

Aus dem Institut für Physiologische Chemie – Abteilung Biochemie
Medizinische Fakultät
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Guido Posern

Generierung und Charakterisierung spezifischer monoklonaler und polyklonaler Antikörper gegen humanes Cathepsin F

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Nadine Wickboldt
geboren am 13.08.1979 in Halle/Saale

Gutachter:

1. Prof. Dr. Guido Posern; Institut für Physiologische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. Bernd Wiederanders; Institut für Biochemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Prof. Dr. Dieter Brömme; Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of British Columbia, Vancouver, Kanada

Datum der Eröffnung: 26. Februar 2013

Datum der Verteidigung: 22. November 2013

Halle/Saale, den 19. Januar 2013

*Meinen lieben Eltern,
Kerstin und Manfred Robr,
und meinen lieben Großeltern*

Referat

Cathepsin F (CF) ist ein proteolytisches Enzym der Papain-Familie der Cystein-Proteasen, zu der 15 humane Cathepsine zählen [1]. Die Cathepsine spielen eine entscheidende Rolle in der endosomalen bzw. lysosomalen Proteolyse [2-3]. Cathepsin F wird in vielen Geweben exprimiert [4-5] und übt eine allgemeine Funktion als intrazelluläre *housekeeping* Protease aus, wie z. B. die Cathepsine B, C, H, L, O und X [6-7]. Cathepsin F hat zudem spezifische Funktionen, wie z. B. in bestimmten Zellen des Immunsystems [8], im Lipoprotein- [9] und Kollagenstoffwechsel [10], im Nervensystem [11-12] und ist vermutlich für die Tumorgenese von Bedeutung [4-5, 13]. Seine optimale Aktivität entfaltet es im sauren pH-Bereich von 5,2-6,8, wie er in den Lysosomen vorliegt [4-5, 14-15]. Cathepsin F, das 1998 erstmals beschrieben wurde [4], bildet mit Cathepsin W (CW) eine neue Subgruppe der Cathepsine, die der CF-ähnlichen Proteasen, die strukturell mit anderen Cystein-Cathepsinen verwandt ist [16-17]. Pro-Cathepsin F (484 Aminosäuren [AS]; 53,4 kDa [5]) besteht aus einer Signalsequenz von 19 AS [5], einem Propeptid von 251 AS [5], das das Sequenzmotiv ERFNAQ [4] enthält, das ebenso in CW vorkommt und eine Modifikation des in Cathepsin L-ähnlichen Proteasen konservierten ERW/FNIN-Sequenzmotiv [16] darstellt und dem katalytisch aktiven reifen Teil des Enzyms von 214 AS (reifes CF: 23,6 kDa) [5]. Das Gen für CF befindet sich wie das CW-Gen auf dem langen Arm des Chromosom 11 (11q13.1-13.3) [5, 16-18]. Die Aminosäuresequenzen von CF und CW weisen eine Sequenzidentität von 42% und eine Sequenzhomologie von 58% auf [4].

Im Gegensatz zu den anderen Cathepsinen ist nicht viel über CF bekannt und seine Funktionen sind nicht vollständig geklärt. Dies ist u. a. auf das Fehlen spezifischer monoklonaler Antikörper in der Vergangenheit zurückzuführen.

Inhalt der vorliegenden Arbeit war es, spezifische und kreuzreaktivitätsfreie monoklonale (mAk) und polyklonale Antikörper (pAk) zu generieren, zu charakterisieren (mittels ELISA, Immunoblot und Epitopkartierung) und in der Immunpräzipitation und Immunhistochemie einzusetzen, da zu Beginn dieser Arbeit die Expression von CF nur auf Transkriptionsebene [4-5, 14] nicht aber auf Proteinebene beschrieben worden war.

In dieser Arbeit wurden Antikörper (Ak) gegen humanes rekombinantes CF aus *Escherichia coli* und gegen mehrere spezifische CF-Peptide generiert. Aus ca. 7.000 Hybridomen wurden monoklonale CF-spezifische Ak (CF77-3C2, CF77-4D1, CF169-6H12) selektiert. Zudem wurden gegen CF gerichtete pAk („Franzi“, „Fritzi“) generiert. Alle Ak zeigten keine Kreuzreaktion mit dem eng verwandten CW. Der pAk „Fritzi“ präzipitierte CF aus HeLa-S3-Zellen, die CF überexprimieren. In immunhistochemischen Untersuchungen der Kolonmukosa, des Herz- (Kardiomyozyten) und Lebergewebes (Hepatozyten und Gallengangepithel) wurde CF nachgewiesen. Im Thymus wurde kein CF detektiert. Die in der Literatur beschriebene Expression von humanem CF auf Transkriptionsebene der einzelnen Gewebe konnte damit auf Proteinebene bestätigt werden [4-5, 14]. Der zum Vergleich dienende, kommerziell erhältliche pAk „Santa Cruz“ zeigte identische Ergebnisse. Cathepsin F wurde zudem (von den mAk CF77-4D1 und CW39-2E2, ein mit CF kreuzreagierender gegen CW generierter Ak bzw. den pAk „Franzi“ und „Fritzi“) in den arteriellen Gefäßen der Herz- und Leberschnitte detektiert. Dies ist evtl. auf das Vorhandensein atherosklerotischer Veränderungen zurückzuführen, da CF in der Intima normaler Arterien nur schwach, jedoch in entzündlichen Infiltraten (v. a. durch Makrophagen) atherosklerotisch veränderter Gefäße vermehrt exprimiert wird [19].

Die vorliegenden Resultate bestätigen die erfolgreiche Generierung von spezifischen Ak gegen CF und geben einen Überblick über das Vorkommen von CF auf Proteinebene. Zur Klärung weiterer gewebspezifischer Funktionen von CF müssen weiterführende Untersuchungen z. B. mittels der gewonnenen spezifischen Ak erfolgen.

Inhaltsverzeichnis

1	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	IV
2	EINLEITUNG	1
2.1	Zielstellung: Generierung und Charakterisierung von monoklonalen und polyklonalen anti-Cathepsin F-Antikörpern	1
2.2	Cystein-Proteasen der Papain-Familie	1
2.3	Cystein-Cathepsine	2
2.4	Cathepsin F	4
2.4.1	Cathepsin F und seine Charakteristika	4
2.4.2	Bedeutung von Cathepsin F für verschiedene physiologische und pathophysiologische Prozesse	8
2.4.3	Cathepsin F als Forschungsthema	11
3	MATERIAL UND METHODEN	12
3.1	Chemikalienverzeichnis	12
3.2	Materialien	14
3.3	Stammlösungen und Puffer	15
3.4	Zelllinien	15
3.5	Antikörper	16
3.6	Humanes Cathepsin F	17
3.7	Generierung von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern gegen humanes Cathepsin F	17
3.7.1	Immunisierung	17
3.7.2	Serumgewinnung	18
3.7.3	Zellhybridisierung - Fusion	18
3.8	Charakterisierung der monoklonalen und polyklonalen anti-Cathepsin F-Antikörper	22
3.8.1	Indirekter Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)	22
3.8.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	22
3.8.3	Proteinfärbung	23
3.8.4	Immunoblotting	24
3.8.5	Epitope Mapping	25
3.8.6	Immunglobulinreinigung	27
3.8.7	Konzentrierung von Antikörpern	28
3.8.8	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	28
3.9	Gewinnung von Cathepsin F aus einer humanen Tumorzelllinie	29
3.9.1	Kultivierung der Karzinomzelllinie HeLa-S3	29
3.9.2	Herstellung von Zellysaten	29
3.9.3	Immunpräzipitation	30

3.10	Isotypbestimmung	30
3.11	Kreuzreaktivität	30
3.12	Immunhistochemie	31
3.12.1	In der Immunhistochemie eingesetzte Gewebe	31
3.12.2	Vorbereitung der immunhistochemischen Analysen	31
3.12.3	Antikörper	32
3.12.4	Visualisierung mittels LSAB-Methode und Diaminobenzidin-Reaktion	32
3.12.5	Gegenfärbung mit Hämalaun	33
3.12.6	Konservierung der Präparate	33
3.12.7	Negativkontrolle und Positivkontrolle	33
3.12.8	Bewertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate	33
3.13	Massenspektrometrie	33
4	ERGEBNISSE	35
4.1	Gewinnung von Cathepsin F und Cathepsin F-Peptiden	35
4.1.1	Cathepsin F-Aminosäuresequenz	35
4.1.2	Cathepsin F und Cathepsin F-Peptide	35
4.2	Gewinnung von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern gegen humanes Cathepsin F	38
4.3	Charakterisierung der monoklonalen und polyklonalen anti-Cathepsin F-Antikörper	39
4.3.1	Charakterisierung der anti-Cathepsin F-Antikörper mittels proteinchemischer Methoden	39
4.3.2	Kreuzreaktivität der monoklonalen anti-Cathepsin F-Antikörper	42
4.3.3	Gewinnung von Cathepsin F aus einer humanen Tumorzelllinie	44
4.3.4	Immunhistochemie	45
4.4	Ergänzende Ergebnisse	49
4.4.1	Antikörper gegen E. coli-Proteine	49
4.4.2	Kreuzreaktivität der anti-Cathepsin F-Antikörper	51
5	DISKUSSION	53
5.1	Gewinnung von Cathepsin F und Cathepsin F-Peptiden	53
5.2	Monoklonale und polyklonale Antikörper gegen humanes Cathepsin F	53
5.2.1	Einfluß des Immunisierungsprotokolls auf die Bildung der Antikörper-Subtypen	54
5.2.2	Einfluß der Immunisierung auf den Antikörper-Titer	55
5.3	Gewinnung von Cathepsin F aus einer humanen Tumorzelllinie	55
5.4	Detektion von Cathepsin F in der Immunhistochemie	56
5.5	Ausblick	57
6	LITERATURVERZEICHNIS	58
7	THESEN	71
8	ANHANG	i

8.1	Lebenslauf	i
8.2	Selbständigkeitserklärung	iv
8.3	Erklärung über frühere Promotionsversuche	v
8.4	Danksagung	vi

1 Verzeichnis der Abkürzungen

μ	mikro (1*10 ⁻⁶)
%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	<i>Antigen-Presenting Cell</i> (Antigen-präsentierende Zelle)
apoB-100	Apolipoprotein(apo)B-100
aqua dest., bidest., tridest.	Aqua destillata, bidestillata, tridestillata
AS	Aminosäure
AS-Sequenz	Aminosäuresequenz
ATP	Adenosintriphosphat
BM	Basalmembran
bzgl.	Bezüglich
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CF, CW etc.	Cathepsin F, Cathepsin W etc.
CLIP	<i>CLass II-associated Invariant chain Peptide</i>
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DNA	<i>DeoxyriboNucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced ChemiLuminescence</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
et al.	et alii
F(ab ²)	<i>Fragment antigen-binding</i>
Fc	<i>Fragment crystalline</i>
FKS	Fetales Kälberserum

g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H+L	<i>Heavy and Light chain</i> (schwere und leichte Kette)
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin (Medienzusätze für die Selektion von Hybridomklonen)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	<i>HorseRadish Peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HT	Hypoxanthin, Thymidin (Medienzusätze nach der Selektion von Hybridomklonen)
IFA	inkomplettes Freundsches-Adjuvans
Ig; IgG, IgM etc.	Immunglobulin; Immunglobulin G, Immunglobulin M etc.
Ii	invariante Kette
Iip10	kleinstes Fragment der invarianten Kette (Ii) von 10 kDa
IP	Immunpräzipitation
k	kilo (1*10 ³)
KFA	komplettes Freundsches-Adjuvans
KK	Konjugatkontrolle (<i>second step control</i>)
KÜ	Kulturüberstand
L	Liter
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
LSAB	<i>Labelled StreptAvidin-Biotin</i>
m	Meter oder milli (1*10 ⁻³)
M	Molarität
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization-Time-Of-Flight</i>
2-ME	2-Mercaptoethanol
MHC-II	<i>Major Histocompatibility Complex class-II</i>
min	Minute
MM	Molmasse
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MS	Massenspektrometrie

n	nano ($1 \cdot 10^{-9}$)
NCL	neuronale Ceroid-Lipofuszinose
P	Peptid
p. a.	pro analysis
Pa	Pascal
PAK	Primärantikörper
pAk	polyklonaler Antikörper
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIC	<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>
POD	Peroxidase
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAK	Sekundärantikörper
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> (Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
Tab.	Tabelle
TP	Tandempeptid
TPI	Triosephosphatisomerase
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
v/v	<i>volume/volume</i>
vgl.	vergleiche
w/v	<i>weight/volume</i>
x g	-fache Erdbeschleunigung
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Englische Fachbegriffe werden in *kursiver Schreibweise* dargestellt. Die Bezeichnung der Aminosäuren erfolgt nach dem Einbuchstabencode auf der Grundlage der IUPAC-IUB-Nomenklatur [20]. Länderbezeichnungen werden nach der internationalen Nomenklatur ISO 3166-1-Alpha 2 vorgenommen [21].

2 Einleitung

2.1 Zielstellung: Generierung und Charakterisierung von monoklonalen und polyklonalen anti-Cathepsin F-Antikörpern

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, monoklonale und polyklonale Antikörper gegen humanes Cathepsin F (CF) zu generieren und zu charakterisieren. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war CF nur auf Transkriptionsebene jedoch nicht auf Proteinebene in verschiedenen Geweben nachgewiesen worden [4-5, 14]. Die Funktionen von CF, z. B. im Proteinstoffwechsel, sind weitestgehend ungeklärt, was u. a. auf das bisherige Fehlen spezifischer, insbesondere monoklonaler Ak (mAk) gegen CF zurückzuführen ist. Spezifische Antikörper (Ak), wie in dieser Dissertationsarbeit generiert, könnten für diagnostische und therapeutische Ansätze von Bedeutung sein.

2.2 Cystein-Proteasen der Papain-Familie

Cathepsin F gehört zu den Cystein-Proteasen, einer der vier Hauptgruppen der proteolytischen Enzyme, die von einer Vielzahl von Organismen, u. a. Pflanzen, Viren, Bakterien, Protozoen, Helminthen, Insekten und Säugetieren exprimiert werden [22-26]. Die Cystein-Proteasen erfüllen verschiedene Funktionen: im intrazellulären Protein-*Turnover* [27], bei der viralen Proteolyse, in Signalkaskaden, bei der Apoptose und als extrazelluläre Proteasen [28]. Diese Gruppe der proteolytischen Enzyme lässt sich in mehr als 20 Familien, u. a. die Papaine, die Calpaine, die Streptopaine, die viralen Cystein-Proteasen und die Caspasen unterteilen [2]. Die größte Subgruppe der Cystein-Proteasen stellt die Papain-Familie [29] mit einer Vielzahl von Enzymen in Pro- und Eukaryoten dar [23, 29]. Es lassen sich innerhalb der Papain-Familie 15 Cathepsine, sogenannte C1-Peptidasen (u. a. die Cathepsine B, F, H, L, S, W) unterscheiden [1, 30], die eine Schlüsselfunktion in der endosomalen bzw. lysosomalen Proteolyse einnehmen [2-3]. Die Abbildung 1 gibt einen Überblick über die phylogenetische Verwandtschaft der einzelnen Cathepsine.

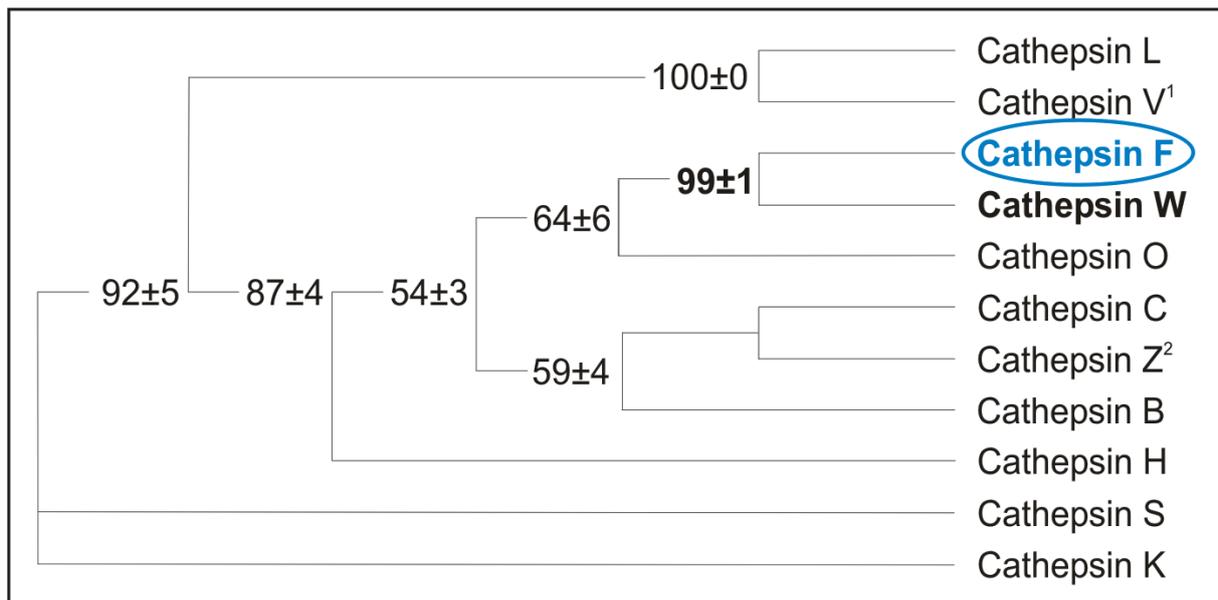


Abb. 1. Schematische Darstellung der evolutionären Verwandtschaft humaner Cystein-Cathepsine.

Phylogenetischer Stammbaum basierend auf der Aminosäuresequenz von 11 humanen Cathepsinen der Papain-Familie; in Anlehnung an Wex et al. [16] und an Santamaria et al. [5].

¹ Cathepsin V wird auch als Cathepsin L2, M oder U bezeichnet.

² Cathepsin Z ist ebenfalls unter den Bezeichnungen Cathepsin P oder X bekannt.

2.3 Cystein-Cathepsine

Expressionsmuster. Die Cathepsine lassen sich nach ihrer Gewebsverteilung in 2 Gruppen unterteilen: (1) Cathepsine mit ubiquitärem Expressionsmuster: die Cathepsine B [31], C [32], F [4], H [33-34], L [35-36], O [37-38] und Z (auch CP oder CX genannt) [14, 39-42]. Die Cathepsine haben einerseits eine entscheidende Funktion als intrazelluläre *housekeeping* Proteasen in der unspezifischen terminalen Proteinspaltung [6-7, 37]. Andererseits üben sie auch spezifische Funktionen in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen aus (siehe 2.3 Cystein-Cathepsine; Funktion), wie z. B. Cathepsin L, das zum einen eine entscheidende Rolle in der Prozessierung der invarianten Kette (Ii) des *Major Histocompatibility Complex class-II* (MHC-II) in kortikalen Thymus-Epithelzellen spielt und damit für die positive Selektion von CD4⁺ T-Lymphozyten entscheidend ist [43] und das zum anderen für die Regulation der Proliferation basaler Keratinozyten und Haarfollikel-epithelzellen notwendig ist [44].

(2) Cathepsine mit gewebsspezifischer Expression [45-46]: die Cathepsine J [47], K [48], S [49], V [30, 50] und W [51]. Cathepsin J wird während der späten Gestationsphase in der Plazenta exprimiert, wo es eine Rolle bei der Implantation des Embryos und für die Plazentaentwicklung bzw. -funktion spielt [47]. Cathepsin K kommt in hoher Konzentration in Osteoklasten vor und beeinflusst den Knochenabbau [48, 52-55]. Mutationen im humanen CK-Gen können zur Pyknodysostose, einer autosomal-rezessiv vererbten Osteochondrodysplasie führen [56]. Cathepsin S [49, 57] wird in verschiedenen Zellen des lymphatischen Gewebes [58-59] exprimiert und ist essentiell für die spezifische Degradation der Ii des MHC-II-Komplexes in Antigen-präsentierenden Immunzellen [60-63]. Weiterhin spielt CS eine Rolle in der Makrophagen-vermittelten Gewebsdestruktion [49]. Cathepsin W wird v. a. in zytotoxischen CD8⁺ T-

Lymphozyten und natürlichen Killerzellen exprimiert und ist für die Immunantwort von Bedeutung [51]. Cathepsin V (auch Cathepsin L2, M oder U genannt), das eng mit CL verwandt ist, kann im Thymus, wo es vermutlich in der positiven T-Zell-Selektion involviert ist [30, 50, 64-65], im Korneaepithel [66] und in den Testis [30], wo es eine mögliche Rolle in Fertilitätsprozessen spielt [50], detektiert werden.

Zudem spielen proteolytische Enzyme in der Tumorprogression eine Rolle. Cystein-Proteasen der Papain-Familie werden in humanen Karzinomen verschiedenen Ursprungs überexprimiert: CF kommt vermehrt im Zervixkarzinom und in Tumorzelllinien, wie den HeLa-Zellen, vor [5, 13]; CV wird in Mamma- und Kolonkarzinomen exprimiert [50]; CO wurde ursprünglich aus einem Mammakarzinom isoliert [37] und CZ wurde in Tumorzelllinien und in Primärtumoren nachgewiesen [41].

Proteinstruktur. Die Cystein-Cathepsine sind strukturell miteinander verwandt [67]. Sie bestehen jeweils aus einer Signalsequenz von 16-23 Aminosäuren (AS), einem Propeptid von 38-251 AS und einem katalytisch aktiven reifen Enzym von 220-230 AS [6]. Die Propeptide lassen sich in 3 Subfamilien gliedern: (1) Die Klasse der CL-ähnlichen Proteasen (Cathepsine H, J, K, L, S und V) mit einem Propeptid von ca. 90 AS, in der das Sequenzmotiv ERW/FNIN konserviert wurde, das in einer der drei Helices ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) lokalisiert ist [16, 47, 68].

(2) Die CB-ähnlichen Proteasen (Cathepsine B, C und Z), die eine kürzere Proregion von ca. 40 AS [68] bzw. 60 AS [5] aufweisen und kein konserviertes ERW/FNIN-Motiv enthalten [68].

(3) Die Subgruppe der CF-ähnlichen Proteasen (Cathepsine F und W) [16-17] mit einem Propeptid von 251 bzw. 106 AS. Die nahe Verwandtschaft von CF und CW [51] wird u. a. durch das in der Propeptid-Sequenz des CF und des CW gelegene gemeinsame Motiv ERFNAQ deutlich [4], das eine Modifikation des in CL-ähnlichen Proteasen vorkommenden Sequenzmotivs ERW/FNIN [16] darstellt.

Drei Cystein-Proteasen sind bisher noch nicht genau charakterisiert: das CC (Dipeptidyl-Peptidase I) mit einem Propeptid von 206 AS [32], das CZ mit einem je nach Literaturangabe variierenden Propeptid von 38 AS [40-41] bzw. 40 AS [5] und das CO mit einem Propeptid von 84 AS [37-38].

In ihrer Proform sind die Cathepsine zunächst katalytisch inaktiv. Das Propeptid erfüllt vielfältige Funktionen. Neben der intrinsischen Inhibition der proteolytischen Aktivität der Protease [69-72] und der damit verbundenen Regulation der Enzymaktivität ist es essentiell für die Proteinfaltung und die Strukturstabilisierung der Protease insbesondere bei pH-Veränderungen (pH-Optimum im sauren Milieu) [69-70, 73-76]. Es ermöglicht zudem die Bindung der Cathepsine an die Membran von Mikrosomen und die Aufnahme der Cathepsine über den Mannose-6-Phosphat-Weg ins endosomale bzw. lysosomale Zellkompartiment (lysosomales *targeting*) [28, 76-77]. Nach Abspaltung und Dissoziation des Propeptids findet eine Konformationsänderung des Moleküls statt, die eine Aktivierung des Enzyms bewirkt [70-71, 78]. Das aktivierte Enzym besitzt ein aktives Zentrum, das sich aus den AS Cystein (C), Histidin (H) und Asparagin (N) zusammensetzt, die als katalytische Triade bezeichnet werden [23]. Die Cystein-Proteasen der Papain-Familie lassen sich in Endopeptidasen (z. B. die Cathepsine K, L, S und V) und Exopeptidasen (z. B. die Cathepsine B, H und Z) [79-81] gliedern [82]. Die thiol-abhängigen Cathepsine weisen N-Glykosylierungsstellen auf [4].

Funktion. Unterschiede in der gewebsspezifischen Verteilung (siehe 2.3 Cystein-Cathepsine; Expressionsmuster), der intrazellulären Lokalisation und den Enzymeigenschaften, wie Substratspezifität und pH-Stabilität tragen zu den spezifischen Funktionen dieser strukturell relativ ähnlichen Proteasen bei. So sind die Cystein-Proteasen der Papain-Familie der Säugetiere an Prozessen der Proteolyse beteiligt, wie der Aktivierung von Proenzymen [83-84], der Antigenprozessierung [43, 60] und der Antigenpräsentation [60, 85], der hormonellen Reifung [86-87] und dem Proteinabbau und Proteinumsatz im endosomalen/lysosomalen System [3]. Cystein-Proteasen können unter bestimmten Bedingungen von Zellen sezerniert werden und dann extrazellulär an verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen teilnehmen, wie dem Abbau der extrazellulären Matrix beim physiologischen Knochenumbau [52, 88-89], der Osteoporose [90], der Muskeldystrophie [91-92], den chronischen inflammatorischen Erkrankungen wie der Arthritis [93-94], dem Lungenemphysem [95-96], der Tumordinvasion und Metastasierung [97-100] und bei der Alzheimer Erkrankung [101-103]. Aufgrund der Expression der Cystein-Proteasen im Rahmen dieser pathologischen Prozesse bzw. Krankheitsbilder besteht ein grosses Interesse, die Expression dieser Proteasen z. B. durch spezifische Antikörper zu ermitteln für evtl. diagnostische Aussagen und für ihre Evaluierung als *targets* für mögliche Therapieansätze.

2.4 Cathepsin F

2.4.1 Cathepsin F und seine Charakteristika

Gen. Das CF-kodierende Gen setzt sich aus 12 [5, 16] bzw. 13 Exons [104] und 12 Introns zusammen und liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 11 (11q13.1-13.3) [5, 17]. In der gleichen Genregion befindet sich das Gen von CW (11q13.1-13.3) [16, 18] und das Gen von CC (11q14.1-14.3) [105]. Die Gene der restlichen Cathepsine liegen auf anderen Chromosomen [38, 56, 62, 106-110]. Das Gen von CF befindet sich außerdem in enger Nachbarschaft zu den Genen des Cystein-Proteasen Inhibitors, Cystatin M (CST 6) (11q13) [111], des Interleukin-1 β -Converting-Enzyms (11q22-23) [112] und der grossen Untereinheit des Calpain I (11q11) [113]. Neun von 12 der im CF-Gen vorkommenden Spleißstellen sind mit denen des CW-Gens identisch; im Gegensatz zu den anderen Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen (Cathepsine K, L, O oder S), für die eine Identität von nur 4 von 12 Spleißstellen besteht [16]. Zudem hat Cathepsin F zwei für die anderen Cathepsine untypische Spleißstellen, an denen die Cystatin-ähnliche Domäne der Proregion gespalten wird [14] und die Ähnlichkeit mit den Spleißstellen der Cystatin-Gene, wie z. B. denen der humanen Cystatine C, D und SN zeigen [104]. Es wird deshalb vermutet, dass CF ein Fusionsprodukt zwischen einem Cathepsin- und einem Cystatin-Gen ist [104].

Expression. Das CF wird in vielen Geweben exprimiert. Erstmals wurde es aus einer λ gt10-Skelettmuskel-cDNA-Bibliothek kloniert (302 AS) [4] und später u. a. aus einer humanen Prostata- bzw. Ovar-cDNA-Datenbank (484 AS) gewonnen [5, 14]. Cathepsin F wird v. a. im Herzen, im Gehirn, in der Skelettmuskulatur und in den Genitalorganen (Ovar und Testis) exprimiert [5]. In Leber, Kolon, Pankreas, Niere, Plazenta und Prostata zeigt sich eine moderate Expression von CF und in Dünndarm, Milz und

Lunge wird CF in noch geringerem Maße exprimiert. Im Thymusgewebe und in peripheren Lymphozyten ist CF nicht detektierbar [4-5]. Cathepsin F kann in bestimmten Tumorzelllinien nachgewiesen werden, insbesondere in HeLa-Zellen und zu einem geringeren Grad in Melanomen, Leukämie- (K-562) und Lungenkarzinomzelllinien [4-5]. Es könnte somit eine Rolle in der Tumorprogression und in der Metastasierung spielen. Cathepsin F kommt in der Zelle juxt nukleär im endoplasmatischen Retikulum oder in Lysosomen vor [4-5, 11].

Homologie mit anderen Cathepsinen. Proteinsequenzanalysen zeigen eine enge Verwandtschaft von Pro-CF (302 AS) mit anderen humanen Pro-Cathepsinen, insbesondere mit Pro-CW (Sequenzidentität: 42%, Homologie: 58%) und Pro-CB (Sequenzidentität: 22%, Homologie: 38%) [4]. Vergleiche der Aminosäuresequenz (AS-Sequenz) des reifen CF mit denjenigen anderer Cathepsine ergeben bei Nögler *et al.* eine Sequenzidentität von 34-42% mit den Cathepsinen H, K, L, O, S, V und W und von 26-32% mit den Cathepsinen B, C und X [14]. Das Propeptid des Pro-CF (484 AS), das sich in Länge (längstes bisher für Säugetiere beschriebenes Propeptid der Familie der Cystein-Proteasen) bzw. Sequenz von denjenigen anderer Cathepsine unterscheidet, weist eine Homologie von 39% im Vergleich mit dem Propeptid des Pro-CW auf und eine Homologie von 13-20% verglichen mit denjenigen anderer Pro-Cathepsine, wie den Cathepsinen K, L und S [14]. Basierend auf dem konservierten Sequenzmotiv ERFNAQ (siehe 2.3 Cystein-Cathepsine; Proteinstruktur), der benachbarten chromosomalen Lokalisation (siehe 2.4.1 Cathepsin F und seine Charakteristika; Gen) und der hohen Aminosäuresequenzidentität lassen sich CF und CW zur Subgruppe der CF-ähnlichen Proteasen zusammenfassen [16]. Die Homologie von humanem und murinem CF liegt zwischen 72% [5] und 89% [17].

Proteinstruktur (Abb. 2). Cathepsin F wird als Präproenzym translatiert. Dies wird ins Proenzym überführt und über ein an das CF gekoppeltes Mannose-6-Phosphat ins Lysosom aufgenommen. Hier wird es durch Abspaltung und Dissoziation der Proregion aktiviert [15]. Das Signalpeptid von CF setzt sich aus 19 AS zusammen und wird zwischen zwei Alanin-Aminosäuren (A₁₉-A₂₀) vom Proenzym abgespalten [5]. Das Proenzym besteht aus dem N-terminalen Propeptid, das mit seiner 251 AS zählenden AS-Sequenz im Vergleich zu anderen Cathepsinen (38 [CZ] [39-41] bis 206 [CC] [32] AS) sehr lang ist [5]. Das Propeptid lässt sich in 3 Regionen unterteilen: (1) eine N-terminale Cystatin-ähnliche Domäne [14, 16], (2) eine C-terminale, dem Propeptid der CL-ähnlichen Enzyme gleichende Domäne und (3) ein Verbindungselement, über das die beiden Domänen miteinander verknüpft sind [5, 14]. Die Cystatin-ähnliche Domäne fungiert hierbei als endogener Inhibitor und kann möglicherweise physiologische Effekte auf andere Cystein-Proteasen ausüben [14, 16, 104]. Durch Spaltung zwischen Leucin und Alanin (L₂₇₀-A₂₇₁) entsteht aus dem Proenzym das reife CF-Protein (214 AS; 23,6 kDa). Pro-Cathepsin F setzt sich aus 484 AS zusammen und besitzt eine Molmasse von 53,4 kDa [5]. Das humane Pro-CF-Molekül weist 5 N-Glykosylierungsstellen auf: N₁₆₀-E₁₆₁-T₁₆₂, N₁₉₅-R₁₉₆-T₁₉₇, N₃₆₇-F₃₆₈-S₃₆₉, N₃₇₈-D₃₇₉-S₃₈₀ und N₄₄₀-R₄₄₁-S₄₄₂ [5], die an der Enzymoberfläche liegen [15]. Drei der 5 Glykosylierungsstellen befinden sich im reifen CF [15]. Es wird angenommen, dass mindestens eine der 5 Stellen permanent glykosyliert vorliegt

und Mannose-6-Phosphat gebunden hat, um die Aufnahme des CF-Proteins ins endosomale/lysosomale Zellkompartiment zu gewährleisten [5, 14]. Im CF sind zusätzlich 6 Cysteine vorhanden, die 3 Disulfidbrücken ausbilden (C₂₉₂-C₃₃₃, C₃₂₆-C₃₆₆ und C₄₂₄-C₄₇₂). Die Disulfidbrücken formen und stabilisieren die Tertiärstruktur des Proteins [114-118] und ermöglichen die Konformation des funktionellen Proteins [119-120].

Enzymaktivität. Das CF entfaltet seine maximale Aktivität in einem pH-Bereich von 5,2-6,8 [4], wie er z. B. in Lysosomen vorliegt [5, 14-15]. Im Zytosol, bei einem pH von 7,2, ist es nicht stabil und hat eine kurze Halbwertszeit von nur wenigen Minuten [4]. Die katalytische Aktivität des CF gegenüber synthetischen Substraten (z. B. Benzyloxycarbonyl-Phenyl-Arginin-7-Amido-4-Methylcoumarin, ein häufig für die Charakterisierung der Funktion der Cystein-Proteasen eingesetztes Substrat [121]) und seine Inhibition u. a. durch Transepoxysuccinyl-L-Leucylamido-(4-Guanidino)Butan (E-64) [5] sind mit CL vergleichbar und höher als die der Cathepsine V und Z [5, 41, 50].

Molekülstruktur und katalytisches Zentrum. Das reife CF setzt sich aus 2 Domänen zusammen; der L-Domäne, die aus 3 α -Helices aufgebaut ist und der R-Domäne, die aus 2 α -Helices und einer β -Faltblattstruktur besteht [122]. Die 2 Domänen bilden gemeinsam die Substratbindungsstelle und das katalytische Zentrum [122]. Das aktive Zentrum ähnelt denen anderer Cystein-Proteasen der Papain-Familie [78, 123] und besteht aus der katalytischen Triade: C₂₉₅, H₄₃₁ und N₄₅₁ [5]. In Abwesenheit eines gebundenen Substrats oder Inhibitors liegen die beiden AS C₂₉₅ und H₄₃₁ als Thiolat-Imidazolium-Ionenpaar vor [124-126], das mit seiner nukleophilen Thiolatgruppe die Hydrolyse des Substrats initiieren kann [122]. Die Substratbindung erfolgt über 4 Bindungsstellen (S1, S2, S3 und S1') zwischen der L- und der R-Domäne [122]. Die AS der Bindungsstellen bedingen das elektrische Potenzial des aktiven Zentrums (z. B. CF: elektronegativ oder neutral, CL: elektronegativ, CS: elektropositiv) und damit die verschiedenen Substratspezifitäten [122, 127]. Das CF hat mit einigen anderen Cathepsinen der Cystein-Protease-Familie identische AS N-terminal vom katalytischen Zentrum (Glutamin [Q₂₈₉ oder Q₁₉], Tryptophan [W₁₇₇] und hydrophobe AS, die an das C₂₉₅ des aktiven Zentrums angrenzen) und C-terminal vom katalytischen Zentrum (aromatische AS und Glycin, die in der Nähe von H₄₃₁ und N₄₅₁ der katalytischen Triade liegen).

Funktion. Das Vorkommen von CF in den Lysosomen vieler Gewebe [5] weist auf dessen Rolle im intrazellulären Proteinkatabolismus hin [6-7, 37]. Die variierende Höhe der Expression von CF in Geweben lässt vermuten, dass CF auch spezifische Funktionen [6-7, 37], z. B. im Nervensystem [11] ausübt. Seine Expression in Tumorzelllinien bzw. Tumorgewebe gibt Hinweis darauf, dass CF eine Rolle in der Tumorprogression verschiedener Karzinome spielt [5, 13], insbesondere da die 11q13-Region des Chromosoms 11, die u. a. für das CF-Gen kodiert, in Tumoren häufig modifiziert ist [128-129].

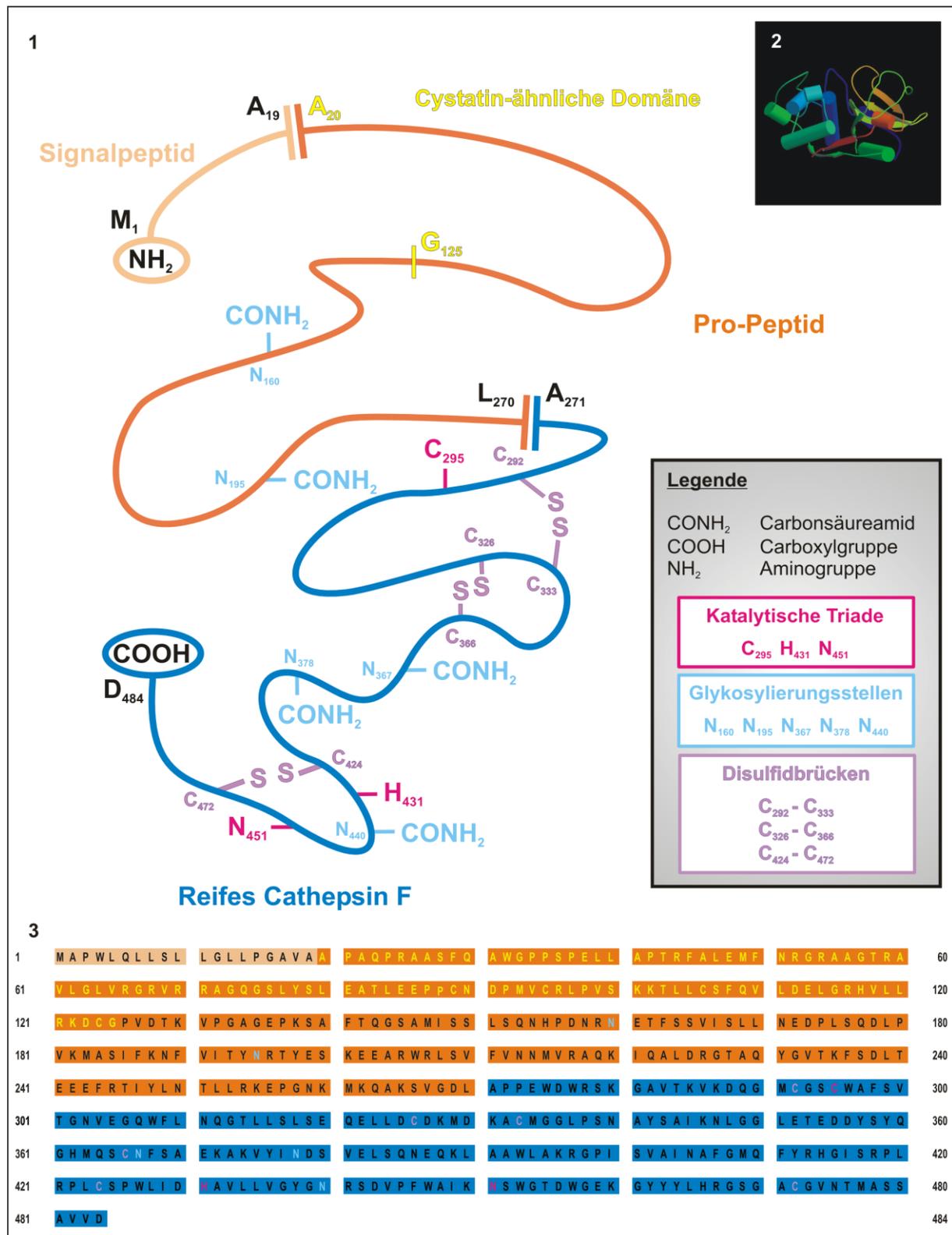


Abb. 2. Proteinstruktur und Aminosäuresequenz des Pro-Cathepsin F.

Abb. 2-1: Schematische Darstellung der linearen Pro-Cathepsin F-Struktur.

Abb. 2-2: Schematische Darstellung der 3D-Struktur des Pro-Cathepsin F [130].

Abb. 2-3: Aminosäuresequenz des Pro-Cathepsin F [5].

2.4.2 Bedeutung von Cathepsin F für verschiedene physiologische und pathophysiologische Prozesse

Immunsystem. Die Peptidbindungsstelle von neu synthetisierten α/β -Heterodimeren des MHC-II bindet die invariante Kette (Ii) und verhindert damit die frühzeitige Assoziation mit endogenen Polypeptiden [131]. Die invariante Kette reguliert ebenfalls den intrazellulären Transport von MHC-II-Dimeren durch das endosomale Kompartiment von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) (vom rauhen endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat zum Lysosomen) [132-136]. Im endosomalen/lysosomalen Zellkompartiment findet ein stufenweiser proteolytischer Abbau des Ii über das 10 kDa große Iip10 (kleinstes Ii-Fragment) zum 3 kDa großen *Class II-associated Invariant chain Peptide* (CLIP) statt, das dissoziiert und so die Bindung eines antigenen Peptides an MHC-II ermöglicht [137-144]. Der Antigen-beladene Haupthistokompatibilitätskomplex wandert zur Antigenpräsentation an die Zelloberfläche. Die Degradation von Iip10 zu CLIP ist der entscheidende Regulationsschritt, an dem die Cathepsine L [43] und S [60, 63, 145] mitwirken. Bei einem Defizit von CL zeigt sich eine Akkumulation von Iip10 in der Thymusrinde der Maus [43]. Im humanen Thymus ist jedoch CV für den Abbau von Iip10 verantwortlich [30, 122]. Cathepsin S ist v. a. am Abbau des Ii in den APC (B-Zellen, dendritische Zellen und Makrophagen) [146] beteiligt. Ein Defizit von CS führt insbesondere in Splenozyten zu einem *shift* in der CD4+ T-Zelldifferenzierung vom Th2- zum Th1-Typ [8]. In anderen Antigen-präsentierenden Zellen, wie den Makrophagen lassen sich auch bei einem Defizit bzw. bei Inhibition von CL und CS Ii zu CLIP prozessieren, MHC-II Dimere mit Antigen-Peptiden beladen und die antigenen Strukturen auf der Zelloberfläche präsentieren. Dies ist auf die Expression von Cathepsin F zurückzuführen, das in Makrophagen genauso effizient wie CS ist [8]. Eine klinische Relevanz für das CF und dessen Hemmung könnte sich aus der Möglichkeit einer Therapie für mit inadäquat erhöhter Immunantwort einhergehender Krankheitsbilder (z. B. Asthma, rheumatoide Arthritis oder andere Autoimmunkrankheiten) ergeben.

Lipoproteinstoffwechsel. Am Metabolismus der Lipoproteine ist CF beteiligt, indem es u. a. *Low Density Lipoproteins* (LDL) partiell hydrolysiert. Diese aggregieren dann u. a. durch den Abbau von Apolipoprotein(apo)B-100 (apoB-100) zu Lipidtröpfchen [19], wie sie in vitro oder in atherosklerotischen Gefäßveränderungen vorkommen [147-150]. Die so entstandenen LDL-Partikel können z. B. von der arteriellen extrazellulären Matrix, insbesondere von Proteoglykanen [151], die v. a. apoB-100-haltige Lipoproteine binden [152-155], eingeschlossen und von den in der Gefäßintima lokalisierten Makrophagen aufgenommen werden [9]. Dies führt zur Bildung von Schaumzellen [9] und zur Anreicherung von LDL-Cholesterol in der arteriellen Intima [151]. Cathepsin F kann außerdem apoB-100 der *High Density Lipoproteins* (HDL) hydrolysieren und damit deren Kapazität, Cholesterol aus Schaumzellen zu binden [150], einschränken. Dies führt ebenfalls zur Anreicherung von Cholesterol in Schaumzellen, da Makrophagen nur über den Cholesterolausstrom die intrazelluläre Cholesterolanreicherung regulieren können [156].

Kollagenstoffwechsel. Cathepsin F ist in der Lage, Kollagenfragmente zu hydrolysieren, die von der Matrix-Metalloproteinase-1 [10] generiert wurden. Letztere ist eine Kollagenase, die fibrilläres Kollagen spezifisch spalten kann [157].

Atherosklerose. Im Rahmen der Entwicklung von Atherosklerose spielt die Proteolyse eine entscheidende Rolle. In den atherosklerotischen Läsionen kommen vermehrt Elastase, Kollagenase, Gelatinase und Cystein-Cathepsine (Cathepsine F, K und S [19, 158]) vor [159], wobei letztere von Makrophagen [19, 160], von glatten Gefäßmuskelzellen [158] und von Endothelzellen sezerniert werden [161]. Im Verlauf der Atherogenese ist CF vermutlich am *remodeling* der extrazellulären Matrix der inflammatorisch veränderten Arterienintima und an der Modifikation und Anreicherung von Lipoproteinen in der Intima beteiligt [9, 19]. Die Induktion der Expression von CF in Makrophagen wird, wie von Kaakinen *et al.* [162] gezeigt wurde, u. a. von Angiotensin-II reguliert, das eine pro-atherogene Aktivität aufweist [163-167]. Angiotensin-II wird von Makrophagen in der atherosklerotisch veränderten Gefäßintima von vulnerablen, potenziell rupturgefährdeten Arterienabschnitten sezerniert [168]. Über einen Angiotensin-II Typ 2-Rezeptor werden die Expression und die Sekretion von CF signifikant gesteigert, bei konstantem intrazellulären CF-Spiegel [162]. Über diesen Rezeptor lässt sich ebenfalls die Sekretion der Matrix-Metalloproteinase-1 [169] steuern. Wie die meisten Cathepsine hat CF ein pH-Optimum im Sauren (pH 5,2-6,8). Aus diesem Grund können Makrophagen, die lysosomale Cathepsine sezernieren, die perizelluläre Umgebung u. a. durch eine erhöhte Laktatsekretion [170] ansäuern [171-172]. Zur pH-Senkung tragen ebenfalls die durch Lipolyse aus Lipoproteinen entstandenen freien Fettsäuren bei [173]. Im Gegensatz zu atherosklerotisch geschädigten Gefäßen liegt in der Intima gesunder Gefäße ein annähernd neutraler pH-Wert vor. Die Expression des Inhibitors der extrazellulären Cystein-Proteasen, des Cystatin C, ist in atherosklerotisch veränderten Gefäßen vermindert [174]. Die Störung der Balance zwischen Synthese und Abbau der extrazellulären Matrix kann zur Instabilität und zur Ruptur der atherosklerotischen Plaques führen [162].

Diabetische Veränderungen der Kornea. Verzögerte und abnorme epitheliale Wundheilung, Ulcera, Ödeme, rezidivierende Erosionen, oberflächliche Punktkeratitiden, Abnormalitäten des Endothels und der Korneanerven sind Hauptmanifestationen der diabetischen Korneaerkrankung [175-180]. Es ist seit langem bekannt, dass Alterationen der epithelialen Basalmembran (BM) - erhöhte BM-Fragilität [177, 181-182] und verringerte Anzahl von Hemidesmosomen [181, 183] - sowie deren Interaktion mit dem Korneaepithel Diabetes-typische Korneaveränderungen bedingen können. Wachstumsfaktoren, Mediatoren [184-187] und das wahrscheinlich u. a. durch die erhöhte Expression von CF bedingte verringerte Vorkommen spezifischer BM-Komponenten (Laminin-1 bzw. Laminin-10, Entactin/Nidogen und Integrin $\alpha 3 \beta 1$) [188] können zur Bildung diabetischer Keratopathien beitragen. Saghizadeh *et al.* zeigten, dass die Überexpression von CF und der Matrix-Metalloproteinase-10 (MMP-10) im normalen Korneagewebe eine wie beim Diabetes mellitus beobachtete verzögerte Wundheilung induziert [189].

Zervixkarzinom. HeLa-Zellen [5] und das Zervixkarzinom [13] zeigen eine erhöhte Expression des CF-Gens im Vergleich zu den gesunden Ursprungsgeweben. Im Zervixkarzinom findet eine erhöhte Transkription von Promotergenem statt, die eine Expression u. a. von CF und der Matrix-Metalloproteinasen MMP-11 und MMP-12 bewirken [13]. Diese Proteasen spielen bei tumorassoziierten Prozessen, wie tumorinduzierter Angiogenese, Zellmigration, Zellproliferation und Abbau von Bindegewebe [190-191] und der damit verbundenen pathologischen Gewebszerstörung und dem invasivem Tumorwachstum eine Rolle [13, 192].

Neurodegeneration und neuronale Ceroid-Lipofuszinosen (NCL). Unter dem Begriff neuronale Ceroid-Lipofuszinose (NCL) werden verschiedene lysosomale Speichererkrankungen, v. a. des Zentralnervensystems, zusammengefasst [12]. Die NCL manifestiert sich durch folgendes Krankheitsbild: progressiver Verlust motorischer Fähigkeiten und des Augenlichts, mentaler Verfall, Myoklonie, Epilepsie und frühzeitiger Tod [193]. Es handelt sich v. a. um autosomal-rezessiv vererbte Erkrankungen. Bei diesen Erkrankungen sind Gene betroffen, die ein im endosomalen/lysosomalen Zellkompartiment lokalisiertes Protein kodieren, wie die Palmitoyl-Protein-Thioesterase 1, die Tripeptidyl-Peptidase 1 [194-195] und das Cathepsin D, das einen NCL-Phänotyp mit viszeraler Beteiligung zeigt [196-197]. Die NCL zeigt einen frühen Beginn im Kindesalter [198]. Bei der sogenannten KUFs Krankheit, die im Erwachsenenalter auftritt, ist nur wenig über die genetischen Veränderungen bzw. Ursachen bekannt [199-203]. In diesem Zusammenhang untersuchten Tang *et al.* [11] CF-*knock out*-Mäuse (CF-/-), die zwischen dem 12. und 16. Lebensmonat eine der NCL-ähnliche Erkrankung entwickelten mit progressiver Hinterbeinschwäche und Abnahme der motorischen Koordination bzw. Gangschwierigkeiten. Sechs Monate später führte die Erkrankung zu einem Gewichtsverlust und schließlich zum Exitus. In Abwesenheit von CF wurden ab der 6. Lebenswoche zunehmend eosinophile zytoplasmatische Granula, die lysosomalem Lipofuszin gleichen, in den Neuronen und Gliazellen akkumuliert [11]. Da CF Lipoproteine abbaut [9, 19], wird eine Lipoprotein-Komponente des Lipofuszin-Komplexes als Substrat von CF in den Neuronen vermutet. In älteren CF-/- Mäusen trat neben der Anreicherung von Lipofuszin eine ausgeprägte Gliose auf [11], die ein Indikator für neuronalen Stress und Neurodegeneration ist [204], was auch für NCL-Patienten demonstriert wurde [205-206]. Zudem zeigte sich bei CF-/- Mäusen eine Abnahme der Hirnmasse, was vermutlich auf einen Neuronenverlust zurückzuführen ist. Cathepsin F ist das einzige Cystein-Cathepsin, dessen fehlende Aktivität allein einen lysosomalen Speicherdefekt und damit einhergehende progressive neurologische Veränderungen verursachen kann. Der späte Krankheitsbeginn gibt Grund zur Annahme, dass das CF-Gen mit der im Erwachsenenalter auftretenden späten Form (*late adult-onset*) der NCL im Zusammenhang stehen könnte [11]. Die CF-Sequenzierung bei 13 *late-onset* NCL-Patienten hat jedoch bei Tang *et al.* keinen Hinweis für das Vorhandensein von Mutationen des CF-Gens ergeben. In CF-/- Mäusen konnte zudem keine erhöhte Akkumulation der mitochondrialen ATP-Synthase-Untereinheit c detektiert werden, die eine in den meisten humanen NCL-Erkrankungen anzutreffende Lipofuszin-Komponente ist [11]. In neueren Untersuchungen von Smith *et al.*, publiziert 2013, wurde bestätigt, dass Mutationen im humanem CF-Gen zum Typ B der KUFs Krankheit mit spät auftretender progressiver

neuronaler Dysfunktion in Form einer früh auftretenden Demenz und motorischen Defiziten führen [207]. Zudem gab ein *in silico* Modell Aufschluss darüber, wie *missense* (nicht-synonyme) Mutationen die Proteinstruktur und -funktion von CF verändern können [207]. Basierend auf diesen Erkenntnissen könnten bei Patienten mit Verdacht auf KUFs Krankheit zur Diagnosesicherung evtl. Veränderungen im CF-Gen durch Genomscreening ermittelt und somit invasive Gehirn-Biopsien vermieden werden [207]. Bei zahlreichen peripheren Neuropathien mit Krankheitsbeginn im Erwachsenenalter finden sich genetische Veränderungen in der Region 11q12 bis 11q14 des Chromosoms 11, das ebenso für das CF-Gen (11q13.1-13.3) kodiert [208-209].

2.4.3 Cathepsin F als Forschungsthema

Cathepsin F ist eine Cystein-Protease mit nahezu ubiquitärem Expressionsmuster. Es ist an unterschiedlichen intra- und extrazellulär ablaufenden physiologischen bzw. pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Cathepsin F übt eine generelle *housekeeping* Funktion im lysosomalen Proteinabbau aus [4-5] und spielt vermutlich eine entscheidende Rolle im Stoffwechsel der Lipoproteine [19], bei der Entstehung von Atherosklerose [9], bei der Tumorgenese [5, 13] und bei Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis und der neuronalen Ceroid-Lipofuszinose [11].

Die in den beschriebenen Prozessen wahrgenommenen Funktionen des 1998 entdeckten CF [4] sind nicht abschließend geklärt, was u. a. auf das Fehlen hochspezifischer Ak gegen humanes CF zurückgeführt werden kann. Aus diesem Grund bestand die Aufgabe der vorliegenden Arbeit darin, gegen CF gerichtete monoklonale und polyklonale Ak zu generieren, diese zu charakterisieren, spezifische und kreuzreaktionsfreie Ak zu selektieren und in der Immunhistochemie einzusetzen.

Mit Hilfe von Ak können physiologische und pathophysiologische Funktionen des CF untersucht werden und diagnostische Optionen und Therapieansätze entwickelt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalienverzeichnis

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	Roth, Karlsruhe
Amidoschwarz (0,8%) Lösung	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	SERVA GmbH, Heidelberg
Ammoniumsulfat ($[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$)	Roth, Karlsruhe
2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) -diammonium-Salz (ABTS)	Roche Diagnostics, Mannheim
Blockierungsreagenz für ELISA	Roche Diagnostics, Mannheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	SERVA GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Kallies Feinchemie AG, Sebnitz
<i>Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail</i> (PIC)-Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie®-Brilliant-Blau G-250	Bio-Rad Laboratories, München
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB)	Dako, Hamburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>ECL Lumi-Light Immunoblotting Substrate</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol 99,8%	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	GIBCO, Paisley, GB
Folin-Ciocalteu-Phenol-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formalinlösung 35%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Freundsches-Adjuvans, komplett und inkomplett	Sigma-Aldrich, Steinheim
Geneticin G-418	GIBCO, Paisley, GB
Gentamycin	SERVA GmbH, Heidelberg
Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Glutaraldehyd 25% Lösung	SERVA GmbH, Heidelberg
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
2-(4-[2-Hydroxyethyl]-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	Merck, Darmstadt
Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin Medium (HAT)	Invitrogen, Karlsruhe
Hypoxanthin-Thymidin Medium (HT)	GIBCO, Paisley, GB
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe

Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogentartrat	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat (CuSO ₄)	Roth, Karlsruhe
Laemmli-Puffer	SERVA GmbH, Heidelberg
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol (2-ME)	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natriumphosphat (Na ₃ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Fluka, Schwalbach
Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Dihydrogen (NADH ₂)	Roche Diagnostics, Mannheim
4-Nitrobluetetrazoliumchlorid (NBT)	Roche Diagnostics, Mannheim
Phenol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyethylenglykol (PEG 1500)	Roche Diagnostics, Mannheim
Ponceau S	Merck, Darmstadt
RPMI (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>) 1640-Medium	GIBCO, Paisley, GB
Saccharose	Merck, Darmstadt
Silbernitrat (AgNO ₃)	Fluka, Schwalbach
<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (SDS) (Natriumdodecylsulfat)	SERVA GmbH, Heidelberg
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Thimerosal	Fluka, Schwalbach
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Triton™-X-100	SERVA GmbH, Heidelberg
Tween® 20 (Polyoxyethylen [20] Sorbitan Monolaurat)	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt
<i>Western Blocking Reagent</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
Xylol	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Chemapol, Prag, Tschechische Republik

Soweit nicht anderweitig beschrieben, wurden alle Chemikalien mit dem Reinheitsgrad p. a. verwendet.

3.2 Materialien

Tab. 1: Materialien geordnet nach methodischen Anwendungsgebieten.

	Produkt	Hersteller
ELISA (vgl. 3.8.1)		
Mikrotiterplatten (Polystyrol)	Mikrotiterplatte <i>Costar high binding</i> (96 Kavitäten)	Bioscience, San Diego, US
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (vgl. 3.8.2)		
Lösungen	NuPAGE® LDS <i>Sample buffer</i>	Invitrogen, Karlsruhe
	NuPAGE® <i>Sample Reduction Agent</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Gradientengele	NuPAGE® Novex® Bis-Tris Gel	Invitrogen, Karlsruhe
Immunoblotting (vgl. 3.8.4)		
Nitrozellulosemembran	<i>Nitrocellulose Membrane Hybond™-c extra</i>	Amersham, Heidelberg
	<i>Nitrocellulose Membrane Hybond™-ECL</i>	Amersham, Heidelberg
Epitope Mapping (vgl. 3.8.5)		
Tracker Tapes	Tracker Tape™ RPN 2050	Amersham, Heidelberg
Immunglobulinreinigung/Immunpräzipitation (vgl. 3.8.6/3.9.3)		
Protein G-Sepharose	HiTrap™ Protein G-Sepharose HP	Amersham, Heidelberg
	HiTrap™ IgM <i>Purification</i> HP	Amersham, Heidelberg
Immunhistochemie (vgl. 3.12)		
Streptavidin-Peroxidase	Dako REAL™ Streptavidin Peroxidase (HRP)	Dako, Hamburg
Verdünnungspuffer	Dako REAL™ <i>Antibody Diluent</i>	Dako, Hamburg
Substratpuffer	Dako REAL™ HRP <i>Substrate Buffer</i>	Dako, Hamburg
Chromogen	Dako REAL™ DAB (50x)	Dako, Hamburg
Zellkernfarbstoff	Mayer's Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt

Tab. 2: Molmassemarker.

Molmassemarker	Molmassebereich	Hersteller
LMW-SDS Marker Kit	14-97 kDa	Amersham, Heidelberg
PageRuler™ <i>Prestained Protein Ladder</i>	10-170 kDa	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Tab. 3: Sonstige Materialien.

	Produkt	Hersteller
Film	Hyperfilm™ ECL	Amersham, Heidelberg
	<i>Lumi-Film Chemiluminescent-Detection</i> Film	Roche Diagnostics, Mannheim

3.3 Stammlösungen und Puffer

Tab. 4: Standardlösungen.

Standardlösung	Zusammensetzung
PBS (<i>Phosphate-Buffered Saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung)	270 mM NaCl; 16 mM NaH ₂ PO ₄ ; 5,4 mM KCl; 2,9 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
TBS (<i>Tris-Buffered Saline</i> ; Tris-gepufferte Salzlösung)	20 mM Tris-HCl; 155 mM NaCl; pH 7,5
TBST (TBS Tween)	TBS; 0,05% (v/v) Tween [®] 20; pH 7,5

Tab. 5: Puffer und Lösungen für die einzelnen Methoden.

	Zusammensetzung
ELISA (vgl. 3.8.1)	
NaCl-Tween [®] -Puffer	155 mM NaCl; 2% (v/v) Tween [®] 20
Immunoblotting (vgl. 3.8.4)	
Transferpuffer	20 mM Tris-HCl; 150 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol; 0,05% (w/v) SDS; pH 8,3
Blockierungslösung	TBST; 3% (w/v) Magermilchpulver; 0,5% Triton [™] -X-100
Epitope Mapping (vgl. 3.8.5)	
Blockierungslösung	TBST; <i>Western Blocking Reagent</i> ; 146 mM Saccharose
Regenerierungspuffer	50 mM Tris-HCl; 100 mM 2-ME; 2% (v/w) SDS; pH 6,7
Immunglobulinreinigung mittels Affinitätschromatographie (vgl. 3.8.6)	
Bindungspuffer	IgG: 20 mM Na ₂ HPO ₄ ; 20 mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,0
	IgM: 20 mM Na ₃ PO ₄ ; 0,8 M (NH ₄) ₂ SO ₄ ; pH 7,5
Elutionspuffer	IgG: 0,1 M Glycin-HCl; pH 2,7
	IgM: 20 mM Na ₂ HPO ₄ ; 20 mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,5
Neutralisationspuffer	1 M Tris-HCl; 1% Thimerosal; pH 9,0
Regenerierungspuffer	20 mM Na ₂ HPO ₄ ; 20 mM NaH ₂ PO ₄ ; 30% Isopropanol; pH 7,5

3.4 Zelllinien

Tab. 6: Zelllinien.

Bezeichnung	Ursprung	Charakterisierung
HeLa-S3	Humane epitheliale Zervixkarzinomzelllinie (Kurzname „HeLa“)	Epithelzellen eines Zervixkarzinoms einer 31-jährigen afroamerikanischen Frau namens Helen Lane , aus denen die erste permanente humane Zelllinie am Johns Hopkins Hospital etabliert wurde. (Gey <i>et al.</i> , 1952 [210])
P3X63-Ag8/653	Murine Myelomzelllinie (Kurzname „Ag8“)	Die Zelllinie weist einen Defekt im <i>salvage pathway</i> der Nucleinsäuresynthese auf. Es fehlt das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT). (Kearny <i>et al.</i> , 1979 [211])

FTC-133	Humane Zelllinie aus einem metastasierten follikulären Schilddrüsenkarzinom	Die Zellen bilden noch Thyreoglobulin und besitzen intakte EGF- und TSH-Rezeptoren. (Goretzki <i>et al.</i> , 1990 [212])
EPLC-32M1	Humane Zelllinie aus einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom	Histologisch mittelmässig differenzierte Zellen aus der Lymphknotenmetastase eines Patienten mit squamösem epitheloidzelligen Karzinom, die als <i>Non-Small-Cell Lung Cancer</i> (NSCLC) Zelllinie eines Nacktmaus-Transplantats in der Abteilung für Hämatologie/Onkologie des Zentrums für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg etabliert wurden. (Bepler <i>et al.</i> , 1988 [213])

Zellkulturmaterial und -zusätze wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Für die Immunisierung der Mäuse wurde Freundsches-Adjuvans (komplett und inkomplett) von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) verwendet.

3.5 Antikörper

Tab. 7: Primäre anti-Cathepsin F-Antikörper und sekundäre Antikörper.

Primärantikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Anti-human Cathepsin F (C-20): sc-9634, pAk („Santa Cruz“)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:30 - 1:3.000
Sekundärantikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Anti-Maus-Sekundärantikörper			
Anti-Maus IgG, Fc _γ , pAk, HRP-markiert	Kaninchen	Dianova, Hamburg	1:5.000 - 1:10.000
Anti-Maus IgG (H+L), F(ab') ₂ -Fragment, pAk, HRP-markiert	Schaf	Dianova, Hamburg	1:500 - 1:100.000
Anti-Maus IgG+IgM (H+L), pAk, HRP-markiert	Kaninchen	Dianova, Hamburg	1:5.000 - 1:10.000
LSAB-Kit: Dako REAL™ Link Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)		Dako, Hamburg	Fertiglösung
Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper			
Anti-Kaninchen IgG1 (leichte Kette), mAk, HRP-markiert	Maus	Dianova, Hamburg	1:5.000 - 1:10.000
Anti-Kaninchen IgG (H+L), pAk, HRP-markiert	Ziege	Dianova, Hamburg	1:500 - 1:100.000
LSAB-Kit: Dako REAL™ Link Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)		Dako, Hamburg	Fertiglösung
Anti-Ziege-Sekundärantikörper			
Anti-Ziege IgG (H+L), pAk, HRP-markiert	Kaninchen	Dianova, Hamburg	1:500 - 1:100.000

Zum Herstellen gebrauchsfähiger Sekundärantikörper wurden diese im Verhältnis 1:2 in Glycerol verdünnt. Die Konjugate wurden bei -20°C aufbewahrt.

3.6 Humanes Cathepsin F

Zu Beginn dieser Arbeit basierte die Antigengenerierung auf einer Aminosäuresequenz (AS-Sequenz) des humanen Pro-Cathepsin F (CF) von 302 Aminosäuren (AS) [4]. Diese AS-Sequenz wurde im späteren Verlauf von Santamaria *et al.* auf 484 AS korrigiert [5].

Rekombinantes Cathepsin F. Auf der Grundlage der 302 AS umfassenden AS-Sequenz von Pro-CF [4] wurde humanes rekombinantes CF aus *Escherichia coli* (*E. coli*) gewonnen, das freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Dr. D. Brömme und PD Dr. T. Wex (2001 am Mount Sinai Hospital, New York, US) zur Verfügung gestellt wurde.

Cathepsin F-Peptide. Nach Bekanntwerden der 484 AS umfassenden Pro-CF-AS-Sequenz [5] wurden mit Hilfe der Firma EMC (Tübingen) CF-Peptide synthetisiert, entweder als Einzelpeptide mit einer Länge von 6-15 AS oder als aus 2 und mehr identischen oder unterschiedlichen Einzelpeptiden zusammengesetzte Tandempeptide. Die CF-Peptide wurden u. a. an Pam₃Cys oder Lysin gekoppelt.

3.7 Generierung von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern gegen humanes Cathepsin F

3.7.1 Immunisierung

Zur Herstellung von Antikörpern (Ak) gegen CF wurden als Antigene (Ag) humanes rekombinantes CF oder Einzel- bzw. Tandempeptide eingesetzt, die auf der Grundlage der humanen CF-AS-Sequenz synthetisiert wurden. Für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern (mAk) wurden Mäuse (3 Monate alte Balb/c-Mäuse: insgesamt 11), für diejenige von polyklonalen Antikörpern (pAk) Kaninchen (6 Monate alte Kaninchen: insgesamt 4) eingesetzt. Für die Erstimmunisierung (Abb. 3 am Beispiel der Maus) wurde das Protein (25 µg Ag pro Maus bzw. 50 µg Ag pro Kaninchen) in 200 µL isotonischer NaCl-Lösung (0,154 M) gelöst und in 300 µL komplettem Freundschens-Adjuvans (KFA) suspendiert und bis zur Entstehung einer Emulsion gemischt. Die Antigenapplikation erfolgte bei der Maus intraperitoneal und beim Kaninchen bei der ersten Immunisierung subkutan und dann bei jeder weiteren intramuskulär. Vor der ersten Immunisierung wurde zu Kontrollzwecken Prä-Immuneserum gewonnen. Die erste Auffrischung der Immunantwort fand nach einem Zeitraum von 6 Wochen statt. Pro Maus wurden 20 µg CF-Antigen bzw. pro Kaninchen 40 µg CF-Antigen gemischt mit 200 µL NaCl (0,154 M) und mit 300 µL inkomplettem Freundschens-Adjuvans (IFA) injiziert. Die zweite Auffrischungsimmunisierung erfolgte nach weiteren 14 Tagen. Pro Maus wurden 20 µg CF bzw. pro Kaninchen 40 µg CF appliziert. Bei der Maus erfolgte 4 Tage vor und am Vortag der Fusion eine erneute Antigeninjektion (*boost*) von 20 µg CF. Am Fusionstag wurde die Isolierung der Milzzellen vorgenommen.

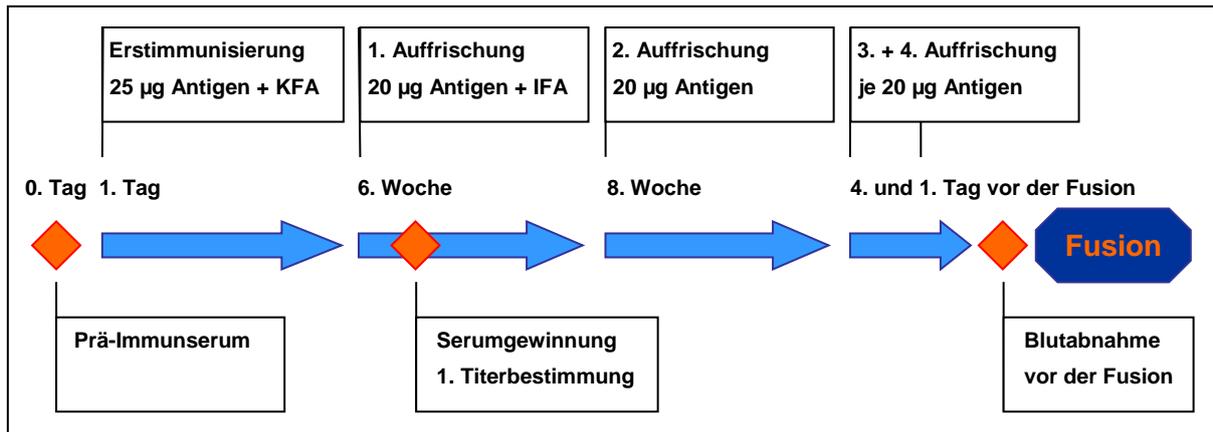


Abb. 3. Immunisierungsschema am Beispiel der Maus (Schema entlehnt von Dr. E. Weber).

KFA = komplettes Freundsches-Adjuvans (Wasser-in-Öl-Emulsion, die hitzeinaktivierte Tuberkelbakterien, *Mycobacterium tuberculosis*, enthält), das zur primären Antigeninjektion verwendet wurde. IFA = inkomplettes Freundsches-Adjuvans (Wasser-in-Öl-Emulsion, die nicht mit Mykobakterien versetzt ist), das für Folgeinjektionen eingesetzt wurde [214].

3.7.2 Serumgewinnung

Zur Serumgewinnung wurden die Blutproben (bei der Maus 100 µL Blut für die Titerkontrollen zur Bestimmung des Fusionszeitpunktes und beim Kaninchen 20-30 mL für die Gewinnung von pAk) bei RT stehen gelassen. Das geronnene Blut wurde über Nacht bei 4°C aufbewahrt und dann zur Gewinnung des Serums für 10 min bei RT bei 3.500 x g abzentrifugiert. Das Serum wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.7.3 Zellhybridisierung - Fusion

1. Vorbereitung der Fusion

Zur Titerbestimmung vor der Fusion und um die Anzahl der Erythrozyten in der zu isolierenden Milz *in vivo* zu minimieren, erfolgte eine Blutentnahme (0,5 mL) ca. 30 min vor der Milzentnahme bei der Maus.

Im Folgenden wurden unter Einhaltung der Sterilitätskriterien drei Zelltypen gewonnen und aufgearbeitet: Makrophagen, Splenozyten (beide aus der Maus) und Myelomzellen (P3X63-Ag8/653) [211] (aus der Zellkultur).

Makrophagen. Die Peritoneal-Makrophagen der immunisierten Maus übernehmen in der Co-Kultur mit Hybridomzellen die Aufgabe der Sezernierung von Wachstumsfaktoren und der Phagozytose von toten Zellen. Zu ihrer Gewinnung wurde die Peritonealhöhle eröffnet und diese nach Aufnahme der Peritonealflüssigkeit 4 x mit je 1 mL RPMI 1640-Medium (4°C), das ohne fetales Kälberserum (FKS) versetzt war, gespült. Die Zellsuspension wurde in einem sich im Eisbad befindenden Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf 1×10^6 Zellen/5 mL HAT-Medium eingestellt. Es wurden je 100 µL Makrophagen-Zellsuspension pro Kavität auf 96 *well*-Zellkulturplatten verteilt.

Splenozyten. Die Milz wurde präpariert und in eine Petrischale gegeben. Zur Gewinnung der Splenozyten wurde die Milzkapsel 2-3 x mit je 10 mL FKS-freiem RPMI 1640-Medium gespült. Die isolierten Milzzellen wurden mit serumfreiem Medium 2-3 x gewaschen und die Zellzahl ermittelt.

Myelomzellen. Die mit FKS-haltigem RPMI 1640-Medium kultivierten Myelomzellen (P3X63-Ag8/653) wurden am Fusionstag 5 x mit je 35 mL FKS-freiem Medium gewaschen. Die Myelomzellen befanden sich zum Zeitpunkt der Fusion in der exponentiellen Wachstumsphase.

2. Fusion von Maus-B-Lymphoblasten und Maus-Myelomzellen (P3X63-Ag8/653)

Die Milzzellen ($1-2 \times 10^8$ Zellen/mL) wurden im Verhältnis 2:1 mit den Zellen der Myelomzelllinie Ag8 (P3X63-Ag8/653) gemischt (Abb. 4). Das Zellgemisch wurde in ein Glaszentrifugenröhrchen überführt, 1-2 x mit je 25 mL auf 37°C erwärmten serumfreiem Medium gewaschen und 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Nach vollständiger Entfernung des Überstandes wurden zu dem Myelomzell-Milzzellgemisch 1,5 mL des auf 37°C erwärmten Polyethylenglykols (PEG 1500) langsam innerhalb 1 min unter ständigem Drehen des Zentrifugenröhrchens im 37°C-Wasserbad zugeführt und während einer weiteren Minute stetig gedreht. Dann wurden tropfenweise insgesamt 24 mL des vorgewärmten serumfreien Mediums unter Drehen des Zentrifugenröhrchens bei 37°C hinzugegeben: 1 mL in der 1. Minute, 3 mL in der 2. Minute, 18 mL in der 3. Minute. Die Suspension wurde dann für 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Das Zellgemisch verblieb für 5 min bei 37°C im Wasserbad. Im Anschluss wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet in 8 mL FKS-haltigem RPMI 1640-Medium, das mit Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT) versetzt war, vorsichtig resuspendiert. Ein Zehntel des Fusionsansatzes wurde sofort in 40 mL HAT-Medium aufgenommen und auf 4 Zellkulturplatten mit je 96 Kavitäten verteilt (100 µL/Kavität). Jede Zellkulturplatte (96 *wells*) war mit insgesamt 1×10^6 Makrophagen/5 mL HAT-Medium (1×10^4 Makrophagen/*well*) vorbeschichtet. Die nicht der Zellkultur zugeführten Zellen wurden kryokonserviert.

3. Selektion von Hybridomzellen

Nach der Fusion (Abb. 4) verbleiben viele, nicht-fusionierte Zellen in Kultur. Erythrozyten und Lymphozyten sterben im Laufe der Zeit ab und werden von den Makrophagen phagozytiert. Die nicht-fusionierten Myelomzellen, die sich durch eine unbegrenzte Lebensdauer auszeichnen, könnten in kürzester Zeit die Hybridome überwuchern. Um dies zu unterbinden, werden Myelomzellen mit einer Defektmutation im Nukleinsäurestoffwechsel eingesetzt (P3X63-Ag8/653). Der Hauptstoffwechselweg der *de novo*-Nukleotidbiosynthese wird durch den Zusatz von Aminopterin im HAT-Medium inhibiert, das ein Folsäureantagonist ist und die Dihydrofolatreduktase hemmt, so dass weder Guanosintriphosphat (GTP) noch Thymidintriphosphat (TTP) gebildet werden. Normalerweise können über einen Reservestoffwechsel die für die DNA-Synthese benötigten Purine mit Hilfe des Enzyms Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) aus Hypoxanthin und Guanin synthetisiert werden. Die Myelomzellen vom Typ P3X63-Ag8/653 besitzen jedoch keine funktionelle HGPRT, so dass sie kein GTP aus Hypoxanthin synthetisieren können [215-216]. Aus diesem Grund überlebten durch die

Selektion mit HAT-Medium nur fusionierte Zellen (Klone), bei denen der Fusionspartner (B-Lymphoblasten) eine funktionelle HGPRT in die Hybridzelle eingebracht hatte. Das für die DNA-Synthese ebenfalls erforderliche Thymidin war in den Medienzusätzen enthalten. Die Zellen wurden somit für 2 Wochen mit RPMI 1640-HAT-Medium (Endkonzentrationen im Ansatz: 100 μM Hypoxanthin; 0,4 μM Aminopterin; 16 μM Thymidin) kultiviert. Dann wurde die Zellkultur für 1-2 Wochen mit RPMI 1640-HT-Medium (Endkonzentrationen im Ansatz: 100 μM Hypoxanthin; 16 μM Thymidin) und schließlich nur noch mit RPMI 1640-Medium versorgt. Alle Medien enthielten 10% FKS.

4. Klonierung positiver Hybridome

Mit Hilfe des indirekten *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) (3.8.1) konnten 2-3 Wochen nach der Fusion die Kavitäten auf das Vorhandensein spezifischer anti-CF-Ak-produzierender Klone analysiert werden. Positive Klone wurden selektiert und kloniert. Zur Klonierung (Abb. 4) wurde das Zellgemisch aus der entsprechenden Kavität der Mutterplatte verdünnt, um am Ende der Verdünnungsreihe statistisch nur eine einzelne Ak-produzierende Zelle pro Kavität zu erhalten. Dazu wurde die Zellsuspension auf eine Zellzahl von 1×10^4 Zellen/mL eingestellt und davon 200 μL in die erste Kavität einer 96 *well*-Mikrotiterplatte überführt und in seriellen Verdünnungsschritten (1:2) bis zur Kavität 12 einer horizontalen Reihe vereinzelt. Während der Klonierung wurden die Zellen mit FKS-haltigem RPMI 1640-Medium versorgt. Nach 10-15 Tagen fand eine erneute Testung der Kulturüberstände hinsichtlich der Produktivität der Klone und der Spezifität der Antikörper mittels indirektem ELISA statt. Positive Klone wurden einer zweiten Klonierung unterzogen, anschließend propagiert und für Massenkulturen zur Ak-Gewinnung verwendet bzw. kryokonserviert.

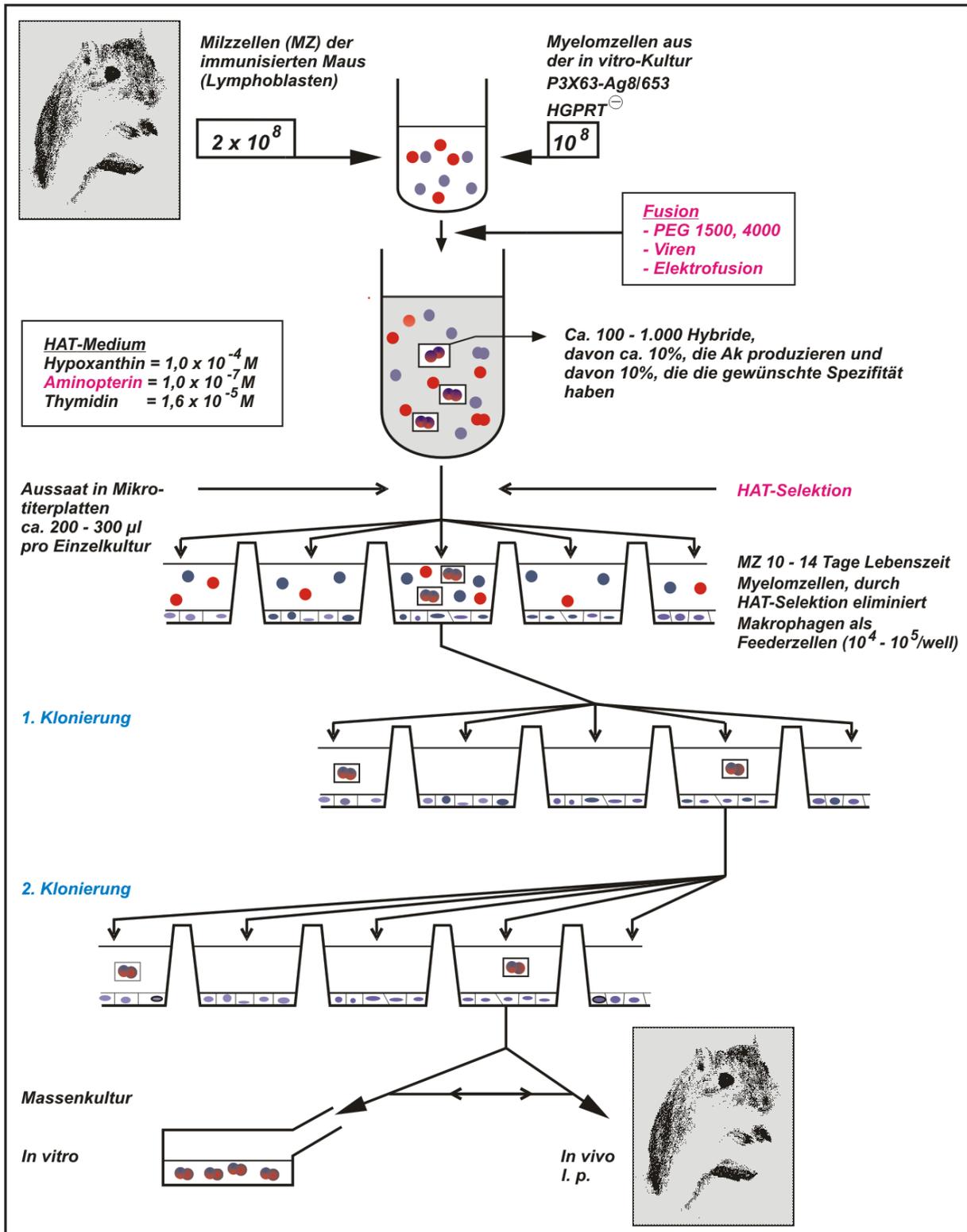


Abb. 4. Generierung monoklonaler Antikörper-produzierender Hybridome (Schema entlehnt von Dr. E. Weber).

3.8 Charakterisierung der monoklonalen und polyklonalen anti-Cathepsin F-Antikörper

3.8.1 Indirekter Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Der indirekte ELISA diente in der vorliegenden Arbeit zur Titerbestimmung von Maus- und Kaninchenseren, zur Überprüfung der mAk-Produktion der Hybridome und zur Charakterisierung von mAk und pAk.

Durchführung.

- **Adsorption:** 50 µL CF-Antigen-Lösung/Kavität (Beschichtungskonzentration für rekombinantes CF: 2 µg/mL TBS und für Einzel- bzw. Tandempeptide von CF: 5 µg/mL TBS) über Nacht bei 4°C bzw. für 2 h bei RT.
- **Waschen:** 3 x NaCl-Tween® 20.
- **Blockierung:** 200 µL Blockierungsreagenz/Kavität für 1 h bei RT.
- **Waschen:** 3 x NaCl-Tween® 20.
- **Bindung des Primärantikörpers:** 30 µL Hybridoma-Zellkulturüberstand und 20 µL TBST/Kavität für 90 min bei RT.
- **Waschen:** 3 x NaCl-Tween® 20.
- **Bindung des Sekundärantikörpers:** 50 µL anti-Maus- bzw. anti-Kaninchen- bzw. anti-Ziege-Ak, HRP-konjugiert (1:5.000 bzw. 1:10.000)/Kavität für 60 min bei RT.
- **Waschen:** 3 x NaCl-Tween® 20.
- **Nachweis der Ag-Ak-Reaktion:** 50 µL Peroxidase-Substrat ABTS-Chromogenlösung/Kavität für 10 min bei RT. Oxidation von ABTS (2,2'-Azino-bis-[3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure]) bei Anwesenheit von H₂O₂ mittels der an den sekundären Ak gebundenen Peroxidase unter Bildung eines grünen Farbstoffes.

3.8.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung eines Proteingemisches entsprechend der Molmasse (MM) wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [217] bzw. nach O'Farrell [218] eingesetzt. Zunächst wurden die Proteine durch Erhitzung der Proteingemische auf 95°C denaturiert, verstärkt durch die gleichzeitige Reduktion mit 2-Mercaptoethanol (2-ME). Durch Bindung von SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) an die Proteine entstehen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladungs-Masse-Verhältnis (1,4 g SDS/g Protein in 1%iger SDS-Lösung). Diese Komplexe wandern im elektrischen Feld zur Anode und der Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidmatrix erlaubt ihre Trennung gemäß ihrer Molmasse.

Durchführung. Die Gele hatten eine Größe von 83 x 73 x 1,5 mm. Es wurden Trenngele mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen (7,5%, 12,5% und 15%) sowie Sammelgele mit einer 5%igen Acrylamidkonzentration verwendet (Tab. 8). Die Proteinkonzentrationen der verwendeten Proben lagen

in einem Bereich von 10 ng Protein pro Bahn bis maximal 50 µg Protein über die gesamte Gelbreite. Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:2 mit SDS-Probenpuffer (0,5 M Tris-HCl; 10% [v/v] Glycerol; 2,3% [w/v] SDS; pH 6,8) versetzt und anschließend für 5 min bei 95°C inkubiert. Für die Untersuchung der Proteingemische unter reduzierenden Bedingungen wurde 2-ME (5% [v/v]) zum Probenpuffer zugegeben. Nach Abkühlen der Proben auf RT wurden 25-50 µL Probe pro Bahn bzw. 150-300 µL Probe über die gesamte Gelbreite aufgetragen. Die Trennung des Proteingemisches erfolgte in 25 mM Tris/200 mM Glycin-Puffer (pH 6,8) über 90 min bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel. Zur Identifizierung der Proteinmasse wurde ein Molmassemarker verwendet (MM-Bereich: 14,4 bis 97,0 kDa).

Tab. 8: Herstellung von 7,5%-, 12,5%- und 15%-Trenngelen bzw. von Sammelgel für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Lösungen	Trenngel 7,5%ig	Trenngel 12,5%ig	Trenngel 15%ig	Sammelgel
30% Acrylamid; 0,8% Bisacrylamid	7,5 mL	12,5 mL	15 mL	1,5 mL
Trenngelpuffer 1,5 M Tris-HCl; pH 8,8	7,5 mL	7,5 mL	7,5 mL	
Sammelgelpuffer 0,5 M Tris-HCl; pH 6,8				2,5 mL
Aqua dest.	15 mL	10 mL	7,5 mL	6 mL
10% APS	100 µL	100 µL	100 µL	60 µL
TEMED	20 µL	20 µL	20 µL	10 µL

3.8.3 Proteinfärbung

Nach elektrophoretischer Trennung erfolgte die direkte Visualisierung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel mittels Coomassie®-Brilliant-Blau-Färbung bzw. Silberfärbung.

1. Coomassie®-Färbung

Die Proteine im Polyacrylamidgel werden durch Methanol und Essigsäure fixiert und durch Coomassie®-Brilliant-Blau gefärbt. Dieses Färbeverfahren kann zur semi-quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration (Nachweisgrenze: 0,1 µg-1 µg Protein/Bande) verwendet werden.

Durchführung. Das Polyacrylamidgel wurde 1 h bzw. über Nacht in der Färbelösung (2 g Coomassie®-Brilliant-Blau G-250; 50% [v/v] Methanol; 20% [v/v] Essigsäure) inkubiert. Danach wurde nicht Protein-gebundener Farbstoff durch Waschen mit Coomassie®-Blau-Entfärberlösung G-250 (25% [v/v] Ethanol; 8% [v/v] Essigsäure) entfernt.

2. Silberfärbung

Die Detektion von Proteinen erfolgt bei der Silberfärbung mit hoher Sensitivität mit einer Nachweisgrenze von 5 ng Protein/Bande. Die Silberfärbung ist damit 10- bis 100-fach empfindlicher als die Coomassie®-Färbung. Diese Methode ist durch die unterschiedlichen Färbeeigenschaften verschiedener Aminosäuren jedoch nur eingeschränkt zu deren Quantifizierung einsetzbar [219]. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte in Anlehnung an die Silberfärbung nach Blum *et al.* [220] und

Shevchenko *et al.* [221] bzw. nach Merril *et al.* [222]. Die dabei ablaufende chemische Reaktion beruht auf einer Umwandlung der nicht-stöchiometrisch an Proteine gebundenen Silberionen aus der Silbernitratlösung (AgNO_3) zu elementarem, metallischem Silber mittels Formaldehyd. Die Proteinbanden werden durch unterschiedliche Schwarzfärbung sichtbar. Durch einen vorausgehenden Reduktionsschritt mit 0,8 mM Natriumthiosulfatlösung ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) wird die Nachweisgrenze für Proteine erhöht [223].

Durchführung. Alle Lösungen wurden mit aqua tridest. hergestellt und die Versuchsschritte wurden bei RT durchgeführt.

- **Vorfixierung:** 50% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure für 30 min.
- **1. Fixierung:** 5% (v/v) Methanol; 7% (v/v) Essigsäure für 30 min.
- **2. Fixierung:** 2,5% (v/v) Glutaraldehyd für 30 min.
- **Waschen:** aqua tridest. über Nacht.
- **Waschen:** aqua tridest. für 30 min.
- **Reduktion:** 0,8 mM Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) für 90 s.
- **Waschen:** aqua tridest. für 3 x 20 s.
- **Färbung:** 12 mM Silbernitrat (AgNO_3) für 20 min.
- **Waschen:** aqua tridest. für 2 x 20 s.
- **Entwicklung:** 566 mM Natriumcarbonat (Na_2CO_3); 150 μL Formaldehyd; 0,016 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ für 5-10 s zur Auswaschung des weißlichen Silberniederschlags, gefolgt von einer Inkubation von 1-5 min zum Entwickeln.
- **Waschen:** aqua tridest. für 2 x 2 min.
- **Stopplösung:** 50% (v/v) Methanol; 12% (v/v) Essigsäure für 10 min.
- **Waschen:** aqua tridest. für 20 min.

Die Silberfärbung wurde ebenfalls mit Hilfe des *SilverQuest Silver Staining Kit* (Invitrogen, Karlsruhe) für massenspektrometrische (MS) Untersuchungen kompatibel durchgeführt.

3.8.4 Immunoblotting

Nach ihrer Trennung im SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine beim Blotten ebenfalls elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Das Immunoblotting erfolgte nach der von Towbin *et al.* beschriebenen Methode [224] im Tank-Blot-Verfahren (*Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell*, Bio-Rad Laboratories, München).

Durchführung. Die einzelnen Versuchsschritte erfolgten, sofern nicht anders beschrieben, bei RT.

- **Proteintransfer:** Transferpuffer für 2 h bei konstanter Stromstärke von 480 mA bzw. für 1-2 h bei 350-400 mA.
- **Überprüfung des Proteintransfers:** 2%ige Ponceau S-Lösung.
- **Blockierung:** Blockierungslösung für 1 h bei RT bzw. für 30 min bei 37°C. Der Membranbereich, der die zur Identifikation der Proteingröße mitgeführten Molmassemarker enthielt, wurde vor der Blockierung von der Blotmembran abgetrennt und mit in Essigsäure (5%) gelöstem Amidoschwarz sichtbar gemacht.
- **Waschen:** TBS für 3 x 10 min.
- **Bindung des Primärantikörpers:** in TBST verdünnter primärer anti-CF-Ak über Nacht unter leichtem Schütteln.
- **Waschen:** TBS für 3 x 10 min.
- **Bindung des Sekundärantikörpers:** in TBST verdünnter, HRP-gebundener anti-Maus- bzw. anti-Kaninchen- bzw. anti-Ziege-Ak (1:5.000-1:10.000) für 1 h.
- **Waschen:** TBS für 3 x 10 min.
- **Visualisierung des Ag-Ak-Komplexes:**
 - Chromogene Entwicklung: Nitrobluetetrazolium (NBT) unter Lichtausschluss (HRP-Substratlösung: 6 mg NBT in 20 mL TBST; 20 mg NADH₂; 30 µL [80%] Phenol; 30 µL [30%] H₂O₂). Nach 5-10 min Sichtbarwerden der gesuchten Bande und anschließendes Stoppen der Enzymreaktion durch einen Überschuss an Leitungswasser.
 - Filmentwicklung: *ECL Lumi-Light Immunoblotting Substrate* gemäß den Herstellerangaben. Das bei der ECL (*Enhanced ChemiLuminescence*)-Entwicklung entstandene Chemilumineszenz-Signal wurde auf einem ECL-Film abgebildet.

3.8.5 Epitope Mapping

Mit Hilfe des Epitope Mapping wird diejenige Peptidsequenz (Epitop) innerhalb einer gegebenen AS-Sequenz ermittelt, an die der eingesetzte Ak spezifisch bindet. Im Versuch wurden mittels Pep-SPOT-Synthesetechnik (Abb. 5) 98 Tridecapeptide (13-mere) der Cathepsin F-AS-Sequenz (nach Wang *et al.* [4]: 1.-302. AS und nach Santamaria *et al.* [5]: 183.-484. AS) bzw. 115 Tridecapeptide der Cathepsin W-AS-Sequenz synthetisiert, die um jeweils 3 AS gegeneinander fortlaufend verschoben waren. Diese Peptidsequenzen wurden mit dem C-terminalen Teil kovalent an eine Zellulosemembran gebunden.

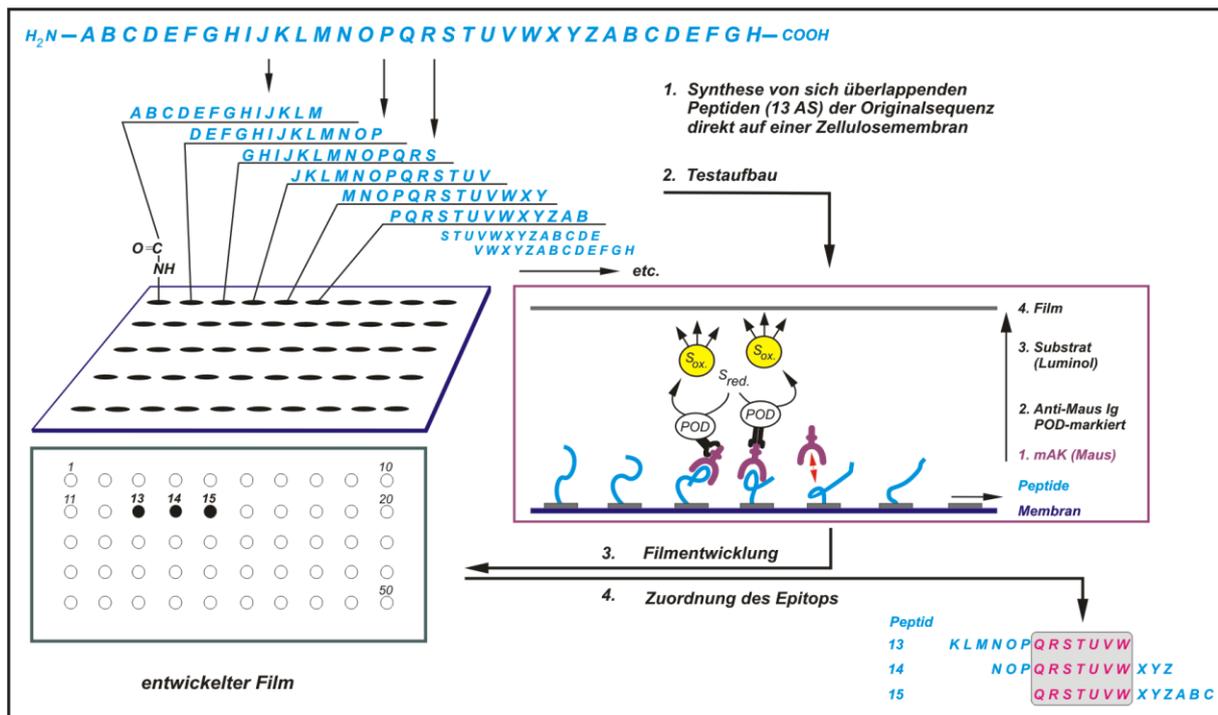


Abb. 5. Prinzip des Epitope Mapping nach der Pep-SPOT-Technik (Schema entlehnt von Dr. E. Weber). Die Bezeichnung der Aminosäuren erfolgt zum besseren Verständnis nach dem Alphabet und nicht nach dem Einbuchstabencode auf der Grundlage der IUPAC-IUB-Nomenklatur [24].

Durchführung. Es wurden die Epitope Mapping-Membranen CF: Je_350_3#1355 für CF bzw. CW: Je_299_10 für CW eingesetzt, die wie folgt behandelt wurden:

- **Waschen:** Methanol für 10 min und TBST für 3 x 10 min.
- **Blockierung:** Blockierungslösung für 1 h.
- **Waschen:** TBST für 10 min.
- **Bindung des Primärantikörpers:** in Blockierungslösung verdünnter primärer Antikörper (1-10 µg/mL) für 90 min.
- **Waschen:** TBST für 5 min.
- **Bindung des Sekundärantikörpers:** anti-Maus- bzw. anti-Kaninchen- bzw. anti-Ziege-Ak, HRP-konjugiert (1:5.000-1:10.000) für 90 min.
- **Waschen:** TBST für 3 x 10 min.
- **Detektion des Ag-Ak-Komplexes:** ECL Lumi-Light Immunoblotting Substrate gemäß den Herstellerangaben und Detektion des Chemilumineszenz-Signals auf Hyperfilm™ bzw. Lumi-Film.
- **Waschen:** TBST für 3 x 10 min.
- **Regenerierung:** Regenerierungspuffer für 30 min bei 50°C.
- **Waschen:** TBST für 3 x 10 min und Methanol für 10 min.

Die Membran wurde im Anschluß wiederverwendet oder getrocknet und bei -20°C gelagert. Die einzelnen Versuchsschritte der Epitopkartierung wurden, sofern nicht anders angegeben, auf einem Rotations-schüttler bei RT durchgeführt.

3.8.6 Immunglobulinreinigung

1. IgG-Reinigung

Die Reinigung mono- und polyklonaler Immunglobuline (Ig) vom Typ IgG aus Kulturüberständen der Hybridomazellen bzw. aus Seren wurde mittels Affinitätschromatographie an HiTrap™ Protein G-Sepharose durchgeführt. Protein G (MM: 35 kDa) ist ein Oberflächenprotein der Streptokokken der Gruppe G, das über einen Typ III Fc-Rezeptor an die Fc-Region des IgG bindet. Das Protein G ist an Sepharose-*Beads* gekoppelt [225]. Die verwendete Protein G-Sepharose wies eine Bindungskapazität von 25 mg humanem (7 mg murinem) IgG/mL Protein G auf. Die Affinitätsreinigung der Ak wurde mit einem *Low Pressure Liquid Chromatography System* (Bio-Rad Laboratories, München) durchgeführt.

Durchführung. Protein G-Sepharose (1 mL) wurde mit 10 mL Bindungspuffer (pH 7,0) äquilibriert. Der antikörperhaltige Kulturüberstand wurde zunächst für 5 min bei 3.500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand mit Bindungspuffer (1:5) verdünnt. Nach dem Auftragen der Ak-Lösung auf die Protein G-Sepharose-Säule wurde die Matrix 5 x mit je 1 mL Bindungspuffer gespült. Dann erfolgte die Elution der Ak mit 3-6 mL Glycin-HCl-Puffer (pH 2,7) unter Aufzeichnung des Elutionsprofils bei 278 nm. Das Eluat wurde in 50 µL Neutralisationspuffer (pH 9,0) fraktioniert aufgefangen. Die Protein G-Sepharose wurde nach Versuchsende mit 20% Ethanol überschichtet und bei +4°C bis +8°C gelagert. Die Aufreinigung der eluierten Proben wurde elektrophoretisch in der SDS-PAGE (3.8.2) überprüft.

2. IgM-Reinigung

Die Reinigung der Ak vom Typ IgM wurde mittels der Matrix HiTrap™ IgM *Purification* HP durchgeführt. Dies ist ein aus Polypropylen bestehendes thiophiles Adsorptionsmedium, das mit 2-Mercaptopyridin an *Sepharose™ High Performance* gebunden ist. Die Bindungskapazität der Matrix liegt bei 5 mg humanem IgM/mL Sepharose.

Durchführung. Die mit der HiTrap™ IgM-Matrix (3 g) bestückte Säule wurde mit jeweils 5 mL Bindungs-, Elutions- und Regenerierungspuffer gewaschen und anschließend nochmals mit 5 mL Bindungspuffer äquilibriert. Die IgM-enhaltenden Kulturüberstände wurden für 10 min bei 3.500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,8 M Ammoniumsulfat langsam versetzt und anschliessend über die Säule gegeben. Ungebundene Bestandteile des Proteingemisches wurden mit 15 mL Bindungspuffer eliminiert. Dann wurden die an die Matrix gebundenen Ak mit Elutionspuffer eluiert, fraktioniert gesammelt und mit 1% Thimerosal (Endkonzentration 0,01%) versetzt. Die Säulen zur IgM-Reinigung wurden mit 5-10 mL Regenerierungspuffer versetzt und mit 5 mL Bindungspuffers reäquilibriert. Dann wurden sie mit 20% Ethanol überschichtet und bei +4°C bis +8°C gelagert. Die eluierten Proben wurden in der SDS-PAGE (3.8.2) untersucht.

3.8.7 Konzentrierung von Antikörpern

Antikörperlösungen wurden in einer Amicon®-Zelle (Millipore, Bedford, GB) mit einer dem Ig-Typ entsprechenden Millipore® Ultrafiltrationsmembran (Millipore, Bedford, GB) bei +4°C eingengt; IgG (MM: 146-165 kDa) mit einer Membran der Porengröße für 10 kDa und IgM (MM: 970 kDa) mit einer für 100 kDa. Das in der Zelle verbleibende minimale Restvolumen wurde 2-3 x mit PBS-(0,01%) Thimerosal-Puffer (pH 7,4) verdünnt und bis zum Erreichen einer Ak-Konzentration von 1 mg/mL eingengt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry *et al.* [226] bzw. Bradford [227] (3.8.8). Eine Funktionsüberprüfung der Ak wurde per ELISA (3.8.1) durchgeführt.

3.8.8 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Um die Konzentrationen von Proteinen in Lösungen zu bestimmen, wurden die Methoden nach Lowry *et al.* [226] und Bradford [227] angewandt.

1. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry

Bei der Lowry-Methode, die eine Verfeinerung der Biuret-Methode darstellt, wird aus Cu²⁺-Ionen des Kupfersulfat (CuSO₄) und Peptidbindungen ein Kupfer-Proteinkomplex gebildet, wobei eine Reduktion der Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen stattfindet. Die Cu⁺-Ionen und die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan reduzieren das Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz, so dass ein blauer Farbstoff entsteht, über dessen Extinktionsbestimmung sich die Proteinkonzentration quantitativ ermitteln lässt [226].

Durchführung. Reagenzien für die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry:

Lösung A:	943 mM Na ₂ CO ₃ ; 5,3 mM Kaliumhydrogentartrat; 500 mM NaOH
Lösung B:	1% CuSO ₄
Lösung C:	20 mL Lösung A + 1 mL Lösung B + 30 mL aqua dest.

Die Proben (je 20 µL), für die eine 5-fache Bestimmung pro Verdünnungsreihe durchgeführt wurde, wurden im Verhältnis 1:10 mit Lösung C versetzt (je 200 µL) und für 20 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden zu jeder Probe je 200 µL Folin-Ciocalteu-Lösung (1:10) gegeben und für 2 h bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Die Extinktion des gebildeten Farbstoffs wurde bei 595 nm gemessen. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde eine Standardkurve aus bovinem Serumalbumin im Konzentrationsbereich von 0,015-1,0 mg/mL etabliert.

2. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Bei Bindung eines Proteins an den Farbstoff Coomassie®-Brilliant-Blau G-250 verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum von 465 nm (rot-braun) nach 595 nm (blau). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist dabei ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung [227-230]. Die Bradford-Methode ist ein einfaches und schnell auszuführendes Verfahren, das sensitiver und weniger störanfällig, insbesondere

gegenüber Reduktionsmitteln, als die Lowry-Methode ist. Nachteilig ist hingegen die Störanfälligkeit gegenüber Detergenzien [227].

Durchführung. Es wurde der *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, München) nach Bradford eingesetzt. Je Protein wurden 2-3 verschiedene Verdünnungen für 5-fache Bestimmungen angefertigt. Es wurden 20 µL einer Proteinlösung mit je 980 µL 1:5-verdünntem Reagenz versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 595 nm. In Relation zum *Bio-Rad Protein Standard* aus bovinem Immunglobulin (Konzentrationsbereich: 0,04-1,34 mg/mL) erfolgte die Berechnung der Proteinkonzentration der Proben.

3.9 Gewinnung von Cathepsin F aus einer humanen Tumorzelllinie

3.9.1 Kultivierung der Karzinomzelllinie HeLa-S3

Kulturmedium. Die humane Tumorzelllinie HeLa-S3 wurde in RPMI 1640-Medium (25 mM HEPES; 2 mM L-Glutamin; 2 g NaHCO₃/L; 5,5 g NaCl/L; 80 mg Gentamycin/L; 300 mg Geneticin G-418/L und 10% FKS, das vorher für 20 min bei 56°C hitzeinaktiviert wurde) kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte regelmäßig alle 3-4 Tage.

Kulturbedingungen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardkulturbedingungen im Inkubator (HERAcell®150, Heraeus®, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold) bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5%.

Zellpassagierung. In Abhängigkeit von der Zellkonfluenz wurden die Zellen nach 3-6 Tagen passagiert. Hierfür wurden die Zellen mechanisch von der Bodenfläche der Zellkulturflasche gelöst, in Kulturmedium resuspendiert und gemäß der gewünschten Zellzahl auf Zellkulturflaschen verteilt.

Kryokonservierung. Die Zellen ($\geq 2 \times 10^6$ Zellen/mL Kulturmedium) wurden für 10 min bei 4°C und 300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (90% [v/v] FKS und 10% [v/v] DMSO) resuspendiert und dann in flüssigem N₂ bei -196°C eingefroren. Zur Rekultivierung wurden die kryokonservierten Zellen bei 37°C schnell aufgetaut und in Kulturmedium überführt, um die toxische Wirkung des Einfriermediums zu reduzieren.

3.9.2 Herstellung von Zelllysaten

Zum Nachweis von zellulären Proteinen mussten die Zellen lysiert werden. Dazu wurden die HeLa-S3-Zellen 3 x in je 10 mL RPMI 1640-Medium gewaschen und für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in *Protease Inhibitor Cocktail*-Lösung (PIC) (1 x 10⁶ Zellen/mL PIC-Lösung; PIC gelöst in aqua dest.) resuspendiert, die Zellen mechanisch mittels eines Ultra-Turrax® (IKA®, Staufen) (3-5 x 20 s) im Eisbad aufgeschlossen und die Zellyse mikroskopisch kontrolliert. Es folgte eine Alkalisierung des Zelllysats durch 1 M NaOH auf einen pH > 7. Es schlossen sich 5 Frier-Tau-Vorgänge an. Die nach

mechanischem und thermischem Aufschluss verbleibenden Zellfragmente, inklusive genomischer DNA, wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 2.400 x g als Pellet entfernt. Der CF-enhaltende Überstand wurde u. a. im Immunoblot (3.8.4) und in der Immunpräzipitation (3.9.3) eingesetzt.

3.9.3 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) diente der Isolierung von CF aus Zellysaten mit Hilfe von anti-CF-Ak.

Durchführung. Zur Äquilibration der *Hi-Trap*TM Protein G-Sepharose wurde diese mehrmals mit PBS-Puffer gewaschen. Es wurden 100 µL Protein G-Sepharose-Suspension (1:2 mit PBS verdünnt) mit 4 mL des vorbereiteten Zellysats (ca. 2 x 10⁷ Zellen/mL Zellysat pro IP-Ansatz) versetzt, um alle unspezifisch an die Matrix gebundenen Moleküle aus dem Lysat zu entfernen. Die Prä-Adsorption erfolgte für 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler. Nach Abtrennung der Protein G-Sepharose durch Zentrifugation (2 min bei 600 x g) wurde der vorgereinigte Zellysatüberstand mit polyklonalen anti-CF-Ak (10-500 µL) oder mit monoklonalen anti-CF-Ak aus Zellkulturüberständen (10 mL) bzw. mit affinitätschromatographisch gereinigten und konzentrierten monoklonalen anti-CF-Ak (5-10 µL) versetzt. Die Immunpräzipitation erfolgte für 4 h bzw. über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler. Zur Isolierung der spezifischen Ag-Ak-Komplexe wurde mit 100-300 µL der gewaschenen und aufbereiteten Protein G-Sepharose (1:2 mit PBS) inkubiert (2 h, RT oder 4°C, im Überkopfschüttler). Das durch Zentrifugation gewonnene Pellet aus Protein G-Sepharose und gebundenen Immunkomplexen wurde mit 500 µL PBS gewaschen und anschließend mit 500 µL Lysispuffer (1 M Tris-HCl; 5 M NaCl; 20% TritonTM-X-100; 10% [v/w] SDS) und *Protease Inhibitor Cocktail* (1 Tablette PIC/10 mL Lysispuffer) für 3 x 10 min bei 4°C versetzt. Zur Trennung des Immunkomplexes von der Matrix wurden 100 µL 2-fach Probenpuffer (1 M Tris-HCl; 20% [v/v] Glycerol; 4,6% [w/v] SDS; pH 6,8) und Laemmli-Puffer (SERVA GmbH, Heidelberg; 126 mM Tris HCl; 4% [v/w] SDS; 20% Glycerin; 0,02% Bromphenolblau; pH 6,8) im Verhältnis 1:2 zugesetzt und für 5-10 min bei 95°C erhitzt. Durch Zugabe von 10% 2-Mercaptoethanol (5 min, 95°C) wurde das Ag vom Ak getrennt. Nach Zentrifugation (10 min, RT, 3.000 x g) wurde der Überstand zur Detektion des Ag in der SDS-PAGE (3.8.2) und im Immunoblot (3.8.4) analysiert.

3.10 Isotypbestimmung

Zur Bestimmung des Immunglobulin-Isotyps und der Subklasse der mAk wurden Teststreifen des *Iso Quick Kit* (Sigma-Aldrich, Steinheim) eingesetzt.

3.11 Kreuzreaktivität

Die generierten monoklonalen und polyklonalen anti-CF-Ak wurden bzgl. ihrer Kreuzreaktion mit CW im indirekten ELISA (3.8.1) und im Immunoblot (3.8.4) untersucht.

3.12 Immunhistochemie

Mit Hilfe immunhistochemischer Verfahren lassen sich Verteilungsmuster von Proteinen in Gewebeschnitten visualisieren. Dazu wird das zu analysierende Protein (Antigen, Ag), wie z. B. das Cathepsin F, von einem spezifischen Primärantikörper (PAK) detektiert, der wiederum von einem Sekundärantikörper (SAK), der u. a. an ein Enzym (Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase) konjugiert vorliegen kann, erkannt und gebunden wird. Durch die enzymatische Umsetzung eines Substrats (Chromogen, Fluoreszenzfarbstoff) wird die Ag-Ak-Bindung lichtmikroskopisch sichtbar gemacht (indirekte Immunhistochemie, Abb. 6-2).

3.12.1 In der Immunhistochemie eingesetzte Gewebe

Die Expression des in vielen Geweben vorkommenden Cathepsin F wurde mittels immunhistochemischer Methoden an mikroskopischen Schnittpräparaten formalinfixierter und in Paraffin eingebetteter Gewebe (Herz, Kolon, Leber und Thymus) untersucht. Die Gewebeproben wurden freundlicherweise vom Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt.

3.12.2 Vorbereitung der immunhistochemischen Analysen

Die Paraffinschnitte wurden zunächst in Xylol für 3 x 10 min eingelegt, um das Paraffin zu entfernen. Anschließend wurden die Präparate durch Inkubation in 95% und 70% Ethanol (je 2 x 3 min) und in aqua dest. (30 s) rehydratisiert und dann mit PBS-Puffer gespült. Bei formalinfixierten Gewebsschnitten wurde zur Demaskierung der Ag eine Mikrowellenbehandlung in Citratpuffer (15 mL Lösung A [10,5 g Zitronensäure-Monohydrat in 500 mL aqua dest.] und 85 mL Lösung B [14,7 g Natriumcitrat-Dihydrat in 500 mL aqua dest.] in 1.000 mL aqua dest.; pH 6,0) für maximal 10 x 1 min bei einer Wattleistung von 700 W durchgeführt. Nach der hitzeinduzierten Epitodemaskierung (HIER) und Abkühlung der Objektträger für mindestens 20 min auf RT folgte nach einer 5-minütigen Spülung in PBS eine Inkubation für 20 min im Methanol-Wasserstoffperoxid-Gemisch (120 mL kaltes Methanol und 30 mL 3% H₂O₂), um endogene Peroxidasen (in Erythrozyten, Granulozyten und Muskelzellen) zu blockieren. Dann folgten 3 Waschschrte (2 x 1 min und 1 x 5 min) mit PBS.

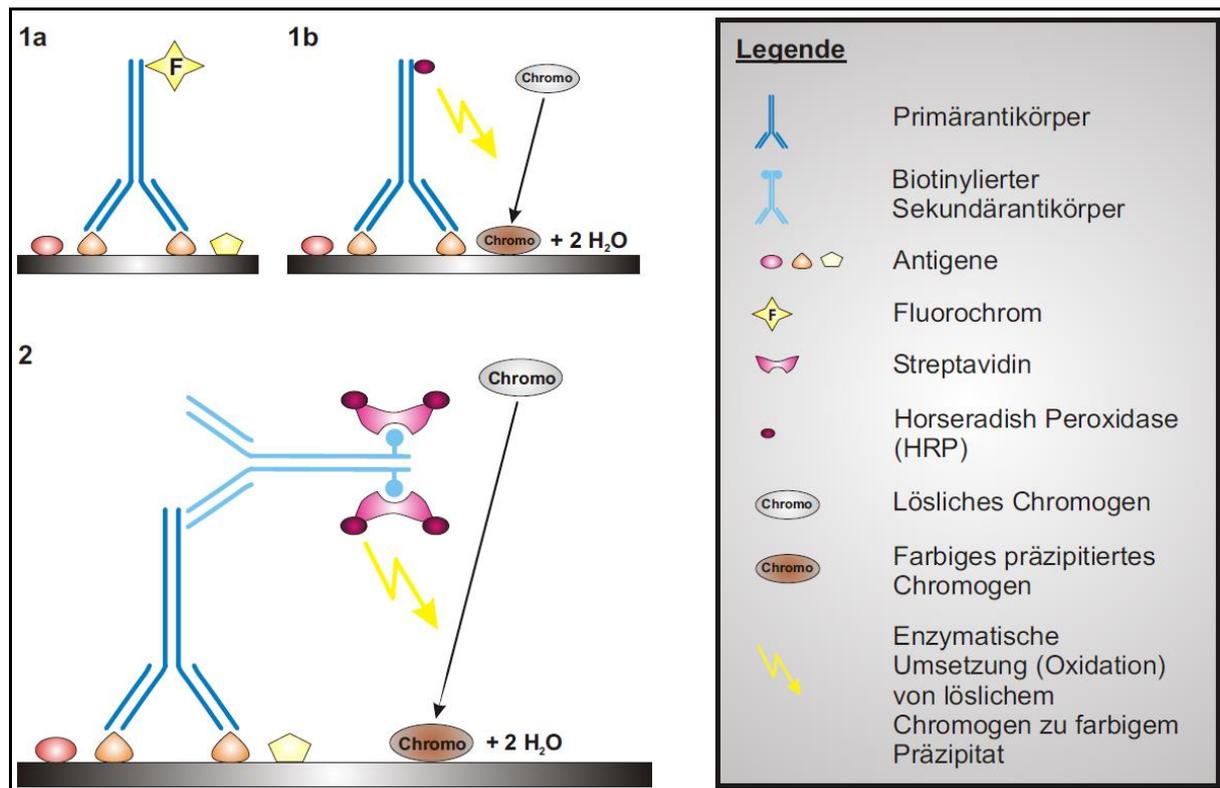


Abb. 6. Direkte und indirekte Immunhistochemie bzw. Immunfluoreszenz.

Abb. 6-1: Prinzip der direkten Immunfluoreszenz (Abb. 6-1a) bzw. der direkten Immunhistochemie (Abb. 6-1b).

Abb. 6-2: Prinzip der indirekten Immunhistochemie (z. B.: Labelled Streptavidin-Biotin [LSAB]/Horseradish Peroxidase [HRP]-Methode).

Pro Primärantikörper können bis zu 8 Sekundärantikörper gebunden werden und pro Sekundärantikörper können mehrere Enzym-gekoppelte Streptavidin-Einheiten gebunden werden (2-facher Signalamplifikations-effekt).

3.12.3 Antikörper

Die wie unter 3.12.2 vorbehandelten Gewebepreparate wurden mit 250 µL monoklonalem bzw. polyklonalem anti-CF-PAK über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Dann wurde 3 x 1 min mit PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem SAK (anti-Maus- bzw. anti-Kaninchen- [Dako REAL™ Link biotinylierter Sekundärantikörper, Dako, Hamburg] bzw. anti-Ziege-Ak) für 30 min bei RT. Danach wurde 1 min mit PBS gewaschen.

3.12.4 Visualisierung mittels LSAB-Methode und Diaminobenzidin-Reaktion

Zur Visualisierung der Immunreaktion wurde die *Labelled StreptAvidin-Biotin*-Methode (LSAB-Methode, Dako, Hamburg) eingesetzt. Der Nachweis der Bildung der Ag-Ak-Kaskade erfolgte durch die Bindung des Meerrettichperoxidase-konjugierten Streptavidin an das an den SAK gekoppelte Biotin. Die Gewebsschnitte wurden für 35 min bei RT mit Dako REAL™ Streptavidin Peroxidase inkubiert. Nicht-gebundene LSAB-Komponenten wurden durch 3-maliges Spülen mit PBS entfernt. Bei der anschließenden Diaminobenzidin-Reaktion wurde mit Hilfe der Peroxidase das farblose Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) zu einem braunen Reaktionsprodukt oxidiert und damit das

Zielantigen lokalisiert. Dazu wurden die Gewebsschnitte mit jeweils 250 μ L DAB-Reagenz, das mit wasserstoffperoxidhaltigem Substratpuffer 1:50 verdünnt worden war, versetzt und für 10 min inkubiert.

3.12.5 Gegenfärbung mit Hämalaun

Zur Darstellung des umliegenden Gewebes wurde nach vorangegangenem Spülen in aqua bidest. eine Kernfärbung mit 1:5 verdünntem 0,1% saurem Mayer's Hämalaun für 2 min durchgeführt. Zum Bläuen wurden die Präparate mit Leitungswasser entfärbt und dann erneut mit aqua bidest. gespült.

3.12.6 Konservierung der Präparate

Die Paraffinschnitte wurden zunächst mit Ethanol (je 1 min in 50% und 70%, 2 x 1 min in 96%, 1 min und 5 min oder 10 min in 100% Ethanol) dehydratisiert. Nach der Dehydratisierung wurden sie mit Xylol (2 x 1 min und 5 min oder 15 min) behandelt, um den im Gewebe befindlichen Alkohol zu verdrängen. Das Eindeckeln fand mit einem auf organischen Lösungsmitteln basierenden Fixiermittel, Entellan® (Merck, Darmstadt), statt.

3.12.7 Negativkontrolle und Positivkontrolle

Die bei jedem Versuch mitgeführten Negativkontrollen wurden wie oben beschrieben in identischer Weise behandelt, wobei anstelle des PAK mit PBS inkubiert wurde. Thymusgewebe, das CF nicht exprimiert [4], wurde auch als Negativkontrolle eingesetzt. Als Positivkontrolle für das Anfärbeverfahren im Thymusgewebe diente die Färbung von CD45.

3.12.8 Bewertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate

Vorkommen, Lokalisation und Verteilungsmuster des CF in den immunhistochemisch angefärbten Präparaten wurden lichtmikroskopisch bei 20- bzw. 40-facher Vergrößerung analysiert (Lichtmikroskop: AxioPlan-2, Zeiss, Jena; AxioCam-Kamera; Photodokumentation: Programme AxioVision und Corel Photo-Paint).

3.13 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden freundlicherweise mit Hilfe von Dr. A. Schierhorn (Forschungsgruppe „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle/Saale) realisiert.

Durchführung. Die Zusammensetzung der Proben wurde durch *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight* (MALDI-TOF)-Massenspektrometrie an einem Esquire-LC-Ionenfallen-Massenspektrometer (Bruker-Franzen Analytik, Bremen) detektiert. Hierfür wurden die das zu identifizierende Protein enthaltenden Silbergelbanden (3.8.3) (MS-kompatible Silberfärbung mittels *SilverQuest Silver Staining Kit* [Invitrogen, Karlsruhe]) aus der SDS-PAGE (3.8.2) ausgeschnitten und 3 x in

aqua dest., 2 x mit 10 mM Ammoniumbicarbonat und anschließend mit 10 mM Ammoniumbicarbonat in 50% Acetonitril gewaschen. Die Gelproben wurden getrocknet und erneut in 20 µL 10 mM Ammoniumbicarbonat (pH 8,0) rehydratisiert, um dann mit Trypsin (Promega, Madison, WI, US) über Nacht bei 37°C inkubiert zu werden [221]. Daraufhin wurden die trypsinierten Peptide aus dem Gel extrahiert und unter Verwendung eines *Micromass CapLC* (Micromass, Manchester, GB) in Verbindung mit einem *Quadrupol-Time-Of-Flight*-Massenspektrometer (Q-TOF 2, Micromass, Manchester, GB) analysiert. Die Proben wurden durch eine *Symmetry300TM-C₁₈*-Säule (Waters, Eschborn) entsalzt und an einer *Atlantis dC18 NanoEaseTM*-Säule (Waters, Eschborn) mit einem Gradienten von 5% bis 60% Acetonitril in 0,1%iger Ameisensäure in 30 min getrennt. Im Anschluss wurde der Gradient innerhalb von 10 min auf 95% Acetonitril in 0,1%iger Ameisensäure erhöht und nach 4 min erneut auf die Ausgangsbedingungen zurückgebracht. Die Ionenspektren der Peptidfragmente wurden mit der MSDB Proteinsequenz-Datenbank bzgl. eventueller Übereinstimmungen abgeglichen, wobei die Suchmaschine MASCOT (Matrix Science, London, GB) eingesetzt wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Gewinnung von Cathepsin F und Cathepsin F-Peptiden

4.1.1 Cathepsin F-Aminosäuresequenz

Zu Beginn der Versuche war nur die von Wang *et al.* ermittelte Aminosäuresequenz (AS-Sequenz) des humanen Cathepsin F (CF) von 302 Aminosäuren (AS) (keine Signalsequenz, Präpeptid: 87 AS, Propeptid: 88 AS [1.-88. AS], reifes CF: 214 AS [89.-302. AS]) und einer Molmasse (MM) von 33,9 kDa bekannt [4]. Später wurde diese CF-AS-Sequenz von Santamaria *et al.* auf 484 AS (Signalsequenz: 19 AS [1.-19. AS], Propeptid: 251 AS [20.-270. AS], reifes CF: 214 AS [271.-484. AS]) mit einer MM von 53,4 kDa korrigiert [5, 231].

4.1.2 Cathepsin F und Cathepsin F-Peptide

Humanes rekombinantes Cathepsin F aus *Escherichia coli*. Das zunächst eingesetzte, aus *E. coli* gewonnene rekombinante CF, freundlicherweise von Dr. D. Brömme und PD Dr. T. Wex zur Verfügung gestellt, wurde auf der Grundlage der von Wang *et al.* [4] beschriebenen 302 AS zählenden CF-AS-Sequenz generiert und nicht nach der erst später von Santamaria *et al.* [5] ermittelten CF-AS-Sequenz von 484 AS. Dies führte zu anfänglichen Schwierigkeiten in der Interpretation der Versuchsergebnisse, insbesondere im Immunoblot (siehe 4.4.1 Antikörper gegen *E. coli*-Proteine).

Gegen dieses, aus *E. coli* stammende CF wurden in der Maus keine spezifischen anti-CF-Antikörper, sondern nur gegen *E. coli*-Proteine gerichtete Antikörper (Ak) gewonnen (siehe 4.4.1 Antikörper gegen *E. coli*-Proteine). Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf der Arbeit CF-Peptide eingesetzt (Tab. 9).

Cathepsin F-Peptide. Cathepsin F-Peptide (Tab. 9) wurden anhand der CF-AS-Sequenz nach Santamaria *et al.* [5] ausgesucht. Zur Vermeidung von Kreuzreaktionen, insbesondere mit dem phylogenetisch verwandten Cathepsin W (CW) [4, 14], wurden identische oder homologe AS-Abschnitte zwischen CF und CW mittels verschiedener Datenbanken [110, 232] und durch Sequenzalignment (Sequenzvergleichsprogramm von Rothen AG) ermittelt und für die Peptidsynthese ausgeschlossen. Für die Peptide wurden Sequenzabschnitte von 6 bis 15 AS ausgewählt, die eine geringe Wahrscheinlichkeit der Kreuzreaktion zeigten. Aus kurzen AS-Abschnitten bestehende Antigene (Ag) mit einer MM < 5 kDa sind wenig immunogen [233]. Sie wurden an Carrier gekoppelt, um eine zur Ak-Bildung führende Immunreaktion zu initiieren [234]. Um die Immunogenität des Ag zu erhöhen, wurden im späteren Versuchsverlauf Tandempeptide aus 2-3 Einzelpeptiden synthetisiert, die ungekoppelt oder an einen Carrier gebunden zur Immunisierung eingesetzt wurden. Als CF-Peptid-Carrier wurden Pam₃Cys und später Lysinreste verwendet, da die Bildung von Ak gegen Pam₃Cys beobachtet wurde.

Aminosäuresequenz der CF-Peptide. Die Tabelle 9 und die Abbildung 7 geben einen Überblick über die zur Immunisierung eingesetzten CF-Peptide, deren AS-Sequenz und deren Lokalisation innerhalb der 484 AS umfassenden CF-AS-Sequenz [5].

Tab. 9: Cathepsin F-Peptide.

Bezeichnung	Aminosäure-Anzahl	Aminosäuresequenz der Cathepsin F-Peptide innerhalb der Cathepsin F-Aminosäuresequenz
Rekombinantes Cathepsin F		
Pro-CF aus E. coli	302	₁₈₃ MASIF...SAVVD ₄₈₄
Cathepsin F-Einzelpeptide (¹ungekoppelt, ²an Lysinreste gekoppelt)		
CF-P1 ^{1,2}	10	₃₀₉ FLNQGTLTLLSL ₃₁₈
CF-P2 ^{1,2}	6	₃₂₇ DKMDKA ₃₃₂
CF-P3 ^{1,2}	10	₃₆₇ NFSAEKAKVY ₃₇₆
CF-P4 ^{1,2}	7	₄₇₄ VNTMASS ₄₈₀
CF-P5 ^{1,2}	8	₄₁₆ ISRPLRPL ₄₂₃
CF-P6 ²	18	₄₀₅ NAFGMQFYRHGISRPLRP ₄₂₂
CF-P7 ²	12	₃₅₃ TEDDYSYQGHMQ ₃₆₄
Cathepsin F-Tandempeptide (¹ungekoppelt, ²an Lysinreste gekoppelt, ³an Pam₃Cys gekoppelt)		
CF-TP-1/1 ^{1,3}	20	₃₀₉ FLNQGTLTLLSL ₃₁₈₋₃₀₉ FLNQGTLTLLSL ₃₁₈
CF-TP-2/4/5 ^{1,2,3}	21	₃₂₇ DKMDKA ₃₃₂₋₄₇₄ VNTMASS ₄₈₀₋₄₁₆ ISRPLRPL ₄₂₃
CF-TP-3/3 ^{1,2,3}	20	₃₆₇ NFSAEKAKVY ₃₇₆₋₃₆₇ NFSAEKAKVY ₃₇₆
Pro-Cathepsin F-Peptide (¹ungekoppelt, ²an Lysinreste gekoppelt, ³an Pam₃Cys gekoppelt)		
Pro-CF-P1 ^{1,2,3}	15	₂₅₆ EPGNKMKQAKSVGDI ₂₇₀
Pro-CF-P2 ^{1,2,3}	13	₂₀ APAQPRAASFQAW ₃₂
Pro-CF-P3 ^{1,2,3}	14	₆₈ RVRRAGQGSLYSLE ₈₁

CF = Cathepsin F; P = Peptid; TP = Tandempeptid; Pro = Pro-Peptid.

	< Signalsequenz	> <	20 Pro-CF-P2 ₃₂	Pro-Cathepsin F	
1	MAPWLQLLSL	LGLLPGAVAA	PAQPRAASFQ	AWGPPSPELL	APTRFALEMF NRGRAAGTRA 60
61	VLGLVRGRVR	68 Pro-CF-P3 ₈₁ RAGQGSLSL	EATLEEPPCN	DPMVCRLPVS	KKTLLCSFQV LDELGRHVLL 120
121	RKDCGPVDTK	VPGAGEPKSA	FTQGSAMISS	LSQNHDPNRN	ETFSSVISLL NEDPLSQDLP 180
181	VKMASIFKNF	VITYNRTYES	KEEARWRLSV	FVNNMVRQAK	IQALDRGTAQ YGVTKFSDLT 240
241	EEEFRTIYLN	256 Pro-CF-P1 ₂₇₀ TLLRKEPGNK MKQAQSVGDL	> <	Reifes Cathepsin F	APPEWDWRSK GAVTKVKDQG MCGSCWAFSV 300
301	TGNVEGQWFL	309 CF-P1 ₃₁₈ NQGTLTLLSLE	327 CF-P2 ₃₃₂ QELLDCDKMD	KACMGGLPSN	AYSAIKNLGG LETEDDYSYQ 360
361	353 CF-P7 ₃₆₄ GHMQSCNFS	367 CF-P3 ₃₇₆ SA EKAKVY	INDS	VELSQNEQKL	AAWLAKRGP I SVAI 405 CF-P6 ₄₂₂ NAFGMQ FYRHG I SRPL 420
421	416 CF-P5 ₄₂₃ RPLCSPWLID	HAVLLVGYGN	RSDVPFWAIK	NSWGTDWGEK	GYYYLHRGSG 474 CF-P4 ₄₈₀ ACGVNTMASS 480
481	> AVVD				484

Abb. 7. Position der Cathepsin F-Peptide innerhalb der humanen Pro-Cathepsin F-Aminosäuresequenz [5].

Lokalisation der Pro-CF-Peptide (orange) und der CF-Peptide (hellblau) innerhalb der 484 Aminosäuren (AS) umfassenden humanen Pro-Cathepsin F (CF)-AS-Sequenz. Die Signalsequenz (AS 1-19), das Pro-Peptid des Pro-CF (AS 20-270) und das reife CF (AS 271-484) sind durch senkrechte blaue Striche voneinander abgegrenzt.

Oberflächenexposition der selektierten CF-Peptide. Die CF-Peptide wurden hinsichtlich ihrer Lage im CF-Molekül untersucht [232], wobei deren Präsentation an der Moleküloberfläche die Antikörper-Bindung ermöglicht [235]. Abbildung 8 gibt Auskunft über die Position einiger der zur Peptid-Synthese verwendeten CF-Sequenzen (CF-P1 bis CF-P7; gelb) im CF-Molekül. Das CF-Molekül ist ein Dimer, das aus 2 Subeinheiten (in Abb. 8 pink und blau) besteht, die sich aus Abschnitten mit α -Helix, β -Faltblattstruktur und mit linearer AS-Abfolge zusammensetzen.

Alle CF-Peptidsequenzen sind optimal für eine Ak-Bindung exponiert, insbesondere die der Peptide CF-P3, CF-P5, CF-P6 und CF-P7.

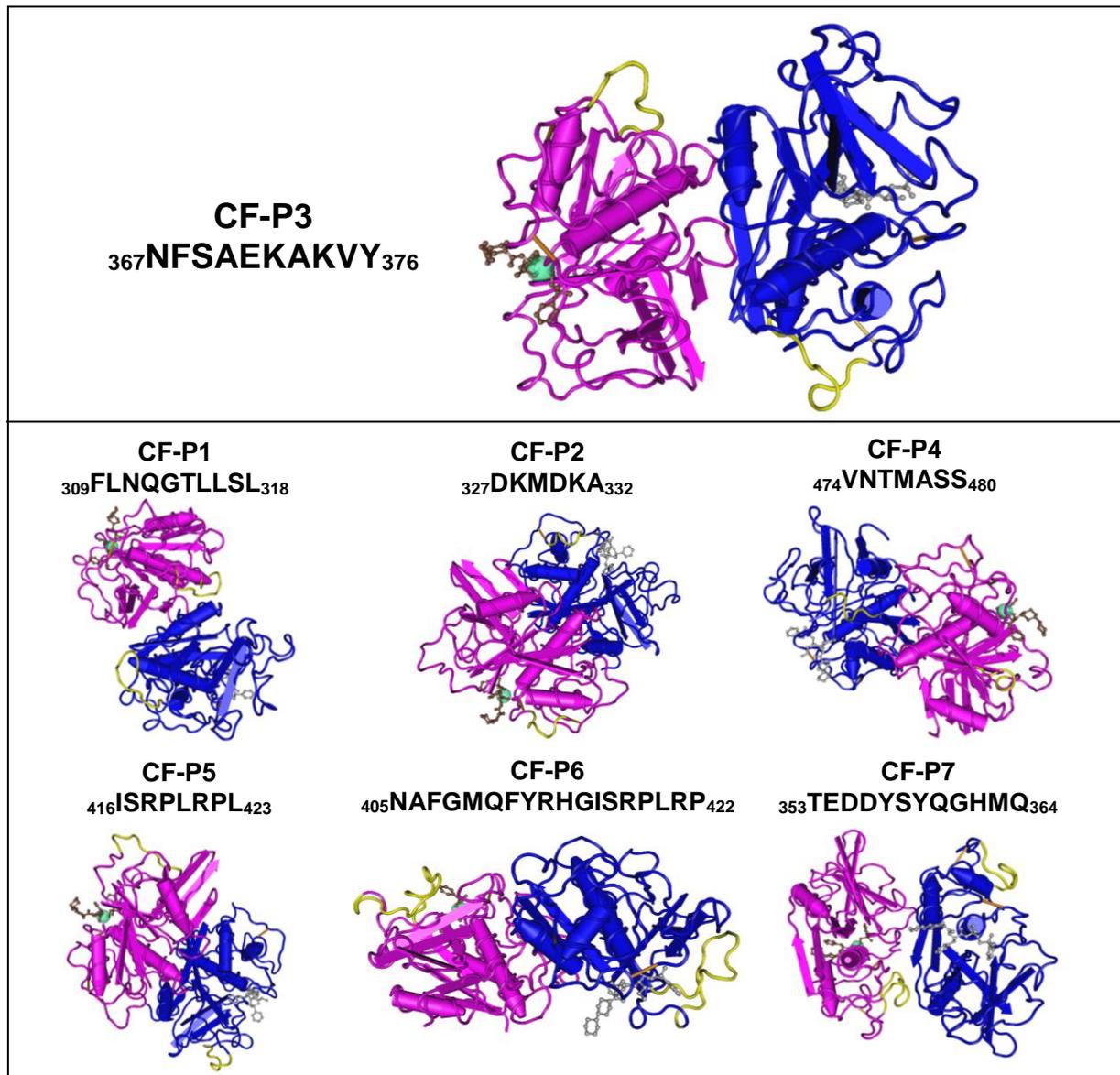


Abb. 8. Oberflächenexposition der Peptide CF-P1 bis CF-P7 im Cathepsin F-Dimer.

Lokalisation der CF-Peptide (gelb) im CF-Protein [236]. Folgende Angaben zu den CF-Peptiden können der Abbildung entnommen werden: Peptidbezeichnung; Aminosäuresequenz der Peptide und deren Lokalisation innerhalb der CF-Aminosäuresequenz [5]; 3D-Struktur des CF-Dimers (aus 2 Monomeren [pink und blau]) in Form eines Banddiagramms (1-dimensionale lineare Aminosäureabfolge und 2-dimensionale α -Helix bzw. β -Faltblattstruktur).

4.2 Gewinnung von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern gegen humanes Cathepsin F

Die CF-Peptide wurden gemäß dem in Abschnitt 3.7.1 in Material und Methoden erläuterten Immunisierungsschema appliziert (Abb. 3). Dabei kamen Mäuse zur Gewinnung von monoklonalen Ak (mAk) (Tab. 10; Überblick über die 11 Fusionen und die getesteten Klone) bzw. Kaninchen für die Herstellung polyklonaler Ak (pAk) zum Einsatz. Die Tabelle 11 gibt eine Übersicht der gewonnenen anti-CF-Ak und der zur Immunisierung eingesetzten CF-Peptide.

Tab. 10: Anzahl der getesteten Klone der 11 Cathepsin F-Fusionen.

Nummer der Fusionen: CF-	45	46	77	82	83	141	156	159	163	169	177
Anzahl der getesteten Klone	500	400	400	100	1.000	2.200	400	400	400	800	400

Tab. 11: Monoklonale und polyklonale anti-Cathepsin F-Antikörper und die zu ihrer Immunisierung eingesetzten Cathepsin F-Peptide.

	Cathepsin F-Peptid
Monoklonale Cathepsin F-Antikörper	
CF77-Fusion	
CF77-3C2	Pro-CF-P1
CF77-4D1	CF-P3
CF169-Fusion	
CF169-6H12	CF-P6
Polyklonale Cathepsin F-Antikörper	
"Franzi"	CF-TP1/1, CF-TP3/3, CF-TP2/4/5, Pro-CF-P1
"Fritzi"	CF-P1→P4, Pro-CF-P1→P3

Erklärung zur Namensgebung der monoklonalen anti-CF-Ak: Die der Bezeichnung CF nachstehende Ziffer gibt die Fusionsnummer wieder und die dem Bindestrich folgende Ziffern-Buchstaben-Kombination entspricht der Nummerierung der Mutterplatte (1. Zahl) gefolgt von den Koordinatenangaben der Kavität der 96 well-Mikrotiterplatte, in der der Ak erstmals detektiert wurde.

Beispiel: CF77-3C2 – anti-CF-Ak der Fusion 77, der aus der Kavität C2 der 96 well-Mikrotiter-Mutterplatte 3 stammt.

Erklärung zur Namensgebung der polyklonalen anti-CF-Ak: Die Bezeichnung entspricht dem Namen des Kaninchens, von dem der pAk stammt.

4.3 Charakterisierung der monoklonalen und polyklonalen anti-Cathepsin F-Antikörper

4.3.1 Charakterisierung der anti-Cathepsin F-Antikörper mittels proteinchemischer Methoden

Die Spezifität der gewonnenen anti-CF-Ak wurde im ELISA (3.8.1), im Immunoblot (3.8.4) (bei beiden Verfahren durch Testung gegen die zur Immunisierung verwendeten CF-Peptide bzw. rekombinantes Pro-CF aus *E. coli*) und mittels Epitope Mapping (3.8.5) bestimmt. Außerdem wurde im Immunoblot gegen die Kulturüberstände der EPLC-32M1-Plattenepithelkarzinom-Zelllinie (humane nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom-Zellen [213]) und der FTC-133-Tumorzelllinie (follikuläre Schilddrüsenkarzinom-Zellen [212]) getestet (nicht dargestellt). Des Weiteren wurde der Immunglobulin-(Sub)Typ eines jeden Antikörpers ermittelt (3.10). Die Tabelle 12 gibt eine Übersicht über die Charakteristika der gewonnenen monoklonalen anti-CF-Ak. Es ist zudem ein mit CF kreuzreagierender Ak, der ursprünglich gegen CW generiert wurde (CW39-2E2) (generiert im Labor von Dr. E. Weber), aufgelistet. Aufgrund der unterschiedlichen Molmassen von Pro-CF (53,4 kDa; 484 AS) und Pro-CW (42,1 kDa; 376 AS) [232] war eine Differenzierung von CF und CW möglich, so dass CW39-2E2 zur Verifizierung der mit anderen anti-CF-Ak ermittelten Ergebnisse eingesetzt werden konnte.

Tab. 12: Charakterisierung der monoklonalen anti-Cathepsin F-Antikörper.

Antikörper	ELISA	Aminosäuresequenz des CF-Peptides (fett gedruckt) bzw. der beim Epitope Mapping (CF: Je_350_3#1355) detektierten Aminosäuresequenz (blau)	Immunoblot	Ig-Typ
Anti-Cathepsin F-Antikörper				
CF77-3C2	Pro-CF-P1	²⁵⁶ EPGNKMKQAKSVGDL ₂₇₀	CF aus E. coli	IgM/k
CF77-4D1	CF-P3	³⁶⁷ NFSAEKAKVY ₃₇₆	CF aus E. coli	IgM/k, λ
CF169-6H12	CF-P6	⁴⁰⁵ NAFGMQFYRHGISRPLRP ₄₂₂		IgM
Anti-Cathepsin W-Antikörper				
CW39-2E2		⁴⁵⁹ EKGYYYL ₄₆₅	CF aus E. coli	IgG 2b/k

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Epitopkartierung für einen Teil der in der Tabelle 12 beschriebenen monoklonalen anti-CF-Ak und anti-CW-Ak dargestellt (Abb. 9). Das für den jeweiligen Ak ermittelte Epitop entsprach der übereinstimmenden AS-Sequenz der auf der Mapping-Membran detektierten Spots (CF: blau bzw. CW: orange).

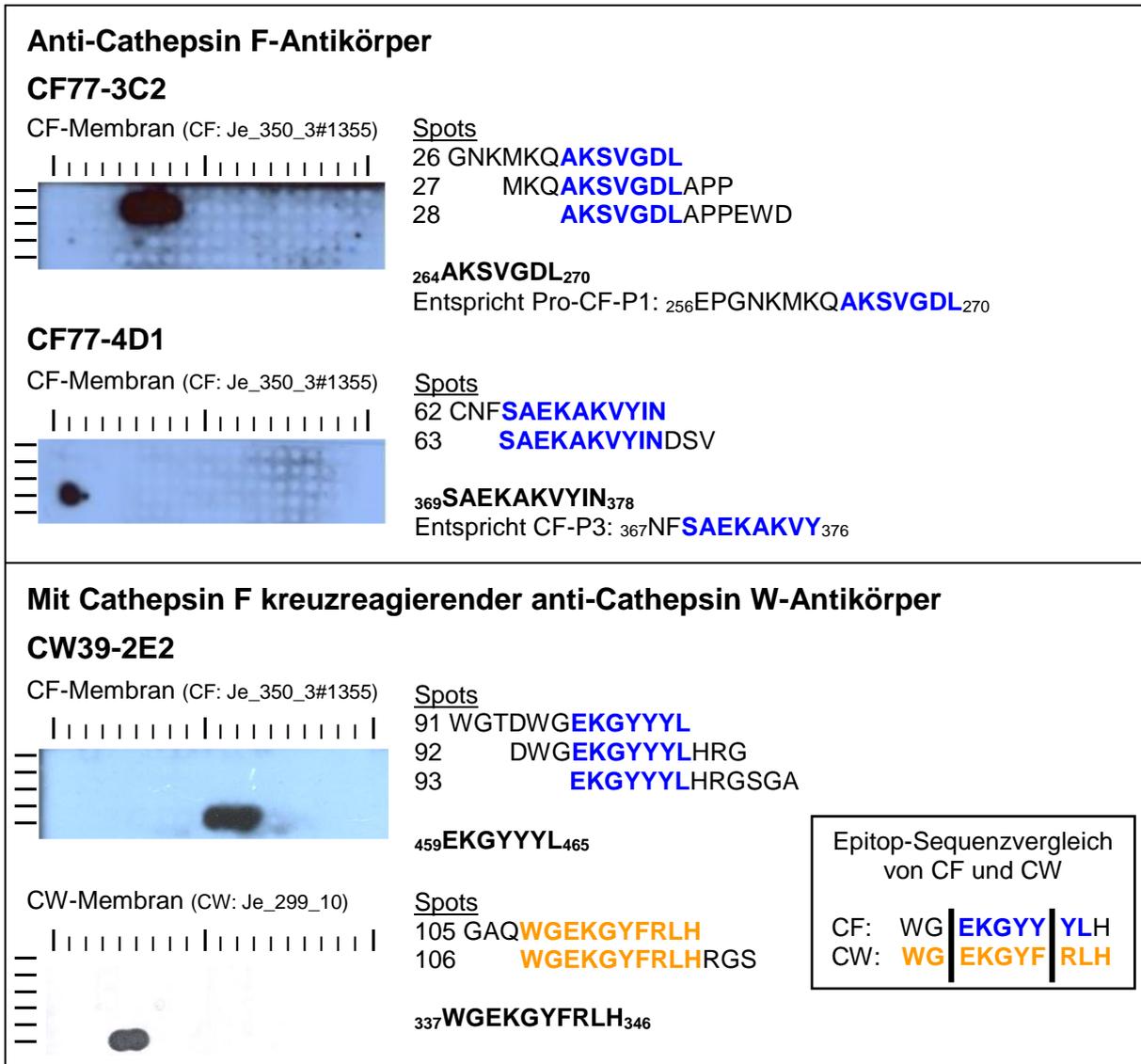


Abb. 9. Epitope Mapping von monoklonalen anti-Cathepsin F-Antikörpern bzw. von einem mit Cathepsin F kreuzreagierenden anti-Cathepsin W-Antikörper.

Der Primärantikörper wurde mit Blocklösung verdünnt 1:20 (1-10 µg/mL) eingesetzt.

Die vom Ak erkannten Aminosäuresequenzen wurden im Epitope Mapping als Spots auf der Mapping-Membran detektiert, wobei der bei allen Spots identische Aminosäureabschnitt das Epitop des Ak (blau für die CF-Mapping-Membran CF: Je_350_3#1355 und orange für die CW-Mapping-Membran CW: Je_299_10) darstellte.

In Tabelle 13 werden die Testergebnisse der polyklonalen anti-CF-Ak und deren Eigenschaften veranschaulicht. Im Immunoblot wurden ebenfalls Kulturüberstände der FTC-133-Tumorzelllinie [212] zur Testung eingesetzt (nicht dargestellt).

Tab. 13: Charakterisierung der polyklonalen anti-Cathepsin F-Antikörper.

Antikörper	ELISA	Aminosäuresequenz der detektierten CF-Peptide	Immunoblot
„Franzi“	CF-P3 CF-TP3/3 CF-TP2/4/5 Pro-CF-P1	367 NFSAEKAKVY $_{376}$ 367 NFSAEKAKVY $_{376}$ 367 NFSAEKAKVY $_{376}$ 327 DKMDKA $_{332-474}$ VNTMASS $_{480-416}$ ISRPLRPL $_{423}$ 256 EPGNKMKQAQKSVGDL $_{270}$	CF aus E.coli
„Fritzi“	CF-P1→P4 Pro-CF-P1→P3	309 FLNQGTLTLLSL $_{318}$ 327 DKMDKA $_{332}$ 367 NFSAEKAKVY $_{376}$ 474 VNTMASS $_{480}$ 256 EPGNKMKQAQKSVGDL $_{270}$ 20 APAQPRAASFQAW $_{32}$ 68 RVRRAGQGSLSYSLE $_{81}$	CF aus E.coli

Die Funktionalität der generierten monoklonalen und polyklonalen anti-CF-Ak wurde im Immunoblot mit HeLa-S3-Lysat kontrolliert (Abb. 10), da diese CF überexprimieren.

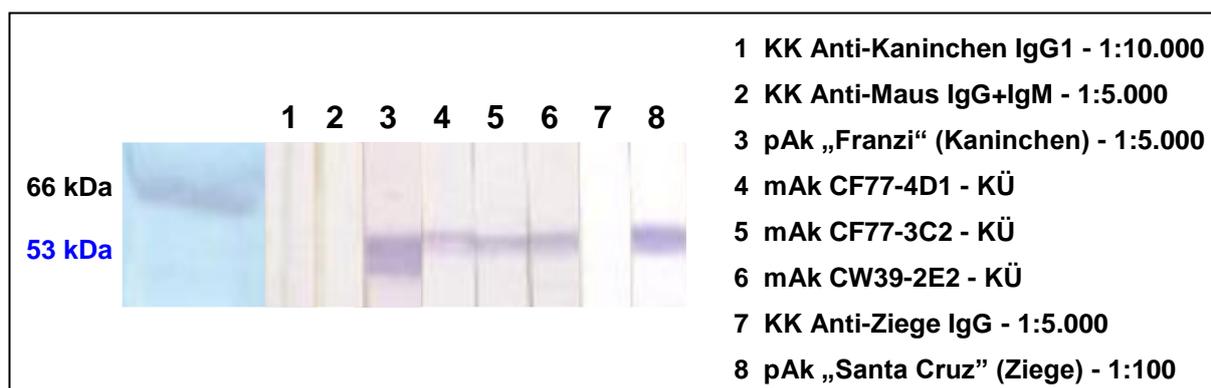


Abb. 10. Funktionsprüfung der anti-Cathepsin F-Antikörper und Nachweis von Cathepsin F im Zelllysat von Cathepsin F-exprimierenden HeLa-S3-Zellen.

Immunoblot aus HeLa-S3-Lysat (60 μ L/Bahn) nach reduzierender SDS-PAGE. Blotentwicklung: Primärantikörper: monoklonale und polyklonale anti-CF-Ak; Sekundärantikörper: POD-markiert und Nitrobluetetrazolium-Entwicklung. Die entsprechenden Konjugatkontrollen (KK) wurden mitgeführt.

Die aus immunisierten Mäusen bzw. Kaninchen gewonnenen Antikörper (mAk CF77-3C2, CF77-4D1, CF169-6H12, CW39-2E2 und pAk „Fritzi“) wurden mittels Protein G-Sepharose aus den Kulturüberständen bzw. Seren angereichert. Die Proteinkonzentration wurde nach Lowry *et al.* [226] bzw. nach Bradford [227] bestimmt und ein Teil der Antikörper auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml eingestellt.

4.3.2 Kreuzreaktivität der monoklonalen anti-Cathepsin F-Antikörper

Die Cathepsine F und W weisen eine hohe Strukturverwandtschaft auf. Wang *et al.* ermittelte anhand der Datenbanken GenBank™ und SwissProt eine Identität der Proteinsequenzen der 302 AS zählenden CF-AS-Sequenz und der 376 AS umfassenden CW-AS-Sequenz von 42% und eine Sequenzhomologie von 58% [4]. Ein Vergleich der von Santamaria *et al.* ermittelten 484 AS umfassenden Pro-CF-AS-Sequenz [5]

mit Pro-CW ergab mittels NCBI/BLAST (*National Center for Biotechnology Information/Basic Local Alignment Search Tool*) [110] bzw. UniProt [232] eine Sequenzidentität von 38% bzw. 39% und eine Sequenzhomologie von 54% (Abb. 11). Aus diesem Grund wurden alle gewonnenen anti-CF-Ak systematisch auf eine Kreuzreaktivität mit CW u. a. im ELISA und Immunoblot überprüft. Die Kreuzreaktion eines anti-CF-Ak mit CW galt als Ausschlusskriterium des Ak für weitere Versuche.

CF 1	MAPWLQLLSL	LGLLPGAVAA	PAQPRAASFQ	AWGPPSPELL	APTRFALEMF	NRGRAAGTRA	60
CW 1	-----	-----	-----	-----MALT	AHPSCLLALL	VAGLAQG---	21
				*	*	*	
				:	:	:	
CF 61	VLGLVRGRVR	RAGQGSLSL	EATLEPPCN	DPMVCRLPVS	KKTLLCSFQV	LDELGRHVLL	120
CW 22	----IRGPLR	AQDLG----	-----	-----	-----	-----	32
	:*:*:*	:*					
CF 121	RKDCGPVDTK	VPGAGEPKSA	FTQGSAMISS	LSQNHDPNRN	ETFSSVISLL	NEDPLSQDLP	180
CW 33	-----	-----	-----	-----	-----	-----PQP	35
						*	
CF 181	VKMASIFKNF	VITYNRTYES	KEEARWRLSV	FVNNMVRAQK	IQALDRGTAQ	YGVTKFSDLT	240
CW 36	LELKEAFKLF	QIQFNRSYLS	PEEHAHRLDI	FAHNLAQAQR	LQEEDLGTAE	FGVTPFSDLT	95
	::: : ** *	* : ** : *	** ** ** :	* : * : * : *	: * * * * :	: * * * * :	
CF 241	EEEFRTIYLN	TLLRKEPGNK	MKQAKSVG--	DLAPPEWDR	SKG-AVTKVK	DQGMCGSCWA	297
CW 96	EEEFQQLYGY	RRAAGGVPSM	GREIRSEEP	ESVPFSCDWR	KVASAISPDK	DQKNCNCWA	155
	* * * * :	: *	: * :	: * * * * :	: * * * * :	: * * * * :	
CF 298	FSVTGNVEGQ	WFLNQGTLLS	LSEQELLDCD	KMDKACMGGL	PSNAYSAIKN	LGGLETEDDY	357
CW 156	MAAAGNIETL	WRISFDFVD	VSVQELLDCG	RCGDGCHGGF	VWDAFITVLN	NSGLASEKDY	215
	::: ** *	* : :	: * * * * :	: * * * * :	: * * * * :	: * * * * :	
CF 358	SYQGHMQS--	CNFSAEKAKV	YINDSVELSQ	NEQKLAAWLA	KRGPISVAIN	AFGMQFYRHG	415
CW 216	PFQKVRRAHR	CHPKKYQKVA	WIQDFIMLQN	NEHRIAQYLA	TYGPITVTIN	MKPLQLYRKG	275
	: * * * * :	* : : :	: * * * * :	: * * * * :	: * * * * :	: * * * * :	
CF 416	ISRPLRPLCS	PWLIDHAVLL	VGYGNRSD--	-----	-----VP	FWAIKNSWGT	455
CW 276	VIKATPTTCD	PQLVDHVSLL	VGFGSVKSEE	GIWAETVSSQ	SQPQPPHPTP	YWILKNSWGA	335
	: : : : *	* * * * * :	* * * * :			: * * * * :	
CF 456	DWGEKGYYYL	HRGSGACGVN	TMASSAVVD-	-----	-----	-----	484
CW 336	QWGEKGYFRL	HRGNTCGIT	KFPLTARVQK	PDMKPRVSCP	P	-----	376
	: * * * * * :	* * * * * :	: : : * :				

Abb. 11. Aminosäuresequenzvergleich von humanem Pro-Cathepsin F (CF) und humanem Pro-Cathepsin W (CW).

Identische (*) (133) bzw. homologe (:) (113) Aminosäuren sind entsprechend gekennzeichnet [232].

Für den anti-CF-Ak CF77-3C2 ergab sich eine Kreuzreaktivität mit Triosephosphatisomerase (TPI), die durch Massenspektrometrie (nicht gezeigt) festgestellt wurde. Der anti-CW-Ak CW39-2E2 wurde aufgrund der Kreuzreaktivität mit CF zur Testung und zur Verifizierung der mit anderen gegen CF generierten Ak ermittelten Ergebnisse eingesetzt (Tab. 14).

Tab. 14: Kreuzreagierende monoklonale Antikörper.

Antikörper	Kreuzreaktion	AS-Anzahl	MM in kDa	Erkannter Aminosäuresequenzabschnitt	Identische Sequenz
Anti-CF-Antikörper					
CF77-3C2	Pro-CF	484	53,4	CF: ²⁶⁴ AKSVGDL ₂₇₀	²⁶⁴ AKSV ₂₆₇
	Triosephosphatisomerase	249	26,7	TPI: ³² AKV ₃₄	³² AKV ₃₄
Anti-CW-Antikörper					
CW39-2E2	Pro-CW	376	42,1	CW: ³³⁷ WGEKGYFRLH ₃₄₆	³³⁹ EKG ₃₄₂
	Pro-CF	484	53,4	CF: ⁴⁵⁹ EKGYYYL ₄₆₅	⁴⁵⁹ EKG ₄₆₂

Die nachstehende Abbildung 12 gibt einen Überblick über das Reaktionsverhalten der gegen CF gerichteten monoklonalen Ak CF77-3C2 und CW39-2E2.

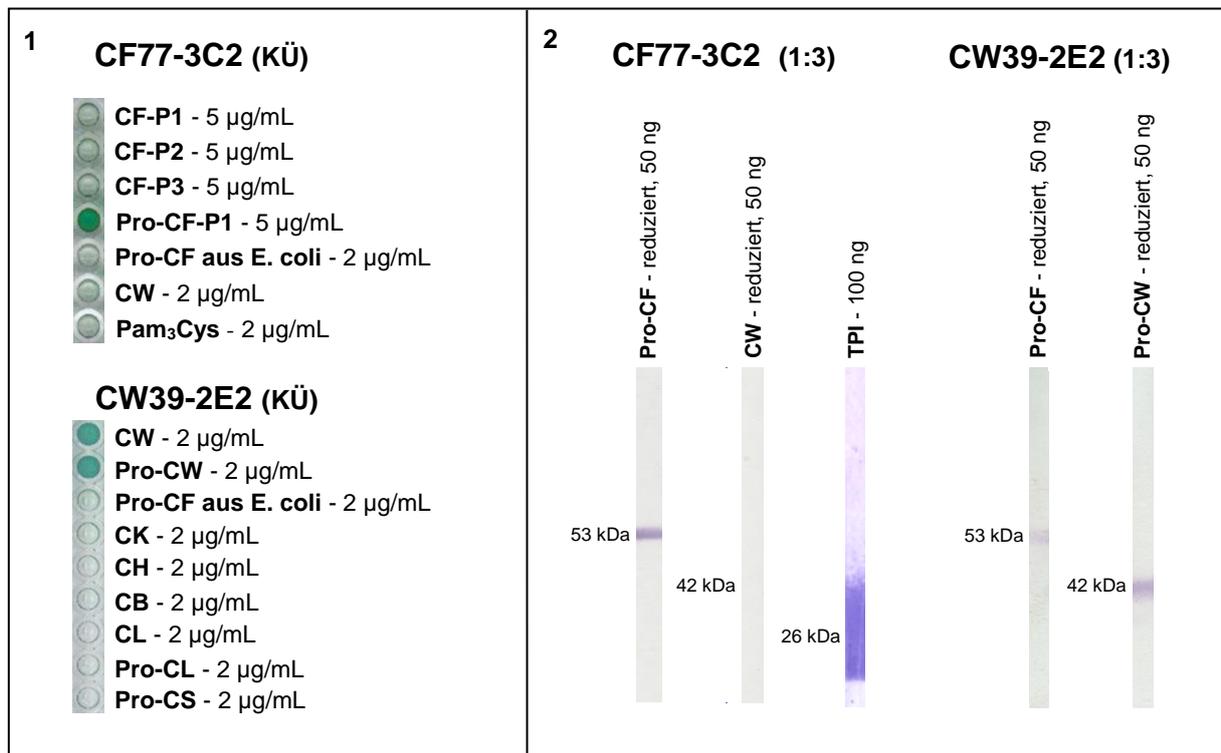


Abb. 12. Charakterisierung der Kreuzreaktivität des monoklonalen anti-Cathepsin F-Antikörpers CF77-3C2 und des anti-Cathepsin W-Antikörpers CW39-2E2.

Abb. 12-1: ELISA für die Bestimmung des Reaktionsverhaltens von CF77-3C2 gegenüber CF-Peptiden, Pro-CF aus *E. coli* und der Kreuzreaktivität gegenüber CW und Pam₃Cys; und von CW39-2E2 gegenüber verschiedenen Cathepsinen. TBS-Kontrollen negativ. Beschichtungskonzentration für die CF-Peptide: 5 µg/mL TBS und für rekombinantes Cathepsin: 2 µg/mL TBS.

Abb. 12-2: Immunoblot nach erfolgter SDS-PAGE (15%) für die Bestimmung des Reaktionsverhaltens von CF77-3C2 und CW39-2E2; Molmasse von Pro-CF: 53,4 kDa; Pro-CW: 42,1 kDa und Triosephosphat-isomerase (TPI): 26,7 kDa [232].

4.3.3 Gewinnung von Cathepsin F aus einer humanen Tumorzelllinie

Aus einer CF-exprimierenden Tumorzelllinie (HeLa-S3-Zellen) [210] wurde natives Pro-CF mittels der gewonnenen anti-CF-Ak isoliert. Zur Antigengewinnung mussten die HeLa-S3-Zellen zunächst lysiert werden, um CF mittels eines spezifischen Ak aus dem Proteingemisch selektieren zu können.

Immunpräzipitation. Von den unter 4.3.1 charakterisierten Ak eigneten sich für die Immunpräzipitation (IP) besonders die polyklonalen Ak („Franzi“ und „Fritzi“). In Abbildung 13 ist die Analyse des Immunpräzipitats aus HeLa-S3-Zellysate mit dem pAk „Fritzi“ im Immunoblot dargestellt. Es wurde gegen die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen polyklonalen Kaninchen anti-CF-Ak („Franzi“ und „Fritzi“) und gegen den kommerziellen polyklonalen Ziege anti-CF-Ak („Santa Cruz“; Cathepsin F [C-20]: sc-9634, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) getestet. Die anti-CF-Ak detektierten eine Bande bei 53 kDa, eine dem Pro-CF entsprechende Molmasse [232]. Die Bande bei 50 kDa stellt die schwere Kette der

Immunglobuline (Ig) dar [234, 237-238], wie sie unter reduzierenden Bedingungen (mit 2-Mercaptoethanol) auftritt. Zur Ergebnisüberprüfung wurden Konjugatkontrollen (KK) mitgeführt.



Abb. 13. Immunoblot des Immunpräzipitats aus HeLa-S3-Zelllysate und dem polyklonalen anti-Cathepsin F-Antikörper „Fritzi“ nach reduzierender SDS-PAGE (15%).

Pro Bahn wurden 60 μ L Immunpräzipitat (aus 1,4 mL HeLa-S3-Lysat und 75 μ L anti-CF-Ak „Fritzi“) aufgetragen. Blotentwicklung: Primärantikörper: polyklonale anti-CF-Ak „Santa Cruz“, „Fritzi“ und „Franzi“; Sekundärantikörper: POD-markiert und Nitrobluetetrazolium-Entwicklung. Die entsprechenden Konjugatkontrollen (KK) wurden mitgeführt. Das Vorkommen von Pro-CF im Immunpräzipitat wurde durch den kommerziellen polyklonalen Ziege anti-CF-Ak „Santa Cruz“ und den generierten polyklonalen Kaninchen anti-CF-Ak „Franzi“ bestätigt.

4.3.4 Immunhistochemie

Die oben beschriebenen monoklonalen Maus und polyklonalen Kaninchen bzw. Ziege anti-CF-Ak wurden in der Immunhistochemie getestet, um CF auf zellulärer Ebene zu detektieren. Es wurden verschiedene Gewebe verwendet, die CF (Kolon, Herz und Leber) exprimieren [4-5]. Der Thymus ist als CF-freies Gewebe beschrieben [4, 231, 239] und wurde als Negativkontrolle mitgeführt.

Kolon. In den immunhistochemischen Färbungen der Kolonmukosa ließ sich CF in den Epithelzellen im Bereich der Krypten, den sogenannten Glandulae intestinales, detektieren (Abb. 14). Cathepsin F wurde intrazellulär in den dort angesiedelten Schaumzellen und Becherzellen nachgewiesen (Abb. 15). Von den eingesetzten anti-CF-Ak zeigten die pAk „Franzi“ und „Fritzi“ sowie der mAk CF77-4D1 die stärksten Signale. Die Negativkontrolle (PBS) blieb ohne Signal für CF.

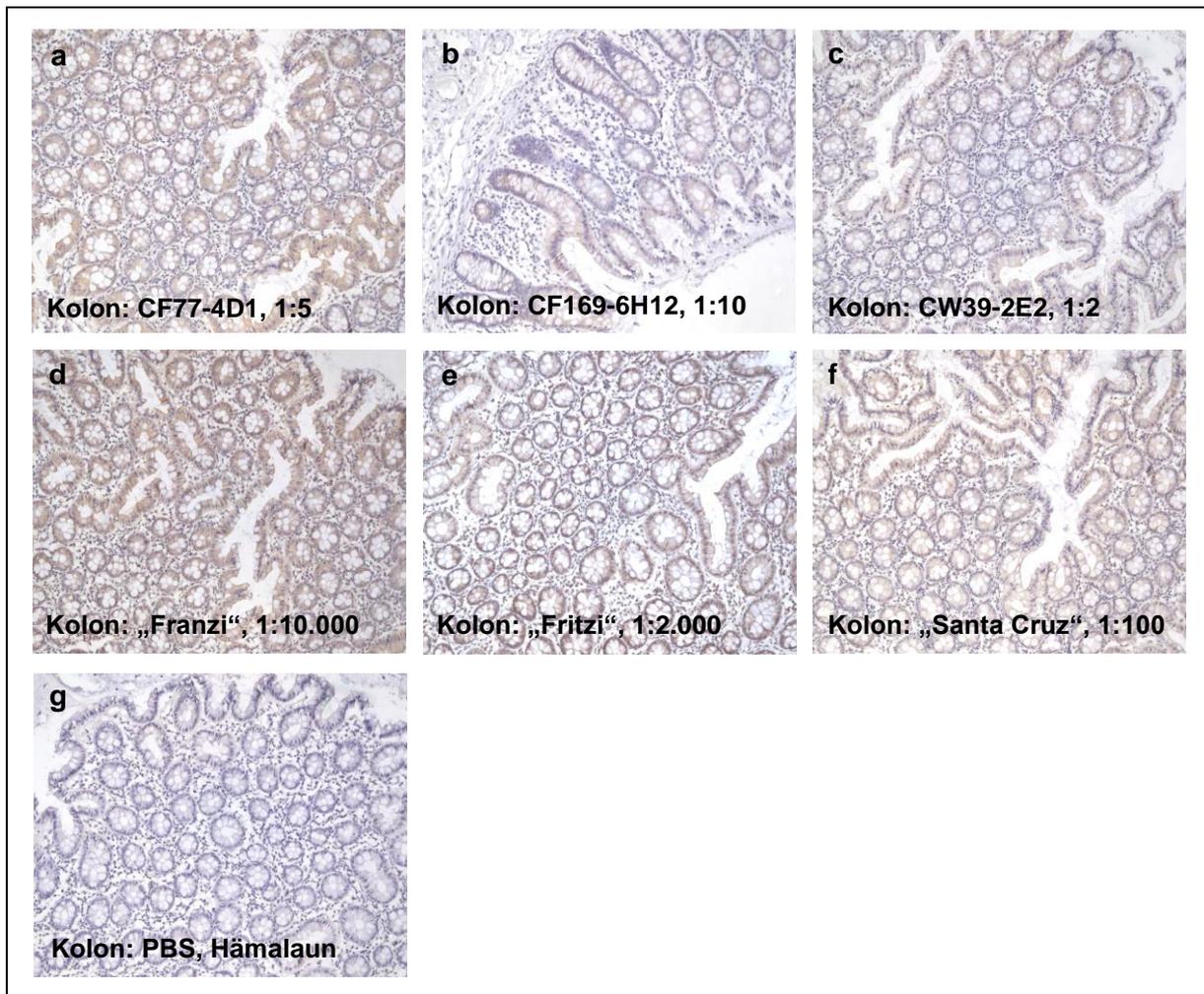


Abb. 14. Kolon - immunhistochemischer Nachweis von Cathepsin F.

Die Abbildung zeigt histologische Schnitte der Kolonmukosa in 10-facher Vergrößerung. Grundfärbung war die Färbung mit Hämalan.

- a) – f) Immunhistochemische Anfärbung mit anti-CF-Ak: CF-spezifisches Signal in den Epithelzellen der Kolonmukosa im Bereich der Krypten, den Glandulae intestinales.
g) PBS-Kontrolle: Kein Signal.

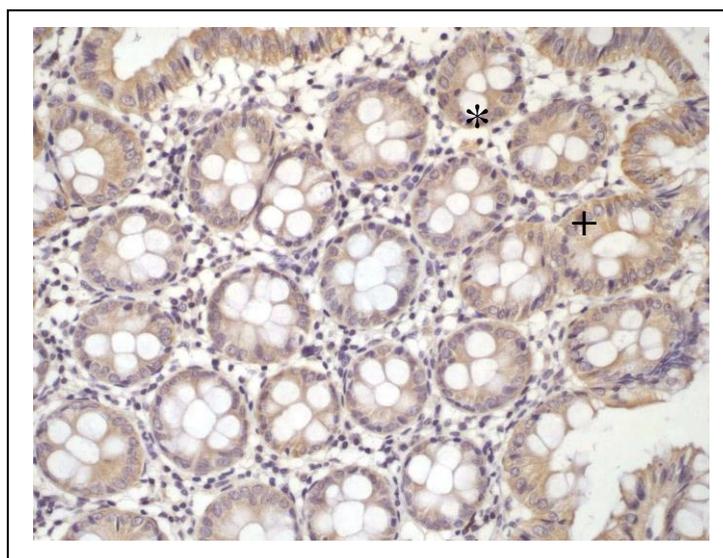


Abb. 15. Kolon - immunhistochemischer Nachweis von Cathepsin F.

Die Abbildung zeigt einen histologischen Schnitt der Kolonmukosa in 40-facher Vergrößerung. Immunhistochemische Anfärbung mit dem mAk CF77-4D1 (1:5): CF-spezifisches Signal in den Epithelzellen der Kolonmukosa; den Schaumzellen (+) und den Becherzellen (*).

Herz. Im quergestreiften Herzmuskel zeigte sich eine immunhistochemische Anfärbung des CF in den Kardiomyozyten (Abb. 16).

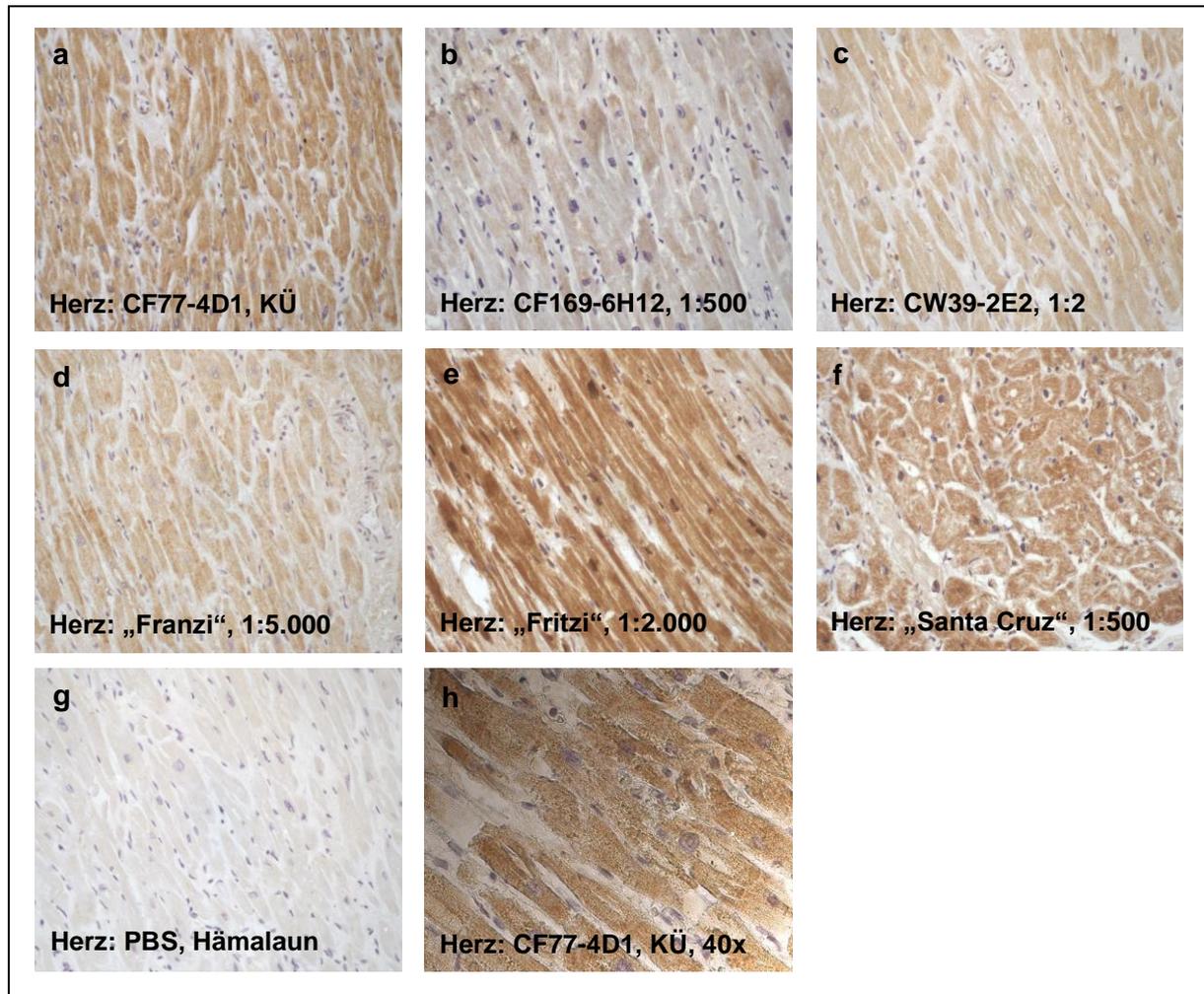


Abb. 16. Herz - immunhistochemischer Nachweis von Cathepsin F.

Die Abbildung zeigt histologische Schnitte von Kardiomyozyten in 20-facher (a-g) bzw. 40-facher (h) Vergrößerung. Grundfärbung war die Färbung mit Hämalan.

- a) – f) und h) Immunhistochemische Anfärbung mit anti-CF-Ak: CF-spezifisches Signal in den Kardiomyozyten.
g) PBS-Kontrolle: Kein Signal.

Leber. Bei der immunhistochemischen Färbung des Lebergewebes mit den anti-CF-Ak (Abb. 17) zeigte sich ein starkes Signal in den Hepatozyten. Am besten wurde CF vom mAk CF169-6H12 (1:2.000) und vom pAk „Franzi“ (1:5.000) detektiert. Weiterhin ergaben die anti-CF-Ak eine Anfärbung des Gallengang-epithels und der Tunica media der arteriellen Gefäße. Die restlichen Strukturen des Leberläppchens und des periportalen Feldes (Trias aus Vena interlobularis [Vena portae], Arteria interlobularis [Arteria hepatica] und Gallengang [Ductus interlobularis]) zeigten kein CF-spezifisches Signal. Die PBS-Kontrolle war negativ.

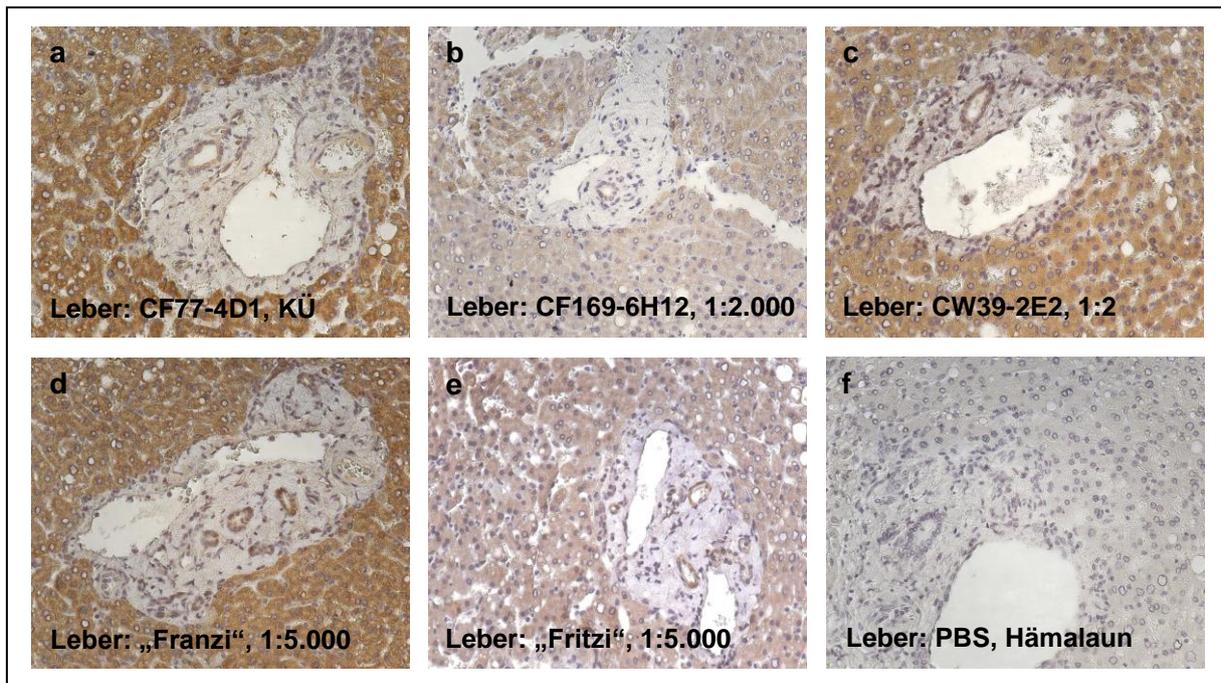


Abb. 17. Leber - immunhistochemischer Nachweis von Cathepsin F.

Die Abbildung zeigt histologische Schnitte des Lebergewebes in 20-facher Vergrößerung. Grundfärbung war die Färbung mit Hämalaun.

- a) – e) Immunhistochemische Anfärbung mit anti-CF-Ak: CF-spezifisches Signal in den Hepatozyten, im Gallengangepithel und in den glatten Muskelzellen der Tunica media der arteriellen Gefäße.
- f) PBS-Kontrolle: Kein Signal.

Thymus. In Übereinstimmung mit der Literatur [4] detektierten die eingesetzten anti-CF-Ak im Thymusgewebe kein CF. Zur Überprüfung der Resultate wurde eine Negativkontrolle (PBS) durchgeführt. Zur Kontrolle des Anfärbeprotokolls wurde CD45 histochemisch dargestellt, das die im Thymus lokalisierten Immunzellen nachweist (Abb. 18). Das CD45-Antigen ist ein membranständiges Protein, das einen intrazellulären Abschnitt mit Tyrosin-Phosphatase-Aktivität aufweist und auf vielen kernhaltigen Blutzellen vorkommt [240]. Der Nachweis von CD45 im humanen Thymus ist auf die dort vorhandenen Prothymozyten zurückzuführen, die im Knochenmark heranwachsen und dann ins Thymusgewebe migrieren, wo sie zu T-Lymphozyten heranreifen. Während der Differenzierung der T-Zellen bleibt CD45 als Oberflächenmarker erhalten [241].

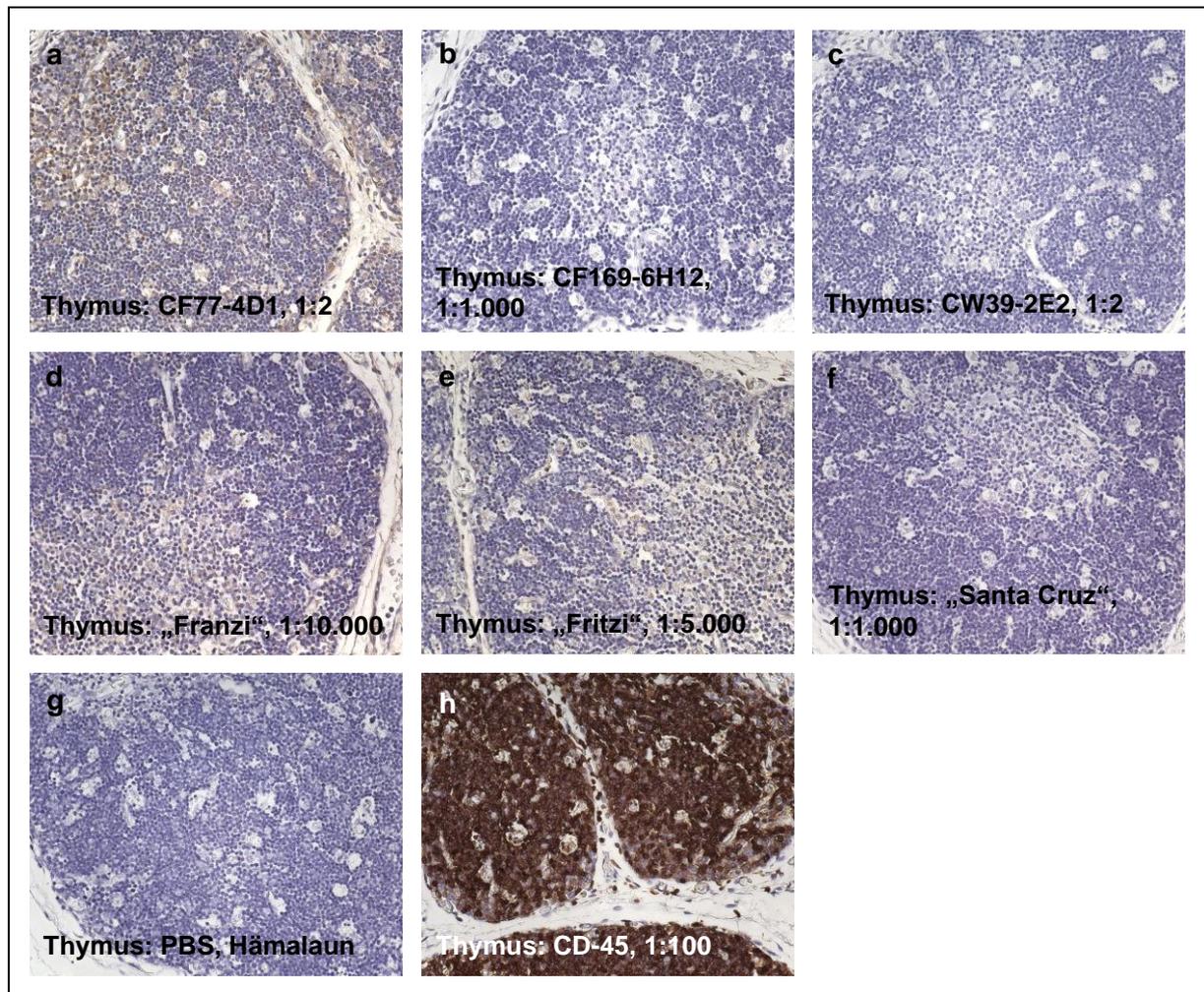


Abb. 18. Thymus - immunhistochemischer Nachweis von Cathepsin F.

Die Abbildung zeigt histologische Schnitte des Thymusgewebes in 20-facher Vergrößerung. Grundfärbung war die Färbung mit Hämalau.

- a) – f) Immunhistochemische Anfärbung mit anti-CF-Ak: Kein CF-spezifisches Signal.
- g) PBS-Kontrolle: Kein Signal.
- h) CD45-Kontrolle des Anfärbeprotokolls: Immunhistochemische Anfärbung der im Thymus residenten Lymphozyten.

4.4 Ergänzende Ergebnisse

4.4.1 Antikörper gegen *E. coli*-Proteine

Für die Generierung spezifischer Ak sollte eine Kontamination des zur Immunisierung verwendeten Ag mit anderen antigenen Strukturen vermieden werden. Die beiden aus *E. coli* gewonnenen rekombinanten CF (Probe-1: „gereinigtes“ CF, Probe-2: „teilgereinigtes“ CF) wiesen aber Verunreinigungen mit *E. coli*-Proteinen auf, was zur Bildung von gegen *E. coli*-Proteine gerichteten Ak führte. Die generierten mAk, die gegen das rekombinante CF getestet wurden, zeigten ein positives Signal im ELISA und detektierten im Immunoblot ein Protein in Höhe von 34 kDa, das der Molmasse der 302 AS (33,9 kDa) umfassenden Pro-CF-AS-Sequenz entsprach [4]. Im Epitope Mapping zeigten diese mAk kein Signal auf der CF-Mapping-Membran (CF: Je_350_3#1355).

Massenspektrometrisch wurden die mittels eines Gradientengels durch SDS-PAGE gewonnenen und durch MS-kompatible Silberfärbung (Invitrogen, Karlsruhe) dargestellten Banden bei 24-34 kDa des rekombinanten CF aus *E. coli* untersucht (Abb. 19 und Tab. 15). Die Massenspektrometrie zeigte in den Banden A (34 kDa), B (28 kDa) und C (24 kDa) der Probe-1 CF und *E. coli*-Proteine. Die Bande D (34 kDa) der Probe-2 enthielt vorrangig CF.

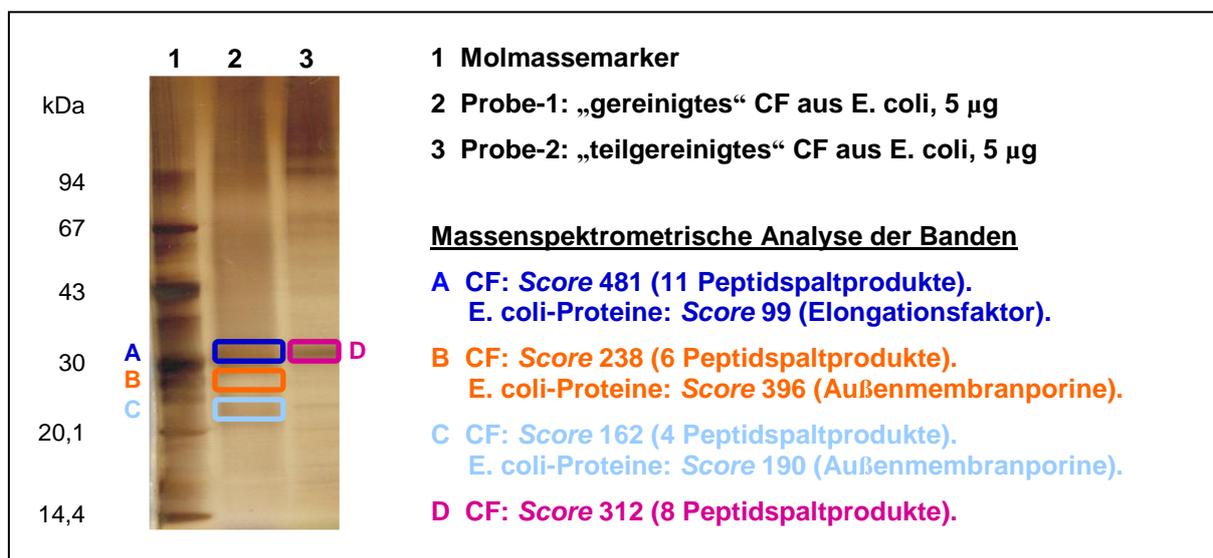


Abb. 19. Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von „gereinigtem“ bzw. „teilgereinigtem“ rekombinanten Cathepsin F aus *E. coli* der Probe-1 bzw. Probe-2.

Silberfärbung des rekombinanten Cathepsin F der Probe-1 und Probe-2 unter reduzierenden Bedingungen. Die Banden A und D (34 kDa) zeigten bei der massenspektrometrischen Analyse einen hohen Anteil an CF und einen geringen bzw. keinen Anteil von Proteinen aus *E. coli*. Die Banden B und C enthielten vorwiegend *E. coli*-Proteine.

Tab. 15: Zusammenfassung der Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse des „gereinigten“ und des „teilgereinigten“ rekombinanten Cathepsin F aus *E. coli*.

Bande	Peptide	Aminosäure-Score	Peptide matches
A	Cathepsin F	481	11
	Translation Elongation Faktor EF-Tu.B - <i>E. coli</i> (strain K-12)	99	2
B	Cathepsin F	238	6
	Außenmembranporin ompF Precursor - <i>E. coli</i> (strain K-12)	396	7
C	Cathepsin F	162	4
	Außenmembranporin ompF Precursor - <i>E. coli</i> (strain K-12)	190	4
D	Cathepsin F	312	8
	Trypsin	47	1

Aminosäure-Score = Gesamtzahl an Aminosäureübereinstimmungen. Peptide matches = Anzahl der Peptide, deren Aminosäuresequenz mit Aminosäureabschnitten des ermittelten Proteins übereinstimmen.

In der Abbildung 20 sind die durch massenspektrometrische Analyse der Banden A bis D (Abb. 19) ermittelten Sequenzen den entsprechenden Abschnitten auf der Pro-CF-AS-Sequenz [5] zugeordnet.

1	MAPWLQLLSL LGLLPGAVAA PAQPRAASFQ AWGPPSPELL APTRFALEMF NRGRAAGTRA	60
61	VLGLVRGRVR RAGQGSLSL EATLEPPCN DPMVCRLPVS KK ¹ TLLCSFQV LDELGR ¹ HVLL	120
121	RKDCGPVDTK VPGAGEPK ² SA FTQGSAMISS ³ LSQNHDPNRN ³ ETFSSVISLL NEDPLSQDLP	180
181	⁴ VKMASIFK ⁴ NF VITYNRTYES ⁵ KEEARWR ⁵ LSV FVNNMVR ⁶ BAQK ⁶ IQALDR ⁶ GTAQ YGVTKFSDLT	240
241	⁷ EEEFRTIYLN ⁷ TLLR ⁸ KEPGNK ⁸ MKQAK ⁸ SVGDL ⁸ APPEWDWRS ⁸ KGAVTKVKDQG MCGSCWAFSV	300
301	TGNVEGQWFL NQGTLLSLSE QELLDCDKMD KACMGGLPSN AYSAIKNLGG LETEDDYSYQ	360
361	GHMQSCNFSA EKAK ⁹ VYINDS ⁹ VELSQNEQK ⁹ LAAWLAKRGPISVAINAFGMQ FYRHGISRPL	420
421	RPLCSPWLID HAVLLVGYGN ¹⁰ RSDV ¹⁰ PFWAIK ¹⁰ NSWGTDWGEGYYYLHRGSG ACGVNTMASS	480
481	AVVD	484

	Bande A	Bande B	Bande C	Bande D
1	x			x
2	x			
3	x	x		
4	x		x	x
5	x			x
6	x		x	x
7	x	x	x	x
8	x	x		x
9	x	x		
10				x

Abb. 20. Übereinstimmung der Aminosäuresequenz der massenspektrometrisch identifizierten Fragmente von rekombinantem Pro-Cathepsin F aus *E. coli* (Abb. 19 und Tab. 15) mit der Pro-Cathepsin F-Aminosäuresequenz [5].

4.4.2 Kreuzreaktivität der anti-Cathepsin F-Antikörper

1. Kreuzreaktivität von CF77-3C2 mit der Triosephosphatisomerase

Wie bereits unter 4.3.2 beschrieben, zeigte der monoklonale anti-CF-Ak CF77-3C2 eine Kreuzreaktivität mit der Triosephosphatisomerase (TPI), was massenspektrometrisch ermittelt wurde (nicht dargestellt). Identische Aminosäuresequenzen von 3 konsekutiven AS zwischen dem CF-Molekül und der TPI ergaben sich für folgende, im reifen CF liegende Sequenzabschnitte: $_{373}\text{AKV}_{375}$ ($_{32}\text{AKV}_{34}$ für TPI), $_{388}\text{QKL}_{390}$ ($_{54}\text{QKL}_{56}$ für TPI) und $_{404}\text{INA}_{406}$ ($_{245}\text{INA}_{247}$ für TPI) (Abb. 21) [130]. Für die AS-Sequenz $_{373}\text{AKV}_{375}$ ließ sich eine Sequenzübereinstimmung mit dem im reifen CF gelegenen und zur Immunisierung eingesetzten CF-Peptid CF-P3 ($_{367}\text{NFSAEKAKVY}_{376}$) nachweisen. Die Aminosäureabfolge AKV ließ sich zudem in abgewandelter Form im Pro-Peptid des Pro-CF, insbesondere in dem zur Immunisierung verwendeten Pro-CF-P1 ($_{256}\text{EPGNKMKQAKSVGDL}_{270}$) wiederfinden, das die AS-Sequenz des von CF77-3C2 erkannten Epitops ($_{264}\text{AKSVGDL}_{270}$) einschließt. Aufgrund der unterschiedlichen Molmassen (CF: 53,4 kDa [5] versus TPI: 26,7 kDa [242]) [130, 232] war eine Unterscheidung beider Proteine im Immunoblot möglich.

	< Signalsequenz		> < Pro-Cathepsin F				
CF 1	MAPWLQLLS-	LLGLLPGAVA	APAQPRAASF	QAWGPPSPEL	LAPTRFALEM	FNRGRAAGTR	59
TPI 1	MAPSRKFFVG	GNWKMNGRKQ	SLGELIGTLN	A AKV PADTEV	VCAPPTAYID	FAR QKL DPKI	60
	*** : : :	: * :	: : : : :	* * : : : *	: : : * :	* * : : :	
CF 60	AVLGLVGRV	RRAGQGSLS	LEATLEEPPC	NDPMVCRPLV	SKKTLLCSFQ	VLDELGRHVL	119
TPI 61	AVAAQNCYKV	TNGAFTGEIS	-----	-----PG	MIKDCGATWV	VLGHSERRHV	102
	** : * :	: : * :	-----	-----*	* : : : *	** : : * :	
CF 120	LRKDCGPVDT	KVPGAGEPKS	AFTQGSAMIS	SLSQNHDPNR	NETFSSVISL	LNEDPLSQDL	179
TPI 103	FGESDELIGQ	KVA-----H	ALAEGLGVIA	CIGEKLDER-	-----	---EAGITEKV	143
	: : : : :	** : : :	* : : * : *	: : : : :	: : : : :	* : : : :	
CF 180	PVKMASIFKN	FVITYNRTYE	SKEEARWRLS	VFVNNMVRQA	KIQALDRGTA	QYGVTKFSDL	239
TPI 144	VFEQTKVIAD	NVKDWSKVVV	AYEPV---WA	IGTGKTATPQ	QAQEVHEKLR	GWLKSNVSDA	200
	: : : : :	* : : : :	: * : : :	: : : : *	: : : : *	: : : ** :	
			256Pro-CF-P1 ²⁷⁰	> < Reifes Cathepsin F			
CF 240	TEEEFRTIYL	NTLLRKEPGN	KMK QAKSV GD	LAPPEWDWRS	KGAVTKVKDQ	GMC ³⁷⁶ GC ³⁷⁶ SWAFS	299
TPI 201	VAQSTRIIYG	GSVTG-----	-----	-----	-----	---ATCKELA	222
	: : : * ** :	: : : : :	-----	-----	-----	: : : : :	
CF 300	VTGNVEGQWF	LNQGTLLSL	EQELLDCDKM	DKACMGLPS	NAYSAIKNLG	GLETEDDYSY	359
TPI 223	SQPDVDG--F	LVGGASLKPE	FVDI INA KQ-	-----	-----	-----	249
	* : * * :	* : * : *	: : : : :	-----	-----	-----	
			367CF-P3 ³⁷⁶				
CF 360	QGHMQSCNFS	AE AKVY IND	SVELSQNE QK	LAAWLAKRGP	ISVA INA FGM	QFYRHGISRP	419
TPI 249	-----	-----	-----	-----	-----	-----	249
CF 420	LRPLCSPWLI	DHAVLLVGYG	NRS ⁴⁶³ DVPFWAI	KNSWGTDWGE	KGYYYLHRGS	GACGVNTMAS	479
TPI 249	-----	-----	-----	-----	-----	-----	249
			>				
CF 480	SAVVD						484
TPI 249	-----						249

Abb. 21. Aminosäuresequenzvergleich von humanem Pro-Cathepsin F (CF) und humaner Triosephosphatisomerase (TPI).

Identische (*) (40) bzw. homologe (:) (106) Aminosäuren und identische Aminosäuresequenzabschnitte (blauer Hintergrund) sind entsprechend gekennzeichnet [232].

2. Kreuzreaktivität von CW39-2E2 mit Cathepsin F

Grundlage für die Kreuzreaktion des gegen CW generierten mAk CW39-2E2 mit CF ist die phylogenetisch enge Strukturverwandtschaft durch die hohe AS-Sequenz-Identität und AS-Sequenz-Homologie von CW und CF (Abb. 1; siehe 2.4.1 Cathepsin F und seine Charakteristika; Homologie mit anderen Cathepsinen) [4, 14]. Aufgrund der differierenden MM (Pro-CW: 42,1 kDa bei 376 AS [51]; Pro-CF: 53,4 kDa bei 484 AS [5]) [130, 232] war trotz ähnlicher Epitope (Pro-CW: ³³⁹EKG_{YF}₃₄₃; Pro-CF: ⁴⁵⁹EKG_Y₄₆₃) eine Zuordnung zum jeweiligen Cathepsin möglich. Deshalb konnte CW39-2E2 als Kontrolle zur Identifizierung von CF (im Immunoblot und in der Immunhistochemie) eingesetzt werden, zumal CW nur in Killerzellen und zytotoxischen T-Zellen vorkommt.

5 Diskussion

Cathepsin F wurde 1998 [4] erstmals auf Transkriptionsebene detektiert. Im Gegensatz zu anderen Cathepsinen ist über die Beteiligung von CF an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen nach wie vor wenig bekannt. Dies ist u. a. auf das Fehlen von spezifischen Antikörpern (Ak) zurückzuführen. So wiesen z. B. Vazquez-Ortiz *et al.* [13] auf Transkriptionsebene eine hohe Expression von CF im Zervixkarzinom nach; immunhistologische Untersuchungen konnten aufgrund des Fehlens von spezifischen Ak gegen CF nicht durchgeführt werden. Das Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit war es, monoklonale und polyklonale Ak gegen CF zu generieren, zu charakterisieren und zur Detektion von CF im Gewebe einzusetzen und so einen Beitrag zur Aufklärung der Rolle von CF im Zellstoffwechsel zu leisten.

5.1 Gewinnung von Cathepsin F und Cathepsin F-Peptiden

Zunächst wurde mit rekombinantem Pro-CF aus *E. coli* auf der Grundlage der 1998 von Wang *et al.* ermittelten Pro-CF-AS-Sequenz von 302 AS [4] immunisiert, wobei nur Ak gegen *E. coli*-Proteine generiert wurden (siehe 4.1.2 Cathepsin F und Cathepsin F-Peptide und 4.4.1 Antikörper gegen *E. coli*-Proteine; Abb. 19; Tab. 15). Daraufhin wurden mehrere CF-Peptide nach spezifischen Kriterien (Kreuzreaktivität, Oberflächenexposition) gemäß der 1999 von Santamaria *et al.* bestimmten 484 AS umfassenden Pro-CF-AS-Sequenz [5] ermittelt, synthetisiert und für die Immunisierung eingesetzt (siehe 4.1.2 Cathepsin F und Cathepsin F-Peptide; Tab. 9; Abb. 7 und 8).

5.2 Monoklonale und polyklonale Antikörper gegen humanes Cathepsin F

Antikörper sind Glykoproteine, die bei Kontakt mit einem Fremdmolekül, dem Antigen (Ag), als Immunantwort vom Organismus gebildet werden [243-245]. Sie stellen die Grundlage der humoralen Antwort des Immunsystems dar. Antikörper gehören zur Gruppe der Immunglobuline (Ig), die sich bzgl. Masse, Struktur und Funktion 5 Klassen zuordnen lassen: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM [246]. Monoklonale Antikörper (mAk) werden von einem einzelnen aktivierten B-Lymphozyten (Plasmazelle) produziert und sind spezifisch gegen ein Epitop gerichtet. Polyklonale Antikörper (pAk) werden von verschiedenen Ak-produzierenden B-Lymphozyten synthetisiert und stellen ein Gemisch von mAk dar, das mit verschiedenen Epitopen des Ag reagiert [247].

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war die Gewinnung spezifischer monoklonaler anti-CF-Ak, da zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Arbeit weltweit keine mAk gegen CF verfügbar waren. Die monoklonalen anti-CF-Ak wurden mittels des von Köhler & Milstein entwickelten Hybridomverfahrens [216] hergestellt, das die Eigenschaft eines aktivierten B-Lymphozyten, mAk gegen ein spezifisches Epitop zu erzeugen, mit dem uneingeschränkten Proliferationspotenzial einer Myelomzelle (Maus-Myelomzellen P3X63-Ag8/653) kombiniert. Mit einem optimierten Immunisierungsschema (Abb. 3) wird die Anzahl an

Antigen-spezifischen Klonen in der zur Fusion (Abb. 4) eingesetzten Milzzellpopulation signifikant gesteigert [248-249]. So wurde die Anzahl spezifischer B-Lymphozyten durch die mehrmalige *Boosterung* mit dem Ag und komplettem Freundschens-Adjuvans (in dieser Arbeit zum Priming eingesetzt) oder inkomplettem Freundschens-Adjuvans (zur ersten Auffrischungsimpunisierung verwendet) gesteigert [250-251]. Die Myelomzellen, als Fusionspartner der B-Lymphozyten, befanden sich zum Zeitpunkt der Fusion in der exponentiellen Wachstumsphase.

Beim Screening von ca. 7.000 Hybridom-Kulturüberständen (Tab. 10) wurden 3 CF-spezifische Klone (CF77-3C2, CF77-4D1 und CF169-6H12) identifiziert. Die mAk wurden anhand verschiedener Kriterien selektiert (z. B. keine Kreuzreaktivität mit CW) und charakterisiert, was einen wesentlichen Teil der Arbeit darstellte. Proteinchemische Methoden, wie ELISA, Immunoblot und Epitopkartierung zeigten die CF-Spezifität der mAk (Tab. 12; Abb. 9 und 10). Die mAk waren gegen verschiedene Sequenzabschnitte des CF gerichtet; CF77-3C2 (A₂₆₄-L₂₇₀) reagierte mit einem Abschnitt des Pro-Peptids (A₂₀-L₂₇₀) des Pro-CF, CF77-4D1 (S₃₆₉-Y₃₇₆) und CF169-6H12 (N₄₀₅-P₄₂₂) hingegen mit der reifen, enzymatisch aktiven Form (A₂₇₁-D₄₈₄) des CF (Abb. 2 und 7).

Neben den mAk wurden im Kaninchen pAk („Franzi“ und „Fritzi“) gegen CF durch Immunisierung mit CF-Peptiden generiert [252] und anschließend charakterisiert (im ELISA, im Immunoblot und im Epitope Mapping) (Tab. 13; Abb. 10). Die pAk genügten den in diese Arbeit gestellten Anforderungen.

5.2.1 Einfluß des Immunisierungsprotokolls auf die Bildung der Antikörper-Subtypen

Bei Erstkontakt mit einem Ag kommt es zunächst zur Synthese von Immunglobulinen vom Typ IgM, als Primärantwort des Immunsystems in der akuten Infektionsphase [253-254]. Immunglobuline vom Typ IgG werden in der verzögerten Abwehrphase produziert, sind lange nachweisbar und können sowohl eine momentane als auch eine frühere Infektion oder Immunisierung anzeigen [254]. Bei einer Zweitimmunisierung werden v. a. IgG gebildet [253, 255]. Nach Miller [256] entsteht eine intensive und dauerhafte Immunantwort, wenn das immunogene Ag über einige Wochen kontinuierlich dem Immunsystem präsentiert wird. Durch Modifikation des Immunisierungsschemas und durch die Wahl der Adjuvanzen ist es bis zu einem gewissen Grad möglich, nicht nur das Immunsystem zu aktivieren, sondern auch die Immunglobulinsubklasse der gebildeten Ak zu beeinflussen. Das Immunisierungsschema nach Miller führt v. a. zur Bildung von IgG1-Ak [256]. Mit *Toxoplasma gondii* infizierte Mäuse bilden vermehrt Ak der IgG2- und IgG3-Subklasse, aber nur geringe Mengen von IgG1 [257-258]. Klone, die Ak vom Typ IgM synthetisieren, werden v. a. durch ein 4- bzw. 5-Tage-Immunisierungsschema hervorgebracht [259-260]. In einigen Fällen kann die IgM-Antwort verlängert sein, wenn das Ag kontinuierlich präsentiert wird [260], wie es z. B. für Polysaccharidkomplexe, die nicht metabolisiert und eliminiert werden [261-262] und für einige Virusantigene beschrieben ist [263-264]. Hierbei ist zu beachten, dass Immunglobuline vom Typ IgM häufiger eine unspezifische Bindung an antigene Strukturen

und falsch positive Reaktionen zeigen können und eine geringere Stabilität als Immunglobuline vom Typ IgG aufweisen können [265].

Bei Antigenen, die keine oder nur eine schwache Immunreaktion auslösen, ist zu überlegen, ob *knock out*-Mäuse für die Generierung mAk gegen diese Ag eingesetzt werden können (z. B. für Cathepsin B im Labor von Dr. E. Weber)

5.2.2 Einfluß der Immunisierung auf den Antikörper-Titer

Ein hoher Ak-Titer kann durch (1) das Ag oder eines seiner Komponenten, (2) den Carrier und (3) das Freundschsche-Adjuvans bewirkt werden.

(1) Peptide sind aufgrund ihrer z. T. geringen MM wenig immunogen [266]. In Abhängigkeit von Größe und Struktur der Ag fällt die Immunantwort unterschiedlich aus. Sie ist um so intensiver, je größer das Ag und je komplexer dessen Struktur ist [234]. Antigene mit einer MM < 10 kDa sind nur schwache Immunogene und diejenigen mit einer MM < 1 kDa (Haptene) rufen allein keine Immunantwort hervor [254].

(2) Peptide werden zur Erhöhung ihrer Immunogenität z. T. an Carrier (wie z. B. Pam₃Cys, Rinderserumalbumin) gebunden, um die Bildung von Ak initiieren zu können [214, 267]. Der Carrier sollte eine MM > 2 kDa aufweisen, um vom Immunsystem als immunogen erkannt zu werden [233].

(3) Das Freundschsche-Adjuvans ist eines der effizientesten Immunstimulanzien [268], das bevorzugt die Bildung von Ak gegen Epitope denaturierter Proteine induziert [269]. Es stimuliert die antikörpervermittelte und die zellvermittelte Immunantwort [266, 270]. Es werden komplettes (KFA) und inkomplettes (IFA) Freundschsche-Adjuvans unterschieden, die bei gleichzeitiger Verringerung des Antigenbedarfs die Immunantwort steigern und modifizieren [271]. Dies ist zurückzuführen auf (1) eine Depotwirkung mit verzögerter Ag-Liberation und damit verminderter Ag-Degradation, (2) eine Veränderung der Phagozytose partikulär gebundener Ag und (3) auf eine starke Anregung des Immunsystems durch im Adjuvans enthaltene Bestandteile von Bakterien (*Mycobacterium tuberculosis*, *Bordetella pertussis* u. a.) im KFA [272-273]. Das KFA ist effizienter in der Induktion hoher Ak-Titer und in der Verstärkung der zellvermittelten Immunreaktion, jedoch toxischer als das IFA [269]. Adjuvanzien werden mit einer erhöhten und länger anhaltenden Immunantwort in Verbindung gebracht. In neueren Publikationen wurde zudem gezeigt, dass sie den Titer, den Isotyp und die Affinität der Ak beeinflussen [274].

5.3 Gewinnung von Cathepsin F aus einer humanen Tumorzelllinie

Immunpräzipitation. Die Immunpräzipitation (IP) wurde (1) zum Nachweis der Spezifität der generierten Ak und des kommerziell erhältlichen pAk „Santa Cruz“ und (2) zur Gewinnung von CF aus Tumorzelllinien (z. B. HeLa, eine humane epitheliale Zervixkarzinomzelllinie, charakterisiert von Gey *et al.* [210]) für weitere Immunisierungen eingesetzt. Für die IP haben sich in der vorliegenden Arbeit die pAk („Franzi“ und „Fritzi“) als Präzipitationspartner für die Detektion von CF bewährt, da sie aufgrund der

Bindung an verschiedene Epitope des Pro-CF eine hohe Affinität und eine hohe Spezifität aufwiesen (siehe 4.3.3 Gewinnung von Cathepsin F aus einer humanen Tumorzelllinie; Immunpräzipitation; Abb. 13).

5.4 Detektion von Cathepsin F in der Immunhistochemie

Wie in der Literatur beschrieben, wurde CF zu Beginn der vorliegenden Arbeit nur auf Transkriptionsebene in verschiedenen Geweben nachgewiesen [4-5, 14]. Darauf basierend wurde das Gewebe von Herz, Kolon, Leber und Thymus auf das Vorhandensein von CF mittels immunhistochemischer Verfahren (Abb. 6) unter Verwendung der im Laufe dieser Arbeit gewonnenen und charakterisierten gegen CF gerichteten monoklonalen (CF77-4D1, CF169-6H12 und CW39-2E2) (Tab. 11 und 12) und polyklonalen Antikörper („Franzi“ und „Fritzi“) (Tab. 11 und 13) untersucht. Cathepsin F wurde im Kolon (Kolonmukosa) (Abb. 14 und 15), im Herzen (Kardiomyozyten) (Abb. 16) und in der Leber (Hepatozyten) (Abb. 17) detektiert [5]. Im Thymusgewebe wurde entsprechend der Literatur [4-5, 14] kein CF nachgewiesen (Abb. 18). Identische Ergebnisse wurden mit dem mit CF kreuzreagierenden monoklonalen anti-CW-Ak CW39-2E2 und dem kommerziell erhältlichen polyklonalen Ziege anti-CF-Ak „Santa Cruz“ erzielt. Der in dieser Arbeit erbrachte immunhistologische Nachweis von CF bestätigt die in der Literatur beschriebene Expression von CF auf Transkriptionsebene in den einzelnen humanen Geweben [5] bzw. die Detektion von CF im Immunoblot von Lebergewebsextrakten der Maus mittels eines bei Santa Cruz Biotechnology erhältlichen polyklonalen Kaninchen anti-CF-Ak (Cathepsin F [H-110]: sc-13987; Epitop: D₃₂₅-L₄₃₄; IgG; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg).

Gallengangepithel. Die mAk CF77-4D1 und CW39-2E2 bzw. pAk „Franzi“ und „Fritzi“ detektierten ebenfalls CF im Gallengangepithel der hepatischen Glisson Trias (Abb. 17).

Arterielle Gefäße. Es kam zu einem positiven Färbesignal der arteriellen Gefäße der Herz- und Leberschnitte v. a. im Bereich der Tunica media bei folgenden Ak: mAk CF77-4D1 und CW39-2E2 bzw. pAk „Franzi“ und „Fritzi“ (Abb. 17 und 22). Die PBS-Kontrollen zeigten kein Signal.

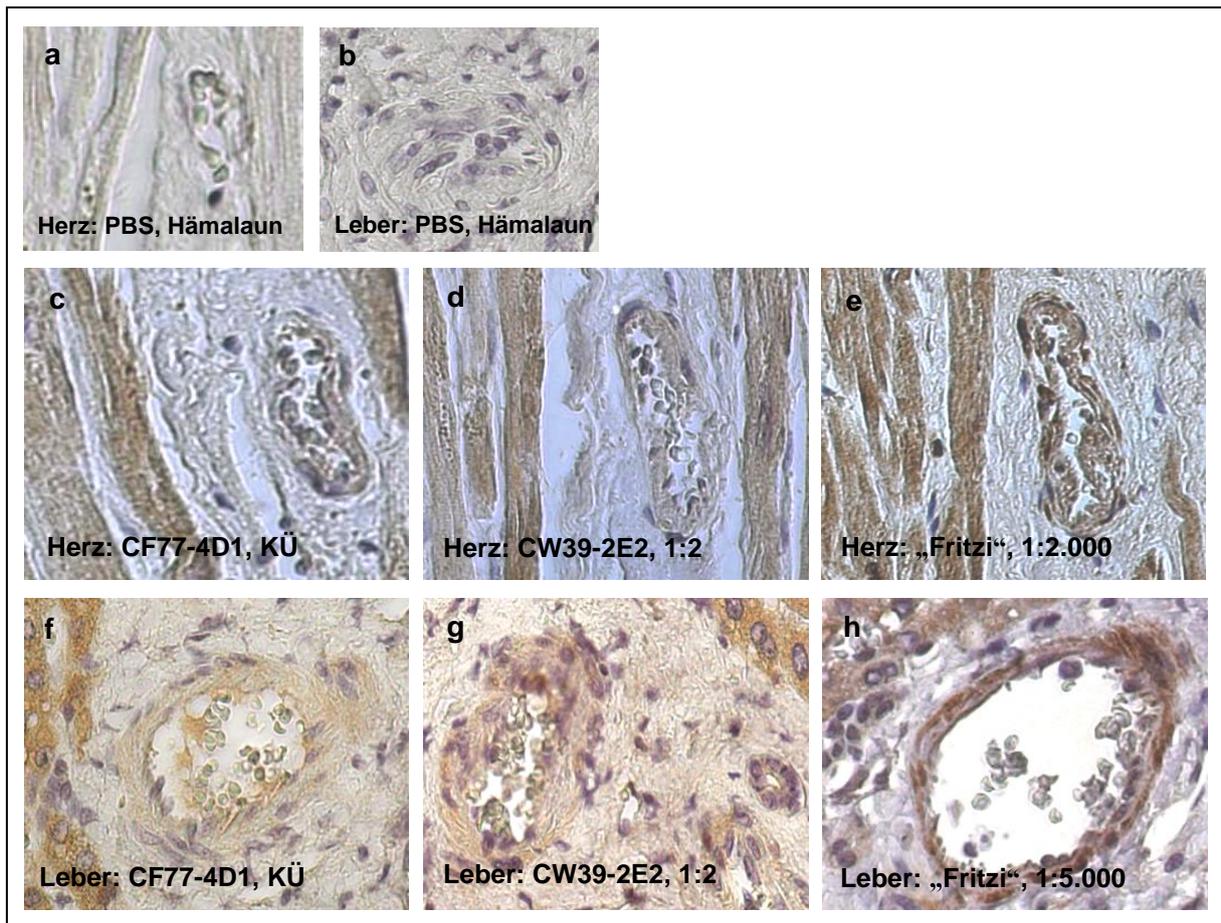


Abb. 22. Nachweis von Cathepsin F in arteriellen Gefäßen von Leber- und Herzgewebe.

Die Abbildung zeigt histologische Schnitte des Herzgewebes (a und c-e) und des Lebergewebes (b und f-h) in 20-facher Vergrößerung. Grundfärbung war die Färbung mit Hämalaun.

a) – b) PBS-Kontrolle: Kein Signal.

c) – h) Immunhistochemische Anfärbung mit anti-CF-Ak: CF-spezifisches Signal in der arteriellen Gefäßwand.

Gemäß Oorni *et al.* [19] lassen sich in der Intima von normalen Koronararterien nur wenige CF-immunpositive Zellen nachweisen. Cathepsin F wird wahrscheinlich von glatten Muskelzellen der Tunica media der physiologischen, unveränderten Arterienwand exprimiert. In atherosklerotisch veränderten Herzkranzgefäßen kommt es hingegen im entzündlichen Infiltrat zur starken Anfärbung von CF in den dort akkumulierten Makrophagen [19]. Aus diesem Grund wiesen die histologischen Schnitte von Herz- (Abb. 16) und Lebergewebe (Abb. 17) möglicherweise atherosklerotisch veränderte Gefäße auf (Abb. 22). In den Arterien der Kolonschnitte ließ sich kein CF nachweisen, da diese wahrscheinlich keine atherosklerotischen Veränderungen aufwiesen.

5.5 Ausblick

Wegen des Fehlens geeigneter spezifischer mAk zur Detektion von CF gibt es in der Literatur bisher nur wenige verlässliche Daten zur Expression von CF auf Proteinebene. Seine Rolle im Proteinstoffwechsel bleibt weiterhin weitestgehend ungeklärt. Es bedarf weiterführender Untersuchungen auf diesen Feldern, wofür auch die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen spezifischen Ak zur Anwendung kommen können.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Rawlings ND and Barrett AJ (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* **290**:205-218.
- [2] Joo HS, Koo KB, Park KI, Bae SH, Yun JW, Chang CS and Choi JW (2007) Cloning and expression of the cathepsin F-like cysteine protease gene in *Escherichia coli* and its characterization. *J Microbiol* **45**(2):158-167.
- [3] Kirschke H and Barret AJ: Chemistry of lysosomal proteases. In: Glaumann H, and Ballard FJ (eds): *Lysosomes: their role in protein breakdown*. Academic Press, London, 1987, pp. 193-238.
- [4] Wang B, Shi GP, Yao PM, Li Z, Chapman HA and Bromme D (1998) Human cathepsin F. Molecular cloning, functional expression, tissue localization, and enzymatic characterization. *J Biol Chem* **273**(48):32000-32008.
- [5] Santamaria I, Velasco G, Pendas AM, Paz A and Lopez-Otin C (1999) Molecular cloning and structural and functional characterization of human cathepsin F, a new cysteine proteinase of the papain family with a long propeptide domain. *J Biol Chem* **274**(20):13800-13809.
- [6] Kirschke H, Barrett AJ and Rawlings ND (1995) Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile* **2**(14):1581-1643.
- [7] Barrett AJ (1992) Cellular proteolysis. An overview. *Ann N Y Acad Sci* **674**:1-15.
- [8] Shi GP, Bryant RA, Riese R, Verhelst S, Driessen C, Li Z, Bromme D, Ploegh HL and Chapman HA (2000) Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages. *J Exp Med* **191**(7):1177-1186.
- [9] Lindstedt L, Lee M, Oorni K, Bromme D and Kovanen PT (2003) Cathepsins F and S block HDL3-induced cholesterol efflux from macrophage foam cells. *Biochem Biophys Res Commun* **312**(4):1019-1024.
- [10] Li Z, Yasuda Y, Li W, Bogyo M, Katz N, Gordon RE, Fields GB and Bromme D (2004) Regulation of collagenase activities of human cathepsins by glycosaminoglycans. *J Biol Chem* **279**(7):5470-5479.
- [11] Tang CH, Lee JW, Galvez MG, Robillard L, Mole SE and Chapman HA (2006) Murine cathepsin F deficiency causes neuronal lipofuscinosis and late-onset neurological disease. *Mol Cell Biol* **26**(6):2309-2316.
- [12] Mitchison HM and Mole SE (2001) Neurodegenerative disease: the neuronal ceroid lipofuscinoses (Batten disease). *Curr Opin Neurol* **14**(6):795-803.
- [13] Vazquez-Ortiz G, Pina-Sanchez P, Vazquez K, Duenas A, Taja L, Mendoza P, Garcia JA and Salcedo M (2005) Overexpression of cathepsin F, matrix metalloproteinases 11 and 12 in cervical cancer. *BMC Cancer* **5**:68.
- [14] Nagler DK, Sulea T and Menard R (1999) Full-length cDNA of human cathepsin F predicts the presence of a cystatin domain at the N-terminus of the cysteine protease zymogen. *Biochem Biophys Res Commun* **257**(2):313-318.
- [15] Ho JD, Meltser Y, Buggy JJ, Palmer JT, Elrod KC, Chan H, Mortara KD and Somoza JR (2002) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of human cathepsin F complexed with an irreversible vinyl sulfone inhibitor. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**(Pt 12):2187-2190.
- [16] Wex T, Levy B, Wex H and Bromme D (1999) Human cathepsins F and W: A new subgroup of cathepsins. *Biochem Biophys Res Commun* **259**(2):401-407.
- [17] Wex T, Levy B, Wex H and Bromme D (2000) Human cathepsins W and F form a new subgroup of cathepsins that is evolutionary separated from the cathepsin B- and L-like cysteine proteases. *Adv Exp Med Biol* **477**:271-280.
- [18] Wex T, Levy B, Smeekens SP, Ansorge S, Desnick RJ and Bromme D (1998) Genomic structure, chromosomal localization, and expression of human cathepsin W. *Biochem Biophys Res Commun* **248**(2):255-261.
- [19] Oorni K, Sneek M, Bromme D, Pentikainen MO, Lindstedt KA, Mayranpaa M, Aitio H and Kovanen PT (2004) Cysteine protease cathepsin F is expressed in human atherosclerotic lesions, is secreted by cultured macrophages, and modifies low density lipoprotein particles in vitro. *J Biol Chem* **279**(33):34776-34784.

- [20] IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature J (1984) Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *Biochem J* **219**(2):345-373.
- [21] http://www.iso.org/iso/country_codes.htm.
- [22] Allaire M, Chernaia MM, Malcolm BA and James MN (1994) Picornaviral 3C cysteine proteinases have a fold similar to chymotrypsin-like serine proteinases. *Nature* **369**(6475):72-76.
- [23] Berti PJ and Storer AC (1995) Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. *J Mol Biol* **246**(2):273-283.
- [24] Baker EN and Drenth J: The thiol proteases: structure and mechanism. In: Jurnak FA, and McPherson J (eds): *Biological Macromolecules and Assemblies. Active Sites of Enzymes. Vol. 3. John Wiley & Sons, Inc., New York*, 1987, pp. 313-368.
- [25] Polgár L: *Mechanisms of Protease Action*. 1st ed. *CRC Press Inc., Boca Raton, Florida*, 1989, pp. 123-156.
- [26] Shaw E (1990) Cysteinyln proteinases and their selective inactivation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **63**:271-347.
- [27] Bond JS and Butler PE (1987) Intracellular proteases. *Annu Rev Biochem* **56**:333-364.
- [28] Chapman HA, Riese RJ and Shi GP (1997) Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* **59**:63-88.
- [29] Rawlings ND and Barrett AJ (1994) Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol* **244**:461-486.
- [30] Bromme D, Li Z, Barnes M and Mehler E (1999) Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potential, enzymatic characterization, and chromosomal localization. *Biochemistry* **38**(8):2377-2385.
- [31] Chan SJ, San Segundo B, McCormick MB and Steiner DF (1986) Nucleotide and predicted amino acid sequences of cloned human and mouse preprocathepsin B cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**(20):7721-7725.
- [32] Paris A, Strukelj B, Pungercar J, Renko M, Dolenc I and Turk V (1995) Molecular cloning and sequence analysis of human preprocathepsin C. *FEBS Lett* **369**(2-3):326-330.
- [33] Fuchs R, Machleidt W and Gassen HG (1988) Molecular cloning and sequencing of a cDNA coding for mature human kidney cathepsin H. *Biol Chem Hoppe Seyler* **369**(6):469-475.
- [34] Ritonja A, Popovic T, Kotnik M, Machleidt W and Turk V (1988) Amino acid sequences of the human kidney cathepsins H and L. *FEBS Lett* **228**(2):341-345.
- [35] Gal S and Gottesman MM (1988) Isolation and sequence of a cDNA for human pro-(cathepsin L). *Biochem J* **253**(1):303-306.
- [36] Joseph LJ, Chang LC, Stamenkovich D and Sukhatme VP (1988) Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of human and murine preprocathepsin L. An abundant transcript induced by transformation of fibroblasts. *J Clin Invest* **81**(5):1621-1629.
- [37] Velasco G, Ferrando AA, Puente XS, Sanchez LM and Lopez-Otin C (1994) Human cathepsin O. Molecular cloning from a breast carcinoma, production of the active enzyme in *Escherichia coli*, and expression analysis in human tissues. *J Biol Chem* **269**(43):27136-27142.
- [38] Santamaria I, Pendas AM, Velasco G and Lopez-Otin C (1998) Genomic structure and chromosomal localization of the human cathepsin O gene (CTSO). *Genomics* **53**(2):231-234.
- [39] Gay NJ and Walker JE (1985) Molecular cloning of a bovine cathepsin. *Biochem J* **225**(3):707-712.
- [40] Nagler DK and Menard R (1998) Human cathepsin X: a novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions. *FEBS Lett* **434**(1-2):135-139.
- [41] Santamaria I, Velasco G, Pendas AM, Fueyo A and Lopez-Otin C (1998) Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location. *J Biol Chem* **273**(27):16816-16823.
- [42] Kirschke H, Barrett AJ and Rawlings ND: *Lysosomal cysteine proteinases*. 2nd ed. *Oxford University Press, Oxford-New York-Tokyo*, 1998, 148 pp.
- [43] Nakagawa T, Roth W, Wong P, Nelson A, Farr A, Deussing J, Villadangos JA, Ploegh H, Peters C and Rudensky AY (1998) Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* **280**(5362):450-453.
- [44] Roth W, Deussing J, Botchkarev VA, Pauly-Evers M, Saftig P, Hafner A, Schmidt P, Schmahl W, Scherer J, Anton-Lamprecht I, Von Figura K, Paus R and Peters C (2000) Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J* **14**(13):2075-2086.

- [45] Rawlings ND and Barrett AJ (1999) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **27**(1):325-331.
- [46] <http://merops.sanger.ac.uk/>.
- [47] Tisljar K, Deussing J and Peters C (1999) Cathepsin J, a novel murine cysteine protease of the papain family with a placenta-restricted expression. *FEBS Lett* **459**(3):299-304.
- [48] Inaoka T, Bilbe G, Ishibashi O, Tezuka K, Kumegawa M and Kokubo T (1995) Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone. *Biochem Biophys Res Commun* **206**(1):89-96.
- [49] Shi GP, Munger JS, Meara JP, Rich DH and Chapman HA (1992) Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease. *J Biol Chem* **267**(11):7258-7262.
- [50] Santamaria I, Velasco G, Cazorla M, Fueyo A, Campo E and Lopez-Otin C (1998) Cathepsin L2, a novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas. *Cancer Res* **58**(8):1624-1630.
- [51] Linnevers C, Smeekens SP and Bromme D (1997) Human cathepsin W, a putative cysteine protease predominantly expressed in CD8+ T-lymphocytes. *FEBS Lett* **405**(3):253-259.
- [52] Tezuka K, Tezuka Y, Maejima A, Sato T, Nemoto K, Kamioka H, Hakeda Y and Kumegawa M (1994) Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts. *J Biol Chem* **269**(2):1106-1109.
- [53] Bromme D, Okamoto K, Wang BB and Biroc S (1996) Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. *J Biol Chem* **271**(4):2126-2132.
- [54] Bromme D and Okamoto K (1995) Human cathepsin O2, a novel cysteine protease highly expressed in osteoclastomas and ovary molecular cloning, sequencing and tissue distribution. *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**(6):379-384.
- [55] Smith WW and Abdelmeguid SS (1999) Cathepsin K as a target for the treatment of osteoporosis. *Expert Opin Ther Patents* **9**:683-694.
- [56] Gelb BD, Shi GP, Chapman HA and Desnick RJ (1996) Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science* **273**(5279):1236-1238.
- [57] Wiederanders B, Bromme D, Kirschke H, von Figura K, Schmidt B and Peters C (1992) Phylogenetic conservation of cysteine proteinases. Cloning and expression of a cDNA coding for human cathepsin S. *J Biol Chem* **267**(19):13708-13713.
- [58] Turnsek T, Kregar I and Lebez D (1975) Acid sulphhydryl protease from calf lymph nodes. *Biochim Biophys Acta* **403**(2):514-520.
- [59] Kirschke H, Schmidt I and Wiederanders B (1986) Cathepsin S. The cysteine proteinase from bovine lymphoid tissue is distinct from cathepsin L (EC 3.4.22.15). *Biochem J* **240**(2):455-459.
- [60] Riese RJ, Wolf PR, Bromme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL and Chapman HA (1996) Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* **4**(4):357-366.
- [61] Villadangos JA, Riese RJ, Peters C, Chapman HA and Ploegh HL (1997) Degradation of mouse invariant chain: roles of cathepsins S and D and the influence of major histocompatibility complex polymorphism. *J Exp Med* **186**(4):549-560.
- [62] Shi GP, Webb AC, Foster KE, Knoll JH, Lemere CA, Munger JS and Chapman HA (1994) Human cathepsin S: chromosomal localization, gene structure, and tissue distribution. *J Biol Chem* **269**(15):11530-11536.
- [63] Nakagawa TY, Brissette WH, Lira PD, Griffiths RJ, Petrushova N, Stock J, McNeish JD, Eastman SE, Howard ED, Clarke SR, Rosloniec EF, Elliott EA and Rudensky AY (1999) Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* **10**(2):207-217.
- [64] Sevenich L, Hagemann S, Stoeckle C, Tolosa E, Peters C and Reinheckel T (2010) Expression of human cathepsin L or human cathepsin V in mouse thymus mediates positive selection of T helper cells in cathepsin L knock-out mice. *Biochimie* **92**(11):1674-1680.
- [65] Somoza JR, Zhan H, Bowman KK, Yu L, Mortara KD, Palmer JT, Clark JM and McGrath ME (2000) Crystal structure of human cathepsin V. *Biochemistry* **39**(41):12543-12551.

- [66] Adachi W, Kawamoto S, Ohno I, Nishida K, Kinoshita S, Matsubara K and Okubo K (1998) Isolation and characterization of human cathepsin V: a major proteinase in corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**(10):1789-1796.
- [67] Turk D, Guncar G, Podobnik M and Turk B (1998) Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol Chem* **379**(2):137-147.
- [68] Karrer KM, Peiffer SL and DiTomas ME (1993) Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**(7):3063-3067.
- [69] Fox T, de Miguel E, Mort JS and Storer AC (1992) Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry* **31**(50):12571-12576.
- [70] Carmona E, Dufour E, Plouffe C, Takebe S, Mason P, Mort JS and Menard R (1996) Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases. *Biochemistry* **35**(25):8149-8157.
- [71] Maubach G, Schilling K, Rommerskirch W, Wenz I, Schultz JE, Weber E and Wiederanders B (1997) The inhibition of cathepsin S by its propeptide--specificity and mechanism of action. *Eur J Biochem* **250**(3):745-750.
- [72] Wiederanders B (2000) The function of propeptide domains of cysteine proteinases. *Adv Exp Med Biol* **477**:261-270.
- [73] Tao K, Stearns NA, Dong J, Wu QL and Sahagian GG (1994) The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch Biochem Biophys* **311**(1):19-27.
- [74] Mach L, Mort JS and Glossl J (1994) Noncovalent complexes between the lysosomal proteinase cathepsin B and its propeptide account for stable, extracellular, high molecular mass forms of the enzyme. *J Biol Chem* **269**(17):13036-13040.
- [75] McIntyre GF, Godbold GD and Erickson AH (1994) The pH-dependent membrane association of procathepsin L is mediated by a 9-residue sequence within the propeptide. *J Biol Chem* **269**(1):567-572.
- [76] Cuozzo JW, Tao K, Wu QL, Young W and Sahagian GG (1995) Lysine-based structure in the proregion of procathepsin L is the recognition site for mannose phosphorylation. *J Biol Chem* **270**(26):15611-15619.
- [77] Von Figura K (1991) Molecular recognition and targeting of lysosomal proteins. *Curr Opin Cell Biol* **3**(4):642-646.
- [78] Coulombe R, Grochulski P, Sivaraman J, Menard R, Mort JS and Cygler M (1996) Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *EMBO J* **15**(20):5492-5503.
- [79] Barrett AJ and Kirschke H (1981) Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol* **80 Pt C**:535-561.
- [80] Nagler DK, Zhang R, Tam W, Sulea T, Purisima EO and Menard R (1999) Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochemistry* **38**(39):12648-12654.
- [81] Menard R, Nagler DK, Zhang R, Tam W, Sulea T and Purisima EO (2000) Human cathepsin X. A novel cysteine protease with unique specificity. *Adv Exp Med Biol* **477**:317-322.
- [82] Nagler DK, Tam W, Storer AC, Krupa JC, Mort JS and Menard R (1999) Interdependency of sequence and positional specificities for cysteine proteases of the papain family. *Biochemistry* **38**(15):4868-4874.
- [83] Krieger TJ and Hook VY (1991) Purification and characterization of a novel thiol protease involved in processing the enkephalin precursor. *J Biol Chem* **266**(13):8376-8383.
- [84] Samarel AM, Ferguson AG, Decker RS and Lesch M (1989) Effects of cysteine protease inhibitors on rabbit cathepsin D maturation. *Am J Physiol* **257**(6 Pt 1):C1069-1079.
- [85] Vidard L, Rock KL and Benacerraf B (1991) The generation of immunogenic peptides can be selectively increased or decreased by proteolytic enzyme inhibitors. *J Immunol* **147**(6):1786-1791.
- [86] Docherty K, Carroll RJ and Steiner DF (1982) Conversion of proinsulin to insulin: involvement of a 31,500 molecular weight thiol protease. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**(15):4613-4617.
- [87] Shinagawa T, Do YS, Baxter JD, Carilli C, Schilling J and Hsueh WA (1990) Identification of an enzyme in human kidney that correctly processes prorenin. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**(5):1927-1931.
- [88] Inui T, Ishibashi O, Inaoka T, Origane Y, Kumegawa M, Kokubo T and Yamamura T (1997) Cathepsin K antisense oligodeoxynucleotide inhibits osteoclastic bone resorption. *J Biol Chem* **272**(13):8109-8112.

- [89] Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, Amegadzie BY, Hanning CR, Jones C, Kurdyla JT, McNulty DE, Drake FH, Gowen M and Levy MA (1996) Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *J Biol Chem* **271**(21):12517-12524.
- [90] Delaisse JM, Ledent P and Vaes G (1991) Collagenolytic cysteine proteinases of bone tissue. Cathepsin B, (pro)cathepsin L and a cathepsin L-like 70 kDa proteinase. *Biochem J* **279** (1):167-174.
- [91] Takeda A, Jimi T, Wakayama Y, Misugi N, Miyake S and Kumagai T (1992) Demonstration of cathepsins B, H and L in xenografts of normal and Duchenne-muscular-dystrophy muscles transplanted into nude mice. *Biochem J* **288** (2):643-648.
- [92] Katunuma N and Kominami E (1987) Abnormal expression of lysosomal cysteine proteinases in muscle wasting diseases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **108**:1-20.
- [93] Mort JS, Recklies AD and Poole AR (1984) Extracellular presence of the lysosomal proteinase cathepsin B in rheumatoid synovium and its activity at neutral pH. *Arthritis Rheum* **27**(5):509-515.
- [94] Cunnane G, FitzGerald O, Hummel KM, Gay RE, Gay S and Bresnihan B (1999) Collagenase, cathepsin B and cathepsin L gene expression in the synovial membrane of patients with early inflammatory arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **38**(1):34-42.
- [95] Mason RW, Johnson DA, Barrett AJ and Chapman HA (1986) Elastinolytic activity of human cathepsin L. *Biochem J* **233**(3):925-927.
- [96] Chapman HA, Jr., Munger JS and Shi GP (1994) The role of thiol proteases in tissue injury and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* **150**(6 Pt 2):S155-159.
- [97] Sloane BF, Dunn JR and Honn KV (1981) Lysosomal cathepsin B: correlation with metastatic potential. *Science* **212**(4499):1151-1153.
- [98] Sloane BF and Honn KV (1984) Cysteine proteinases and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **3**(3):249-263.
- [99] Sloane BF (1990) Cathepsin B and cystatins: evidence for a role in cancer progression. *Semin Cancer Biol* **1**(2):137-152.
- [100] Mignatti P and Rifkin DB (1993) Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* **73**(1):161-195.
- [101] Lemere CA, Munger JS, Shi GP, Natkin L, Haass C, Chapman HA and Selkoe DJ (1995) The lysosomal cysteine protease, cathepsin S, is increased in Alzheimer's disease and Down syndrome brain. An immunocytochemical study. *Am J Pathol* **146**(4):848-860.
- [102] Figueiredo-Pereira ME, Efthimiopoulos S, Tezapsidis N, Buku A, Ghiso J, Mehta P and Robakis NK (1999) Distinct secretases, a cysteine protease and a serine protease, generate the C termini of amyloid beta-proteins Abeta1-40 and Abeta1-42, respectively. *J Neurochem* **72**(4):1417-1422.
- [103] Marks N, Berg MJ, Sapirstein VS, Durrie R, Swistok J, Makofske RC and Danho W (1995) Brain cathepsin B but not metalloendopeptidases degrade rAPP751 with production of amyloidogenic fragments. Comparison with synthetic peptides emulating beta- and gamma-secretase sites. *Int J Pept Protein Res* **46**(3-4):306-313.
- [104] Wex T, Wex H and Bromme D (1999) The human cathepsin F gene -a fusion product between an ancestral cathepsin and cystatin gene. *Biol Chem* **380**(12):1439-1442.
- [105] Rao NV, Rao GV and Hoidal JR (1997) Human dipeptidyl-peptidase I. Gene characterization, localization, and expression. *J Biol Chem* **272**(15):10260-10265.
- [106] Rood JA, Van Horn S, Drake FH, Gowen M and Debouck C (1997) Genomic organization and chromosome localization of the human cathepsin K gene (CTSK). *Genomics* **41**(2):169-176.
- [107] Chauhan SS, Popescu NC, Ray D, Fleischmann R, Gottesman MM and Troen BR (1993) Cloning, genomic organization, and chromosomal localization of human cathepsin L. *J Biol Chem* **268**(2):1039-1045.
- [108] Gong Q, Chan SJ, Bajkowski AS, Steiner DF and Frankfater A (1993) Characterization of the cathepsin B gene and multiple mRNAs in human tissues: evidence for alternative splicing of cathepsin B pre-mRNA. *DNA Cell Biol* **12**(4):299-309.
- [109] Wang X, Chan SJ, Eddy RL, Byers MG, Fukushima Y, Henry WM, Haley LL, Steiner DF and Shows TB (1987) Chromosome assignment of cathepsin B (CTSB) to 8p22 and cathepsin H (CTSH) to 15q24-q25. *Cytogenet Cell Genet* **46**:710-711.
- [110] <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

- [111] Stenman G, Astrom AK, Roijer E, Sotiropoulou G, Zhang M and Sager R (1997) Assignment of a novel cysteine proteinase inhibitor (CST6) to 11q13 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **76**(1-2):45-46.
- [112] Nasir J, Theilmann JL, Vaillancourt JP, Munday NA, Ali A, Scherer S, Beatty B, Nicholson DW and Hayden MR (1997) Interleukin-1beta-converting enzyme (ICE) and related cell death genes ICErel-II and ICErel-III map to the same PAC clone at band 11q22.2-22.3. *Mamm Genome* **8**(8):611-613.
- [113] Ohno S, Minoshima S, Kudoh J, Fukuyama R, Shimizu Y, Ohmi-Imajoh S, Shimizu N and Suzuki K (1990) Four genes for the calpain family locate on four distinct human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* **53**(4):225-229.
- [114] Haber E and Anfinsen CB (1962) Side-chain interactions governing the pairing of half-cysteine residues in ribonuclease. *J Biol Chem* **237**:1839-1844.
- [115] Cecil R and McPhee JR (1959) The sulfur chemistry of proteins. *Adv Protein Chem* **14**:255-389.
- [116] Cecil R and Wake RG (1962) The reactions of inter- and intra-chain disulphide bonds in proteins with sulphite. *Biochem J* **82**:401-406.
- [117] Cecil R: Intramolecular bonds in proteins. In: Neurath H (ed): The Proteins: Composition, Structure and Function. Vol. 1, 2nd ed. *Academic Press, New York*, 1963, pp. 380-476.
- [118] Cecil R and Weitzman PDJ (1964) The electroreduction of the disulphide bonds of insulin and other proteins. *Biochem J* **93**(1):1-11.
- [119] Stroud RM, Kay LM and Dickerson RE (1972) The crystal and molecular structure of DIP-inhibited bovine trypsin at 2.7 Angstrom resolution. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **36**:125-140.
- [120] Creighton TE (1997) Protein folding coupled to disulphide bond formation. *Biol Chem* **378**(8):731-744.
- [121] Mason RW, Green GD and Barrett AJ (1985) Human liver cathepsin L. *Biochem J* **226**(1):233-241.
- [122] Somoza JR, Palmer JT and Ho JD (2002) The crystal structure of human cathepsin F and its implications for the development of novel immunomodulators. *J Mol Biol* **322**(3):559-568.
- [123] Kamphuis IG, Drenth J and Baker EN (1985) Thiol proteases. Comparative studies based on the high-resolution structures of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for cathepsins B and H, and stem bromelain. *J Mol Biol* **182**(2):317-329.
- [124] Polgar L (1974) Mercaptide-imidazolium ion-pair: the reactive nucleophile in papain catalysis. *FEBS Lett* **47**(1):15-18.
- [125] Lewis SD, Johnson FA and Shafer JA (1976) Potentiometric determination of ionizations at the active site of papain. *Biochemistry* **15**(23):5009-5017.
- [126] Sluyterman LA and Wijdenes J (1976) Proton equilibria in the binding of Zn²⁺ and of methylmercuric iodide to papain. *Eur J Biochem* **71**(2):383-391.
- [127] Fengler A and Brandt W: Development and validation of homology models of human Cathepsins K, S, H and F. In: Langner J, and Ansorge S (eds): Cellular peptidases in immune functions and diseases 2. Vol. 477, Advances in Experimental Medicine and Biology. *Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York*, 2000, pp. 255-260.
- [128] Chuaqui RF, Zhuang Z, Emmert-Buck MR, Liotta LA and Merino MJ (1997) Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 11q13 in atypical ductal hyperplasia and in situ carcinoma of the breast. *Am J Pathol* **150**(1):297-303.
- [129] Newsham IF (1998) The long and short of chromosome 11 in breast cancer. *Am J Pathol* **153**(1):5-9.
- [130] <http://expasy.org>.
- [131] Roche PA and Cresswell P (1990) Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* **345**(6276):615-618.
- [132] Hiltbold EM and Roche PA (2002) Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway. *Curr Opin Immunol* **14**(1):30-35.
- [133] Cresswell P (1994) Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* **12**:259-293.
- [134] Germain RN (1994) MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* **76**(2):287-299.
- [135] Wolf PR and Ploegh HL (1995) How MHC class II molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**:267-306.

- [136] Watts C (1997) Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* **15**:821-850.
- [137] Romagnoli P and Germain RN (1994) The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy. *J Exp Med* **180**(3):1107-1113.
- [138] Sloan VS, Cameron P, Porter G, Gammon M, Amaya M, Mellins E and Zaller DM (1995) Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* **375**(6534):802-806.
- [139] Sherman MA, Weber DA and Jensen PE (1995) DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity* **3**(2):197-205.
- [140] Fung-Leung WP, Surh CD, Liljedahl M, Pang J, Leturcq D, Peterson PA, Webb SR and Karlsson L (1996) Antigen presentation and T cell development in H2-M-deficient mice. *Science* **271**(5253):1278-1281.
- [141] Miyazaki T, Wolf P, Tourne S, Waltzinger C, Dierich A, Barois N, Ploegh H, Benoist C and Mathis D (1996) Mice lacking H2-M complexes, enigmatic elements of the MHC class II peptide-loading pathway. *Cell* **84**(4):531-541.
- [142] Ghosh P, Amaya M, Mellins E and Wiley DC (1995) The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* **378**(6556):457-462.
- [143] Riberdy JM, Newcomb JR, Surman MJ, Barbosa JA and Cresswell P (1992) HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* **360**(6403):474-477.
- [144] Riberdy JM and Cresswell P (1992) The antigen-processing mutant T2 suggests a role for MHC-linked genes in class II antigen presentation. *J Immunol* **148**(8):2586-2590.
- [145] Shi GP, Villadangos JA, Dranoff G, Small C, Gu L, Haley KJ, Riese R, Ploegh HL and Chapman HA (1999) Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* **10**(2):197-206.
- [146] Driessen C, Bryant RA, Lennon-Dumenil AM, Villadangos JA, Bryant PW, Shi GP, Chapman HA and Ploegh HL (1999) Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells. *J Cell Biol* **147**(4):775-790.
- [147] Kovanen PT and Kokkonen JO (1991) Modification of low density lipoproteins by secretory granules of rat serosal mast cells. *J Biol Chem* **266**(7):4430-4436.
- [148] Paananen K and Kovanen PT (1994) Proteolysis and fusion of low density lipoprotein particles independently strengthen their binding to exocytosed mast cell granules. *J Biol Chem* **269**(3):2023-2031.
- [149] Paananen K, Saarinen J, Annala A and Kovanen PT (1995) Proteolysis and fusion of low density lipoprotein particles strengthen their binding to human aortic proteoglycans. *J Biol Chem* **270**(20):12257-12262.
- [150] Piha M, Lindstedt L and Kovanen PT (1995) Fusion of proteolyzed low-density lipoprotein in the fluid phase: a novel mechanism generating atherogenic lipoprotein particles. *Biochemistry* **34**(32):10120-10129.
- [151] Oorni K, Pentikainen MO, Ala-Korpela M and Kovanen PT (2000) Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions. *J Lipid Res* **41**(11):1703-1714.
- [152] Williams KJ and Tabas I (1995) The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**(5):551-561.
- [153] Hurt-Camejo E, Olsson U, Wiklund O, Bondjers G and Camejo G (1997) Cellular consequences of the association of apoB lipoproteins with proteoglycans. Potential contribution to atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(6):1011-1017.
- [154] Camejo G, Hurt-Camejo E, Wiklund O and Bondjers G (1998) Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis* **139**(2):205-222.
- [155] Williams KJ and Tabas I (1998) The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol* **9**(5):471-474.
- [156] Brown MS and Goldstein JL (1983) Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* **52**:223-261.
- [157] Lauer-Fields JL, Juska D and Fields GB (2002) Matrix metalloproteinases and collagen catabolism. *Biopolymers* **66**(1):19-32.

- [158] Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, Chapman HA and Libby P (1998) Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest* **102**(3):576-583.
- [159] Liu J, Sukhova GK, Sun JS, Xu WH, Libby P and Shi GP (2004) Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(8):1359-1366.
- [160] Reddy VY, Zhang QY and Weiss SJ (1995) Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(9):3849-3853.
- [161] Liu J, Sukhova GK, Yang JT, Sun J, Ma L, Ren A, Xu WH, Fu H, Dolganov GM, Hu C, Libby P and Shi GP (2006) Cathepsin L expression and regulation in human abdominal aortic aneurysm, atherosclerosis, and vascular cells. *Atherosclerosis* **184**(2):302-311.
- [162] Kaakinen R, Lindstedt KA, Sneck M, Kovanen PT and Oorni K (2007) Angiotensin II increases expression and secretion of cathepsin F in cultured human monocyte-derived macrophages: an angiotensin II type 2 receptor-mediated effect. *Atherosclerosis* **192**(2):323-327.
- [163] Daugherty A, Manning MW and Cassis LA (2000) Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest* **105**(11):1605-1612.
- [164] Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R and Dagenais G (2000) Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* **342**(3):145-153.
- [165] Keidar S, Heinrich R, Kaplan M, Hayek T and Aviram M (2001) Angiotensin II administration to atherosclerotic mice increases macrophage uptake of oxidized ldl: a possible role for interleukin-6. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**(9):1464-1469.
- [166] Candido R, Jandeleit-Dahm KA, Cao Z, Nesteroff SP, Burns WC, Twigg SM, Dilley RJ, Cooper ME and Allen TJ (2002) Prevention of accelerated atherosclerosis by angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **106**(2):246-253.
- [167] Dol F, Martin G, Staels B, Mares AM, Cazaubon C, Nisato D, Bidouard JP, Janiak P, Schaeffer P and Herbert JM (2001) Angiotensin AT1 receptor antagonist irbesartan decreases lesion size, chemokine expression, and macrophage accumulation in apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* **38**(3):395-405.
- [168] Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, Nussberger J, Harringer W and Drexler H (2000) Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation* **101**(12):1372-1378.
- [169] Kim MP, Zhou M and Wahl LM (2005) Angiotensin II increases human monocyte matrix metalloproteinase-1 through the AT2 receptor and prostaglandin E2: implications for atherosclerotic plaque rupture. *J Leukoc Biol* **78**(1):195-201.
- [170] Levin M, Leppanen O, Evaldsson M, Wiklund O, Bondjers G and Bjornheden T (2003) Mapping of ATP, glucose, glycogen, and lactate concentrations within the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(10):1801-1807.
- [171] Punturieri A, Filippov S, Allen E, Caras I, Murray R, Reddy V and Weiss SJ (2000) Regulation of elastolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages. *J Exp Med* **192**(6):789-799.
- [172] De Vries HE, Ronken E, Reinders JH, Buchner B, Van Berkel TJ and Kuiper J (1998) Acute effects of oxidized low density lipoprotein on metabolic responses in macrophages. *FASEB J* **12**(1):111-118.
- [173] Hurt-Camejo E, Camejo G, Peilot H, Oorni K and Kovanen P (2001) Phospholipase A(2) in vascular disease. *Circ Res* **89**(4):298-304.
- [174] Shi GP, Sukhova GK, Grubb A, Ducharme A, Rhode LH, Lee RT, Ridker PM, Libby P and Chapman HA (1999) Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms. *J Clin Invest* **104**(9):1191-1197.
- [175] Chen WL, Lin CT, Ko PS, Yeh PT, Kuan YH, Hu FR and Yang CM (2009) In vivo confocal microscopic findings of corneal wound healing after corneal epithelial debridement in diabetic vitrectomy. *Ophthalmology* **116**(6):1038-1047.
- [176] De Cilla S, Ranno S, Carini E, Fogagnolo P, Ceresara G, Orzalesi N and Rossetti LM (2009) Corneal subbasal nerves changes in patients with diabetic retinopathy: an in vivo confocal study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**(11):5155-5158.

- [177] Herse PR (1988) A review of manifestations of diabetes mellitus in the anterior eye and cornea. *Am J Optom Physiol Opt* **65**(3):224-230.
- [178] Rosenberg ME, Tervo TM, Immonen IJ, Muller LJ, Gronhagen-Riska C and Vesaluoma MH (2000) Corneal structure and sensitivity in type 1 diabetes mellitus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**(10):2915-2921.
- [179] Sanchez-Thorin JC (1998) The cornea in diabetes mellitus. *Int Ophthalmol Clin* **38**(2):19-36.
- [180] Shenoy R, Khandekar R, Bialasiewicz A and Al Muniri A (2009) Corneal endothelium in patients with diabetes mellitus: a historical cohort study. *Eur J Ophthalmol* **19**(3):369-375.
- [181] Azar DT, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS and Gipson IK (1992) Altered epithelial-basement membrane interactions in diabetic corneas. *Arch Ophthalmol* **110**(4):537-540.
- [182] Hatchell DL, Magolan JJ, Jr., Besson MJ, Goldman AI, Pederson HJ and Schultz KJ (1983) Damage to the epithelial basement membrane in the corneas of diabetic rabbits. *Arch Ophthalmol* **101**(3):469-471.
- [183] Tabatabay CA, Bumbacher M, Baumgartner B and Leuenberger PM (1988) Reduced number of hemidesmosomes in the corneal epithelium of diabetics with proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **226**(4):389-392.
- [184] Saghizadeh M, Brown DJ, Castellon R, Chwa M, Huang GH, Ljubimova JY, Rosenberg S, Spirin KS, Stolitenko RB, Adachi W, Kinoshita S, Murphy G, Windsor LJ, Kenney MC and Ljubimov AV (2001) Overexpression of matrix metalloproteinase-10 and matrix metalloproteinase-3 in human diabetic corneas: a possible mechanism of basement membrane and integrin alterations. *Am J Pathol* **158**(2):723-734.
- [185] Saghizadeh M, Chwa M, Aoki A, Lin B, Pirouzmanesh A, Brown DJ, Ljubimov AV and Kenney MC (2001) Altered expression of growth factors and cytokines in keratoconus, bullous keratopathy and diabetic human corneas. *Exp Eye Res* **73**(2):179-189.
- [186] Saghizadeh M, Kramerov AA, Tajbakhsh J, Aoki AM, Wang C, Chai NN, Ljubimova JY, Sasaki T, Sosne G, Carlson MR, Nelson SF and Ljubimov AV (2005) Proteinase and growth factor alterations revealed by gene microarray analysis of human diabetic corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(10):3604-3615.
- [187] Sosne G, Qiu P and Kurpakus-Wheaton M (2007) Thymosin beta-4 and the eye: I can see clearly now the pain is gone. *Ann N Y Acad Sci* **1112**:114-122.
- [188] Ljubimov AV, Huang ZS, Huang GH, Burgesson RE, Gullberg D, Miner JH, Ninomiya Y, Sado Y and Kenney MC (1998) Human corneal epithelial basement membrane and integrin alterations in diabetes and diabetic retinopathy. *J Histochem Cytochem* **46**(9):1033-1041.
- [189] Saghizadeh M, Kramerov AA, Yaghoobzadeh Y, Hu J, Ljubimova JY, Black KL, Castro MG and Ljubimov AV (2010) Adenovirus-driven overexpression of proteinases in organ-cultured normal human corneas leads to diabetic-like changes. *Brain Res Bull* **81**(2-3):262-272.
- [190] McCawley LJ and Matrisian LM (2000) Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today* **6**(4):149-156.
- [191] Nagase H and Woessner JF, Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **274**(31):21491-21494.
- [192] Boulay A, Masson R, Chenard MP, El Fahime M, Cassard L, Bellocq JP, Sautes-Fridman C, Basset P and Rio MC (2001) High cancer cell death in syngeneic tumors developed in host mice deficient for the stromelysin-3 matrix metalloproteinase. *Cancer Res* **61**(5):2189-2193.
- [193] Mole S (2004) Neuronal ceroid lipofuscinoses (NCL). *Eur J Paediatr Neurol* **8**(2):101-103.
- [194] Mole SE (1996) Recent advances in the molecular genetics of the neuronal ceroid lipofuscinoses. *J Inher Metab Dis* **19**(3):269-274.
- [195] Rawlings ND and Barrett AJ (1999) Tripeptidyl-peptidase I is apparently the CLN2 protein absent in classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Biochim Biophys Acta* **1429**(2):496-500.
- [196] Koike M, Nakanishi H, Saftig P, Ezaki J, Isahara K, Ohsawa Y, Schulz-Schaeffer W, Watanabe T, Waguri S, Kametaka S, Shibata M, Yamamoto K, Kominami E, Peters C, von Figura K and Uchiyama Y (2000) Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons. *J Neurosci* **20**(18):6898-6906.
- [197] Siintola E, Partanen S, Stromme P, Haapanen A, Haltia M, Maehlen J, Lehesjoki AE and Tyynele J (2006) Cathepsin D deficiency underlies congenital human neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Brain* **129**(Pt 6):1438-1445.

- [198] Dawson G, Dawson SA and Siakotos AN (1989) Phospholipases and the molecular basis for the formation of ceroid in Batten disease. *Adv Exp Med Biol* **266**:259-270; discussion 271.
- [199] Berkovic SF, Andermann F, Andermann E, Carpenter S and Wolfe L (1988) Kufs disease: clinical features and forms. *Am J Med Genet Suppl* **5**:105-109.
- [200] Goebel HH, Mole SE and Lake BD: The neuronal ceroid lipofuscinoses (Batten disease). 1st ed. *IOS Press, Amsterdam*, 1999, 197 pp.
- [201] Arsov T, Smith KR, Damiano J, Franceschetti S, Canafoglia L, Bromhead CJ, Andermann E, Vears DF, Cossette P, Rajagopalan S, McDougall A, Sofia V, Farrell M, Aguglia U, Zini A, Meletti S, Morbin M, Mullen S, Andermann F, Mole SE, Bahlo M and Berkovic SF (2011) Kufs disease, the major adult form of neuronal ceroid lipofuscinosis, caused by mutations in CLN6. *Am J Hum Genet* **88**(5):566-573.
- [202] Noskova L, Stranecky V, Hartmannova H, Pristoupilova A, Baresova V, Ivanek R, Hulkova H, Jahnova H, van der Zee J, Staropoli JF, Sims KB, Tynnela J, Van Broeckhoven C, Nijssen PC, Mole SE, Elleder M and Kmoch S (2011) Mutations in DNAJC5, encoding cysteine-string protein alpha, cause autosomal-dominant adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis. *Am J Hum Genet* **89**(2):241-252.
- [203] Velinov M, Dolzhanskaya N, Gonzalez M, Powell E, Konidari I, Hulme W, Staropoli JF, Xin W, Wen GY, Barone R, Coppel SH, Sims K, Brown WT and Zuchner S (2012) Mutations in the gene DNAJC5 cause autosomal dominant Kufs disease in a proportion of cases: study of the Parry family and 8 other families. *PLoS One* **7**(1):e29729.
- [204] Goebel HH, Schochet SS, Jaynes M, Bruck W, Kohlschutter A and Hentati F (1999) Progress in neuropathology of the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Mol Genet Metab* **66**(4):367-372.
- [205] Mitchison HM, Lim MJ and Cooper JD (2004) Selectivity and types of cell death in the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Brain Pathol* **14**(1):86-96.
- [206] Tynnela J, Cooper JD, Khan MN, Shemilt SJ and Haltia M (2004) Hippocampal pathology in the human neuronal ceroid-lipofuscinoses: distinct patterns of storage deposition, neurodegeneration and glial activation. *Brain Pathol* **14**(4):349-357.
- [207] Smith KR, Dahl HH, Canafoglia L, Andermann E, Damiano J, Morbin M, Bruni AC, Giaccone G, Cossette P, Saftig P, Grotzinger J, Schwake M, Andermann F, Staropoli JF, Sims KB, Mole SE, Franceschetti S, Alexander NA, Cooper JD, Chapman HA, Carpenter S, Berkovic SF and Bahlo M (2013) Cathepsin F mutations cause Type B Kufs disease, an adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis. *Hum Mol Genet*.
- [208] Macedo-Souza LI, Kok F, Santos S, Amorim SC, Starling A, Nishimura A, Lezirovitz K, Lino AM and Zatz M (2005) Spastic paraplegia, optic atrophy, and neuropathy is linked to chromosome 11q13. *Ann Neurol* **57**(5):730-737.
- [209] Windpassinger C, Wagner K, Petek E, Fischer R and Auer-Grumbach M (2003) Refinement of the Silver syndrome locus on chromosome 11q12-q14 in four families and exclusion of eight candidate genes. *Hum Genet* **114**(1):99-109.
- [210] Gey GO, Coffman WD and Kubicek MT (1952) Tissue culture studies of the proliferation capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research* **12**:264-265.
- [211] Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B and Rajewsky K (1979) A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J Immunol* **123**(4):1548-1550.
- [212] Goretzki PE, Frilling A, Simon D and Roehrer HD (1990) Growth regulation of normal thyroids and thyroid tumors in man. *Recent Results Cancer Res* **118**:48-63.
- [213] Bepler G, Koehler A, Kiefer P, Havemann K, Beisenherz K, Jaques G, Gropp C and Haeder M (1988) Characterization of the state of differentiation of six newly established human non-small-cell lung cancer cell lines. *Differentiation* **37**(2):158-171.
- [214] Hanly WC, Taylor Bennett B and Artwohl JE (1994) Overview of adjuvants. *BRL Bulletin* **10**(1):1-4.
- [215] Fong SK, Sasaki DT, Grumet FC and Engleman EG (1982) Production of functional human T-T hybridomas in selection medium lacking aminopterin and thymidine. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**(23):7484-7488.
- [216] Kohler G and Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**(5517):495-497.

- [217] Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259):680-685.
- [218] O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**(10):4007-4021.
- [219] Poehling HM and Neuhoff V (1981) Visualization of proteins with a silver stain: A critical analysis. *Electrophoresis* **2**:141-147.
- [220] Blum M, Beier H and Gross HJ (1987) Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**(2):93-99.
- [221] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O and Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**(5):850-858.
- [222] Merril CR, Goldman D and Van Keuren ML (1984) Gel protein stains: silver stain. *Methods Enzymol* **104**:441-447.
- [223] Heukeshoven J and Dernick R (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**(1):28-32.
- [224] Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**(9):4350-4354.
- [225] Nilson B, Bjorck L and Akerstrom B (1986) Detection and purification of rat and goat immunoglobulin G antibodies using protein G-based solid-phase radioimmunoassays. *J Immunol Methods* **91**(2):275-281.
- [226] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**(1):265-275.
- [227] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
- [228] Reisner AH, Nemes P and Bucholtz C (1975) The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **64**(2):509-516.
- [229] Fazekas de St Groth S, Webster RG and Datyner A (1963) Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta* **71**:377-391.
- [230] Sedmak JJ and Grossberg SE (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem* **79**(1-2):544-552.
- [231] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UBX1>.
- [232] <http://www.uniprot.org>.
- [233] Kaufmann SHE: Teil 2: Immunologie. Kapitel 6: Grundbegriffe. In: Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, and Suerbaum S (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 6. Aufl. *Springer Medizin Verlag, Berlin-Heidelberg-New York*, 2009, S. 37-39.
- [234] Janeway CA and Travers P: Immunologie. 2. Aufl. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin-Oxford*, 1997, S. 85-122.
- [235] <http://www.poscogen.dk/pages.asp?PID=217>.
- [236] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi>.
- [237] Edelman GM (1991) Antibody structure and molecular immunology. *Scand J Immunol* **34**(1):1-22.
- [238] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68007143>.
- [239] Buhling F, Fengler A, Brandt W, Welte T, Ansorge S and Nagler DK (2000) Review: novel cysteine proteases of the papain family. *Adv Exp Med Biol* **477**:241-254.
- [240] <http://www.pathologen-luebeck.de/Methoden/Immunhistologie/Antikorper/CD45/cd45.html>.
- [241] Sell S: Immunology, immunopathology and immunity. 6th ed. *American Society for Microbiology (ASM) Press, Herndon, VA, USA*, 2001, pp. 198-232.
- [242] Lu HS, Yuan PM and Gracy RW (1984) Primary structure of human triosephosphate isomerase. *J Biol Chem* **259**(19):11958-11968.
- [243] Joosten V, Lokman C, Van Den Hondel CA and Punt PJ (2003) The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi. *Microb Cell Fact* **2**(1):1.
- [244] Stryer L: Biochemie. 4. Aufl. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford*, 1996, S. 381-404.
- [245] Voet D, Voet JG and Pratt CW: Lehrbuch der Biochemie. 1. Aufl. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim*, 2002, S. 173-210.

- [246] Löffler G and Petrides PE: Biochemie und Pathobiochemie. 6. Aufl. *Springer Medizin Verlag, Berlin-Heidelberg-New York*, 1998, S. 1058-1085.
- [247] Anonymous: Handbook of Antibody Purification. Vol. 1, AA ed. *Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg*, 2000, pp. 7-11.
- [248] Stahli C, Staehelin T, Miggiano V, Schmidt J and Haring P (1980) High frequencies of antigen-specific hybridomas: dependence on immunization parameters and prediction by spleen cell analysis. *J Immunol Methods* **32**(3):297-304.
- [249] Stahli C, Staehelin T and Miggiano V (1983) Spleen cell analysis and optimal immunization for high-frequency production of specific hybridomas. *Methods Enzymol* **92**:26-36.
- [250] Cooper PD, McComb C and Steele EJ (1991) The adjuvanticity of Algamulin, a new vaccine adjuvant. *Vaccine* **9**(6):408-415.
- [251] Herbert WJ: Mineral-oil adjuvants and the immunization of laboratory animals. In: Weir DM, Herzenberg LA, and Blackwell C (eds): Handbook of Experimental Immunology. 3rd ed. *Blackwell Scientific Publications, Oxford*, 1978, pp. A3.1-A3.15.
- [252] Dunbar BS and Schwoebel ED (1990) Preparation of polyclonal antibodies. *Methods Enzymol* **182**:663-670.
- [253] Pike RM (1967) Antibody heterogeneity and serological reactions. *Bacteriol Rev* **31**(2):157-174.
- [254] Revillard J-P: Immunologie. 2nd ed. *De Boeck & Larcier S.A., Bruxelles*, 1995, 367 pp.
- [255] Spiegelberg HL: Biological activities of immunoglobulins of different classes and subclasses. In: Dixon FJ, and Kunkel HG (eds): Advances in Immunology. Vol. 19. *Elsevier, Academic Press, Inc., New York*, 1974, pp. 259-289.
- [256] Miller LA: Delivery of immunocontraceptive vaccines for wildlife management. In: Kreeger TJ (ed): Contraception in Wildlife Management. Vol. 1853. *Technical Bulletin, Animal and Plant Health Inspection Service, USDA, Washington DC*, 1997, pp. 49-58.
- [257] Handman E and Remington JS (1980) Serological and immunochemical characterization of monoclonal antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Immunology* **40**(4):579-588.
- [258] Handman E and Remington JS (1980) Antibody responses to toxoplasma antigens in mice infected with strains of different virulence. *Infect Immun* **29**(1):215-220.
- [259] Mashimo J and Mita A (1995) In vivo production of various cytokines in splenocytes of sheep erythrocyte-immunized mice after intravenous administration of bacterial lipid A. *Microbiol Immunol* **39**(3):169-175.
- [260] Turner GS (1978) Immunoglobulin (IgG) and (IgM) antibody responses to rabies vaccine. *J Gen Virol* **40**(3):595-604.
- [261] Britton S and Moller G (1968) Regulation of antibody synthesis against *Escherichia coli* endotoxin. I. Suppressive effect of endogenously produced and passively transferred antibodies. *J Immunol* **100**(6):1326-1334.
- [262] Miranda JJ (1972) Studies on immunological paralysis. IX. The immunogenicity and tolerogenicity of levan (polyfructose) in mice. *Immunology* **23**(6):829-842.
- [263] Uhr JW and Finkelstein MS (1967) The kinetics of antibody formation. *Prog Allergy* **10**:37-83.
- [264] Monath TP (1971) Neutralizing antibody responses in the major immunoglobulin classes to yellow fever 17D vaccination of humans. *Am J Epidemiol* **93**(2):122-129.
- [265] Goding JW: Monoclonal antibodies: principles and practice. 3rd ed. *Academic Press Limited, London*, 1996, pp. 160-174.
- [266] Ringleb J (2004) Identifikation antigener Determinanten des ZPB2 Proteins der Hauskatze und Charakterisierung ihrer kontrazeptiven und immunogenen Eigenschaften. *Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Potsdam*.
- [267] Holtzhauer M: Biochemische Labormethoden. 3. Aufl. *Springer Labor Manual, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York*, 1997, S. 135-137.
- [268] Van der Ven H (2002) Zur Wirksamkeit verschiedener Adjuvantien in bakteriellen bestandsspezifischen Vakzinen für Puten. *Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover*.
- [269] Jennings VM (1995) Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production. *ILAR J* **37**(3):119-125.
- [270] Miller LA, Johns BE, Elias DJ and Crane KA (1997) Comparative efficacy of two immunocontraceptive vaccines. *Vaccine* **15**(17-18):1858-1862.

-
- [271] Kaeberle ML: Function of carriers and adjuvants in induction of immune responses. In: Nervig RM, Gough PM, Kaeberle ML, and Whetstone CA (eds): *Advances in Carriers and Adjuvants for Veterinary Biologics*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 1986, pp. 11-23.
- [272] Freund J, Schryver EM, McGuinness MB and Geitner MB (1952) Diphtheria antitoxin formation in the horse at site of injection of toxoid and adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med* **81**(3):657-658.
- [273] Pingoud A and Urbanke C: *Arbeitsmethoden der Biochemie*. 1. Aufl. Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1997, S. 209-228.
- [274] Hunter RL, Olsen MR and Bennett B: Copolymer adjuvants and Titermax[®]. In: Stewart-Tull DES (ed): *The Theory and Practical Application of Adjuvants*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995, pp. 51-94.

7 Thesen

1. Cathepsin F (CF) ist eine lysosomale Cystein-Proteinase, die 1998 erstmals von Wang *et al.* beschrieben wurde und über deren spezifische Funktionen bisher nur wenig bekannt ist.
2. Zu Cathepsin F existieren nur wenige verlässliche Daten, insbesondere bzgl. seiner Expression auf Proteinebene und seine Rolle im Proteinstoffwechsel ist weitgehend ungeklärt, was nicht zuletzt auf das bisherige Fehlen geeigneter spezifischer monoklonaler Antikörper zur Detektion von CF zurückgeführt werden kann. Es wird in verschiedenen Geweben unterschiedlich exprimiert und es konnte auch in einzelnen humanen Tumorzelllinien (z. B. HeLa-Zellen, K-562-Zellen und Lungenkarzinomzellen) und in Tumorgewebe (z. B. Zervixkarzinom) detektiert werden.
3. Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, mit humanem rekombinanten CF aus *Escherichia coli* und mit CF-Peptiden, die nach spezifischen Kriterien ausgesucht worden waren (Oberflächenexpression im CF-Molekül und Ausschluss von Kreuzreaktivitäten), monoklonale (mAk) und polyklonale Antikörper (pAk) gegen CF zu generieren.
4. Aus Fusionen von Lymphoblasten von insgesamt 11 Mäusemilzen mit Myelomzellen konnten ca. 7.000 Hybridome gewonnen werden, deren Kulturüberstände bzgl. ihrer Produktion spezifischer Antikörper gegen Cathepsin F überprüft wurden. Es konnten 3 Klone (CF77-3C2, CF77-4D1 und CF169-6H12) identifiziert werden, die spezifische monoklonale anti-CF-Ak produzierten. Außerdem wurden 4 Kaninchen zur Gewinnung von polyklonalen anti-CF-Ak eingesetzt, wobei die Seren von 2 Kaninchen („Franzi“ und „Fritzi“) hochspezifisch waren und für die weiteren Versuche verwendet wurden.
5. Die generierten mAk zeigten im ELISA, im Immunoblot und in der Epitopkartierung CF-Spezifität. Die mAk reagierten mit unterschiedlichen Sequenzabschnitten des CF:
 - CF77-3C2 mit A₂₆₄-L₂₇₀ des Pro-Peptids (A₂₀-L₂₇₀) des Pro-CF,
 - CF77-4D1 mit S₃₆₉-Y₃₇₆ und
 - CF169-6H12 mit N₄₀₅-P₄₂₂ des reifen, enzymatisch aktiven CF (A₂₇₁-D₄₈₄).
6. Die anti-CF-Ak zeigten keine Kreuzreaktivität mit dem nahe verwandten, zu 42% identischen und zu 58% homologen Cathepsin W (CW). Für den mAk CF77-3C2 ergab sich eine Kreuzreaktion mit der Triosephosphatisomerase (TPI), jedoch war eine Differenzierbarkeit beider Moleküle im Immunoblot anhand ihrer unterschiedlichen Molmassen (MM) (Pro-CF: 53,4 kDa bei 484 Aminosäuren (AS) versus TPI: 26,7 kDa bei 249 AS) möglich.
7. Zum Nachweis der Spezifität der Antikörper und zur Gewinnung von nativem CF u. a. aus Tumorzelllinien (z. B. HeLa-S3) für weitere Immunisierungen wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Die Immunpräzipitation erfolgte mit dem pAk „Fritzi“; der Nachweis von CF im

Immunpräzipitat durch die pAk „Franzi“, „Fritzi“ und den kommerziell erhältlichen polyklonalen Ziege anti-CF-Ak „Santa Cruz“, die jeweils eine Bande in Höhe von 53 kDa, das der MM von Pro-CF entspricht, detektierten.

8. Zu Beginn der Arbeit war die Expression von humanem CF nur auf Transkriptionsebene eindeutig nachgewiesen worden, nicht jedoch auf Proteinebene. In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde Gewebe mit (Herz, Kolon, Leber) oder ohne Expression (Thymus) von CF mittels der gewonnenen, gegen CF gerichteten mAks (CF77-4D1, CF169-6H12 und CW39-2E2) und der pAks („Franzi“, „Fritzi“ und „Santa Cruz“) immunhistochemisch untersucht. Es gelang der Nachweis von CF auf Proteinebene mit diesen spezifischen anti-CF-Aks.
9. In der Kolonmukosa ließ sich CF intrazellulär in den Schaum- und Becherzellen im Bereich der Krypten detektieren. Im Herzgewebe wurde CF in den Kardiomyozyten nachgewiesen. Im Lebergewebe wurde CF in den Hepatozyten detektiert und die eingesetzten Antikörper (mAks CF77-4D1 und CW39-2E2 bzw. pAks „Franzi“ und „Fritzi“) färbten zudem das Gallengangepithel der hepatischen Glisson Trias. Im Bereich der arteriellen Gefäße der Herz- und Leberschnitte wurde mit diesen anti-CF-Aks ebenfalls CF detektiert, was möglicherweise auf das Vorhandensein von atherosklerotischen Veränderungen zurückzuführen ist. Cathepsin F, das in der Intima normaler Arterien nur minimal exprimiert wird, kann in entzündlichen Infiltraten (v. a. in Makrophagen) atherosklerotisch veränderter Gefäße vermehrt exprimiert werden. Im Thymusgewebe ließ sich entsprechend der Literatur kein CF nachweisen.
10. Aufgrund der sich inzwischen andeutenden Beteiligung von CF an vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen (z. B. im Immunsystem, im Stoffwechsel von Lipoproteinen und Kollagen, in der Tumorgenese etc.) könnte sich eine klinische Relevanz für CF und dessen Antikörper bei der Erkennung u. a. von Tumorerkrankungen und atherosklerotischen Gefäßveränderungen ergeben. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen spezifischen Aks könnten aufgrund der erzielten Ergebnisse geeignet sein, die Rolle von CF weiter aufzuklären.

8 Anhang

8.1 Lebenslauf

Familienname: Wickboldt
Vorname: Nadine
Geburtsdatum: 13.08.1979
Geburtsort: Halle/Saale
Eltern: Lutz Wickboldt
Kerstin Rohr, geborene Schmidt
Wohnort: Rue Cingria 3, 1205 Genf, Schweiz
Max-Richards-Straße 41, 06128 Halle/Saale

Ausbildung:

Schulische Laufbahn

1986-1991 Grundschule
1991-1998 Besuch des Friedensgymnasiums Halle/Saale
1998 Hochschulreife mit Auszeichnung

Medizinstudium

1998-2005 Medizinstudium an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2000 Ärztliche Vorprüfung
2000 Fachkurs „Englisch für Mediziner“ (Grade A)
2000-2001 Einjähriger Studienaufenthalt an der Universität von Besançon, Frankreich (Praktikum in der inneren Medizin, Kinderchirurgie, pädiatrischen Intensivmedizin am Centre hospitalier universitaire de Besançon); Erasmusförderung
2002 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2003 Famulatur in der Gefäß-, Herz- und Viszeralchirurgie und der Notfallmedizin am Universitätskrankenhaus Hiroshima, Japan und Sozialpraktikum in Hiroshima und Nagasaki, Japan; Stipendium der Organisation IPPNW
2004 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2004-2005 Praktisches Jahr:
1. Terial: Dermatologie am Universitätsklinikum Halle/Saale;
2. Terial: Gefäß-, Thorax- und endokrinologische Chirurgie am Centre hospitalier universitaire de Grenoble, Frankreich;

3. Terial: Innere Medizin und Intermediate Care an den Hôpitaux universitaires de Genève, Genf, Schweiz

2005 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Approbation

Berufliche Laufbahn

2006-2007 Anästhesiologie am Universitätsklinikum Halle/Saale

2006 Tropenmedizinischer Lehrgang am Universitätsklinikum Leipzig

2007 Praktikum der Anästhesiologie und Intensivmedizin am Universitätskrankenhaus Hiroshima, Japan

2007-2009 Allgemein- und Viszeralchirurgie, Herz-Gefäßchirurgie, Notaufnahme an den Hôpitaux universitaires de Genève, Genf, Schweiz

2008 Notfallmedizin-Kurs der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Seit 2009 Anästhesiologie, Intensivmedizin und Notfallmedizin an den Hôpitaux universitaires de Genève, Genf, Schweiz

2009 *Advanced Trauma Life Support (ATLS)*-Kurs in Bern, Schweiz

2010-2012 Weiterbildung in der medizinischen Hypnosetherapie, Schweizerische Gesellschaft für Hypnose

2011 Kurs der Schweizer Gesellschaft für Notfall- und Rettungsmedizin (SGNOR) in Zürich, Schweiz

Offizielle Funktionen

2000-2006 Mitglied des Deutschen Famulanten Austauschdienstes (DFA) an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Seit 2010 Mitglied der Gruppe für klinische Hypnose in der Anästhesiologie, Intensivmedizin und Notfallmedizin an den Hôpitaux universitaires de Genève, Genf, Schweiz

Seit 2011 Repräsentantin der Assistenzärzte der Anästhesiologie, Abteilung Anästhesiologie, Intensivmedizin und Notfallmedizin an den Hôpitaux universitaires de Genève, Genf, Schweiz

Seit 2011 Mitglied der Medikamentenkommission in der Anästhesiologie, Intensivmedizin und Notfallmedizin an den Hôpitaux universitaires de Genève, Genf, Schweiz

Seit 2011 Repräsentantin der Assistenzärzte der Universitätsklinik Genf in der Gruppe Stressbewältigung für Mediziner an den Hôpitaux universitaires de Genève, Genf, Schweiz

Seit 2012 Junior Mitglied der „European Society of Anaesthesiology (ESA) - European Society of Intensive Care Medicine (ESICM) Outcome Measure Task Force“

Wissenschaftliche Funktionen

2011 Koordinatorin der Studie EuSOS („European Surgical Outcome Study“, *principal investigator* Dr. R. M. Pearse) auf nationaler Ebene in der Schweiz und auf lokaler Ebene in

den Hôpitaux universitaires de Genève, Genf, Schweiz (in Zusammenarbeit mit Oberarzt
PD Dr. B. Walder)

Halle/Saale, den 19. Januar 2013

Nadine Wickboldt

8.2 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsarbeit selbständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel verfasst habe. Die aus anderen Werken direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater und andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle/Saale, den 19. Januar 2013

Nadine Wickboldt

8.3 Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertationsarbeit bisher keiner anderen Prüfungsbehörde in gleicher oder abgewandelter Form vorgelegt wurde.

Ich habe keine früheren Promotionsversuche unternommen.

Halle/Saale, den 19. Januar 2013

Nadine Wickboldt

8.4 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Dr. Ekkehard Weber bedanken für das Überlassen des Themas und die intensive Betreuung in allen Phasen meiner Dissertationsarbeit, für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die fruchtbare Zusammenarbeit. Im Kreise seiner Arbeitsgruppe möchte ich Frau Rita Medek für die Unterstützung bei der Erlernung der Techniken zur Generierung monoklonaler Antikörper danken und Frau Dr. Gerit Theil für die stetige Hilfsbereitschaft bei den Experimenten und sonstigen Anfragen. Die aufgeschlossene Arbeitsatmosphäre und offene Diskussionskultur im Labor hat im besonderen Maße zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Ich möchte mich ebenso bei Herrn Prof. Dr. Cuong Hoang-Vu bedanken, der es mir ermöglichte, im ECHO-Labor der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg die immunhistologischen Versuche vorzunehmen. In diesem Zusammenhang richte ich einen besonderen Dank an sein Team und hierbei v. a. an Frau Kathrin Hammje für ihre großzügige Hilfe.

Bei Herrn Dr. Dieter Brömme der University of British Columbia, Vancouver, Kanada und Herrn PD Dr. Thomas Wex der Medizinischen Fakultät, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg (beide 2001 am Mount Sinai Hospital, New York, US) möchte ich mich für die Bereitstellung des rekombinanten Cathepsin F bedanken.

Dem Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für die großzügige Bereitstellung der Gewebsschnitte.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner lieben Familie, insbesondere meinen Eltern und meinen Freunden, hierbei v. a. Nicole, Saja, Valérie, Sandie, Sermin, Pernilla, Anusha, ... durch deren ständige Unterstützung und unermüdliches Mutmachen das Anfertigen dieser Arbeit erst ermöglicht wurde.