Spezifität klassifizieren. Spalten sie die Polypeptidkette vom C-Terminus werden sie als Carboxypeptidasen bezeichnet, schneiden sie hingegen von N-Terminus nennt man sie Aminopeptidasen. Die Klassifizierung bei Endopeptidasen gestaltet sich deutlich schwieriger. Sie spalten die Polypeptidkette spezifisch nach ihrer jeweiligen Signalsequenz. Deshalb werden sie aufgrund ihres katalytischen Zentrums eingeteilt. Ein wichtiges Beispiel hierfür sind die Serin-Endopeptidasen. Ihr Name rührt daher, dass sie sich durch eine katalytische Triade im aktiven Zentrum auszeichnen. In dieser speziellen Anordnung von drei Aminosäuren befindet sich ein Serinmolekül¹⁰⁵.

1.7.1 Serin-Endopeptidasen

Serinproteasen machen ein Drittel aller Proteasen aus¹⁰⁵. Im menschlichen Organismus kommen ihnen Funktionen im Bereich der Apoptose, des generellen Proteinumsatzes, der Immunantwort und weitere physiologischen Aufgaben zu¹⁰⁵. Die Serin-Endopeptidasen lassen sich auf Grund ihrer Struktur hin weiter klassifizieren, dabei gibt es u.a. Trypsin-ähnliche, Chymotrypsin-ähnliche, Subtilisin-ähnliche, CLP-ähnliche, etc¹⁰⁶. Dabei haben sie alle ein strukturelles Merkmal gemeinsam, die katalytische Triade. Sie ist in allen Serin-Proteasen konserviert und ist für den katalytischen Mechanismus verantwortlich. Eine kritische Rolle liegt in der Regulation der Aktivität der Proteasen, wäre ihre Aktivität von unkontrollierter Natur, könnte dies den Organismus stark schädigen, wie es z.B. bei der akuten Pankreatitis der Fall ist. Im Falle der Proteasen wird eine optimale Aktivität durch zwei Mechanismen erreicht. Zunächst werden die Enzyme als inaktive Vorläufer, sog. Zymogene gebildet. Diese Vorläufer erlangen erst durch Aktivierung ihre native Konformation und somit katalytische Aktivität. Der zweite Mechanismus zielt auf die Inhibition aktiver Proteasen ab, was durch spezifische Inhibitoren gewährleistet wird.

Trypsin ist ein bekanntes Beispiel für eine Serin-Endopeptidase. Es ist in fast allen Vertebraten vorhanden und wird im Pankreas als inaktives Proenzym Trypsinogen gebildet. Im Verdauungstrakt ist es u.a. für die Hydrolyse von Proteinen verantwortlich¹⁰⁷. Dabei hat es eine spezifische Erkennungssequenz und hydrolysiert nur am C-Terminus der AS Arg und Lys. Allerdings kann es die Peptidbindung nicht hydrolysieren, wenn Arg oder Lys in der Sequenz von einem Prolin (Pro) gefolgt werden¹⁰⁸. Trypsin hat sein Optimum bei einer Temperatur von 37 °C und einem pH von 8,0 und lässt sich einfach aus dem Pankreas aufreinigen¹⁰⁸.

1.7.2 Proteolytische Enzyme im Zuge MS-basierter Proteomik

Das proteolytische Enzym Trypsin ist heutzutage die gebräuchlichste Protease im Zuge der Generierung von Peptiden für massenspektrometrische Analysen¹⁰⁹. Ein Grund hierfür Gründe hierfür ist die definierte Spezifität. Peptide, die durch Trypsin generiert wurden tragen an ihrem C-Terminus immer ein Arginin, oder ein Lysin¹¹⁰. In ESI-MS Methoden eignen sich tryptische Peptide besonders, da sie in der Regel zweifach geladen sind, wodurch sie sich gut durch CID fragmentieren lassen^{87,110,111}. Die Protokolle zum Nutzen von Trypsin werden allerdings noch stetig verbessert, z.B. fand man heraus, dass sich mehr Peptide generieren lassen, wenn Proben 1 h lang mit immobilisiertem und an Silica gekoppeltem Trypsin inkubiert wurden, anstelle des klassischen In-Lösung Verdaus über Nacht¹¹². Trotz immenser Vorteile ist der Einsatz von Trypsin innerhalb der Proteomik limitiert und die Suche nach weiteren nutzbaren proteolytischen Enzymen ist noch lange nicht abgeschlossen, weshalb sich viele Studien mit dieser Thematik beschäftigen¹¹³. Um eine möglichst komplette Sequenzabdeckung zu erreichen, oder bestimmte PTMs, oder Untergruppen von Proteinen zu analysieren, besteht die Notwendigkeit im Nutzen weiterer proteolytischer Enzyme. Beispielsweise konnten die Serin-Endopeptidasen GluC^{114–116} und LysC^{117;118}, sowie die Cystein-Endopeptidase ArgC¹¹⁹ und die Metalloendopeptidase AspN^{120;121} erfolgreich für Proteinverdaus genutzt werden. Dabei unterscheiden sich die generierten Peptide jeweils in ihrer Länge und dem Terminus, je nach der Erkennungssequenz der entsprechenden Protease. Beispielsweise generieren Proteasen die nur eine Aminosäure als Erkennungssequenz haben, wie z.B. LysC, mehrfach geladene, lange Peptide. Deshalb eignen sich durch diese Proteasen generierte Peptide besser für MS-Methoden mit Elektronentransferdissoziation (ETD) Fragmentierung. Im Gegensatz zu CID werden die Peptide dadurch generiert, dass durch den Einsatz von radikalen Anionen Elektronen auf sie übertragen werden und die Polypeptidkette dadurch bricht. Je länger das generierte Peptid ist, desto mehrfacher ist es geladen, weshalb mehr Elektronen übertragen werden können.

Aus diesem Grund lassen diese Peptide sich gut via ETD fragmentieren. Diese Methode ist vor allem in letzten Jahren gebräuchlicher geworden¹²², da sie den großen Vorteil besitzt, dass sich PTMs besser detektiert lassen, als mit CID-Methoden. Labile PTMs werden während des CID-Verfahrens auf Grund der hohen Energie des Peptids am ehesten abgespalten. Hingegen ist die Elektronenverteilung über das Peptidrückgrat bei der ETD-Methode einheitlicher, woraufhin dieses gleichmäßiger fragmentiert und sich dadurch die Chance erhöht, dass die PTMs am Fragment erhalten bleiben. Hingegen sind tryptische Peptide auf Grund der Erkennungssequenz von Trypsin (zwei AS) zu kurz und wenig stark geladen, um sich gut durch ETD fragmentieren zu lassen. Tabelle 1 zeigt die am häufigsten genutzten Enzyme in der Massenspektrometrie.

Tabelle 1: Auswahl einiger Proteasen für proteolytische Verdaus

Protease	pH-Optimum	Spezifität
ArgC	7,2 - 8,0	Arg-X
AspN	6,0 - 8,5	X-Asp
GluC	4,0 und 7,8	Glu-X, bei pH 7,8 auch Asp-X
LysC	8,5 - 8,8	Lys-X
Trypsin	8,0	Arg-X, Lys-X (schneidet nicht wenn X ein Prolin ist)

Gezeigt sind die pH-Werte und die Signalsequenz der Proteasen, dabei steht X für einen beliebigen Aminosäurerest.

Je nach Einsatzgebiet und Fragestellung haben die verschiedenen Proteasen besondere Vorzüge für bestimmte Applikationen. AspN wurde, z.B. erfolgreich bei der Untersuchung von Histonen eingesetzt^{123;124}. Histone sind oft an reich an modifizierten Lysinresten, wodurch sich ein tryptischer Verdau oft schwierig gestaltet. GluC und LysC konnten u.a. erfolgreich im Bereich der Phosphoproteomik eingesetzt werden¹²⁵. Phosphopeptide werden in der Regel durch Affinitätschromatographie aufgereinigt. Diese Aufreinigungsmethode hat bei tryptisch generierten Peptiden den Nachteil, dass durch Trypsin viele saure Peptide generiert, die ebenfalls an die Affinitätschromatographiesäule binden. GluC hingegen erkennt Glutaminsäure, somit sind die generierten Peptide weniger stark sauer. Dadurch konnte der Prozentsatz von phosphorylierten Peptiden eines proteolytischen Verdaus durch den Einsatz von GluC von 40 % (tryptischer Verdau) auf 70 % erhöht werden¹¹⁶. Der Verdau einer Probe mit zwei Proteasen in getrennten Ansätzen wird ebenfalls erfolgreich genutzt, um entweder die Ausbeute an generierten Peptiden zu erhöhen, oder ein komplementäres „Mapping“ Ergebnis zu erhalten¹²¹. Neben den genannten spezifischen Enzymen kommen teilweise auch weniger spezifische Enzyme wie Pepsin, Chymotrypsin, Elastase, oder Proteinase K zum Einsatz.

Vor allem für Membranproteomstudien eignen sich unspezifischere Enzyme. Da viele Schnittstellen schlecht zugänglich sind, ist die fehlende Spezifität in diesem Fall von Vorteil, da deutlich mehr Peptide generiert werden können, als mit einem spezifischen Enzym^{126;127}. Phosphoproteomstudien ließen sich ebenfalls erfolgreich mit Elastase durchführen. Im Vergleich zu Trypsin konnten durch Elastase deutlich mehr phosphorylierte Stellen identifiziert werden^{128;129}. In letzter Zeit wird vermehrt die Metalloendopeptidase LysN für proteolytische Verdauung eingesetzt. Aufgrund ihrer Eigenschaften scheint sie ein vielversprechender Kandidat zu sein, z.B. konnte die Ausbeute von Phosphopeptiden aus einem Proteingemisch welches zum einen mit LysN und zum anderen mit Trypsin verdaut wurde, im Vergleich zum Verdau mit Trypsin alleine um 72 % erhöht werden¹³⁰.

1.7.3 Die Metalloendopeptidase LysN

Metalloendopeptidasen (MEPs) besitzen die Fähigkeit zur Zerstörung von Geweben^{131;132}. Sie können sowohl als freies Enzym, als auch als Enzym-Inhibitor Komplex vorliegen. Auf Grund ihrer Struktur im Bereich des aktiven Zentrums lassen sich zwei Hauptklassen unterscheiden, die „Gluzincins“ und „Metzincins“. Allen gemeinsam ist das Strukturmotiv HExxH, wobei die beiden Histidine als Zink-Ligand fungieren. LysN ist eine Zink- Metalloendopeptidase und wurde aus den Fruchtkörpern der Pilze *Grifola frondosa* und *Pleurotus ostreatus* isoliert¹³³. Nonaka *et al.* fand heraus, dass die Peptidase eine starke Spezifität für Lysin hat und Peptidyl-Lysin Bindungen N-terminal hydrolysiert (-X-Lys-)¹³³. Für kommerzielle Zwecke ist es von besonderem Interesse, da es eine überaus hohe Stabilität gegen anionischen Detergenzien besitzt und in einem pH-Bereich von 6-10 aktiv ist. Die höchste Aktivität liegt im basischen Bereich bei pH 8 - 9,5¹³³. Zudem ist es auch noch bei Temperaturen in einem Bereich von 4 °C bis knapp 70 °C aktiv¹³⁴. Mittlerweile ist auch die Kristallstruktur des Enzyms bekannt und es wurde innerhalb der Metalloendopeptidasen in die Subklasse der „Aspzincins“ kategorisiert^{135,136} (siehe Abbildung 13). Das aktive Zentrum wird von zwei Helices und einer Schleife gebildet wobei Histidine an den Positionen 117 und 121 und ein Asp-Rest an Position 130 die katalytischen Zink-Ionen koordinieren. Von den Positionen Asp₁₅₄ und Glu₁₅₇ geht eine Spezifität für positiv geladene Lysinseitenkette aus, was impliziert, dass beide Aminosäurereste eine zentrale Rolle für die Spezifität des Enzyms spielen¹³⁵. Vor allem die Position Glu₁₅₇ scheint hier von Interesse, da es sich im Gegensatz zu dem konservierten Asp₁₅₄ Rest der Zinkine um eine variable AS handelt. Spekulationen über eine Mutante, die an Position 157 an Stelle von Glutaminsäure einen Asparaginsäure-

Rest trägt, beschäftigten sich mit der Frage, ob sich die Spezifität dahingehend ändert, dass auch Arginin als Substrat erkannt wird¹³⁵.

Zum einen war bekannt, dass Arg-haltige Peptide als kompetitive Inhibitoren wirken¹³⁷, somit also in die S1`-Bindetasche des Enzyms binden können. Zum anderen trägt Trypsin in der S1`-Bindetasche ein Asp (kürzere Seitenkette als Glu) an entsprechender Position und Trypsin erkennt neben Lys auch Arg. Aus diesem Grund scheint die Bindetasche nicht tief genug zu sein um Arg-haltige Seitenketten so zu binden, dass sie proteolytisch umgesetzt werden können¹³⁰. Befindet sich jedoch ein Asp-Rest in der Tasche anstatt des Glu-Restes, ändert sich die Konformation stereochemisch dahingehend, dass die Tasche tiefer wird und somit Arg als Substrat akzeptiert werden könnte. Die Folge wäre eine Substratspezifität analog zum Trypsin, allerdings würde das Enzym nicht C-terminal von Arginin und Lysin, sondern N-terminal schneiden¹³⁵. Darüberhinaus würde sich die Mutante im Gegensatz zum Wildtyp besonders gut für Tandem-MS basierte CID eignen. In Länge und Eigenschaft ähneln die durch LysN_{E157D} generierten Peptide denen, die durch Trypsin generiert wurden.

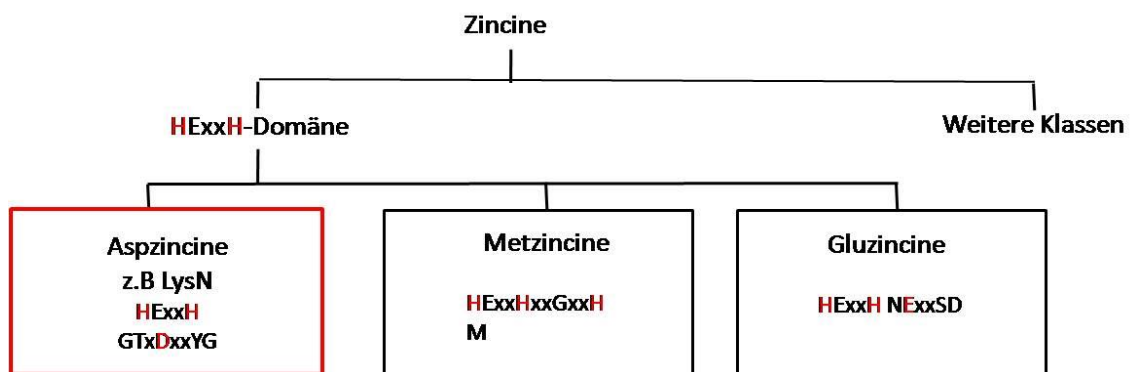


Abbildung 13: Klassifizierung der Metalloendopeptidasen

Gezeigt sind die konservierten Aminosäuren innerhalb des aktiven Zentrums. Die Zinkliganden sind rot markiert. Allen gemeinsam sind zwei Histidinreste (rot markiert) als Zinkliganden innerhalb des aktiven Zentrums mit der konservierten HExxH-Domäne. Der dritte Zinkligand ist hingegen variabel.

1.8 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle von proteolytischen Enzymen, insbesondere der Metalloendopeptidase LysN, im Zuge von Proteomanalysen in der MS diskutiert. Die Generierung von Peptiden aus Proteingemischen erfolgt hauptsächlich durch Trypsin. Allerdings ist die Identifizierung weiterer Endopeptidasen die genutzt werden können von großem Interesse, da hierdurch die Sequenzabdeckung der verdauten Proteine erhöht, sowie den Nachweis von PTMs erfolgen kann. LysN ist in den letzten Jahren vielversprechend zur Probenvorbereitung in ETD-, und CID-gestützten MS-Analysen genutzt worden. Durch die Aufklärung der Kristallstruktur konnten die für die Substratspezifität verantwortlichen Aminosäurereste identifiziert werden. Das führte zu der Fragestellung über eine Mutation innerhalb der entsprechenden AS-Reste, die zu einer veränderten Substratspezifität führen soll, resultierend in einem Schnittmuster eines „reversen Trypsins“¹³⁵. Ziel dieser Arbeit war es zum einen LysN, sowie seine Mutante LysN_{E157D} zu exprimieren, das rekombinante Protein aufzureinigen und es auf seine Aktivität hin zu überprüfen. Durch den Verdau von Proteinen wie Serumalbumin und Zelllysate als komplexe biologische Probe sollte bewiesen werden, dass sich LysN als proteolytisches Enzym in der Probenvorbereitung für MS-Analysen eignet. Dabei ist LysN_{E157D} von besonderem Interesse, da die generierten Peptide tryptischen stark ähneln, weshalb sie sich ideal durch CID fragmentieren lassen würden. Des Weiteren soll die vermutete Spezifität der mutierten Metalloendopeptidase durch die Analyse der generierten Peptide bewiesen werden. Schließlich soll das Enzym für Probenvorbereitung in der allgemeinen Proteomik, als auch in speziellen Gebieten wie der Phosphoproteomik eingesetzt werden.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Aktivierung von dendritischen Zellen und Makrophagen. Hierbei kommt es zu dem Phänomen der Bildung von DALIS. Über die Zusammensetzung und die Entstehung dieser polyubiquitinylierten Proteinaggregate ist wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit sollen die Mechanismen, die zur Aktivierung von Makrophagen und BMDCs führen, untersucht werden. Die Aktivierung ist mit der Bildung von DALIS eng verknüpft. Um diesen Zusammenhang zu untersuchen, wurden gezielt Komponenten der Aktivierungskaskade der dendritischen Zellen inhibiert, um deren Auswirkung auf die Bildung von DALIS näher zu charakterisieren. Ein besonderer Fokus wurde dabei auf die Wirkung von Caspasen gelegt. Durch den Einsatz spezifischer Caspase-Inhibitoren soll aufgeklärt werden, ob und wenn ja, welche Caspasen an der Bildung von DALIS beteiligt sind. Hierbei sollte untersucht werden, ob DALIS als Antwort auf zellulären Stress hin gebildet werden, oder ihnen die bereits diskutierte Rolle des aus missgefalteten Proteinen bestehenden Antigenpools zukommt⁷⁷ aus dem CTL-Epitope mit zeitlicher Verzögerung generiert werden können.

II. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 2: Geräte

Geräte	Modell	Hersteller
ÄKTAPurifier Fast-performance Liquid Chromatography Hochgeschwindigkeits- Flüssigkeitschromatographie	ÄKTAPurifier P-900 ÄKTA-FPLC (UPC-900)	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Analysenwaage	CP64	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Bunsenbrenner	Fireboy Plus	Integra Bioscience, Chur, Schweiz
CO ₂ -Inkubator	Hera cell 150	Heraeus, Hanau, Deutschland
Elektrophoresekammer	Sub-Cell GT	BioRad, München, Deutschland
ESI- Massenspektrometer	Q-ToF Premier™	Waters, Milford, USA
FACS Sorter	FACS Canto	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Feinwaage	PM2000	Mettler, Gießen, Deutschland
Fluoreszenz/Absorptionsmesser, ELISA-Reader	SPECTRAFluor Plus Reader Genios 2005 Reader	TECAN, Crailsheim, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	IX81 Biozero BZ9000	Olympus, Hamburg, Deutschland Keyence Neu-Isenburg, Deutschland
Gefriertrockner	Lyovac GT2	Leybold, Biocompare, San Francisco, USA
Gel- Dokumentationssystem	ChemiDoc GelDoc	Bio-Rad, Munich, Deutschland
Heizblock	Rotilabo®- Block Heater	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hochgeschwindigkeitszentrifuge	RC-5C, Sorvall	Thermo Scientific, Schwerte Deutschland
Inkubator	HERAcell Inkubator; Kendro Inkubator	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kipp- Schüttler	TL-10	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Mikropipette		Gilson, Middleton, USA
Mikroskop	CKX31	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mini-Zentrifuge	Rotilabo®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Multipipette		Biohit, Köln, Deutschland
nanoHPLC	nanoAcquity UPLC	Waters, Milford, USA
PAGE-equipment (1D-Page)	Mini-PROTEAN®	BioRad, Munich, Deutschland
PCR-Cycler	Peqstar Thermocycler	Peqlab, Erlangen, Deutschland

pH-Meter	Calimatic	Knick measuring instruments, Berlin, Deutschland
Photometer	Biophotometer plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetboy acu / Comfort	Integra Bioscience, Fernwald, Deutschland
Power supply unit	EPS 3500 XL	Amersham Pharmacia Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Rührwerk, elektronisch (Potter)	VWR VOS 16	VWR, Darmstadt, Deutschland
Schüttelinkubator	MaxQ4000	Thermo Scientific, Schwerte, Germany
Speed-Vac	SVC-100	Savant, Thermo Scientific, Schwerte, Germany
Sterilbank	HERAsafe Sicherheitswerkbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex RK	SCHALLTEC GmbH, Mörfelden-Walldorf, Deutschland
Ultraschallstab	Sonoplus HD 2070	Bandelin electronic GmbH, Berlin, Deutschland
Ultrazentrifuge	T-1065	Kontron Instruments, Thermo Fisher, Schwerte, Deutschland
Vortexer	Vortex-Genie-2	Scientific Int., New York, USA
Waagen	1202	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Western Blot Transferapparatur	SemiDry System XCell SureLock System	BioRad, München, Deutschland Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Zählkammer	Neubauer Counting Chamber	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugen	Labofuge 400 Multifuge 3-LR Omnigufe 2.0 RS	Heraeus, Hanau, Deutschland Kendro, Hanau, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Folgende Verbrauchsmaterialien wurden von der Firma Greiner, Frickenhausen, Deutschland bezogen:

Kryoröhrchen (Cryo.S™, PP, mit Schraubverschluss), Petrischalen (100 x 20 mm, 60 x 15 mm), Plastikröhrchen mit Schraubverschluss (15 ml, 50 ml), Platten 6-Kavitäten-Platten (für Suspensionszellen und für adhärenente Zellen), 48-, 12-, 24- 96- Kavitäten-Platten (U- Form, V- Form, Flachboden- Platten), Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml), Zellkultur Flaschen (Suspension 25 ml, 250 ml, 650 ml) (Wachstumsfläche 25 cm², 75 cm²), Zellschaber

Folgende Verbrauchsmaterialien wurden von der Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland bezogen:

Entsorgungsbeutel, Färbeschale, Nescofilm, Nitrilhandschuhe, Objektträger, Präparierbesteck (Scheren, Pinzetten), Spritzenfilter (0,22 µm)

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Aufkonzentrierungsgefäße Amicon® Ultra (Ultracel 10 kda)	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Deckgläschen	VWR, Darmstadt, Deutschland
FACS-Röhrchen 5 ml; 300 µl	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Filterpapiere (3 mm) Whatman® Paper	Biometra, Göttingen, Deutschland
Gel-Beladungsspitzen (10 – 200 µl)	Starlab, Ahrensburg, Deutschland
Glasgefäße mit Schraubverschluss (12 x 32 mm)	Waters, Milford, USA
Gummihandschuhe (M)	Sempercare, Wien, Österreich
Kanülen (0,3 x 13 mm)	BD Microlance, Frankreich
DNase und RNase frei (100 x 20 mm) Nunclon™ Surface	Nunc, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Pipettenspitzen (0,1 – 10 µl, 10 – 200 µl, 200 – 1000 µl)	Starlab, Ahrensburg, Deutschland
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml Protein lobind® Eppendorf Gefäße)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Skalpelle (Federstahlskalpell)	PFM Medical AG, Köln, Deutschland
Spritzen (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml)	Omnifix, Melsungen, Deutschland
Sterilfilter (0,45 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Zellsiebe (0,4 µm)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

2.1.3 Chemikalien und Medienzusätze

Folgende Chemikalien wurden von der Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland bezogen:

Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese® Gel-40), Agar-Agar (Kobe / pulv), Ameisensäure (98 %), Ammoniak-Lösung (25 %), Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3), Ampicillin Natriumsalz, Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), Dimethylsulfoxid (DMSO), Ethanol (70 %) ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA), Glycerin ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$), Glycin (99 %) ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$), Harnstoff (UREA) (98 %) ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), Hefeextrakt, Hydrogenchlorid (HCl), Kaliumacetat (99 %) ($\text{C}_2\text{H}_3\text{KO}_2$), Kaliumchlorid (99,5 %) (KCl), Kanamycin, Lysozym, Magnesiumchlorid Hexahydrat (99 %) ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$), Magnesiumsulfat (MgSO_4), Mangan (II)-chlorid Tetrahydrat ($\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), Milchpulver (blotting grade), MOPS (99 %), Natriumchlorid (NaCl), Natriumdodecylsulfat (SDS), Neutralrot, Pepton aus Casein, TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$), Thioharnstoff, Trichloressigsäure (99 %), Tris Ultra Qualität ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$), Triton-X 100, Trypanblau, Tween® 20, Wasser (LC-MS grade) (H_2O), Zinksulfat-Heptahydrat (99 %) ($\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)

Folgende Chemikalien wurden von der Sigma Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland bezogen:

Ammoniumpersulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$), Bromphenolblau, Ethidiumbromid, Imidazol ($\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$), Isopropanol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$), Methanol (LC-MS grade) (MeOH) (CH_4OH), Natriumazid (NaN_3), o-Phosphorsäure (85 %) (H_3PO_4)

Tabelle 4: Chemikalien und Medienzusätze

Substanz	Hersteller
Acetonitril (ACN) (98 %); Acetonitril (LC-MS grade)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Riedel de Haën, Honeywell, Seelze, Deutschland
Azocasein	Sigma Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Casein	Sigma Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
CHAPS (98 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Chloramphenicol	Appligene, Watford, Großbritannien
Coomassie G-250	Pierce, Rockford, Irland
Cytofix/Cytoperm	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Molecular Probes, Darmstadt, Deutschland
Destilliertes Wasser (DNase / RNase frei)	Gibco, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT) (99 %)	Sigma Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Vitromex GmbH, Geilenkirchen, Deutschland
HABA (hydroxyl-azophenyl-benzoic acid)	IBA Biotagnology, Göttingen, Germany
Iodacetamid (IAA)	Sigma Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) (98 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
L- Glutathion oxidiert (GSSG)	Sigma Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
L- Glutathion reduziert (GSH)	Sigma Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumorthovanadat (NaVO ₃)	Sigma Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
n-Octyl-β-D-glucopyranosid (99 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
RapiGest™ SF	Waters, Milford, USA
Saponin B	Sigma Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Top Vision™ LM GQ Agarose low melting point	Fermentas, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Puffer, Medien und Medienzusätze

2.1.4.1 Medien und Medienzusätze

Das Grundmedium wurde als Pulver von der Firma Gibco (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die Medien wurden in vollentsalztem Wasser (Millipore Entsalzungsanlage, Invitrogen, Deutschland) und durch Aktivkohle gereinigtem Wasser (VE-Wasser) gelöst und durch einen 0,2 µm Filter steril filtriert. Des Weiteren wurden sie vor Gebrauch einer Sterilkontrolle unterzogen. SOC- Medium und Trypsin / EDTA wurden bereits fertig zur Anwendung von Invitrogen bezogen. Penicillin und Streptomycin wurde von der Firma Serva (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

DC-Medium:

TM 5 %; 2 % GM-CSF (bei BALB/c) Mäusen

GM-CSF bewirkt die Differenzierung zu BMDCs aus Vorläuferzellen von Makrophagen.

Einfriermedium:

90 % FCS; 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)

Das DMSO wurde steril entnommen.

Fetales Kälberserum (FCS):

Vor Verwendung des FCS in der Zellkultur wurde es 45 min bei 56 °C hitzeinaktiviert um Komponenten des Komplementsystem auszuschalten, welche sonst die zu kultivierenden Zellen angreifen würden. Danach wurde es bei 1000 x g für 30 min abzentrifugiert um Schwebstoffe zu pelletieren, nur der Überstand wurde weiter verwendet.

Geneticin (G418):

Dient als Selektionsmittel für gentechnisch veränderte Zelllinien, die ein entsprechendes Resistenzgen tragen.

Glutamin (Gln):

200 mM in 1 x PBS; 0,2 µm steril filtriert

GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor):

Murines GM-CSF wurde aus Kulturüberständen der Myelomzelllinie X630 gewonnen, Institut für Immunologie

ISCOVE`s modified Dulbecco`s Medium:

IMDM-Pulver (Gibco); NaHCO₃; HEPES; AS- Mischung; Cystein; Natriumselenit; Penicillin; Streptomycin

LB (lysogeny broth)-Medium:

0,5 % Hefeextrakt; 10 % Pepton; 10 % NaCl

Natrium-Pyruvat (Na-Pyruvat):

0,1 M in VE-Wasser; 0,2 µm steril filtriert

Testmedium (TM5/TM10):

5 % bzw. 10 % FCS; 1 % Glutamin; 1 % Na-Pyruvat; 1 % Penicillin / Streptomycin; 50 µM β-Mercaptoethanol in Iscove`s Medium (DMEM)

Selektionsmedium (SM):

650 µg/ml G418 in TM10- Medium

Sf-9 Insektenzellmedium:

10 % FCS; 1 % Penicillin / Streptomycin in TC 100 Medium

SOC-Medium:

2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 8,6 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 20 mM MgSO₄; 20 mM Glucose

SOC-Medium ist eine Art modifiziertes LB-Medium welches vor allem als Erholungsmedium für *E.coli* Zellen dient, nachdem sie transformiert wurden.

TC 100 Medium:

Das Medium wurde von der Firma Pan Biotech (Aidenbach, Deutschland) bezogen und dient als Grundmedium für Insektenzelllinien.

Trypsin/EDTA:

Zum Ablösen adhärenter Zelllinien, indem es die Bindungen von extrazellulären Proteinen spaltet, die die Adhärenz von der Zelle an die Zellkulturflaschen aufrechterhalten.

2.1.4.2 Puffer

Bakterieller Lysepuffer 1:

100 mM Tris/HCl; 500 mM Saccharose; 5 mM MgCl₂; 5 mM MgSO₄; 2 mg/ml Polymyxin B sulfat; pH 8,0; frisch zugegeben wurde Lysozym (1 mg/ml)

Zur Untersuchung einer periplasmatischen Expression des Proteins, wurde o.g. bakterieller Lysepuffer angewandt.

Bakterieller Lysepuffer 2:

50 mM Tris/HCl pH 8; 25 mM NaCl; 1 % Octylglucosid; frisch zugegeben wurde Lysozym (10 mg/ml)

Zur Optimierung der Lyse wurde dem Puffer Octylglucosid zugegeben und der pH auf 8 eingestellt, da Lysozym hier sein Reaktionsoptimum hat.

β – Mercaptoethanol:

Als Zusatz für ISCOVE´s Medium

Citratpuffer A:

10 mM Citronensäure- Monohydrat; pH 6,0

Citratpuffer B:

10 mM Citronensäure- Monohydrat; 1 M NaCl pH 6,0

Denaturierungspuffer:

1 M Tris HCl pH 8,0; 8 M Urea

FACS- Puffer:

1 x PBS; 1 % BSA; 0,02 % Natriumazid

Fixierlösung:

10 % Essigsäure; 50 % Methanol in Aqua dest.

Gey´s Lysepuffer:

150 mM NH₄Cl; 1 mM KHCO₃; 0,1 mM EDTA; pH 7,3

His-Tag Equivlibrierungs-, Waschpuffer:

50 mM Natriumphosphat; 300 mM NaCl; 5 mM Imidazol; pH 7,4

Im Falle einer denaturierenden Aufreinigung wurde der Puffer mit 8 M Harnstoff versetzt.

His-Tag Elutionspuffer:

50 mM Natriumphosphat; 300 mM NaCl; 150 mM Imidazol; pH 7,4

Im Falle einer denaturierenden Aufreinigung wurde der Puffer mit 8 M Harnstoff versetzt.

Kolloidale Coomassie Lösung:

0,12 % Coomassie Brilliant Blue G250; 10 % Phosphorsäure; 10 % Ammoniumpersulfat, 20 % Methanol

Zur Herstellung ist die Reihenfolge, in der die Chemikalien zugegeben werden, von entscheidender Rolle. Zunächst werden 30 % Wasser und 10 % der Phosphorsäure vorgelegt. In dem Gemisch wird zunächst das Ammoniumpersulfat komplett gelöst. Erst danach wird der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 hinzugefügt und ebenfalls komplett gelöst. Danach wird das Volumen auf 80 % mit Methanol aufgefüllt. Schließlich wird die Lösung unter Rühren mit Wasser auf das Endvolumen eingestellt. Dabei muss die Lösung von grün-blauer Farbe sein.

Ni-NTA Lysepuffer:

50 mM NaH_2PO_4 ; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; pH 8,0

frisch zugegeben wurde Lysozym (1 mg/ml)

PBS (phosphate buffered saline):

PBS wird als 10 x konzentrierter Stammlösung in VE- Wasser hergestellt.

1,4 M NaCl; 0,1 M NaH_2PO_4

Hier wurde meist 1 x PBS genutzt (pH-Wert 7,2).

Regenerierungspuffer:

20 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES); 10 mM NaCl; pH 5,0

Rückfaltungspuffer:

50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 50 μM ZnSO_4 ; 400 mM L-Arginin; pH 8,0; 1,25 mM GSH, 0,25 mM GSSG wurden jeweils Frisch zugegeben.

Saponinpuffer:

2 % FCS; 0,1 % Saponin; 0,5 % BSA; 0,01 % NaN_3 in 1 x PBS

SDS- Ladepuffer:

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

SDS- Laufpuffer:

25 mM Tris/HCl; 190 mM Glycin; 0,1 % SDS; pH 8,3

Sonifizierungs-/Lysepuffer:

5 x TBS; 0,3 M EDTA; 2 M MgCl₂; frisch zugegebene wurde Lysozym (1 mg/ml)

Sucrosepuffer:

30 mM Tris/HCl; 20 % Sucrose; pH 8,0

TAE-Puffer:

40 mM Tris/Acetate; 1 mM EDTA; pH 8,5

TBS / (TBST):

50 mM Tris, 150 mM NaCl; pH 8,0 (+ 0,05 % Tween20)

Transformationspuffer 1 (Tfb1):

30 mM Kaliumacetat; 50 mM MnCl₂; 100 mM KCl; 10 mM CaCl₂; 15 % Glycerin, mit 0,2 M Essigsäure wurde der pH auf 5,8 eingestellt

Transformationspuffer 2 (Tfb2):

10 mM Mops; 75 mM CaCl₂; 10 mM KCl; 15 % Glycerin; mit 10 M NaOH wurde der pH auf 7 eingestellt

Urea- Lysepuffer:

7 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 1,5 mM DTT; (2 % CHAPS)

Urea- Waschpuffer:

5 x TBS; 3 M Urea

Waschpuffer TritonX:

5 x TBS; 10 % Triton x-100

Western-Blot Puffer (Towbin Puffer):

25 mM Tris; 190 mM Glycin; 20 % Methanol (tech.) 0,02 % SDS; pH 8,3

2.1.5 Marker und Enzyme und Inhibitoren

Marker SM1811	Prestained Protein Ladder (10-250 kDa), Fermentas
Marker SM0671	Page Ruler™ Protein Ladder (11-250 kDa), Fermentas
Trypsin	Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
GeneRuler™ (Molekulargewicht)	1kb plus DNA Ladder, Fermentas
Molekulargewichtsmarker	100 bp O'Generuler, Fermentas
Ladepuffer (Agarosegele)	Orange Loading Dye, Fermentas

Folgende Restriktionsendonukleasen (REN) für den präparativen Verdau wurden von der Fermentas GmbH, Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland bezogen:

BamHI, BglII, DpnI, EcoRI, HindIII, NcoI, NdeI, XhoI

BspHI wurde von New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland bezogen.

Tabelle 5: Liste der verwendeten Inhibitoren

Inhibitor/ Bezeichnung	Inhibiertes Molekül	Hersteller	Eingesetzte Konzentration
Akt – IV Inhibitor	Akt (Protein Kinase B)	Calbiochem, Merck AG, Darmstadt, Deutschland	1 µM
Caspase-1 Inhibitor	Caspase-1	Bachem, Offenburg, Deutschland	3 µM
Caspase-3 Inhibitor	Caspase-3	Bachem, Offenburg, Deutschland	3 µM
Caspase-8 Inhibitor	Caspase-8	Bachem, Offenburg, Deutschland	3 µM
Ly294002	Phosphoinositid-3- Kinasen (PI 3-Kinase)	Calbiochem, Merck AG, Darmstadt, Deutschland	30 µM
Pancaspase Inhibitor	Caspasen	Bachem, Offenburg, Deutschland	2 µM
Rapamycin	mTOR	Calbiochem, Merck AG, Darmstadt, Deutschland	100 pM
Wortmannin	PI 3-Kinase	Calbiochem, Merck AG, Darmstadt, Deutschland	1 µM

2.1.6 Primer

Tabelle 6: Primer und Oligonukleotide

Bezeichnung der Primer	Sequenz (5' → 3')	T _m
Virus PCR ERMP1 SP	ATTTTCTGGTAGTTCTTCGGAGTG	52,8°C
Virus PCR ERMP1 ASP	TACGGAGATGCTGTGAAGGC	52,7°C
LysN pVL internal coding s. SP	ATCTGCAGACCCATAACCGCG	57,2°C
LysN pVL internal coding s. ASP	CGTGGTTATCCGCGTTCATC	55,3°C
pVL LysN SP	CGCTGCGCATAGTTTTTCTG	53,8°C
pVL LysN ASP	TCGGATACACATACGCAAAGG	52,8°C
pEXPR-IBA42 Sequ. SP	GAGAACCCACTGCTTACTGGC	53,0°C
pEXPR-IBA42 Sequ. ASP	TAGAAGGCACAGTCGAGG	45,4°C
pVL Mellitin BgIII SP	TAAGATCTACCTATAACGGCTGCTCCAGC	61,2°C
pVL Mellitin BgIII ASP	TAGAATTCTCAGTGGTGGTGGTGG	62,9°C
LysN Quickchange SP	GCGGATAACCACGATTACTTCTCTGAAAC	66,4°C
LysN Quickchange ASP	GTTTTTCAGAGAAGTAATCGTGGTTATCCGC	67,0°C
LysN PCR Primer ohne pelB SP	CATATGATGACCTATAACGGCTGCTCC	65,3°C
LysN PCR Primer ohne pelB ASP	ATCTCAGTGGTGGTGGTGG	65,1°C

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zelllinien

RAW309	murine Lymphomzelllinie; H2-D; H2-B ATCCR-Nr: TIB-51
Sf-9	Zelllinie aus den Ovar-Zellen der Mottenart <i>Spodoptera frugiperda</i> ¹³⁸ , erhalten von Prof. Edgar Schmitt, Institut für Immunologie, Mainz

2.2.1.2 Kultivierung von Zellen und Zelllinien

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Gearbeitet wurde immer unter einer Sterilbank der Klasse II, welche neben Personenschutz auch Probenschutz gewährleistet.

RAW309 Zellen wurden in TM5-Medium in einem Brutschrank bei 37 °C und einer konstanten CO₂-Konzentration von 5 % kultiviert. Je nach Dichte wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage in einem Verhältnis von 1:10 gesplittet um ein konstantes Wachstum zu gewährleisten. Die adhärente RAW309 Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA (5 min Inkubationszeit) vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst. Durch das Splitten wurden die Zellen mit frischem Medium und somit Nährstoffen versorgt, im Gegenzug dazu wird altes Medium mit toten Zellen und evtl. toxischen Substanzen, die von sterbenden Zellen ins Medium sezerniert wurden, entfernt.

Sf-9 Zellen wurden in TC-100 Medium gezogen, welches mit 10 % FCS und 1 % Penicillin / Streptomycin versetzt wurde. Die Zellen wurden ohne CO₂, bei einer Temperatur von 27 °C, kultiviert. Sf-9 Zellen sind adhärent und wachsen als Monolage. Die Zellen wurden täglich lichtmikroskopisch auf ihre Konfluenz hin beobachtet, da diese 70 % nicht überschreiten sollte. In diesem Fall wurden sie gesplittet (1:4), wobei die Zellen mittels eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturgefäße abgelöst wurden.

2.2.1.3 Auftauen und Kryokonservierung von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen in ein Eisbad überführt und durch Schwenken in einem 37 °C warmen Wasserbad angetaut. Die Zellen wurden zügig in 1 ml des entsprechenden Mediums resuspendiert. Danach wurden sie in 9 ml Medium aufgenommen und abzentrifugiert (500 x g, 3 min, 4 °C) um die Zellen zu pelletieren. Schließlich wurde das Pellet in entsprechendem Medium aufgenommen und die Zellsuspension in Zellkulturflaschen (25 ml) überführt und bei ihrem Temperaturoptimum im Inkubator kultiviert.

Zum Einfrieren der Zellen wurden sie zunächst geerntet, abzentrifugiert (500 x g, 5 min, 4 °C) und zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Im Folgenden wurde die Zellzahl bestimmt und pro ml Einfriermedium auf 5×10^6 eingestellt. Die Zellen wurden dann in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen pipettiert und unter Verwendung einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei – 80 °C eingefroren.

DMSO wirkt toxisch auf Zellen, weshalb dieser Vorgang zügig durchgeführt werden muss. Der Isopropanol-Mantel innerhalb der Einfrierbox stellt ein langsames herunterkühlen der einzufrierenden Zellen sicher. Zu schnelles Abkühlen könnte zum Platzen der Zellen führen, oder sie zumindest in ihrer Viabilität beeinflussen. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl sowie auch der Gesamtzellzahl wurden die Zellen zunächst geerntet und abzentrifugiert (500 x g, 5 min). Danach wurden die Zellen in 5 ml 1 x PBS aufgenommen und einmal gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in 5 ml 1x PBS aufgenommen und 10 µl dieser Zellsuspension mit Trypanblau (Endkonzentration 0,05 %) verdünnt. Hierbei handelt es sich um eine Vitalfärbung. Der anionische Diazofarbstoff wird lediglich von den toten Zellen aufgenommen, wohingegen sich lebende Zellen nicht anfärben lassen, da der Farbstoff nicht membrangängig ist. Lebende Zellen erscheinen unter dem Lichtmikroskop farblos und können leicht von den toten Zellen unterschieden werden. Die Auszählung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Diese setzt sich aus vier Großquadraten zusammen, welche wiederum aus 4 x 4 Kleinquadraten zusammengesetzt sind. In vier Großquadraten werden lebende Zellen ausgezählt und die Lebendzellzahl unter Einberechnung des Kammerfaktors (1×10^4), der Verdünnung und des Volumens in dem die Zellen aufgenommen wurden bestimmt.

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

2.2.3 Versuchstiere

BALB/c

Genetisch nicht veränderter Wildtypstamm der Maus (*Mus musculus*). Die Inzuchtstämme wurden in der Zentrale Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universitätsmedizin Mainz gezüchtet.

2.2.4 Isolierung muriner BMDCs

Alle verwendeten Mäuse wurden gemäß §4 des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) durch zervikale Dislokation abgetötet.

2.2.4.1 murine BMDCs

Die Isolierung muriner BMDCs erfolgte aus dem Knochenmark der Hinterläufe. Zunächst wurden die Mäuse durch Besprühen mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Anschließend wurden die Hinterläufe komplett vom Fell befreit und von der Maus abgetrennt. Mittels Präparierbesteckes wurden die Knochen freigelegt und restliche Fleischrückstände durch Abreiben mit Ethanol komplett entfernt. Durch Eindrücken des Kniegelenkes wurden Femur und Tibia voneinander getrennt. Die Knochen wurden an beiden Enden durch einen Schnitt geöffnet. Mit Hilfe einer Spritze und einer feinen Kanüle (0,3 x 13 mm) wurde das Knochenmark aus den Unterschenkel-, und Oberschenkelknochen in eine mit PBS und 1 % FCS gefüllte Petrischale gespült. Das Knochenmark wurde gründlich resuspendiert um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (500 x g, 5 min, 4 °C) und in Gey's Lysepuffer aufgenommen und 3 min bei RT in dem Puffer inkubiert. Hiermit wurde eine Lyse der ebenfalls im Knochenmark vorkommenden Erythrozyten erreicht. Die Reaktion wurde abgeschwächt indem 1 x PBS mit 1 % FCS zugegeben wurden, gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt. Die pelletierten Zellen wurden in DC-Medium aufgenommen, wodurch der Lysepuffer weitgehend entfernt und somit die Lyse komplett gestoppt wurde. Die Zellsuspension wurde dann durch ein Zellsieb gegeben um mögliche Knochensplitter, oder andere Verunreinigungen zu entfernen. Die Zellen wurden im Folgenden gezählt und auf 3×10^6 / ml DC-Medium eingestellt. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension wurde in 3 ml DC Medium pro Kavität einer 6-Kavitäten-Suspensionsplatte ausgesät, so das in jeder Kavität 3×10^6 Zellen waren.

In den nächsten sechs bis sieben Tagen entwickelten sich aus den Zellen der Makrophagenvorläufer reife BMDCs. Dazu musste an den Tagen 2 und 4 ein Medienwechsel vollzogen werden. An Tag 2 wurden 3 ml Medium aufgezogen und wieder vorsichtig in die Kavität zurück gegeben, dabei wurde die Platte zügig, aber ohne ruckartige Bewegung im Kreis geschwenkt. Durch dieses Spülen wurden nicht adhärenente Zellen entfernt. DCs entwickeln sich aus adhärenente Zellen, somit müssen Zellen, die sich in Suspension befinden entfernt werden. Schließlich wurden 3 ml abgezogen und 3 ml frisches DC-Medium hinzugefügt. An Tag 4 wiederum sind die DCs nur noch schwach adhärenent und beginnen in Suspension überzugehen, sie befinden sich jetzt im halbreifen Zustand. Deshalb wurden 3 ml Medium ohne Spülen abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt.

An Tag 6 wurden die Zellen mit Vorsicht geerntet, um sie nicht zu aktivieren. Die Zellen wurden in 96- Kavitätenplatten in Testmedium überführt, pro Kavität 200.000 Zellen. Die Stimulation via LPS wurde für 15-20 h bei 37 °C durchgeführt. Um optimale Versuchsbedingungen zu garantieren wurden die DCs zunächst mittels einer FACS-Analyse auf ihre Reinheit hin überprüft. Nur DCs die eine Reinheit von über 80 % hatten, wurden für weitere Experimente herangezogen. Des Weiteren wurde der Grad der Aktivierung überprüft, welcher durch Expressierung der Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 bestimmt werden kann.

Tabelle 7: Liste der verwendeten DC-Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

Spezifität	Verdünnung	Fluorochrom	Klon	Hersteller
CD11c	1:600	APC-Cy7	N418	eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland
CD40	1:200	APC	1C10	eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland
CD80	1:200	PE	16-10A1	eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland
CD86	1:200	FITC	GL1	BioLegend, Fell, Deutschland
MHC II	1:1000	APC	M5/114.15.2	BioLegend, Fell, Deutschland

2.2.5 Durchflusszytometrie-Analyse (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Analyse von Zellen. Diese werden mit hoher Geschwindigkeit durch eine Kapillare gesaugt, so dass eine Vereinzelung der Zellen erfolgt. Die so vereinzelteten Zellen passieren nun nacheinander einen Laserstrahl. Dieser Prozess wird als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet. Dabei kommt es zu einer Lichtbeugung und -streuung seitens der Zellen, welches durch Photodetektoren nachgewiesen werden kann. Somit können Größe und Granularität der Zelle bestimmt werden, wobei sich die Menge des gestreuten Lichts proportional zu der Größe und Komplexität der Zelle verhält. Des Weiteren können im Falle der FACS- Analyse (von engl. *fluorescent activated cell sorting*) auch Fluoreszenzfarben gemessen werden¹³⁹. Dies ist besonders für das Anfärben von Proteinen, oder Bestandteilen innerhalb der Zelle wichtig. Dieses kann zum einen durch Interkalation des Farbstoffes in die DNA erfolgen, z.B. Propidiumiodid (PI), oder durch einen Antikörper der mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) markiert ist. Mit dieser Methode kann beispielsweise die Expression von Oberflächenmolekülen spezifisch bestimmt werden. Die Expression der Oberflächenmoleküle ist ein wichtiges Kriterium bei der Analyse von Zellen, wobei hier u.a. der Aktivierungsgrad der Zelle, Überexpressionen bestimmter Proteine, sowie das Fehlen bestimmter Proteine gezielt bestimmt werden kann. In diesem Fall werden die an die Zelle gebundenen Fluorochrome nach Bestrahlung durch den Laser zum Fluoreszieren angeregt. Die Fluoreszenz kann gemessen werden und gibt Auskunft über die Expression der zu untersuchenden Oberflächenproteine. Des Weiteren können auch intrazelluläre Bestandteile nachgewiesen werden, wobei die Zellen zunächst permeabilisiert werden müssen.

In dieser Arbeit wurden die Geräte FACS-Canto und LSR II von BD genutzt. Wurden mehrere Farben gemessen, wurde vor dem Experiment eine Kompensation vorgenommen um die spektrale Überlappung von Fluoreszenzen ähnlicher Wellenlängen zu korrigieren. Wurden Beads zur Kompensation herangezogen stammten diese von BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland.

Tabelle 8: Verwendete Fluorochrome in alphabetischer Reihenfolge

Fluorochrom mit Abkürzung	Emission in nm (Max.)	Extinktion in nm (Max.)
Allophycocyanin, APC	660	650
APC Konjugat mit einem Cyan-Farbstoff (Cy7), APC-Cy7	785	650
Fluoresceinisothiocyanat, FITC	519	494
Phycoerythrin, PE	578	496, 546
Peridinin-Chlorophyll-Protein-Complex, Per-CP	678	482

Für eine Messung wurden ca. 1×10^5 Zellen benötigt. Zunächst wurden sie zweimal in 2 ml FACS-Puffer gewaschen. Die Probe wurde zunächst mit den Antikörpern in entsprechender Verdünnung (Tabelle 7) inkubiert. Dabei wurden die Antikörper nach folgenden Kriterien ausgewählt: Reinheit der DCs (CD11c) und Aktivierungsgrad (CD80, CD86 und MHCII). Darüber hinaus wurde der Totfarbstoff Propidiumiodid benutzt, um tote von lebenden Zellen zu unterscheiden. Im Zuge der Inkubationszeit von 30 min ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) binden die Antikörper spezifisch an ihre entsprechenden Oberflächenmoleküle. Danach wurde die Probe erneut zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, in 100 μl FACS-Puffer aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt und direkt für die Messung herangezogen.

Die FACS-Analysen wurden mit Hilfe der Software FACS-Diva (von BD) ausgewertet. Zunächst wurde durch Einstellung der richtigen Parameter die zu messende Population ausgewählt. Dabei können die Zellen in Histogrammen oder im Dot-Blot dargestellt werden. In einem Histogramm wird eine Häufigkeitsverteilung der Messungen eines bestimmten Parameters berücksichtigt, orientiert wird sich nach der MFI (mean fluorescence intensity). Gezeigt wird also nur ein Parameter. Im Dot-Blot wiederum können zwei Parameter dargestellt werden und die Korrelationen zwischen diesen bestimmt werden. Somit können auch Subpopulationen von Zellen elegant gegeneinander übergestellt werden.

2.2.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine weitere Methode zur Analyse von Zellen, wobei hier jede Zelle einzeln als solche dargestellt werden kann. Dabei können zum einen, analog zur lichtmikroskopischen Darstellung, einfache morphologische Merkmale wie Größe und Form gezeigt werden. Zum anderen können aber auch morphologische Merkmale aufgezeigt werden, die sich durch eine lichtmikroskopische Darstellung nicht darstellen lassen, wie z.B. Organellen die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden. Ein Beispiel hierfür ist die Anfärbung der DNA im Zellkern mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Des Weiteren können im Zuge der Immunfluoreszenz Antigene nachgewiesen werden, die mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörper gebunden werden. Diese Technik wurde in dieser Arbeit genutzt um DALIS nachzuweisen. Darüber hinaus können rekombinante Proteine nachgewiesen werden, die mit GFP (green fluorescent protein) fusioniert werden. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit einem Invers-Mikroskop (IX81, Olympus) gearbeitet. Dieses kann die Wellenlänge von drei Fluoreszenzen messen, nämlich Fura/DAPI (350 nm), FITC (488 nm) und Texas Red (495 nm).

2.2.6.1 Intrazelluläre Färbung für Fluoreszenzmikroskopie

Die intrazelluläre Färbung eignete sich als Methode zur Untersuchung der DALIS. Die Zellen wurden zunächst mit 100 ng/ml LPS stimuliert und nach 11 – 24 h geerntet. Wurden Inhibitoren mit in die Untersuchung einbezogen wurden diese in entsprechender Konzentration zugegeben und ihrer Wirkung entsprechend für einen bestimmten Zeitraum mit den Zellen inkubiert (Tabelle 5). Die Zellen wurden nach erfolgter Stimulation geerntet und einmal mit 1 x PBS gewaschen und abzentrifugiert (500 x g, 5 min). Danach wurden die Zellen in 96-er Kavitätenplatten mit Spitzboden überführt, gefolgt von einem weiteren Waschschrift. Nach dem Abzentrifugieren (s.o.) wurde die Platte ausgeschlagen, um den Überstand komplett zu entfernen. Das Zellpellet wurde nun in 200 µl Cytofix/Cytoperm aufgenommen. Inkubiert wurde für 20 min bei 4 °C, in diesem Zeitraum erfolgte die Permeabilisierung und Fixierung der Zellen. Wiederum wurde abzentrifugiert (500 x g, 4 °C, 5 min). Im Folgenden wurde das Pellet dreimal mit Saponin-Puffer gewaschen. Das Detergenz Saponin unterstützte hierbei die Aufrechterhaltung der Permeabilität der Zellmembran. Nun wurden unspezifische Bindungsstellen innerhalb der Zellen mit 2 % BSA in 1 x TBST blockiert. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei RT. Erneut wurde einmal mit PBS gewaschen und die Zellen wie beschrieben pelletiert. Die Zellen wurden einer Behandlung mit FC-Block (1:100) unterzogen, wodurch die FC-Rezeptoren blockiert wurden, somit ging von ihnen keine unspezifische Bindung aus. Wiederum erfolgte ein Waschschrift nach beschriebenenem Prinzip.

Nun wurde der biotinylierte Primär-Antikörper (Maus IgG1 Anti-Ubiquitin Klon FK2) in einer Verdünnung von 1:200 in Blockierlösung hinzugegeben (bezogen von: Enzo, Lörrach, Deutschland). Dieser Antikörper richtet sich gegen mono- und polyubiquitinylierte Proteine, detektiert aber kein freies Ubiquitin. Nach 1 h Inkubation (RT in Dunkelheit) erfolgten drei weitere Waschschriffe mit 1 x PBS (Zentrifugation wie beschrieben). Im Folgenden wurde der Sekundärantikörper (Streptavidin-FITC, goat anti-mouse IgG) (Invitrogen) zu den Zellen in einer Verdünnung von 1:200 gegeben, in Kombination erfolgte die Zugabe von DAPI (1:30000). Beide Komponenten wurden in Blockierlösung verdünnt zugesetzt, wobei die Inkubation für 1 h (RT in Dunkelheit) erfolgte. Von nun an wurde direkte Lichteinstrahlung vermieden, um ein Ausbleichen der Proben nach erfolgter Anfärbung zu verhindern. Schließlich wurde dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 10 µl Mounting-Medium aufgenommen und resuspendiert. 5 µl der Zellsuspension wurden auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen luftblasenfrei eingedeckelt und mit Klarlack versiegelt, um die Zellen vor Austrocknung zu schützen.

2.2.7 Aufreinigung von Proteinen und Methoden der Proteinanalytik

2.2.7.1 Lyse der Zellen

Die Zellen wurden zunächst abzentrifugiert (600 x g, 5 min, 4 °C) und zweimal mit 1 x PBS gewaschen und mit UREA-Puffer lysiert. Zellpellets wurden direkt nach dem Auftauen auf Eis mit UREA-Puffer versetzt und lysiert. Der Lysevorgang wurde 15 min auf Eis durchgeführt, gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt (16.000 x g, 25 min, 4 °C). Der Überstand wurde weiter verwendet und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, während das aus Zellrückständen und DNA bestehende Pellet verworfen wurde.

2.2.7.2 Fällung der Proteine

Mit Hilfe der Proteinfällung können Verunreinigungen, wie Salze und Detergenzien aus der Probe entfernt werden, indem die Proteine präzipitiert werden, die ungewollten Substanzen hingegen in Lösung verbleiben. Dies ist wichtig, da die Verunreinigungen unter Umständen spätere Analyseverfahren, wie Gelelektrophorese, oder den enzymatischen Verdau stören können. Des Weiteren können die Proteine in der Probe durch diese Methode aufkonzentriert werden. Die Proteinfällung erfolgte nach Angaben des Herstellers (ProteoExtract® Protein Precipitation Kit; Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) für 1 h.

2.2.7.3 Bestimmung der Konzentration von Proteinen

Die Proteinbestimmung gewährleistet, dass Proben auf einem SDS-PAGE-Gel oder einer entwickelten Western-Blot Membran quantitativ miteinander verglichen werden können. Nach Berechnung der Proteinkonzentration können in jede Tasche des SDS-PAGE-Gels die gleiche Menge Protein geladen werden. In dieser Arbeit wurde das Pierce® 660 nm Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA) verwendet, wobei die Versuchsdurchführung nach Angaben des Herstellers erfolgte. Der Test basiert auf Bindung eines Farbstoffs an das Protein in saurem pH-Wertbereich, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs ändert. Die Absorption wird mittels eines TECAN- Readers gemessen. Im Falle des Pierce® 660 nm Protein Assay Kits wird die Absorption bei 660 nm gemessen. Zunächst wurde eine als Referenz dienende BSA-Standardgrade als Doppelbestimmung in eine 96-well Kavitätenplatte pipettiert. Mit Hilfe der Steigung dieser Graden wurde die Konzentration der Proteine errechnet. In der Regel wurde die Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ausgerechnet, wodurch gewünschte Proteinkonzentrationen einfach berechnet werden konnten. Die Proben wurden für weitere Versuche bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.8 SDS-PAGE, Coomassie-Färbung und Western-Blot

2.2.8.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Methode der Gel-Elektrophorese um komplexe Proteingemische der Größe nach aufzutrennen. Dafür wurde sich der Methode in einem vertikalen System nach Laemmli bedient¹⁴⁰. Das Verfahren basiert auf der Kombination zweier Gele, einem kleinporigen Trenngel, welches die Proteine auftrennt, auf das ein großporiges Sammelgel gegossen wird. Das Sammelgel fokussiert dabei zunächst die Probe, bevor diese in das Trenngel migriert. Um Blasenbildung innerhalb des Gels zu vermeiden und um eine saubere Trennschicht zu erzielen wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisierung wurde das Isopropanol abgegossen und das Trenngel mit einem 4 %-igen Sammelgel überschichtet. Direkt nach dem Gießen wurde das Sammelgel mit einem Kamm versehen. Der Kamm formte nach Auspolymerisierung des Gels Taschen, in die die Probe pipettiert werden konnte.

Tabelle 9: Übersicht über die Zusammensetzung der SDS-Gele

	Sammelgel (4%)	Trenngel (14%)
Acrylamid 40% / Bis (29:1)	0,5 ml	3,5 ml
Trenngelpuffer 1,5 M Tris-HCl, pH 8,6	-	2,5 ml
Sammelgelpuffer 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,2 ml	-
dH ₂ O	3,2 ml	3,8 ml
SDS (10% w/v)	50 µl	100 µl
APS (10% w/v)	50 µl	75 µl
TEMED	10 µl	20 µl

Proben für SDS-PAGE wurden nach der Proteinbestimmung und Einstellung der gewünschten Proteinkonzentration mit 5 x SDS- Ladepuffer versetzt, und für 5 min bei 95 °C in einem Heizblock aufgeköcht, um sie zu denaturieren. Der Ladepuffer enthielt DTT um Disulfidbrücken zu reduzieren.

Die auspolymerisierten Gele wurden in das System gegeben und die Kammer mit 1 x SDS Laufpuffer geflutet. Nun wurde der Kamm und gezogen das Gel beladen. Um eine Größenbestimmung durchführen zu können wurden immer 3 µl eines vorgefärbten Markers auf das Gel aufgetragen. Nun wurde das System an die Spannungsquelle angeschlossen. Die Migration der Proteine basiert auf der Spannung, wobei kleine Proteine schneller migrieren als große, da diese stärker durch die Poren im Gel zurückgehalten werden. Der Gellauf erfolgte je nach Dicke des Gels für 1 – 2 h bei 30 mA. Dabei regulieren sich die Volt- und Wattzahl entsprechend, allerdings wurde die Voltzahl auf maximal 200 V pro Gel eingestellt. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und nur das Trenngel für weitere Versuche genutzt. Es wurde entweder fixiert und die Proteinbanden mittels einer Coomassie-Färbung sichtbar gemacht, oder es wurde für eine Western-Blot Analyse herangezogen.

2.2.8.2 Fixierung und kolloidale Coomassie-Färbung der Gele

Das Fixieren ist für das spätere Färben des Gels wichtig, denn der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant Blue G-250 benötigt einen sauren pH um an die Proteine binden zu können^{141;142}. Sobald das Gel deutlich geschrumpft war (ca. 45 min), wurde die Fixierlösung abgegossen und die kolloidale Coomassie Färbelösung „Blue Silver“ auf das Gel gegeben¹⁴³. Nach ca. 2 h wurden die ersten Proteinbanden deutlich sichtbar, um aber eine komplette Färbung der Proteine zu gewährleisten wurde meistens über Nacht gefärbt. Somit konnten auch Proteine sichtbar gemacht werden, die

nur in geringen Mengen in der Probe vorhanden waren. Dabei liegt das Detektionslimit des Farbstoffs bei ca. 5 ng Protein pro Bande¹⁴². Schließlich wurde das Gel mit Wasser entfärbt um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Dadurch waren nur noch Proteinbanden gefärbt, während der Hintergrund des Gels entfärbt war. Danach wurden die Gele mittels des GelDoc Systems dokumentiert, dabei wurden die Gele auf eine weiße Glasplatte gelegt um für optimale Kontraste zu sorgen.

2.2.8.3 Western-Blot und Immundetektion von Proteinen

Um quantitative Aussagen über die Expression von Proteinen machen zu können, oder nur bestimmte Proteinbanden sichtbar zu machen und zu analysieren, wurde der Western-Blot genutzt¹⁴⁴. Durch diese Methode können auch gering abundante Proteine nachgewiesen werden, da einzelne Banden spezifisch detektiert werden können. Im Gegensatz hierzu sind auf einem gefärbten SDS-PAGE Gel alle aufgetragenen Proteine sichtbar, wodurch schwache Banden von stärkeren überlagert werden können. Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung der Proteine durch die SDS-PAGE wird das Proteinbandenmusters des Gels auf eine Membran übertragen.

Dazu wurde zunächst je Gel eine PVDF-Membran (0,45 µm) und vier Whatman-Filterpapiere in entsprechender Größe zugeschnitten. Im Folgenden wurde die Membran für 10 s in Methanol aktiviert und dann für 5 min in Blotpuffer äquilibriert.

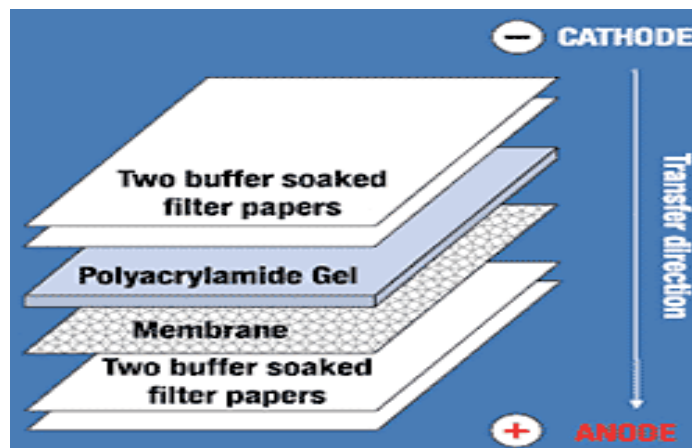


Abbildung 14: Schematischer Aufbau des Western-Blots (lokalisiert, 01.12.2011)

http://www.fermentas.com/templates/files/tiny_mce/support_images/wblotting.gif

Für den eigentlichen Blot wurde zumeist die Variante des „Semi-Dry“-Elektrotransfers genutzt. Dazu wurden zunächst zwei mit Blotpuffer befeuchtete Filterpapiere auf die Anode der Apparatur gelegt. Darauf wurde passgenau die äquilibrierte Membran gelegt, auf welcher wiederum das Gel platziert wurde.

Luftblasen wurden sorgfältig ausgestrichen, weil an ihrer Stelle das Protein nicht richtig auf die Membran übertragen werden kann. Schließlich wurde auf das Gel eine abschließende Lage von zwei mit Blotpuffer getränkten Filterpapieren gelegt und ebenfalls vorsichtig glatt gestrichen. Nun wurde die mobile Kathode der Apparatur angelegt und fest auf die obere Schicht der Filterpapiere gedrückt. Im Folgenden wurde die Apparatur an den Strom angeschlossen, woraufhin der eigentliche Transfervorgang beginnt. Die Proteine migrieren aus dem Gel und werden auf die Membran übertragen. Pro SDS-PAGE Gel wurden maximal 55 mA gewählt, in diesem Fall dauerte der Vorgang 4 h. Die Membran verfügt am Ende des Blotvorgangs über dasselbe Proteintrennmuster wie das entsprechende SDS-PAGE Gel. Nach dem Proteintransfer auf die Membran, wurde diese zunächst mit 5 % Milchpulver blockiert (RT, 1 h). Dadurch wurden freie Bindungsstellen auf der Membran blockiert, um unspezifisches Signal zu unterbinden. Nach dem Blockieren wurde die Membran dreimal mit 1 x TBST für jeweils 5 min auf einem Kippschüttler gewaschen. Im Folgenden wurde der Primärantikörper (Primär-Ak) in entsprechender Verdünnung (in 1 % BSA) auf die Membran gegeben und 15 h bei 4 °C inkubiert. Wiederholt wurde die Membran dreimal für 5 min mit 1 x TBST gewaschen, bevor Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung hinzugefügt wurde (RT, 1 h). Danach wurde erneut dreimal mit 1 x TBST für jeweils 5 min gewaschen. Abschließend erfolgte ein Waschschrift mit 1 x TBS um Tween[®]20 zu entfernen, da es die Immundetektion stören würde.

2.2.8.4 Immundetektion

An die Membran gebundene Proteine können durch den HRP-gekoppelten Sekundär-AK im Zuge der Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden. Zunächst bindet der Primär-AK spezifisch an ein Epitop des zu erkennenden Proteins. Der Sekundär-AK wiederum erkennt spezifisch die FC-Domäne des Primär AKs und bindet an diese. Die an ihn gebundene HRP ist enzymatisch aktiv und setzt Luminol in Anwesenheit eines peroxidhaltigen Puffers um (Abbildung 15) In diesem angeregten Zustand emittiert es Licht einer Wellenlänge von 425 nm. In dieser Arbeit wurde das Kit SuperSignal West Dura Extended Duration (Medium und Strong, Pierce, Rockford, USA) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Die Emission wurde schließlich im BioRad GelDoc System dokumentiert.

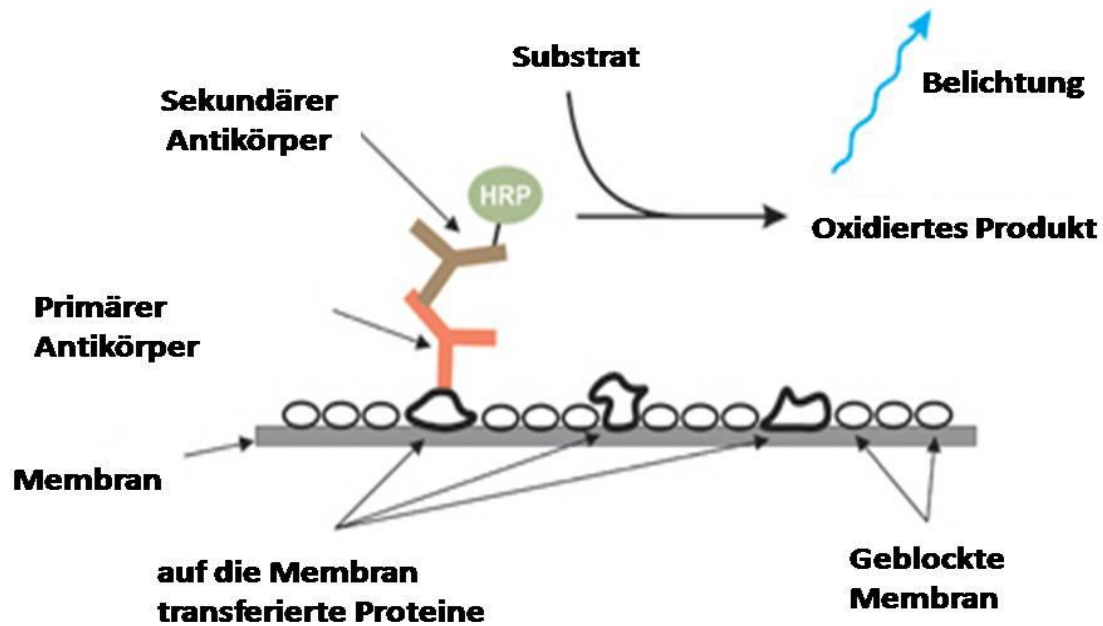


Abbildung 15: Prinzip des Nachweises von Proteinen mittels eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers (modifiziert nach <http://advansta.com>)

Tabelle 10: Primär- und Sekundärantikörper für Western Blots.

Primärantiköpers in entsprechender Verdünnung	Sekundärantiköpers in entsprechender Verdünnung	Hersteller (Primär-AK)	Größe des detektierten Proteins
Anti-(His) ₆ Tag-Maus monoklonaler Antikörper-unkonjugiert (1:1000)	α-Maus HRP (1:1000)	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	Je nach Größe des markierten Proteins
Anti-β-Aktin HRP Konjugat (1:20000)	Kein sek. AK, da konjugiert	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	~ 42 kDa

Der α-Maus HRP wurde von Pierce, Rockford, USA bezogen.

2.2.9 Aktivitätsassay von Peptidasen mittels Azocasein

Zur Überprüfung der Aktivität aufgereinigter Proteasen wurde der Azocaseintest durchgeführt. Dieser basiert auf der Umsetzung des als Peptidasesubstrat dienenden Caseins, an welches ein Azofarbstoff gebunden ist. Ist keine Peptidase vorhanden, fällt das unverdaute Azocasein als säureunlösliches Molekül aus. Im Falle der Anwesenheit einer Peptidase hingegen, wird das Casein umgesetzt und in kleine Fragmente gespalten. An diese kleinen Peptidfragmente sind die Azogruppen gekoppelt, sie verbleiben Überstand und lassen sich nicht abzentrifugieren. Im Überstand wird die Freisetzung des säurelöslichen Materials gemessen, welches augenscheinlich als gelbe Trübung erkennbar ist¹⁴⁵.

Zur Durchführung wurden zunächst je 300 µl Azocasein (in 50 mM Tris-HCl, pH 7,0) pro Reaktionsgefäße (2 ml, mit Deckel) vorgelegt. In jedem Test wurden 300 µl Azocasein plus 50 µl Wasser als Leerwert mit geführt. Als Positivkontrolle wurde Trypsin eingesetzt (Trypsin Gold, siehe 2.1.6). In das Gefäß der Positivkontrolle wurden 300 µl Azocasein plus 48 µl Wasser vorgelegt. Im Folgenden wurden 2 µl Trypsin in die Positivkontrolle pipettiert, in die zu messenden Fraktionen jeweils 50 µl der entsprechenden Probe. Endvolumen je Reaktionsgefäß waren also 350 µl. Danach wurden die Proben für 45 min bei 37 °C inkubiert, gefolgt von einer Zugabe von 600 µl 10 % Trichloressigsäure. Nach sorgfältigen Vortexen wurde das Gemisch für 10 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurden die Proben abzentrifugiert (16.000 x g, 15 min, RT). Vom Überstand wurden 200 µl in eine 96-Kavitäten- Flachbodenplatte pipettiert und im TECAN-Reader die Absorption bei 360 nm gemessen.

2.2.10 Methoden der Klonierung und DNA-Analysen

2.2.10.1 Aufreinigung von DNA aus Bakterienkulturen

Je nachdem wie viel Plasmid-DNA benötigt wurde, wurden Präparationen in Mini-, Midi-, oder Maximaßstab durchgeführt. Dabei wurde jeweils nach Angaben des Herstellers gearbeitet (Maxi-, und Midipräparation; Invitrogen, Darmstadt, Deutschland und Minipräparation von Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland). Die Konzentration der präparierten DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.2.10.2 Restriktionsverdau von Plasmiden durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen (REN) werden in drei Typen eingeteilt, für den Restriktionsverdau werden nur Enzyme des Typs II genutzt¹⁴⁶. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie die DNA an spezifischen Stellen schneiden, die ihrer Erkennungssequenz entsprechen. Dabei ist die Erkennungssequenz oft von palindromischer Natur und zwischen vier bis acht Basenpaaren (bp) lang. Dabei kann der Schnitt glatt erfolgen, man spricht von glatten Enden (blunt ends), oder versetzt erfolgen wobei man von überhängenden Enden spricht (sticky ends). Letzere lassen sich aufgrund der Überhänge leichter ligieren. Dabei wurden pro µg DNA ca. 2-4 U Restriktionsenzym in vom Hersteller angegebenen 10 x Puffer verdünnt. Der Verdau erfolgte für 1-2 Stunden, oder 15 h bei dem jeweiligen Temperaturoptimum des genutzten Enzyms. Wurde ein Verdau mit zwei Restriktionsenzymen durchgeführt, wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Nach durchgeführtem Verdau wurden die RENs hitzeinaktiviert, basierend auf ihrer Thermostabilität.

2.2.10.3 Analyse von DNA-Molekülen mittels Agarose-Gelelektrophorese

DNA- Moleküle lassen durch Agarose-Gelelektrophorese in einem elektrischen Feld auftrennen¹⁴⁷. Dabei wird ein als Trennmatrix dienendes Agarosegel gewünschter Konzentration gegossen, an welches eine Spannung angelegt wird. Auf Grund der negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat Rückgrat wandern die DNA-Moleküle zur Anode. Um die DNA-Moleküle sichtbar zu machen, werden diese mit Ethidiumbromid angefärbt¹⁴⁸. Ethidiumbromid ist ein Phenantridin-Farbstoff, welcher zwischen die Basen der DNA interkaliert. In diesem Zustand lässt sich durch Bestrahlung mit UV-Licht (Wellenlänge 300 nm) eine Fluoreszenz erzeugen, wodurch die DNA-Moleküle sichtbar gemacht werden können.

Die Endkonzentration der Agarose richtet sich dabei nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente. Dabei wurde bei der Auftrennung kleinerer DNA-Fragmente ein hochprozentiges Agarosegel gegossen, da kleine Fragmente durch die Poren des Gels hindurch gelangen, größere Fragmente hingegen von den Poren stärker zurückgehalten werden und somit langsamer laufen. Im Gegensatz dazu, werden durch die größeren Poren eines niederprozentigen Agarosegels größere Fragmente aufgetrennt, kleinere hingegen können das Gel fast ungehindert passieren. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer durch aufkochen vollständig gelöst. Anschließend wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zu der Lösung pipettiert. Die Lösung wurde in eine Gelform gegossen und ein Probenkamm hinzugefügt. Nach Aushärtung des Gels wurde es in die Elektrophoresekammer überführt, welche mit 1 x TAE-Puffer befüllt wurde.

Der Kamm wurde gezogen und die Proben, die zuvor mit Orange Loading Dye 1:10 versetzt worden waren, wurden in die vom Kamm vorgegebenen Taschen pipettiert. Des Weiteren wurde jeweils eine Spur mit Marker versetzt, um das Molekulargewicht der Fragmente bestimmen zu können. Um nach dem Gellauf quantitative Aussagen über die Menge der DNA-Konzentration treffen zu können, wurden definierte Mengen des Markers aufgetragen. Die Auftrennung der DNA erfolgte je nach Größe des Gels für ca. 30-90 min und wurde über die Voltzahl reguliert, welche auf 80-110 V eingestellt wurde. Danach konnte das Gel mittels des GelDoc Systems dokumentiert werden, oder wurde für weitere Analysen verwendet.

2.2.10.4 Gelelution von DNA-Molekülen

Um die DNA aus dem Gel zu isolieren, wurden die gewünschten Banden durch UV-Licht sichtbar gemacht und aus dem Gel ausgeschnitten. Im Folgenden wurde die DNA aus dieser Bande aufgereinigt, dazu wurde das NucleoSpin Extract II Kit benutzt (Macherey-Nagel, Dueren, Deutschland). Es wurde nach Anweisung des Herstellers gearbeitet.

2.2.10.5 Dephosphorylierung von aufgereinigten DNA-Fragmenten

Um eine Religation geschnittener und aufgereinigter DNA-Fragmente in Form eines Vektors zu verhindern, wurde der Phosphatrest am 5- Ende mit antarktischer Phosphatase (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) dephosphoryliert. Dazu wurde 1 U des Enzyms pro μg DNA benötigt. Die Inkubation erfolgte 30 min bei 37 °C, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung bei 65 °C für 5 min. Durch Verhinderung der Religation des Vektors wurde die Chance der Ligation von geschnittenem Vektor und geschnittenem Insert deutlich erhöht.

2.2.10.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Um Vektor und Insert gezielt zu ligieren, wurden die Eigenschaften der T4 DNA– Ligase (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) genutzt. Das Enzym katalysiert die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphatrest und der Desoxyribose am 3'-Ende¹⁴⁹. Dabei hat die ATP-abhängige T4 DNA- Ligase den Vorteil, dass sie sowohl glatte als auch Überhänge ligieren kann. Zunächst wurde die Menge an DNA durch Vergleich mit der entsprechenden Bande des Molekulargewichtsmarkern abgeschätzt. Es ist wichtig, dass das Insert im Reaktionsansatz im Überschuss vorliegt.

Hier wurden Verhältnisse von 1:3 -1:7 benutzt. 20 µl des Vektor/Insertgemisches wurden mit 2 µl des T4 DNA-Ligase-Puffer (enthält ATP) und 1 µl T4-DNA-Ligase versetzt. Der Ligationsansatz wurde 15 h bei 16 °C inkubiert.

Für Subklonierungen von PCR Produkten wurde der pCR2.1-TOPO Vektor (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) genutzt. Die PCR Produkte wurden durch die GoTaq Polymerase (Promega, Madison, USA) mit einem A-Überhang versehen. TOPO-Vektoren sind linear und tragen eine 5'-(C/T)CCTT-3' DNA Sequenz an beiden Enden. Des Weiteren sind Topoisomerasen kovalent an den Vektor gebunden. Die Topoisomerasen erkennen die 5'-(C/T)CCTT-3' Sequenz und ligieren das PCR-Produkt mit dem Vektor.

2.2.11 Kompetente bakterielle Zellen

Unter kompetenten Bakterien versteht man jene, die dazu befähigt sind DNA, die sich frei in ihrer Umgebung, z.B. dem Medium befindet, aufzunehmen¹⁵⁰. Man unterscheidet natürliche und künstliche Kompetenz. Erstere basiert auf den *com*-Genen einiger Bakterienarten, die sowohl für die Erkennung von Fremd-DNA, als auch deren Aufnahme und Integrierung durch Rekombination in das Genom verantwortlich sind. Bakterien der Art *E. coli* hingegen verfügen über eine künstlich herbeigeführte Kompetenz. Dabei unterscheidet man zwischen chemischer Kompetenz und Elektrokompetenz. Kompetenz ist die Voraussetzung für die Transformierbarkeit von Bakterien. In dieser Arbeit wurden zwei chemisch kompetente *E.coli* Stämme genutzt.

Rosetta-gamiTM B Host strain

Novagen, San Francisco, USA

Top10 *E.coli* (One Shot[®] ccd
Survival – T1^R) des Top10 Stammes

Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

Bakterien des Top10 Stammes wurden dazu benutzt Plasmide in hoher Zahl zu exprimieren, während Bakterien des Rosetta-Gami Stammes dazu benutzt wurden Fremd- Protein zu exprimieren.

2.2.11.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen Rosetta-gami Zellen

Zunächst wurde der Bakterienstamm auf eine LB-Agarplatte (34 µg/ml Chloramphenicol) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden Einzelkolonien unter sterilen Bedingungen gepickt und jeweils in 5 ml LB-Medium (versetzt mit 34 µg/ml Chloramphenicol) überführt und 15 h bei 37 °C schüttelnd (180 rpm) inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden 50 µl in 5 ml frisches LB-Medium pipettiert. Nach einer Wachstumszeit von 3 h wurden mit dieser Kultur 100 ml frisches LB-Medium angeimpft. Nachdem die optische Dichte (OD) einen Wert von 0,3 bei einer Wellenlänge von 600 nm erreicht hatte (OD₅₅₀) wurde die Bakterienkultur mit Eis abgekühlt. Danach wurde die Kultur abzentrifugiert (1800 x g; 4 °C; 10 min) und das Pellet in 20 ml Tfb1 aufgenommen, resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 900 x g (4 °C, 5 min). Das Pellet wurde in 4 ml kaltem Tfb2 resuspendiert und Aliquots von 100 µl pipettiert, welche direkt in flüssigen Stickstoff schockgefroren wurden. Danach wurden die Zellen bei – 80 °C aufbewahrt.

2.2.11.2 Transformation in chemisch kompetente Zellen

Pro Transformation wurde ein Röhrchen Top10 *E.coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Direkt nach dem Auftauen der Zellen wurden 10 µl des Ligationsansatzes (in pCR2.1-TOPO) hinzupipettiert und das Röhrchen dreimal mit dem Finger angestoßen, damit sich die Plasmid-DNA gut mit den Zellen vermischen kann. Danach wurden die Zellen 10 min auf Eis inkubiert.

Durch den folgenden Hitzeschock öffnen sich Poren in der Membran der Bakterienzelle, was die Aufnahme fremder Plasmid-DNA ermöglicht, wobei Dauer und Temperatur von enormer Wichtigkeit für den Erfolg sind. In diesem Fall dauerte der Hitzeschock 30 s bei 42 °C. Direkt wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und in 400 µl SOC-Medium aufgenommen. Im Folgenden wurden die Zellen 60 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert und danach bei 800 x g abzentrifugiert (5 min). Das Zellpellet wurde in 200 µl LB-Medium aufgenommen und auf einer mit entsprechendem Antibiotikum versetzten LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden 16 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Die Transformation in Rosetta-gami (DE3) erfolgte nach dem gleichen Prinzip, nur das zu den Zellen 50-100 ng des entsprechenden Konstrukts zugegeben wurden. Die Zellen wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die mit 30 µg/µl Kanamycin und 34 µg/µl Chloramphenicol versetzt wurden. Da Rosetta-gami (DE3) bereits einmal transformiert wurden, besitzen sie eine Resistenz gegen Chloramphenicol. Kanamycin war das Selektionsantibiotikum der in dieser Arbeit genutzten Plasmide.

2.2.12 Blau-Weiß Selektion

Die Blau-Weiß Selektion wurde als Methode gewählt, um Religanden von dem gewünschten Konstrukt zu unterscheiden¹⁵¹. Religanden hydrolysieren durch Anwesenheit der exprimierten β -Galactosidase das X-Gal, wodurch ein blauer Farbstoff entsteht, welcher die Kolonie blau anfärbt. Hat das Konstrukt hingegen das Insert aufgenommen, wird das β -Galactosidase kodierende *lacZ* Operon durch das Insert zerstört und die Kolonie auf der LB- Agarplatte erscheint weiß. Somit wurden nur weiße Kolonien für weitere Experimente verwendet. Dazu wurden Agarplatten mit 40 μ l (40 μ g/ml) X-Gal versetzt.

2.2.13 Isolierung von Plasmiden aus Bakterien und Anlegen von Glycerinstocks

Von den über Nacht inkubierten und mit transformierten Bakterien bewachsenen Platten wurden Einzelzellklone mittels einer sterilen Pipettenspitze gepickt. Diese wurden in LB-Medium überführt, welches mit entsprechendem Antibiotikum versetzt war und 15 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Im Folgenden wurden je nach gewünschter Menge Plasmidisolierungen und Reinheitsbestimmungen wie in 2.2.10.1 beschrieben durchgeführt.

In der Regel wurden zunächst geringe Mengen an DNA isoliert und sequenziert. Dazu wurde ein Kontrollverdau durchgeführt. Die REN für den Verdau wurden so gewählt, dass anhand der geschnittenen Fragmente die Größe und wenn möglich auch die Orientierung des Inserts bestimmt werden konnte. Banden, die dem vorher errechneten Molekulargewicht entsprachen, wurden ausgeschnitten und die DNA extrahiert. Die Proben wurden von der Firma GATC (Konstanz, Deutschland) sequenziert. Die Sequenzierungsdaten wurden mit den cDNA-Sequenzen des Proteins mit Hilfe des Computerprogrammes Vector NTI verglichen. Stimmt die Sequenzierungsdaten mit dem Konstrukt überein, wurden von diesen Proben Glycerinstocks angelegt. Dazu wurden 300 μ l der Bakteriensuspension mit 700 μ l 50 %-igem Glycerin vermischt. In einem Kryoröhrchen wurden sie bei – 80 °C als Dauerkultur eingefroren.

2.2.14 Konventionelle Polymerase - Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR lassen sich definierte Bereiche der DNA amplifizieren, dabei reichen wenige Kopien der gewünschten DNA zur Vervielfältigung aus¹⁵². Es handelt sich um einen *in vitro* Vorgang, bei dem die DNA enzymatisch durch eine DNA- Polymerase repliziert wird. Heutzutage werden äußerst hitzeresistente Polymerasen genutzt, die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert werden¹⁵³. Neben dem thermostabilen Enzym benötigt man für den Vorgang das zu vervielfältigende DNA-Stück (engl. *Template*-DNA) und zwei Oligonukleotid Primer. Diese legen den Startpunkt der DNA-Synthese fest. Sie sind komplementär zum Sinn-, bzw. dem Antisinnstrang. Zudem werden Desoxyribonukleotidphosphate (dNTPs) benötigt, welche als Bausteine fungieren. Da das Enzym nur in Gegenwart von $MgCl_2$ aktiv ist, muss der Reaktionspuffer gegebenenfalls damit versetzt werden.

Tabelle 11: Übersicht über einen klassischen PCR-Ansatz

Komponente	Menge
Template DNA	25-100 ng
<i>Sense</i> Primer [100 pM]	1 μ l
<i>Antisense</i> Primer [100 pM]	1 μ l
dNTP Mix [10 mM je Base]	1,5 μ l
DNA Polymerase	0,5 – 1 μ l
10 x Polymerase Puffer	2,5 μ l
$MgCl_2$ [25 mM]	1,5 μ l
dH ₂ O (DNase und RNase-frei)	Zum Auffüllen auf das Gesamtvolumen (50 μ l)

Dabei gliedert sich die eigentliche Reaktion in drei Teilschritte, die Denaturierung, die Primerhybridisierung (engl. *Annealing*) und die Elongation. Jeder Teilschritt findet bei einer anderen Temperatur statt. Die Temperaturwechsel müssen schnell stattfinden um ein optimales Ergebnis zu generieren, weshalb die gesamte Reaktion in einem Thermocycler stattfindet. Im Zuge der Denaturierung wird die DNA auf 95 °C erhitzt, wodurch die Stränge voneinander getrennt werden. Anschließend wird die DNA abgekühlt und die Primer können sich an die DNA anlagern. Jeder Primer besitzt ein spezifisches Temperaturoptimum, die Anlagerungstemperatur (engl. *annealing temperature*). Diese richtet sich nach der Länge, der Sequenz und dem GC-Gehalts des Primers. Schließlich erfolgt im Schritt der Elongation die eigentliche Replikation, indem die DNA-Polymerase die Stränge mit Nukleotiden ergänzt und somit das gewünschte Produkt synthetisiert. Das Enzym beginnt am 3'OH-Ende des Primers und folgt dann dem DNA-Strang, der als Matrize dient. Dabei ist jedes Syntheseprodukt im nächsten Schritt eine zusätzliche Matrize für weitere Produkte.

Tabelle 12: Schritte und Temperaturen eines typischen PCR-Programmes

PCR-Teilschritt	Dauer und Temperatur
Denaturierung	3 min, 95 °C
Lauf 25- 35 Wiederholungen	
Denaturierung	30 s 95 °C
Primerhybridisierung	30 - 45 s (variiert je nach Primer)
Elongation	68 °C, 1 min/kb
Finale Elongation	3 min, 68 °C

Die Temperatur der Elongation ist entsprechend des Optimums der genutzten DNA-Polymerase. Hier wurden für PCRs im Rahmen von Klonierungsschritten die PfuUltra® II Fusion HS, für Screenings wiederum wurde eine die GoTaq Polymerase genutzt. Diese hat im Gegensatz zur erst genannten keine Korrekturlese-Funktion (proof reading). Durch ihre Exonukleaseaktivität ist die PfuUltra® II Fusion HS (Stratagene, Santa Clara, USA) dazu befähigt falsch eingebaute Nukleotide zu erkennen und zu entfernen.

2.2.15 Ortsgerichtete Mutagenese durch *Quickchange* – PCR

Um eine Punktmutation innerhalb der optimierten LysN_{opt} Sequenz zu erreichen, wurde eine *Quickchange* - PCR durchgeführt. Die Methode basiert auf einem *in vitro* Vorgang, in dem durch ortsgerechte Mutagenese einzelne Aminosäuren durch andere ausgetauscht werden können¹⁵⁴. Dies kann durch Punktmutation, Deletion oder Insertion einzelner Basen erfolgen. Durch den Einsatz der mutagenen Primer und der DNA- Polymerase Pfu Ultra Fusion II wird die Plasmid-DNA amplifiziert. Die Pfu repliziert mit hoher Genauigkeit, ist aber andererseits nicht in der Lage den mutagenen Primer von dem DNA-Strang zu lösen. Dabei entstehen an den Enden des replizierten zirkulären Plasmids kleine Kerben, sog. *Nicks*. Im Folgenden werden die PCR Produkte mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut. Diese Endonuklease besitzt die Eigenschaft methylierte und hemimethylierte DNA zu erkennen und zu verdauen¹⁵⁵. Die als Muster dienende DNA aus *E.coli* ist methyliert und wird verdaut, während die neu synthetisierte, unmethylierte, mutierte DNA nicht abgebaut wird. Da die Primer übereinander gelegt wurden, kann die Polymerase die Sequenz synthetisieren und die Mutation wird inkorporiert. In diesem Fall wurden die Primer so konstruiert, dass die gewollte Mutation innerhalb der Sequenz lag. Wie in 2.2.14 beschrieben wurde die Plasmid-DNA mit dem zu mutierenden Insert bei 95 °C denaturiert. Im Folgenden wurden die Primer bei 55 °C an die DNA hybridisiert. Die Elongation erfolgte entsprechend dem Temperaturoptimum der Pfu- Polymerase bei 68 °C. Insgesamt wurden 15 Zyklen durchlaufen. Nach erfolgter PCR wurde das Produkt für 2 h bei 37 °C mit DpnI verdaut.

2.2.16 Klonierung der Metalloendopeptidasen in *E.coli*

Sowohl für LysN_{opt(182-301)}, als auch für LysN_{optE157D(182-301)} wurde als Expressionssystem der pET-26b (+) Vektor (Novagen, Merck, Darmstadt, Deutschland) gewählt. Da es sich bei den Proteasen um Proteine aus einem Pilz handelt wurden die Proteinsequenzen eigens für *E.coli*, bzw. Sf-9 Zellen sequenzoptimiert und von der Firma Centic Biotec (Weimar, Deutschland) synthetisiert.

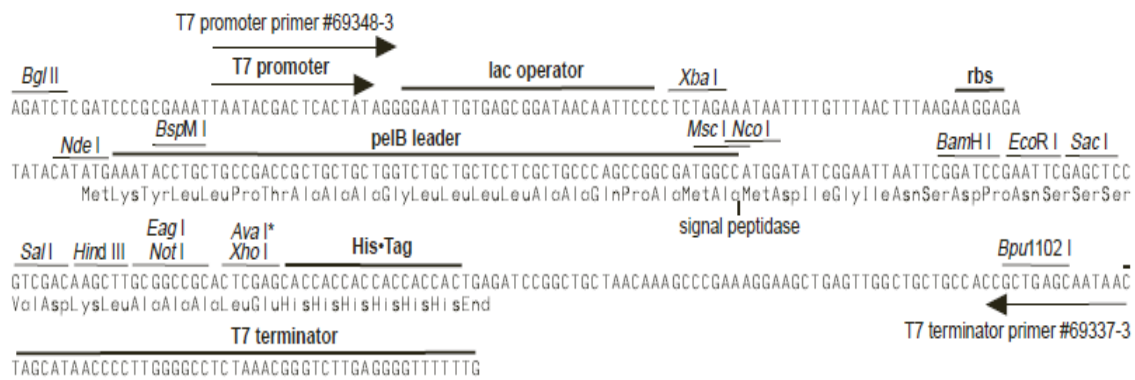


Abbildung 16: Detaillierte Darstellung der wichtigen Elemente des pET26b (+) Vektors

Gezeigt sind der Promoter, Operator, Signalsequenz, Stopp-Signal und dem His-Tag.

Der Vektor enthält eine N-terminale *pelB* Signalsequenz die dafür sorgt, dass das exprimierte Protein in das Periplasma des Bakteriums dirigiert wird, wo die Signalsequenz selbst durch eine Peptidase abgespalten wird^{156;157}. Dazu verfügt der Vektor über das *lac*-Operon und kann somit durch IPTG, welches als künstlicher Aktivator des Operons dient, induziert werden. Das rekombinante Protein wurde mit der ebenfalls im Vektor vorhandenen C-terminalen His-Tag Sequenz (6 x His-Tag) fusioniert.

2.2.16.1 Expression von LysN_{opt} und LysN_{optE157D}

Zunächst wurde der Zeitpunkt der maximalen Expression des Proteins bestimmt. Dazu wurden *E.coli* Bakterienzellen des Stammes Rosetta Gami (DE3) mit 50 ng Plasmid-DNA von LysN_{opt}, bzw. LysN_{optE157D} transformiert. Von den Agarplatten wurde am nächsten Tag jeweils ein Klon zum Ansetzen der bakteriellen Kultur gepickt. Die Kultur wurde schüttelnd (180 rpm) bei 37 °C inkubiert. Im Folgenden wurde in regelmäßigen Abständen die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Sobald diese einen Wert von 0,6 erreicht hatte, wurden die Bakterien mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und zusätzlich mit ZnSO₄ (Endkonzentration 0,2 mM) versetzt. Dabei wirkte

IPTG als Induktor für die Expression des Proteins. ZnSO_4 dient als Stabilisator der Struktur der Metalloendopeptidase. Danach wurde in regelmäßigen Abständen Zeitwerte (jeweils 1 ml) entnommen. Von den Zeitwerten wurde die OD gemessen und eine Probe für ein SDS-PAGE-Gel vorbereitet (siehe Abbildung 22). Dazu wurden die Proben abzentrifugiert und das Pellet in SDS-Lysepuffer lysiert. Das Pellet wurde 1:10 verdünnt und auf das SDS-PAGE Gel aufgetragen.

2.2.16.2 Aufreinigung von LysN_{opt} und $\text{LysN}_{\text{optE157D}}$ aus dem Periplasma

Alle Inkubationen bakterieller Zellen wurden bei 37 °C auf einem Schüttler durchgeführt. Die Zentrifugationsschritte in der Hochgeschwindigkeitszentrifuge wurden mit dem GS-3 Rotor (1000 x g, 4 °C, 15 min) durchgeführt. Das LB-Medium für transformierten Rosetta-gami Zellen wurde mit 34 µg/ml Chloramphenicol und 30 µg/ml Kanamycin versetzt. Zur periplasmatischen Aufreinigung wurde zunächst eine Kolonie transformierter Bakterien einer LB-Agar Platte gepickt. Von diesem Klon wurden 200 ml Bakterienkultur angeimpft und 16 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Dann wurde die Kultur abzentrifugiert (6000 x g, 15 min, 4 °C) und das Pellet in frischem, mit Antibiotikum versetzten Medium (1 l) aufgenommen. Die Bakterien wuchsen bei RT und wurden schüttelnd bei 180 rpm inkubiert. Sobald die OD der Hauptkultur einen Wert von 0,6 erreicht hatte, wurde die Kultur induziert (1 mM IPTG, 0,2 mM ZnSO_4). Nach Erreichen der maximale Expression (siehe 3.1.3) wurde die Kultur in einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge pelletiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Pellet wurde in 80 ml Sucrosepuffer pro g Nassgewicht aufgenommen und resuspendiert. Danach wurden die Zellen schüttelnd für 10 min inkubiert, gefolgt von einem weiteren Schritt in der Hochgeschwindigkeitszentrifuge. Der Überstand wurde komplett verworfen und das Pellet in gleichem Volumen 5 mM MgSO_4 aufgenommen. Das Gemisch wurde für 10 min auf Eis gerührt. Nochmals erfolgte ein Zentrifugationsschritt. Final wurde der Überstand sorgfältig gegen Ni-NTA Puffer dialysiert werden, bevor weitere Aufreinigungsschritte unternommen wurden.

2.2.16.3 Aufreinigung von *LysN_{opt}* und *LysN_{optE157D}* aus dem Zytoplasma

Zunächst wurde wie in 2.2.16.2 beschrieben eine Hauptkultur (1 l) angesetzt, induziert, geerntet und abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 1 x PBS gewaschen und bei – 20 °C eingefroren. Am folgenden Tag wurde das Pellet auf Eis aufgetaut (30 min) und dann in 15 ml bakteriellem Lysepuffer, welcher frisch mit 1 mg/ml Lysozym versetzt wurde, aufgenommen und resuspendiert. Das Lysat wurde für 30 min bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert und dabei alle 5 min fünfmal invertiert. Danach wurde das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um dann erneut bei 37 °C für 15 min aufgetaut zu werden. In der Regel war das Pellet so viskos, dass DNase (Endkonzentration 100 µg) und 100 mM MgSO₄ (Mg als Kofaktor für DNase) hinzugegeben werden musste und nochmals 30 min inkubiert wurde. Schließlich wurde das Lysat sonifiziert (3 x 30 s, Intervall 6). Ein möglichst flüssiges Lysat ließ auf eine erfolgreiche Lyse schließen. Das Lysat wurde abzentrifugiert um Zelldebris zu entfernen. Der Überstand wurde durch einen Spritzenfilter (0,45 µm) gegeben bevor weitere Aufreinigungsschritte unternommen wurden. Des Weiteren wurde eine Probe für eine SDS-PAGE Analyse entnommen.

2.2.16.4 Aufreinigung aus Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*)

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 10.000 x g, 4 °C, 15 min mit dem SS-34 Rotor in einer Sorvall-Hochgeschwindigkeitszentrifuge. Nach jedem Waschschrift wurde eine Probe für eine SDS-PAGE entnommen (100 µl).

Teilweise waren schon mit bloßem Auge im Pellet der induzierten und abzentrifugierten Bakterienkulturen sog. Einschlusskörperchen erkennbar. Hierbei handelt es sich um aggregierte Proteine. Das Pellet war in diesem Fall von gräulich-weißer Farbe und krümeliger Konsistenz. Ein weiterer Hinweis auf die Bildung von Einschlusskörperchen war, dass sich ein Großteil des Proteins im Pellet befand und nicht wie vermutet im Überstand. Unter denaturierenden Bedingungen wurden die Proteine aus den Einschlusskörperchen isoliert. Hierzu wurde das induzierte bakterielle Pellet in 5 ml/g Nassgewicht Sonifizierungs-/Lysepuffer aufgenommen und für 45 min bei 4 °C sanft geschüttelt. Von nun an erfolgten alle Schritte auf Eis. Mittels Sonifikation eines Ultraschallstabs wurden die Bakterien aufgeschlossen (fünf Zyklen à 30 s, Intervall 5, auf Eis) und das Lysat abzentrifugiert. Das Pellet wurde dreimal mit Triton-Waschpuffer (10 ml pro g Pellet) gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde erneut sonifiziert (zwei Zyklen, 30 s, Intervall 5, auf Eis) und abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 20 ml/g Pellet in Urea Waschpuffer aufgenommen, resuspendiert und mittels eines Potters homogenisiert. Danach wurde das Lysat 30 min bei RT inkubiert, gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt. Es wurde noch dreimal mit Urea Waschpuffer gewaschen.

Schließlich folgte die eigentliche Denaturierung der Einschlusskörperchen. Dazu wurde das Pellet 16 h bei RT in Denaturierungspuffer sanft auf einem Schüttler inkubiert. Die denaturierte Proteinlösung wurde filtriert (0,45 µM) und denaturierend aufgereinigt um evtl. vorhandene kontaminierende Proteine zu eliminieren und das rekombinante Protein in reiner Form zu erhalten (siehe 2.2.18.2)

2.2.16.5 Zurückfaltung von $LysN_{opt}$ und $LysN_{optE157D}$

Das denaturierte, aufgereinigte Protein muss zur Wiederherstellung seiner enzymatischen Aktivität wieder in seine native Struktur zurück gefaltet werden. Dazu wurden die aufgereinigten Fraktionen (siehe 2.2.18.2) vereinigt und mit einem 10 kDa Aufkonzentrierungsgefäß auf 1 ml eingengt. Die Suspension wurde mit einer Spritze aufgezogen und schnell, in einen mittels Magnetrührer und Rührfisch erzeugten Strudel gespritzt. Dazu wurden verschiedene Rückfaltungspuffer ausgetestet (siehe 3.5.4). Danach wurde der Rührer schwächer gestellt und das Protein weitere 10 min gerührt. Im Folgenden wurde die Lösung abzentrifugiert (6000 x g, 4 °C, 10 min). Pellets ließen auf nicht rückgefaltetes Protein schließen, entsprechende Fraktionen wurden nicht weiter verwendet. Von allen getesteten Bedingungen wurde jeweils eine Probe für eine SDS-PAGE entnommen. Des Weiteren wurde von jeder Probe ein Azocasein-Aktivitätsassay durchgeführt um zu testen, welche Bedingung die höchste Enzymaktivität garantierte.

2.2.17 Baculoviren in Sf-9 Insektenzellen

Als Alternative zu *E.coli* wurden lytische Baculoviren zur Expression der Proteine gewählt. Diese infizieren hauptsächlich Mottenlarven und können zur Infektion von kultivierten Insektenzellen dienen. Baculoviren verfügen über ein kleines Genom, das sich einfach in der Art modifizieren lässt, dass das gewünschte rekombinante Protein kodiert wird. Nach Infektion der Insektenzelle (in diesem Fall Sf-9 Zellen) beginnen diese, dass rekombinante Protein zu synthetisieren. Im Gegensatz zu *E.coli* bieten sie den Vorteil, dass fast alle PTMs gewährleistet sind. Dadurch entsteht u.a. der Vorteil, dass die rekombinanten Proteine eine deutlich bessere Löslichkeit zeigen und es nicht zur Bildung von Einschlusskörperchen kommt. Darüberhinaus wird die infizierte Zelle lysiert, wenn der Promotor am stärksten abgelesen wird. Somit wird in der lytischen Phase am meisten Protein exprimiert. Zur Klonierung von $LysN_{opt(182-301)}$ und $LysN_{optE157D(182-301)}$ in Sf-9 Insektenzellen wurde das pVL1393 Baculovirus-Expressionsvektor System gewählt.

Der Vektor wurde mit einer Mellitin-Signalsequenz modifiziert (erhalten von Dr. Nadja Akkad, Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz). Die Signalsequenz dient zur Translokation des rekombinanten Proteins in das ER der Sf-9 Zellen.

2.2.17.1 Kotransfektion mit linearisierter Baculovirus-DNA

Die Generierung rekombinanter Baculoviren erfolgte mit Hilfe linearisierter Baculovirus DNA. Diese beinhaltet eine letale Deletion, wodurch die DNA keinen viablen Virus codieren kann. Nur im Falle einer Kotransfektion mit einem passenden Transfervektor wird der Virus rekonstituiert und kann die Zellen infizieren. Des Weiteren kodiert die linearisierte DNA ein grün fluoreszierendes Protein (kurz GFP, vom engl. *green fluorescent protein*) als Reportergen, wodurch infizierte Zellen im Fluoreszenzmikroskop von nicht infizierten unterschieden werden konnten. Die Durchführung erfolgte mit Hilfe des BD BaculoGold™ bright Baculovirus DNA Kits (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) nach Instruktionen des Herstellers.

2.2.17.2 Plaque Assay und Amplifizierung des Virus

Der Plaque Assay ist eine Methode zur um stark infektiöse Klone zu isolieren. Dazu wurde vier Tage nach der Kotransfektion der Überstand von infizierten Sf-9 Zellen abgenommen und zur Gewinnung eines einzelnen Virusklons herangezogen. Zunächst wurden serielle Verdünnungen des Überstands gemacht (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}). Danach wurden für jede Verdünnung $2,5 \times 10^6$ Zellen in 60 mm Petrischalen ausgesät. Diese wurden direkt sanft gerüttelt, um die Zellen über die gesamte die Oberfläche zu verteilen. In den folgenden 30 min adhärten die Zellen, welche lichtmikroskopisch auf ihre Konfluenz hin untersucht wurden, wobei wurden 70 % nie überschritten. Zellen, die nicht adhärten, wurden abgesaugt. Im Folgenden wurde eine 1 % Agaroselösung (lowMelting Point) zur Überschichtung der Zellmonolage angesetzt und auf 42 °C temperiert. Zum Infizieren der Zellen, wurde zunächst das Medium abgesaugt und jeweils 1 ml der vorbereiteten Virusverdünnung auf die Zellen gegeben. Während der einstündigen Infektion wurden die Platten in fünfzehn minütigem Abstand geschüttelt, um den Virus über die gesamte Monolage zu verteilen. Schließlich wurde das virushaltige Medium komplett abgesaugt und die Agaroselösung vorsichtig auf die Zellen gegeben, insgesamt 4 ml pro Petrischale. Nach Solidifikation der Agarose wurden die Platten in einem Inkubator bei 27 °C für acht Tage inkubiert. Um die Plaques besser auszählen zu können, wurde die Agarose mittels einer Neutralrotlösung (50 µg/ml in 0,5 % Agarosel) gefärbt und die Plaques nach 15 h ausgezählt. Mittels einer sterilen Pasteurpipette

wurden die Plaques ausgestanzt und einzeln in 1 ml Insektenzellmedium überführt. Die Isolation des Virus aus den Plaques erfolgte rotierend, 16 h bei 4 °C. Von diesem Virusüberstand wurden 200 µl pro Kavität einer 12-Kavitätenplatte auf frisch ausgesäte Sf-9 Zellen gegeben (2×10^5). Pro Kavität wuchsen die Zellen in 1 ml Medium. Die Platten wurden für drei Tage bei 27 °C inkubiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, für 5 min abzentrifugiert (600 x g, 4 °C) und zur Amplifikation des Virus herangezogen. Um den Virusstock zu amplifizieren und einen Hochtitervirus zu generieren wurden pro isoliertem Plaque 5×10^6 Sf-9 Zellen in 100 mm Petrischalen ausgesät. Nach Adhäsion der Zellen wurde das Medium abgenommen und durch 10 ml frisches Medium ersetzt. 200 µl der Virus (Passage 1) wurden pro Petrischale in das Medium gegeben. Danach wurden die Schalen für 72 h inkubiert. Im Folgenden wurde der Überstand abgenommen und eine Bestimmung des Virustiters unternommen, betrug diese weniger als 2×10^8 pfu/ml wurden erneute Amplifikationsrunden durchgeführt.

Rechnung: $10^{-6} = 100$ Plaques $\rightarrow 100 * 10^6$ pfu in 100 ml = $100 * 10^7$ pfu/ml = $1 * 10^9$ pfu/ml

2.2.18 Methoden der Proteinaufreinigung

Um Proteine aus komplexen biologischen Gemischen wie Zelllysat aufzureinigen, wurde das ÄKTApurifier System genutzt welches auf dem System der Hochgeschwindigkeits-Flüssigkeitschromatographie basiert.

2.2.18.1 Native Proteinaufreinigung von 6 x His-tag Proteinen und Mono S Aufreinigung

Die native Proteinaufreinigung erfolgte durch immobilisierte Nickelionen (NTA-Ni²⁺), welche an ein Harz innerhalb der Aufreinigungssäule gebunden sind. Die Aufreinigung basiert auf dem Prinzip der immobilisierten Metallaffinitäts-Chromatographie (kurz IMAC, vom engl. *immobilized metal affinity chromatography*). His-Tag hat eine Affinität für Nickelionen und bindet im ersten Schritt der Aufreinigung an die Säule, während Proteine ohne His-Tag nicht binden und im Durchfluss zu finden sind.

10 ml des gefilterten Lysats (siehe 2.2.16.2) wurden mit Hilfe einer Spritze in eine 10 ml Injektionschleife injiziert. Die Beladung der äquilibrierten Aufreinigungssäule erfolgte in Ni-NTA (phosphathaltigem) Puffer (Flussrate 1 ml/min). Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Säule mit dreifachem Säulenvolumen Ni-NTA Waschpuffer (enthält 20 mM Imidazol) gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm die Basislinie erreicht hat. Die Elution des rekombinanten Proteins erfolgte bei einer Flussrate von 0,5 ml/min mit Ni-NTA Elutionspuffer der 250 mM Imidazol enthält (100 % B), wobei

der Überschuss an Imidazol das His-Tag von den Nickelionen löste und somit freisetzte. Sowohl von Durchfluss-, Wasch-, und Eluatfraktionen wurden Proben für eine SDS-PAGE, einen Western-Blot und für ein Azocasein-Aktivitätsassay entnommen. Fraktionen die das rekombinante Protein in aktiver Form beinhalteten wurden vereint und mit einer HiPrep *Desalting* Säule entsalzt (Flussrate 1 ml/min). Die entsalzte Durchflussfraktion wurde mit 1 ml/min auf eine äquilibrierte Kationenaustauschersäule (MonoS 5/50) in Citratpuffer A geladen. Waschschriffe erfolgten in beschriebener Art und Weise. Die Elution erfolgte mit Citratpuffer B, dazu wurde ein linearer Gradient in 30 min auf 100 % gefahren (Flussrate 0,5 ml/min). Erneut wurden die Fraktionen auf Proteingehalt und Aktivität hin überprüft.

2.2.18.2 Denaturierte Proteinaufreinigung von 6 x His-tag Proteinen und Gelfiltration

Die denaturierende Aufreinigung wurde prinzipiell durchgeführt wie in 2.2.18.1 beschrieben (inklusive Flussraten). Als Probe dienten denaturierte Einschlusskörperchen. Um den denaturiertem Zustand zu erhalten, wurden sowohl Equilibrierungs-, Wasch-, als auch Elutionspuffer mit 8 M Harnstoff versetzt. Im Unterschied zur nativen Aufreinigung diente auf Agarose immobilisiertes Co^{2+} Chelat (Thermo Scientific HisPur Cobalt Resin, Rockford, USA) als stationäre Phase. Die Equilibrierung der Säule, sowie Waschschriffe erfolgten mit demselben Puffer (His-Tag Waschpuffer). Die Elution erfolgte durch 150 mM Imidazol. Von sämtlichen Fraktionen wurden SDS-PAGE Proben genommen. Fraktionen die das rekombinante Protein enthielten wurden zusammengefasst und das Volumen mittels 15 ml Amicon-Aufkonzentrierungsgefäßen auf 1 ml reduziert und einer weiteren Aufreinigung unterzogen. Die Probe wurde in Equilibrierungspuffer auf eine Superose-6 Säule Gelfiltrationssäule geladen.

Im Zuge der Gelfiltration kann man Proteine der Größe nach trennen^{158;159}. Die Trennmatrix besteht meist aus quervernetzter Agarose (Sephrose). Kleine Proteine treten in die Trennmatrix ein und wandern langsam hindurch, hingegen können große Proteine nicht in die Poren der Matrix eintreten und laufen deshalb schnell an der Trennmatrix vorbei. Das bedeutet, dass große Proteine früher von der Säule eluieren, als kleine. Alle Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE Analyse auf das rekombinante Protein hin überprüft.

2.2.19 In-Lösungsverdau

Durch den In-Lösungsverdau werden Proteine in vier Schritten (Solubilisierung, Reduzierung, Alkylierung und proteolytischer Verdau) für massenspektrometrische Analysen vorbereitet. Die zu verdauenden Proteine können mit dem Detergenz RapiGest versetzt werden. Es dient zur Verbesserung des enzymatischen Verdau, da es die Solubilisierung der Proteine unterstützt¹⁶⁰. In Gegenwart des RapiGest wurden die Proben für 15 min auf 80 °C erhitzt. Danach erfolgte die Reduktion der Cysteine mittels DTT (Endkonzentration = 8 mM) bei 56 °C für 15 min. Schließlich wurden die Cysteine mit IAA (Endkonzentration = 15 mM) alkyliert. Nach einer 45 minütigen Inkubation bei RT in Dunkelheit wurde erneut DTT (8 mM) zugegeben um die Reaktion von IAA abzustoppen. Danach erfolgte die Zugabe des proteolytischen Enzyms. Wurde Trypsin eingesetzt, wurde es in einem Enzym-Substratverhältnis von 1:100 eingesetzt. Verdaut wurde in der Regel 16 h bei 37 °C.

2.2.20 In-Gel-Verdau

Der In-Gel-Verdau ist ein wesentlicher Schritt im Zuge der Probenvorbereitung für massenspektrometrische Analysen. Die Methode wurde 1992 von Rosenfeld entwickelt und besteht im Wesentlichen aus vier Schritten¹⁶¹. Zunächst werden die Gelbanden entfärbt, dann die Cysteingruppen der Proteine reduziert und alkyliert und das Protein schließlich proteolytisch in Peptide gespalten, welche aus dem Gel extrahiert werden.

Um Kontaminationen mit Keratin zu vermeiden, wurden alle Schritte mit Handschuhen durchgeführt, des Weiteren wurde der Arbeitsplatz mit Ethanol gesäubert. Es wurden sog. „LoBind“ Reaktionsgefäße genutzt, diese sind vom Material her so ausgerichtet, dass Proteine schlecht an ihre Oberfläche binden können.

Die zu untersuchenden Banden wurden aus einem SDS-PAGE-Gel ausgeschnitten, zerkleinert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Im ersten Schritt wurden die Gelstückchen entfärbt, dazu wurden sie einmal mit 50 % ACN in 50 mM NH_4HCO_3 gewaschen, danach mit 100 % ACN. Jeweils wurden die Stückchen für 5 min im Ultraschallbad inkubiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Im zweiten Schritt erfolgte die Reduktion der Disulfidbrücken. Dazu wurden pro Reaktionsgefäß 1,5 mg/ml DTT in 50 mM NH_4HCO_3 auf die Gelstückchen gegeben, die Inkubation erfolgte 1 h bei 56 °C. Nach kurzem Abkühlen erfolgte im dritten Schritt die irreversible Alkylierung der SH-Gruppen. Dazu wurden die Proben mit 10 mg/ml IAA (in 50 mM NH_4HCO_3) für 45 min in Dunkelheit bei RT inkubiert. Erneut wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Im Folgenden wurde zweimal mit 50 % ACN (in 50 mM NH_4HCO_3) und einmal mit 100 %

ACN gewaschen. Jeweils wurden die Proben für 5 min im Ultraschallbad inkubiert und der Überstand komplett abgenommen und verworfen.

Schließlich wurden die Proteine enzymatisch durch Trypsin in Peptide gespalten. Hierzu wurde TrypsinGold (siehe 2.1.6) in einer Konzentration von 20 ng/μl auf die Probe gegeben, gefolgt von einer 30 minütigen Inkubation auf Eis. Erneut wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Die Gelstückchen wurden mit 30 μl 50 mM NH₄HCO₃ versetzt und 16 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Peptide aus den Gelstückchen gewaschen. Dazu wurde zweimal mit 50 % ACN in 1% FA gewaschen, gefolgt von einem finalen Waschschrift mit 100 % ACN. Jeweils wurden die Reaktionsgefäße für 15 min im Ultraschallbad inkubiert. Nach jedem Waschschrift wurde der Überstand komplett abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Reaktionsgefäß für 30 min bei – 80 °C inkubiert und dann bis auf ca. 10 % des ursprünglichen Ausgangsvolumens lyophilisiert. In diesem Schritt wurde der Überschuss an ACN entfernt. Die eingeeengte Probe wurde mit 1 % FA auf 20 μl aufgefüllt und dann im Massenspektrometer gemessen.

2.2.21 Analyse von Peptiden via Nanofluss (nanoflow) LC-ESI-MS/MS Analyse

Durch die stetigen Leistungsverbesserungen innerhalb der MS ist es heutzutage möglich, komplexe biologische Proben zu charakterisieren. Allerdings haben sich Vorfraktionierungen bewährt, um die Komplexität von Proben vor der MS-Analyse zu verringern. Flüssigkeitschromatographie (kurz LC, vom engl. *liquid chromatography*) stellt eine gute Möglichkeit dar, Proben vor der MS-Messung zu separieren. Die Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und MS/MS bildet die Grundlage für die sogenannte „shotgun“ Proteomik, zur Analyse von komplexen Proteingemischen. Durch die Trennung können auch gering abundante Proteine charakterisiert werden. Die Suppression von hoch abundanten Proteinen wird durch die unterschiedlichen Retentionszeiten mit der die Peptide von der Trennsäule eluieren überwunden. LC-MS und besonders nano-LC-MS/MS besitzen den Vorteil dass sie hochsensitiv sind und eine gute Reproduzierbarkeit besitzen¹⁶².

2.2.21.1 Bedingungen des HPLC-Laufs

Das in dieser Arbeit genutzte ESI-Massenspektrometer ist an eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Säule (kurz HPLC, vom engl. „*High Pressure Liquid Chromatography*“) (nanoAcquity UPLC, Waters, Eschborn, Deutschland) gekoppelt, welche die Peptide auf Grund von hydrophoben Interaktionen mit der unpolaren stationären Phase und einer polaren, mobilen Phase innerhalb der Trennsäule separiert.

Die verdauten Proteine wurden durch eine 2,6 µl PEEKsil-™ Proben Schleife (Analytical Science, Darmstadt, Deutschland) in die UPLC geladen. Im Folgenden wurden die Proteine getrennt, dazu wurde eine Umkehrphasen C₁₈-Säule mit einem inneren Durchmesser von 75 µm und einer Länge von 150 µm benutzt (ACQUITY UPLC™ BEH, Waters, Eschborn, Deutschland). C₁₈-Säulen trennen im Gegensatz zu C₈, oder C₄-Säulen besonders gut Peptide und kleinere Moleküle. Die mobile Phase setzte sich aus Puffer A und Puffer B zusammen.

Puffer A (wässrige mobile Phase) 0,1 % Ameisensäure in H₂O (LC-MS Grad)
 Puffer B (organische mobile Phase) 100 % ACN; 0,1 % Ameisensäure

Tabelle 13: Die Bedingungen eines HPLC-Laufs

Zeit (in min)	Flussrate in µl/min	Puffer A in %	Puffer B in %
15 min (Beladung)	0,4	97 %	3 %
10 min (Waschschritt)	0,3	97 %	3 %
90 min (Elution)	0,3	97 % - 65 %	3 % - 35 %
20 min (Waschschritt)	0,3	20 %	80 %
20 min (Reequilibrierung)	0,3	97 %	3 %

Eluiert wurde innerhalb von 90 min mit einem Gradienten von 3 % - 35 % Puffer B bei einer Flussrate von 0,3 µl/min (siehe 2.18 für die Zusammensetzung von Puffer A und B).

Jeweils 2,6 µl der Proben wurden auf die Säule geladen. Der Lauf startete mit 3 % Puffer B bei einer Flussrate von 400 nl/min für 15 min. Es folgte ein Waschschritt bei einer Flussrate von 300 nl/min mit 3 % Puffer B. Die Elution der Peptide wurde mit einem kontinuierlichen Gradienten von 3 % – 35 % Puffer B durchgeführt. Der Elutionsprozess dauerte 90 min, gefolgt von einem Waschschritt mit 80 % Puffer B für 20 min. Abschließend wurde die Säule mit 3 % Puffer B reequilibriert (20 min). 300 fmol/µL [Glu¹]-Fibrinopeptid B wurden zum Kalibrieren genutzt. Es wurde über eine Nebenpumpe des NanoAcquity Systems mit Flussrate von 400 nl/min zu einem Referenz-Sprayer geleitet und von diesem injiziert.

2.2.21.2 Nanofluss LC-ESI-MS/MS Analyse (Tandem-Massenspektrometrie)

Nach der erfolgten Auftrennung tritt die zu messende Probe aus dem Nanosprayer aus und wird zunächst einer Spannung von 2800 V ausgesetzt, woraufhin sie in feinste Tröpfchen nebulisiert wird. Daraufhin werden die nun in der Gasphase befindlichen Peptide ionisiert. Diese Nanospraymethode bietet den Vorteil, dass im Vergleich zu anderen Elektrospray-Ionisierungen deutlich weniger Probe gebraucht wird. Die Proteine wurden im positiven Ionenmodus gemessen, deshalb wurde Ameisensäure zum Lösungsmittel gegeben, welches die Protonierung der Peptide unterstützt. Der Referenzkanal wurde alle 30 s gemessen. Alle Messungen erfolgten im V-Modus mit einer Auflösung von 10000 Halbwertsbreite (kurz FWHM, vom engl. *full width of half maximum*). Zum einen wurden in dieser Arbeit die Daten mit einer sogenannten *Expression-Analyse* gemessen. Dazu wurden die LC-MS Daten (Massengenauigkeit <15 ppm) im Wechsel von low- energy Modus (MS) und dem elevated- energy Erfassungsmodus (MS^E) aufgenommen. Im low- energy Modus wurden die Daten bei einer Kollisionsenergie von 3 eV gemessen. Im MS^E wurde die Kollisionsenergie zwischen 16 eV und 36 eV variiert. Ein Zyklus von MS und MS^E Daten wurde alle 1,5 s erfasst. Die Chromatogramme und Spektren wurden mit Hilfe des Programmes MassLynx 4.1 erstellt.

Sämtliche Messungen wurden mit Hilfe eines Quadrupol Time-Of-Flight (Q-TOF) Premier™ API Massenspektrometers (Waters, Eschborn, Deutschland) unternommen.

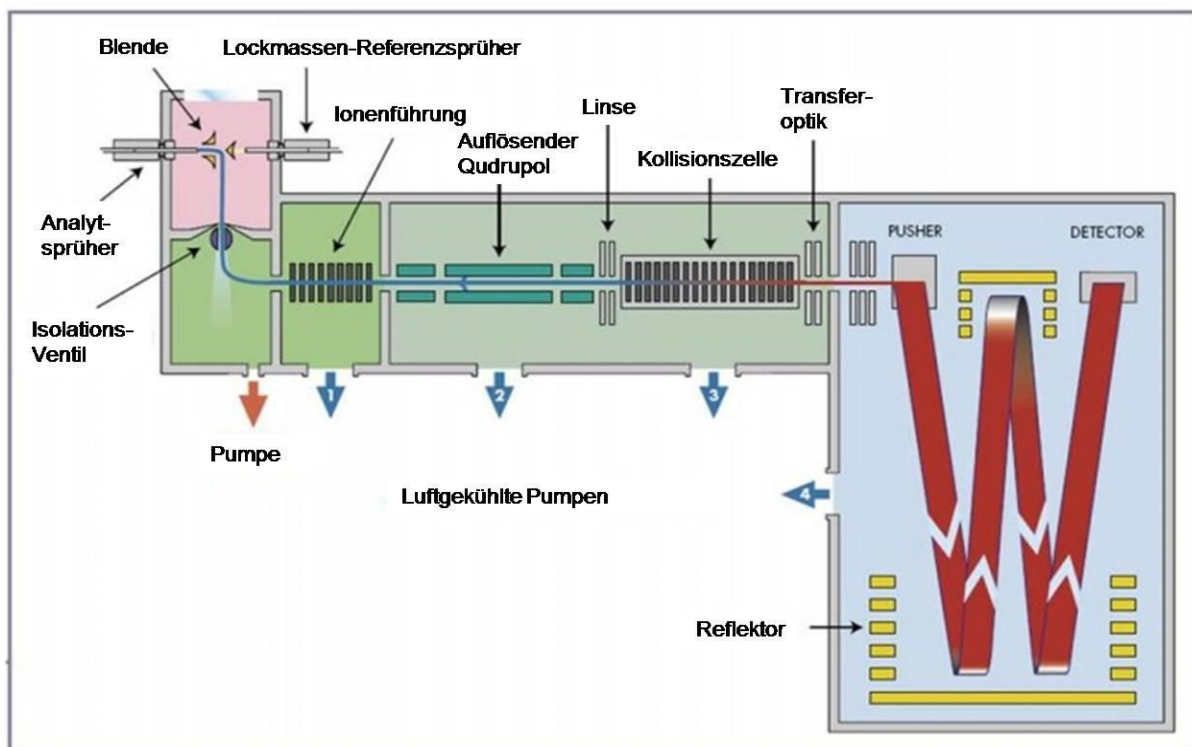


Abbildung 17: Aufbau eines Q-ToF- Massenspektrometers (abgeändert nach Waters)

Neben der Expression-Analyse wurden in dieser Arbeit auch *Data Directed Acquisition* (DDA) Läufe gemessen. In diesem Fall wurde zunächst ein Übersichtsspektrum gemessen. Dafür wurden alle Peptide, die von der HPLC-Säule eluierten, vom Quadrupol weiter geleitet und von TOF-Analysator gemessen. Im zweiten Schritt wurden Peptide die eine zuvor definierte Intensität überschritten für die Fragmentierung ausgewählt. Nach erfolgter Fragmentierung, wurden die Fragmente durch den TOF-Analysator detektiert. In nächsten Schritten wurde mit weiteren Übersichtsspektren in beschriebener Weise verfahren. Die Zeit für die Fragmentierung wurde auf 2 s gesetzt. Der Referenzkanal wurde alle 30 s gemessen. Alle Messungen erfolgten im V-Modus mit einer Auflösung von 10000 Halbwertsbreite (FWHM). Die Chromatogramme und Spektren wurden mit Hilfe des Programmes MassLynx 4.1 erstellt.

2.2.22 Datenbanksuche

In diesem Fall wurden die LC-MS Rohdaten automatisch durch den iDENTITY^E-Algorithmus des ProteinLynx Global Server (PLGS) 2.5 prozessiert und ausgewertet. Die identifizierten Proteine und Peptide wurden von dem Programm nach statistischen Methoden berechnet¹⁶³. Dabei filtert das Programm zunächst die Rohdaten der massenspektrometrischen Auswertung nach Signalen und versucht diese einzelnen Peptiden zuzuweisen. Danach erfolgt die Zuweisung der Peptide zu einem bestimmten Protein. Dazu durchsucht das Programm ihm zugewiesene Datenbanken nach den identifizierten Peptiden und ordnet diese den eingetragenen Proteinen zu. Hierzu wurden speziesspezifische Datenbanken, oder komplette Datenbank genutzt, d.h. dass die gefundenen Peptide nicht nur innerhalb einer bestimmten Spezies gesucht wurden, sondern über alle eingetragenen Organismen hinweg.

Teilweise wurden einzelne Spektren nach der automatisierten Auswertung nochmals manuell ausgewertet. Die MS/MS Datensätze wurden mit eingetragenen Proteinsequenzen aus den MSDB und UniProtKB/SwissProt Datenbanken der entsprechenden Spezies, oder einer kompletten Datenbank verglichen und identifiziert. Bei der Identifizierung durch Trypsin verdauter Peptide, wurde sich auf tryptische Peptide beschränkt. Entsprechend abgeändert wurde diese Beschränkung wenn andere Proteasen für den Verdau eingesetzt wurden. Des Weiteren wurden nur Peptidfragmente akzeptiert die maximal eine fehlende Spaltung aufwiesen. Als maximale Massenabweichung für Vorläufer und dessen Fragmentionen wurden <15ppm toleriert. Carbamidomethyl Cystein wurde als Modifikation angegeben. Oxidiertes Methionin, N-Acetylierung und Deamidierung von Asn und Gln wurden als variable Modifikationen angegeben.

Im Falle einer Zuordnung von Peptiden zu entsprechenden Proteinen mussten folgende Kriterien erfüllt werden: mindestens zwei Peptide mussten detektiert werden mit wenigstens sieben Fragmentationen. Die falsch-positiv Rate der Proteinidentifikation wurde auf 3 % gesetzt, basierend auf einer Suche von fünf randomisierten Datenbanken.

III. Ergebnisse

3.1 LysN_{opt} und LysN_{optE157D}

Die Metalloendopeptidase LysN wurde von der Forschergruppe um Nonaka und Healy aus den Fruchtkörpern der Basidiomyceten *Grifola*, *Armillaria* und *Pleurotes* isoliert^{133,164}. Auf Grund seiner Spezifität, Peptidyl-Lys Bindungen N-terminal zu hydrolysieren, wird es in letzter Zeit vermehrt im Zuge der massenspektrometrischen Probenvorbereitung genutzt^{134,165,166}. Die gesamte, kodierende Proteinsequenz umfasst 301 AS (Abbildung 18).

```

1  mfssvmvalv slavavsanp glslkvsgpe avdgvnnlkv vttitntgde tlklldprg
61  alhtmpdtf aitnesgetp sfigvkvkyv psmaakstge nvfaviapgq svnvehdlsa
121 aynftssgag tyalealnvf nyidpetnep veiwadaeah ttavsgklav vratptltrp
181 vtyngcssse qsalaaaaasa aqsyvaesls ylgthtaatp ryttwfgsyi ssrhstvlqh
241 ytdmnsndfs sysfdctcta agtfayvypn rfgtvylcga fwkapttgtd sqagtlvhes
301 shftrnggtk dyayggqaaak slatmdpka vma□dnheyf sennpaqs

```

Abbildung 18: Die kodierende Aminosäuresequenz der Peptidyl-Metalloendopeptidase LysN

Die Proteinsequenz ist im Einbuchstabencode dargestellt. Die gesamte Proteinsequenz des Zymogens umfasst 301 Aminosäuren. Die reife, enzymatisch aktive Protease beginnt mit der Aminosäure Thr (T) an Position 182 (dunkelrot unterlegt) und wird im Folgenden als Position 2 bezeichnet. In der kodierenden Sequenz des reifen Enzyms befinden sich an den Positionen 83 und 133 ein Phe und ein Tyr (fett, blau). Die His-Reste an den Positionen 117, 121 und der Asp-Rest an Position 130 (grün markiert) koordinieren das katalytische Zinkion im aktiven Zentrum des Enzyms. An den Positionen 154 und 157 befinden sich ein Asp-Rest (154) und ein Glu-Rest (157) (markiert mit schwarzem Viereck), von ihnen geht die Spezifität der Protease aus. Der Glu-Rest an Position 157 ist zusätzlich violett markiert. Ist dieser Rest zu einer Asp punktmutiert handelt es sich um die mutierte Form LysN_{optE157D} der Metalloendopeptidase LysN.

Wie fast alle Proteasen wird auch LysN zunächst als inaktives Zymogen gebildet und erlangt erst nach Abspaltung der ersten 182 AS seine native Konformation und somit biologische Aktivität (siehe Abbildung 18). Das reife, aktive Enzym setzt sich schließlich aus nur 120 AS zusammen, welches einem Molekulargewicht von ca. 21 kDa entspricht¹⁶⁴. Innerhalb dieser Sequenz befinden sich einige wichtige Aminosäurereste, die durch die mittlerweile bekannte Kristallstruktur des Enzyms identifiziert wurden¹³⁵.

In dieser Arbeit ist besonders der Glu-Rest an Position 157 von Interesse, da von dieser AS die Spezifität für positiv geladene Lysinseitenketten ausgeht. Durch ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe einer *Quickchange*-PCR wurde eine Mutante erzeugt die an dieser Position eine Asp trägt. Durch diese Mutation soll sich die Spezifität des Enzyms ändern, so dass neben Lys auch Arg als Substrat erkannt wird.

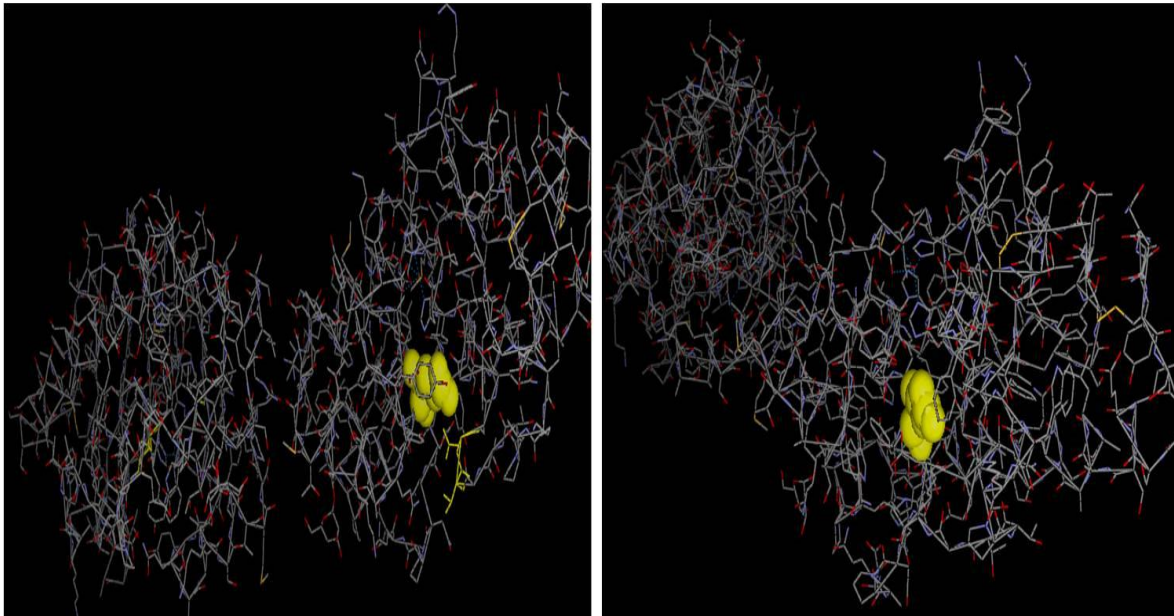


Abbildung 19: 3D-Modelle der Peptidyl-Metalloendopeptidase LysN_{opt}

Das Modell zeigt die Dimerstruktur der Metalloendopeptidase LysN aus zwei Blickwinkeln. Gelb, als Kalottenmodell ist die Aminosäure (Asp) an Position 157 dargestellt, die durch die Quickchange-PCR in einem Glu-Rest (D) mutiert wurde.

Um zu überprüfen, ob die Mutante LysN_{optE157D} tatsächlich über die veränderte Spezifität verfügt, wurde die kodierende Sequenz des reifen Peptids in die Expressionsvektoren pVL1393 für Sf-9 Insektenzellen und in pET-26b(+) für die Expression in *E.coli* kloniert. Danach wurde das Protein isoliert, auf seine Aktivität hin getestet und schließlich die Spezifität kontrolliert.

3.1.2 Klonierung in den bakteriellen Expressionsvektor pET-26b(+)

Da es sich bei der Metalloendopeptidase um ein Enzym aus einem Pilz handelt, wurden die Nukleotide der kodierenden Sequenz zunächst für eine Expression in *E.coli* sequenzoptimiert. Als Expressionsvektor wurde der pET-26b(+) gewählt. Die kodierende Sequenz des reifen Peptids (Abbildung 18) wurde mit den Restriktionsschnittstellen für XhoI und BspHI und den Primerbindungsstellen von der Firma Centic Biotec (Weimar, Deutschland) in einem pUC57 Vektor synthetisiert (pUC_LysN_{opt}). Aus diesem Vektor wurde die optimierte Proteinsequenz herausgeschnitten und in den linearisierten Expressionsvektor pET-26b(+) ligiert. Durch einen weiteren Restriktionsverdau und eine Sequenzierung (GATC, Konstanz, Deutschland) wurde die Ligierung in den Expressionsvektor bestätigt. Die „Quickchange PCR“ wurde mit den Primern „LysN Quickchange SP“ und „LysN Quickchange ASP“ auf den pUC_LysN_{opt} Vektor durchgeführt. Hierdurch wurde eine Punktmutation von einer Glu zu Asp an Position 157 innerhalb der kodierenden Sequenz erzeugt. Die Mutation wurde per Sequenzierung bestätigt. Danach wurde das mutierte Gen für LysN_{opt} in den pET26b(+) Vektor ligiert. Die Konstrukte wurden als pET-26b(+)LysN_{opt}, bzw. pET-26b(+)LysN_{optE157D} bezeichnet.

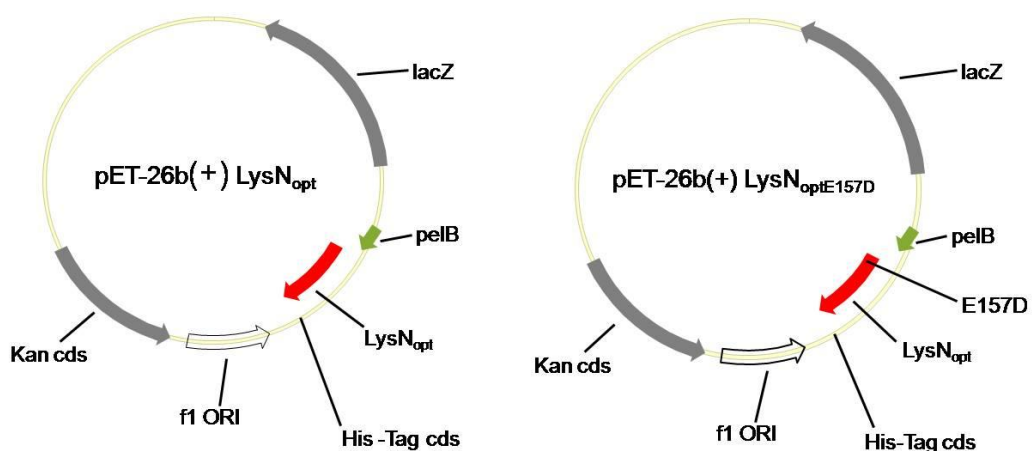


Abbildung 20: Die Expressionsvektoren pET26b(+) für LysN_{opt} und LysN_{optE157D}

Die generierten Expressionsvektoren pET26b (+) LysN_{opt} und pET26b (+) LysN_{optE157D}. Kan cds = Kanamycin-Resistenz, pelB = pelB Signalsequenz, His-Tag cds = His-Tag kodierende Sequenz, f1 Ori = Replikationsursprung, lacZ = Lactose-Operon.

Um das Protein gegebenenfalls aus dem bakteriellen Zytoplasma isolieren und aufreinigen zu können wurden zusätzlich Konstrukte für LysN_{opt} und LysN_{optE157D} generiert, in denen die pelB Signalsequenz eliminiert wurde. Dazu wurden 50 ng Matrizen-DNA von beiden Konstrukten genommen und jeweils eine PCR durchgeführt. Dabei wurde N-terminal von der pelB Sequenz NdeI als Restriktionsschnittstelle gewählt, sowie C-terminal von LysN_{opt}, bzw. LysN_{optE157D} BamHI.

Die Primer wurden so generiert, dass der Sinn-Primer ebenfalls über eine NdeI Schnittstelle und eine BamHI Schnittstelle verfügt. Somit verfügt das PCR-Produkt ebenfalls über eine NdeI Schnittstelle, im Gegenzug wurde die pelB Sequenz eliminiert. Das PCR Produkt wurde nun zur effizienteren Klonierung am 3'-Ende mit A-Überhängen (Adenosinmonophosphaten) durch die Aktivität einer speziellen Taq-Polymerase versehen¹⁶⁷. Der linearisierte pCR2.1-TOPO Vektor wiederum trägt am 5'-Ende Thymidinreste, die mit einer DNA-Topoisomerase assoziiert sind und somit eine effektive Ligation mit den PCR-Produkten garantieren. Nach positiver Sequenzierung wurden die LysN_{opt} und LysN_{optE157D} Sequenzen erneut in den linearisierten Expressionsvektor pET26b(+) ligiert. Die Konstrukte wurden per Restriktionskontrollverdau und Sequenzierung bestätigt.

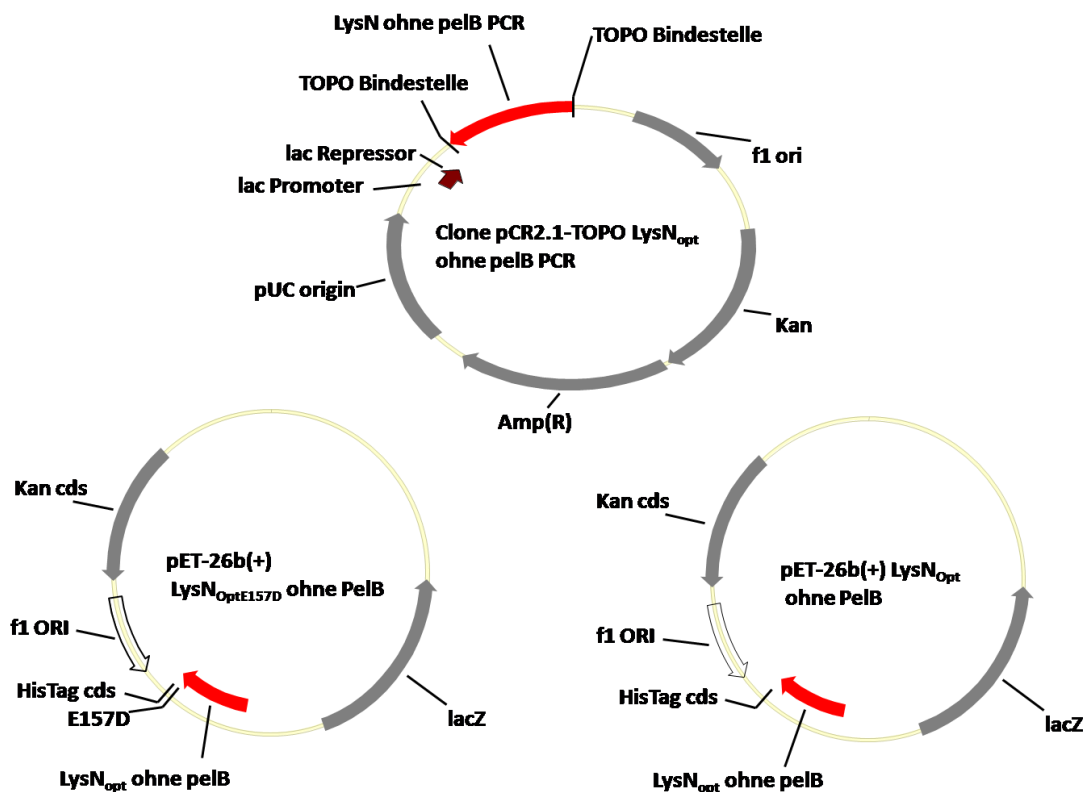


Abbildung 21: Der pCR2.1 –Topo Vektor und der Expressionsvektor pET26b(+) für LysN_{opt} und LysN_{optE157D} mit eliminerter pelB Signalsequenz

LysN_{E157D} wurde durch eine Quickchange PCR generiert. Die pelB Signalsequenz wurde durch eine PCR eliminiert. Amp(R) = Ampicillin Resistenz, Kan cds = Kanamycin Resistenz, pelB = pelB Signalsequenz, His Tag cds = His Tag kodierende Sequenz, f1 Ori = Replikationsursprung, lacZ = Lactose-Operon, T7 = Terminator.

3.1.3 Expression von LysN_{opt} und LysN_{optE157D}

Zunächst wurde der Zeitpunkt der maximalen Expression der Proteine bestimmt. Dazu wurden *E.coli* Bakterienzellen des Stammes Rosetta Gami (DE3) mit 50 ng Plasmid-DNA von LysN_{opt}, bzw. LysN_{optE157D} transformiert (2.2.11.2). Die Proben wurden wie in 2.2.16.1 vorbereitet und wurden in gleichen Volumina auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen. Nach der Coomassie-Färbung war deutlich zu erkennen, dass bereits 2 h nach der Induktion eine Bande von ca. 21 kDa erschien, welche dem rekombinanten LysN entsprechen könnte (Abbildung 22). Im weiteren Verlauf nahm die Proteinbande an Stärke zu, bis schließlich 4 bis 6 h nach Induktion des Promotors die höchste Expression zu verzeichnen war. Im Überstand konnte kein Protein detektiert werden. Zur Kontrolle wurde das Pellet vor Induktion der Bakterienkultur mitgeführt, wobei in diesem Fall keine Proteinbande der entsprechenden Größe zu erkennen ist.

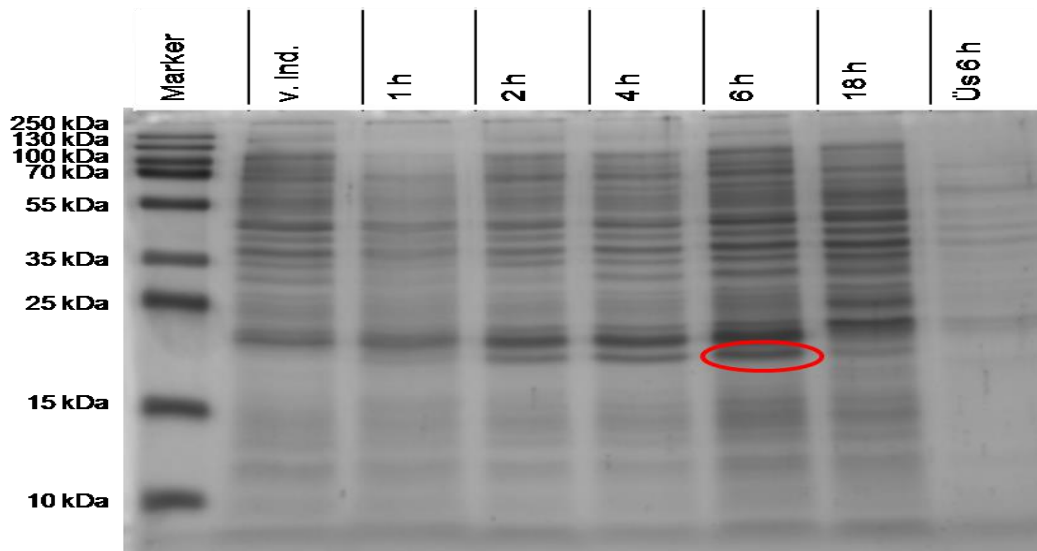


Abbildung 22: SDS-PAGE Gel der Induktion von LysN_{opt}

Von der induzierten Bakterienkultur wurden Zeitwerte (1-18 h) nach der Induktion entnommen. Zusätzlich wurde auch der Überstand nach 6 h aufgetragen (rechte Spur), sowie das Pellet der Kultur vor Induktion. Rot gekennzeichnet ist die Bande die im Verlauf der Induktion an Intensität zunimmt und der Größe von LysN_{opt} entspricht. Des Weiteren wurde das Zellpellet vor Induktion als Kontrolle aufgetragen. Die Proteinbanden wurden mit kolloidalem Coomassie-Blau gefärbt. V.Ind. = vor Induktion, Üs = Überstand

3.2 Lokalisation des exprimierten LysN_{opt} und LysN_{optE157D}

Der gewählte Vektor des Expressionssystems pET26b(+) verfügt über eine N-terminale pelB Signalsequenz, die dafür verantwortlich ist, das rekombinante Protein in das Periplasma der Zelle zu dirigieren. Hierdurch sollte die Aufreinigung des rekombinanten Proteins vereinfacht werden. Zur Überprüfung, ob die exprimierten Proteine der Konstrukte pET-26b(+) LysN_{opt} und pET-26b(+) LysN_{optE157D} tatsächlich im Periplasma zu finden sind, wurde zunächst eine periplasmatische Aufreinigung der Proteine durchgeführt (siehe 2.2.16.1). Als Ausgangsmaterial diente 1 l der induzierten Bakterienkultur. Der Überstand, der die periplasmatischen Proteine beinhaltet, wurde von 80 ml auf 5 ml aufkonzentriert. Sowohl die verdünnte, als auch die konzentrierte Periplasmaprobe, wurden auf einem SDS-PAGE Gel in Bezug auf das rekombinante Protein untersucht. Es wurden gleiche Volumina auf das Gel aufgetragen (Abbildung 23). Das rekombinante Protein wurde nicht in das Periplasma dirigiert. Vielmehr fiel im Vergleich zu dem Pellet, was nach der periplasmatischen Aufreinigung übrig blieb und dem Pellet der induzierten Kultur auf, dass sich das Protein komplett in der Fraktion des Pellets befand (LysN_{opt} Pellet 6 h). Im Bereich von ca. 21 kDa ist eine deutliche Bande zu erkennen (rot eingekreist), die in keiner der Fraktionen des Periplasmas vorkommt. Daraus lässt sich schließen, dass das Protein trotz pelB Signalsequenz nicht in das Periplasma dirigiert wird.

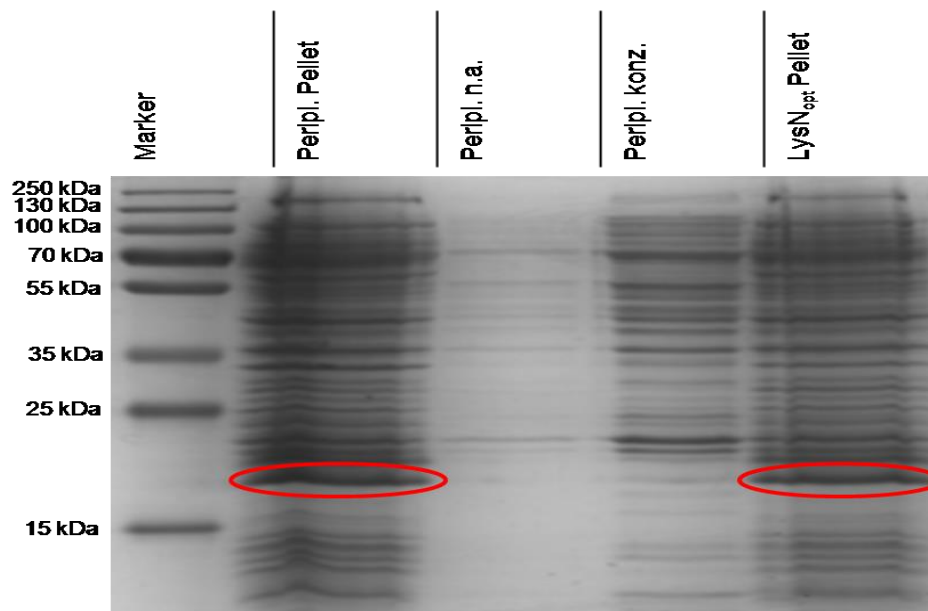


Abbildung 23: SDS-PAGE Gel der periplasmatischen Aufreinigung von LysN_{opt}

Die Bakterienkultur wurde 6 h nach Induktion mit IPTG geerntet und die Proteine aus dem Periplasma isoliert. Gezeigt sind die entsprechenden Fraktionen der Aufreinigung und der jeweiligen Kontrollen auf einem 14% SDS-PAGE Gel das mit kolloidalem Coomassie-Blau gefärbt wurde. Es wurden gleiche Volumina aufgetragen. Die Banden für LysN_{opt} sind rot eingekreist. Peripl. = Periplasma

3.3 Native Aufreinigung aus dem Zytoplasma

Um das Protein näher zu charakterisieren, muss es aus dem Zytoplasma aufgereinigt werden, da im Lysat der *E.coli* Zellen große Mengen an kontaminierenden Proteinen vorhanden sind. Alle nativen Aufreinigungen wurden bei 4 °C durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten 2 l Bakterienkultur, die mit 0,2 mM ZnSO₄ versetzt und mit 1 mM IPTG induziert wurden.

3.3.1 Aufreinigung des rekombinanten Proteins durch IMAC

Der pET26b(+) Vektor verfügt über ein C-terminales His-Tag (6 x His), über das das Protein spezifisch aufgereinigt werden kann¹⁶⁸. Nach erfolgter zytoplasmatischer Aufreinigung (2.2.16.2) wurde der Überstand über eine Säule gegeben, die immobilisierte Nickelionen enthielt, an welche das His-Tag bindet. Die eigentliche Aufreinigung wurde dabei automatisch mit Hilfe des ÄKTAPurifier Systems vorgenommen. Eluiert wurde mit 250 mM Imidazol in einem Gradienten von 0-50 % Puffer B in 30 Minuten, gefolgt von einem zweiten Gradienten von 50-100 % in weiteren 30 Minuten (2.2.18.1). Die Eluatfraktionen (J1-J9), sowie der Durchfluss wurden mittels eines SDS-PAGE Gels auf das rekombinante Protein hin überprüft. Zur Kontrolle wurde eine Probe des Pellets der induzierten Bakterienkultur vor der Aufreinigung mit auf das Gel aufgetragen.

Abbildung 24 zeigt, dass das His-Tag fusionierte Protein im nativen Zustand nicht mittels IMAC aufgereinigt werden konnte. Fast das gesamte rekombinante Protein fand sich in der Durchflussfraktion (roter Pfeil) wieder, während sich in den Eluatfraktionen nur geringste Mengen des rekombinanten Proteins nachweisen ließen. Lediglich eine dünne Bande der entsprechenden Größe von 21 kDa ist in den Fraktionen J1 und J2 zu erkennen. Im Vergleich dazu ist diese Bande in der Durchflussfraktion deutlich intensiver. Das gezeigte Gel zeigt die Aufreinigung von LysN_{opt}, bei LysN_{optE157D} ergab sich dasselbe Ergebnis. Daraus lässt sich schließen, dass das Protein im nativen Zustand nicht mit dem His-Tag an die immobilisierten Nickel-Ionen binden kann.

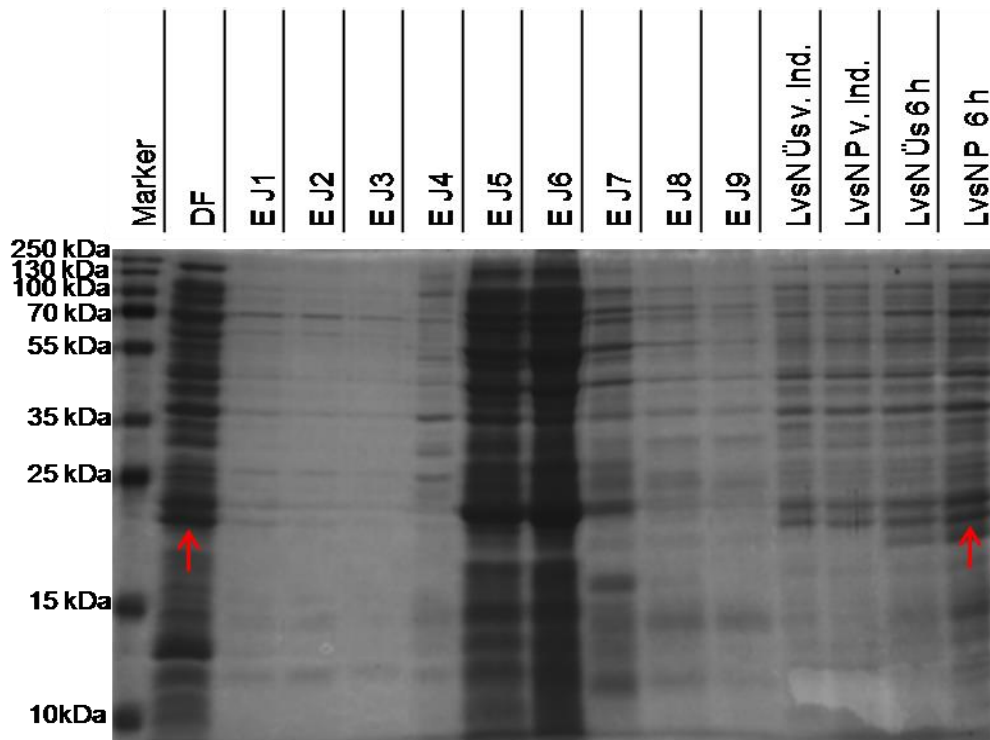


Abbildung 24: SDS-PAGE Gel der Fraktionen der nativen His-Tag Aufreinigung von $LysN_{opt}$

Das Lysat von 2 l induzierter Bakterienkultur wurde auf eine Nickelsäule geladen und das rekombinante Protein mit einem Gradienten von 125-250 mM Imidazol eluiert (0,5 ml/min). Auf die Spuren J1 – J9 wurden die Eluatfraktionen aufgetragen. Als Kontrollen wurden auf den letzten vier Spuren (linke Seite) Pellet und Überstand der aufgereinigten Kultur vor und nach Induktion aufgetragen. Die Proteinbanden wurden mit kolloidalem Coomassie-Blau gefärbt. DF = Durchfluss, E = Eluat, v. Ind. = vor Induktion, P = Pellet

Das Elutionsprofil der nativen Aufreinigung zeigte in Übereinstimmung mit dem SDS-PAGE Gel nur einen minimalen Ausschlag der mAU (milliabsorption units), was bedeutet das nur ungenügende Mengen Protein aufgereinigt werden konnten.

3.3.2 Aufreinigung über Ionentauscher

Da sich gezeigt hatte, dass eine Aufreinigung der Metalloendopeptidasen über His-Tag nicht möglich war, wurde als weitere Möglichkeit eine Aufreinigung über Ionentauscher in Betracht gezogen. In diesem Fall wurde die Kationentauschersäule MonoS 5/50 benutzt. Da der bakterielle Lysepuffer NaCl enthält wurde das gefilterte Zelllysate zunächst mit Hilfe einer HiPrep Entsalzungssäule vom Salz befreit, da es eine Bindung an die MonoS Säule unterbindet und das rekombinante Protein somit direkt in den Durchfluss gelangen würde. Die Abbildung 25 und Abbildung 26 zeigen den Entsalzungsschritt und die Aufreinigung von $LysN_{opt}$ über den Kationentauscher. $LysN_{optE157D}$ zeigte ein analoges Aufreinigungsprofil (Daten nicht gezeigt).

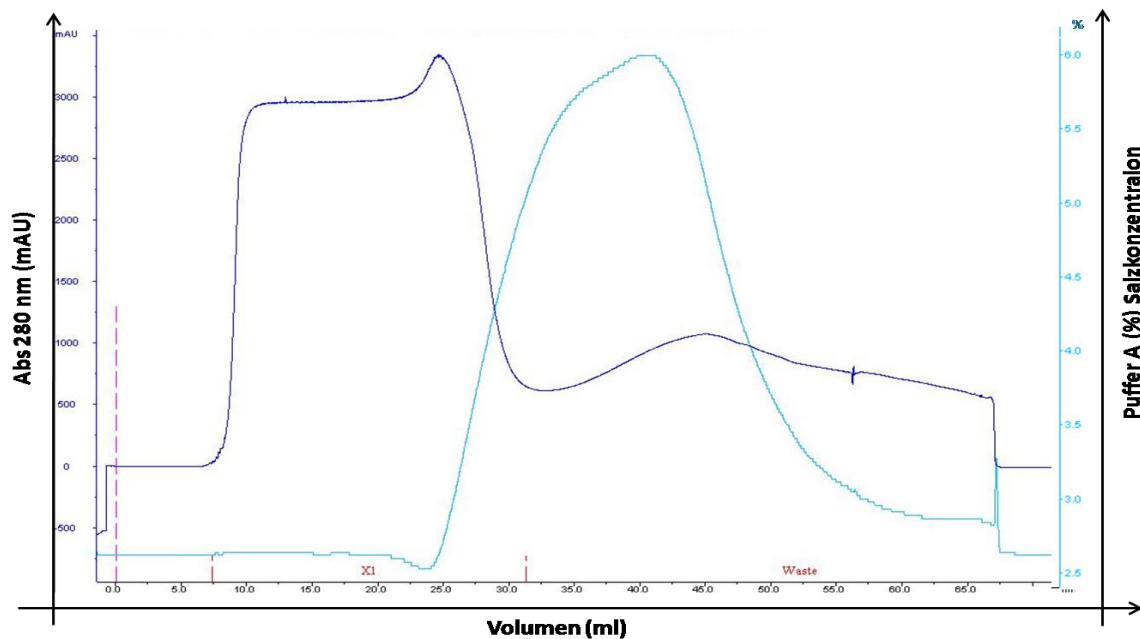


Abbildung 25: Entsalzung des rekombinanten Proteins

Das Bakterienlysat wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min in Citratpuffer A auf die HiPrep Entsalzungssäule geladen. Die X- Achse gibt das Volumen in ml wieder. Die dunkelblaue Kurve gibt die mAU (Absorption bei einer Wellenlänge von 280 in nm) und die hellblaue Kurve die Konzentration des Puffers A an. Die gestrichelte rosa Linie markiert die Injektion des Lysats auf die Säule. Dabei wurde nur die mit X1 bezeichnete Fraktion für die weitere Aufreinigung verwendet, da es sich hierbei um das entsalzte Lysat handelt.

Nach dem Entsalzen wurde der Durchfluss der Säule auf die MonoS Säule in Citratpuffer A (pH = 6,0) mit einer Flussrate von 1 ml/min geladen. Nachdem der Beladungspeak von 3000 mAU wieder einen Wert von 0 erreicht hatte, wurde das Protein mit Citratpuffer B (enthält 1 M NaCl, pH = 6,0) eluiert. Dazu wurde ein linearer Gradient von 0-50 % in 30 min gefahren. Zu erkennen ist ein Elutionssignal mit einem Maximum von 900 mAU (Abbildung 26, im kleinen Bild vergrößert dargestellt). Die Elution beginnt bei ca. 5 % Puffer B (= 50 mM) und hat ein Maximum bei ca. 30 % Puffer B (= 300 mM). Von allen Fraktionen wurden 30 µl für eine SDS-PAGE entnommen. Fraktion B9 enthielt den Großteil des rekombinanten Proteins (grün hervorgehoben, Abbildung 26).

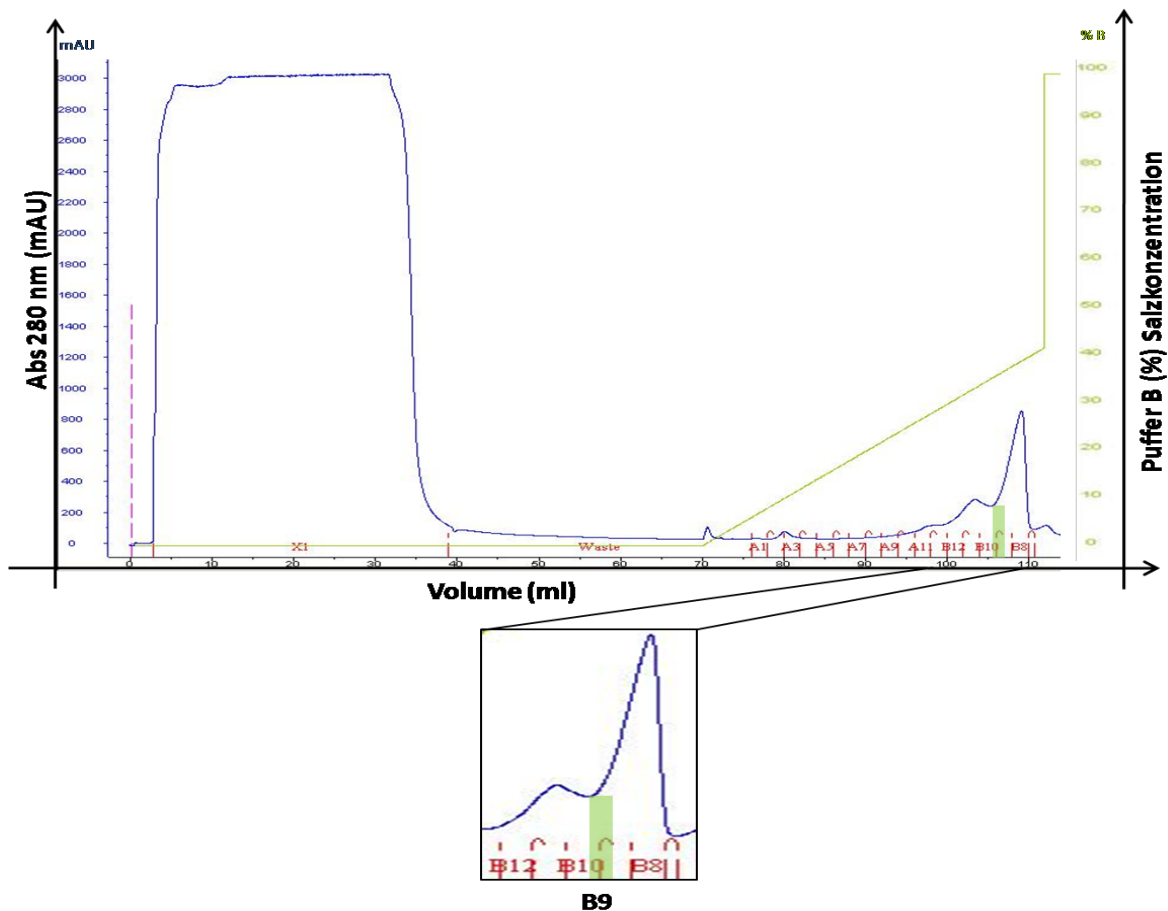


Abbildung 26: Aufreinigung von LysN_{opt} durch die Kationentauschersäule MonoS

Das entsalzte Lysat wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min in Citratpuffer A auf die MonoS Säule geladen. Nachdem die mAU wieder einen Wert von 0 erreicht hatte, wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen Citratpuffer A gewaschen. Die Elution erfolgte mit Citratpuffer B in einem linearen Gradienten von 0-50 % in 30 min. Die Proteine eluieren bei einem Salzgehalt von 5-30 %. Grün markiert ist die Eluatfraktion B9 (siehe Vergrößerung der Elutionsspitze). Die gestrichelte rosa Linie im Diagramm zeigt an, wann das Lysat auf die Säule injiziert wurde. Die X-Achse gibt das Volumen in ml an. Die dunkelblaue Kurve gibt die mAU (Absorption bei einer Wellenlänge von 280 in nm) während die hellgrüne Kurve die Salzkonzentration des Puffers B angibt.

Abbildung 27 zeigt das aufgereinigte, rekombinante Protein auf einem SDS-PAGE-Gel, sowie dessen Aktivität. Die Bande des rekombinanten Proteins (21 kDa) ließ sich vor allem in den Fraktionen B9 und B10 nachweisen. Die Bande (Fraktion B9) wurde aus dem Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und massenspektrometrisch untersucht. Hiermit konnte bewiesen werden, dass es sich bei dem aufgereinigten Protein tatsächlich um LysN_{opt} handelt (siehe 3.4). Die restlichen Eluatfraktionen der Aufreinigung beinhalteten kein LysN_{opt} (Abbildung 27, A). Allerdings war im Durchfluss rekombinantes Protein vorhanden. Im Vergleich zur der stärksten Bande der Eluatfraktionen von LysN_{opt} (B9 in Bild B, Abbildung 27) fiel auf, dass die Bande im Durchfluss stärker war. Daraus ergab sich die Annahme, dass die Mehrheit des rekombinanten Proteins in die Durchflussfraktion gelangt, ohne zunächst an die Säule zu binden.

Neben der Bande des rekombinanten Proteins fiel auf, dass in allen Eluatfraktionen eine Bande von ca. 13 kDa zu sehen ist (Abbildung 27, B). Diese nahm im Verlauf der Elution, also mit steigendem Salzgehalt, an Intensität zu. Betrachtet man die Vergrößerung des Elutionssignals von Abbildung 26 fällt auf, dass ein Teil der stärksten Banden (B8 und B7) im Maximum des Elutionssignals liegen. Daraus wurde geschlossen, dass das Elutionssignal nicht allein von dem rekombinanten Protein herrührte, sondern vielmehr durch ein kontaminierendes Protein, welches unter den gleichen Bedingungen von der MonoS Säule eluierte wie LysN_{opt}. Um herauszufinden, um welches Protein es sich bei der Kontamination handelte, wurde die Bande aus dem SDS-PAGE-Gel ausgeschnitten und das Protein durch einen In-Gel Verdau aus dem Polyacrylamid herausgelöst und massenspektrometrisch untersucht. Es wurde eindeutig als Lysozym identifiziert, welches dem bakteriellen Lysepuffer zur Unterstützung der Lyse zugefügt wurde. Von allen Eluatfraktionen wurde neben der SDS-PAGE auch die Aktivität der aufgereinigten Protease durch einem Azocaseintest ermittelt (siehe 2.2.9). Eventuell vorhandene Endopeptidasen verdauten das Azocasein, woraufhin der Farbstoff als säureunlösliches, nicht abzentrifugierbares Material ausfiel. Das Ergebnis des Tests zeigte eine Aktivität der Fraktionen B10 und B9. Hier ist zu betonen, dass der Azocaseintest nicht spezifisch für eine bestimmte Protease ist, allerdings fiel im Vergleich mit dem SDS-PAGE-Gel B (Abbildung 27) auf, dass die aktiven Fraktionen auf dem SDS-PAGE Gel eine Bande von 21 kDa zeigten, die dem rekombinanten Protein entsprachen (B10 und B9). Im Vergleich zur Trypsinkontrolle waren die Fraktionen B10 und B9 ca. 1/5, bzw. 1/8 weniger aktiv. Die Proteinbestimmung des aufgereinigten Proteins ergab lediglich 0,015 µg/µl Ausbeute an Gesamtprotein. Im Azocaseintest wurden 50 µl des aufgereinigten Proteins eingesetzt, das entspricht 0,75 µg in 50 µl. Wenn man einberechnet, dass in der Positivkontrolle Trypsin in ca. 2,7-facher Konzentration eingesetzt wurde, steigt die Aktivität von LysN_{opt} im Vergleich zu Trypsin an, erreicht diese aber trotzdem nicht.

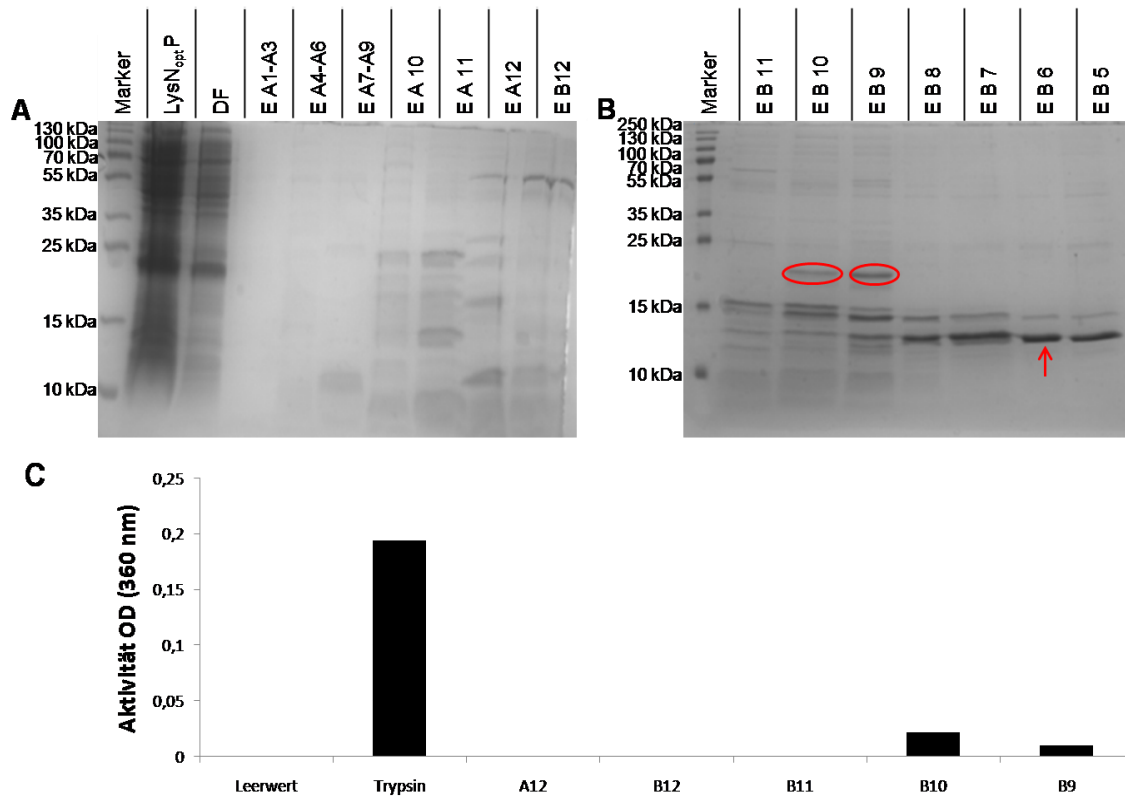


Abbildung 27: SDS-PAGE Gel und Aktivitätsassay des aufgereinigten LysN_{opt}

Pro Spur wurden jeweils 30 µl des Durchflusses und der Eluate des durch die MonoS Säule aufgereinigten LysN_{opt} aufgetragen (A1—B4). Bild A zeigt den Durchfluss und die Eluatfraktionen außerhalb des Elutionspeaks. B zeigt die Eluatfraktionen des Elutionspeaks (Abbildung 26). Dabei enthalten die Fraktionen B9 und B10 das rekombinante Protein (rote Kreise). Auffallend sind Banden in jeder Fraktion im Bereich von ca. 13 kDa (entsprechen Lysozym, markiert durch den roten Pfeil), die im Elutionsverlauf von B11-B5 an Stärke zunehmen. DF = Durchfluss, P = Pellet, E = Elution

Abbildung C zeigt den Azocaseinassay zur Messung der Aktivität der aufgereinigten Proteinfractionen. 50 µl der aufgereinigten Fraktion wurden eingesetzt und für 30 min mit 300 µl 1 % Azocasein inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion wurde die Absorption gemessen. Die Fraktionen B10 und B9 zeigten als einzige der aufgereinigten Fraktionen Aktivität. Als Positivkontrolle wurde Azocasein mit Trypsin verdaut.

3.4 Massenspektrometrische Bestimmung von LysN_{opt}

Um sicherzustellen, dass es sich bei der enzymatisch aktiven Fraktionen der MonoS Aufreinigung auch tatsächlich um LysN_{opt} handelte, wurde die 21 kDa große Bande von Fraktion B9 aus dem Gel ausgeschnitten, die Proteine aus dem Gel eluiert, tryptisch verdaut und massenspektrometrisch untersucht. Die Probe wurde dann mit 1 % FA angesäuert und massenspektrometrisch untersucht (siehe 2.2.20.1 und 2.2.20.2). Abbildung 28 zeigt die Daten für LysN_{optE157D}, LysN_{opt} wurde in analoger Weise massenspektrometrisch identifiziert (Daten nicht gezeigt). Der automatische Suchalgorithmus PLGS (ProteinLynx Global Server) des Auswertungsprogramms ProteinLynx identifizierte sowohl LysN_{opt}, als auch für LysN_{optE157D} eindeutig in den tryptisch verdauten SDS-PAGE Gelbanden der Eluatfraktion B10 aus Abbildung 27.

Das Übersichtsspektrum (MS1-Spektrum) (Abbildung 28, A) der Tandem MS zeigte vier Peptidsignale, die blau gefärbt waren. Diese hinterlegten Peptide konnten dem rekombinanten Protein zugeordnet werden. Dabei wiesen drei dieser Peptide die höchste Intensität auf. Die grau hinterlegten Signale konnten den rekombinanten Proteinen LysN_{opt}, bzw. LysN_{optE157D} nicht zugewiesen werden konnten. Die Sequenzabdeckung von LysN_{optE157D} (Abbildung 28, B) zeigte Übereinstimmungen der gefundenen Peptide mit dem Protein. Diese Übereinstimmungen sind ebenfalls blau hinterlegt. Grün bedeutet, dass auch eine Übereinstimmung mit dem Peptid vorhanden ist, allerdings eine Modifikation am Peptid vorliegt, z.B. eine Phosphorylierung. Zu beachten ist hierbei, dass die kodierende Sequenz erst mit dem Thr (Position 182) beginnt, welches durch den roten Pfeil gekennzeichnet ist und deswegen vor der markierten AS keine Übereinstimmungen mit dem Peptid gefunden werden konnten. Die Sequenzabdeckung des Proteins betrug für LysN_{opt}, als auch von LysN_{optE157D} 16 %. Dieser Wert erschien zunächst gering, bezog sich allerdings auf die insgesamt 348 AS lange Proteinsequenz der zymogenen Vorstufe des rekombinanten Proteins. Unter Berücksichtigung dieses Aspekts, ergab sich eine Sequenzabdeckung von ca. 40 %. Das Peptid mit der mittleren Intensität von 53.2356 ist mit einem roten Pfeil markiert und wurde fragmentiert, woraus sich das Fragmentspektrum (MS2) des Peptids (A)PTTGTDSQAGTLVHESHFT(R) von LysN_{optE157D} ergab (Abbildung 28, C). Im Vergleich mit der Sequenzabdeckung (Bild B) fiel auf, dass es sich um das von AS 283 bis AS 306 reichende Peptid handelte (blau unterlegt). Die Peptidleiter der *y*-Ionenserie (rot markiert) und die der *b*-Ionenserie (blau markiert) konnten weitestgehend annotiert werden, d.h. die höchsten Signale konnten den entsprechenden AS zugeordnet werden. Dabei ergab sich die AS-Sequenz aus der Differenz zwischen den Signalen. Das Peptid trug am C-Terminus die AS Arg, wie es für tryptisch verdaut Proteine charakteristisch ist. Signale, die von Arg stammen haben

dabei ein AS-Signal bei 175 Da, die von Lys bei 147. Somit können tryptisch generierte Peptide durch ihren definierten C-Terminus identifiziert werden.

Generell konnte das rekombinante Protein spezifisch durch den Kationentauscher aufgereinigt werden konnte. Die Ausbeute war trotz allem noch relativ gering, weshalb ein weiteres Expressionssystem zur Aufreinigung genutzt wurde.

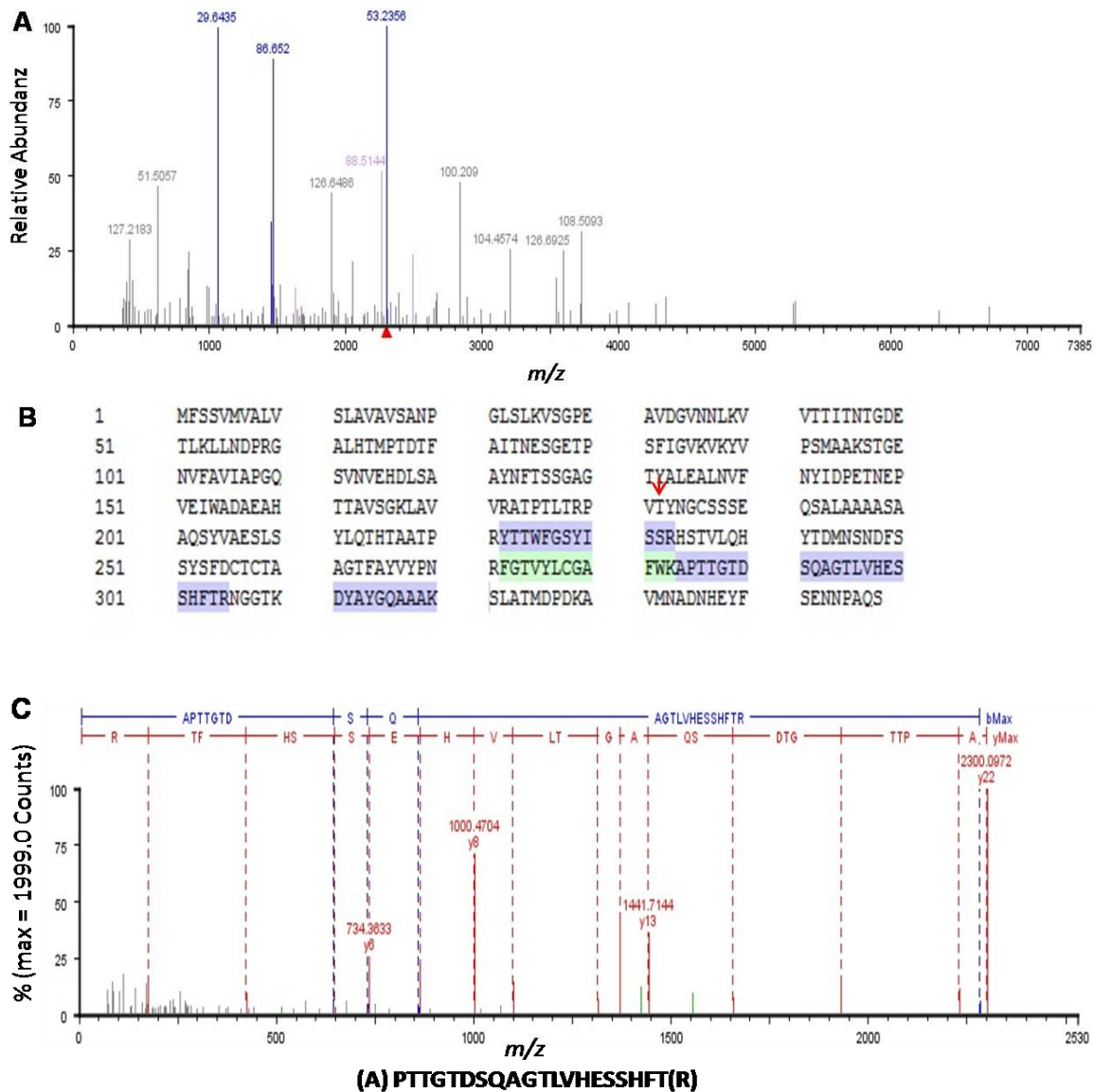


Abbildung 28: Massenspektrometrische Daten der tryptisch verdauten Proteinbanden der SDS-PAGE Analyse von LysN_{optE157D}

Das oberste Bild zeigt das Massenspektrum des proteolytischen Verdaus der SDS-PAGE der Aufreinigung des rekombinanten Proteins. Blau gefärbte Peptidsignale konnten LysN_{optE157D} zugeordnet werden, die grauen Signale nicht. Durch den roten Pfeil ist das Peptid gekennzeichnet, welches fragmentiert wurde. B zeigt die Sequenzabdeckung der gefundenen und LysN_{opt} zugeordneten Peptide (farblich unterlegt). C zeigt das MS/MS Fragmentspektrum des tryptischen Peptidfragments (A)PTTGTD(S)QAGTLVHESHFT(R). Der C-Terminus ist durch das „(R)“ (Arg) gekennzeichnet, der N-Terminus durch „(A)“. Die Peptidleiter der *y*-Ionenserie ist rot geschrieben, die der *b*-Ionenserie blau.

3.1.1 Klonierung in den bakteriellen Transfervektor pVL1393

Als Alternative zur Aufreinigung der Metalloproteasen wurden eukaryotische Zellen, die mit Baculoviren infiziert wurden, genutzt. Dieses gängiges System bot gegenüber der bakteriellen Expression einige Vorteile^{169;170}. Durch die „evolutionäre Distanz“ zwischen Prokaryoten und Eukaryoten haben sich andere Mechanismen im Zuge der Modifikation von Proteinen nach der Translation entwickelt^{171–173}. Dabei werden PTMs von bakteriellen Expressionssystemen anders, oder gar nicht vollzogen, woraufhin das exprimierte Protein oft nicht biologisch aktiv ist.

Durch die Wahl eines eukaryotischen Expressionssystems sollte eine bessere Löslichkeit des Proteins erreicht werden, sowie eine korrekte Faltung des exprimierten Proteins. Zunächst wurden die Nukleotide für die Expression in Sf-9 Zellen sequenzoptimiert. Entsprechende Restriktionsschnittstellen, eine Kozaksequenz und ein Startcodon wurden eingefügt. Um das Protein aus einem komplexen Proteingemisch (wie es nach Zelllyse der Fall ist) aufzureinigen zu können, wurde es mit einem His-Tag (6 x His) versehen, welches ermöglicht, das Protein spezifisch aufzureinigen zu können. Die cDNA wurde von der Firma Centic Biotec synthetisiert und in einen pUC57 Vektor kloniert. Aus diesem Vektor wurde die kodierende Sequenz mit den Restriktionsenzymen BglIII und EcoRI herausgeschnitten, aufgereinigt und in den Transfervektor pVL1393_{Mellitin} ligiert. Durch die Mellitin-Signalsequenz sollte eine Sezernierung des Proteins in den Überstand erreicht werden.

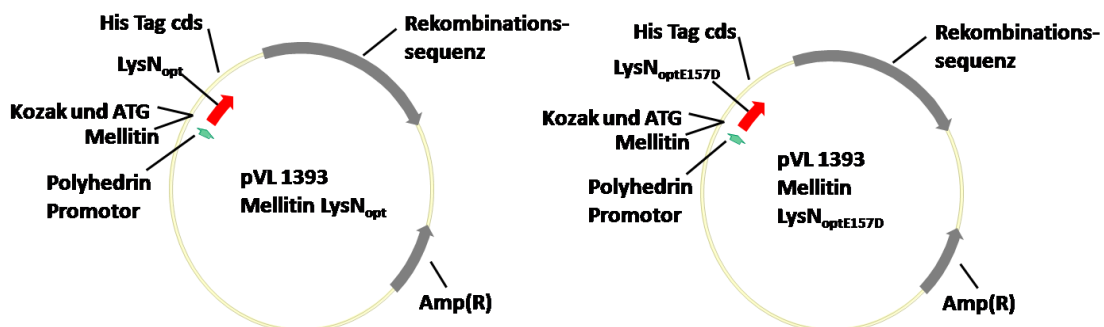


Abbildung 29: Die Vektoren pVL 1393 Mellitin Lys_{opt} und pVL 1393 Mellitin Lys_{optE157D} für die Expression der rekombinanten Proteine in Sf-9 Zellen

Die kodierenden Sequenzen der Metalloendopeptidasen Lys_{opt} und Lys_{optE157D} wurden N-terminal mit einem His-Tag versehen und per Restriktion in den Expressionsvektor kloniert. Ebenso wurde mit der c-terminalen Mellitin-Sequenz verfahren.

Amp (R) = Ampicillinresistenz, His Tag cds, = His Tag Kodierungssequenz, ATG = Startcodon

3.1.2 Infektion von Sf-9 Zellen mit Baculoviren

Zunächst wurde durch Kotransfektion des Transfervektors pVL1393_{Mellitin} mit linearisierter Baculovirus DNA ein infektiöser Virus generiert, der zur Identifizierung infizierter Zellen ein Gen für GFP im Konstrukt beinhaltet (siehe 2.2.17.1). Das Baculovirus Expressionssystem nutzt dabei den lytischen Virus, der als *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* bekannt ist. Dabei wurde das in Abbildung 30 gezeigte Protokoll zur Infektion von Sf-9 Zellen und anschließender Expression der rekombinanten Proteine etabliert.

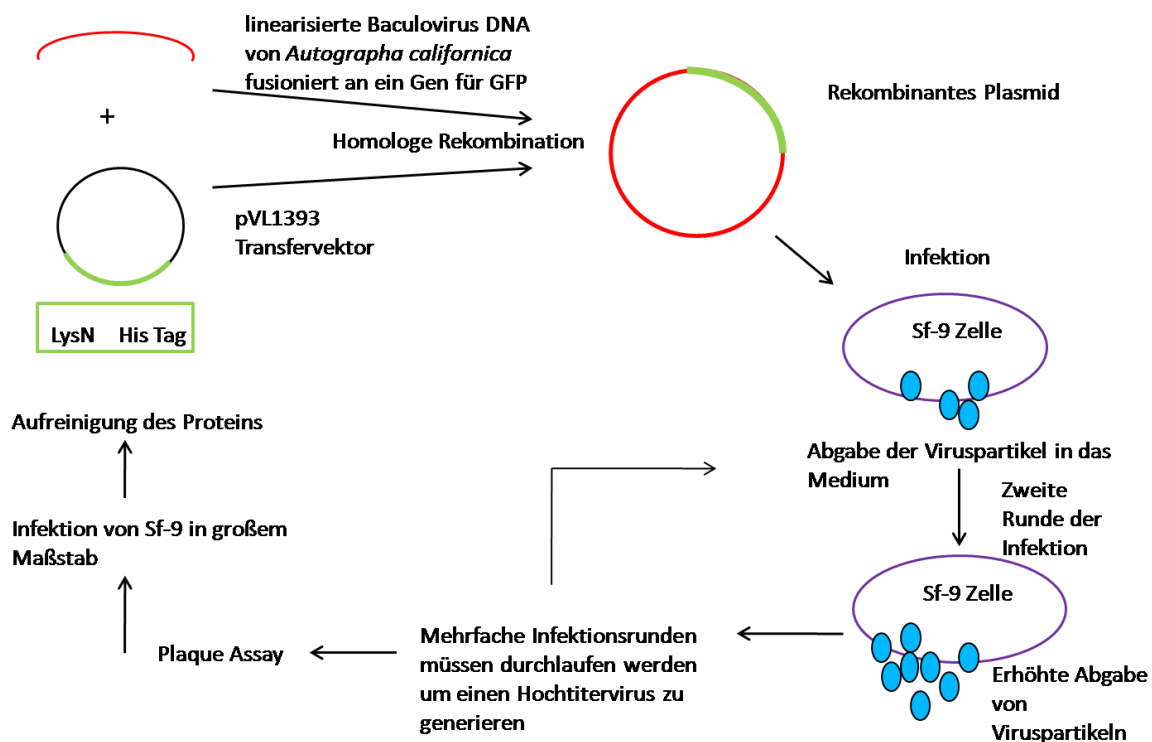


Abbildung 30: Etabliertes Versuchsprotokoll zur Infektion von Sf-9 Zellen zur Expression rekombinanter Proteine

GFP = (vom engl. *green fluorescent protein*)

$2,5 \times 10^6$ Zellen wurden mit dem konstruierten Virus infiziert (siehe 2.2.17.2 bis zum Schritt der Agaroseüberschichtung). Die Dauer der Infektion von 72 h lässt sich in drei Phasen einteilen. Im Falle von Polyhedra entstammenden Viren beginnt die frühe Phase 0-24 h nach Infektion, die späte Phase 24-48 h nach Infektion und die sehr späte Phase der Infektion nach 48-72 h. Die Zellen wurden während den Infektionsphasen mikroskopisch untersucht, dabei ist jede Phase durch charakteristische Veränderungen in der Morphologie der Zellen gekennzeichnet (Daten nicht gezeigt).

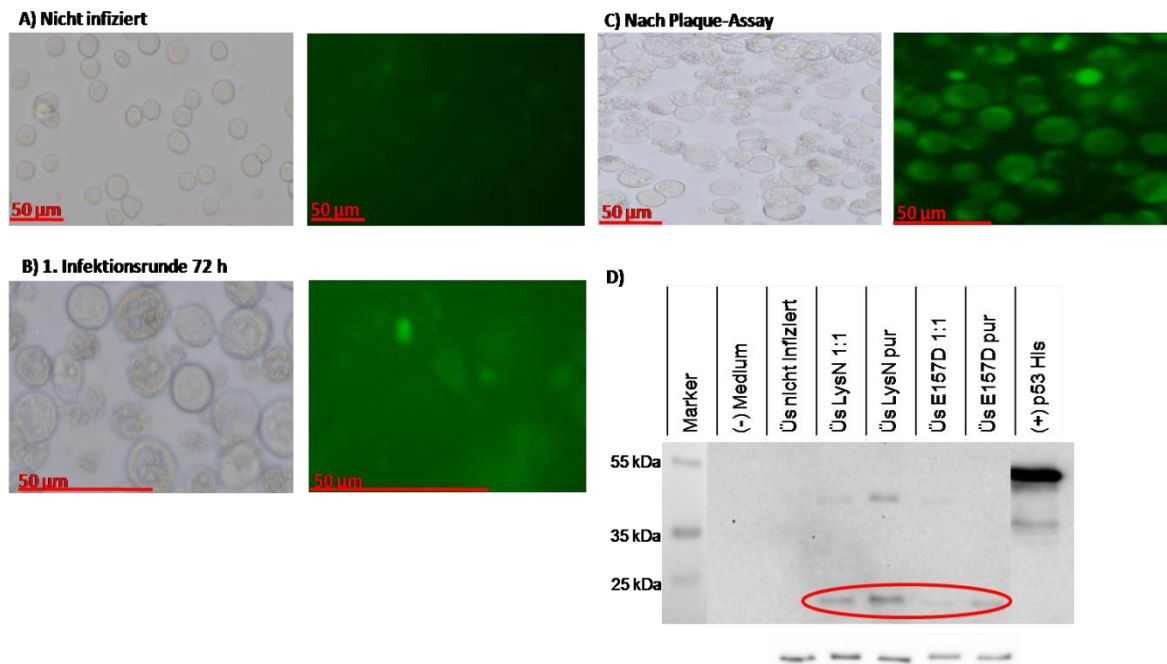


Abbildung 31: Infizierte Sf-9 Zellen exprimieren GFP-fusioniertes Protein nach 72 h Infektion

Bild A zeigt nicht infizierte Sf-9 Zellen als Durchlichtbild, sowie als fluoreszenzmikroskopische Darstellung im FITC-Kanal. 72 h nach Infektion mit dem Baculovirus (Bild B) wurde der Überstand abgenommen und die Zellen erneut mikroskopisch untersucht. Es handelt sich um die späte Phase der Infektion. C zeigt Sf-9 Zellen, die 48 h mit dem „Hochtitervirus“ inkubiert wurden. Der Maßstab beträgt jeweils 50 µm.

D) $2,5 \times 10^6$ Sf-9 Zellen wurden 72 h mit Virusüberstand des aus dem Plaque-Assay gewonnenen Virusklons inkubiert. Der Zellüberstand wurde von 25 ml auf 5 ml aufkonzentriert. Um das rekombinante Protein nachzuweisen, wurde als Primärantikörper der monoklonale Anti-(His)₆ Tag Maus-Antikörper unkonjugiert (1:1000) eingesetzt (ü.N. 4 °C). Als Sekundärantikörper wurde ein α -Maus-HRP (1:1000) eingesetzt (1 h, RT). Als Negativkontrollen (-) wurden Insektenzellmedium und der Überstand nicht infizierter Zellen aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde das His-Tag Protein fusionierte p53 mitgeführt. Es wurden gleiche Volumina aufgetragen. 1:1 bedeutet, dass der konzentrierte Üs 1:1 verdünnt wurde. Die rot eingekreisten Banden entsprechen dem Molekulargewicht von LysN_{opt} und LysN_{optE157D}. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

Während der frühen Phase infizierten die Virionen die Zellen und gelangen in den Nukleus. Bereits 30 min nach der Infektion ist erste virale RNA detektierbar¹⁷⁴. In dieser Arbeit wurden die strukturellen Veränderungen untersucht, die sowohl licht-, als auch fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen wurden (Abbildung 31). Dabei wurden vergleichend nicht infizierte Zellen, sowie Zellen, die sich in der späten Phase der Infektion befanden untersucht. Nicht infizierte Zellen waren nahezu uniform in ihrer Größe und wiesen keine besonderen strukturellen Merkmale auf. In der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung ließen sich die Zellen kaum erkennen. Der erkennbare grünliche Schimmer ließ sich auf die Hintergrundfluoreszenz zurückführen. Hingegen waren die infizierten Zellen von unterschiedlicher Größe, da sie begannen anzuschwellen, zusätzlich war der Nukleus vergrößert.

Darüber hinaus ließ sich das virogene Stroma (Ort der Virus-DNA Replikation) lichtmikroskopisch als verdichtete Struktur erkennen. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (B) zeigte zusätzlich, dass der Bereich um den Nukleus leuchtend grün erschien. Dies ist ein Hinweis auf GFP markierte Viruspartikel, die im Nukleus generiert wurden. 48 h – 72 h nach Infektion (je nach Virustiter) wurde der Promotor maximal abgelesen, die Zellen begannen zu lysieren und setzten das Virusmaterial frei. Erkennbar am grünlichen Schimmer im Medium war, dass Viruspartikel bereits frei im Medium vorlagen. Nach 72 h Infektion wurden die Zellen geerntet und der Zelldebris pelletiert (6000 x g, 20 min, 4 °C). Die Viruspartikel befanden sich im Überstand, welcher auf seine Infektiosität überprüft wurde. Dazu wurden frische Zellen mit Überstand infiziert und einem Plaque Assay unterzogen (siehe 2.2.17.2). Die Anzahl der Plaques einer bestimmten Konzentration wurde ausgezählt und die Plaque-formierende Einheiten (kurz PFU, vom engl. *plaque forming units*) (pfu/ml) bestimmt. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung ergab, dass auch nach der vierten Infektionsrunde noch kein Hochtitervirus ($> 2 \cdot 10^8$ pfu/ml) generiert werden konnte. Deshalb wurden die Zellen einem weiteren Plaque Assay unterzogen. Einzelne Plaques (die einem Virusklon entsprachen) wurden gepickt und der Virus daraus isoliert (2.2.17.2). Hiermit sollten Klone gewonnen werden, die infektiöser sind, als andere. Erneut wurden mit diesen Virusklonen vier Infektionsrunden durchlaufen. 48 h nach der Infektion mit diesem Virus zeigten die Zellen eine deutliche Expression von GFP (fluoreszenzmikroskopische Aufnahme Abbildung 31, C). Daraus ergab sich die Annahme, dass auch die rekombinanten Proteine LysN_{opt} und LysN_{optE157D} exprimiert wurden, da auf Grund der homologen Rekombination der resultierende Vektor GFP und das rekombinante Protein beinhaltet (siehe Abbildung 30). Um sicherzustellen, dass neben dem GFP auch das rekombinante Protein exprimiert wurde, wurden mit den Überständen der Virusklone ein Western-Blot durchgeführt (Abbildung 31, Bild D). Die Membran wurde mit einem monoklonalen Antikörper (Anti-(His)₆ Tag Maus) inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Insektenzellmedium und der Überstand nicht infizierter Zellen, beides zeigte kein Signal. Die Positivkontrolle zeigte, dass der Anti-(His)₆ Tag Maus Antikörper (Bande + p53His) spezifisch ist. Die Überstände von LysN_{opt} und LysN_{optE157D} zeigen jeweils zwei Banden. Eine Bande von stärkerer Intensität (21 kDa) und eine schwächere im Bereich von 42 kDa. Die stärkeren Banden von ca. 21 kDa entsprachen dem Molekulargewicht des His-Tag fusionierten LysN_{opt} bzw. LysN_{optE157D} Protein. Vergleich man die aufgetragenen Proteinmengen mit der Ladekontrolle fiel auf, dass LysN_{opt} im Vergleich zu seiner Mutante stärker exprimiert wurde. Allerdings konnten auf Grund der geringen Proteinmengen weder LysN_{opt} noch LysN_{optE157D} durch massenspektrometrische Analysen nachgewiesen werden.

3.5 Denaturierende Aufreinigung aus Einschlusskörperchen

Durch die massenspektrometrische Auswertung konnten die rekombinanten Metalloproteasen in infizierten Sf-9 Zellen nicht nachgewiesen werden. Da im Falle der bakteriellen Expression und nativer Proteinaufreinigung das Protein zwar in aktiver Form nachgewiesen werden konnte, die Ausbeute allerdings gering war, wurde versucht, das Protein in größeren Mengen zu exprimieren. Die Bilder A und B aus Abbildung 27 zeigten, dass LysN_{opt} in den Fraktionen B9 und B10 aufgereinigt werden konnte (Bild B), allerdings war es ebenfalls im Durchfluss vorhanden. Das bedeutet, dass durch den Kationentauscher nicht das gesamte exprimierte rekombinante Protein aufgereinigt werden konnte. Des Weiteren fiel eine starke Bande in der Fraktion „LysN_{opt} Pellet entsalzt“ (Abbildung 27, A) auf, die ebenfalls im Bereich von 21 kDa lag. Hieraus wurde geschlossen, dass nach der Lyse nur ein Teil des rekombinanten Proteins in Lösung ging und ein Großteil in unlöslicher Form pelletierte. Bei näherem Betrachten des Pellets fiel eine „bröselige“ Struktur auf und das Pellet war von grau-weißer Farbe. Diese Charakteristika ließen den Schluss zu, dass das rekombinante Protein in Einschlusskörperchen akkumuliert. Dieses Phänomen tritt häufig auf, wenn eukaryotische Proteine in prokaryotischen Zellen exprimiert werden. Auf Grund fehlender posttranslationaler Modifikationen kann es zu Missfaltungen der exprimierten Proteine kommen. Diese aggregieren dann als Einschlusskörperchen^{175;176}. Zur Isolierung des rekombinanten Proteins aus Einschlusskörperchen gibt es verschiedenste Ansätze, hier wurde sich auf die Isolierung der Einschlusskörperchen, gefolgt von deren Denaturierung, beschränkt^{177;178}.

3.5.1 Isolierung der Einschlusskörperchen von LysN_{opt} und LysN_{optE157D}

Zur Isolierung des rekombinanten Proteins aus den Einschlusskörperchen wurden diese zunächst isoliert und denaturiert (siehe 2.2.16.3). Die aufgereinigten Einschlusskörperchen sollten möglichst rein sein, damit nach der Denaturierung nur wenig kontaminierendes Protein die Aufreinigung des rekombinanten Proteins behindert. Zur Überprüfung der Reinheit der Einschlusskörperchen wurde nach jedem Waschschrift eine Probe für eine SDS-PAGE-Analyse entnommen. Es wurden jeweils gleiche Volumina (30 µl) aufgetragen.

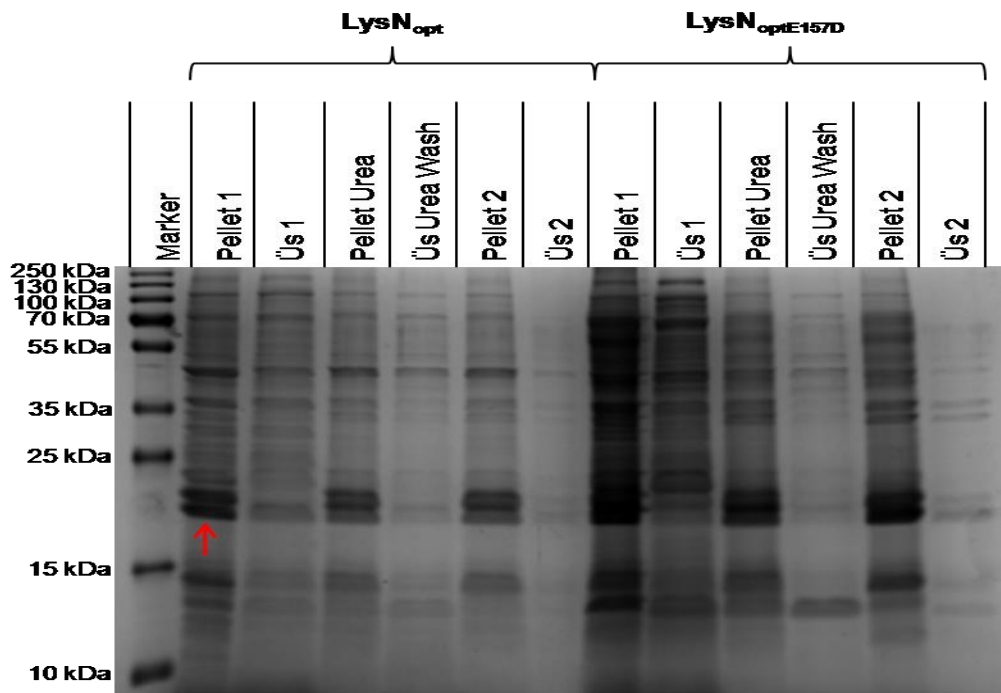


Abbildung 32: SDS-PAGE Gel der aufgereinigten Einschlusskörperchen

2 l induzierte Bakterienkultur dienten als Ausgangsmaterial für die Aufreinigung der rekombinanten Proteine. Die Einschlusskörperchen wurden zunächst mit tritonhaltigem Waschpuffer behandelt (Üs 1 und Pellet 1), gefolgt von vier Waschschritten mit 3 M Harnstoff (Üs & Pellet UREA Wash und P2 und Ü2). Es wurden 30 µl pro Spur geladen. Der Üs wurde pur aufgetragen, die Pellets wurden 1:10 verdünnt. Die Bande des rekombinanten Proteins wurde repräsentativ durch den roten Pfeil gekennzeichnet. Üs = Überstand, Urea = Harnstoff

Das isolierte Protein zeigte auf dem SDS-PAGE Gel eine Doppelbande im Bereich von 21 kDa, die dem rekombinanten Protein entsprach (Abbildung 32). Die Intensität der Bande ließ auf eine hohe Expressionsrate schließen, sowie eine Aggregation des Proteins, da die höchsten Intensitäten jeweils in den Fraktionen der Pellets zu verzeichnen waren (siehe Pellet 1, Pellet *Urea Wash* und Pellet 2). In den Überständen hingegen war das rekombinante Protein kaum detektierbar (Üs 1, Üs *Urea Wash*, Üs 2). Die Banden von schwächerer Intensität wiesen darauf hin, dass neben dem rekombinanten Protein noch weitere Proteine in den Einschlusskörperchen aggregierten. In den folgenden Waschschrritten wurde nun versucht diese Kontaminationen zu eliminieren. Pellet 1 ist das Pellet nach dem ersten Waschschriff mit Triton Waschpuffer, Üs 1 der Überstand nach dem ersten Waschschriff. „Pellet *Urea Wash*“ ist das Pellet nach dem 1. Waschschriff mit Urea Waschpuffer, „Üs *Urea Wash*“ analog dazu der Überstand. Pellet 2 ist das Pellet nach dem letzten (4.) Waschschriff mit Urea Waschpuffer, Üs 2 der Überstand. Dabei fiel auf, dass mit zunehmenden Waschschriffen zwar einige Banden der kontaminierenden Proteine erfolgreich entfernt werden konnten, es aber trotzdem nicht möglich war, das rekombinante Protein durch die Waschschriffen komplett rein zu bekommen.

Generell fiel auf, dass sich die Einschlusskörperchen von LysN_{optE157D} in reinerer Form isolieren ließen als die von LysN_{opt} (Abbildung 32, rechts im Gel). Das Pellet 2 wurde für 18 h in 8 M Harnstoff denaturiert. Danach wurden die denaturierten Einschlusskörperchen abzentrifugiert (4500 x g, RT, 30 min).

3.5.2 Denaturierende Aufreinigung über das His-Tag mittels IMAC

Teilweise ist es möglich rekombinante Proteine bereits nach der Aufreinigung der Einschlusskörperchen in reiner Form zu isolieren. Mitunter aggregiert jedoch nicht nur das überexprimierte Protein in Einschlusskörperchen, sondern auch andere, kontaminierende Proteine. In diesem Fall ließen sich die Einschlusskörperchen nicht in reiner Form isolieren (Abbildung 33), da auch in den Fraktionen nach dem letzten Waschschrift kontaminierende Proteine vorhanden waren. Allerdings wies die Bande bei 21 kDa die höchste Intensität auf. Um das Protein in reiner Form zu gewinnen wurde es denaturierend über eine Säule gegeben, mit der sich durch immobilisierte Cobaltionen spezifisch His-Tag fusionierte Proteine aufreinigen ließen (siehe 2.2.18.3)^{179;180}.

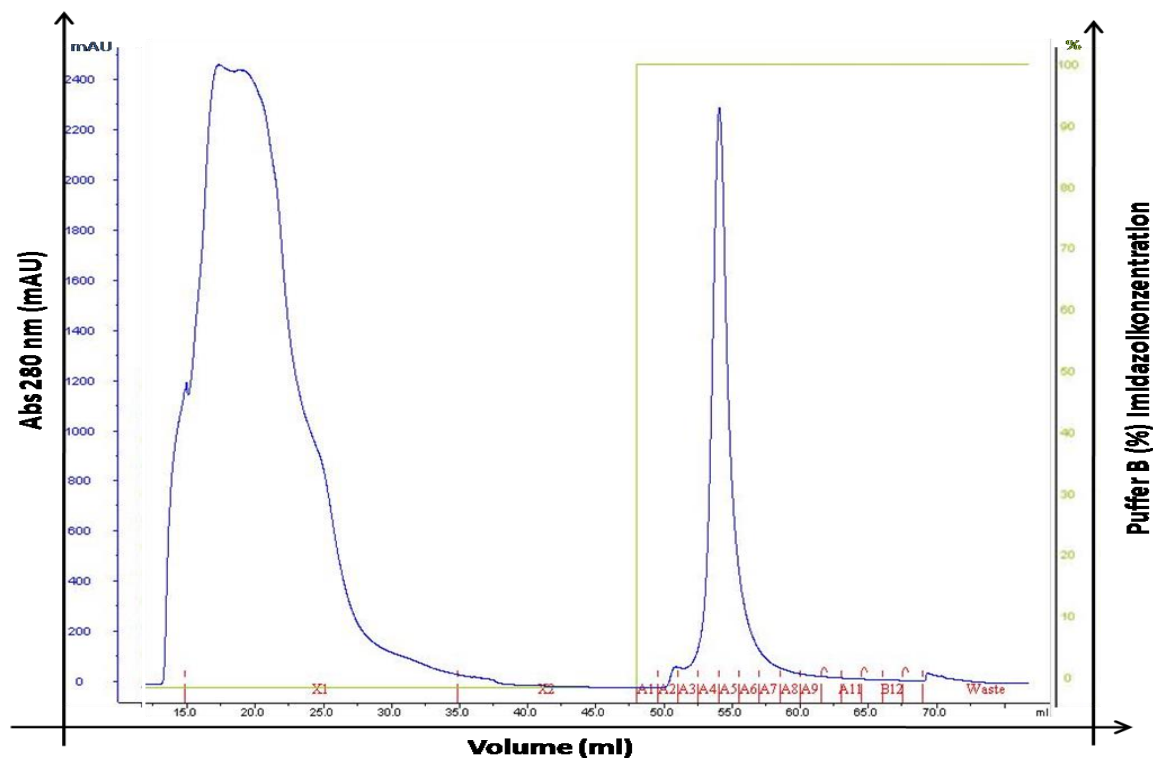


Abbildung 33: Denaturierende Aufreinigung von LysN_{optE157D} über das His-Tag

10 ml der denaturierten Einschlusskörperchen wurden mit 1 ml/min auf die Co²⁺ Chelat- IMAC Säule gegeben (in denaturierendem His-Tag Waschpuffer). Nachdem die mAU wieder den Basiswert von 0 erreicht hatte, wurde die Säule mit zwei Säulenvolumina mit denaturierendem His-Tag Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 100 % denaturierendem His-Tag Elutionspuffer (0,5 ml/min).

Das Elutionsmaximum erreichte fast den Wert des Beladungsmaximums (2400 mAU). Im Vergleich zur nativen His-Tag Aufreinigung fiel auf, dass durch die denaturierende Aufreinigung deutlich mehr His-Tag fusioniertes Protein von der Säule eluiert werden konnte (siehe 3.3.1).

Um zu überprüfen, ob es sich beim eluierten Protein um das rekombinante Protein handelt und um dessen Reinheit zu kontrollieren, wurden jeweils 30 µl der Eluatfraktionen des Elutionspeaks für eine SDS-PAGE verwendet. Um zu evaluieren, ob die Bindekapazität der Co²⁺ Chelat- IMAC-Säule ausreichte, um das gesamte rekombinante LysN_{optE157D} aus 2 l Bakterienkultur zu binden, oder ein Teil ungebunden blieb, wurde die Durchflussfraktion ebenfalls durch eine SDS-PAGE auf das rekombinante Protein hin getestet.

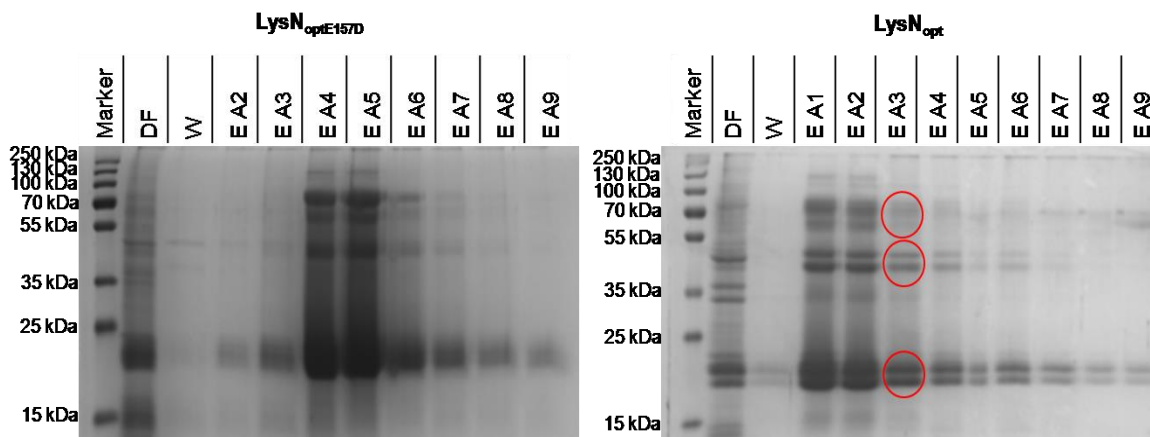


Abbildung 34: SDS-PAGE Gele der denaturierenden His-Tag Aufreinigung mittels IMAC

Das linke Gel zeigt die Eluatfraktionen der denaturierenden Aufreinigung von LysN_{optE157D} durch das His-Tag, das rechte Gel zeigt die fraktionen von LysN_{opt}. Neben den Eluatfraktionen A2-A9 wurden auch die Durchfluss-, und Waschfraktion aufgetragen. Es fällt auf, dass die Bande des rekombinanten Proteins (21 kDa) eine Doppelbande ist (rot eingekreist bei A3). Des Weiteren sind Doppelbanden im Bereich von ca. 40 kDa und im Bereich von ca. 65 kDa rot markiert (A3). Es wurden gleiche Volumina (30 µl) pro Spur aufgetragen. DF = Durchfluss, W = Wash, E = Eluat

In den Eluatfraktionen A2-A9 war eine Bande in der Größe von 21 kDa zu erkennen, die der des rekombinanten Proteins entsprach (Abbildung 34). Besonders in den Fraktionen A4 und A5 war diese Bande von besonders starker Intensität. Verglichen mit dem Elutionspeak aus Abbildung 33 fiel auf, dass A4 und A5 die Fraktionen waren, die eluierten, als das Elutionssignal sein Maximum erreicht hatte. Die Waschfraktion zeigten so gut wie gar keine Bande in der entsprechenden Größe. In der Durchflussfraktion war eine Bande von 21 kDa zu erkennen, was bedeutete, dass die Bindekapazität der Säule nicht ausreichte um das rekombinante Protein aus 2 l Kultur zu binden. Im Gegensatz zur nativen Aufreinigung über das 6 x His-Tag war die denaturierende Aufreinigung deutlich erfolgreicher.

Im Fall der denaturierenden Aufreinigung von LysN_{opt} durch das 6 x His-Tag ließ sich eine deutlich bessere Trennung der Proteine der aufgetragenen Fraktionen erzielen (Abbildung 34, rechtes Gel). Deshalb fiel hier ein Phänomen auf, welches bei der nativen Aufreinigung nicht beobachtet werden konnte. Die Bande im Bereich von 21 kDa war in diesem Fall keine Einzelbande, sondern eine klar getrennte Doppelbande (rot markiert A3). Des Weiteren waren Doppelbanden im Bereich von ca. 40 kDa zu erkennen, sowie von schwächerer Intensität im Bereich von ca. 60 - 65 kDa (E A3, rechtes Gel). Neben diesen Doppelbanden waren die Eluatfraktionen frei von kontaminierendem Protein. Auffällig war, dass die Doppelbanden von 40 kDa, bzw. ca. 65 kDa der doppelten, bzw. dreifachen Größe von 21 kDa entsprechen. Um zu überprüfen, ob das rekombinante Protein Dimere und Trimere bildet, oder ob es sich um Kontaminationen handelt, wurden die Doppelbanden (21 kDa, 40 kDa und 60 kDa) getrennt ausgeschnitten, die Proteine aus dem Gel isoliert und massenspektrometrisch analysiert.

Tabelle 14: Identifizierte Proteine der massenspektrometrischen Analyse des In-Gel Verdau des aufgereinigten rekombinanten Proteins

Benennung	Gefundene Peptide	Wahrscheinlichkeit (%)	Sequenzabdeckung (%)
Peptidyl Lys metalloendopeptidase OS <i>Grifola frondosa</i>	14	100	31,0
Peptidyl Lys metalloendopeptidase OS <i>Pleurotus ostreatus</i>	1	100	7,0
Keratin type I cytoskeletal 9 OS <i>Canis familiaris</i> GN KRT9 PE 3 SV 1	1	100	1,1
Keratin type I cytoskeletal 9 OS <i>Homo sapiens</i>	5	100	11,2
Keratin type II cytoskeletal 6B OS <i>Homo sapiens</i> GN KRT6B PE 1 SV 5	2	100	3,9
Mitochondrial genome maintenance protein mgm101 OS	2	100	4,1
UDP N acetylenolpyruvoylglucosamine reductase OS <i>Burkholderia ambifaria</i>	1	100	2,9
NF X1 type zinc finger protein NFXL1 OS <i>Homo sapiens</i>	1	100	4,9
NADH quinone oxidoreductase subunit N	1	100	2,2
Keratin type I cytoskeletal 10 OS <i>Canis familiaris</i>	3	100	7,0
Coproporphyrinogen III oxidase	2	100	4,1

Die Tabelle zeigt die gefundenen Proteine des In-Gelverdau der unteren Doppelbande von 21 kDa. Gezeigt werden der Name des Proteins in der Datenbank, die Anzahl der gefundenen Peptide, die Wahrscheinlichkeit in %, sowie die Sequenzabdeckung in %. Die Daten wurden in einem DDA Lauf generiert. Die erste Zeile zeigt, dass 14 der gefundenen Peptide LysN aus *Grifola frondosa* zugeordnet werden konnten, was einer Sequenzabdeckung von 31 % des gesamten Proteins entspricht. Daneben sind weitere mögliche Proteine angegeben, denen zumindest eines der gefundenen Peptide zugeordnet werden konnte.

Tabelle 14 zeigt die Daten der massenspektrometrischen Analyse des beschriebenen In-Gelverdaus. Gezeigt sind die identifizierten Proteine aus der unteren der 21 kDa großen Doppelbande des SDS-PAGE Gels (rechtes Gel, Abbildung 34). Von allen gefundenen Peptiden konnten vierzehn der *Peptidyl Lys metalloendopeptidase* aus *Grifola frondosa* zugewiesen werden. Dies entsprach einer Sequenzabdeckung von 31 % des gesamten Peptids, allerdings erhöhte sich der Prozentsatz, da nur der reife Teil des rekombinanten Proteins exprimiert wurde (siehe 3.4). Ein Teil der Peptide konnte zwar noch weiteren Proteinen zugeordnet werden, allerdings wurden maximal fünf Peptide im Falle des *Keratin type I cytoskeletal 9 OS Homo sapiens* gefunden. In diesem Fall bedeutete das Ergebnis allerdings, dass in der 21 kDa großen Bande lediglich das rekombinante Protein LysN zu finden war und keine kontaminierenden Proteine. Keratin kommt in geringen Mengen als Kontamination fast in jeder zu messenden Probe vor.

Auch in den Doppelbanden von 42 kDa und 65 kDa konnte das rekombinante Protein nachgewiesen werden. In der unteren Bande der 42 kDa großen Doppelbande konnten zwölf Peptide dem rekombinanten Protein zugewiesen werden, während in der oberen noch sechs Peptide zugewiesen werden konnten. Im Falle der unteren Bande der 65 kDa großen Doppelbande konnten immerhin noch acht Peptide dem rekombinanten Protein zugewiesen werden. In der unteren Bande konnten sechs Peptide LysN zugeordnet werden. Aus der massenspektrometrischen Analyse ergaben sich die Sequenzabdeckungen des Monomers, des Dimers und des Trimers (Abbildung 35, siehe 3.4 für Farbkodierung). Die Auswertung ließ den Schluss zu, dass das rekombinante Protein unter denaturierenden Bedingungen dazu neigt, Dimere (ca. 40 kDa), Trimere (ca. 65 kDa) und möglicherweise hochmolekulare Multimere zu bilden.

ca. 65 kDa	1	MFSSVMVALV	SLAVAVSANP	GLSLKVSQPE	AVDGVNMLKV	VTTITNIGDE
	51	TLKLLNDPRG	ALHTMPTDTF	AITNESGETP	SFIGVKVKYV	PSMAAKSTGE
	101	NVFAVIAPGQ	SVNVEHDLA	AYNFTSSGAG	TYALEALNVF	NYIDPETNEP
	151	VEIWADAEAH	TTAVSGKLAV	VRATPILTRP	↓VYNGCSSSE	QSALAAAASA
	201	AQSYVAESLS	YLQHTAATP	RYTTWFGSYI	SSRHSTVLQH	YDMNSNDFS
	251	SYSFDCTCTA	AGTFAYVYPN	RFGTVYLCGA	FWKAPTIGTD	SOAGTLVHES
301	SHFTRNGGTK	DYAYGQAAAK	SLATMDPDKA	VMNADNHEYF	SENNPAQS	
ca. 42 kDa	1	MFSSVMVALV	SLAVAVSANP	GLSLKVSQPE	AVDGVNMLKV	VTTITNIGDE
	51	TLKLLNDPRG	ALHTMPTDTF	AITNESGETP	SFIGVKVKYV	PSMAAKSTGE
	101	NVFAVIAPGQ	SVNVEHDLA	AYNFTSSGAG	TYALEALNVF	NYIDPETNEP
	151	VEIWADAEAH	TTAVSGKLAV	VRATPILTRP	↓VYNGCSSSE	QSALAAAASA
	201	AQSYVAESLS	YLQHTAATP	RYTTWFGSYI	SSRHSTVLQH	YDMNSNDFS
	251	SYSFDCTCTA	AGTFAYVYPN	RFGTVYLCGA	FWKAPTIGTD	SOAGTLVHES
301	SHFTRNGGTK	DYAYGQAAAK	SLATMDPDKA	VMNADNHEYF	SENNPAQS	
21 kDa	1	MFSSVMVALV	SLAVAVSANP	GLSLKVSQPE	AVDGVNMLKV	VTTITNIGDE
	51	TLKLLNDPRG	ALHTMPTDTF	AITNESGETP	SFIGVKVKYV	PSMAAKSTGE
	101	NVFAVIAPGQ	SVNVEHDLA	AYNFTSSGAG	TYALEALNVF	NYIDPETNEP
	151	VEIWADAEAH	TTAVSGKLAV	VRATPILTRP	↓VYNGCSSSE	QSALAAAASA
	201	AQSYVAESLS	YLQHTAATP	RYTTWFGSYI	SSRHSTVLQH	YDMNSNDFS
	251	SYSFDCTCTA	AGTFAYVYPN	RFGTVYLCGA	FWKAPTIGTD	SOAGTLVHES
301	SHFTRNGGTK	DYAYGQAAAK	SLATMDPDKA	VMNADNHEYF	SENNPAQS	

Abbildung 35: Sequenzabdeckungen der rekombinanten Proteine, sowie seiner Dimere und Trimere

Blau unterlegte Peptide konnten dem rekombinanten Protein zugewiesen werden, grün unterlegte Peptide konnten ebenfalls zugewiesen werden, weisen aber eine Modifikation auf. Farbabstufungen weisen Mischformen auf. Gezeigt ist die komplette Aminosäuresequenz, der rote Pfeil kennzeichnet den Beginn der Sequenz des Proteins welches in den Expressionsvektor kloniert wurde. Vor der ersten Aminosäure steht jeweils die kDa Angabe, wobei es sich bei 21 kDa um das Monomer, bei ca. 42 kDa um das Dimer und bei ca. 65 kDa um das Trimer handelt.

Abschließend lässt sich sagen, dass sich die rekombinanten Proteine unter denaturierenden Bedingungen in deutlich reinerer Form aufreinigen ließen, als unter nativen Bedingungen. Abgesehen von der geringen Kontamination durch Keratin wurden keine weiteren Verunreinigungen detektiert.

3.5.3 Gelfiltration unter denaturierenden Bedingungen

Die Gelfiltration wurde als Methode gewählt um die monomere Form des Proteins vom Dimer und Trimer zu trennen. Durch die denaturierende Aufreinigung über das His-Tag ließ sich das rekombinante Protein zwar ohne Kontamination aufreinigen, doch ließ es sich nicht von den multimeren Formen trennen. Dazu wurde das aufgereinigte, rekombinante Protein auf eine äquilibrierte Superose-6 Säule¹⁸¹ (2.2.18.3) gegeben.

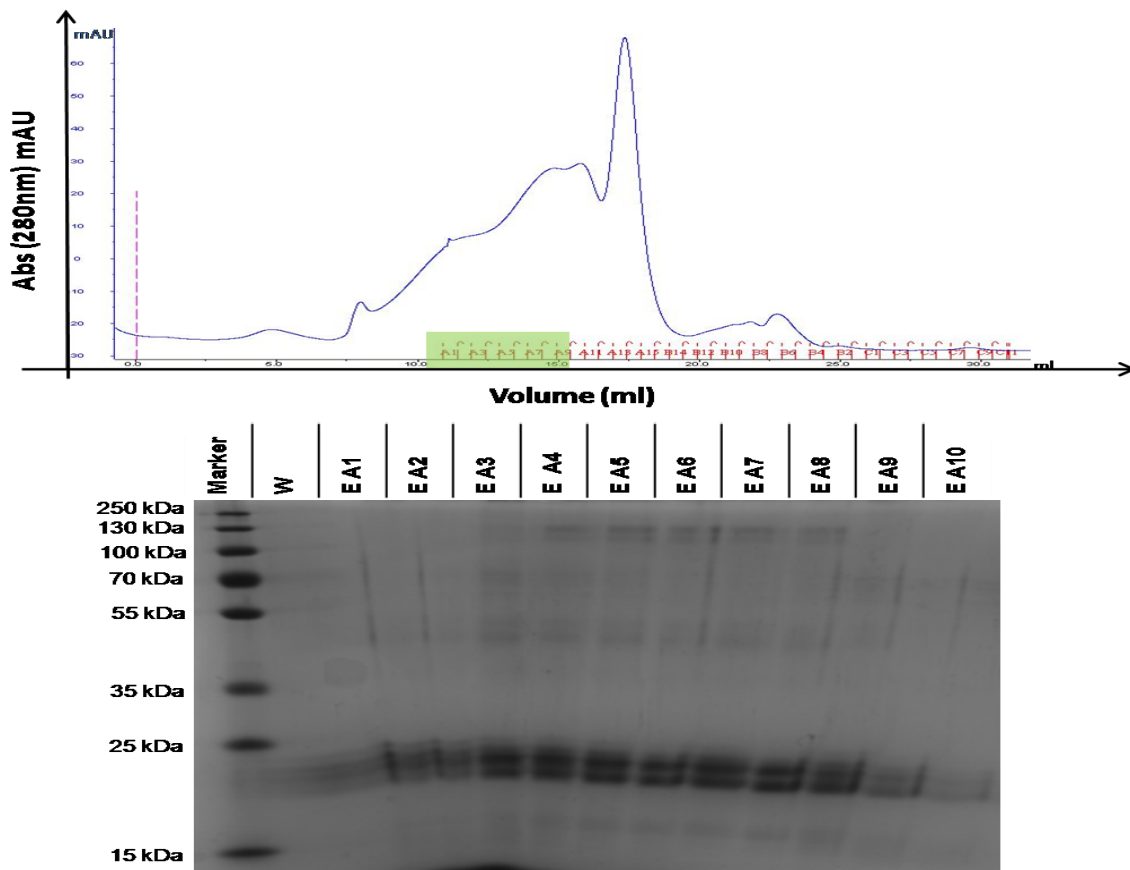


Abbildung 36: Profil der Gelfiltration des rekombinanten Proteins mit der dazugehörigen SDS-PAGE Analyse der Fraktionen

1 ml des aufgereinigten Proteins wurden auf die äquilibrierte Superose-6 Säule geladen. Eluiert wurde mit 0,5 ml/min in denaturierendem Waschpuffer (blaue Kurve). Grün markiert sind die Fraktionen, die auf das SDS-PAGE Gel aufgetragen wurden. Pro Spur wurden 30 μ l aufgetragen.

Das Elutionsprofil zeigte eine Auftrennung des rekombinanten Proteins durch die Superose-6 Säule (Abbildung 36). Auffällig war ein großer Peak und nicht wie erwartet, mehrere, aufeinander folgende Signale. Daraus wurde gefolgert, dass sich durch die Gelfiltration das Monomer nicht exakt von den multimeren Formen trennen ließ. Allerdings wies der Peak mehrere Schultern auf, die auf eine zeitlich verzögerte Elution schließen ließen. Um dies zu überprüfen, wurde von jeder Fraktion der Elution 30 μ l für eine SDS-PAGE-Analyse entnommen. Auf dem gefärbten Coomassie-Gel war eine deutliche Doppelbande im Bereich von 21 kDa erkennbar (Abbildung 36, unteres Bild). Die Doppelbanden des Dimers und des Trimers waren hingegen nur noch schwach zu erkennen. Somit konnte durch die Superose-6 Säule das Monomer vom Dimer und Trimer getrennt werden. Dabei wiesen die Fraktionen A1-A10 (grün markiert) das rekombinante Protein auf. In den Fraktionen A11-A16 (großer Peak) war das rekombinante Protein nicht nachweisbar.

3.5.4 Rückfaltung der rekombinanten Proteine aus denaturierten Einschlusskörperchen

Nach der Denaturierung der Einschlusskörperchen durch 8 M Harnstoff liegen auch die rekombinanten Proteine in denaturierter und somit biologisch inaktiver Form vor. Zur Wiederherstellung der enzymatischen Funktion gibt es heutzutage verschiedenste Ansätze¹⁸². Durch Rückfaltung wurde versucht, die native Struktur der rekombinanten Proteine wieder herzustellen. In den verwendeten Puffern wurde die Abhängigkeit der Rückfaltung durch unterschiedliche pH-Werte, Salzkonzentrationen, Konzentration an oxidiertem Glutathion (GSSG) und reduziertem Glutathion (GSH) und die Konzentration von L-Arginin untersucht. Dazu wurde 1 ml der denaturierten Einschlusskörperchen in 50 ml Rückfaltungspuffer gespritzt (siehe 2.2.16.4). Die besten Ergebnisse wurden dabei mit dem folgenden Rückfaltungspuffer erzielt (Abbildung 37).

50 mM Tris; 150 mM NaCl, 400 mM L-Arginin; 1,25 mM GSH; 0,25 mM GSSG;

50 μ M ZnSO₄; pH = 8,0

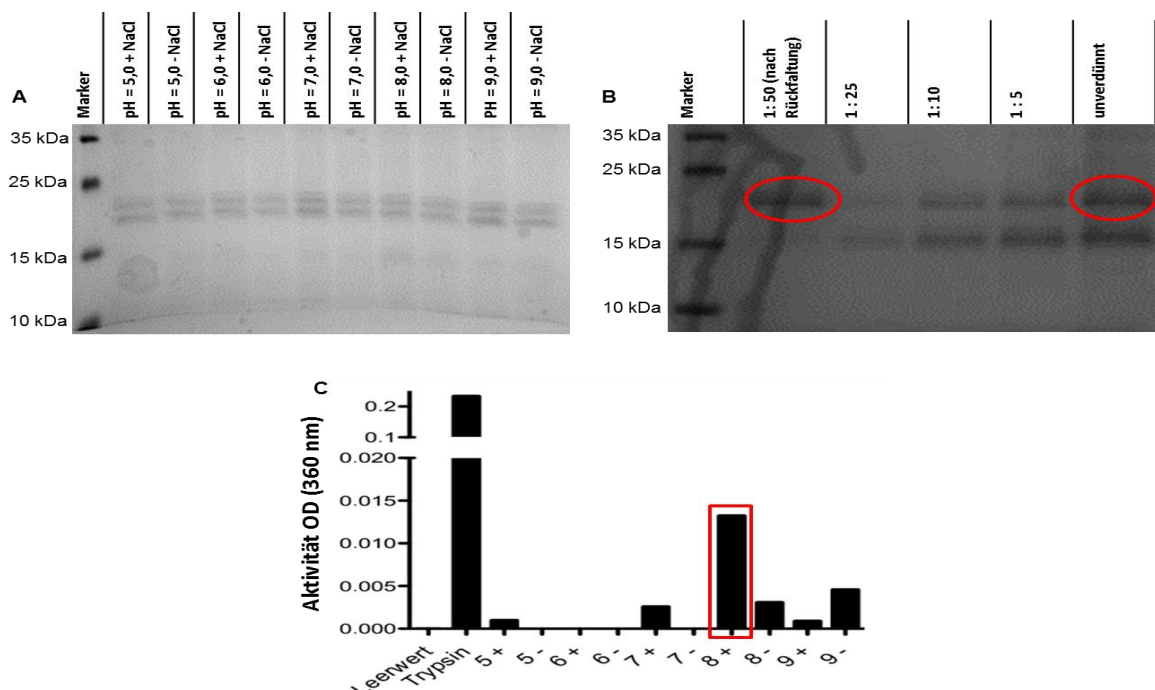


Abbildung 37: Rückfaltung von LysN_{opt} aus denaturierten Einschlusskörperchen

Die denaturierten Einschlusskörperchen wurden in einem 1:50 Verhältnis in den entsprechenden Rückfaltungspuffer injiziert. Nach der kompletten Solubilisierung des Proteins wurde der Ansatz abzentrifugiert und 30 μ l des Überstands auf ein SDS-PAGE aufgetragen (A). Gel B zeigt zurückgefaltetes LysN_{optE157D}. Das Protein wurde von 50 ml auf 1 ml aufkonzentriert. Die Zwischenstufen 1:50, 1:25, 1:10 und 1:5 wurden auf die Spuren des PAGE-Gels aufgetragen, 30 μ l pro Verdünnung. Die rot eingekreiste Bande zeigt LysN_{optE157D}. Bild C zeigt die Aktivität des rückgefalteten Proteins LysN_{optE157D} unter unterschiedlichen pH-Bedingungen und Salzkonzentrationen. + = mit 150 mM NaCl; - = ohne NaCl.

Es ließ sich erkennen, dass in jeder Probe der getesteten Bedingungen eine spezifische Doppelbande von 21 kDa zu erkennen war (Abbildung 37). Der verdünnte Ansatz wurde auf 1 ml Endvolumen aufkonzentriert. Verschiedene Verdünnungsstufen wurden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und per SDS-PAGE analysiert (Abbildung 37, Bild B). Massenspektrometrische Analysen ergaben, dass es sich hierbei um LysN_{optE157D}, bzw. LysN_{opt} handelt (Daten nicht gezeigt). Allerdings ließ sich allein aus dem Ergebnis der SDS-PAGE nicht schließen, ob das Protein in seine native Struktur rückgefaltet wurde und biologische Aktivität aufweist. Um die Aktivität zu überprüfen wurde ein Azocaseintest durchgeführt (siehe Abbildung 37 und Abbildung 38).

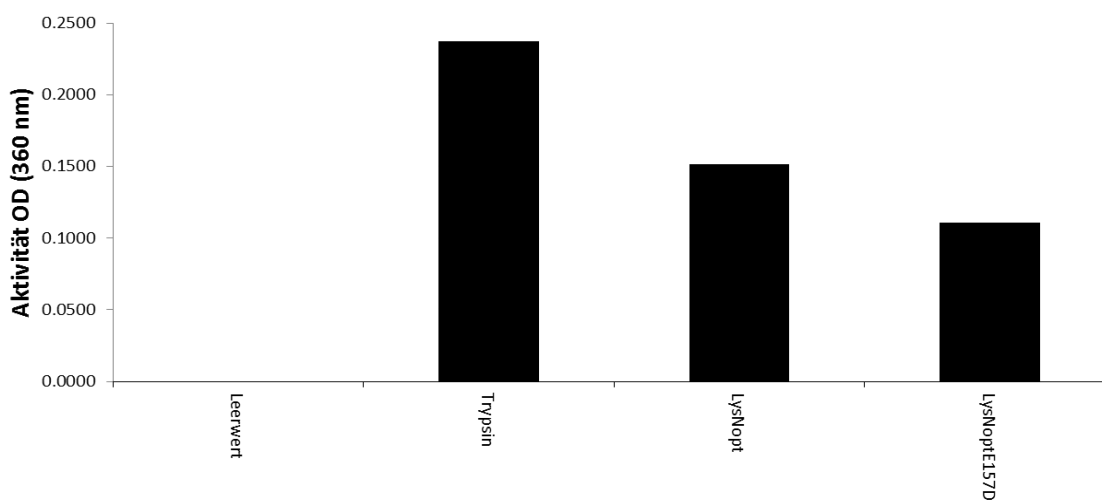


Abbildung 38: Azocaseinassay des rückgefalteten LysN_{opt} und LysN_{optE157D} zur Überprüfung der Aktivität

Gezeigt ist der Azocaseintest der von 50 ml auf 1 ml aufkonzentrierte Fraktion 8+ (pH = 8,0 mit 150 mM NaCl) (rot umrandet, Abbildung 37). Sowohl LysN_{opt}, als auch LysN_{optE157D} wurden auf 1/50 ihres Ausgangsvolumens aufkonzentriert und dann im Azocaseintest untersucht. Jeweils 50 µl (entsprechen 6 µg LysN_{opt} und 9 µg LysN_{optE157D}) des rekombinanten Proteins wurden eingesetzt um 3 mg Azocasein zu verdauen. Als Positivkontrolle wurden 2 µg Trypsin eingesetzt.

Für den Azocaseintest wurden jeweils 50 µl des rückgefalteten Proteins eingesetzt. In Abhängigkeit verschiedener Pufferbedingungen und Salzkonzentrationen zeigte das Protein bei pH = 8,0 in Gegenwart von 150 mM NaCl die höchste Aktivität (Abbildung 37, C, rot markiert). Als Kontrolle wurde Trypsin eingesetzt. Die Aktivität im Vergleich zu Trypsin erhöhte sich, nachdem das zurückgefaltete Protein auf 2 ml aufkonzentriert wurde (Abbildung 38). Die Proteinbestimmung ergab nach dem Aufkonzentrieren 0,13 µg Gesamtprotein für LysN_{opt} und 9 µg Gesamtprotein für LysN_{optE157D}. Nach vier Aufreinigungen wurde mittlere Aktivität der rekombinanten Proteine LysN_{opt} und LysN_{optE157D} ermittelt. Im Vergleich zu Trypsin, dessen Aktivität gleich 100 % gesetzt

wurde, konnte dazu im Vergleich mit LysN_{opt} eine Aktivität von 59,7 % erreicht werden, mit LysN_{optE157D} eine Aktivität von 42,4 %. Von den aufkonzentrierten Fraktionen wurden jeweils Proteinbestimmungen durchgeführt. Dabei ließen sich aus 2 l Bakterienkultur als Ausgangsmaterial nach vier Aufreinigungen im Durchschnitt 2,2 mg LysN_{optE157D} und 0,91 mg LysN_{opt} aufreinigen.

3.6 Verdau von Testproteinen mit LysN_{opt} und LysN_{optE157D}

Nachdem durch den Azocaseintest bewiesen werden konnte, dass die Aktivität der rekombinanten Proteine wieder hergestellt wurde, wurden verschiedene Proteine ausgewählt um zu testen, ob die rekombinanten Proteine dazu in der Lage sind diese zu verdauen. Getestet wurde der Verdau von Casein und Serumalbumin (BSA) (*Bos taurus*), Enolase und Alkohol-Dehydrogenase (*Saccharomyces cerevisiae*), sowie von Ovalbumin (*Gallus gallus*). Dazu wurden 1 mg/ml der Proteine in 50 mM NH₄HCO₃- Puffer angesetzt. Des Weiteren wurde getestet, ob RapiGest für den Verdau benötigt wird.

Abbildung 39 zeigt die Ergebnisse der verdauten Proteine durch LysN_{optE157D}. Es zeigte sich, dass sowohl Casein, als auch BSA komplett durch 5 µg der Metalloprotease verdaut werden konnten. Abbildung 44 zeigt die massenspektrometrischen Daten des Verdaus von BSA und ADH. Dies wurde in beiden Fällen auch durch den Einsatz von 2,5 µg des rekombinanten Proteins erreicht (Casein 1:2 und BSA 1:2). Des Weiteren fiel auf, dass RapiGest als unterstützendes Detergenz nicht notwendig schien, da auch ohne dessen Zugabe die Testproteine umgesetzt werden konnten (Casein 1:1 RapiGest und BSA 1:1 RapiGest). Als Positivkontrolle wurde ein Verdau der Proteine mit 2 µg Trypsin durchgeführt und das verdaute Protein auf eine Spur mit aufgetragen.

30 µg Alkohol-Dehydrogenase (kurz ADH) konnte durch den Einsatz von 2,5 µg LysN_{optE157D} nahezu vollständig verdaut werden, auch ohne die Zugabe von RapiGest. Hingegen konnte Ovalbumin (kurz OVA) nur durch die kombinierte Zugabe von RapiGest und 2,5 µg LysN_{optE157D} verdaut werden (Abbildung 39, Bild B). Allerdings konnte OVA auch durch Trypsin nur verdaut werden, wenn RapiGest zugegeben wurde (Daten nicht gezeigt). Die Spur „Ova Trypsin“ zeigt nur einen geringen Verdau von OVA ohne die Zugabe von RapiGest.

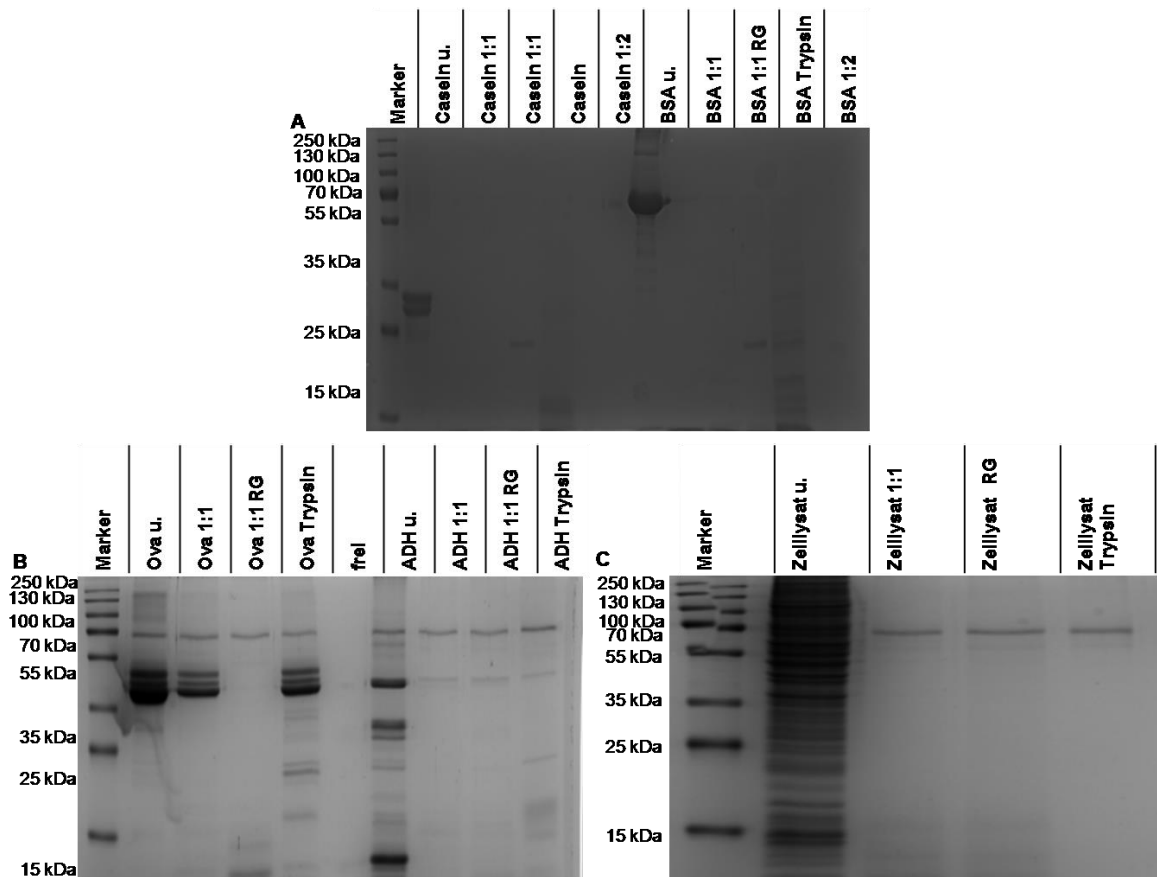


Abbildung 39: Verdauung verschiedener Testproteine und Zelllysats mit LysN_{optE157D}

30 µg einer 1 mg/ml Stocklösung des entsprechenden alkylierten und reduzierten Proteins wurden 16 h bei 37 °C und einem pH-Wert von 8,0 verdaut. 1:1 bedeutet das 5 µg des rekombinanten Proteins zum Proteinverdau eingesetzt wurden. 1:2 bedeutet, dass 2,5 µg des eingesetzt wurden. Das Zelllysats wurde aus RAW309-Zellen ($1 \cdot 10^7$) gewonnen und auf 1 mg/ml eingestellt. U. = unverdaut, RG = RapiGest, BSA = Serumalbumin, OVA = Ovalbumin, ADH = Alkohol-Dehydrogenase. Der gezeigte Versuch ist repräsentativ für vier Proteinaufreinigungen.

Nachdem einzelne Testproteine erfolgreich durch LysN_{optE157D} verdaut werden konnten, wurde im nächsten Schritt eine komplexe biologische Probe durch das rekombinante Protein verdaut. Dazu wurden RAW309 Zellen lysiert und das Lysats einer Proteinbestimmung unterzogen (zur Probenvorbereitung siehe 2.2.7). Im Folgenden wurde das Zelllysats behandelt wie im Falle der Testproteine beschrieben. Der Verdau erfolgte 16 h bei 37 °C mit 15 µg LysN_{optE157D}. Das Zelllysats konnte ohne die Zugabe von RapiGest nahezu komplett verdaut werden (Abbildung 39, Bild C). Die Ergebnisse zeigen, dass LysN_{optE157D} nicht nur enzymatisch aktiv ist, sondern auch dazu in der Lage ist, komplexe biologische Proben zu verdauen. Damit kommt es als potentieller Kandidat zur Probenvorbereitung von Zelllysats für massenspektrometrische Analysen in Frage. Analoge Ergebnisse wurden durch den Verdau mit LysN_{opt} erzielt (Daten nicht gezeigt).

3.7 Bestimmung des optimalen Enzym-Substratverhältnis

Durch die Ermittlung des optimalen Enzym-Substratverhältnis sollte bestimmt werden, wie viel rekombinantes Enzym benötigt wird, um eine definierte Menge Substrat (BSA) in einem festgesetzten Zeitraum umzusetzen.

Obwohl gezeigt werden konnte, dass die rekombinanten Metalloendopeptidasen nur 4-6 h benötigen um BSA komplett zu verdauen (3.8.2), wurde zur Bestimmung der limitierenden Enzymkonzentration, die benötigt wird um das Testprotein BSA komplett zu verdauen, ein 16 h Ansatz gewählt. Hierdurch sollte sichergestellt werden, dass unverdautes Protein nur von mangelnder Enzymkonzentration und nicht aufgrund einer zu kurzen Inkubationszeit herrührt. Das BSA wurde, wie in 3.6 (ohne Zugabe von RapiGest) beschrieben, vorbereitet und verdaut. Die rekombinanten Metalloendopeptidasen wurden mittels einer Proteinbestimmung auf ihre Konzentration hin untersucht.

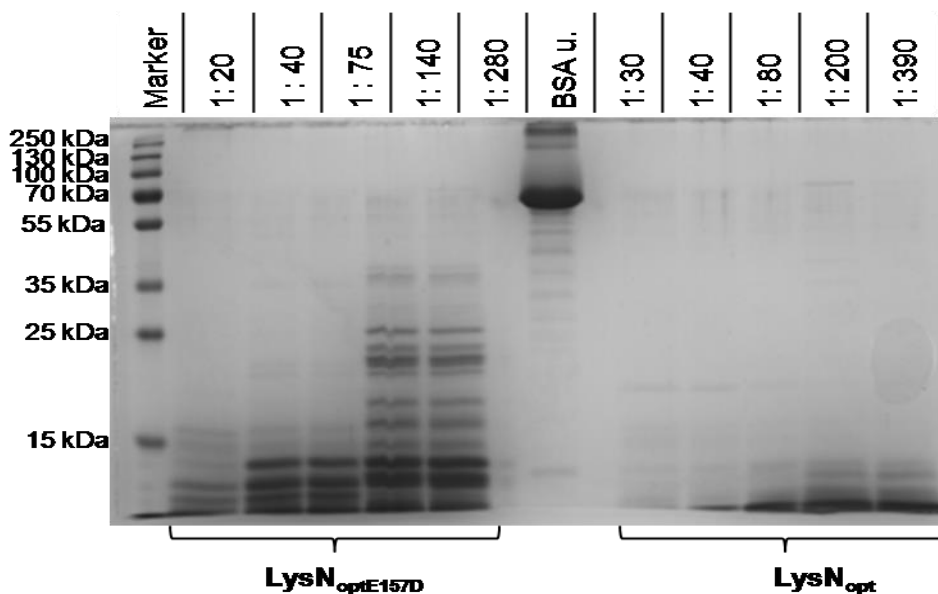


Abbildung 40: Bestimmung des Enzym-Substratverhältnisses der rekombinanten Metalloendopeptidasen zum Testprotein BSA

50 µg BSA wurden 16 h bei einem pH-Wert von 8,0 mit unterschiedlichen Konzentrationen des zurückgefalteten LysN_{opt} und LysN_{optE157D} mit folgenden Mengen verdaut: 15 µl, 10 µl, 5 µl, 2 µl und 1 µl. Zuvor wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Als Kontrolle wurde unverdautes BSA aufgetragen. Der gezeigte Versuch ist repräsentativ für vier Proteinaufreinigungen.

Laut Proteinbestimmung entsprachen 1 µl des aufgereinigten LysN_{opt} 0,128 µg, woraus sich die angegebenen Enzym/Substratverhältnisse ergaben (Abbildung 40). LysN_{opt} ist also in der Lage in einem Verhältnis von 1:390 das Substrat nahezu komplett umzusetzen. Für LysN_{optE157D} ergab die Proteinbestimmung 0,18 µg/µl. Trotzdem musste LysN_{optE157D} mengenmäßig deutlich stärker eingesetzt werden als LysN_{opt} um gleiche,

bzw. ausreichende Mengen an Substrat umzusetzen. In einem Verhältnis von ca. 1:100 konnte LysN_{optE157D} das Substrat in fast gleicher Menge umsetzen wie LysN_{opt}.

Nach vier Proteinaufreinigungen war deutlich zu erkennen, dass LysN_{opt} innerhalb eines definierten Zeitpunkts in geringeren Konzentrationen als die mutierte Protease LysN_{optE157D} gleich viel Substrat umsetzen kann. Wurde der Einsatz von LysN_{optE157D} erhöht, konnte das Substrat ebenfalls komplett umgesetzt werden.

3.8 Optimierung der Bedingungen für den Einsatz von LysN_{opt} und LysN_{optE157D} in proteolytischen Verdaus

3.8.1 Aktivität in Gegenwart von denaturierendem Agens und unterschiedlichen pH-Werten

LysN ist bei Temperaturen um 4 °C noch aktiv, darüber hinaus besitzt es eine ungewöhnliche Stabilität gegenüber Detergenzien¹³⁴. Diese Eigenschaft macht es als Enzym für proteolytische Verdaus besonders interessant, da einige Puffer SDS und andere Detergenzien enthalten, oder denaturierendes Agens wie Harnstoff. Diese müssen durch komplizierte Dialyseschritte, oder Umpufferungen entfernt werden, bevor Enzyme zugesetzt werden können. Dabei kann jeder zusätzliche Schritt zu Verlust von Probenmaterial führen. Weiterhin wurde für LysN eine Aktivität in pH-Werten von 6-10 beschrieben, mit einem Aktivitätsmaximum im basischen Bereich von 8- 9,5^{137;183}. Um zu überprüfen, ob das selbst aufgereinigte LysN_{opt}, sowie die Mutation LysN_{optE157D} unter den genannten Bedingungen aktiv ist, wurde seine Aktivität in Anwesenheit von Harnstoff (Urea) getestet, sowie in steigenden pH- Wertbereichen. Darüber hinaus sollte bestimmt werden, welcher pH- Wert die günstigste Bedingung für den proteolytischen Verdau mit LysN_{opt} und LysN_{optE157D} darstellt. Da sich 1:100 als günstiges Enzym/Substratverhältnis erwies, wurde diese Konzentration für die Ansätze gewählt. Als Kontrolle wurde jede Bedingung zusätzlich durch gekauftes, hochaufgereinigtes LysN (LysN_{rek}) verifiziert. LysN_{opt} und LysN_{rek} konnten BSA auch noch in Anwesenheit von 5 M Harnstoff nahezu komplett verdauen (Abbildung 41, Bild A) Im Gegensatz dazu, konnte LysN_{optE157D} BSA nur in Anwesenheit von maximal 3 M Harnstoff komplett verdauen. BSA wird zwar auch noch bei 4 M und 5 M Harnstoff verdaut, allerdings sind noch einige größere Proteinfragmente vorhanden, die nicht verdaut werden konnten (Abbildung 41, Bild B).

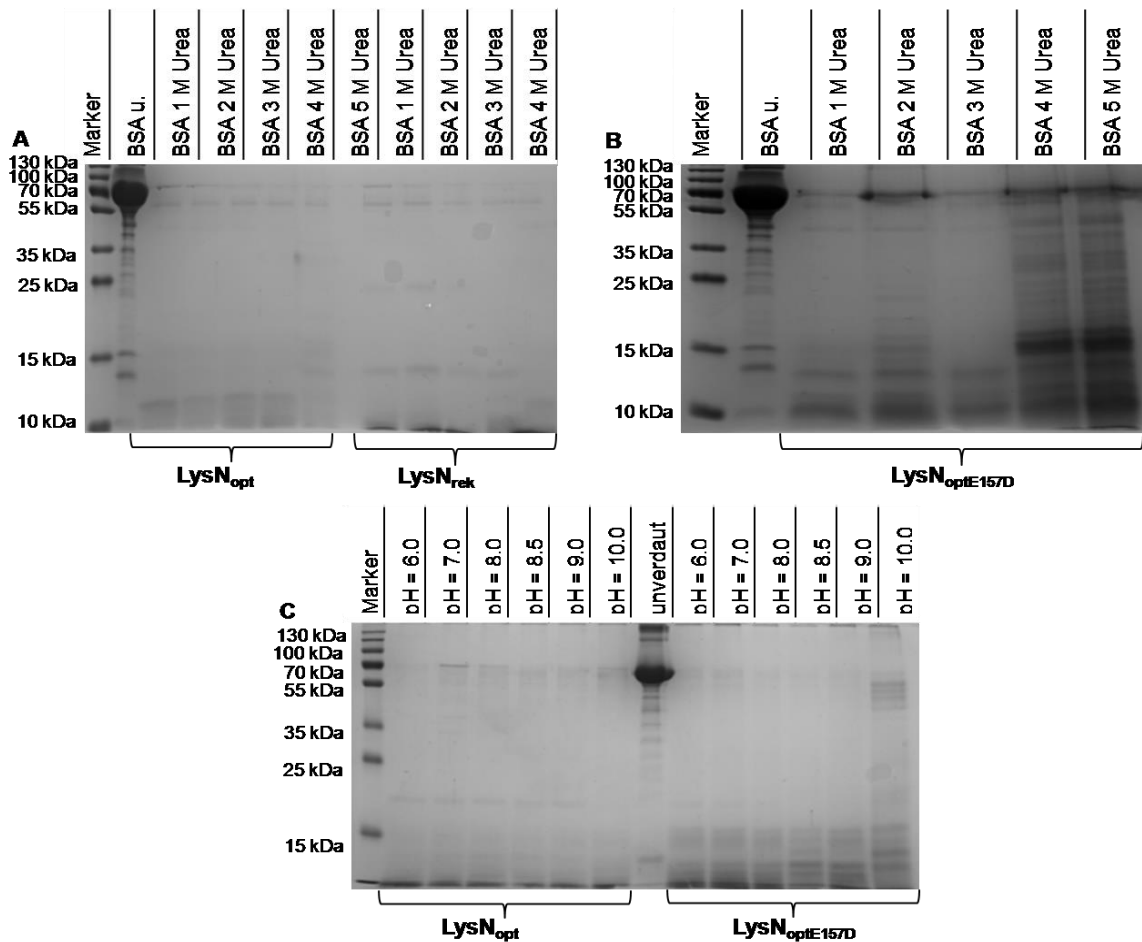


Abbildung 41: Verdau von Serumalbumin (BSA) durch LysN_{opt} und LysN_{optE157D} in Anwesenheit von Harnstoff sowie unterschiedlichen pH-Werten

Das gefärbte SDS-PAGE Gel (A) zeigt den 16 h Verdau von 100 µl BSA (1 mg/ml) durch LysN_{opt} und kommerziell erworbenen LysN (LysN_{rek}). Dabei wurden den Ansätzen Harnstoff von 1 M bis 5 M hinzugesetzt. Gel B zeigt den Verdau von BSA durch LysN_{optE157D}, ebenfalls mit zugesetztem Harnstoff von 1 M – 5 M. Eingesetzt wurden jeweils 1 µg. Gel C zeigt den Verdau von 100 µl BSA (1 mg/ml) durch die rekombinanten Proteine unter unterschiedlichen pH-Wert Bedingungen (pH 6,0 – 10,0). Als Kontrolle wurde unverdautes BSA mitgeführt. Urea = Harnstoff.

Des Weiteren konnte bewiesen werden, dass die rekombinanten Proteine BSA in einem pH- Wert Bereich von 6,0 – pH 10,0 ihr Substrat nahezu komplett verdauen. Dabei weist LysN_{optE157D} eine geringfügig verminderte Aktivität auf, erkennbar an der Anwesenheit niedermolekularer Fragmente auf dem gefärbten SDS-PAGE Gel (Abbildung 41, Bild C).

Die Ergebnisse konnten in drei getrennten Experimenten nach vier Proteinaufreinigungen bestätigt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass das selbst aufgereinigte rekombinante Protein über die gleichen Eigenschaften verfügt wie das kommerziell erworbene. Die Aktivität in Gegenwart von Harnstoff, sowie über einen großen pH-Bereich hinweg aktiv zu sein, machen die rekombinanten Proteine für proteolytische Verdau wertvoll.

3.8.2 Bestimmung des optimalen Zeitpunktes für den Verdau von Proteinen mittels LysN_{opt} und LysN_{optE157D}

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die rekombinanten Proteine über einen großen pH-Bereich aktiv sind und auch in Gegenwart von 5 M Harnstoff noch Substrat verdauen können, sollte die Zeit bestimmt werden, die die rekombinanten Proteine benötigen um ihr Substrat zu verdauen. Dazu wurde BSA mit LysN_{opt}, bzw. LysN_{optE157D} verdaut und verschiedene Zeitwerte entnommen. Die Enzymaktivität wurde durch Zugabe von 10 % Ameisensäure und sofortiges einfrieren bei – 80 °C abgestoppt. Von jedem Zeitwert wurden 30 µl für eine SDS-PAGE verwendet.

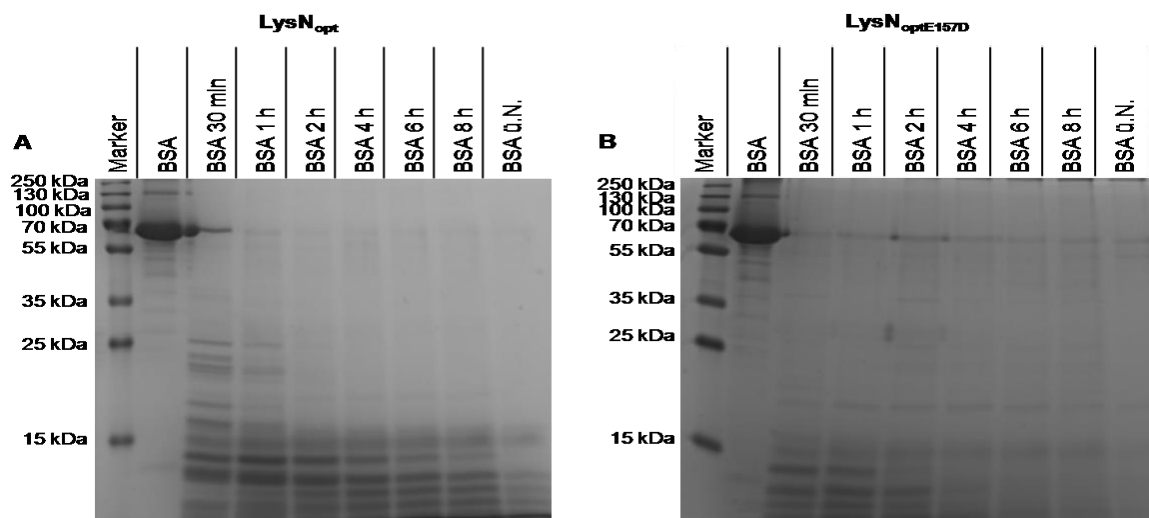


Abbildung 42: Zeitwerte des Verdau von BSA durch LysN_{opt} und LysN_{optE157D}

Insgesamt wurden 800 µg BSA mit 10 µg LysN_{opt}, bzw. LysN_{optE157D} bei einem pH-Wert von 8,0 verdaut. Nach jeweils 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und einem über Nacht (ü.N.) Wert wurde die enzymatische Reaktion abgestoppt. 30 µl des Ansatzes wurden pro Spur geladen. Unverdautes BSA diene als Kontrolle. Der gezeigte Versuch ist repräsentativ für vier Proteinaufreinigungen.

Die Ergebnisse zeigten, dass schon nach 30 min ein Großteil des BSA verdaut wurde, allerdings noch einige Peptidfragmente unverdaut waren (Abbildung 42). Im Fall von LysN_{optE157D} (Bild B) waren 2 h nach Zugabe des Enzyms nur noch wenige Fragmente im unteren Bereich des Gels nachzuweisen. 4 h nach Zugabe des Enzyms waren kaum noch Fragmente erkennbar, was bedeutet, dass LysN_{optE157D} ca. 4 h benötigt um BSA komplett zu verdauen. Im Vergleich dazu weist LysN_{opt} eine geringere Aktivität auf, weil auch 8 h nach Zugabe des Enzyms immer noch einige Fragmente im unteren Bereich des Gels zu erkennen waren. Allerdings blieben diese Fragmente auch 2 h bis 8 h nach Zugabe des Enzyms unverändert. Erst bei der ü.N. Inkubation mit dem Enzym, waren diese Fragmente nicht mehr erkennbar. Nach vier Aufreinigungen konnte auch für LysN_{opt} nachgewiesen werden, dass 4 h für den kompletten Verdau eines Substratproteins ausreichend waren.

3.9 Inhibition der Aktivität durch EDTA und DTT

Die Aktivität von LysN_{opt} und LysN_{optE157D} konnte durch EDTA und DTT inhibiert werden. EDTA ist ein Komplexbildner der stabile Chelatkomplexe mit zweiwertigen Metallionen bildet. In der Biochemie wird es als Inhibitor für Metalloproteasen eingesetzt, da es durch Komplexbildung der Metallionen im aktiven Zentrum der Protease deren Aktivität inhibiert¹⁸⁴.

Des Weiteren konnte eine Inhibition der Aktivität der Metalloendopeptidasen durch Dithiothreitol (DTT) beobachtet werden. DTT kann mit seinen beiden Thiolgruppen das Zinkion im aktiven Zentrum des Enzyms komplexieren. Des Weiteren reduziert DTT die Disulfidbrücken innerhalb der Proteine, wodurch deren Faltung und Struktur zerstört werden¹⁸⁵. Es wird u.a. während der Probenvorbereitung für massenspektrometrische Analysen eingesetzt. Die Disulfidbrücken der Testproteine wurden vor der massenspektrometrischen Untersuchung durch DTT reduziert und anschließend durch IAA irreversibel alkyliert. Um die Wirkung von IAA abzustoppen, wurde nach dessen Inkubationszeit erneut DTT zugesetzt. Proteine, die so vorbereitet wurden, konnten durch LysN_{opt} und LysN_{optE157D} nicht als Substrat umgesetzt werden. Veranschaulicht wurde dies durch eine SDS-PAGE (nicht gezeigt) und eine Messung der Aktivität in Gegenwart von DTT, bzw. EDTA (Abbildung 43).

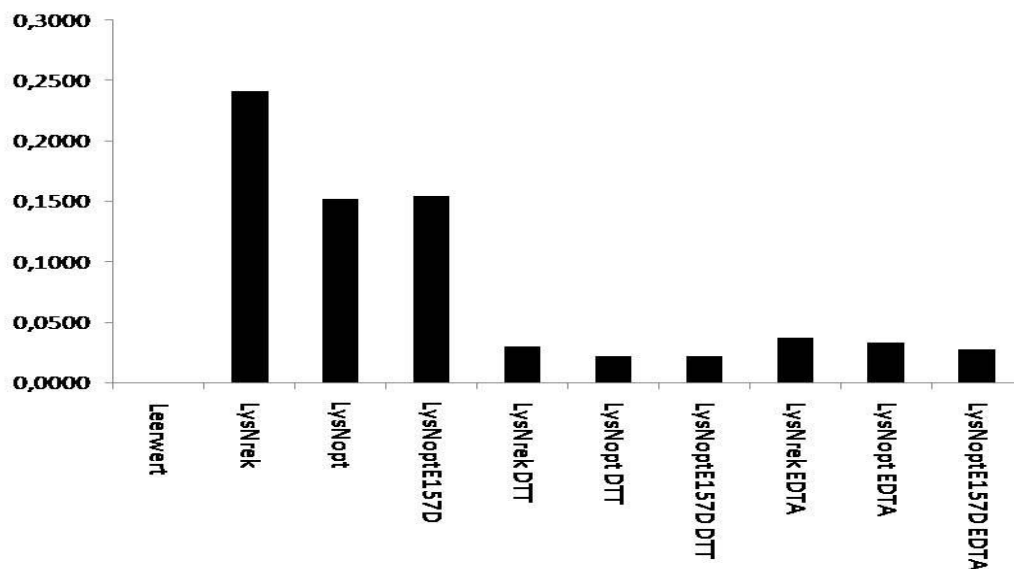


Abbildung 43: Verminderte Aktivität von LysN_{opt} und LysN_{optE157D} in Gegenwart von DTT, bzw. EDTA

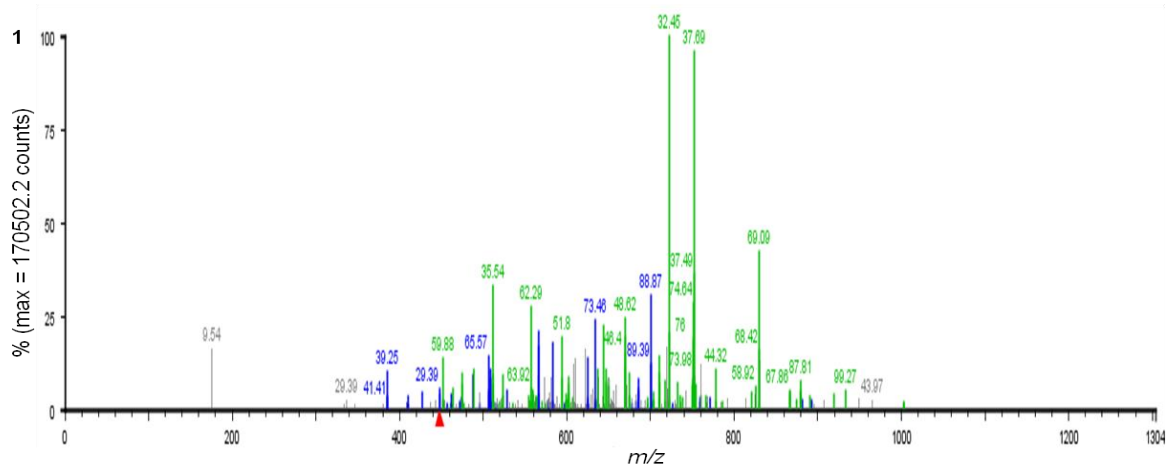
Die Metalloendopeptidasen wurden 30 min mit 10 mM DTT, bzw. 5 mM EDTA inkubiert. 3 mg Azocasein wurden mit 4 µg LysN_{opt}, bzw. 7 µg LysN_{optE157D} für 45 min bei 37 °C verdaut. Als Kontrolle wurde kommerziell erworbenes LysN (LysN_{rek}) mitgeführt. Des Weiteren wurde Azocasein mit nicht inhibierten rekombinanten Metalloproteasen verdaut. Der gezeigte Versuch ist stellvertretend für vier Proteinaufreinigungen und konnte dreimal reproduziert werden.

Sowohl EDTA, als auch DTT übten einen stark inhibitorischen Effekt auf die Aktivität der Metalloproteasen aus. Von EDTA war diese Wirkung bereits bekannt, von DTT in dieser Art nicht. Auffällig ist, dass besonders das hochaufgereinigte, erworbene LysN äußerst sensitiv auf die beiden Inhibitoren reagiert. Dessen Aktivität ist in der Gegenwart der Inhibitoren ein Fünffaches geringer.

3.10 Ermittlung der Spezifität von LysN_{opt} und LysN_{optE157D}

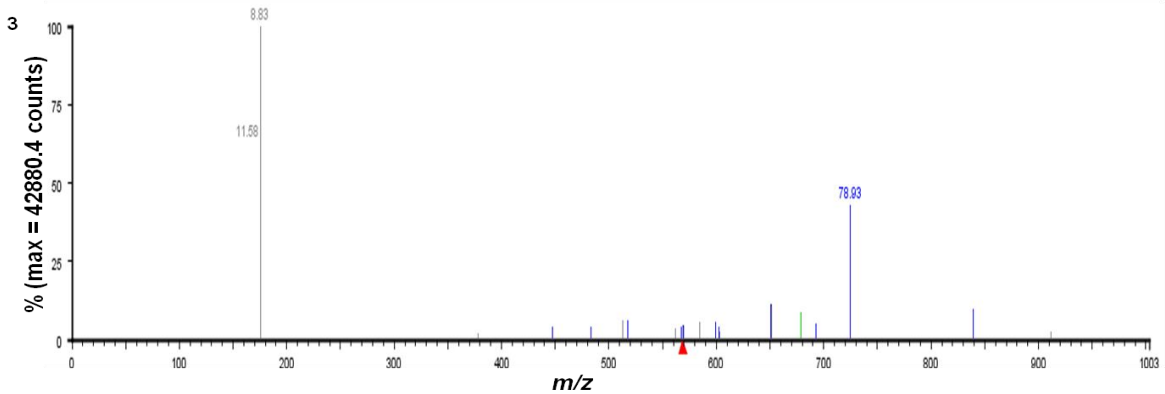
Nachdem sowohl in LysN_{opt}, als auch LysN_{optE157D} nach der Rückfaltung die Aktivität wieder hergestellt wurde, sollte zum einen Spezifität von LysN_{opt} und LysN_{optE157D} ermittelt werden und zum anderen getestet werden, wie erfolgreich sich die beiden Enzyme im Zuge proteolytischer Verdauung einsetzen lassen. (Abbildung 44) zeigt die MS-Auswertung des proteolytischen Verdauungsproduktes von BSA und der Alkohol-Dehydrogenase durch LysN_{optE157D}. Casein, Ovalbumin und Enolase wurden ebenfalls massenspektrometrisch analysiert, jeweils wurde eine Sequenzabdeckung von mindestens 30 % erreicht.

Die Auswertung der massenspektrometrischen Daten der Peptide von BSA die durch LysN_{opt}, bzw. LysN_{optE157D} generiert wurden ergab, dass fast jedes der gefundenen Peptide der Sequenz von BSA zugeordnet werden konnte. Dabei wurde eine Sequenzabdeckung von 89 % der insgesamt 601 Aminosäuren umfassenden Sequenz erreicht. Im Falle der ADH konnte eine Sequenzabdeckung von 35 % erreicht werden. Blau unterlegte Peptide konnten dem BSA direkt zugeordnet werden, grün hinterlegte weisen eine Modifikation auf, z.B. eine Phosphorylierung, oder Oxidation, konnten aber ebenfalls BSA zugeordnet werden. Somit ließ sich durch den Einsatz des rekombinanten Proteins fast die gesamte Sequenz des Testproteins abdecken, so dass es in der MS durchaus Anwendung finden kann.



2

1	MKWVTFISLL	LFSSAYSRG	VFRDTHKSE	IAHRFKDLGE	EHFKGLVLIA
51	FSQYLQCCPF	DEHVKLVNEL	TEFAKTCVAD	ESHAGCEKSL	HTLFGDELCK
101	VASLRETYGD	MADCCCKQEF	ERNECFLSHK	DDSPDLPKLK	PDPNTLCDEF
151	KADEKFKFWGK	YLYEIARRHP	YFYAPELLYY	ANKYNGVFQE	CCQAEDKGAC
201	LLPKIETHRE	KVLASSARQR	LRCASIQKFG	ERALKAVSVA	RLSQKFFKAE
251	FVEVTKLVTD	LTKVHKECCH	GDLECCADDR	ADLAKYICDN	QDTISSKLKE
301	CCDKPLLEKS	HCIAEVEKDA	IPENLPLTA	DFAEDKDVCK	NYQEAKDAFL
351	GSFLYEYSRR	HPEYAVSVLL	RLAKEYEATL	EECCAADDPH	ACYSTVFDKL
401	KHLVDEPQNL	IKQNCQFEK	LGEYGFQNAL	IVRYTRKVPQ	VSTPTLVEVS
451	RSLGKVGTRC	CTKPESERMP	CTEDYLSLIL	NRLCVLHEKT	PVSEKVTKCC
501	TESLVNRRPC	FSAITPDETY	VPKAFDEKLF	TFHADICTLP	DTEKQIKKQT
551	ALVELLKHKP	KATEEQLKTV	MENFVAVFDK	CCAADDKEAC	FAVEGPKLVV
601	STQTALA				



4

1	MSIPETQKGV	IFYESHGKLE	HKDIPEVPEK	ANELLINVKY	SGVCHIDLHA
51	WHGDWPLPVK	LPLVGGHEGA	GVVVGGENV	KGWKIGDYAG	IKWLNCSMA
101	CEYCELGNES	NCPHADLSGY	THDGSFOQYA	TADAVQAAHI	PGTDLAQVA
151	PILCAGITVY	KALKSANLMA	GHWVAISGAA	GGLGSLAVQY	AKAMGYRVLG
201	IDGEGKEEL	FRSIGEVFI	DFTKEKDIVG	AVLKATDGGG	HGVINVSVSE
251	AAIEASTRVV	RANGITVLVG	MPAGAKCCSD	VFNQVVKVSI	IVGSYVGNRA
301	DTREALDFFA	RGLVKSPIKV	VGLSTLPEIY	ERMEKQIVG	RYVVDISK

Abbildung 44: MS-1 Spektren und Sequenzabdeckung von Serumalbumin und der Alkoholdehydrogenase

50 µg BSA, bzw. ADH wurden mit 2,5 µg LysN_{optE157D} über Nacht bei 37 °C verdaut. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 mM HCL abgestoppt. Die Probe wurde auf 5 µl lyophilisiert und mit 15 µl 1 % FA verdünnt. Die vorbereiteten Analyten wurden durch die HPLC aufgetrennt und die eluierenden Peptide durch das Massenspektrometer analysiert. Bild 1 zeigt das Übersichtsmassenspektrum (MS1), Bild 2 zeigt die komplette Sequenz von BSA. Die Bilder 3 und 4 zeigen das MS-1 Spektrum und die sequenzabdeckung der ADH. Farblich markiert sind die Peptide, die während der massenspektrometrischen Messung identifiziert und der BSA-, bzw. ADH Sequenz zugeordnet werden konnten.

Im Folgenden wurde die Sequenz der generierten Peptide des BSA-Verdau analysiert, um die Spezifität der rekombinanten Proteasen zu ermitteln. Dabei wurden nur Peptide berücksichtigt, denen vom PLGS-Auswerteprogramm einen Wert von > 25 zugewiesen wurde.

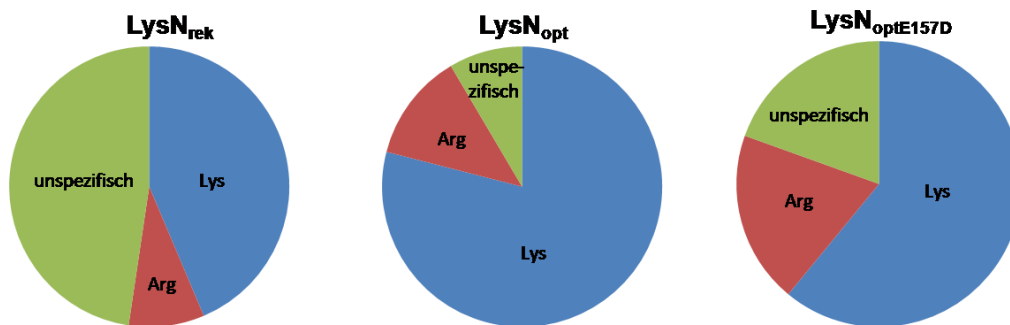


Abbildung 45: Spezifität der rekombinanten Metalloendopeptidasen LysN_{opt} und LysN_{optE157D} im Vergleich zu LysN_{rek}

Die Kreisdiagramme zeigen die generierten Peptide des BSA-Verdau (= 100 %). Dabei sind die Schnittstellen der Peptide, die von den rekombinanten Proteinen erkannt wurden anteilmäßig dargestellt. Blau hinterlegt sind die erkannten Lys-Schnittstellen, rot unterlegt sind die erkannten Schnittstellen für Arg. Grün markiert Peptide, die durch unspezifische Schnittstellen generiert wurden.

Im Vergleich zu kommerziell erworbenen LysN_{rek} wies das aufgereinigte LysN_{opt} eine deutlich höhere Spezifität für Lysine auf (Abbildung 45). Ausgehend von allen generierten Peptidfragmenten wurden lediglich 43,5 % N-terminal von Lys durch LysN_{rek} geschnitten, hingegen 79 % im Falle von LysN_{opt}. Der Anteil von Peptiden die N-terminal von Arg geschnitten wurden liegt bei 12,5 % (LysN_{opt}) und 8,7 % (LysN_{rek}). Im Vergleich dazu weist der BSA- Verdau durch LysN_{rek} einen deutlich höheren Anteil an Peptiden auf, die unspezifisch generiert, also weder N-terminal von Lys noch von Arg geschnitten wurden. Für LysN_{rek} waren dies 47,8 %, für LysN_{opt} lediglich 8,5 % der Peptide. Die Anzahl an Peptiden die N-terminal von Arg geschnitten wurden stieg im Fall des Verdau durch LysN_{optE157D} auf 19 % von allen generierten Peptiden. 59,5 % der Peptide wurden N-terminal von Lys geschnitten und 21,5 % unspezifisch. Somit ließen sich durch den Einsatz von LysN_{optE157D} vermehrt Peptide generieren, die N-terminal von Arg geschnitten wurden. Somit hat die mutierte Peptidase neben der ursprünglichen Spezifität (Lys) auch die Fähigkeit Arginin zu erkennen und N-terminal von diesem zu schneiden. Dadurch konnte bewiesen werden, dass die Punktmutation an Position 157 zu der vermuteten, veränderten Spezifität führt, auch wenn Lys und Arg nicht in gleichen prozentualen Anteilen erkannt wurden.

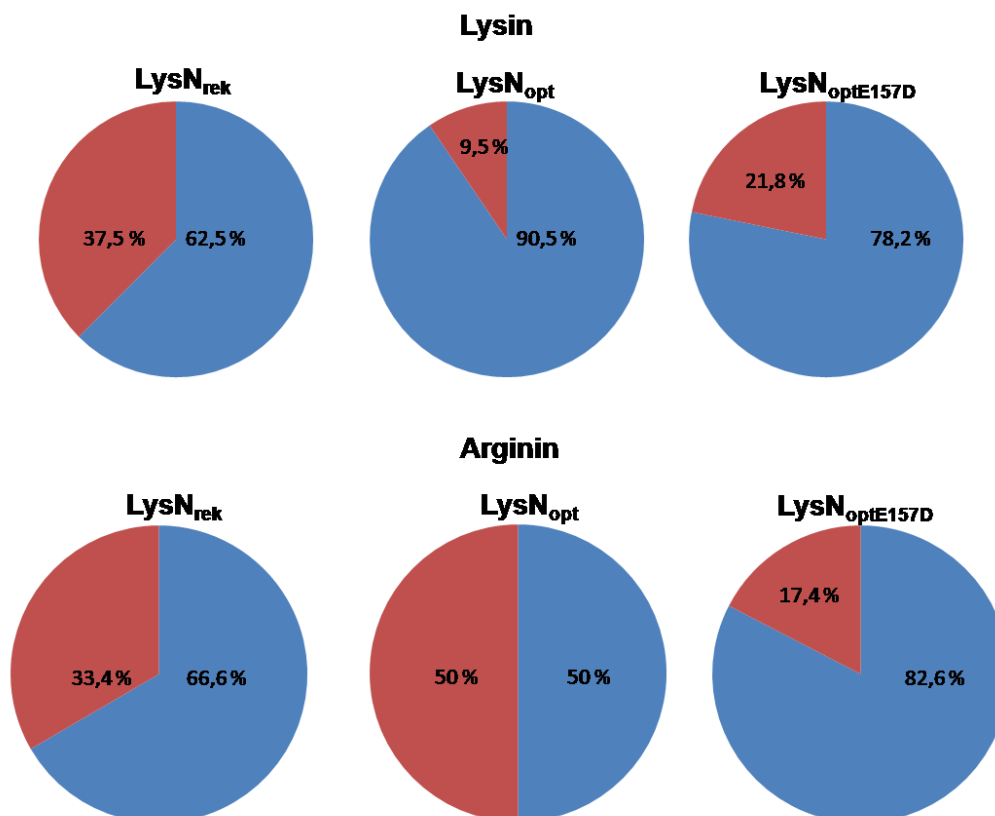


Abbildung 46: Erkante und ausgelassene Schnittstellen der rekombinanten Metalloendopeptidasen im Vergleich zu LysN_{rek}

Im Zuge des BSA-Verdau generierte Peptide wurden nach Schnittstellen durchsucht, die nicht erkannt wurden und mit den Schnittstellen verglichen, die erkannt wurden. Blau bedeutet, dass die entsprechende Schnittstelle erkannt wurde, rot hingegen, dass sie ausgelassen wurde. Die Werte sind in Prozent angegeben. Die oberen Diagramme beziehen sich auf Lysine, die unteren auf Arginine.

Des Weiteren wurde überprüft, ob LysN_{opt} und LysN_{optE157D} jede Schnittstelle innerhalb des BSA Proteins erkennen, bzw. wie viele Schnittstellen nicht erkannt, oder übersprungen wurden (Abbildung 46). Die Gesamtheit der Arginine und Lysine wurde ausgezählt und gleich 100 % gesetzt.

Zunächst wurden die generierten Peptide nach Lys-Resten durchsucht, die nicht erkannt wurden. Im Fall von LysN_{opt} wurden 90,5 % aller vorkommenden Lysine im BSA Protein als Schnittstelle erkannt, lediglich 9,5 % der Lysine wurden nicht geschnitten. 78,2 % der Lysine wurden erkannt, wenn BSA durch LysN_{optE157D} geschnitten wurde, während 21,8 % unerkannt blieben. Wurde hingegen LysN_{rek} eingesetzt, blieben 37,5 % aller Lysine unerkannt, oder wurden nicht geschnitten, lediglich 62,5 % wurden als Schnittstelle erkannt. Dann wurden die gleichen Peptide nach unerkannten Argininen durchsucht. Im BSA-Verdau durch LysN_{opt} wurden 50 % aller Arginine nicht als Schnittstelle erkannt. Immerhin 82,6 % aller Arginine wurden als Schnittstelle durch LysN_{optE157D} erkannt, was wiederum die veränderte Spezifität des mutierten Proteins bestätigt.

Wurde vergleichend dazu LysN_{rek} eingesetzt, wurden interessanterweise 66,6 % aller Arginine als Schnittstelle erkannt und genutzt, obwohl für LysN_{rek} lediglich eine Spezifität für Lysine beschrieben ist. Ebenso wurden Enolase, Casein, ADH und Ova massenspektrometrisch untersucht. Jeweils konnten Peptide der entsprechenden Aminosäuresequenz zugeordnet werden (nicht gezeigt).

Durch SDS-PAGE-Analysen konnte gezeigt werden, dass ca. 4-6 h notwendig sind, um Testproteine nahezu komplett zu verdauen. Im Zuge der massenspektrometrischen Analyse verstopften diese Probenansätze jedoch durch unverdaute Proteinfragmente die C₁₈-Säule innerhalb der HPLC. Deshalb wurden Proteinansätze, die 4-6 h mit den rekombinanten Metalloproteasen verdaut wurden, durch C₁₈-Säulchen vorgereinigt bevor sie auf die HPLC gegeben wurden. Dadurch wurden große, unverdaute Proteinfragmente aus dem Ansatz entfernt. Andererseits gab es durch diesen zusätzlichen Aufreinigungsschritt deutliche Verluste in der Ausbeute an detektierten Peptiden. Deshalb sollten Proteinverdau für massenspektrometrische Analysen mindestens 16 h durchgeführt werden, um einen kompletten Verdau des Ansatzes zu gewährleisten und darüber hinaus eine optimale Ausbeute zu garantieren.

3.9 DALIS

3.9.1 Durchflusszytometrische Analyse der BMDCs

Die durchflusszytometrische Analyse diente zur Überprüfung der Aktivierung der verwendeten BMDCs. Da es schnell zur Aktivierung von BMDCs kommt, wurden sie präventiv vor jedem Experiment durchflusszytometrisch auf Aktivierungsmerkmale hin überprüft, wobei die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 bestimmt wurde (siehe auch Abbildung 48). Überschritten die Werte für CD80 eine mittlere Fluoreszenzintensität von 2,6 wurden die Zellen als voraktiviert angesehen und nicht mehr für das Experiment verwendet. Für CD86 lag der Grenzwert bei 6,3. In LPS stimulierten (20 h, 100 ng/ml) Zellen liegt der Wert der mittleren Fluoreszenzintensität für CD80 bei ca. 10,5 und der für CD86 bei 33,5. Da BMDCs aus Knochenmark isoliert wurden, wurden u.a. auch Granulozyten, Makrophagen, Monozyten oder Fibroblasten isoliert. Ist die zelluläre Verunreinigung zu groß, kann es zu verfälschten Ergebnissen kommen. Aus diesem Grund wurde vor jedem Experiment die Reinheit der Kultur bestimmt. Als Marker diente das Oberflächenintegrin CD11c. Es wird auf allen BMDCs exprimiert und kann somit als Marker für die Reinheit der Kultur dienen. Die Anzahl der CD11c positiven Zellen sollte mindestens 80 % betragen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit BMDC-Kulturen gearbeitet, die eine Reinheit von 80-95 % besaßen. Schließlich wurde noch die Vitalität der BMDCs mit dem Totfarbstoff Propidium-Iodid bestimmt. Der Farbstoff ist nicht membrangängig, somit wurden nur tote Zellen durch den Farbstoff angefärbt. Für die FACS-Analyse wurden nur Zellen aufgenommen, die CD11c positiv und PI-negativ waren. Somit konnte sichergestellt werden, dass nur lebende BMDCs untersucht wurden (Abbildung 47).

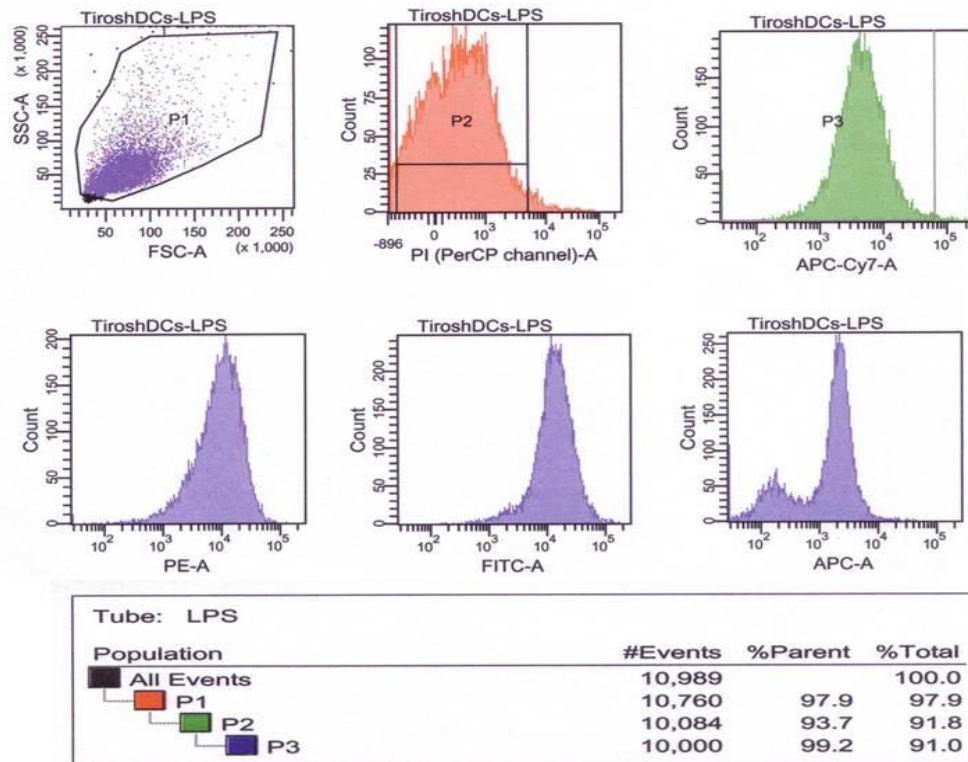


Abbildung 47: Reinheitsbestimmung der BMDCs und Analyse ihres Aktivierungszustandes

P1 wurde auf die Zellpopulation gesetzt. In P2 (Histogramm, rot) wurden nur lebende Zellen berücksichtigt (PI-Färbung). P3 (grünes Histogramm) wurde so eingestellt, dass nur CD11c-positive Zellen, also BMDCs gemessen wurden. Schließlich wurden die so charakterisierten BMDCs auf ihre Oberflächenmoleküle CD80, CD86 und MHCII hin analysiert (Untere Reihe der Histogramme, blau gefärbt). Das untere Bild zeigt die Hierarchie der gesetzten Populationen P1-P3. Im Falle von P2 sind 93,7 % der lebenden Zellen BMDCs, was 91,8 % der gesamten aufgenommenen Events entspricht. Unter den Histogrammen sind die jeweiligen Fluorochrome angezeigt (siehe 2.2.4.1 und Tabelle 7).

Durch die Stimulation der TLRs kommt es zur Aktivierung der BMDC. Daraufhin ändert sich das Expressionsprofil der Oberflächenmoleküle. Zur Stimulation der TLRs wurde hier ausschließlich der TLR4-Ligand LPS aus *Salmonella typhimurium* genutzt. Für die Experimente wurden die Zellen wie in 2.2.4 und 2.2.5 beschrieben behandelt und an Tag 7 mit 100 ng/ml LPS für 20 h stimuliert. Nach erfolgter Stimulation wurden die Zellen im Durchflusszytometer auf die Expression ihrer Oberflächenmoleküle hin untersucht. Dabei konnte eine deutliche Hochregulierung der Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 beobachtet werden. Die Expression der MHCII-Moleküle war ebenfalls erhöht (Abbildung 48) Die Ergebnisse decken sich weitestgehend mit den von Fassbender erfassten Daten⁸⁶. Zur Bestimmung der Expression der Oberflächenmoleküle wurde die Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) der Durchflusszytometrie-Daten der CD11c-positiven Zellpopulation für die Auswertung gewählt.

Für die Untersuchung von DALIS wurden nur CD11c-positive Zellen herangezogen, in denen die Expression CD80 und CD86 hoch reguliert war. Somit konnte sichergestellt werden, dass die Zelle erfolgreich aktiviert werden konnte und es somit zur Ausbildung von DALIS kommt. Da sich BMDCs betreffend ihrer Aktivierung und Grundexpression der Oberflächenmoleküle in jedem Experiment unterschiedlich verhalten, wurde in jeder Messung ein Kontrollwert mitgenommen. Dieser entspricht reifen, nicht aktivierten BMDCs und wird als „Medium“ bezeichnet. Dieser Kontrollwert wurde für jedes Molekül gleich eingesetzt. Durch diesen normalisierten Wert wurde die Veränderung der Expression durch die LPS-Induktion bestimmt. Für die Makrophagenzelllinie musste keine durchflusszytometrische Bestimmung durchgeführt werden, da ihre Aktivierung erst durch LPS erfolgen kann und nicht im Zuge ihrer Kultivierung.

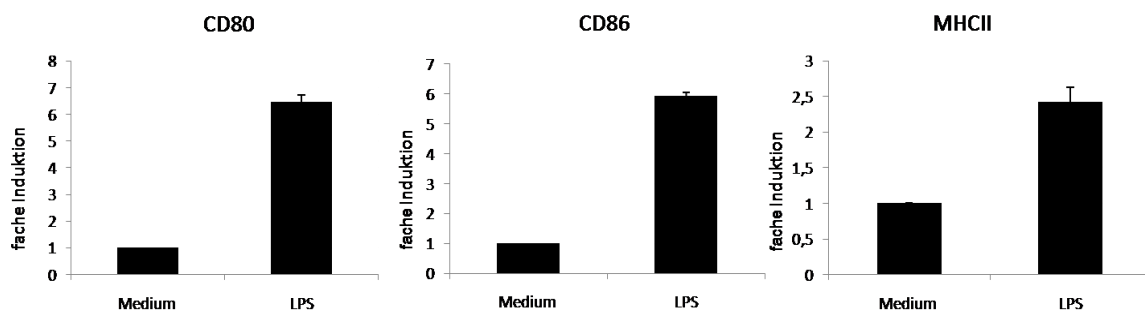


Abbildung 48: Expression der Oberflächenmoleküle in LPS-stimulierten BMDCs im Vergleich zu unstimulierten Zellen.

1×10^6 reife BMDCs wurden in 3 ml TM5- Medium kultiviert und mit 100 ng/ml LPS für 20 h aktiviert, bzw. nicht aktiviert (Medium). 200.000 Zellen wurden in 200 μ l FACS-Puffer mit den entsprechenden Antikörpern für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach zwei Waschschritten wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die Expression der Oberflächenmoleküle CD80 und CD86, sowie die Expression von MHCII. Dabei wurden nur PI-negative und CD11c positive Zellen in der Darstellung berücksichtigt. Der Mediumwert wurde auf 1 normalisiert und die Induktion der Oberflächenmoleküle durch Division des entsprechenden Mediumwertes berechnet. Die dargestellten Graphen sind repräsentativ für vier Experimente.

3.9.2 Bildung von polyubiquitylierten Proteinaggregaten im Verlauf der Aktivierung von DCs und Makrophagen

DCs und Makrophagen bilden vom Zeitpunkt der Antigenaufnahme, bis hin zur komplett aktivierten Zelle im Zytosol transiente Aggregate, die sich aus polyubiquitylierten Proteinen zusammensetzen. Die zunächst kleinen Aggregate treten frühestens 4 h nach Stimulation der Zelle im Zytosol auf und fusionieren zu größeren Ansammlungen um nach 12-15 h ihre maximale Größe zu erreichen. Danach verkleinern sich die Aggregate um schließlich nach ca. 24 h–30 h komplett zu verschwinden. Dieses Phänomen der DALIS-

Bildung wurde erstmals von Lelouard beobachtet und beschrieben³⁸. Hieraus ergab sich die Annahme, dass DALIS als eine Art Antigenreservoir fungieren können. Unterstützend konnte Silvia Herter nachweisen, dass ein Peptid des Influenza-Virus nach Infektion auf der Zelloberfläche präsentiert wurde und zuvor in DALIS kolokalisierte¹⁸⁶.

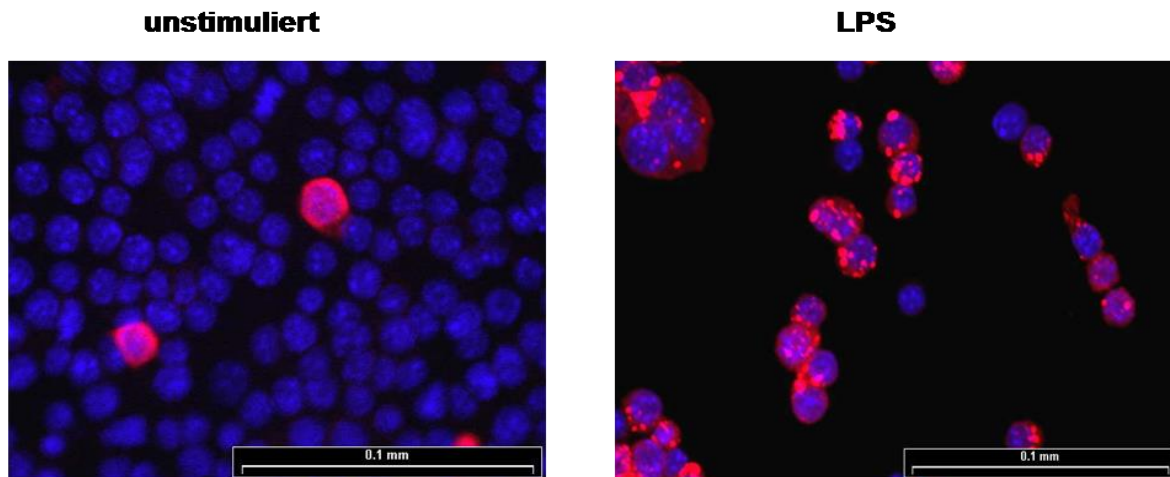


Abbildung 49: DALIS-Bildung in BMDCs nach Stimulation mit LPS

Die BMDCs wurden in 6-er Kavitätenplatten auf Deckgläsern kultiviert. Reife BMDCs wurden unstimuliert belassen (Medium), bzw. an d 7 mit 100 ng/ml LPS für 15 h stimuliert. Danach wurden sie mit einem, gegen mono- und polyubiquitinylierte Proteine gerichteten Primärantikörper (FK2-biotinyliert) und einem sekundären Streptavidin-FITC Antikörper gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Das FITC Signal ist rot dargestellt. Die Skalierungsbalken betragen 0,1 mm.

Die von Fassbender⁸⁶ gezeigte Kinetik der DALIS- Formation konnte in dieser Arbeit sowohl für BMDCs als auch Makrophagen verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). In den folgenden Versuchen wurde jeweils 15 h mit LPS stimuliert und im Vergleich zu den nicht aktivierten Zellen (Abbildung 49) zeigten die mit LPS stimulierten Zellen deutliche DALIS-Bildung. Sie sind als rot gefärbte Aggregate erkennbar. 90 % der Zellen bildeten DALIS, die eine maximale Größe von ca. 5 μ M erreichten.

3.9.3 Verminderte DALIS-Bildung durch Inhibition einzelner Mitglieder der PI-3 Kinase Signaltransduktionskaskade

Die Aktivität der PI-3 Kinase lässt sich durch die Inhibitoren Ly294002 und Wortmannin hemmen¹⁸⁷. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von BMDCs durch Inhibition der PI-3 Kinase und anderer Mitglieder der Signaltransduktionskaskade verringert ist¹⁸⁸ (siehe auch 1.7)

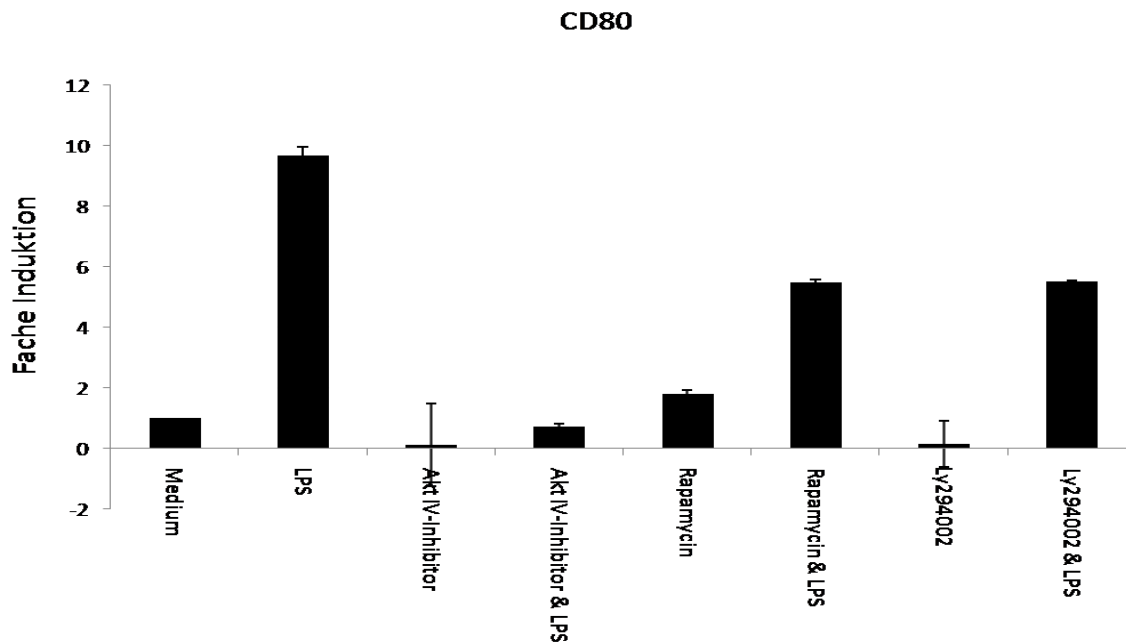


Abbildung 50: Verminderte Expression des Oberflächenmoleküls CD80 in PI-3 Kinase Kaskade-inhibierten BMDCs

1×10^6 reife BMDCs wurden in 3 ml TM5- Medium kultiviert und mit 30 μ M Ly294002 (30 min), 1 μ M Akt-IV Inhibitor, bzw. 100 pM Rapamycin für 1 h inkubiert und mit 100 ng/ml LPS für 24 h aktiviert, bzw. nicht aktiviert. Als Kontrolle wurden unaktivierte, nicht inhibierte BMDCs gemessen (Medium). 200.000 Zellen wurden in 200 μ l FACS-Puffer überführt und mit einer Antikörperlösung für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach zwei Waschschritten wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die Expression des Oberflächenmoleküls CD80. Dabei wurden nur PI-negative und CD11c positive Zellen in der Darstellung berücksichtigt. Der Mediumwert wurde auf 1 normalisiert und die Induktion der Oberflächenmoleküle durch Division des entsprechenden Mediumwertes berechnet. Die dargestellten Graphen sind repräsentativ für drei Experimente.

Die Expression des Oberflächenmoleküls CD80 war in Gegenwart von Inhibitoren der PI-3 Kinase- Kaskade deutlich verringert (Abbildung 50). Dabei ging die stärkste Inhibition von dem Akt-IV Inhibitor aus. Wurden Akt-inhibierte Zellen mit LPS stimuliert, liegt die Expression von CD80 unter der Grundexpression nicht aktivierter Zellen (Medium). Zellen, die vor LPS-induzierter Aktivierung mit Rapamycin, bzw. Ly294002 behandelt wurden, verhielten sich im Expressionsverhalten von CD80 ähnlich. Die Expression von CD80 war in diesem Fall um ca. 40 % geringer, verglichen mit nicht inhibierten, LPS-aktivierten Zellen.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Bildung von DALIS unter Einfluss der Inhibitoren auf die PI-3 Kinase in BMDCs deutlich verringerte⁸⁶. Um die beschriebenen Daten zu evaluieren, wurden die Zellen wie beschrieben kultiviert und für 30 min mit dem Inhibitor Ly294002 (30 μ M) behandelt und nachfolgend mit LPS stimuliert. Als Kontrolle dienten nicht inhibierte, mit LPS stimulierte Zellen. Abbildung 51 zeigt die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zellen.

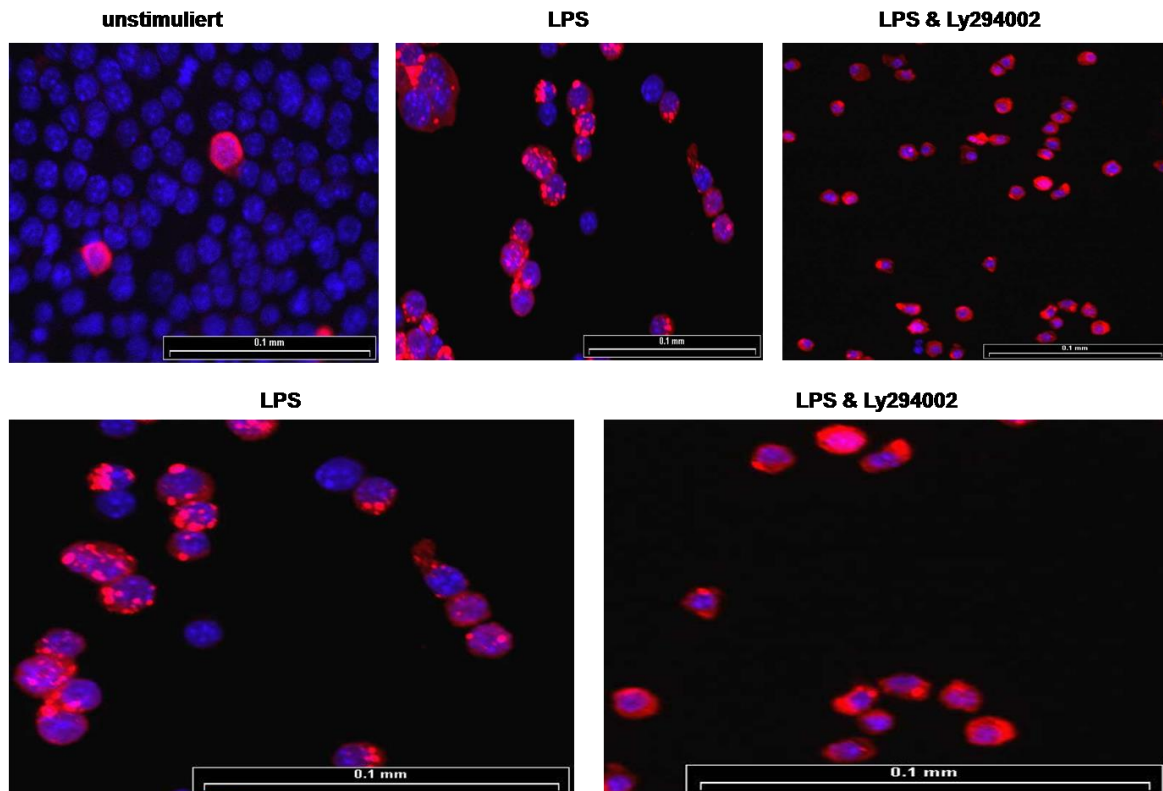


Abbildung 51: Der PI-3 Kinase Inhibitor Ly294002 verringert die DALIS-Bildung

Die BMDCs wurden in 96-er Kavitätenplatten kultiviert. Die reifen BMDCs wurden an Tag 7 mit 100 ng/ml LPS für 15 h stimuliert, bzw. vor der LPS-Stimulation mit dem PI-3 Kinase Inhibitor Ly294002 (30 μ M) behandelt. Als Kontrolle wurden in jedem Experiment nicht stimulierte Zellen untersucht. Die DALIS-Färbung erfolgte durch den FK2 biotinylierten Primärantikörper und den sekundären Streptavidin-FITC Antikörper und wurde im Fluoreszenzmikroskop dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Das FITC Signal ist rot dargestellt. Die Skalierungsbalken betragen 0,1 mm.

Im Gegensatz zu nicht aktivierten Zellen war in der Positivkontrolle eine deutliche DALIS-Bildung zu erkennen. Wurden die Zellen zuvor mit dem Inhibitor Ly294002 inkubiert unterblieb die DALIS-Bildung weitest gehend (siehe vergrößerte Bilder in Abbildung 51). Im Gegensatz zu nicht stimulierten Zellen konnten ubiquitinylierte Proteine zwar nachgewiesen werden, jedoch traten sie diffus verteilt im Zytoplasma der Zellen auf und nicht in Aggregaten. Dabei ist zu beachten, dass der FK2-biotinylierte Antikörper kein freies Ubiquitin erkennt, lediglich mono-, und polyubiquitinylierte Proteine. RAW309 verhielten sich analog in Bezug auf die DALIS-Bildung unter Einfluss der PI-3 Kinase Inhibitoren (Daten nicht gezeigt).

Weitere Mitglieder der PI-3 Kinase Signalkaskade sind Akt (Protein Kinase B) und die Serin/Threonin Kinase *mammalian target of rapamycin* (mTOR). Von Fassbender konnte bereits nachgewiesen werden, dass Rapamycin Auswirkung auf die DALIS-Bildung hat. Die Ergebnisse zeigten weiterhin, dass zwei weitere Inhibitoren von mTOR keinerlei Wirkung auf die DALIS-Bildung hatten⁸⁶. Zur Bestätigung dieser Daten wurden RAW309-

Zellen mit LPS stimuliert, bzw. einer gezielten Inhibition einzelner Komponenten der Signaltransduktionskaskade unterzogen. Die Aktivität von Akt wurde durch den Akt-IV-Inhibitor unterbunden, indem er durch Blockierung die ATP-Bindestelle einer „upstream“ gelegenen Kinase die Phosphorylierung von Akt verhindert. Diese inhibierte Kinase liegt allerdings „downstream“ von der PI-3 Kinase. Inhibiert wurde für 1 h mit einer Konzentration von 1 μM . Die Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 52). Vorversuche zeigten, dass 1 μM die optimale Konzentration zur Inhibition Akt ist (Daten nicht gezeigt). Rapamycin wurde in einer Konzentration von 100 pM zugegeben. Die Konzentrationen der Inhibitoren wurden austitriert, unterhalb der angegebenen Werte kam es zu keinem inhibitorischen Effekt.

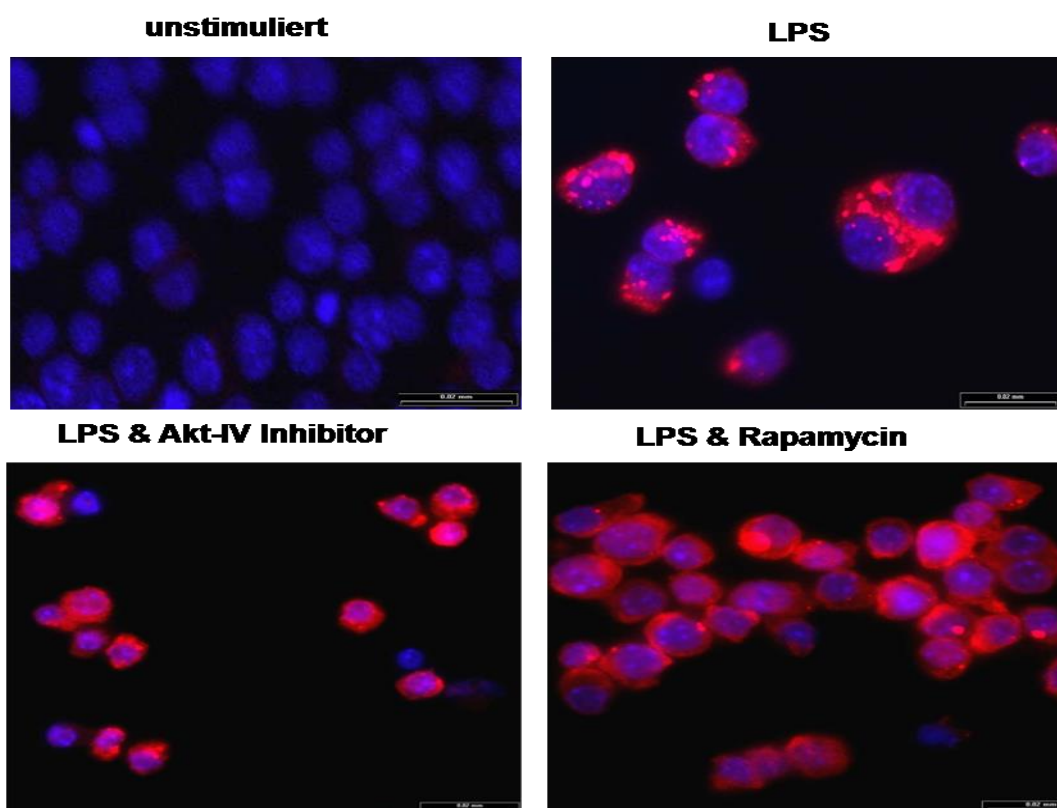


Abbildung 52: Verminderte DALIS-Bildung in stimulierten RAW309 Zellen unter dem Einfluss der Inhibitoren Akt-IV und Rapamycin

Die RAW309-Zellen wurden in 6-Kavitätenplatten kultiviert und mit 100 ng/ml LPS für 15 h stimuliert, bzw. vor der Stimulation für 1 h mit dem Akt-IV Inhibitor behandelt (1 μM) oder mit 100 pM Rapamycin inkubiert. Als Kontrolle wurden unstimulierte Zellen mitgenommen. Die DALIS-Färbung erfolgte durch den FK2 biotinylierten Primärantikörper und einem sekundären Streptavidin-FITC Antikörper. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Das FITC Signal ist rot dargestellt. Die Skalierungsbalken betragen 0,02 mm.

Die LPS-stimulierten RAW-Zellen zeigten eine deutliche Ausbildung der DALIS. Im Vergleich dazu, zeigten die mit Akt-IV Inhibitor behandelten und durch LPS stimulierten Zellen eine deutlich verminderte DALIS-Bildung. Des Weiteren waren die ubiquitinylierten Proteine eher diffus im Zytoplasma der Zellen verteilt, aber nicht aggregiert. Dieses Ergebnis konnte schon bei der Inhibition der PI-3 Kinase durch Ly294002 für BMDCs und RAW309-Zellen gezeigt werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten LPS-stimulierte RAW309-Zellen, die zuvor mit durch 100 pM Rapamycin behandelt wurden. Zwar konnten hier noch einige DALIS beobachtet werden, allerdings waren diese deutlich größer ($> 4 \mu\text{M}$) im Vergleich zu DALIS in stimulierten, ohne Inhibitor behandelten Zellen (Abbildung 52).

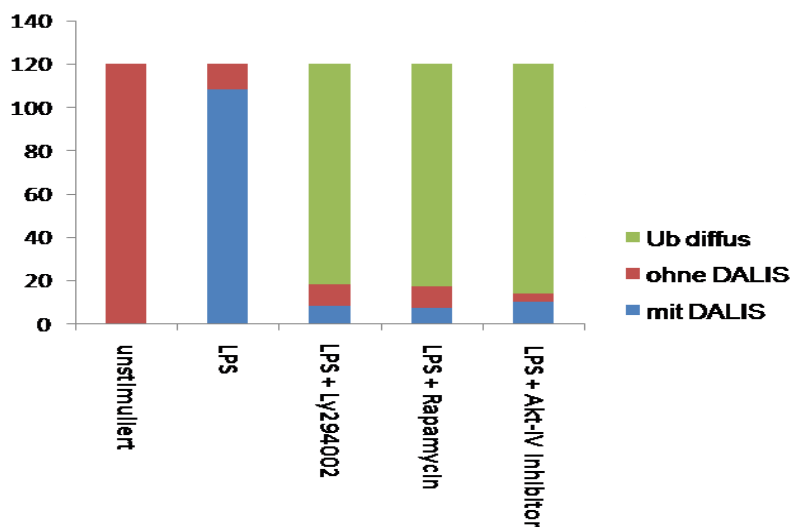


Abbildung 53: Veränderungen der DALIS-Anzahl in PI-3 Kinase inhibierten Zellen

Die Anzahl der DALIS-enthaltenen Zellen wurde ausgezählt (Ausschnitte sind in Abbildung 51 Abbildung 52 zu sehen). 120 Zellen wurden je Ansatz ausgezählt und auf das Vorhandensein von DALIS, oder diffus im Zytoplasma vorkommendem Ub hin untersucht. Als Kontrollen für die PI-3 Kinase-inhibierten Zellen dienten LPS-aktivierte Zellen, sowie nicht aktivierte.

Beim Auszählen der Zellen fiel auf, dass in nicht aktivierten Zellen keine DALIS auftraten. In LPS-aktivierten Zellen hingegen waren DALIS in knapp 95 % der Zellen vorhanden. Des Weiteren traten die DALIS in aktivierten Zellen in Größenverhältnissen von $0,3 - 5 \mu\text{M}$ auf. Zudem waren durchschnittlich acht DALIS in den Zellen vorhanden. Wurde hingegen die PI-3 Kinase inhibiert änderte sich das Bild dahingehend, dass nur noch 10 % der Zellen DALIS aufwiesen (Abbildung 53). Dies galt für alle Inhibitoren. Des Weiteren sank die Anzahl der DALIS auf durchschnittlich ein DALIS/Zelle. Diese DALIS wiesen allerdings morphologische Veränderungen auf und waren deutlich vergrößert ($< 4 \mu\text{M}$). Zudem fiel auf, dass die Zellen die keine DALIS enthielten, diffus im Zytoplasma verteiltes Ub aufwiesen. Dies galt für alle Inhibitoren und betraf in jedem Fall über 90 % der Zellen.

3.9.5 Der Einfluss von Caspasen auf die Bildung von DALIS

Es wurde die Vermutung angeführt, dass sich DALIS in BMDCs und Makrophagen nur als Reaktion auf eine Überstimulation hin bilden, woraufhin die Zellen beginnen apoptotisch zu werden⁸⁶. Das würde bedeuten, dass es in lebenden, vitalen Zellen nicht zur Ausbildung von DALIS kommen kann. Um diesen Aspekt näher zu beleuchten wurde die Aktivität einzelner Caspasen inhibiert. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass durch den Einsatz des BOC-D-FMK die Aktivität aller Caspasen inhibiert wird¹⁸⁹, der Einsatz dieses Inhibitors aber keinerlei Auswirkung auf die Aktivierung von BMDCs hat, da sich die Expression von Oberflächenmolekülen genauso verhält wie in LPS stimulierten Zellen⁸⁶. Deshalb sollte die Auswirkung einzelner Caspase-Inhibitoren auf die LPS-induzierte DALIS-Bildung in Makrophagen untersucht werden. Dabei wurden die Apoptose- Caspasen -3 und -8, sowie die inflammatorische Caspase-1 inhibiert. Es sollte analysiert werden ob, und wenn ja, wie weit sich die Inhibition der beiden Klassen von Caspasen auf die Bildung von DALIS ausübt (Abbildung 54).

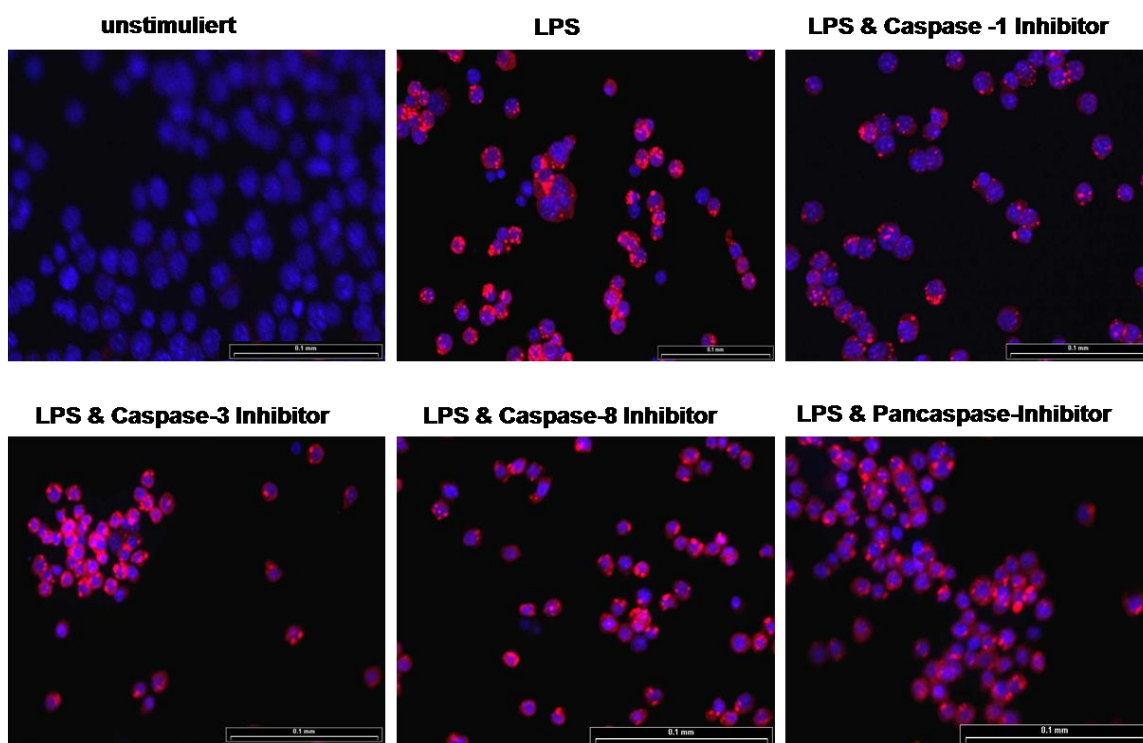


Abbildung 54: Auswirkung der Inhibition verschiedener Caspasen auf die LPS-induzierte DALIS-Bildung in Makrophagen

RAW309 Zellen wurden in 6-Kavitätenplatten kultiviert und mit 100 ng/ml LPS für 15 h stimuliert, bzw. vor der Stimulation mit den Inhibitoren für Caspase-1 (3 μ M), Caspase-3 (3 μ M), Caspase-8 (3 μ M), oder einem Pancaspase-Inhibitor (5 μ M) behandelt. Als Kontrolle wurden in jedem Experiment unstimulierte Zellen untersucht. Die DALIS-Färbung erfolgte durch den FK2 biotinylierten Primäantikörper und einen sekundären Streptavidin-FITC Antikörper. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Das FITC Signal ist rot dargestellt. Die Skalierungsbalken betragen 0,1 mm. Zur besseren Untersuchung der DALIS wurden die Zellen in Caspase-1 inhibierten Zellen mit einer stärkeren Vergrößerung betrachtet (Skalierungsbalken = 0,02 mm).

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zeigte, dass vor allem der Caspase-1 Inhibitor eine Auswirkung auf die Bildung von DALIS hatte. Wurde die inflammatorische Caspase gehemmt, kam es zu einer verminderten Bildung der Polyubiquitin-Aggregate. Auszählungen ergaben, dass zwar knapp 80 % der Zellen DALIS aufwiesen, die Anzahl der Aggregate pro Zelle jedoch deutlich reduziert war (Abbildung 54). In diesen Zellen traten durchschnittlich nur noch drei DALIS-Struktur/Zelle auf. Hingegen zeigten sich in LPS-aktivierte Kontrollzellen durchschnittlich acht DALIS/ Zelle, die alle eine Größe von ($< 3 \mu\text{m}$) aufwiesen. Die Inhibition der Apoptose induzierenden Caspasen 3-, und 8 bewirkte ebenfalls eine Verminderung der DALIS-Bildung. Beim Auszählen der Caspase-8 inhibierten Zellen fiel auf, dass über 80 % der Zellen diffus im Zytoplasma verteiltes Ub aufwiesen und die Anzahl der DALIS enthaltenen Zellen vermindert war. Die Anzahl der DALIS pro Zelle war von acht in LPS-aktivierten Kontrollzellen auf zwei DALIS/Zelle reduziert. Morphologisch betrachtet wiesen sie die gleiche Größe auf, wie DALIS in LPS-stimulierten Zellen. Caspase-3 inhibierten Zellen wiesen zu knapp 60 % verteiltes Ub auf. In 40 % der Zellen wurde zudem noch DALIS nachgewiesen. Allerdings war im Vergleich zu LPS-stimulierten Zellen die durchschnittliche Anzahl auf drei DALIS/Zelle reduziert. Zudem waren die enthaltenen DALIS vergrößert ($> 4 \mu\text{m}$).

Der Einsatz des Pancaspaseinhibitors führte dazu, dass knapp die Hälfte aller Zellen diffus im Zytoplasma verteiltes Ub aufwies. In der anderen Hälfte der Zellen konnten deutlich erkennbare DALIS nachgewiesen werden. Allerdings war die Anzahl der DALIS auf zwei DALIS/Zelle reduziert, verglichen mit der DALIS-Anzahl in LPS-aktivierte Zellen. Auffällig war, dass die DALIS deutlich vergrößert waren, fast alle hatten eine Größe von ca. $5 \mu\text{m}$. Wurden die Zellen lediglich mit Inhibitor, ohne LPS-Stimulation behandelt, wiesen sie keinerlei DALIS auf. Diese Beobachtung deckt sich mit den Untersuchungen von Fassbender⁸⁶. Abbildung 55 zeigt die Auswirkung der Caspase-Inhibitoren als Vergleich im Balkendiagramm (siehe auch Abbildung 54).

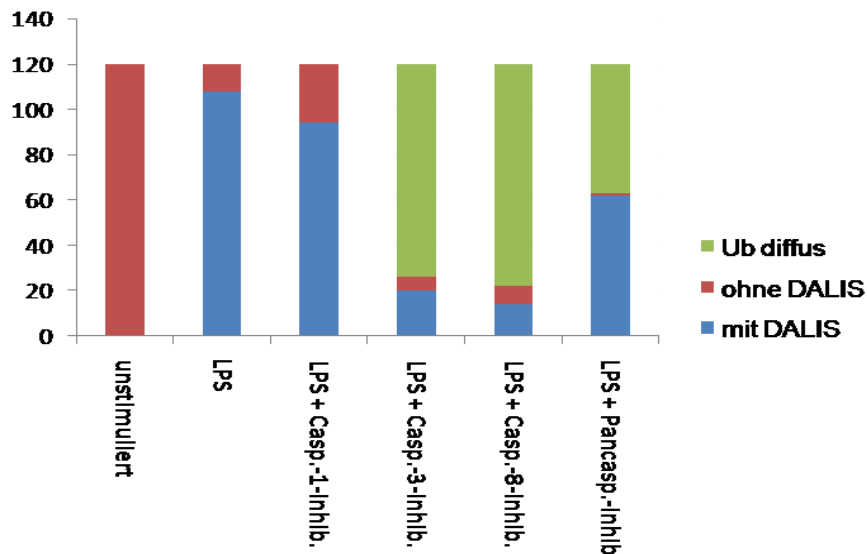


Abbildung 55: Veränderungen der DALIS-Anzahl in Caspase-inhibierten Zellen

Die Anzahl der DALIS-enhaltenen Zellen wurde ausgezählt (Ausschnitte sind in Abbildung 54 zu sehen). 120 Zellen wurden je Ansatz ausgezählt und auf das Vorhandensein von DALIS, oder diffus im Zytoplasma vorkommendes Ub hin untersucht. Als Kontrollen für die Caspase-inhibierten Zellen dienten LPS-aktivierte Zellen, sowie nicht aktivierte. Ub = Ubiquitin

Verglichen zur Inhibition einzelner Mitglieder der PI-3 Kinase Aktivierungskaskade zeigte die Auswirkung der Caspase-Inhibitoren auf die Bildung der DALIS einen schwächeren Effekt, da DALIS in diesen inhibierten Zellen noch vermehrt auftraten (siehe Abbildung 53 und Abbildung 55 im Vergleich). Die Ergebnisse sprechen gegen die Annahme, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Caspase-induzierten Zelltod und der DALIS-Bildung besteht. In diesem Fall sollte vor allem der Einsatz des Pancaspase-Inhibitors die Bildung von DALIS unterdrücken. Somit ist es unwahrscheinlich, dass die Zellen die polyubiquitinylierten Peptide im Zytosol aggregieren, weil sie beginnen abzusterben. Ähnliche Beobachtungen konnten von Fassbender gemacht werden⁸⁶. Interessant ist allerdings die Beobachtung, dass die Hemmung der Caspase-1 die größte Auswirkung auf die DALIS-Bildung hatte. Caspase-1 ist eine inflammatorische Caspase, die vielmehr eine Rolle in Entzündungsreaktionen spielt, als in der Caspase-induzierten Apoptose¹⁹⁰.

IV. Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Metalloendopeptidase LysN besondere biochemische und physikalische Eigenschaften besitzt, die sie von anderen proteolytischen Enzymen unterscheidet. Aus diesem Grund kann sie bevorzugt für proteolytische Verdauung in der Massenspektrometrie eingesetzt werden. Zusätzlich konnte erstmals eine Mutation des Enzyms generiert werden, wodurch sich die Spezifität der Metalloendopeptidase änderte. Neben Lysin konnte das mutierte Enzym Polypeptidketten auch N-terminal von Arginin schneiden. Somit konnte ein weiteres proteolytisches Enzym generiert werden, welches den bestehenden Pool der bekannten Proteasen erweitert. Dadurch rückt das Ziel der Proteomik, eine komplette Sequenzabdeckung zu erreichen und alle PTMs in einer Probe zu detektieren ein Stückchen näher.

4.1 Der Einsatz der Metalloendopeptidasen LysN und LysN_{optE157D} in MS-Analysen

4.1.1 Die Vorzüge der Metalloendopeptidasen LysN_{opt} und LysN_{optE157D}

Die Identifizierung von neuen Proteasen, die als Ergänzung zu Trypsin zur Probenvorbereitung genutzt werden können ist von großer Wichtigkeit. Wäre ein breiteres Spektrum an Proteasen verfügbar, könnte die Erforschung des Proteoms deutlich vereinfacht werden. LysN verfügt über viele Vorzüge (siehe 5.1.4), denen allerdings die schwierige Beschaffung der Metalloendopeptidase gegenüber steht. Das Enzym entstammt dem Pilz *Grifola frondosa*. Frisches Material, aus dem das Enzym zu isolieren ist, ist selten erhältlich, zudem wären große Mengen des Pilzes nötig um ausreichende Mengen zu isolieren. Die Expression und Aufreinigung von rekombinantem LysN, stellt sich im Vergleich zu Trypsin, welches einfach und in großen Mengen zu isolieren ist, immer noch als schwierig heraus. Deshalb wird es nur von wenigen Firmen (u.a. amsbio) angeboten. Entsprechend hohe Preise spiegeln diese Problematik wider. Im Folgenden werden die Expression und die Aufreinigung, sowie die Vorteile der Nutzung des vielseitig einsetzbaren Enzyms diskutiert.

4.1.2 Vergleich der Expressionssysteme und verschiedener Methoden zur Aufreinigung von LysN_{opt} und LysN_{optE157D}

Um Proteine exprimieren zu können, werden heutzutage verschiedene Expressionssysteme genutzt. Dabei hat jedes dieser Systeme, entsprechend der Applikation, spezielle Vorteile. Dabei ist die Wahl für ein bestimmtes System ein kritischer Faktor und richtet sich u.a. nach der Klasse des aufzureinigenden Proteins. Tabelle 15 gibt einen Überblick der erprobtesten Expressionssysteme

Tabelle 15: Überblick der gebräuchlichsten Expressionssysteme und deren Vorteile

	Bakterien (<i>E.coli</i>)	Hefen	Insektenzellen	Säugerzellen
Wachstum	schnell (30 min)	schnell (90 min)	langsam (18-24 h)	langsam (ca. 24 h)
Kosten	niedrig	niedrig	hoch	hoch
Expressionsrate	hoch	relativ hoch	niedrig-hoch	niedrig - moderat
Extrazelluläre Expression	Sekretion in das Periplasma	Sekretion in das Medium	Sekretion in das Medium	Sekretion in das Medium
Proteinfaltung	Rückfaltung in < 70 % der Fälle nötig	teilweise Rückfaltung notwendig	korrekte Faltung	korrekte Faltung
Postranslationale Modifikationen	nein	kaum	fast alle	alle

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Charakteristika der im Labor genutzten Expressionssysteme. Dabei werden Vor-, und Nachteile der einzelnen Systeme aufgezeigt.

In dieser Arbeit wurden das *E.coli* und das Sf-9/Baculovirus Expressionssystem genutzt um das Protein biologisch aktiv zu exprimieren. Dabei ist die bakterielle Überexpression von Proteinen oft die erste Wahl. Sie bietet den Vorteil, dass sich bakterielle Plasmide zum einen relativ einfach in der gewünschten Art modifizieren lassen, zum anderen zeichnen sich Bakterien durch ein schnelles Wachstum aus, so dass in relativ kurzer Zeit große Mengen des Proteins exprimiert werden können. Heutzutage ist bereits eine Vielzahl induzierbarer Vektoren auf dem Markt erhältlich. Schließlich ist die bakterielle Expression auf Grund des relativ geringen Zeitaufwandes und der einfach herzustellenden Kulturmedien kostengünstig. Diesen Vorzügen stehen allerdings Nachteile gegenüber, wie das Fehlen von PTMs, vor allem Glykosylierungen, sowie unvollständige Proteinfaltungen und eine schlechte Löslichkeit des Proteins. Daraus resultiert häufig eine Aggregation des falsch gefalteten Proteins in Einschlusskörperchen. Die Wiederherstellung der biologischen Aktivität ist zeitintensiv, aufwändig und oft wenig erfolgreich. Obwohl in dem gewählten Vektor eine

pelB-Signalsequenz vorhanden war, die das Protein in das Periplasma der Zellen leiten sollte, konnte es nicht aus diesem aufgereinigt werden (siehe Abbildung 23). Vielmehr war ein Großteil des Proteins in Einschlusskörperchen zu finden (siehe Abbildung 24 und Abbildung 32). Nach der Denaturierung durch Harnstoff und Rückfaltung konnte das Protein wieder in Lösung gebracht werden. Weiterhin zeigte der Aktivitätstest, dass die Struktur des Proteins in der Art wieder hergestellt werden konnte, dass das rekombinante Protein biologische Aktivität aufweist (Abbildung 38). SDS-PAGE-Analysen zeigten, dass durch die Rückfaltung auch kontaminierende Proteine in den Einschlusskörperchen aggregierten, allerdings konnten diese Kontaminationen erfolgreich durch eine denaturierende IMAC Aufreinigung des rekombinanten Proteins über das fusionierte His-Tag eliminiert werden. Somit konnte eine gezielte Aufreinigung des rekombinanten Proteins erreicht werden (Abbildung 34). Allerdings kam es zur Bildung von Dimeren und multimeren Formen des Proteins, welche sich nicht durch die denaturierende IMAC-Aufreinigung voneinander trennen ließen. Durch Gelfiltration ließen sich jedoch die monomere Form von den multimeren Formen trennen (Abbildung 36).

Im Gegensatz zu der denaturierenden IMAC-Aufreinigung über das 6 x His-Tag konnte das Protein nativ nicht über das Tag aufgereinigt werden. In einigen Fällen kann es passieren, dass die Sequenz des 6 x His-Tag durch die native Struktur des rekombinanten Proteins abgeschirmt wird und es somit keinen Zugang zu den immobilisierten Nickel, bzw. Cobaltionen der Aufreinigungssäule hat¹⁹¹. Diese Vermutung kann dadurch gestützt werden, dass die Denaturierung des rekombinanten Proteins in einer erfolgreichen Aufreinigung über das 6 x His-Tag resultierte. Durch die Denaturierung des Proteins ist die Tertiärstruktur zerstört, wodurch die Histidine mit den Ionen der Aufreinigungssäule interagieren können.

Nativ konnte das Protein auch nicht mit weiteren Methoden in ausreichenden Mengen aufgereinigt werden. Ein Grund war, dass ein Großteil in Einschlusskörperchen aggregierte. Das Protein welches nicht aggregierte, konnte aus besprochenen Gründen nicht mittels IMAC aufgereinigt werden. Da das Protein über eine negative Nettoladung bei pH = 6,0 (bakterieller Lysepuffer) verfügt, wurde zur Aufreinigung ein Kationentauscher gewählt. Dadurch konnte das rekombinante Protein zwar aufgereinigt werden, allerdings nicht in reiner Form (siehe Abbildung 26 und Abbildung 27). Deshalb musste ein weiterer Aufreinigungsschritt unternommen werden, um die kontaminierenden Proteine zu eliminieren. Durch Gelfiltration können Proteine ihrer Größe nach getrennt werden¹⁹². Allerdings eignet sich diese Methode nur für vorfraktionierte Proben. Ist die Probe zu komplex, kann diese nicht effizient getrennt werden, da sich hierdurch die Chance erhöht, dass Proteine der gleichen Größe in der

aufzureinigenden Probe vorkommen. Das SDS-PAGE Gel nach der Gelfiltration zeigte jedoch keine Bande, die dem rekombinanten Protein entsprach (Daten nicht gezeigt). Hieraus ergab sich die Annahme, dass zu wenig Protein geladen wurde. Natives Protein wurde an sich schon in geringer Menge exprimiert und durch die vorangegangenen Aufreinigungsschritte IMAC und Kationentauscher kam es zu Probenverlust, so dass nicht genug Ausgangsmaterial für die Gelfiltration zur Verfügung stand.

Im Falle der denaturierenden Aufreinigung konnte das Protein alleinig durch IMAC in reiner Form isoliert werden. Die Gelfiltration konnte hier erfolgreich angewandt werden, um monomere und multimere Formen des rekombinanten Proteins voneinander zu trennen. Im Gegensatz zur nativen Aufreinigung stand genug Probenmaterial zur Verfügung (siehe Abbildung 33, Abbildung 34 und Abbildung 36). Die Doppelbanden ergaben sich vermutlich durch eine andere, nicht natürliche Ausbildung einer Disulfidbrücke, durch die ein weiteres stabiles Produkt des Proteins mit einer alternativen Struktur gebildet wurde.

Neben der bakteriellen Expression wurde in dieser Arbeit das Sf-9/Baculovirus System angewendet. Das eukaryotische System (Sf-9 Zellen) bietet den Vorteil, dass die exprimierten Proteine durch den lytischen Baculovirus in das Medium sekretiert werden und korrekt gefaltet sind. Somit kommt es nicht zur Bildung von Einschlusskörperchen. Weiterhin werden durch die eukaryotischen Sf-9 Zellen ein Großteil der Proteine posttranslational modifiziert^{169;170}. Nachteile dieses Systems sind höhere Kosten (Insektenzellmedium, Chemikalien zum Ablösen der Zellen, Gefäße zur Zellkultivierung) und deutlich erhöhter Zeitaufwand, da die Insektenzellen im Vergleich zu *E.coli* langsamer wachsen. Zusätzlich muss der Virus, mit dem die Zellen infiziert werden, erst durch Einbringen in einen Transfervektor rekonstituiert werden. Schließlich müssen die Zellen infiziert werden, damit sie das gewünschte Protein exprimieren. In diesem Fall erfolgte die Infektion über 72 h, bis hin zur lytischen Phase. Im Gegensatz dazu wurde bei der bakteriellen Expression schon 4-6 h nach Induktion ausreichend rekombinantes Protein exprimiert (Abbildung 22). Nach der Infektion der Sf-9 Zellen mit dem rekonstituierten Baculovirus konnte fluoreszenzmikroskopisch die Expression von GFP (im Transfervektor enthaltenes Reporterprotein) nachgewiesen werden. Trotzdem konnten mit diesem System nicht ausreichende Mengen des rekombinanten Proteins exprimiert werden, obwohl mehrere Runden der Infektion durchlaufen wurden, um einen Hochtitervirus zu generieren.

Vielleicht eignete sich das System nicht zur Expression dieser Metalloendopeptidase. Nach der Infektion der Zellen beginnen die ersten nach ca. 12 h Virusmaterial und somit rekombinantes Protein in das Medium abzugeben. Ein Großteil der Zellen lysiert

aber erst zwischen 24- 48 h nach der Infektion. Das bereits frei im Medium vorkommende Protein könnte durch andere Proteasen abgebaut worden sein.

Um eine höhere Ausbeute des Proteins erreichen zu können bedarf es noch weiterer Experimente. Beispielsweise könnte an Stelle des His-Tags ein anderer Tag zur Aufreinigung an das Protein fusioniert werden. Hier sind das *Strep*-Tag, das Myc-Tag und das FLAG-Tag zu nennen, welche alle erfolgreich als Alternative zum His-Tag in Proteinaufreinigungen genutzt wurden¹⁹³⁻¹⁹⁵. In diesem Fall konnte das Tag nur C-terminal an das Protein fusioniert werden, da das Vektorkonstrukt N-terminal über die pelB Signalsequenz verfügte. Andere Expressionsvektoren, die N-terminal über keine Signalsequenz verfügen, ermöglichen auch die Fusion des His-Tags am N-Terminus. Hierdurch könnte evtl. die Abschirmung des Tags durch die native Proteinstruktur umgangen werden.

Des Weiteren lassen sich Insektenzellen u.a. durch Cellfectin- II, oder das Bac-to-Bac System transfizieren, wodurch unter Umständen eine höhere Transfektionseffizienz erreicht werden kann^{196;197}. Hierdurch könnte sich die Chance auf die Generierung eines infektiösen Virus erhöhen, der die Expression des gewünschten Proteins gewährleistet. Zudem sind neben Sf-9 Zellen auch andere Insektzelllinien wie Sf-21 und Tn-5 (*High Five*) zur Expression geeignet¹⁹⁸.

4.1.3 Problematik bei der Wiederherstellung der biologischen Aktivität von denaturierten rekombinanten Proteinen

Zur Wiederherstellung der biologischen Aktivität von denaturierten Proteinen aus Einschlusskörperchen gibt es verschiedene Ansätze. Allen gemein ist die Isolierung der Einschlusskörperchen, deren Aufreinigung und Denaturierung^{177;199}. Für die Rückfaltung müssen verschiedenste Pufferbedingungen getestet werden, da eine korrekte Faltung von diversen physikalischen, chemischen, sowie biologischen Parametern abhängig ist¹⁹⁹. Dabei müssen für jedes Protein die richtigen Bedingungen ausgetestet werden. Ein wichtiger Aspekt sind Oxidations-, und Reduktionsmittel, wie GSH und GSSG, im Pufferansatz. Sie oxidieren, bzw. reduzieren die Thiolgruppen der evtl. vorkommenden Cysteine in der Aminosäuresequenz. Im denaturierten Zustand des Proteins liegen die Thiolgruppen der Cysteine im reduzierten Zustand vor. Zur Wiederherstellung der nativen Struktur müssen die reduzierten Thiolgruppen oxidiert werden. Dadurch können sich die Disulfidbrücken ausbilden, die die Tertiärstruktur des Proteins korrekt zu rekonstruieren. Da jedes Protein über unterschiedliche Mengen an Cysteinen verfügt, muss die Konzentration, die an Oxidations- und Reduktionsmittel

zugegeben wird, für jedes Protein neu bestimmt werden. Die kodierende Sequenz von LysN_{opt} und LysN_{optE157D} beinhaltet vier Cysteine. Geht man davon aus, dass alle vier Schwefelgruppen Disulfidbrücken eingehen, müsste die oxidierte Form von Gluthathion (GSSG) im Überschuss zugegeben werden. Allerdings konnten mit dem Puffer, der GSH in Überschuss enthielt, bessere Ergebnisse erzielt werden. Dies lässt darauf schließen, dass nicht alle Thiolgruppen Disulfidbrücken ausbilden. Eine andere Möglichkeit ist, dass das Zink-Ion im aktiven Zentrum durch GSH reduziert wird und somit das Enzym über keine Aktivität mehr verfügt. Unterstützend konnte gezeigt werden, dass sich durch DTT LysN inhibieren ließ, da die Thiolgruppen von DTT evtl. das Zink-Ion im aktiven Zentrum reduzieren. Um die Aktivität des rückgefalteten Proteins weiter zu optimieren, könnten weitere Pufferbedingungen ausgetestet werden. Beispielsweise wurde kürzlich Glutathion-Ethylester als neues Protein-Rückfaltungsreagenz beschrieben, mit dem sowohl Rückfaltungseffizienz, als auch die richtige Disulfidformation deutlich erhöht werden konnte²⁰⁰.

4.1.4 Die Vorzüge von LysN in proteolytischen Verdaus

Das pH-Optimum der Metalloendopeptidase LysN wurde im basischen Bereich (8-9,5) angegeben^{137;183}, allerdings konnte hier gezeigt werden, dass es auch bei einem pH-Wert von 6,0, sowie einem pH-Wert von 10,0 nicht zu einer nennenswerten Abnahme der Aktivität kommt. Erst bei einem pH-Wert von < 5,0 und > 10 war eine leicht verminderte Aktivität zu verzeichnen (Abbildung 41). Im Gegensatz dazu hat Trypsin ein pH-Optimum von 7,5-8,5, LysC von 8,5²⁰¹ und AspN von 6,0-8,5²⁰². Hingegen hat GluC ein pH-Optimum von 4,0–9,0¹¹⁴. Das bedeutet, dass LysN über den größten pH-Bereich hinweg aktiv ist, und das einzige Enzym, dass auch bei pH-Werten > 9,0 unverminderte Aktivität aufweist. Schon allein diese Eigenschaft macht LysN für den Einsatz in proteolytischen Verdaus interessant, da es in vielen bakteriellen Lysepuffern mit unterschiedlichen pH-Werten eingesetzt werden kann. Somit könnten zeitaufwändige und kostenspielige Umpufferungen, oder Dialyseschritte umgangen werden, die von Nöten wären, wenn ein proteolytisches Enzym in einem Puffer eingesetzt wird, der außerhalb seines pH-Optimums liegt. Diese Eigenschaft wird noch dadurch ergänzt, dass LysN in Gegenwart von bis zu 5 M Harnstoff unverminderte Aktivität aufweist (Abbildung 41). Somit hat LysN einen weiteren Vorzug für proteolytische Verdaus, insbesondere von Zelllysaten, da Lysepuffern oft Harnstoff in hohen Konzentrationen als denaturierendes Agens zugesetzt wird. Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass LysN auch noch bei Konzentrationen von 8 M Harnstoff

effizient arbeitet¹³⁴. Zudem konnte kürzlich gezeigt werden, dass LysN auch noch in Gegenwart von bis zu 80 % Acetonitril Aktivität besitzt¹³⁴.

Ein weiterer Aspekt, der hier allerdings nicht näher untersucht wurde, ist, dass LysN über einen großen Temperaturbereich hinweg aktiv ist. Selbst bei Temperaturen um 4 °C konnte noch Aktivität nachgewiesen werden, zudem ist es hitzestabil bis 70 °C und ist auch während dieser hohen Temperaturen noch aktiv. Es konnte gezeigt werden, dass durch einen 10 minütigen Verdau bei 70 °C, genau so viel Peptide generiert werden konnten wie durch einen einstündigen Verdau bei 25 °C¹³⁴. Im Gegensatz dazu kann Trypsin in diesen Temperaturbereichen nur eingesetzt werden, wenn es chemisch modifiziert wird, z.B. glykolytiert²⁰³. Schließlich konnte gezeigt werden, dass LysN im Gegensatz zu Trypsin, oder LysC dazu fähig ist Peptide mit methylierten Lysinen zu hydrolysieren. Dabei wurden besonders Peptide mit monomethylierten Lysinen geschnitten, dimethylierte zu einem geringeren Teil¹³⁴. Methylierte Lysine sind wichtige PTMs, die in Histonen am besten untersucht sind²⁰⁴. Dabei können sie einfach, zweifach, oder dreifach methyliert sein²⁰⁵. Des Weiteren sind Histone generell reich an Lysinen, weshalb sich proteolytische Enzyme die Lysine erkennen nur bedingt für den Verdau eignen. Die Polypeptidkette wird auf Grund der häufig vorkommenden Erkennungssequenz oft geschnitten, weshalb die generierten Peptidfragmente oft zu kurz sind, um sie massenspektrometrisch zu analysieren.

4.1.5 Die Spezifität der mutierten Metalloendopeptidase LysN_{optE157D}

Bereits im Jahre 2000 zeigten Hori et al. die Kristallstruktur der Metalloendopeptidase LysN. Es konnten sowohl das aktive Zentrum, als auch die S1'- Bindetasche des Enzyms identifiziert werden¹³⁵. Das aktive Zentrum setzt sich aus zwei Helices und einer Schleife zusammen, die die konservierte HExxH Domäne enthält. Diese Domäne kennzeichnet Metalloendopeptidasen, die Histidine fungieren als Zinkliganden. Durch die Analysen von Fushimi konnte der dritte Zinkligand (GTxDxxYG) des Enzyms charakterisiert werden und LysN in die bis dato neue Gruppe der Aspzincine klassifiziert werden²⁰⁶ (siehe Abbildung 13). Somit waren die Zinkliganden His117, His121 aus dem HExxH-Motiv und Asp130, die das katalytische Zink-Ion koordinieren identifiziert. Des Weiteren konnten die AS identifiziert werden, die für die Spezifität verantwortlich sind¹³⁵. Die AS Asp154 und Glu157 bilden eine stark elektrostatisch negative Region, die positiv geladene Lysinseitenketten eines Substrats spezifisch anzieht (Abbildung 56). Asp154 ist konserviert in allen Aspzincinen. Hingegen ist Glu157 variabel in lysinspezifischen Aspzincinen, weshalb von diesem Rest die

primäre Spezifität für Lysine ausgeht. Man geht davon aus, dass die Tiefe der Tasche mitverantwortlich für die Lysinspezifität ist.

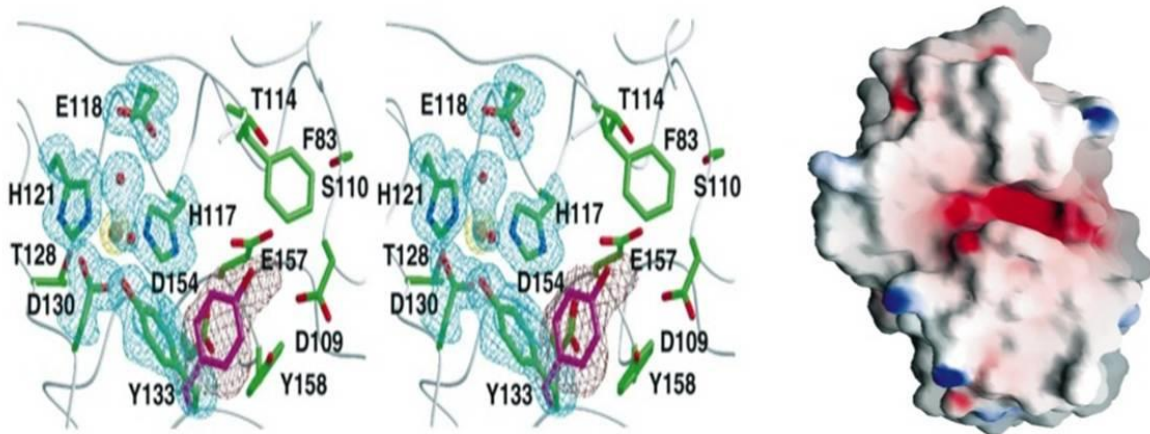


Abbildung 56: Die Bindungsstelle des Zinkatoms durch die entsprechenden Zink-Liganden und die S1'-Bindetasche von LysN¹³⁵

Die linke Abbildung zeigt die Zink-Bindestelle des Proteins. Dabei sind alle Reste, die an der katalytischen Reaktion des Enzyms teilnehmen hervorgehoben. Der Tyr-Rest 133 ist violett hervorgehoben. C-Atome sind grün markiert, O-Atome rot und N-Atome blau. Das Zinkion ist gelb dargestellt. Das 3D-Modell (rechtes Bild) zeigt die elektrostatisch negative Region (rot), die die S1'-Bindetasche des Enzyms darstellt.

Nonaka untersuchte die Substratspezifität der Metalloendopeptidase und nutzte dazu unterschiedliche fluorogene Substrate. Dabei konnte gezeigt werden, dass Substrate mit der Struktur Dnp-A-T-O-L-S-W (O = Ornithin), oder Dnp-A-T-R-L-S-W (R = Arginin) von der Metalloendopeptidase gebunden, aber nicht umgesetzt werden. Vielmehr ging von diesen Substraten eine kompetitive Hemmung aus¹³⁷. Das bedeutet, dass entweder Arg, oder Ornithin in die S1'-Bindetasche passen. Durch ein Bindungsmodell konnte gezeigt werden, dass die Bindetasche nicht tief genug ist, um eine Peptidyl-Arg Seitenkette eines Substrats zu hydrolysieren, da Arg eine längere Seitenkette hat als Lys. Von Trypsin ist bekannt, dass es sowohl Arg, als auch Lys hydrolysieren kann²⁰⁷. Arg kann hier direkt mit dem Asp-Rest in der S1'-Bindetasche interagieren, woraufhin die Aminogruppe der Seitenketten des Lysins eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Carboxylgruppe des Asp-Rests der S1'-Bindetasche bilden kann^{207;208}. Durch die Mutation des Glu157 zu Asp157 soll sich die Tiefe der S1'-Bindetasche ändern. Somit sollte, analog zum Trypsin, auch Arginin hydrolysiert werden können. Hier konnte gezeigt werden, dass sich durch die Mutation tatsächlich die Spezifität änderte und auch N-terminal von Arg geschnitten werden, ob allerdings tatsächlich die Tiefe der Tasche dafür verantwortlich ist, müsste durch eine Kristallstrukturanalyse der mutierten Protease gezeigt werden. Obwohl Arg als Erkennungssequenz für die mutierte

Protease dient, ist die Spezifität für Lysine deutlich höher. Um die Spezifität für Arg zu erhöhen, könnte versucht werden, weitere AS, die für die Spezifität verantwortlich sind, zu mutieren und somit die Spezifität zu beeinflussen. Eine besondere Rolle kommt hier dem Tyr133 zu. Zusammen mit dem Phe83 Rest bildet es eine hydrophobe Umgebung, so dass der Alkylrest des Lysins von der Metalloendopeptidase gebunden werden kann. Des Weiteren fungiert es als Protonendonator für das Oxyanion und stabilisiert somit die Intermediatbildung der biochemischen Reaktion, indem es die Energie, die für die Transition benötigt wird, herabsetzt.

4.1.6 LysN in massenspektrometrischen Analysen

Trypsin ist nach wie vor die am meisten genutzte Protease für massenspektrometrische Probenvorbereitungen. Das Enzym weist keine Sternaktivität auf und hydrolysiert Arg und Lys C-terminal. Allerdings ist die Serinprotease nicht in allen Bereichen einsetzbar. Je nach Applikation ist es sinnvoll, weitere Enzyme für den proteolytischen Verdau von Proben für MS-Analysen zu nutzen. Abbildung 57 zeigt die generierten Peptidfragmente der am besten charakterisierten Proteasen einer hypothetischen Peptidsequenz. Dabei fallen Unterschiede der entstehenden Peptidfragmente auf, sowohl in Länge, als auch dem Terminus. Peptide müssen eine bestimmte Länge aufweisen um in MS-Analysen nachgewiesen werden zu können. Betrachtet man z.B. die tryptisch generierten Fragmente, erkennt man ein kurzes Peptid, was aus S und R besteht (SR). Dieses Peptid wäre zu kurz um vom Massenspektrometer detektiert zu werden. Würde die Peptidsequenz allerdings beispielsweise mit ArgC, oder LysN geschnitten, könnte das entsprechende Peptidfragment detektiert werden. Da im Gegensatz zu Trypsin, welches zwei AS erkennt, durch ArgC und LysN jeweils nur eine AS erkannt wird ist das entstehende Peptid länger. Würde also der Ansatz einmal mit Trypsin, einmal mit ArgC und einmal mit LysN verdaut, könnte eine deutlich bessere Sequenzabdeckung erreicht werden, als durch den Verdau mit Trypsin alleine.

Peptid: **A**DF**R**IS**T**TD**S**WR**T**HGSDF**K**SR**T**EAS**K**EN**D**Y**I**T**L**S
 Trypsin: **A**DF**R** **I**STTD**S**WR **T**HGSDF**K** **S**R **T**EAS**K** **E**ND**Y**IT**L**S
 ArgC: **A**DF**R** **I**STTD**S**WR **T**HGSDF**K**SR **T**EAS**K**EN**D**Y**I**T**L**S
 AspC: **A** **D**FR**I**ST**T** **D**SW**R**THGS **D**FK**S**R**T**EAS**K**E**N** **D**Y**I**T**L**S
 LysC: **A**DF**R**IS**T**TD**S**WR**T**HGSDF**K** **S**R**T**EAS**K** **E**ND**Y**IT**L**S
 GluC: **A**D **F**R**I**ST**T**D **S**WR**T**HGS**D** **F**K**S**R**T**EAS**K**E **N** **D** **Y**IT**L**S
 LysN: **A**DF**R**IS**T**TD**S**WR**T**HGSDF **K**SR**T**EAS **K**EN**D**Y**I**T**L**S
 LysN E157D: **A**D**F** **R**IS**T**TD**S**W **R**THGSDF **K**S **R**T**E**AS **K**EN**D**Y**I**T**L**S
 Chymotrypsin: **A**D**F** **R**IS**T** **T** **D**SW **R**T HGSDF **K**SR**T** **E**AS**K**EN**D**Y**T** **I**L **S**

Abbildung 57: Vergleich der Schnittmuster einer hypothetischen Peptidsequenz durch verschiedene Proteasen

Gezeigt sind die Peptidfragmente, die durch die aufgelisteten Proteasen generiert werden. Arg und Lys sind entsprechend markiert (Lys (K) = rot, Arg (R) = gelb). Um aufzuzeigen, dass bestimmte PTMs nur durch den Einsatz bestimmter Proteasen nachgewiesen werden können, sind einige Ser (S) und Tyr (Y) Reste grün markiert, was für eine Phosphorylierung steht.

Abbildung 57 zeigt die PTMs in Form von Phosphorylierungen (grün markierte Serine, bzw. Tyrosine). Auch hier fällt auf, dass einzelne PTMs nur durch den Verdau bestimmter Proteasen in MS-Analysen nachgewiesen werden können. Z.B. könnte durch den tryptischen Verdau die Phosphorylierung am Ser des Peptids SR auf Grund seiner Länge nicht nachgewiesen werden, wohl aber durch den Verdau mit LysN (KSRTEAS). Analog zur Sequenzabdeckung erweist sich auch im Falle der Detektion von PTMs der Nutzen mehrerer proteolytischer Enzyme für den Verdau der Probe. Es konnte gezeigt werden, dass die Ausbeute von Phosphopeptiden durch einen tryptischen Verdau von 40 % auf 70 % gesteigert werden kann, wenn ein Teil der Probe zusätzlich mit GluC verdaut wird¹¹⁶. Durch den getrennten Einsatz von Trypsin und LysN wurde ebenfalls eine Steigerung in der Ausbeute an phosphorylierten Peptiden erreicht, da sie komplementäre Bereiche im Phosphoproteom abdecken¹³⁰. Phosphoproteomstudien ließen sich ebenfalls erfolgreich mit der unspezifischeren Protease Elastase (erkennt Ala, Val, Leu, Iso, Ser und Thr) in Kombination mit Trypsin durchführen. Im Vergleich zu Trypsin alleine, konnten durch Elastase deutlich mehr phosphorylierte Stellen identifiziert werden^{128;129}. Des Weiteren eignen sich unspezifische Enzyme besonders für Membranproteomstudien. Da viele Schnittstellen in Membranproteinen nicht, oder nur schlecht zugänglich sind, erhöht sich durch den Einsatz unspezifischer Enzyme die Chance viele Peptide zu generieren, um eine gute

Sequenzabdeckung zu erreichen. Bei diesen Applikationen sind spezifische Proteasen oft nur bedingt einsetzbar^{126;127}. Chymotrypsin konnte erfolgreich eingesetzt werden um Peptide zu generieren und identifizieren, denen basische Reste wie Arg, Lys, oder His fehlen²⁰⁹.

Es lässt sich somit deutlich erkennen, dass die Wahl der zu nutzenden Protease abhängig von der Fragestellung und dem Einsatzgebiet ist. Hinzu kommt noch der Faktor der zur Verfügung stehenden Fragmentierungsmethode der generierten Peptide. Tryptische Peptide sind im Schnitt zwischen 8-10 AS lang und sind zumeist doppelt geladen, wenn sie durch ESI-MS analysiert werden. Somit eignen sich diese Peptide besonders für die Fragmentierungsmethode CID. Die Kombination aus tryptisch generierten Peptiden, die in ESI-MS Analysen durch CID fragmentiert werden ist die am meisten gebräuchlichste Methode und wurde auch in dieser Arbeit genutzt. In den letzten Jahren hat sich zusätzlich die Methode ETD zur Fragmentierung durchgesetzt. Durch diese Methode lassen sich besonders längere, mehrfach geladene Peptide gleichmäßiger fragmentieren. Somit bewährt sich hier der Einsatz von Proteasen, die nur eine AS als Schnittstelle erkennen, wie z.B. LysC¹²², aber auch GluC, oder LysN. Die Proteasen generieren längere (im Schnitt 20 AS) Peptide, die mehrfach geladen sind. Da ETD/ECD eine sogenannte „weiche“ Fragmentierungsmethode ist, eignet sie sich besonders zur Analyse von labilen PTMs, wie Phosphorylierungen²¹⁰ oder Glykolysierungen²¹¹, da die Fragmentbrüche relativ gleichmäßig am Peptidrückgrat erfolgen. Somit verbleibt die PTM am Peptidfragment und wird nicht abgespalten. Somit hängt die Wahl der Protease nicht nur von den zu untersuchenden Proben ab, sondern auch von der Fragmentierungsmethoden, die zur Verfügung stehen. Die zukünftige Herausforderung MS-basierter Proteomik wird also sein, dass Repertoire an Proteasen, die für proteolytische Verdaus einzusetzen sind, insofern zu erweitern, dass eine komplette Sequenzabdeckung und die Detektion aller PTMs der zu untersuchenden Proben garantiert werden kann. Durch den Einsatz von LysN und der hier generierten Mutante LysN_{E157D} kann man diesem Schritt etwas näher kommen. Vor allem LysN_{OptE157D} eignet sich für CID-basierende MS-Methoden, da die generierten Peptide Trypsin in Länge und Ladung gleichen. Besondere Vorzüge für MS-Analysen bieten beide Proteasen, da sie auch in Gegenwart von 80 % ACN und hohen Mengen an Harnstoff noch aktiv sind. LysN ist auch noch bei Temperaturen von 70 °C stabil¹³⁴, der Verdau unter höheren Temperaturen findet schneller statt, als bei 37 °C. Des Weiteren können Proteine durch hohe Temperaturen denaturiert werden. Allerdings ist Trypsin bei diesen Temperaturen instabil und nicht mehr aktiv, es sei denn man glykolyisiert die Lysinreste des Trypsins²⁰³. Allerdings ist dieser zusätzliche Schritt zeitintensiv und mit Kosten verbunden.

LysN_{opt} bedarf weiterer Untersuchungen, bezüglich des Schnittverhaltens. Abbildung 46 zeigt, dass einige Schnittstellen ausgelassen wurden. Es ist natürlich von Interesse herauszufinden, warum diese Schnittstellen nicht erkannt wurden. Von Trypsin ist beispielsweise bekannt, dass es Arg und Lys nicht, bzw. schlechter schneiden kann, wenn C-terminal ein Prolin folgt^{212;213}. Des Weiteren ist die Hydrolyserate geringer, wenn sich in der unmittelbaren Umgebung der potentiellen Schnittstelle eine saure AS (Asp, Glu) befindet. Auch für LysN konnte gezeigt werden, dass die Hydrolyserate deutlich herabgesetzt ist, wenn in der AS-Sequenz unmittelbar vor dem Lysin ein Asp-Rest liegt¹³⁷. Die Beobachtung konnte in dieser Arbeit bestätigt werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass sich durch das etablierte Aufreinigungsprotokoll LysN, als auch die mutierte Form LysN_{E157D} in ausreichender Menge exprimieren lassen (ca. 1 mg / L Bakterienkultur). Zudem übertraf die Spezifität des aufgereinigten LysN, die von gekauften LysN. Schließlich konnte durch die Mutation eine Protease neuer Spezifität generiert werden, die den Pool der vorhandenen proteolytischen Enzyme ergänzt. Beide Metalloproteasen eignen sich somit gut für proteolytische Verdaus.

4.2 Korrelation der DALIS-Bildung und der Aktivierung in BMDCs und Makrophagen

Von Lelouard wurde 2002 erstmals das Phänomen der DALIS-Bildung beschrieben. Diese geordneten, transienten Strukturen bestehen aus polyubiquitinylierten Proteinaggregaten, für deren Bestehen eine stetige Proteinsynthese nötig ist³⁸. Zum Zeitpunkt der Entdeckung stellte Lelouard die These auf, dass es sich bei DALIS um eine Art Organell handelt, durch welches die Zelle die Degradierung von ubiquitinylierten Proteinen in gewisser Weise steuern und priorisieren kann. Dies wiederum hätte einen Effekt auf die Präsentation von MHC-Klasse-I Molekülen. In den letzten Jahren konnten einige neue Erkenntnisse, sowohl in der Entstehung als auch dem Abbau von DALIS gewonnen werden⁸². Trotzdem sind noch viele Fragen unbeantwortet, weshalb in dieser Arbeit die Mechanismen, die zur Bildung von DALIS führen, untersucht werden sollten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Bildung von DALIS mit dem Aktivierungsgrad der Zelle korreliert⁸⁵. Deshalb wurde zunächst durch Stimulation des TLR-4 mit LPS die Aktivierung der Zellen induziert. Abbildung 48 zeigt, dass die kostimulatorischen Moleküle in BMDCs, die mit LPS stimuliert wurden, hochreguliert wurden. Des Weiteren konnte eine verstärkte Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-12p40 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). In den durch LPS stimulierten Zellen, kam es zur Ausbildung der DALIS, deren transiente Natur sich dadurch zeigte, dass sie ca. 4-6 h nach Stimulation der Zelle gebildet wurden und die Strukturen nach 24-30 h nach Stimulation wieder verschwanden. In Zellen, die 12-15 h mit LPS induziert wurden, ließen sich mengenmäßig am meisten DALIS nachweisen, sowohl kleine, als auch größere Aggregate ($> 4 \mu\text{m}$) konnten detektiert werden. Im Vergleich dazu wurde in nicht aktivierten BMDCs und Makrophagen keine DALIS gebildet (siehe Abbildung 49). Das bedeutet, dass das Phänomen der DALIS-Bildung vornehmlich in aktivierten Zellen auftritt, in denen eine verstärkte Zytokinproduktion zu verzeichnen und die Expression von kostimulatorischen Molekülen hochreguliert ist. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass die kombinierte Zugabe zweier TLR-Liganden den Aktivierungsgrad der Zelle verstärkt und es auch zu einer vermehrten Bildung von DALIS kommt⁸⁶. Dies begründet sich darauf, dass durch die verschiedenen Stimuli unterschiedliche Signalwege aktiviert werden. Dies impliziert, dass *in vivo* die Menge des im Organismus vorkommenden Pathogens mit der Aktivierung der APZ und somit auch der DALIS-Bildung korreliert. Darüber hinaus konnte bewiesen werden, dass die DALIS-Bildung nicht nur als Antwort der TLR-Aktivierung ausgelöst wird. Vielmehr kann die DALIS-Bildung auch durch die Ligation von CD40³⁸ als auch einen Hitzeschock ausgelöst werden⁸⁴, sowie durch zellulären Stress, wie starke pH-

Wertänderungen und erhöhte Alkoholkonzentrationen²¹⁴. Somit ist die Bildung von DALIS auch von Umweltreizen abhängig. In diesem Zusammenhang spielen Hitzeschockproteine eine wichtige Rolle. Da diese Chaperone auch bei dem Abbau von Proteinaggregaten eine Rolle spielen²¹⁵, wurde untersucht, inwieweit sie an der Bildung von DALIS beteiligt sind. Dabei konnten zwei Chaperone bereits direkt in Verbindung mit DALIS gebracht werden. Durch Koloalisationsexperimente konnte gezeigt werden, dass Hsp70/Hsc70 und Hsp90 mit der DALIS-Bildung korrelieren⁸⁶. Von Hsp70/Hsc70 war es darüber hinaus bekannt, dass es am Abbau von Proteinaggregaten beteiligt ist²¹⁶. Somit könnten Chaperone dafür verantwortlich sein die Antigenpräsentation zeitlich zu steuern, da die Peptide zur MHC-Beladung aus DALIS stammen, deren Formierung und Abbau wiederum durch die Chaperone reguliert wird.

4.2.1 Das Verhalten der DALIS-Bildung in aktivierten BMDCs und Makrophagen unter Beeinflussung der Aktivierungskaskade

In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Untersuchung der Signalwege gelegt, die zur Aktivierung von DCs und Makrophagen und somit auch zur Bildung von DALIS führen. Dazu wurden einzelne Mitglieder der PI-3 Kinasekaskade inhibiert, von der bekannt ist, dass sie bei der Aktivierung von DCs eine Rolle spielt. Herter und Fassbender konnten zeigen, dass die PI-3 Kinase in die Bildung von DALIS bei BMDCs involviert ist^{186;85}. In dieser Arbeit wurde das Ergebnis durch den Einsatz des PI-3 Kinase Inhibitors Ly294002 (Abbildung 51) bestätigt. Des Weiteren konnte erstmals auch für Makrophagen gezeigt werden, dass eine Inhibition der PI-3 Kinasekaskade zur Inhibition der DALIS-Bildung führt, was impliziert, dass es nicht alleinig in DCs zur Aktivierung und damit einhergehender DALIS-Bildung kommt, sondern auch in Makrophagen. Im Falle von intrazellulären, bakteriellen Pathogenen, wie dem Tuberkulose auslösende Bakterium *Mycobacterium tuberculosis*²¹⁷, die Makrophagen befallen können, könnte diese Beobachtung eine wichtige Rolle spielen. In BMDCs konnte bereits gezeigt werden, dass Influenza-infizierte Zellen DALIS bildeten, in denen das Nukleoprotein nachgewiesen werden konnte¹⁸⁸. Um den Zusammenhang der Aktivierung von Makrophagen mit der einhergehenden DALIS-Bildung näher zu charakterisieren, wurden weitere Komponenten der PI-3 Kinasekaskade inhibiert und deren Auswirkung auf die DALIS-Bildung evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der „downstream“ von der PI-3 Kinase gelegenen Elemente Akt und mTOR mit einer deutlich verminderten DALIS-Bildung einhergingen. In LPS-stimulierten Makrophagen, in denen Akt inhibiert wurde waren nur noch in knapp 10 % der Zellen

DALIS detektierbar. In ca. 80 % der Zellen konnten zwar durch den FK-2 AK ubiquitinylierte Proteine detektiert werden, diese lagen aber nicht aggregiert vor, vielmehr traten sie diffus verteilt im gesamten Zytoplasma der Zelle auf. Wurde mTOR durch Rapamycin inhibiert kam es zu einem ähnlichen Effekt, hier zeigten sogar nur noch ca. 5 % der Zellen eine DALIS-Bildung. Zudem waren die erkennbaren DALIS zu großen Aggregaten (ca. 5 μ M) fusioniert. Durch die Inhibition von mTOR können die für die Proteinsynthese verantwortlichen Translationsfaktoren²¹⁸ eIF2G und eIF4E nicht initiiert werden. Sind diese jedoch inhibiert, können die Proteine, die in DALIS eingebaut würden, nicht synthetisiert werden. Somit unterstützt die beobachtete Auswirkung der Inhibition von mTOR die Beobachtung, dass die DALIS-Bildung eng an die Neusynthese von Proteinen geknüpft ist⁷⁷. Dies wiederum deckt sich mit Lelouards Beobachtungen, dass DRiPs in DALIS nachgewiesen wurden³⁸. DRiPs entstehen bei der Proteinsynthese und kommen durch inkorrekte Faltungen, Deletionen, oder vorzeitigen Translationsabbruch zustande und werden normalerweise direkt proteasomal degradiert. Sind die DRiPs aber in DALIS aggregiert, sind sie vorerst vom Abbau geschützt und besitzen somit in DALIS eine längere Halbwertszeit. Durch den Einbau von Puromycin wurden von Lelouard DRiPs markiert und mittels gegen Puromycin-spezifischen Antikörpern in DALIS nachgewiesen⁷⁷. Zudem konnten sie zeigen, dass die Degradierung von Proteinen, die in DALIS inkorporiert sind, verzögert ist.

4.2.2 DALIS-Bildung unter dem Aspekt der Apoptose

Es wurde die Ansicht vertreten, dass die Bildung von DALIS in Zellen stattfindet, wenn diese überstimuliert und apoptotisch werden, was bedeutet, dass die DALIS-Bildung von der Vitalität der Zellen abhängig ist⁸⁶. In diesem Zusammenhang wurde untersucht inwieweit sich die Inhibition verschiedener Caspasen auf die Bildung von DALIS und auswirkt. Caspasen sind wichtige Enzyme in der Einleitung der Apoptose. Dabei zeigte sich eine Hemmung der DALIS-Bildung wenn die Zellen mit einem Pancaspase-Inhibitor behandelt wurden, der die Gesamtheit aller Caspasen innerhalb einer Zelle inhibiert. Wurden hingegen die Caspasen-3 und 8 gehemmt, konnte nur noch in jeweils 30 % - 40 % der Zellen DALIS, die von normaler Morphologie waren, nachgewiesen werden. Allerdings konnten in ca. 60 % - 70 % der Zellen auch noch DALIS detektiert werden, allerdings zeigten diese Zellen auch diffus verteilte ubiquitinylierte Proteine im Zytoplasma. Diese Beobachtung konnte auch bei der Inhibition der PI-3 Kinasekaskade gemacht werden.

Allerdings ließen sich im Gegensatz dazu, in den Caspase-inhibierten Zellen auch noch DALIS nachweisen, auch wenn die Anzahl pro Zelle auf ca. drei reduziert war. Caspase-8 aktiviert als Initiatorcaspase die Effektorcaspase-3, welche zentrale Rollen in der Apoptose übernimmt. Des Weiteren konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass die Zellen bei alleinigem Einsatz des Pancaspase-Inhibitors ohne LPS-Stimulation keine DALIS bilden. Wurde nach Zugabe des Inhibitors zusätzlich mit LPS stimuliert, wurden DALIS gebildet, die in Anzahl und Morphologie denen gleichen, die in Zellen gebildet wurden, die ausschließlich mit LPS stimuliert wurden⁸⁶. Hier konnte gezeigt werden, dass in Makrophagen die Bildung von DALIS in LPS-stimulierten und mit Inhibitor behandelten Zellen zwar vermindert ist, aber nicht ausblieb. Würde ein direkter Zusammenhang zwischen der Caspase-induzierten Apoptose und der DALIS-Bildung bestehen, wäre zu erwarten gewesen, dass durch die Inhibition der Caspasen die DALIS-Bildung unterbunden wird. Somit kommt es zur Aggregation der Proteine in vitalen Zellen und nicht zur Einleitung der Apoptose.

Interessant ist der Aspekt, dass die Inhibition der proinflammatorischen Caspase-1 einer stark verminderten DALIS-Bildung in Zellen führte. Zwar bildeten noch ca. 80 % der Zellen DALIS, jedoch zum Großteil nur ein Aggregat pro Zelle, welches deutlich vergrößert war ($> 5 \mu\text{m}$). Caspase-1 ist eine proinflammatorische Caspase, welche nicht primär mit apoptotischen Prozessen zusammenhängt¹⁹⁰. Ist sie inhibiert, können die Zymogene der inflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-1 β nicht geschnitten und somit aktiviert werden¹⁹⁰. Ein weiterer Aspekt könnte die Pyroptose, oder Nekrose sein. Hierbei handelt es sich um Formen des programmierten Zelltodes, die sich von der Apoptose dahingehend unterscheiden, dass Caspase-1 von Nöten ist²¹⁹. Somit könnte es sein, dass die DALIS-Bildung zwar nicht mit der Apoptose zusammenhängt, aber mit anderen Formen des programmierten Zelltodes. Um diesen Zusammenhang zu klären, sind allerdings noch weitere Untersuchungen notwendig.

4.2.3 Mechanismen der DALIS-Bildung und damit verbundene Proteine

Die Proteine, die in DALIS vorkommen, sind weitestgehend unbekannt. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass Enzyme des Ubiquitin-Systems in DALIS vorkommen. Sowohl E1, E2, als auch die E3-Ligase CHIP konnten in DALIS nachgewiesen werden⁷⁷, kürzlich auch das Protein BAG-1⁸². Dies lässt auf den bereits erwähnten Zusammenhang der Chaperonmaschinerie und Antigenprozessierung in DALIS schließen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bildung von DALIS durch Inhibition der PI-3 Kinasekaskade beeinflusst ist. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass viele Inhibitoren nicht nur ihr Zielprotein inhibieren, sondern auch auf andere Proteine inhibitorische Effekte ausüben können. Des Weiteren ist es möglich, dass ein alternativer Signalweg eingeschlagen wird, wenn die einzelnen Mitglieder der PI-3 Kinase-Kaskade inhibiert werden und es somit trotzdem noch teilweise zur Bildung von DALIS kam, wenn auch vermindert. Die aussagekräftigste Methode, bestimmte Proteine in DALIS nachzuweisen, und deren Rolle zu evaluieren, wäre eine massenspektrometrische Analyse. Allerdings war es bis zur Fertigstellung der Experimente nicht möglich DALIS gezielt aufzureinigen. Es war zwar nachgewiesen worden, dass es sich um tritonunlösliche Strukturen handelt und diese sich somit von den meisten in Triton löslichen polyubiquitinierten Aggregaten trennen lassen, allerdings können DALIS durch diese Methode nicht rein isoliert werden. Mittlerweile ist es gelungen, DALIS-haltige Fraktionen durch einen diskontinuierlichen Sucrosegradienten anzureinigen und DALIS mittels eines „Filter-Trap“ Tests spezifisch aufzureinigen⁸². Bei dieser Methode werden die Proteinaggregate auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Schon vorher konnten durch diese Methode erfolgreich aggregierte Proteine von nicht aggregierten Proteinen getrennt werden^{220;221}. Mit dieser Methode sollte es möglich sein einzelne Komponenten der DALIS massenspektrometrisch zu analysieren. Kürzlich konnte u.a. durch Kolo-kalisation in DALIS gezeigt werden, dass in murinen Makrophagen und BMDCs sowohl die E3-Ligase CHIP, als auch das Ubiquitin-Domänenprotein BAG-1 für die DALIS-Bildung notwendig sind⁸². Demnach gibt es eine sogenannte frühe Phase (Aggregationsphase) in der die Ubiquitinligaseaktivität von CHIP unter der Kontrolle des CHIP-Inhibitors HspBP1 steht. Zu diesem Zeitpunkt wird der Inhibitor verstärkt exprimiert, danach geht die Expression zurück und zugleich werden vermehrt Antigene prozessiert und präsentiert. Die Arbeitsgruppe konnte ebenfalls zeigen, dass in der späten Phase (Präsentationsphase) das stressinduzierbare Hsp70 zusammen mit den degradationsstimulierenden Ko-Chaperonen BAG-1 und BAG-3 induziert werden. Durch das Zusammenspiel der Ko-Chaperone mit CHIP und dem Autophagie

Ubiquitin-Adaptermolekül p62 werden die DALIS-Strukturen aufgelöst. Dieses geschieht nach Kettern über den Weg, der durch Chaperone unterstützten selektiven Autophagie (kurz CASA, vom engl. chaperone-assisted selective autophagy)⁸². Somit konnte gezeigt werden, dass diese Zellen durch Adaption des Ko-Chaperonnetzwerkes in der Lage sind, die Aggregation und somit auch Antigenprozessierung und Präsentation gezielt zu steuern. Abbildung 58 zeigt die nach heutigem Wissensstand gültige Zusammenfassung der beteiligten Komponenten an der DALIS-Bildung-, und Auflösung.

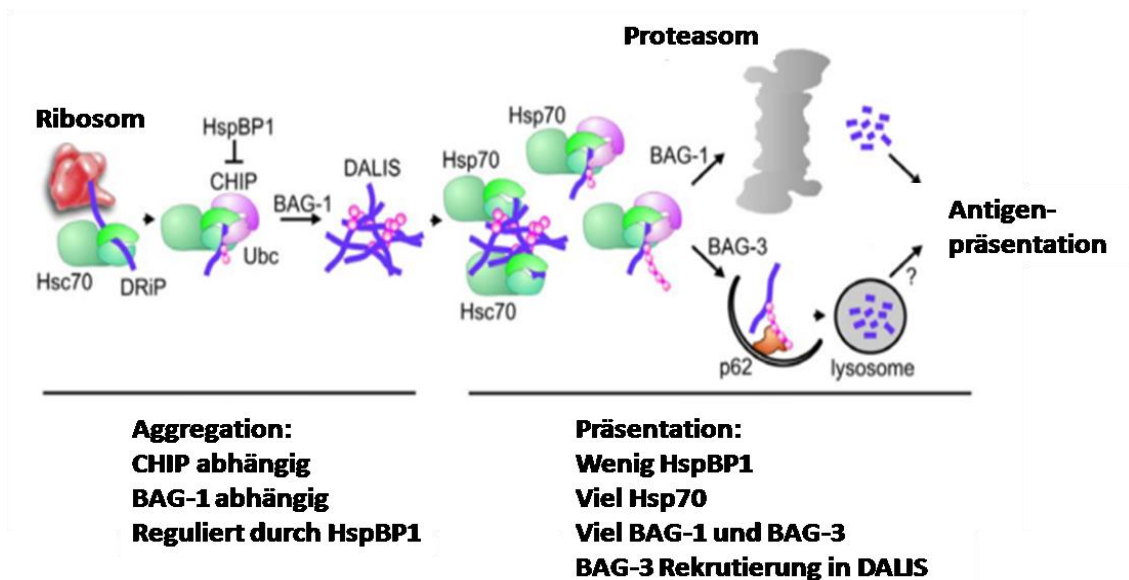


Abbildung 58: Das Hsc/Hsp70 Ko-Chaperon Netzwerk kontrolliert während der Reifung von BMDCs und Makrophagen die DALIS-Bildung⁸²

Die frühe Phase (Aggregationsphase) der Immunzellreifung ist durch die Bildung von DALIS gekennzeichnet und Hsc/Hsp70 bindet die neu translatierten DRiPs. Die Rekrutierung von CHIP führt zur Ubiquitinierung der DRiPs, wodurch sie in DALIS eingebaut werden. Die Ubiquitinierung wird durch den CHIP-Inhibitor HspBP1 reguliert. Des Weiteren wird BAG-1 zur DALIS-Bildung benötigt. In der späten Phase (Präsentationsphase) werden die DALIS abgebaut und es kommt zur Antigenpräsentation. Die Phase ist durch abnehmende HspBP1 Konzentrationen gekennzeichnet, hingegen werden Hsp70, BAG-1 und BAG-3 induziert. Durch diesen Wechsel werden die DRiPs prozessiert und präsentiert. Durch die Aktivität von BAG-3 und p62 werden die DALIS durch Chaperon-unterstützte selektive Autophagie aufgelöst.

V. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte ein Protokoll etabliert werden, wodurch sich LysN aus Einschlusskörperchen isolieren und durch IMAC in mg-Dimensionen aufreinigen lässt. Durch Zurückfaltung des Proteins in seine native Struktur konnte die Aktivität wieder hergestellt werden, was durch den Verdau von Testproteinen, sowie Zelllysate durch SDS-PAGE gezeigt werden konnte. Die massenspektrometrische Analyse eines proteolytischen BSA-Verdau durch aufgereinigtes LysN zeigte weiterhin, dass die Spezifität für Lysine sogar die von kommerziell erworbenem LysN um mehr als 30 % überschritt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Enzym in Gegenwart von denaturierenden Agenzien (bis zu 5 M Harnstoff) unverminderte Aktivität besitzt und in einem pH-Bereich von 5,0-10,0 enzymatisch aktiv ist. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass LysN durch DTT inhibiert wird. Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit eine Mutante von LysN generiert werden, die an Aminosäureposition 157 an Stelle von Glu (E) eine Asp (D) trägt. Die Spezifität dieser LysN_{optE157D}-Mutante änderte sich dahingehend, dass neben Lys auch Arg erkannt und N-terminal von der Asp hydrolysiert wird. Durch SDS-PAGE wurde bewiesen, dass die mutierte Protease, wie auch der Wildtyp in der Lage war Testproteine, wie auch Zelllysate zu verdauen. Ferner konnte in MS-Analysen der verdauten Testproteine gezeigt werden, dass die mutierte Form neben Lys (K) ebenfalls Arg (R) erkennt und N-terminal von diesem schneidet. Allerdings gibt es noch eine deutliche Präferenz für Lys gegenüber Arg. Weitere Versuche sind notwendig um die Spezifität für Arg weiter zu erhöhen, beispielsweise Modifikationen der Verdaubedingungen, oder weitere Punktmutationen einzelner Nukleotide die zu anderen Aminosäuren innerhalb des S1-Bindetasche (Substratbindungsstelle) des Enzyms führen und so die Spezifität für Arg erhöhen könnten. Bis zur Fertigstellung dieser Arbeit waren diese Versuche jedoch noch nicht abgeschlossen. Dennoch lassen sich LysN_{opt} und auch LysN_{optE157D} für proteolytische Verdau einsetzen, vor allem die biochemischen und physikalischen Eigenschaften machen sie hierfür besonders interessant. Durch die Etablierung des Protokolls ist es möglich, dass rekombinante Protein in ausreichender Menge zu isolieren, was sich bis dato als noch immer schwierig herausgestellt hat, weshalb es nur kostenspielig zu erwerben war. Vor allem durch die Generierung der mutierten Protease kann das Repertoire der bekannten Proteasen für proteolytische Verdau ergänzt werden, wodurch ein weiterer Schritt in der Proteomik gemacht werden kann. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit den Mechanismen DALIS-Bildung in BMDCs und Makrophagen.

DALIS sind polyubiquitinylierte, transiente Protein-Aggregate, die teilweise aus DRiPs bestehen und deren Bildung eng an die Aktivierung der Zelle geknüpft ist. Nach heutigem Verständnis geht man davon aus, dass sie als eine Art Antigendepot fungieren, die es dendritischen Zellen und Makrophagen ermöglichen in einem verlängerten Zeitraum auf diese Peptide zuzugreifen, sie zu prozessieren und diese in Kombination mit MHC-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche als Antigen zu präsentieren. In dieser Arbeit konnten die Mechanismen der Formierung von DALIS teilweise geklärt werden. Zunächst konnte gezeigt werden, dass durch Inhibition einzelner Mitglieder der LPS-induzierten Signaltransduktionskaskade die Bildung von DALIS nicht nur in BMDCs, sondern auch in Makrophagen vermindert wurde, oder fast komplett ausblieb. Dieses umfasste sowohl die PI-3 Kinase, Akt als auch mTOR. Vor allem die Inhibition von Akt führte dazu, dass nur noch 10 % der Zellen DALIS ausbilden konnten. Zusätzlich konnte die These, dass DALIS gebildet werden, wenn die Zelle durch Überstimulation apoptotisch wird, widerlegt werden. Wurden die Apoptose-Initiatorcaspase 8 und die Apoptose-Effektorcaspase 3 inhibiert, hatte dies nur einen geringen Effekt auf die Bildung von DALIS, was bedeutet, dass die Zellen im Zuge der DALIS-Bildung vital sind. Allerdings konnte erstmals gezeigt werden, dass die Inhibition der inflammatorischen Caspase-1 einen starken Effekt sowohl auf die Bildung, als auch auf die Morphologie von DALIS hat. In diesem Zusammenhang muss die Rolle der DALIS-Bildung im Zuge der Pyroptose, einer weiteren Form des programmierten Zelltodes, analysiert werden. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse bezüglich der Bildung von DALIS und deren Rolle während der Entstehung einer Immunantwort geklärt werden.

VI. Abkürzungsverzeichnis

In das Abkürzungsverzeichnis wurden keine SI-Einheiten, oder Abkürzungen die im Duden zu finden sind, aufgenommen. Ferner wurden der Einbuchstabencode und der Dreibuchstabencode die in der Arbeit verwendet wurden hier nicht berücksichtigt.

a	anti
AS	Aminosäure(n)
ACN	Acetonitril
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APC	Antigen Presenting Cell, Antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BMDCs	<i>bone marrow derived dendritic cells</i>
beta1i	Immunoproteasom-Untereinheit beta 1i
beta2i	Immunoproteasom-Untereinheit beta 2i
beta5i	Immunoproteasom-Untereinheit beta 5i
beta5t	Thymoproteasom-Untereinheit beta 5t
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
Cy7	Cyanfarbstoff
Da	Dalton
DALIS	dendritic aggresome-like induced structures
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC (s)	dendritische Zelle(n) (vom engl. <i>dendritic cell</i>)
DDA	<i>Data Directed Acquisition</i>
DMEM	<i>Dulbecco 's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DRiPs	<i>defective ribosomal product</i>
DTT	Dithiothreitol
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

et al.	und andere
eGFP	enhanced <i>Green Fluorescent Protein</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	Electrospray Ionisation
ESI-Q-TOF	<i>Electrospray ionization quadrupole time of flight</i>
EtOH	Ethanol
FA	<i>formic acid</i> ; Ameisensäure
FCS	fetal calf serum; fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
G418	Geneticin
HABA	2'-(4-Hydroxyphenyl)-azo-benzoesäure
HCl	Hydrogenchlorid/Salzsäure
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> ; Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> ; Meerrettich-Peroxidase
IAA	Iodacetamid
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN-γ	Interferon-γ
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilo Dalton
LB-Medium	<i>lysogeny broth medium</i>
LC/MS	<i>Liquid chromatography / mass spectrometry</i>
LPS	Lipopolysaccharid
m	murin
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation</i> ; Matrix- unterstützte Laser-Desorption-Ionisation
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i> , multiple Klonierungsstelle
MeOH	Methanol
MEP	Metalloendopeptidase

MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> ; Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	<i>messenger-RNA</i> ; Boten-RNA
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
MW	molecular weight; Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
Na ₃ VO ₄	Natrium Orthovanadat
NH ₄ HCO ₃	Ammonium Hydrogencarbonat
N-terminal	Amino-terminal
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Per-CP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Complex
pfu	<i>plaque forming unit</i> , Plaque-formierende Einheit
pH	Potentia Hydrogenii
PI	Propidiumiodid
PI 3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIS	<i>precursor ion scanning</i> ; Vorläufer-Ionen-Analyse
PLGS	ProteinLynx Global Server
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	<i>parts per million</i>
pSer	Phosphoserin
PTM	Post-translationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
REN	Restriktionsendonuklease
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RP	<i>reversed phase</i> ; Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SSC	sideward scatter
T _a	annealing temperature
TBS/T	<i>Tris buffered saline</i> / Tween
TCR	<i>T-cell receptor</i> , T-Zellrezeptor

Abkürzungsverzeichnis

TEMED	N, N, N, N, N'- tetramethylethylendiamin
Tfb	Transformation Buffer; Transformationspuffer
TierSchG	Tierschutzgesetz
T _m	<i>melting temperature</i> ; Schmelztemperatur
TM10%	Test Medium 10%
TOF	<i>Time of Flight</i>
Trp	Trypsin
U	Unit(s)
Ub	Ubiquitin
ü.N.	über Nacht
Üs	Überstand
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

VII. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schaubild der Hämatopese aus pluripotenten Stammzellen	2
Abbildung 2: Übersicht über die Aktivierung naiver T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abbildung 3: LPS induzierter Signaltransduktionsweg des TLR-4 in Mammalia	10
Abbildung 4: Schematische Struktur der MHC-I-, und MHC-II-Moleküle	12
Abbildung 5: Übersicht über die Herkunft der Antigene, der daraus resultierenden Peptide und an der Antigenprozessierung beteiligten Zellkompartimente ²⁸	13
Abbildung 6: Die Ubiquitinylierung von Proteinen und das Schicksal der markierten Proteine ⁴²	15
Abbildung 7: IFN- γ induzierter Austausch der Proteasomuntereinheiten und Inkorporation der Untereinheit $\beta 5t$ in das Thymoproteasom	17
Abbildung 8: Der Zusammenhang von DALIS in MHC-Klasse-I restringierter Antigenpräsentation	20
Abbildung 9: Schema der beteiligten Proteine innerhalb der PI-3/Akt Signaltransduktionskaskade	22
Abbildung 10: Phylogenetischer Stammbaum der humanen Caspasen der CED3 Protease Familie (abgeändert nach ⁸⁸)	23
Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers und der Electrospray-Ionisation	25
Abbildung 12: Übersicht über entstehenden Peptidfragmente protonierter Peptide ¹⁰³	28
Abbildung 13: Klassifizierung der Metalloendopeptidasen	33
Abbildung 14: Schematischer Aufbau des Western-Blots (lokalisiert, 01.12.2011)	57
Abbildung 15: Prinzip des Nachweises von Proteinen mittels eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers (modifiziert nach http://advansta.com).	59
Abbildung 16: Detaillierte Darstellung der wichtigen Elemente des pET26b (+) Vektors, inklusive Promoter, Operator, Signalsequenz, Stopp-Signal und dem His-Tag	68
Abbildung 17: Aufbau eines Q-Tof- Massenspektrometers	78
Abbildung 18: Die kodierende Aminosäuresequenz der Peptidyl-Metalloendopeptidase LysN	81
Abbildung 19: 3D-Modelle der Peptidyl-Metalloendopeptidase LysN _{opt}	82
Abbildung 20: Die Expressionsvektoren pET26b(+) für LysN _{opt} und LysN _{optE157D}	83
Abbildung 21: Der pCR2.1 –Topo Vektor und der Expressionsvektor pET26b(+) für LysN _{opt} und LysN _{optE157D} mit eliminiertes pelB Signalsequenz	84
Abbildung 22: SDS-PAGE Gel der Induktion von LysN _{opt}	85
Abbildung 23: SDS-PAGE Gel der periplasmatischen Aufreinigung von LysN _{opt}	86
Abbildung 24: SDS-PAGE Gel der Fraktionen der nativen His-Tag Aufreinigung von LysN _{opt}	88
Abbildung 25: Entsalzung des rekombinanten Proteins	89
Abbildung 26: Aufreinigung von LysN _{opt} durch die Kationentauschersäule MonoS	90
Abbildung 27: SDS-PAGE Gel und Aktivitätsassay des aufgereinigten LysN _{opt}	92
Abbildung 28: Massenspektrometrische Daten der tryptisch verdauten Proteinbanden der SDS-PAGE Analyse von LysN _{optE157D}	94
Abbildung 29: Die Vektoren pVL 1393 Mellitin LysN _{opt} und pVL 1393 Mellitin LysN _{optE157D} für die Expression der rekombinanten Proteine in Sf-9 Zellen	95
Abbildung 30: Etabliertes Versuchsprotokoll zur Infektion von Sf-9 Zellen zur Expression rekombinanter Proteine	96
Abbildung 31: Infizierte Sf-9 Zellen exprimieren GFP-fusioniertes Protein nach 72 h Infektion	97
Abbildung 32: SDS-PAGE Gel der aufgereinigten Einschlusskörperchen	100

Abbildung 33: Denaturierende Aufreinigung von LysN _{optE157D} über das His-Tag	101
Abbildung 34: Denaturierende His-Tag Aufreinigung mittels einer Cobaltsäule	102
Abbildung 35: Sequenzabdeckungen der rekombinanten Proteine, sowie seiner Dimere und Trimere	105
Abbildung 36: Profil der Gelfiltration des rekombinanten Proteins mit der dazugehörigen SDS-PAGE Analyse der Fraktionen	106
Abbildung 37: Zurückfaltung von LysN _{opt} aus denaturierten Einschlusskörperchen	107
Abbildung 38: Azocaseinassay von zurückgefaltetem LysN _{opt} und LysN _{optE157D} zur Überprüfung der Aktivität	108
Abbildung 39: Verdau verschiedener Testproteine und Zelllysate mit LysN _{optE157D}	110
Abbildung 40: Bestimmung des Enzym-Substratverhältnisses der rekombinanten Metalloendopeptidasen zum Testprotein BSA	111
Abbildung 41: Verdau von Serumalbumin (BSA) durch LysN _{opt} und LysN _{optE157D} in Anwesenheit des Detergenz Harnstoff sowie unterschiedlichen pH-Werten	113
Abbildung 42: Zeitwerte des Verdau von BSA durch LysN _{opt} und LysN _{optE157D}	114
Abbildung 43: Verminderte Aktivität von LysN _{opt} und LysN _{optE157D} in Gegenwart von DTT, bzw. EDTA	115
Abbildung 44: Sequenzabdeckung von Serumalbumin Peptiden generiert durch LysN _{optE157D}	117
Abbildung 45: Spezifität der rekombinanten Metalloendopeptidasen LysN _{opt} und LysN _{optE157D} im Vergleich zu LysN _{rek}	118
Abbildung 46: Erkannte und ausgelassene Schnittstellen der rekombinanten Metalloendopeptidasen im Vergleich zu LysN _{rek}	119
Abbildung 47: Reinheitsbestimmung der BMDCs und Analyse ihres Aktivierungszustandes	122
Abbildung 48: Expression der Oberflächenmoleküle in LPS-stimulierten BMDCs im Vergleich zu unstimulierten Zellen.	123
Abbildung 49: DALIS-Bildung in BMDCs nach Stimulation mit LPS	124
Abbildung 50: Verminderte Expression des Oberflächenmoleküls CD80 in PI-3 Kinase Kaskade-inhibierten BMDCs	125
Abbildung 51: Der PI-3 Kinase Inhibitor Ly294002 verringert die DALIS-Bildung	126
Abbildung 52: Verminderte DALIS-Bildung in stimulierten RAW309 Zellen unter dem Einfluss der Inhibitoren Akt-IV und Rapamycin	127
Abbildung 53: Veränderungen der DALIS-Anzahl in PI-3 Kinase inhibierten Zellen	128
Abbildung 54: Auswirkung der Inhibition verschiedener Caspasen auf die LPS-induzierte DALIS-Bildung in Makrophagen	129
Abbildung 55: Veränderungen der DALIS-Anzahl in Caspase-inhibierten Zellen	131
Abbildung 56: Die Bindungsstelle des Zinkatoms durch die entsprechenden Zink-Liganden und die S1'-Bindetasche von LysN	139
Abbildung 57: Vergleich der Schnittmuster einer hypothetischen Peptidsequenz durch verschiedene Proteasen	141
Abbildung 58: Das Hsc/Hsp70 Ko-Chaperon Netzwerk kontrolliert während der Reifung von BMDCs und Makrophagen die DALIS-Bildung	149

VIII. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahl einiger Proteasen für proteolytische Verdaus	31
Tabelle 2: Geräte.....	35
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.....	37
Tabelle 4: Chemikalien und Medienzusätze.....	39
Tabelle 5: Liste der verwendeten Inhibitoren	45
Tabelle 6: Primer und Oligonukleotide	46
Tabelle 7: Liste der verwendeten DC-Antikörper für durchflusszytometrische Analysen .50	50
Tabelle 8: Verwendete Fluorochrome in alphabetischer Reihenfolge	52
Tabelle 9: Übersicht über die Zusammensetzung der SDS-Gele	56
Tabelle 10: Primär- und Sekundärantikörper für Western Blots.	59
Tabelle 11: Übersicht über einen klassischen PCR-Ansatz	66
Tabelle 12: Schritte und Temperaturen eines typischen PCR-Programmes.....	67
Tabelle 13: Die Bedingungen eines HPLC-Laufs.....	77
Tabelle 14: Identifizierte Proteine der massenspektrometrischen Analyse des In-Gel Verdaus des aufgereinigten rekombinanten Proteins.....	103
Tabelle 15: Überblick der gebräuchlichsten Expressionssysteme und deren Vorteile.....	133

IX. Literaturverzeichnis

1. Mikkola, H. K. a & Orkin, S. H. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* **133**, 3733–44 (2006).
2. Ardavin, C. *et al.* Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends in immunology* **22**, 691–700 (2001).
3. Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology* **2**, 675–80 (2001).
4. Mckenna, K., Beignon, A. & Bhardwaj, N. Plasmacytoid Dendritic Cells : Linking Innate and Adaptive Immunity. *The Journal of Virology* **79**, 17–27 (2005).
5. Aderem & Underhill, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology* **17**, 593–623 (1999).
6. Krippendorf, B. & Riley, D. Distinguishing unloading- versus reloading-induced changes in rat soleus muscle. *Muscle & nerve* **16**, 99–108 (1993).
7. St Pierre, B. a & Tidball, J. G. Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. *The Journal of applied physiology* **77**, 290–7 (1994).
8. Steinman Identification of a novel cell type in peripheral during the course of observations on the cells of mouse spleen that adhere to glass and plastic surfaces , it was clear that this population was quite hetero- geneous . *The Journal Of Experimental Medicine* **141**, 1142–1162 (1973).
9. Tomlinson, S. Complement defense mechanisms. *Current opinion in immunology* **5**, 83–9 (1993).
10. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. a & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *The Journal of immunology* **175**, 5–14 (2005).
11. Harrington, L. E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology* **6**, 1123–32 (2005).
12. Veldhoen, M. *et al.* Transforming growth factor-beta “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature immunology* **9**, 1341–6 (2008).
13. Stockinger, B. & Veldhoen, M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Current opinion in immunology* **19**, 281–6 (2007).
14. Ivanova, I. a & Dagnino, L. Activation of p38- and CRM1-dependent nuclear export promotes E2F1 degradation during keratinocyte differentiation. *Oncogene* **26**, 1147–54 (2007).
15. Qian, H. & Cooper, J. a Temporal cooperativity and sensitivity amplification in biological signal transduction. *Biochemistry* **47**, 2211–20 (2008).

16. Poltorak, a. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science* **282**, 2085–2088 (1998).
17. Schletter, J. *et al.* Binding of lipopolysaccharide (LPS) to an 80-kilodalton membrane protein of human cells is mediated by soluble CD14 and LPS-binding protein. *Infection and immunity* **63**, 2576–80 (1995).
18. Park, C. T. & Wright, S. D. Plasma lipopolysaccharide-binding protein is found associated with a particle containing apolipoprotein A-I, phospholipid, and factor H-related proteins. *The Journal of biological chemistry* **271**, 18054–60 (1996).
19. Wagner, E. F. AP-1--Introductory remarks. *Oncogene* **20**, 2334–5 (2001).
20. Smolinska, M. J., Page, T. H., Urbaniak, A. M., Mutch, B. E. & Horwood, N. J. Hck Tyrosine Kinase Regulates TLR4-Induced TNF and IL-6 Production via AP-1. *The Journal of immunology* **187**, 6043–51 (2011).
21. Graff. R Minor Histocompatibility Genes and Their Antigens. *Immunogenetics* **7**, 367–373 (1978).
22. Madden, D. R., Gorga, J. C., Strominger, J. L. & Wiley, D. C. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* **70**, 1035–48 (1992).
23. Rötzschke, 1990 Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells.pdf. *Letters to Nature* **348**, 252–254 (1990).
24. Fremont, D. H., Stura, E. a, Matsumura, M., Peterson, P. a & Wilson, I. a Crystal structure of an H-2Kb-ovalbumin peptide complex reveals the interplay of primary and secondary anchor positions in the major histocompatibility complex binding groove. *PNAS* **92**, 2479–83 (1995).
25. Elliott, T., Elvin, J., Cerundolo, V., Allen, H. & Townsend, A. Structural requirements for the peptide-induced conformational change of free major histocompatibility complex class I heavy chains. *The European journal of immunology* **22**, 2085–91 (1992).
26. Stern, Brown, Jardetzky, G. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* **368**, 215–221 (1994).
27. Hiltbold, E. M. & Roche, P. a Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway. *Current opinion in immunology* **14**, 30–5 (2002).
28. Heath, W. R. & Carbone, F. R. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nature reviews. Immunology* **1**, 126–34 (2001).
29. Den Haan, J. M., Lehar, S. M. & Bevan, M. J. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* **192**, 1685–96 (2000).
30. Reits, E. a, Vos, J. C., Grommé, M. & Neefjes, J. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* **404**, 774–8 (2000).

31. Yewdell, J. W., Schubert, U. & Bennink, J. R. At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. *The Journal of cell science* **114**, 845–51 (2001).
32. Khan, S. *et al.* Cutting edge: neosynthesis is required for the presentation of a T cell epitope from a long-lived viral protein. *The Journal of immunology* **167**, 4801–4 (2001).
33. Dolan, B. P., Li, L., Takeda, K., Bennink, J. R. & Yewdell, J. W. Defective ribosomal products are the major source of antigenic peptides endogenously generated from influenza A virus neuraminidase. *The Journal of immunology* **184**, 1419–24 (2010).
34. Princiotta, M. F. *et al.* Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* **18**, 343–54 (2003).
35. Schubert, U. *et al.* Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* **404**, 770–4 (2000).
36. Voo, K. S. *et al.* Evidence for the presentation of major histocompatibility complex class I-restricted Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 peptides to CD8+ T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* **199**, 459–70 (2004).
37. Reits, E. *et al.* Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* **18**, 97–108 (2003).
38. Lelouard, H. *et al.* Transient aggregation of ubiquitinated proteins during dendritic cell maturation. *Nature* **417**, 177–82 (2002).
39. Kloetzel, P. M. Antigen processing by the proteasome. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 179–87 (2001).
40. Ball, P., Benveniste, J. & Randi, J. Chemistry Nobel for trio who revealed molecular death-tag. *Nature* **431**, 729 (2004).
41. Broemer, M. & Meier, P. Ubiquitin-mediated regulation of apoptosis. *Trends in cell biology* **19**, 130–40 (2009).
42. Perrett, C. A., Lin, D. Y.-W. & Zhou, D. Interactions of bacterial proteins with host eukaryotic ubiquitin pathways. *Frontiers in microbiology* **2**, 143 (2011).
43. Kisselev, a F., Akopian, T. N., Woo, K. M. & Goldberg, a L. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *The Journal of biological chemistry* **274**, 3363–71 (1999).
44. Coux, O., Tanaka, K. & Goldberg, a L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annual review of biochemistry* **65**, 801–47 (1996).
45. Seeger, M., Ferrell, K. & Dubiel, W. The 26S proteasome: a dynamic structure. *Molecular biology reports* **24**, 83–8 (1997).

46. Ciechanover, A. The Ubiquitin Proteasome System in Neurodegenerative Diseases. *Neuron* **40**, 427–446 (2003).
47. Groll, Ditzel, L. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **368**, 463–471 (1997).
48. Wang, C. C. *et al.* Biochemical analysis of the 20 S proteasome of *Trypanosoma brucei*. *The Journal of biological chemistry* **278**, 15800–8 (2003).
49. Heinemeyer, W., Gruhler, A., Möhrle, V., Mahé, Y. & Wolf, D. H. PRE2, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked RING10 gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *The Journal of biological chemistry* **268**, 5115–20 (1993).
50. Fehling, H. J. *et al.* MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science* **265**, 1234–7 (1994).
51. Rock, K. L. & Goldberg, a L. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annual review of immunology* **17**, 739–79 (1999).
52. Groettrup, M. *et al.* The interferon-gamma-inducible 11 S regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 subunits govern the peptide production by the 20 S proteasome in vitro. *The Journal of biological chemistry* **270**, 23808–15 (1995).
53. Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K. & Rechsteiner, M. Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *The Journal of biological chemistry* **267**, 22369–77 (1992).
54. Rechsteiner, M., Realini, C. & Ustrell, V. The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. *The Biochemical journal* **345 Pt 1**, 1–15 (2000).
55. Tanahashi, N. *et al.* Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *The Journal of biological chemistry* **275**, 14336–45 (2000).
56. Wang, J. & Maldonado, M. a The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cellular & molecular immunology* **3**, 255–61 (2006).
57. Eleuteri, a M., Kohanski, R. a, Cardozo, C. & Orłowski, M. Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). Replacement of X, Y, and Z subunits by LMP7, LMP2, and MECL1 and changes in properties and specificity. *The Journal of biological chemistry* **272**, 11824–31 (1997).
58. Murata, S. *et al.* Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* **316**, 1349–53 (2007).
59. Murata, S., Takahama, Y. & Tanaka, K. Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides. *Current opinion in immunology* **20**, 192–6 (2008).

60. Nitta, T. *et al.* Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8+ T cells. *Immunity* **32**, 29–40 (2010).
61. Cascio, P., Hilton, C., Kisselev, a F., Rock, K. L. & Goldberg, a L. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *The EMBO journal* **20**, 2357–66 (2001).
62. Tomkinson, B. Tripeptidyl peptidases: enzymes that count. *Trends in biochemical sciences* **24**, 355–9 (1999).
63. Stoltze, L. *et al.* Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nature immunology* **1**, 413–8 (2000).
64. Rockel, B., Kopec, K. O., Lupas, A. N. & Baumeister, W. Structure and function of tripeptidyl peptidase II, a giant cytosolic protease. *Biochimica et biophysica acta* **1824**, 237–45 (2012).
65. Saric, T. *et al.* An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nature immunology* **3**, 1169–76 (2002).
66. Saric, T. *et al.* Major histocompatibility complex class I-presented antigenic peptides are degraded in cytosolic extracts primarily by thimet oligopeptidase. *The Journal of biological chemistry* **276**, 36474–81 (2001).
67. Daumke, O. & Knittler, M. R. Functional asymmetry of the ATP-binding-cassettes of the ABC transporter TAP is determined by intrinsic properties of the nucleotide binding domains. *European journal of biochemistry / FEBS* **268**, 4776–86 (2001).
68. Deverson MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Letters to Nature* **348**, 738–741 (1990).
69. Suh, W. K. *et al.* Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing. *Science* **264**, 1322–6 (1994).
70. Gorbulev, S., Abele, R. & Tampe, R. Transport , and ATP hydrolysis of the ABC. *PNAS* **98**, 3732–3737 (2001).
71. Androlewicz, M. J., Cresswell, P. & Hughes, H. How Selective Is the Transporter Associated with Antigen Processing ? *Cell Press* **5**, 1–5 (1996).
72. Neefjes, J. J., Momburg, F. & Hämmerling, G. J. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* **261**, 769–71 (1993).
73. Lankat-Buttgereit, B. & Tampé, R. The transporter associated with antigen processing: function and implications in human diseases. *Physiological reviews* **82**, 187–204 (2002).
74. Canadien, V. *et al.* Cutting edge: microbial products elicit formation of dendritic cell aggresome-like induced structures in macrophages. *The Journal of immunology* **174**, 2471–5 (2005).

75. Kopito, R. R. Inclusion bodies and protein aggregation. *Cell* **68**, 524–530 (2000).
76. Heath, C. M., Windsor, M. & Wileman, T. Aggresomes Resemble Sites Specialized for Virus Assembly 7. *Cell* **153**, 449–455 (2001).
77. Lelouard, H. *et al.* Dendritic cell aggresome-like induced structures are dedicated areas for ubiquitination and storage of newly synthesized defective proteins. *The Journal of cell biology* **164**, 667–75 (2004).
78. Goldberg, A. L. Degradation of Abnormal Proteins in Escherichia coli. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **69**, 422–426 (1972).
79. Vazquez, D., Barbacid, M. & Carrasco, L. Inhibitors of mammalian protein synthesis. *Hämatologie und Bluttransfusion* **14**, 327–40 (1974).
80. Giddings, M. R. & Inglis, M. S. Kinetics of degradation of “short-” and “long-lived” proteins in cultured mammalian cells. *Cell Biology International* **4**, (1980).
81. Lelouard, H. *et al.* Regulation of translation is required for dendritic cell function and survival during activation. *The Journal of cell biology* **179**, 1427–39 (2007).
82. Kettern, N., Rogon, C., Limmer, A., Schild, H. & Höhfeld, J. The Hsc/Hsp70 co-chaperone network controls antigen aggregation and presentation during maturation of professional antigen presenting cells. *PloS one* **6**, e16398 (2011).
83. Alberti, S. *et al.* Ubiquitylation of BAG-1 suggests a novel regulatory mechanism during the sorting of chaperone substrates to the proteasome. *The Journal of biological chemistry* **277**, 45920–7 (2002).
84. DeFillipo, A. M., Dai, J. & Li, Z. Heat shock-induced dendritic cell maturation is coupled by transient aggregation of ubiquitinated proteins independently of heat shock factor 1 or inducible heat shock protein 70. *Molecular immunology* **41**, 785–92 (2004).
85. Fassbender, M., Herter, S., Holtappels, R. & Schild, H. Correlation of dendritic cell maturation and the formation of aggregates of poly-ubiquitinated proteins in the cytosol. *Medical microbiology and immunology* **197**, 185–9 (2008).
86. Fassbender Untersuchung der Modulation adaptiver Immunantworten in Abhängigkeit der Reifung dendritischer Zellen Dissertation. (2008).
87. Chen, Y.-H. *et al.* Letter to the Editor: The change of the cortisol levels in children with ADHD treated by methylphenidate or atomoxetine. *Journal of psychiatric research* **87**, 53711 (2011).
88. Sprengart, M. L., Wati, M. R. & Porter, A. G. Caspase-3 Is Required for DNA Fragmentation and Associated with Apoptosis *. *Biochemistry* 9357–9360 (1998).
89. Fischer, U., Jänicke, R. U. & Schulze-Osthoff, K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell death and differentiation* **10**, 76–100 (2003).

90. Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T. & Vandenabeele, P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell death and differentiation* **14**, 44–55 (2007).
91. Wilkins, H. From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino analysis. *Bio/Technology* **14**, 61–65 (1996).
92. Sowell, A., Hersberger, K. E., Kaufman, T. C. & Clemmer, D. E. Examining the Proteome of Drosophila Across Organism Lifespan research articles. *The Journal of Proteome Research* 3637–3647 (2007).
93. Hubbard, M. J. & Cohen, P. On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends in biochemical sciences* **18**, 172–7 (1993).
94. Andersson Mass spectrometric studies on amino acid and peptide derivatives. *Acta Chem. Scand.* **6**, (1958).
95. Meng, F., Forbes, A. J., Miller, L. M. & Kelleher, N. L. Detection and localization of protein modifications by high resolution tandem mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews* **24**, 126–34 (2005).
96. Link, a J. *et al.* Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature biotechnology* **17**, 676–82 (1999).
97. Delahunty, C. & Yates, J. R. Protein identification using 2D-LC-MS/MS. *Methods* **35**, 248–55 (2005).
98. Steen, H. & Mann, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 699–711 (2004).
99. Glish, G. L. & Goeringer, D. E. A tandem quadrupole/time-of-flight instrument for mass spectrometry/mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **56**, 2291–2295 (1984).
100. McLuckey, S. a, Goeringer, D. E. & Glish, G. L. Collisional activation with random noise in ion trap mass spectrometry. *Analytical chemistry* **64**, 1455–60 (1992).
101. Eng, J. K., McCormack, A. L. & Yates, J. R. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **5**, 976–989 (1994).
102. Roepstorff Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical mass spectrometry* **11**, 1984 (1984).
103. Pappin, D. J. C., Creasy, D. M. & Cottrell, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data Proteomics and 2-DE. *Electrophoresis* **20**, 3551–3567 (1999).
104. Meyer, B., Papatotiriou, D. G. & Karas, M. 100% Protein Sequence Coverage: a Modern Form of Surrealism in Proteomics. *Amino acids* **41**, 291–310 (2011).

105. Hedstrom, L. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical reviews* **102**, 4501–24 (2002).
106. Ovaere, P., Lippens, S., Vandenabeele, P. & Declercq, W. The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends in biochemical sciences* **34**, 453–63 (2009).
107. Rawlings Families of serine peptidases. *Methods in enzymology* **244**, 1994 (1994).
108. Promega Certificate of Analysis Sequencing Grade Modified Trypsin : Usage Notes : (2009).
109. Aebersold, R. & Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198–207 (2003).
110. Olsen, J. V, Ong, S.-E. & Mann, M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **3**, 608–14 (2004).
111. Liener, E., Viswanathat, T. & Series, S. J. *The inhibition of trypsin*. (1955).
112. Klammer, M. Effects of Modified Digestion Schemes on the Identification of Proteins from Complex Mixtures. *J. Proteome Res.* **5**, 695–700 (2008).
113. Swaney, D. L., Wenger, C. D. & Coon, J. J. The value of using multiple proteases for large-scale mass spectrometry-based proteomics. *J. Proteome Res.* **9**, 1323–1329 (2010).
114. Houmard, J. & Drapeau, G. R. Staphylococcal protease: a proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds. *PNAS* **69**, 3506–9 (1972).
115. Scheler, C. *et al.* Peptide mass fingerprint sequence coverage from differently stained proteins on two-dimensional electrophoresis patterns by matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS). *Electrophoresis* **19**, 918–27 (1998).
116. Seeley, E. H., Riggs, L. D. & Regnier, F. E. Reduction of non-specific binding in Ga(III) immobilized metal affinity chromatography for phosphopeptides by using endoproteinase glu-C as the digestive enzyme. *Journal of chromatography. B* **817**, 81–8 (2005).
117. Michalski, W. P. & Shiell, B. J. Strategies for analysis of electrophoretically separated proteins and peptides. *Analytica Chimica Acta* **383**, (1999).
118. Patterson, S. D. Protein identification and characterization by mass spectrometry. *Current protocols in molecular biology* **Chapter 10**, Unit 10.22 (2001).
119. Nie, A.-Y. *et al.* In vivo termini amino acid labeling for quantitative proteomics. *Analytical chemistry* **83**, 6026–33 (2011).

120. Noreau, J. & Drapeau, G. R. Isolation and properties of the protease from the wild-type and mutant strains of *Pseudomonas fragi*. *Journal of bacteriology* **140**, 911–6 (1979).
121. Wang, L., Amphlett, G., Lambert, J. M., Blättler, W. & Zhang, W. Structural characterization of a recombinant monoclonal antibody by electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Pharmaceutical research* **22**, 1338–49 (2005).
122. Molina, H., Horn, D. M., Tang, N., Mathivanan, S. & Pandey, A. Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *PNAS* **104**, 2199–204 (2007).
123. Eliuk, S. M., Maltby, D., Panning, B. & Burlingame, A. L. High resolution electron transfer dissociation studies of unfractionated intact histones from murine embryonic stem cells using on-line capillary LC separation: determination of abundant histone isoforms and post-translational modifications. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **9**, 824–37 (2010).
124. Phanstiel, D. *et al.* Mass spectrometry identifies and quantifies 74 unique histone H4 isoforms in differentiating human embryonic stem cells. *PNAS* **105**, 4093–8 (2008).
125. Chi, A. *et al.* Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. *PNAS* **104**, (2007).
126. Fischer, F. & Poetsch, A. Protein cleavage strategies for an improved analysis of the membrane proteome. *Proteome science* **4**, 2 (2006).
127. Rietschel, B. *et al.* Elastase digests: new ammunition for shotgun membrane proteomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **8**, 1029–43 (2009).
128. Schlosser, a, Pipkorn, R., Bossemeyer, D. & Lehmann, W. D. Analysis of protein phosphorylation by a combination of elastase digestion and neutral loss tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry* **73**, 170–6 (2001).
129. Schlosser, A., Bodem, J., Bossemeyer, D., Grummt, I. & Lehmann, W. D. Identification of protein phosphorylation sites by combination of elastase digestion, immobilized metal affinity chromatography, and quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry. *Proteomics* **2**, 911–8 (2002).
130. Gauci, S. *et al.* Lys-N and trypsin cover complementary parts of the phosphoproteome in a refined SCX-based approach. *Analytical chemistry* **81**, 4493–501 (2009).
131. Blundell Metalloproteinase superfamilies and drug design. *Structural biology* **1**, 73–75 (1994).
132. Hase, C. C. & Finkelstein, R. A. Bacterial Extracellular Zinc-Containing Metalloproteases. *Microbiological Reviews* **57**, 823–837 (1993).
133. Nonaka, T., Dohmae, N., Hashimoto, Y. & Takio, K. Amino acid sequences of metalloendopeptidases specific for acyl-lysine bonds from *Grifola frondosa* and

- Pleurotus ostreatus fruiting bodies. *The Journal of biological chemistry* **272**, 30032–9 (1997).
134. Taouatas, N., Heck, A. J. R. & Mohammed, S. Evaluation of Metalloendopeptidase Lys-N Protease Performance under Different Sample Handling Conditions. *Journal of Proteome Research* **9**, 4282–4288 (2010).
135. Hori, T. *et al.* Structure of a new 'aspzincin' metalloendopeptidase from *Grifola frondosa*: implications for the catalytic mechanism and substrate specificity based on several different crystal forms. *Acta Crystallographica* **57**, 361–368 (2001).
136. Fushima, Sites, N. E. W. Z., Catalytically, T. & Mutagenesis, S. Aspzincin, a Family of Metalloendopeptidases with a New Zinc-binding Motif. *The Journal of biological chemistry* **274**, 24195–24201 (1999).
137. Nonaka, T., Hashimoto, Y. & Takio, K. Kinetic characterization of lysine-specific metalloendopeptidases from *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. *The Journal of biochemistry* **124**, 157–62 (1998).
138. Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J., Mccawley, A. & Al, V. E. T. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* **13**, 0–4 (1977).
139. Fulwyler Electronic Separation of biological cells by volume. *Science* **150**, 910–911 (1965).
140. Laemmli Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
141. Neuhoff Dependence of Particle and Fiber Properties. *Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen* 255–262 (1988).
142. Kang, D., Gho, Y. S., Suh, M. & Kang, C. Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull. Korean Chem. Soc.* **23**, 1511–1512 (2002).
143. Candiano, G. *et al.* Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**, 1327–33 (2004).
144. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS* **76**, 43504354 (1992).
145. Phillips, P. K., Prior, D. & Dawes, B. A modified azoalbumin technique for the assay of proteolytic enzymes for use in blood group serology. *Journal of clinical pathology* **37**, 329–31 (1984).
146. Roberts, R. J. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Research* **31**, 1805–1812 (2003).

147. Adkins, S. & Burmeister, M. Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations. *Analytical biochemistry* **240**, 17–23 (1996).
148. Waring, M. J. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *The Journal of Molecular Biology* **13**, 269–282 (1965).
149. Lehman, I. R. DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science* **186**, 790–7 (1974).
150. Scherr, M. & Scherr, D. Meilenstein der Molekularbiologie: Das „Avery-Experiment“. *Biologie in unserer Zeit* **33**, 58–61 (2003).
151. Ullmann Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase gene of *Escherichia coli*. *The Journal of Molecular Biology* **24**, 339–343 (1967).
152. Mullis Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 263–273 (1986).
153. Saiki, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–91 (1988).
154. Weissmann Site-directed mutagenesis: Effect of an extracistronic mutation on the in vitro propagation of bacteriophage Q β RNA. *PNAS* **72**, 367–371 (1975).
155. Sullivan, 1988 An improved procedure for measuring DNA replication with transient assays in eukaryotic cells. *Gene analysis techniques* **5**, 54–6 (1988).
156. Hauser Expressed protein ligation using an N-terminal cysteine containing fragment generated in vivo from pelB fusion protein. *Protein Expression Purification* **54**, 227–233 (2008).
157. Lei, S. P., Lin, H. C., Wang, S. S., Callaway, J. & Wilcox, G. Characterization of the *Erwinia carotovora* pelB gene and its product pectate lyase. *The Journal of bacteriology* **169**, 4379–83 (1987).
158. Stein, W. & Moore, S. A look back: adventures in the matrix. *Nature Methods* **3**, 2006 (2006).
159. Moore, J. C., Basic, T. & Dmu, T. Gel Permeation Chromatography . I . A New Method for Molecular Weight Distribution of High Polymers. *Journal of Polymer Science* **2**, 835–843 (1964).
160. Waters, 2007 RapigeSt Sf Surfactant [Care and Use ManUal]. 3–6 (2007).
161. Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J. C. & Ferrara, P. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Analytical biochemistry* **203**, 173–9 (1992).
162. Wilm, 1996 Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Letters to Nature* **379**, 466–469 (1996).

163. Tenzer, S. *et al.* Antigen processing influences HIV-specific cytotoxic T lymphocyte immunodominance. *Nature immunology* **10**, 636–46 (2009).
164. Healy, V., O'Connell, J., McCarthy, T. V & Doonan, S. The lysine-specific proteinase from *Armillaria mellea* is a member of a novel class of metalloendopeptidases located in Basidiomycetes. *Biochemical and biophysical research communications* **262**, 60–3 (1999).
165. Dupre Sequencing Lys-N Proteolytic Peptides by ESI and MALDI Tandem Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 265–279 (2011).doi:10.1007/s13361-010-0022-7
166. Rajmakers, R., Neerincx, P. & Heck, A. J. R. Cleavage specificities of the brother and sister proteases. *ChemComm* **46**, 8827–8829 (2010).
167. Shuman, S. Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase *. *Biochemistry* 32678–32684 (1994).
168. Hengen Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*. *Computer Corner* 285–268 (1993).
169. Miller, L. K. Baculoviruses as gene expression vectors. *Annual review of Microbiology* 1–39 (1988).
170. Luckow Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology* **6**, 47–55 (1988).
171. Davidson, D. J., Fraser, M. J. & Castellino, F. J. Oligosaccharide Processing in the Expression of Human Plasminogen cDNA by Lepidopteran Insect (*Spodoptera frugiperda*) Cells ? *Biochemistry* **29**, 5584–5590 (1990).
172. Jarvis, F. Biochemical Analysis of the N-Glycosylation pathway in baculovirus-infected lepidopteran insect cells. *Virology* **212**, 500–511 (1995).
173. Grabenhorst, E., Hofer, B., Nimtz, M., Jager, V. & Conradt, H. S. Biosynthesis and secretion of human interleukin 2 glycoprotein variants from baculovirus-infected Sf21 cells Characterization of polypeptides and posttranslational modifications. *European journal of biochemistry* **215**, 189–197 (1993).
174. Invitrogen Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVS) and Insect Cell Culture Techniques. *System* 1–30
175. Baneyx, F. & Mujacic, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature biotechnology* **22**, 1399–408 (2004).
176. Ventura, S. & Villaverde, A. Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends in biotechnology* **24**, (2006).
177. Singh, S. M. & Panda, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of bioscience and bioengineering* **99**, 303–10 (2005).
178. Palmer, I. Preparation and Extraction of Insoluble (Inclusion-Body) Proteins from *Escherichia coli*. *Current Protocols in Protein Science* **6.3.1-6.3.**, 1–18 (2004).

179. Benelmekki, M., Xuriguera, E., Caparros, C., Rodríguez-carmona, E. & Mendoza, R. Journal of Colloid and Interface Science Design and characterization of Ni²⁺ and Co²⁺ decorated Porous Magnetic Silica spheres synthesized by hydrothermal-assisted modified-Stöber method for His-tagged proteins separation. *Journal of Colloid And Interface Science* **365**, 156–162 (2012).
180. Clontech TALON™ Products. *Most* 3–20
181. Healthcare, G. Superose 6 PC 3.2/30. *Matrix* **30**, 1–8 (2006).
182. Vrentas, C. E., Onstot, S. & Nicholson, E. M. A comparative analysis of rapid methods for purification and refolding of recombinant bovine prion protein. *Protein expression and purification* **82**, 380–388 (2012).
183. Nishiwaki, T. Purification and characterization of an aminopeptidase from the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **65**, 424–427 (2001).
184. Polgár, L., Szigetvári, A., Löw, M., Kóródi, I. & Balla, E. Metalloendopeptidase QG. Isolation from *Escherichia coli* and characterization. *The Biochemical journal* **273** (Pt 3, 725–31 (1991).
185. Cleland Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* **3**, 480–482 (1962).
186. Herter, S. *et al.* Dendritic cell aggresome-like-induced structure formation and delayed antigen presentation coincide in influenza virus-infected dendritic cells. *The Journal of immunology* **175**, 891–8 (2005).
187. Philpott, N. J., Nociari, M., Elkon, K. B. & Falck-Pedersen, E. Adenovirus-induced maturation of dendritic cells through a PI3 kinase-mediated TNF-alpha induction pathway. *PNAS* **101**, 6200–5 (2004).
188. Herter, S. Hitzeschockproteine als Indikatoren der Wundheilung und Koordination von Reifung und Antigenpräsentation bei Dendritischen Zellen der Maus. *Naturwissenschaften* (2005).
189. Lin, C. *et al.* Caspase activation in equine influenza virus induced apoptotic cell death. *Veterinary microbiology* **84**, 357–65 (2002).
190. Mariathasan, S. *et al.* Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Letters to Nature* **430**, 213–8 (2004).
191. Novagen Ni-NTA His • Bind Resins Novagen. 1–32
192. Amersham Gel Filtration. 1–124 (2002).
193. Hopp, P. A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Bio/Technology* **6**, 1204–1210 (1988).

194. Lee, A. S. *et al.* A novel capture-ELISA for detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) based on c-myc peptide recognition in carboxy-terminally tagged recombinant neutrophil serine proteases. *Journal of immunological methods* **307**, 62–72 (2005).
195. Schmidt, T. G. M. & Skerra, A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nature protocols* **2**, 1528–35 (2007).
196. Invitrogen Bac-to Bac. 1–46 (2009).
197. Invitrogen Cellfectin II. 1 (2011).
198. Invitrogen Growth and Maintenance of Insect Cell Lines. 1–33 (2010).
199. Porowińska, D., Marszałek, E. & Wardęcka, P. Renaturacja in vitro białek zakumulowanych w ciałach inkluzyjnych In vitro renaturation of proteins from inclusion bodies. *Postepy Hig Med Dosw* 322–329 (2012).
200. Ito, L. *et al.* Glutathione Ethylester, a Novel Protein Refolding Reagent, Enhances both the Efficiency of Refolding and Correct Disulfide Formation. *The protein journal* (2012).doi:10.1007/s10930-012-9427-4
201. Sigma Endoproteinase Lys-c. 1–2 (1998).
202. Sigma Endoproteinase Asp-N suitable for protein sequencing and peptide mapping. 1–3 (1995).
203. Pham, V. T., Ewing, E., Kaplan, H., Choma, C. & Hefford, M. A. Glycation improves the thermostability of trypsin and chymotrypsin. *Biotechnology and bioengineering* **101**, 452–9 (2008).
204. Watanabe, H. *et al.* Deregulation of histone lysine methyltransferases contributes to oncogenic transformation of human bronchoepithelial cells. *Cancer cell international* **8**, 15 (2008).
205. Sarg, B., Koutzamani, E., Helliger, W., Rundquist, I. & Lindner, H. H. Postsynthetic trimethylation of histone H4 at lysine 20 in mammalian tissues is associated with aging. *The Journal of biological chemistry* **277**, 39195–201 (2002).
206. Fushimi Aspincin , a Family of Metalloendopeptidases with a New Zinc-binding Motif. *The Journal of biological chemistry* **274**, 24195–24201 (1999).
207. Bode, W., Walter, J., Huber, R., Wenzel, H. R. & Tschesche, H. The refined 2.2-Å (0.22-nm) X-ray crystal structure of the ternary complex formed by bovine trypsinogen, valine-valine and the Arg15 analogue of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *European journal of biochemistry / FEBS* **144**, 185–90 (1984).
208. Marquardt The Geometry of the Reactive Site and of the Peptide Groups in Trypsin , Trypsinogen and Its Complexes with Inhibitors. *Acta Crystallographica* **B39**, 480–490 (1983).

209. Biniossek, M. L. & Schilling, O. Enhanced identification of peptides lacking basic residues by LC-ESI-MS/MS analysis of singly charged peptides. *Proteomics* **12**, 1303–9 (2012).
210. Stensballe, a, Jensen, O. N., Olsen, J. V., Haselmann, K. F. & Zubarev, R. a Electron capture dissociation of singly and multiply phosphorylated peptides. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **14**, 1793–800 (2000).
211. Mirgorodskaya, E., Roepstorff, P. & Zubarev, R. a Localization of O-glycosylation sites in peptides by electron capture dissociation in a Fourier transform mass spectrometer. *Analytical chemistry* **71**, 4431–6 (1999).
212. Thiede, B. *et al.* Analysis of missed cleavage sites, tryptophan oxidation and N-terminal pyroglutamylation after in-gel tryptic digestion. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* **14**, 496–502 (2000).
213. Rodriguez, J., Gupta, N., Smith, R. D. & Pevzner, P. a Does trypsin cut before proline? *The Journal of proteome research* **7**, 300–5 (2008).
214. Szeto, J. *et al.* ALIS are Stress-Induced Protein Storage Compartments for Substrates of the Proteasome and Autophagy ND RIB. *Autophagy* **2**, 189–199 (2006).
215. Srivastava Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: Chaperoning of the Innate and Adaptive Immune Responses. *Annual review of immunology* **20**, 395–425 (2002).
216. Wang, Q., Mosser, D. D. & Bag, J. Induction of HSP70 expression and recruitment of HSC70 and HSP70 in the nucleus reduce aggregation of a polyalanine expansion mutant of PABPN1 in HeLa cells. *Human Molecular Genetics* **14**, 3673–3684 (2005).
217. Glickman, M. S., Jacobs, W. R., York, N. & Ave, M. P. Microbial pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: Dawn of a discipline. *Cell* **104**, 477–485 (2001).
218. Bumann, M. *et al.* Crystal structure of the yeast eIF4A-eIF4G complex: An RNA-helicase controlled by protein – protein interactions. *PNAS* **105**, 9564–9569 (2008).
219. Fink, S. L. & Cookson, B. T. Apoptosis , Pyroptosis , and Necrosis : Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity* **73**, 1907–1916 (2005).
220. Chang, E. & Kuret, J. Detection and quantification of tau aggregation using a membrane filter assay. *Analytical biochemistry* **373**, 330–6 (2008).
221. Scherzinger, E. *et al.* Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* **90**, 549–58 (1997).

X. Publikationen und Lebenslauf

Krämer-Albers, E.M.*, Bretz, N., Tenzer, S., Winterstein, C., Möbius, W., **Berger, H.**, Nave, K.A., Schild, H. and Trotter, J. (2007) Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? **Proteomics Clin. Appl.** **11**, 1446-1461.

Tenzer, S., Hain, T., **Berger, H.**, Schild, H. Purification of large scale cytosolic proteases for *in vitro* assays - 20S and 26S proteasomes
Methods Molecular Biology accepted for publication

:

