

Isolierung und biochemische Charakterisierung  
einer zytosolischen Aminopeptidase aus der humanen  
T-Zelllinie H9

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von  
Mgr. Med. Analytik Alicja Bukowska  
geb. am 8. September 1966 in Rzeszów

Gutachter:

1. Prof. Dr. habil. S. Ansorge
2. Prof. Dr. habil. K. Neubert
3. PD Dr. D. Reinhold

Halle (Saale), den 18.06.2002

**urn:nbn:de:gbv:3-000003800**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003800>]



## ZUSAMMENFASSUNG

Die Struktur, Regulation und physiologische Funktion vieler Proteasen ist nur teilweise aufgeklärt. In der humanen T-Zelllinie H9 wurde eine neutrale Amino-peptidase-Aktivität nachgewiesen, deren bisherige biochemische Charakterisierung sie von anderen, bekannten Aminopeptidasen unterschied. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der Identität des Enzyms und dessen umfassende biochemische Charakterisierung und damit einen Beitrag zur Erweiterung des Kenntnisstandes über Vorkommen und Funktion von Aminopeptidasen im Zytosol von Immunzellen zu leisten.

Das Enzym wurde unter Anwendung von konventionellen chromatographischen Methoden isoliert und mit Hilfe der Massenspektrometrie (Maldi-TOF) als zytosolische Alanyl-Aminopeptidase (EC 3.4.11.14; zAAP, PSA) identifiziert. Die biochemischen Eigenschaften dieser Peptidase aus H9-Zellen zeigten Gemeinsamkeiten, aber auch erhebliche Differenzen im Vergleich zu bisher bekannten zytosolischen Alanyl-Aminopeptidasen aus anderen humanen Geweben. Aufgrund dieser Unterschiede wurden unterschiedliche Namen für dieses Enzym vergeben. Allen bisher beschriebenen Enzymen gemeinsam sind deren Eigenschaften als Metallo- und Thiolpeptidasen, deren breite Substratspezifität sowie deren Monomercharakter. Sie reagieren sensitiv gegenüber dem Inhibitor Puromycin, wobei quantitative Unterschiede vorhanden sind. Die wichtigsten Differenzen wurden in der Aktivierung durch Metallionen und im pH-Optimum der Enzymaktivität festgestellt. Dies könnte auf eine funktionelle Anpassung der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase an die Funktion im jeweiligen Gewebe hinweisen.

Die hohe Sensitivität der charakterisierten zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase gegenüber Aminopeptidase N (APN)-Inhibitoren, wie Phebestin, Probestin oder RB3014, kann mit einer hohen Ähnlichkeit der katalytischen Motive beider Peptidasen erklärt werden. Da auch einige spezifische APN-Antikörper gegen die Struktur des aktiven Zentrums gerichtet sind, wurde auch eine Kreuzreaktivität derselben mit der zAAP aus der T-Zelllinie H9 gefunden. Während die bisher als spezifisch betrachteten APN-Inhibitoren wie Phebestin, Probestin und RB 3014 mit

gleicher Effektivität auch die zAAP hemmen, steht mit dem neuentwickelten Inhibitor PAQ-22 erstmals ein selektiver Inhibitor der zAAP zur Verfügung.

Die Expression der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase in peripheren T-Zellen konnte durch Mitogene wie PHA und PWM induziert werden. Diese aktivierungsabhängige Verstärkung der Expression wurde auf der mRNA-Ebene mit Hilfe der quantitativen RT-PCR-Technik bestimmt. Sie spricht für eine Rolle der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase in der Immunantwort. Die induzierbare Aktivierung des Enzyms konnte durch die Applikation verschiedener APN-Inhibitoren modifiziert werden. Der Effekt der Wirkung war dabei abhängig von den verwendeten Mitogen-Kombinationen.

Zusammenfassend leistet die vorliegende Arbeit einen Beitrag zum Verständnis der Expression, Regulation und Funktion von Aminopeptidasen im Rahmen der Immunantwort. Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der hohen Sensitivität der zAAP gegenüber den APN-Inhibitoren sind für künftige Einsätze dieser Substanzen in der pharmakologischen Therapie entzündlicher und Autoimmun-Erkrankungen von grundlegender Bedeutung.

---

## INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis.....	9
1 Einleitung .....	13
1.1 Proteolyse und Immunsystem .....	14
1.2 Klassifikation von Peptidasen .....	17
1.3 Aminopeptidasen .....	19
1.3.1 Zytosolische Aminopeptidasen.....	20
1.3.2 Zytosolische Aminopeptidasen und Immunsystem .....	22
2 Zielstellung der Promotionsarbeit .....	25
3 Material und Methoden .....	27
3.1 Zelllinien .....	27
3.2 Präparation der Aminopeptidase aus der H9-Zelllinie.....	28
3.2.1 Herstellung der zytosolischen Fraktion .....	28
3.2.2 Aktivitätsbestimmung der $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase .....	28
3.2.3 Chromatographische Trennmethoden.....	28
3.3 Identifikation.....	30
3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	30
3.3.2 Visualisierung .....	31
3.3.3 Massenspektrometrie .....	32
3.3.4 Protein-Blot und Immunologischer Nachweis .....	32
3.4 Biochemische Charakterisierung .....	34
3.4.1 Ermittlung der pH-Abhängigkeit .....	34
3.4.2 Untersuchung der Stabilität und der Haltbarkeit .....	36
3.4.3 Messung von Enzymaktivitäten.....	36
3.4.4 Bestimmung der Effektorenwirkung auf die Aminopeptidase- Aktivität.....	37
3.4.5 Methoden zur Ermittlung der enzymkinetischen Konstanten.....	38

---

3.4.6	Analyse der Spaltung von Peptiden mit Hilfe der Kapillarelektrophorese (CE).....	40
3.5	Bestimmung der mRNA-Expression in T-Zellen .....	41
3.5.1	Präparation mononukleärer Zellen und T-Zell-Anreicherung .....	41
3.5.2	Stimulation der T-Zellen.....	42
3.5.3	RNA-Isolation.....	42
3.5.4	Reverse Transkription.....	43
3.5.5	Quantitative RT-PCR.....	43
4	Ergebnisse .....	47
4.1	Isolation und Identifikation einer Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9 .....	47
4.1.1	Gelchromatographie mit Sepharose 6B. ....	47
4.1.2	Hydroxylapatit-Chromatographie .....	48
4.1.3	Ionenaustauscher mit Mono Q .....	50
4.1.4	Identifikation mittels Massenspektrometrie.....	53
4.2	Charakterisierung der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase der T- Zelllinie H9 .....	54
4.2.1	Bestimmung der Abhängigkeit der Ala-pNA hydrolysierenden Aktivität vom pH-Wert .....	54
4.2.2	Untersuchungen zur Stabilität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase.....	55
4.2.3	Substratspezifität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase und enzymkinetische Daten.....	57
4.2.4	Effektoren der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase .....	64
4.2.5	Einfluss von Ionen auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase.....	71
4.3	Immunreaktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase.....	75
4.4	Aktivierungsabhängige Expression der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase aus humanen Lymphozyten.....	76
4.4.1	Stimulation humaner T-Lymphozyten und Expression der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase .....	76

---

4.4.2	Modulation der mRNA-Expression der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase durch Amino-peptidase-Inhibitoren .....	77
5	Diskussion .....	81
5.1	Biochemischer Vergleich der identifizierten zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase aus der T-Zelllinie H9 mit denen aus anderen Geweben .	81
5.1.1	Monomer - Charakter der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase .....	83
5.1.2	Abhängigkeit der zytosolischen Amino-peptidase Aktivität vom pH- Wert.....	83
5.1.3	Zytosolische Alanyl-Amino-peptidase als thiolabhängige Protease.....	84
5.1.4	Die zAAP aus der humanen T-Zelllinie H9 ist eine Metalloprotease....	85
5.1.5	Einfluss unterschiedlicher Ionen auf die enzymatische Aktivität.....	86
5.1.6	Sensitivität gegenüber Puromycin. ....	87
5.1.7	Sensitivität gegenüber Amino-peptidase-Inhibitoren.....	88
5.1.8	Sensitivität gegenüber PAQ-22.....	89
5.1.9	Substratspezifität der isolierten zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase.....	90
5.1.10	Immunreaktivität der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase .....	92
5.2	Stimulationsabhängige Expression der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase in peripheren T-Lymphozyten.....	93
5.3	Funktion der zAAP .....	95
5.4	Zusammenfassende Diskussion .....	97
	Literaturverzeichnis .....	101



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2-ME	2-Mercaptoethanol
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
AK	Antikörper
Ala-pNA	Alanyl-p-Nitroanilid
Ala-βNA	Alanyl-β-Naphtylamid
AMC	4-Methyl-Coumaryl-7-Amid
AMV	“avian myeloblastic virus”
AP	Aminopeptidase
APA	Aminopeptidase A
APN	Aminopeptidase N
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
B-Zellen	B-Lymphozyten
β-NA	β-Naphtylamid
CCA	α-Cyano-4-Hydroxymizsäure
CCK	Cholecystokinin
CD	„cluster of differentiation“, Systematik der Oberflächenantigene humaner Leukozyten
CD3 <sup>+</sup> - Zellen	T-Zellen, Thymozyten
CD4 <sup>+</sup> -Zellen	T-Helferzellen
CD8 <sup>+</sup> -Zellen	zytotoxische T-Zellen

cDNA	komplementäre DNA
Con A	Concanavalin A (Lektin aus <i>Canavalia ensiformis</i> )
CTL	Zytotoxische CD8 <sup>+</sup> -T-Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
DPIV	Dipeptidylpeptidase IV
ds	doppelsträngig
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FCS	Fetales Kälberserum
FPLC	Niederdruck-Flüssigkeitschromatographie
Gly	Glyzin
Gly-pNA	Glyzyl-p-Nitroanilid
GRP	Gastrin-freisetzendes Peptid
γ-GT	γ-Glutamyltranspeptidase
HEPES	N-2-Hydroxymethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IAA	Iodacetamid
IFN-γ	Interferon γ
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IU	Internationale Einheit
kat	Katal, umgesetzte Stoffmenge (mol) pro Sekunde
kbp	Kilobase (10 <sup>3</sup> Basenpaare)
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
LAP	Leucyl-Aminopeptidase
Leu	Leucin
Leu-pNA	Leucyl-p-Nitroanilid
mAK	monoklonaler Antikörper

---

Met	Methionin
Met-pNA	Methionyl-p-Nitroanilid
MHC	„major histocompatibility complex“
MW	Mittelwert
MNZ	mononukleäre Zellen
MOLT-4	„human acute lymphoblastic leukemia cells“
MOPS	3-Morpholin-2-propansulfonsäure
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
NBT	Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid
NEP	Neutrale Endopeptidase (EC 24.11.)
NK-Zelle	Natürliche Killerzellen
n.s.	nicht signifikant
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAQ-22	3-(2,6-Diethylphenyl)-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> )-Chinazolinedion
PCMB	Para-Chloromercuribenzoat
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PHA	Phytohämagglutinin (Lektin aus <i>Phaseolus vulgaris</i> )
PHMB	Para-Hydroxymercuribenzoat
PHMS	Para-Hydroxymercuriphenylsulphonat
PIQ-22	2-(2,6-Diethylphenyl)-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-1,3-dion
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
Pro	Prolin
Pro-pNA	Prolyl-p-Nitroanilid
PSA	Puromycin Sensitive Aminoipeptidase; zAAP
PWM	„Pokeweed“ Mitogen, (Lektin aus <i>Phytolacca americana</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Trankription-Polymerase-Ketten-Reaktion

SD	Standardabweichung
SDF-1 $\alpha$	“stromal cell derived factor-1 $\alpha$ “
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAP	„transporter associated with antigen processing“
TGF- $\beta$	„transforming growth factor“- $\beta$
TNF- $\alpha$	„tumor necrosis factor“- $\alpha$
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T-Zellen	T-Lymphozyten
zAAP	zytosolische Alanyl-Aminopeptidase
ZAK	Ziege-anti-Kaninchen IgG
ZAM	Ziege-anti-Maus IgG

# 1 EINLEITUNG

Proteolytische Prozesse sind von zentraler Bedeutung für essentielle Lebensfunktionen. Sie bewirken nicht nur den Proteinabbau in den Zellen und Körperflüssigkeiten, sondern sind auch für die Regulation verschiedenster biologischer Prozesse unentbehrlich.

Um die Mengen und damit auch die Aktivitäten wichtiger Enzyme rasch dem Bedarf anzupassen, findet in der Zelle ein ständiger Abbau und eine Synthese von Proteinen statt. Die konstitutiven und induzierbaren Proteine unterliegen dabei spezifischen Regulationsmechanismen, wodurch unterschiedlicher Halbwertzeiten verschiedener Proteine zustande kommen. Von Schlüsselenzymen des Stoffwechsels beträgt die Halbwertzeit zum Teil nur einige Stunden.

Daneben stellen proteolytische Prozesse eine Form der posttranslationalen Modifikation dar. Sie findet bei allen Proteinen statt, wenn auch nur bei der proteolytischen Entfernung des Initiations-Methionins, kurz nachdem das Protein aus dem Ribosom austritt. Viele Proteine mit unterschiedlichsten biologischen Funktionen werden als inaktive Vorstufen (Propeptide) synthetisiert, die dann unter geeigneten Bedingungen durch eine gezielte Proteolyse aktiviert werden können. Verdauungsenzyme, die exogene Proteine hydrolysieren, werden als Propeptide im Magen und Pankreas synthetisiert. Die Blutgerinnung wird durch eine Kaskade von proteolytischen Aktivierungen vermittelt, die eine schnelle und wirksame Antwort auf Verletzungen gewährleistet. Einige Protein hormone werden als inaktive Vorstufen bereitgestellt. So entsteht beispielweise das Insulin durch proteolytische Entfernung eines Peptidfragments aus Proinsulin. Das faserförmige Protein Kollagen, das in Haut und Knochen vorkommt, leitet sich vom Prokollagen, einer löslichen Vorstufe, ab.

## 1.1 PROTEOLYSE UND IMMUNSYSTEM

In der letzten Zeit wird der Rolle von proteolytischen Prozessen im Immunsystem große Aufmerksamkeit gewidmet. Sie sind in allen Phasen der Immunantwort involviert. Das gilt sowohl für die Erkennungsphase (Antigenprozessierung und Präsentation), die Aktivierungsphase (z.B. Prozessierung von Transkriptionsfaktoren, Aktivierung und Prozessierung von Zytokinen) sowie die Effektorphase (z.B. Aktivierung des Komplementsystems, Apoptose der Zellen).

In der Antigenprozessierung spielen die intrazellulären Proteinabbausysteme eine wesentliche Funktion. Die Generierung der Peptidliganden für MHC-Klasse II wird von Lysosomen der Antigen-präsentierenden-Zellen (APZ) übernommen. Die APZ setzen sich aus Makrophagen, Dendritischen Zellen und B-Zellen zusammen, deren Gemeinsamkeit ist, dass sie Haupthistokompatibilitätsmoleküle der Klasse II (MHC-Klasse-II-Moleküle) exprimieren. Der klassische Weg für die MHC-Klasse-II Beladung beinhaltet die Aufnahme von exogenen Proteinen durch Phagozytose, Pinozytose oder Rezeptor-vermittelte Endozytose. Die entstandenen Vesikel verschmelzen dann mit den Lysosomen, in denen die Proteolyse durch Proteasen wie z.B. Cathepsin B, D, L und S stattfindet. Die Antigenbruchstücke werden im Anschluss auf das MHC-II-Molekül geladen und auf der Zelloberfläche der APZ präsentiert. Dort werden sie dann von CD4-T-Zellen erkannt [72,64].

MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf fast allen Zellen exprimiert. Der größte Teil der MHC-Klasse-I-Liganden stammt von endogenen Proteinen, die vom Proteasom, einen multikatalytischen Proteasekomplex, abgebaut werden. Die entstandenen Peptid-Liganden gelangen über den TAP-Transporter (Peptidtransporter) in ATP abhängiger Weise in das endoplasmatische Retikulum (ER), wo die MHC-Klasse-I Komplexe gebildet werden und wandern zur Zelloberfläche [32,43,51,45]. Dort werden die transportierten Peptide „geprüft“. Die Präsentation eines fremden z.B. viralen Peptids durch das MHC-Klasse-I Molekül gibt den CD8-Zellen ein Signal, das zur Zytolyse führt. Das Proteasom besitzt zusätzliche IFN- $\gamma$ -induzierbare  $\beta$ -Untereinheiten, die katalytisch aktiv sind und die konstitutiven Untereinheiten

ersetzen können. Dieses 20S Proteasom mit den IFN- $\gamma$  induzierbaren  $\beta$ -Untereinheiten wird als Immunoproteasom bezeichnet [21,152,125,48]. Es wird angenommen, dass im Falle einer Infektion das von den Zellen produzierte IFN- $\gamma$  den Austausch der  $\beta$ -Untereinheiten in neu synthetisierten Proteasomen bewirkt. Das gebildete Immunoproteasom moduliert dann die Immunantwort [146,27]. Obwohl die Hauptquelle der Peptidliganden für MHC-Klasse I Moleküle zwar das Proteasom ist, wird die Generierung der Peptidliganden von zytosolisch- und ER-lokalisierten Proteasen diskutiert [92,155,8].

Peptidasen auf der Zelloberfläche von Immun- und Endothelzellen spielen eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung, Proliferation, Differenzierung, Zell-Zell-Interaktion und Transformation der Zellen [46,110,7,77,86,80]. Manche dieser Peptidasen wurden als Differenzierungsantigene (CD-Antigene) auf der Zelloberfläche von Leukozyten identifiziert. So ist CD10 (CALLA, common acute lymphoblastic leukemia antigen) z.B. mit Neprilysin (NEP; [88]) identisch, CD13 mit der Aminopeptidase N (APN; [90]), CD26 mit der Dipeptidylpeptidase IV (DPIV; [150]), CD143 mit dem Angiotensin-konvertierenden Enzym (ACE; [30]), CD156a mit „A Disintegrin And Metalloproteinase 8“ (ADAM 8; [163]), CD156b mit ADAM 17 [24,38]. Auch andere Proteasen, wie die Carboxypeptidase M (CPM) auf der Zelloberfläche von Monocyten [120], die Aminopeptidase A (APA) auf B-Zellen (das Murine BP-1/6 C3 Antigen; [161,158]), die Aminopeptidase B auf aktivierten T-Zellen [20], die Aminopeptidase P auf Endothelzellen und aktivierten T-Zellen [78,52], werden auf Zellen des Immunsystems exprimiert.

Die Expression der Ektopeptidasen innerhalb des Immunsystems ist differenzierungs- und aktivierungsabhängig. Die Expression der APN (CD13) wurde beispielsweise auf sehr früheren Stammzellen (CD34-positiven Zellen), die sowohl Vorläuferzellen der lymphozytären als auch der myelo-monozytären Zellen sind, nachgewiesen. Im Verlauf der weiteren Zelldifferenzierung ist eine CD13-Immunreaktivität nicht nachweisbar, wird aber ab einem späteren Differenzierungsstadium auf Zellen der myelo-monozytären Linie wieder ausgebildet. Lymphozyten und von ihnen abgeleitete Zelllinien gelten als CD13 negativ [90,16,137]. Da die APN innerhalb des hämatopoetischen Systems ausschließlich in myelo-monozytären Zellen, Tumorzellen

dieser Abstammung sowie vereinzelt bei malignen Lymphozyten [90,16] nachgewiesen werden kann, dient CD13 neben anderen Markern gegen Oberflächenantigene (z.B. CD11c, CD14, CD15) als Marker zur Typisierung myelomonozytärer Zellen bzw. zur Charakterisierung maligner Erkrankungen.

Die Expression der Ektopeptidasen unterliegt einer selektiven Regulation durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone. So induzieren beispielsweise IL-4 und IL-13 die Expression von APN und DPIV, nicht aber die Expression von APA [69,124,153]. TNF- $\alpha$ , ein anderer Mediator, kann die Expression der Aminopeptidase A und DPIV herabregulieren, nicht aber die Expression von APN [69]. TGF- $\beta$ 1, ein multifunktionelles Zytokin, spielt eine Schlüsselrolle in der Funktion der DPIV [121,122]. Dieses Zytokin kann die Expression von DPIV herabregulieren, was zur Hemmung der DNA-Synthese, der Proliferation und der Produktion von immunostimulatorischen Zytokinen führt [6,14,67].

Die Peptidasen sind an der Modulation der Immunantwort durch proteolytische Aktivierung oder Inaktivierung von biologisch aktiven Peptiden beteiligt. Das hyper-tonisch wirkende Angiotensin II wird aus inaktivem Propeptid Angiotensin I durch ACE generiert. Auf der anderen Seite wird die chemotaktische Wirkung des Chemokins SDF-1 $\alpha$  nach der Prozessierung durch DPIV gehemmt [116].

In der Effektorphase der Immunantwort vermitteln Serinproteasen die zytotoxische Wirkung der aktivierten CD8 T- Lymphozyten [64]. Die aktivierten zytotoxischen T-Zellen und Killerzellen lösen in der Zielzelle Apoptose aus [72]. Dieses Apoptose-Signal aktiviert verschiedene Caspasen (Cysteinproteinasen), welche den intrazellulären Proteinabbau einleiten, ohne die zytoplasmatischen Komponenten freizusetzen [72].

Mehrere Serinproteasen gehören dem Komplementsystem an, welches an Zytolyse- und Phagozytoseprozessen mitwirkt [72].

Immer mehr Beweise sprechen dafür, dass sich die Dysregulation von proteolytischen Prozessen sich in Krankheitszuständen wie Entzündungen, Autoimmunerkrankungen, Krebserkrankungen, Blutgerinnungsstörungen, Wundheilungsstörungen und dem Bluthochdruck äußert [17,141,58,123,7,77].

Aufgrund der Vielzahl proteolytischer Prozesse innerhalb des Immunsystems ist das Ziel vieler aktueller Forschungsarbeiten die genaue Aufklärung der Funktion der zellulären Peptidasen im Immunsystem. Besondere Aufmerksamkeit wird der Interaktion proteolytischer Enzyme mit Zytokinen, Wachstumsfaktoren und innerhalb der Antigenprozessierung gewidmet. Daneben beschäftigen sich klinischen Studien mit der Rolle dieser Enzyme bei Lymphomen, Leukämien und entzündlichen Prozessen. Die Erkenntnisse über die Wirkungsweise der proteolytischen Prozesse und der daran beteiligten Enzyme bilden eine wichtige Grundlage für die Entwicklung von neuen diagnostischen [168] und therapeutischen Strategien [162,141,124,17,37].

## 1.2 KLASSIFIKATION VON PEPTIDASEN

Peptidasen (Proteasen) sind Enzyme, die eine hydrolytische Spaltung der Peptidbindungen in einem Protein- oder Peptid-Molekül katalysieren. Entsprechend der Nomenklatur der *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* werden Peptidasen in die Klasse der **Hydrolasen EC 3** eingeordnet [1]. Proteasen selbst sind unter der Bezeichnung EC 3.4. zu finden, die abhängig vom Ort der Wirkung und dem Mechanismus der Spaltung nomenklatorisch erweitert wird. Nach ihrem Angriffspunkt im Substratmolekül werden die proteolytischen Enzyme dabei in Endo- und Exopeptidasen unterteilt (siehe Abbildung 1).

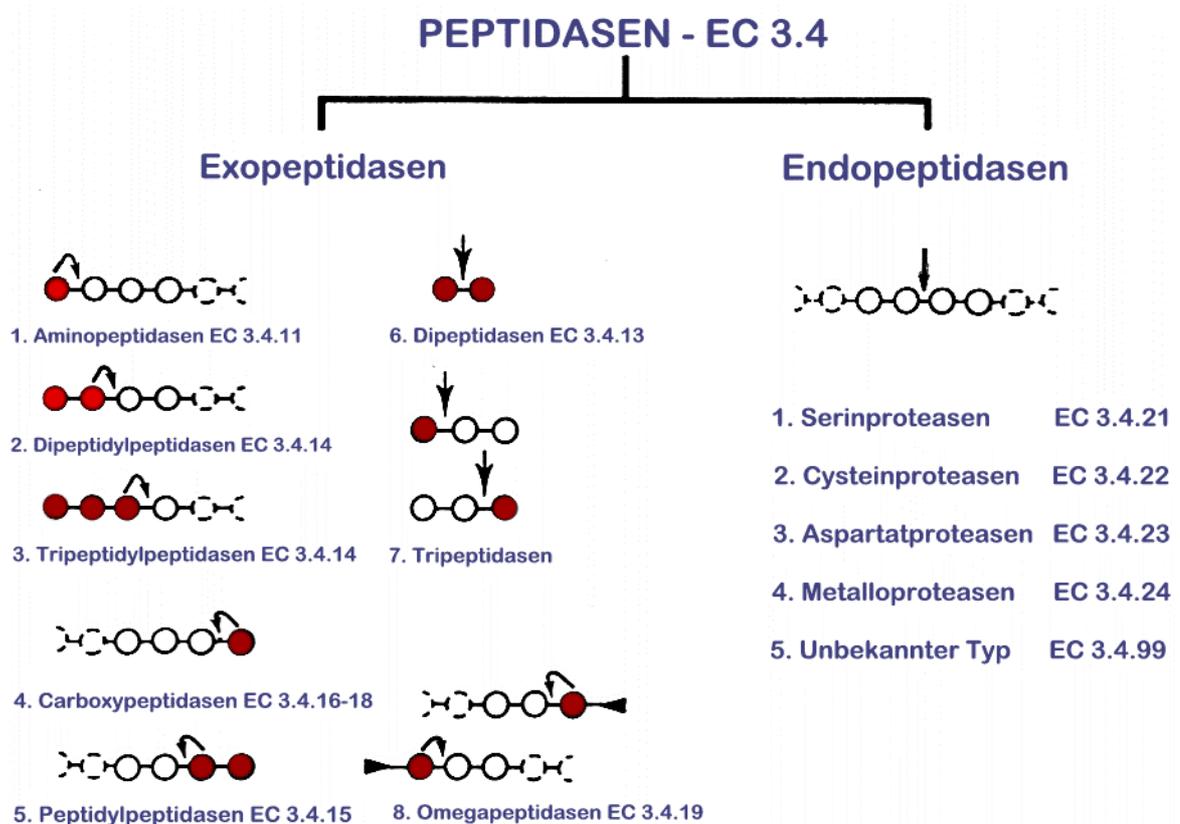


Abbildung 1: Klassifikation der Peptidasen [101].

Endopeptidasen oder Proteinasen spalten Peptidbindungen im Inneren von Proteinketten. Die Proteinase werden weiter nach dem Bau des aktiven Zentrums in Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteasen unterschieden.

Die Exopeptidasen hingegen greifen Peptide oder Proteine vom C- oder N-terminalen Ende der Peptidketten her an und werden nach ihren biochemischen Merkmalen wie Spaltungsort, Substrat, Reaktionsprodukt in Untergruppen (EC 3.4.11.n bis EC 3.4.19.n) geordnet. Peptidasen, die vom N-Terminus der Peptide- oder Proteinkette angreifen, nennt man Aminopeptidasen. Die Namen für Aminopeptidasen werden meistens nach der bevorzugt freigesetzten N-terminalen Aminosäure gebildet. So spaltet zum Beispiel die Leucyl-Aminopeptidase (LAP) bevorzugt Leucin und andere hydrophobe Aminosäuren von Peptiden oder anderen Substratanalogen ab. Nach

diesem Klassifikationsprinzip werden die Arginyl-, Methionyl-, Aspartyl-, Alanyl-, Glutamyl-, Prolyl- und Cysteinyl- Aminopeptidase beschrieben.

Neben dieser Klassifikation der Peptidasen existieren noch weitere, die auf der cDNA-Sequenz der Peptidasen, ihren Strukturdaten oder auf den im aktiven Zentrum befindlichen Aminosäuren basieren [119]. Entsprechend dieser Ordnung werden Peptidasen erst nach ihrem katalytischen Typ und dann in Familien von evolutionär eng verwandten Enzymen unterteilt.

- Serintyp – 22 Familien (S1-S22)
- Cysteintyp – 14 Familien (C1-C14)
- Aspartattyp – 2 Familien (A1-A2)
- Metallotyp – 25 Familien (M1-M25)
- Unbekannter Reaktionstyp – 21 Familien (U1-U21).

### 1.3 AMINOPEPTIDASEN

Aminopeptidasen kommen sowohl in tierischen als auch pflanzlichen Organismen vor. Man findet sie in vielen humanen Geweben auf der Zelloberfläche, in subzellulären Organellen, im Zytosol und in Körperflüssigkeiten [18,129].

Aminopeptidasen sind meistens Metallopeptidasen, die im aktiven Zentrum Zinkionen binden [147,148]. Die Zn-ligandierenden Metallopeptidasen, auch Zinkine genannt, besitzen dafür das Zn-bindende Motiv HEXXH. Die Zinkine werden weiter in Gluzincine (Clan MA) und in Metzincine (Clan MB) unterteilt [57]. Die Vertreter der Familie der Gluzincine ligandieren Zink über die zwei Histidin-Reste aus dem HEXXH-Motiv und einen Glutaminsäure-Rest, der außerhalb des Zn-bindenden Motivs verfügbar ist. Zu dieser Familie gehören u.a. die membranständige Alanyl-Aminopeptidase (APN), Arginyl-Aminopeptidase (APB) und Glutamyl-Aminopeptidase (APA).

Manche Aminopeptidasen ligandieren zwei Zinkionen im katalytischen Zentrum. Dazu gehören die Leucyl-Aminopeptidase (Clan MF, Familie M17) [18], die

Aminopeptidase P und die Methionyl-Aminopeptidase (Clan MG, Familie M24) [31,18].

### 1.3.1 ZYTOSOLISCHE AMINOPEPTIDASEN

Die folgenden Aminopeptidasen wurden bisher aus dem Zytosol humaner Gewebe beschrieben und charakterisiert:

- Leucyl-AP EC 3.4.11.1 [144,109,115,79,96,73,134];
- Arginyl-AP EC 3.4.11.6 [144,98,139,99,79,108];
- Alanyl-AP EC 3.4.11.14 [79,144,97,95,134,157,164];
- Aminopeptidase P EC 3.4.11.9 [31,140,154,126];
- Methionyl-Aminopeptidase EC 3.4.11.18 [13,89,91];
- Aspartyl-Aminopeptidase EC 3.4.11.21 [160].

Mantle und Mitarbeiter haben aus Niere, Gehirn und Skelettmuskeln den Menschen, zytosolische Aminopeptidasen isoliert, biochemisch charakterisiert und ihren Anteil in den Geweben bestimmt [94]. Demnach gehört der wesentliche Anteil der Amino-peptidasen-Aktivitäten der Alanyl-, Arginyl-, Leucyl- und Pyroglutamyl-Amino-peptidase (Tabelle 1).

Tabelle 1: Verteilung der löslichen Aminopeptidasen-Aktivitäten in humanen Geweben (nach Mantle [94]).

Gewebe	Gewebe Aktivität in %			
	Alanyl-AP	Arginyl-AP	Leucyl-AP	Pyroglutamyl-AP
Gehirn	80	15	1,5	3,5
Skelettmuskel	79	18	1,5	2,5
Niere	56	25	16	3

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Enzyme in den drei untersuchten Geweben ähnliche Eigenschaften aufweisen. Das Auftreten eines sogenannten

gleichen „Aminopeptidasen – Musters“ mit ähnlichen Eigenschaften, spricht für eine wesentliche Funktion der zytosolischen Aminopeptidasen beim zellulären Protein-Turnover. Die Charakteristika der wichtigsten zytosolischen Aminopeptidasen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Vergleich der Charakteristik der zytosolischen Aminopeptidasen (nach Mantle [94]).

<b>Eigenschaft</b>	<b>Alanyl-AP EC 3.4.11.14</b>	<b>Arginyl-AP EC 3.4.11.6</b>	<b>Leucyl-AP EC 3.4.11.1</b>	<b>Pyroglutamyl-AP EC 3.4.11.3*</b>
pH-Optimum	7,3	6,5	9,5	8,5
Molekularmasse	100 kDa	70 kDa	270 kDa	22 kDa
Bevorzugtes Substrat	breites Spektrum; Ala-AMC am besten.	Arg-AMC und Lys-AMC	Leu-AMC und Met-AMC	Pyroglutamyl-AMC
Peptid-Substrate	Leu- und Met-Enkephalin, CCK, Somatostatin, Vasopressin, Oxytocin, Angiotensin	Bradykinin, Proangiotsin	Leu-Enkephalin, Luliberin, Proctolin	Thyroliberin, Neurotsin, Luliberin
Aktivatoren	0,5 mM Ca <sup>+2</sup> ; teilweise durch andere Metallionen	0,15 M Cl <sup>-</sup> ; 5 mM Co <sup>+2</sup> ;	5 mM Mg <sup>+2</sup> ; 5 mM Mn <sup>+2</sup> ;	1 mM DTT; keine Aktivierung durch Metallionen
<b>Inhibitoren</b>	<b>IC50-Wert:</b>	<b>IC50-Wert:</b>	<b>IC50-Wert:</b>	<b>IC50-Wert:</b>
Bestatin	0,1-0,2 µM	0,1-2,0 µM	0,05-0,1 µM	keine Inhibition bei 100 µM
EDTA	0,5-1 mM	nicht bestimmt	nicht bestimmt	keine Inhibition
o-Phenanthrolin	nicht bestimmt	50-100 µM	5 mM	3-5 mM
Arphamenin B	keine Inhibition	10 nM	keine Inhibition	keine Inhibition
Puromycin	10-20 µM	2-3 mM	keine Inhibition	keine Inhibition
PHMS	0,1-0,2 mM	0,03-1 µM	keine Inhibition	nicht vorhanden

\* Gegenwärtig wird diese Peptidase als Omegapeptidase EC 3.4.19.3 klassifiziert [18].

In anderen Organen wurden bisher keine derartig komplexen Studien über die zytosolischen Aminopeptidasen durchgeführt. Daher ist nicht bekannt, ob das oben erwähnte Muster im Zytosol anderer Gewebe ebenfalls realisiert wird. Die grundlegenden Erkenntnisse können jedoch als Tendenz für weitere Studien dienen.

Insgesamt zeigt das ubiquitäre Vorkommen der zytosolischen Aminopeptidasen, dass diese Enzyme unentbehrlich für die Zelle sind. Die Funktion zytosolischer Aminopeptidasen wird dabei oft mit der intrazellulären Protein-Degradation und Zell-Zyklus-Kontrolle verbunden [147,148]. Die spezifischen Funktionen einzelner Aminopeptidasen sind aber meist ungeklärt. Nur für die Methionyl-Aminopeptidase konnte die wahrscheinliche, spezifische Funktion geklärt werden. Sie entfernt nach erfolgter Translation das Initiations-Methionin [147,12].

### 1.3.2 ZYTOSOLISCHE AMINOPEPTIDASEN UND IMMUNSYSTEM

Publikationen über Aminopeptidasen im Zytosol der Immunzellen liefern unvollständige bzw. kontroverse Informationen [73,117,118,156,47,40]. Die teilweise überlappende Substratspezifität dieser Enzyme erschwert die Abgrenzung gegenüber weiteren zellständigen Peptidasen mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften. Aufgrund der Heterogenität des zellulären Peptidasenspektrums wird durch die Messung der Aminoacyl-Hydrolyse nicht nur eine Peptidase erfasst. Besonders bei der Anwendung von Ala- und Leu-Substraten ist die Unterscheidung von Alanyl- und Leucyl-Aminopeptidase problematisch. Nur in wenigen Fällen konnten die Enzyme definitiv identifiziert und ausreichend biochemisch charakterisiert werden.

Als erste wurden Leucyl-Aminopeptidase-Aktivitäten im Zytosol von verschiedenen Leukozyten beschrieben [115,93,73,109]. Kohno und Kanno [74] zeigten dabei eine aktivierungsabhängige Induktion der Leu-pNA-hydrolysierenden Aktivitäten als Antwort auf PHA- und Concanavalin A-Stimulation von Lymphozyten auf. Aufgrund der Substrat-Spezifität und der Aktivierung durch Mn-Ionen konnten diese

Aktivitäten der Leucyl-Aminopeptidase (LAP) zugeschrieben werden. Nagaoka und Yamashita konnten die LAP nur in der Membran von polynukleären Leukozyten finden [105,106,107]. Smith und Folds wiesen intrazellulär in diesen Zellen die Leucyl-Aminopeptidase nach, jedoch war diese mit undefinierten zytoplasmatischen Strukturen verbunden [138]. Shah und Mitarbeiter [133] hingegen konnten Leucyl-Aminopeptidase-Aktivitäten in der Membran und in Lysosomen von Lymphozyten detektieren. Lundgren hat dann drei Isoformen der LAP in polynukleären Leukozyten beschrieben [93], wovon eine im Zytosol lokalisiert wurde. Die anderen Isoformen befanden sich intrazellulär, an Granula gebunden.

Auf die Existenz anderer zytosolischen Aminopeptidasen in den Zellen des Immunsystems haben erst Grdisa und Mitarbeiter aufmerksam gemacht, indem verschiedene Aminoacyl-Derivate verwendet wurden [156,47]. So konnte im Zytosol von Lymphozyten und Monozyten die Anwesenheit von mindestens zwei Aminopeptidasen und in polynukleären Leukozyten sogar von drei festgestellt werden [47]. Die Eigenschaften eines dieser Enzyme entsprachen denen der Arginyl-Aminopeptidase, nämlich die Bevorzugung von basischen Substraten und die Aktivierung durch Chloridionen. Die anderen Aminopeptidasen konnten keinem bekannten Enzym zugeordnet werden.

Murray und Mitarbeiter [70] berichteten von zwei Aminopeptidasen in der T-Zelllinie Jurkat, wovon eine die Arginyl-Aminopeptidase zu sein scheint. Die zweite war sensitiv gegenüber Amastatin, nicht sensitiv gegenüber Metallochelatoren, ließ sich nicht durch Chloridionen aktivieren und konnte keiner bekannten Aminopeptidase zugeordnet werden. Die Anwesenheit der Arginyl-Aminopeptidase konnte von Belhacene und Mitarbeiter bestätigt werden. Sie isolierten, identifizierten und charakterisierten dieses Enzym aus T-Zellen von gesunden Spendern und aus der T-Zelllinie Jurkat [20]. Die zytosolische Arginyl-Aminopeptidase unterliegt ähnlich der Leucyl-Aminopeptidase einer stimulationsabhängigen Induktion der Aktivitäten, was auf eine Beteiligung an Immunprozessen hinweist [20].

Mittels DEAE-Chromatographie haben Rautenberg und Mitarbeiter vier zytosolische Aminopeptidasen aus „buffy coats“ präpariert [117]. Die Anwesenheit der Arginyl- und Leucyl-Aminopeptidase konnte bestätigt werden. Es war jedoch nicht möglich,

die anderen zwei Enzyme zu identifizieren [40,117,118]. Später konnte eine andere Arbeitsgruppe die zytosolische Aminopeptidase P aus „buffy coats“ isolieren und charakterisieren [126].

Zwei zytosolische Aminopeptidasen wurden in der humanen myeloischen Zelllinie U937 von Erbeznik und Hersh [41] beschrieben. Mittels eines Antiserums gegen die Puromycin-sensitive-Aminopeptidase (PSA; zAAP) konnte diese Aminopeptidase mit einer Molekularmasse von 100 kDa identifiziert werden. Die andere Aminopeptidase, mit einer Molekularmasse von 200 kDa, reagierte erst nach Ammoniumsulfat-Behandlung positiv mit dem Antiserum. Beide Enzyme bevorzugten Ala-pNA als Substrat und zeigten Unterschiede bezüglich der Sensitivität gegenüber Inhibitoren wie z.B. Puromycin und Bestatin [41]. Es fehlt jedoch für beide Aminopeptidasen eine umfassende biochemische Charakterisierung.

Wex und Mitarbeiter [85,159] beschrieben eine Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität der T-Zelllinie H9, die zytosolisch lokalisiert war und in ihrer Substratspezifität der membranständigen Alanyl-Aminopeptidase (APN) ähnelte. Dieses unbekannte Enzym reagierte jedoch nicht mit dem spezifischen APN-Antikörpern WM15 [159].

Vor diesem Hintergrund erscheint klar, dass es einer umfassenden und systematischen Bestimmung der biochemischen, insbesondere der enzymkinetischen Charakteristika des gereinigten Enzyms bedarf, um die Natur der Aminopeptidase aus dem Zytosol humaner T-Zellen genau zu definieren.

## 2 ZIELSTELLUNG DER PROMOTIONSARBEIT

Die Struktur, Regulation und physiologische Funktion vieler Proteasen ist nur teilweise aufgeklärt. In der humanen T-Zelllinie H9 wurde eine neutrale Aminopeptidase-Aktivität nachgewiesen, deren bisherige biochemische Charakterisierung sie von anderen, bekannten Aminopeptidasen unterschied [103,159]. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der Identität des Enzyms und dessen umfassende biochemische Charakterisierung. Damit sollte ein Beitrag zur Erweiterung des Kenntnisstandes über Vorkommen und Funktion von Aminopeptidasen im Zytosol von Immunzellen geleistet werden. Im einzelnen waren die folgenden Teilaufgaben zu bearbeiten:

### **1. Molekulare Identifizierung der unbekannt humanen, zytosolischen Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9.**

Dabei sollte die Aminopeptidase unter Anwendung verschiedenster biochemischer Methoden gereinigt werden. Die molekulare Identifizierung des gereinigten Enzyms sollte dann mittels tryptischem Verdaus und Nutzung der Massenspektrometrie vorgenommen werden.

### **2. Charakterisierung der isolierten Aminopeptidase.**

Die folgenden Eigenschaften sollten näher charakterisiert werden:

- Substratspezifität
- Spaltungsfähigkeit von biologisch-aktiven Peptiden
- Einfluss von verschiedenen Metall-Ionen und Metallchelatoren auf die Aktivität
- Sensitivität gegenüber Aminopeptidasen-Inhibitoren
- pH-Abhängigkeit der hydrolysierenden Aktivität
- Wirkung von Thiolreagenzien auf die enzymatische Aktivität.

- Überprüfung der Kreuzreaktivität gegenüber kommerziell vorhandenen APN-Antikörpern.

### **3. Untersuchungen zur mRNA-Expression des identifizierten Enzyms**

Mit der molekularen Identifizierung der zytosolischen Aminopeptidase wurde die Voraussetzung getroffen, diese Peptidase auf dem Niveau der mRNA qualitativ und quantitativ zu erfassen. Die mRNA-Expression soll an peripheren T-Zellen unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden. Anhand dieser Untersuchungen kann eine mögliche Beteiligung dieser Aminopeptidase im Rahmen der Immunantwort näher bestimmt werden.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 ZELLINIEN

Die verwendete humane T-Zelllinie H9 wurde käuflich von der „European Collection of Cell Cultures“ (ECACC 85050301) erworben. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10% FCS und unter Zusatz von 2mM Glutamin sowie 60 IU/ml Penicillin (Gibco) bei 37°C, 97% relativer Luftfeuchte und 6% (v/v) CO<sub>2</sub> in einem Sterikult 200 (Firma Scientific) kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen (Falcon) unterschiedlicher Größe, wobei die Zellen mit einer Dichte von 500000 Zellen/ml eingesät wurden. Nach 3 Tagen erfolgte die Zellernte. Dazu wurden die Zellen nach der Zentrifugation (10 min; 500×g; Raumtemperatur) und dem Absaugen des Überstands jeweils zweimal in PBS aufgenommen und erneut zentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Zellpellet bei –80°C gelagert.

PBS-Puffer: 137 mM NaCl,  
2,7 mM KCl  
8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7,2

## 3.2 PRÄPARATION DER AMINOPEPTIDASE AUS DER H9-ZELLINIE

### 3.2.1 HERSTELLUNG DER ZYTOSOLISCHEN FRAKTION

Nach dem Auftauen der H9-Zellen wurde das Pellet in zwei Volumina 10 mM HEPES-Puffer (Gibco; pH 6,5) mit 0,2 mM  $MgCl_2$  und 2 mM DTT resuspendiert. Die entstandene Zellsuspension wurde mit Ultraschall (0°C; 5×20s; 30 W; Vibra-Cell, Sonics) homogenisiert und im Anschluss die zytosolische Fraktion durch eine Ultrazentrifugation (4°C; 100.000×g; 2 h; TL100, Beckmann) von den partikulären Bestandteilen getrennt. Die Reinheit der Fraktion wurde anhand der Bestimmung der  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidaseaktivität ( $\gamma$ -GT) kontrolliert. Der relative Anteil partikulärer Verunreinigungen im Zytosol hatte einen Wert von 5% nicht überschritten.

### 3.2.2 AKTIVITÄTSBESTIMMUNG DER $\gamma$ -GLUTAMYLTRANSPEPTIDASE

Die  $\gamma$ -GT, ein membrangebundenes Enzym, katalysiert den Transfer einer  $\gamma$ -Glutamylgruppe von Glutathion zur  $\alpha$ -Aminogruppe einer Akzeptoraminosäure. Die Bestimmung der  $\gamma$ -GT-Aktivität erfolgte analog zur Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität, wobei  $\gamma$ -Glutamyl-p-nitroanilid (Chemapol) als Substrat diente und Glyzyl-Glyzin als Akzeptormolekül fungierte. Die Messung und Berechnung erfolgte wie bei Grisk und Mitarbeitern [49] beschrieben.

### 3.2.3 CHROMATOGRAPHISCHE TRENNMETHODEN

Die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus H9-Zellen wurde chromatographisch unter Verwendung des FPLC-Systems (Bio-Rad) bis zur Homogenität gereinigt. Die dabei durchgeführten Reinigungsschritte, die alle bei 4°C durchgeführt wurden, sind nachfolgend aufgeführt. Nach jedem Reinigungsschritt wurden die Ala-pNA-

hydrolysierende Aktivität sowie die Proteinkonzentration (Bradford-Assay; Bio-Rad) des teilgereinigten Enzyms bestimmt.

### ***Gelfiltration über Sepharose 6B***

Eine 2,6×100 cm große Säule (Pharmacia) wurde mit Sepharose 6B (Pharmacia) gemäß Herstellerhinweisen gefüllt. Die Matrix wurde vor dem Probenauftrag mit Beladungspuffer (50 mM Phosphatpuffer; pH 6,5; 2 mM DTT)(vgl.3.4.1) gespült. Anschließend wurde die zytosolische Fraktion (max. Volumen 4 ml) blasenfrei auf die Sepharose appliziert. Die Trennung erfolgte bei einer Flußrate von 0,5 ml/min, sowie einer Fraktionsgröße von 5 ml über 16 Stunden. Der Elutionspuffer entsprach dem Beladungspuffer.

Der Proteingehalt der Fraktionen wurde fortlaufend durch Messung der Extinktion bei 280 nm ermittelt. Alle Fraktionen wurden auf das Vorhandensein von Ala-pNA-hydrolysierenden Aktivitäten untersucht (vgl. 3.4.3) und positive Proben hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität und Proteinkonzentration quantitativ analysiert.

### ***Chromatographie über Hydroxylapatit***

Eine 5 ml Säule mit Hydroxylapatit-Matrix Typ I wurde gemäß den Herstellerangaben (Bio-Rad) erstellt. Die von der Gelfiltration herrührenden positiven Fraktionen wurden vereinigt und im Beladungspuffer (50 mM Phosphatpuffer; pH 6,5; 2 mM DTT) auf die Säule appliziert. An die Hydroxylapatit-Matrix gebundene Proteine wurden mit einem Elutionspuffer (250 mM Phosphatpuffer; pH 6,5; 2 mM DTT) nach folgendem Schema eluiert:

1. linear steigende Elutionspufferkonzentration von 23 bis 27%;  
Flussrate 3 ml/min; Fraktionsgröße von 3 ml, 25 Minuten,
2. Elutionsschritt mit 100%igem Phosphatpuffer;  
Flussrate 3 ml/min; 3 Minuten.

Alle Fraktionen wurden auf das Vorhandensein Ala-pNA-hydrolysierender Aktivität (vgl. 3.4.3) untersucht und die positiven Fraktionen vereinigt.

### ***Trennung mittels Anionenaustauscher***

Die Matrix (MonoQ, Bio-Rad) wurde entsprechend den Herstellerangaben behandelt. Die teilgereinigten Proteinfractionen von der Hydroxylapaptit-Chromatographie wurden mittels YM30-Konzentratoren (Millipore) konzentriert und in den Beladungspuffer (50 mM Phosphatpuffer; pH 6,5; 2 mM DTT) umgepuffert. Das Konzentrat wurde auf die Mono Q – Säule (Bio-Rad; 2ml) appliziert und mit einem Säulenvolumen Beladungspuffer nachgespült. Die an den MonoQ-Anionenaustauscher gebundenen Proteine wurden mit stufenweise steigender Salzkonzentration nach folgendem Schema eluiert:

Stufe 1: 20% Elutionspuffer (50 mM Phosphatpuffer, 2 mM DTT, 0,35 M NaCl, pH 6,5): Flussrate: 3 ml/min, Zeit: 5 Minuten;

Stufe 2: 51% Elutionspuffer: Flussrate: 3 ml/min, Zeit: 6 Minuten, Fraktionsgröße: 1 ml;

Stufe 3: 100% Elutionspuffer: Flussrate: 3 ml/min, Zeit: 4 Minuten.

Es wurden Fraktionen mit höchsten Ala-pNA hydrolysierenden Aktivitäten während der zweiten Stufe gesammelt. Die Beurteilung der Effektivität der Reinigungsschritte erfolgte anhand der Bestimmung der spezifischen Aktivität (vgl. 3.4.3). Daraus errechnete sich der Reinigungsfaktor nach der Formel:

$$\text{Reinigungsfaktor} = \frac{\text{Spezifische Aktivität der gesammelten Fraktion}}{\text{Spezifische Aktivität des Ausgangsmaterials}}$$

## 3.3 IDENTIFIKATION

### 3.3.1 SDS-POLYACRYLAMID-GEL-ELEKTROPHORESE

Die elektrophoretische Auftrennung der isolierten Proteine erfolgte unter reduzierenden bzw. nichtreduzierenden Bedingungen in SDS-haltigen Polyacrylamid-Gelen.

*Proben:*

- 0,5 µg zAAP aus der T-Zelllinie H9;
- 0,5 µg APN aus humaner Niere (bereitgestellt von Thilo Kähne, Magdeburg);

*Probenvorbereitung für reduzierende Bedingungen:*

Die Proben wurden mit Laemmli-Probenpuffer (mit Zusatz von 5% 2-ME; Bio-Rad) 1:2 verdünnt, drei Minuten bei 95°C gekocht und dann auf Eis gestellt.

*Probenvorbereitung für nicht-reduzierende Bedingungen:*

Die Proben wurden mit nativen Probenpuffer (ohne Zusatz von 2-ME; Bio-Rad) 1:2 verdünnt.

20-25 µl der vorbereiteten Probe wurden je Spur auf das Gel appliziert. Die Auftrennung erfolgte dann im 4-12%igen (m/V) Bis-Tris-Gel (NuPAGE Gel, Novex) unter folgenden Bedingungen:

- Laufpuffer: MES-SDS (Novex); 100 mA pro Gel.

Zur Kontrolle der Elektrophorese und zur Größenbestimmung der detektierten Proteine wurde der Proteinmarker Mark 12 (Novex) verwendet. Je nach Aufgabenstellung wurden nach Beendigung der Elektrophorese die Proteine mit Coomassie Blue G-250 (vgl. 3.3.2.) bzw. mit einer Silberfärbung (vgl. 3.3.2) visualisiert oder im „semi-dry“-Blot-Verfahren auf Nitrozellulose transferiert (vgl. 3.3.4).

### 3.3.2 VISUALISIERUNG

*Coomassie-Färbung*

Die Coomassie-Färbung wurde unter Verwendung des „Colloidal Blue Stain Kits“ (Novex) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### *Silber-Färbung*

Die Silber-Färbung erfolgte unter Nutzung des „SilverXpress Kits“ der Firma Novex entsprechend dem Protokoll, welches für 1,0 mm starke Gele empfohlen wird.

### 3.3.3 MASSENSPEKTROMETRIE

Die zu untersuchende Proteinbande wurde nach Visualisierung mittels Silber-Färbung aus dem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten und das Gelstück in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mechanisch zerkleinert. Daran schlossen sich folgende Schritte an:

- Trypsin – Verdau (Boehringer Mannheim)
- Peptidextraktion durch Sonifikation ( Sonorex RK 156)
- Reinigung der Peptidfragmente mittels einer Reverse-Phase (R2)-Säule (Poros 50 R2; Perseptive Biosystem)
- Co-Kristallisation mit CCA in 70% Acetonitril auf einem SCOUT 384-MALDI-Target (Bruker Daltonic).

Die massenspektrometrische Analyse der Peptidfragmente erfolgte mittels eines MALDI-TOF-MS (Reflex III, Bruker Daltonics) im Reflektor Modus mit interner Kalibrierung. Die erhaltenen Peptidfragmentmassen wurden mit Hilfe der MASCOT Software (Matrix Science) mit der OWL-Datenbank verglichen. Ab dem tryptischen Verdau wurde die Analyse von T. Kähne durchgeführt.

### 3.3.4 PROTEIN-BLOT UND IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS

Nach der elektrophoretischen Auftrennung (vgl. 3.3.1) wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose Membran (PROTRAN 85; Schleicher & Schüll) unter Nutzung der „semi-dry transfer cell“ Apparatur (Bio-Rad), bei 30 V für 2 Stunden transferiert.

---

Kathodenpuffer:	5 ml Roti-Blot K (Roth)
	35 ml H <sub>2</sub> O dest.
	10 ml Methanol
Anodenpuffer:	5 ml Roti-Blot A (Roth)
	35 ml H <sub>2</sub> O dest.
	10 ml Methanol

### *Blockierung*

Die Membran wurde in 7,5% (w/v) entfettetem Milchpulver in PBS über Nacht bei 4°C blockiert und vor der Verwendung 3×10 Minuten in PBS unter starkem Schütteln bei Raumtemperatur gewaschen.

### *Kopplung des primären Antikörpers*

Es wurden die folgenden primären Antikörper verwendet:

- monoklonaler anti-CD13-Antikörper, Klon LeuM7 (Becton-Dickenson)
- monoklonaler anti-CD13-Antikörper, Klon WM15 (Crawley Down, England)
- polyklonales anti-APN-Kaninchen-Antiserum 7B (U. Lendeckel, Magdeburg; Immunisierung mit einem synthetischen Peptidfragment der Zn-bindenden Region der APN und anschließender Reinigung mittels Protein A-Affinitätschromatographie)

Die primären Antikörper bzw. das Antiserum wurden 1:2000 in PBS mit 0,03% Tween 20 (Roth) verdünnt und die Nitrozellulosemembran 90 Minuten unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde 3×10 Minuten in PBS mit 0,03% Tween 20 unter starkem Schütteln bei Raumtemperatur gewaschen.

### *Kopplung des sekundären Antikörpers*

Es wurden die folgenden sekundären Antikörper verwendet:

- Ziege-anti-Maus-IgG (ZAM), konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (Sigma)

- Ziege-anti-Kaninchen-IgG (ZAK), konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (Sigma)

Der ZAM-Antikörper wurde 1:500 und der ZAK-Antikörper 1:50 in PBS mit 0,03% Tween 20 verdünnt. Die Inkubation der Membran mit den Antikörperlösungen erfolgte bei Raumtemperatur für 45 Minuten. Es schlossen sich drei Waschschrirte (siehe oben) an.

#### *Nachweisreaktion*

Die Nachweisreaktion erfolgte bei 37°C mit NBT (0,66 mg/ml; Sigma) und BCIP (0,165 mg/ml; Sigma) in 10 ml Reaktionspuffer (0,1 M Tris/HCl; 0,1 M NaCl; 0,05 M MgCl<sub>2</sub>; pH 9,5). Zur Beendigung der Nachweisreaktion wurde die Membran 15 Minuten mit Wasser und dann mit TE-Puffer (10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0) gespült und im Anschluss getrocknet.

## 3.4 BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG

### 3.4.1 ERMITTLUNG DER pH-ABHÄNGIGKEIT DER ALA-PNA HYDROLYSIERENDEN AKTIVITÄTEN

Die Messungen Ala-pNA-hydrolysierender Aktivitäten der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase wurden in drei Puffersysteme, im pH-Bereich von 5,0 bis 9,0 durchgeführt.

**Phosphatpuffer** mit Zusatz von 2mM DTT; pH-Bereich von 6,0 bis 8,0.

50 mM Phosphatpuffer: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; das Mischungsverhältnis wurde von Harris entnommen [50]

- pH 6,0; 6,15 Teile von 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> wurden mit 43,85 Teilen von 0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> gemischt und verdünnt..
- pH 6,5; 13,25 Teile von 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> wurden mit 36,75 Teilen von 0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> gemischt und verdünnt.

- pH 7,0; 30,5 Teile von 0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  wurden mit 19,5 Teilen von 0,5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  gemischt und verdünnt.
- pH 7,5; 40,5 Teile von 0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  wurden mit 9,5 Teilen von 0,5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  gemischt und verdünnt.
- pH 8,0; 47,35 Teile von 0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  wurden mit 2,65 Teilen von 0,5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  gemischt und verdünnt.

**50 mM Tris-HCl-Puffer** mit Zusatz von 2mM DTT; pH-Bereich von 7,5 bis 9,0 [71].

- pH 7,5 ; 40,6 ml 0,1M HCl wurde 25 ml 0,2M Tris hinzugefügt und mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100ml aufgefüllt.
- pH 8,0 ; 28,9 ml 0,1M HCl wurde 25 ml 0,2M Tris hinzugefügt und mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100ml aufgefüllt.
- pH 8,5 ; 15,0 ml 0,1M HCl wurde 25 ml 0,2M Tris hinzugefügt und mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100ml aufgefüllt.
- pH 9,0 ; 6,0 ml 0,1M HCl wurde 25 ml 0,2M Tris hinzugefügt und mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 100ml aufgefüllt.

**50 mM Citrat-Phosphat-Puffer** mit Zusatz von 2mM DTT; pH-Bereich 5,0 - 7,0 [71].

- pH 5,0; 48,5 Teile von 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  wurden mit 43,1 Teilen 0,1 M Citronensäure gemischt und verdünnt.
- pH 5,5; 56,9 Teile von 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  wurden mit 43,1 Teilen 0,1 M Citronensäure gemischt und verdünnt.
- pH 6,0; 63,2 Teile von 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  wurden mit 43,1 Teilen 0,1 M Citronensäure gemischt und verdünnt.
- pH 6,5; 71,0 Teile von 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  wurden mit 43,1 Teilen 0,1 M Citronensäure gemischt und verdünnt.
- pH 7,0; 82,4 Teile von 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  wurden mit 43,1 Teilen 0,1 M Citronensäure gemischt und verdünnt.

### 3.4.2 UNTERSUCHUNG DER STABILITÄT UND DER HALTBARKEIT

Der Einfluss von 2 mM DTT auf die Stabilität der Aminopeptidase-Aktivität wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden bei 4°C untersucht. Als Kontrolle dienten Proben ohne DTT-Zusatz. Nach Ablauf der Reaktionszeit erfolgte eine Bestimmung der Ala-pNA-hydrolysierenden Aktivität (vgl. 3.4.3).

Das gereinigte Enzym wurde in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,5) mit 2 mM DTT bei -70°C; -20°C und 4°C, mit und ohne Zusatz von 20% Glycerol aufbewahrt. Nach 7 bzw. 26 Tagen erfolgte eine Bestimmung der Enzymaktivitäten (vgl. 3.4.3).

### 3.4.3 MESSUNG VON ENZYMAKTIVITÄTEN

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Aminopeptidase erfolgte anhand der hydrolytischen Spaltung des chromogenen Substrates Ala-pNA (Sigma). Dabei wurde eine Endpunktmessung des freigesetzten p-Nitroanilins bei 390 nm (molarer Extinktionskoeffizient  $11,5 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ ) am Spektrophotometer Spekol 21 (Carl Zeiss Jena, Küvettenstärke 1 cm) vorgenommen. Zu jeweils 100 µl Probe in 50 mM Phosphatpuffer (50 mM MOPS/NaOH, zytosolische Fraktion in 10 mM HEPES-Puffer) mit Zusatz von 2 mM DTT, wurden 100 µl einer 5 mM Alanyl-p-Nitroanilid-Lösung in 50 mM Phosphatpuffer gegeben. 100 µl des erhaltenen Reaktionsansatzes wurden für 30 bis 120 Minuten bei 37°C unter leichtem Schütteln (Thermomixer 5436, Eppendorf) inkubiert, wonach die Reaktion durch Zugabe von 400 µl 1 M Acetatpuffer (pH 4.2) beendet wurde. Entsprechend wurde die spontane Hydrolyse des Ala-pNA in 50 mM Phosphatpuffer in der jeweiligen Reaktionszeit bestimmt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation (6000×g, Raumtemperatur, Biofuge 13, Heraeus) wurde die Extinktion des Überstandes bei 390 nm gemessen. Die Extinktionsdifferenz  $\Delta E$  wurde durch Subtraktion des nach 0 Minuten Reaktionszeit

erhaltenen Extinktionswertes  $\Delta E_0$  vom Extinktionswert  $\Delta E_t$  nach 30-120 Minuten Inkubation errechnet. Die Aminopeptidase-Aktivität A nach der folgenden Formel berechnet:

$$A = \frac{\Delta E \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot t \cdot v}$$

A = Aminopeptidase-Aktivität [kat/ml]

V = Ansatzvolumen [ml]

$\Delta E$  = Extinktionsdifferenz

t = Reaktionszeit [s]

v = Probenvolumen [ml]

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

$\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient des p-Nitroanilins [ $\text{cm}^2/\text{mol}$ ]

Neben Ala-pNA wurde H-Met-pNA (Bachem), L-Leu-pNA (Sigma), L-Arg-pNA (Sigma), L-Pro-pNA (Sigma) und Gly-pNA (Sigma) mit einer Konzentration von jeweils 2,5 mM eingesetzt. Die Bestimmung erfolgte analog wie für Ala-pNA.

#### 3.4.4 BESTIMMUNG DER EFFEKTORENWIRKUNG AUF DIE AMINOPEPTIDASE-AKTIVITÄT

Zur Charakterisierung der Aminopeptidase-Aktivität im Zytosol der H9-Zellen wurden Aminopeptidasen-Effektoren in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt:

*Aminopeptidase-Inhibitoren:* RB 3014 (bereitgestellt von B.P.Roques, Paris), Phebestin (Serva), Puromycin (Serva), Actinonin (Serva), Probestin (bereitgestellt von T.Aoyagi, Tokio), Bestatin (Serva), PAQ 22 (bereitgestellt von Y. Hashimoto, Tokio): von 1 nM bis 1 mM;

*EDTA* (Merck): von 0,1  $\mu\text{M}$  bis 1 mM;

*o*-Phenanthrolin (Sigma): von 1  $\mu$ M bis 10 mM;

Iodacetamid (IAA, Sigma) von 0,1  $\mu$ M bis 0,1 M; für diese Untersuchung wurde zAAP ohne Zusatz von Thiolreagentien isoliert und in PBS Puffer pH 8,0 (siehe 3.1) umgepuffert.

DTT (Roth): von 1 bis 50 mM; für diese Untersuchung wurde zAAP ohne Zusatz von Thiolreagentien isoliert.

Kationen: 0,1 mM und 1mM;

Chloridionen: von 0,05 bis 1 mM.

Alle Effektoren wurden mit der jeweiligen Probe bei 37°C 15 Minuten vorinkubiert und anschließend wurde die Aminopeptidase-Aktivität bestimmt (vgl.3.4.3).

Als Kontrolle diente zAAP aus der T-Zelllinie H9 (bzw. APN aus humaner Niere, bereitgestellt von T. Kähne, Magdeburg) ohne Zusatz von Effektoren, deren Aktivität als 100 % angenommen wurde.

Die verwendeten Puffersysteme: 50 mM Phosphatpuffer, 2 mM Zusatz von DTT, pH 6,5; 50 mM MOPS/NaOH, 2 mM Zusatz von DTT, pH 6,5; PBS, pH 8,0.

### 3.4.5 METHODEN ZUR ERMITTLUNG DER ENZYMKINETISCHEN KONSTANTEN

Unter definierten Reaktionsbedingungen sind die Größen  $K_m$  und  $V_{max}$  der Michaelis-Menten-Kinetik charakteristische Konstanten für das jeweilige Enzym.  $K_m$  ist ein Maß für die Substrataffinität des jeweiligen Enzyms und  $V_{max}$  bezeichnet die maximal mögliche Reaktionsgeschwindigkeit. Zur experimentellen Bestimmung dieser Konstanten wurden Messungen der Reaktionsgeschwindigkeit der enzymkatalysierten Reaktion in Abhängigkeit von der Substratkonzentration durchgeführt. Für diese Untersuchung wurden unterschiedliche Konzentrationsbereiche benötigt. Ala-pNA wurden im Bereich von 0,025-1,50 mM und Met-pNA im Bereich von 0,002 bis 0,4 mM im Reaktionsgemisch eingesetzt. Arginin-pNA und Leucin-pNA mussten in niedrigeren Substratkonzentrationen von 0,004-0,2 mM (Arg-pNA) bzw.

0,001-0,06 mM (Leu-pNA) untersucht werden, da der Sättigungsbereich schneller erreicht wurde.

Zur Messung wurden 0,9 ml des gereinigten Enzyms (0,56 µg pro Ansatz) zunächst 2 Minuten bei 37°C präinkubiert und anschließend 0,1 ml des entsprechenden Substrates in der jeweiligen Konzentration zugesetzt. Innerhalb von 5 Minuten wurde der Umsatz des Substrates bei 37°C mit Hilfe eines Spektrophotometers (Cary 100, Varian) ermittelt. Die Berechnung der Enzymaktivitäten erfolgte mittels des molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  des para-Nitroanilins, der bei einer Wellenlänge von 390 nm  $11,5 \times 10^6 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$  beträgt.

Zur Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) wurde die graphische Methode nach Lineweaver-Burk verwendet, der eine Linearisierung der Michaelis-Menten-Gleichung zugrunde liegt.

Michaelis-Menten-Gleichung:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$V$  = die Geschwindigkeit einer Enzymreaktion

$V_{\max}$  = die maximale Geschwindigkeit der Reaktion bei hohen Substratkonzentrationen

$K_m$  = Michaelis-Menten Konstante

$[S]$  = Substratkonzentration

Durch Umformung der Michaelis-Menten-Gleichung in ihre reziproke Form entsteht die Gleichung:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Das Auftragen der reziproken Reaktionsgeschwindigkeit ( $1/V$ ) gegen den reziproken Wert der Substratkonzentration ( $1/[S]$ ) ergibt eine Gerade, die der allgemeinen Form

$y = ax + b$  gehorcht, wobei  $a$  die Steigung und  $b$  den Schnittpunkt mit der Ordinate ausdrückt.

Dabei ist:

$$\frac{1}{V} = y; \frac{1}{[S]} = x; \frac{K_m}{V_{\max}} = a; \frac{1}{V_{\max}} = b$$

Daraus ergibt sich für  $K_m$  und  $V_{\max}$ :

$$\frac{1}{b} = V_{\max} \quad \text{und} \quad \frac{a}{b} = K_m$$

Die Maximalgeschwindigkeit geteilt durch die Enzymkonzentration  $[E_0]$  ergibt die Katalysekonstante [130].

$$\frac{V_{\max}}{[E_0]} = k_{\text{cat}}$$

### 3.4.6 ANALYSE DER SPALTUNG VON PEPTIDEN MIT HILFE DER KAPILLARELEKTROPHORESE (CE)

*Eingesetzte Peptide:* MK-Bradykinin (Bachem), Tuftsin (Bachem), CCK(3-8) (Bachem), GRP(14-27) (Bachem). Das humane Interleukin-2 (IL-2), Met-Interleukin-2 (Met-IL-2), HIV-1 Tat (1-9) und das Peptidfragment Val-Lys-Pro-Phe-Tyr wurden von J.Faust und K.Neubert (Halle) synthetisiert.

Der Reaktionsansatz bestand aus 3  $\mu\text{l}$  (60  $\mu\text{kat}$  pro Ansatz) gereinigter Aminopeptidase aus der H9-Zelllinie und 2  $\mu\text{l}$  einer Lösung (1 mM) des jeweiligen Substrates. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 37°C. Parallel dazu wurden Kontrollproben ohne das Enzym angesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  30 mM Phosphorsäure mit internem Standard (500  $\mu\text{M}$  His) gestoppt, die Proben 4 min bei 14000 $\times$ g zentrifugiert und der Überstand vom Sediment getrennt. Der Reaktionsansatz wurde dann mittels Kapillarelektrophorese (Biofocus, Bio-Rad)

analysiert. Die Kapillare (24 cm Länge, 25 µm Innendurchmesser, Bio-Rad) wurde mit 0,1 M Phosphatpuffer und mit linearem Polymer (Bio-Rad) gefüllt. Die aufbereiteten Proben wurden unter Druck in die Kapillare injiziert und bei einer elektrischen Spannung von 14kV getrennt. Die Absorption der Produkte wurde bei 200 nm detektiert. Die entstandenen Produkt-„Peaks“ wurden für jedes Substrat gegen die Kontrollprobe ausgewertet und als relative Werte dargestellt. Als signifikant wurde eine relative Spaltungsrate von über 10% angenommen.

Die Kapillarelektrophorese nach der Peptidspaltung wurde in Zusammenarbeit mit S. Wrenger durchgeführt.

### 3.5 BESTIMMUNG DER MRNA-EXPRESSION IN T-ZELLEN

#### 3.5.1 PRÄPARATION MONONUKLEÄRER ZELLEN UND T-ZELL-ANREICHERUNG

Mononukleäre Zellen wurden durch Dichtegradienten-Zentrifugation aus heparinisiertem Blut gesunder Spender erhalten [23]. Von diesen Zellen erfolgte im Anschluss die Präparation peripherer T-Zellen mittels Nylon-Adhärenz-Technik [66]. Die Reinheit der Zellpopulation wurde durch eine FACS-Analyse verifiziert. Der Anteil der CD3-positiven Zellen sollte mehr als 92% der Gesamtzellzahl betragen. Die angereicherten T-Zellen wurden in AIM-V-Medium (Gibco) supplementiert mit 10% (v/v) FCS (Gibco) und 60 IU Penicillin/ml (Gibco), über Nacht bei 37°C, 97% Luftfeuchtigkeit, 6% CO<sub>2</sub> in einem Sterikult 200 inkubiert (Forma Scientific) und danach für die jeweiligen Versuche eingesetzt.

### 3.5.2 STIMULATION DER T-ZELLEN

Die T-Zell-Stimulantien wurden in den folgenden Endkonzentrationen im Kulturmedium verwendet:

PMA (Sigma)	10 ng/ml
PHA-L (Roche Diagnostics)	1 µg/ml
PWM (Serva)	2 µg/ml

Die Stimulation wurde sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit der folgenden APN-Inhibitoren durchgeführt:

Actinonin (Serva)	10 µM
Leuhistin (Sigma)	10 µM
RB 3014 (bereitgestellt von B.R.Roques, Paris)	0,1µM.

Jeweils  $10 \times 10^6$  Zellen/well ( $3 \times 10^6$  Zellen/ml Medium) wurden in Zellkultur-Platten (Nunc) 24 Stunden bei 37°C, 97% relativer Luftfeuchte und 6% (V/V) CO<sub>2</sub> in einem Sterikult 200 (Forma Scientific) inkubiert.

Die quantitative Bestimmung der IL-2-mRNA-Gehalte (vgl. 3.5.5) von ruhenden und aktivierten T-Lymphozyten diente der Kontrolle der T-Zell-Aktivierung. In allen Experimenten überstiegen die IL-2-mRNA-Gehalte 24 Stunden nach Aktivierung die der ruhenden Zellen um mindestens das 100fache.

### 3.5.3 RNA-ISOLATION

Die Präparation totaler RNA aus Zelllinien erfolgte unter Verwendung des RNeasy-Mini-Kits der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden  $2 \times 10^7$  Zellen eingesetzt, die nach der Ernte mindestens einmal in PBS gewaschen wurden. Die erhaltene RNA wurde mit DNase für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend einer erneuten Reinigung mit Hilfe der RNeasy-Zentrifugationssäulen unterzogen. Die Quantifizierung der erhaltenen DNA-freien totalen RNA erfolgte spektrophotometrisch am GeneQuant (Pharmacia). Der Quotient aus der OD<sub>260</sub> und

OD<sub>280</sub> war bei allen RNA-Präparationen zwischen 1,8 und 2,05. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

#### 3.5.4 REVERSE TRANSKRIPTION

Für die nachfolgende enzymatische Amplifikation (RT-PCR) wurden 1 µg DNA-freie totale RNA mit Hilfe von AMV Reverser Transkriptase und random-hexameren Oligonukleotiden in Erststrang-cDNA umgeschrieben.

Ein typischer Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

1 µg RNA	
2 µl random-hexamere Oligonukleotide	(0,5 µg/µl, Roche Diagnostics)
1 µl RNase-Inhibitor aus humaner Plazenta	(40 U/µl, Ambion)
2 µl AMV reverse Transkriptase	(15 U/µl, Stratagene)
2 µl dNTP	(je 25 mM, InViTec)
4 µl 5× Reaktionspuffer	(Stratagene)
MilliQ-Wasser ad 20 µl	

Alle Komponenten wurden zunächst 45 Minuten bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA-Reaktionsmischung für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und dann auf Eis gestellt. Die Erststrang-cDNA wurde bis zur Verwendung in der PCR bei -20°C gelagert.

#### 3.5.5 QUANTITATIVE RT-PCR

Zur quantitativen Bestimmung der Kopienzahl spezifischer mRNA mittels RT-PCR wurde der Lightcycler LC24 (Idaho Technology) verwendet. Der Lightcycler erlaubt die direkte Quantifizierung von PCR-Produkten sowie der für die PCR verwendeten Ausgangsmengen von „template“-cDNA. Dabei wird über die periodische Bestimmung der Fluoreszenzintensität des dsDNA-spezifischen Farbstoffes SYBR™Green der Zuwachs an PCR-Produkt in Abhängigkeit von der Zeit 35 PCR-

Zyklen gemessen. Durch die zugehörige Software wird nachfolgend die Ausgangsmenge „template-mRNA“ kalkuliert. Die PCR wurde in verschließbaren Glaskapillaren (Idaho Technology) und in einem Reaktionsvolumen von 10 µl durchgeführt.

Ein typischer Reaktionsansatz hatte die folgende Zusammensetzung:

1 µl cDNA

1 µl 2 mM dNTP (MBI Fermentas)

1 µl INViTaq (0,4 units, Invitrogen)

1 µl 10×Reaktionspuffer (10 mM MgCl<sub>2</sub>, Idaho Technology)

0,3 µl SYBR™Green I (1:1000)

1 µl Primer\* (je 5 µM) (BioTeZ)

MilliQ-Wasser ad 10 µl.

\* Primer:

zAAP: forward 5`- AGGTGCGCTATGCTGCTGTA

reverse 5`- TTGCGTTAGAGGTTGCTGCT und

für die Kontrolle der T-Zell-Aktivierung:

IL-2: forward 5`-ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTT

reverse 5`- GTCAGTGTTGAGATGATGCTTTGAC

Das Amplifikationsprotokoll setzte sich aus folgenden Teilprogrammen zusammen:

Anfangsdenaturierung                      95°C; 2 Minuten

35 Zyklen:

    Primerhybridisierung                  60°C ; 30 Sekunden

    Primerverlängerung                    72°C; 30 Sekunden

    Denaturierung                          95°C; 30 Sekunden

Finale Verlängerung:

    Primerhybridisierung                  60°C ; 30 Sekunden

    Primerverlängerung                    72°C; 5 Minuten

Schmelzkurve

Anstieg von 72°C auf 95°C, 5 Minuten;  
kontinuierliche Messung der Fluoreszenz

---

Die Auswertung verschiedener Stimulationsexperimente erfolgte durch den Vergleich der mRNA-Gehalte mit Hilfe des Anova-Testes, wobei ein p-Wert von  $<0,05$  als statistisch signifikant angesehen wurde.



## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 ISOLATION UND IDENTIFIKATION EINER AMINOPEPTIDASE AUS DER T-ZELLINIE H9

Die Isolierung der unbekanntes zytosolischen Aminopeptidase mit Ala-pNA hydrolysierender Aktivität aus der T-Zelllinie H9 erfolgte chromatographisch in drei Schritten unter Nutzung eines FPLC-System. Diese Schritte waren im Einzelnen: Gelchromatographie über Sepharose 6B, Ionenaustausch-Chromatographie über Hydroxylapatit und über einen starken Anionenaustauscher (Mono Q).

#### 4.1.1 GELCHROMATOGRAPHIE MIT SEPHAROSE 6B.

Die gewonnene zytosolische Fraktion von  $0,88 \times 10^9$  H9-Zellen wurde in der Gelfiltrationschromatographie über Sepharose 6B aufgrund ihrer Proteingröße aufgetrennt. Das Elutionsprofil mit den korrespondierenden Ala-pNA-hydrolysierenden Aktivitäten zeigte (Abbildung 2), dass das gesuchte Protein sich in einer heterogenen Proteingruppe befindet. In diesem Reinigungsschritt wurde das Enzym um den Faktor 1,6 mit einer 54%igen Aktivitätsausbeute angereichert (siehe Tabelle 3).

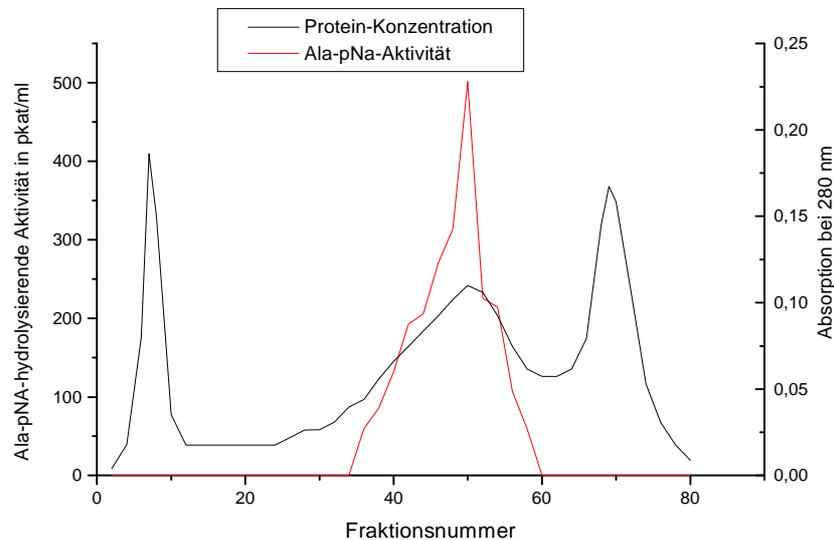


Abbildung 2: Diagramm der chromatographischen Trennung der Alanyl-Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9 mittels Sepharose 6B. Es wurde der Verlauf der Ala-pNA-hydrolysierenden Aktivität in den Fraktionen zusammen mit dem Verlauf der Proteinkonzentration dargestellt.

#### 4.1.2 HYDROXYLAPATIT-CHROMATOGRAPHIE

Die unterschiedliche Adsorptionsfähigkeit zytosolischer Proteine an Hydroxylapatit wurde genutzt, um das Ala-pNA-hydrolysierende Enzym weiter zu reinigen. Die in den Fraktionen gemessenen Ala-pNA-hydrolysierenden Aktivitäten wurden in das Protein-Elutionsprofil integriert. In Abbildung 3 wurde das Beladungs- und Elutionsprofil dieses Schrittes dargestellt (für Einzelheiten siehe 3.2.3). Wie in der Abbildung ersichtlich ist, befanden sich die Fraktionen mit Ala-pNA-hydrolysierender Aktivität im Bereich von 23 bis 27% des Elutionspuffers (entspricht 57,5 bis 67,5 mM Phosphatpuffer).

Es wurde eine Anreicherung des Proteins um den Faktor 44,3 bei einer, bezogen auf die Ausgangsmenge, 48%igen Aktivitätsausbeute mit diesem Reinigungsschritt erreicht (vgl. Tabelle 3).

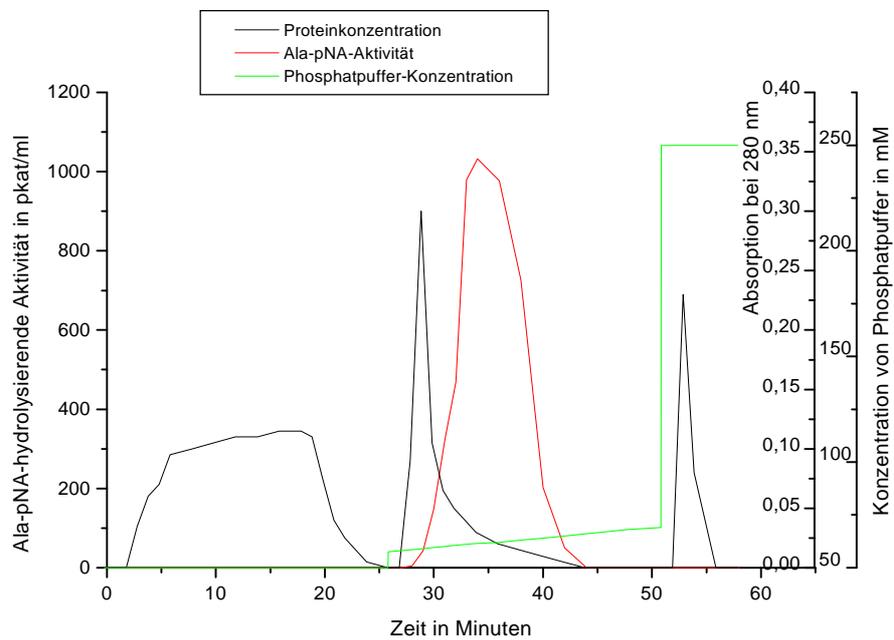


Abbildung 3: Profil der chromatographischen Trennung mittels Hydroxylapatit. Neben der Darstellung der Aktivität des Enzyms in den Fraktionen, wurde der Verlauf der Proteinkonzentration in Bezug zur ansteigenden Konzentration des Phosphatpuffers dargestellt.

## 4.1.3 IONENAUSTAUSCHER MIT MONO Q

Die im vorherigen Schritt (4.1.2) teilgereinigten Proteine wurden an eine starke Anionenaustauschermatrix (Mono Q) gebunden und mit einer stufenweise steigenden Konzentration von NaCl eluiert. Das Protein mit der Ala-pNA-hydrolysierenden Aktivität konnte dabei vollständig bei einer Salzkonzentration von 0,175 M isoliert werden (Abbildung 4). Durch diesen Schritt wurde das Enzym um den Faktor 777 angereichert, bei einer Aktivitätsausbeute von 16,5% (Tabelle 3).

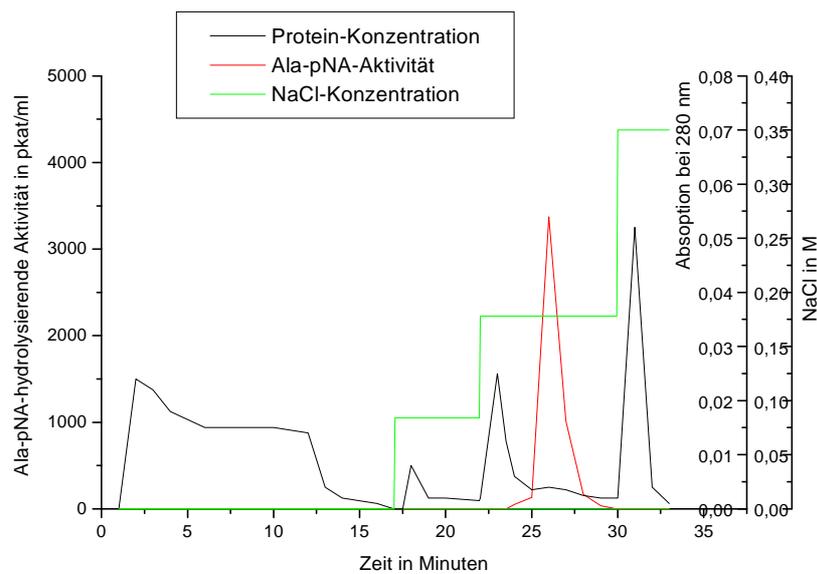


Abbildung 4: Darstellung des Verlaufes der chromatographische Trennung der Alanyl-Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9 mittels starkem Anionenaustauscher im Bezug zur NaCl-Konzentration.

Das gesamte Reinigungs-Protokoll für das Ala-pNA-hydrolysierende Protein der T-Zelllinie H9 wurde mit den einzelnen Teilschritten und den erzielten Ergebnissen in der Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Reinigungs-Protokoll der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase aus der 0,88 Mrd H9 T-Zellen.

Isolationsschritt	Protein in mg	Aktivität in nkat	Spezifische Aktivität in nkat/mg	Ausbeute in %	Anreicherungs- faktor
Zytosolische Fraktion	61,05	41,34	0,68	100	1
Sepharose 6 B	19,87	22,1	1,1	54	1,6
Hydroxylapatit	0,660	19,8	30	48	44,3
Mono Q	0,013	6,84	526	16,5	777

Das gereinigte Enzym wurde mittels einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) dargestellt. Es wurde in einem 4-12 %igem Gel unter reduzierenden (Bahn 1) bzw. unter nicht-reduzierenden (Bahn 2) Bedingungen als eine Proteinbande mit einem Molekularmasse von 101 kDa sichtbar (Abbildung 5).

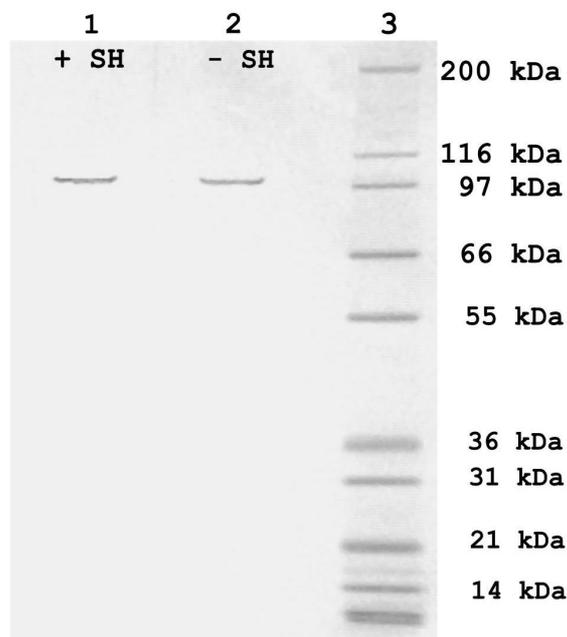


Abbildung 5: Darstellung der gereinigten Aminopeptidase der T-Zelllinie H9 mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Nach Auftrennung der Proteine in einem 4-12 %igem Polyacrylamidgel wurden die Proteinbanden mit einer Coomassie-Färbung visualisiert.

Bahn 1 = 0,5  $\mu$ g des gereinigten Enzyms in Anwesenheit von 2-ME;

Bahn 2 = 0,5  $\mu$ g des gereinigten Enzyms in Abwesenheit von 2-ME;

Bahn 3 = Proteinmarker (Mark 12, Novex).

## 4.1.4 IDENTIFIKATION MITTELS MASSENSPEKTROSKOPIE

Die Bande des isolierten Proteins (vgl. Abbildung 5) wurde ausgeschnitten, im Gel einer Trypsin-Verdauung unterzogen und die aus dieser Verdauung resultierenden Peptidfragmente unter Nutzung des MALDI-TOF-Massespektrometers analysiert. Es wurden insgesamt 15-Peptidfragmente untersucht. Im Ergebnis konnte eine 100%ige Identität des untersuchten Proteins mit der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase (EC 3.4.11.14; zAAP; Puromycin-sensitive Aminopeptidase; PSA) nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 6).

1	MWLAAAAPSL	ARRLLFLGPP	PPLLLLLVFS	RSSRRRLHSL	GLAAMPEKRP
51	FERLPADVSP	INYSLCLKPD	LLDFTFEGKL	EAAAQVRQAT	NQIVMNCADI
101	DIITASYAPE	GDEEIHATGF	NYQNEDEKVT	LSFPSTLQTG	TGTLKIDFVG
151	ELNDKMKGFY	RSKYTTPSGE	VRYA AVTQFE	ATDPRRAFPC	WDEPAIKATF
201	DISLVVPKDR	VALSNMNVID	RKPYPDENL	VEVKFARTPV	MSTYLVAFVV
251	GEYDFVETRS	KDGV CVRVYT	PVGKAEQGKF	ALEVA AKTLP	FYKDYFNVPY
301	PLPKIDLIAI	ADFAAGAMEN	WGLV TYRETA	LLIDPKNSCS	SSRQWVALVV
351	GHELAHQWFG	NLVTMEWETH	LWLNEGFASW	IEYLCVDHCF	PEYDIWTQFV
401	SADYTRAQEL	DALDNSHPIE	VSVGHPSEVD	EIFDAISYSK	GASVIRMLHD
451	YIGDKDFKKG	MNMYLTKFQQ	KNAATEDLWE	SLENASGKPI	AAVMNTWTQK
501	MGFPLIYVEA	EQVEDDRLLR	LSQKKFCAGG	SYVGEDCPQW	MVPITISTSE
551	DPNQAKLKIL	MDKPEMNVVL	KNVKPDQWVK	LNLGTVGFYR	TQYSSAMLES
601	LLPGIRDLSL	PPVDR LGLQN	DLFSLARAGI	ISTVEVLKVM	EAFVNEPNYT
651	VWSDLSCNLG	ILSTLLSHTD	FYEIQEFVK	DVFSPIGERL	GWDPKPGEGH
701	LDALLRGLVL	GKLGKAGHKA	TLEEARRRFK	DHVEGKQILS	ADLRSPVYLT
751	VLKHGDGTTL	DIMLKLHKQA	DMQEEKNRIE	RVLGATLLPD	LIQKVLTFAL
801	SEEV RPQDTV	SVIGGVAGGS	KHGRKAAWK F	IKDNWEELYN	RYQGGFLISR
851	LIKLSVEGFA	VDKMAGEVKA	FFESH PAPSA	ERTIQCCEN	ILLNAAWLKR
901	DAESIHQYLL	QRKASPPTV			

Abbildung 6: Aminosäure-Sequenz der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase (EC 3.4.11.14; zAAP; Puromycin-sensitive Aminopeptidase; PSA). Die identifizierten Peptid-Fragmente des aus der T-Zelllinie H9 untersuchten Enzyms wurden rot hervorgehoben.

## 4.2 CHARAKTERISIERUNG DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE DER T-ZELLINIE H9

### 4.2.1 BESTIMMUNG DER ABHÄNGIGKEIT DER ALA-pNA HYDROLYSIERENDEN AKTIVITÄT VOM pH-WERT

Die Untersuchungen wurden in drei Puffersystemen (Phosphatpuffer, Tris-HCl und Citrat-Phosphatpuffer) in einem pH-Bereich von 5,0 bis 9,0 durchgeführt (vgl. 3.4.3). Die höchste Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase konnte bei einem pH-Wert von 6,5 ermittelt werden.

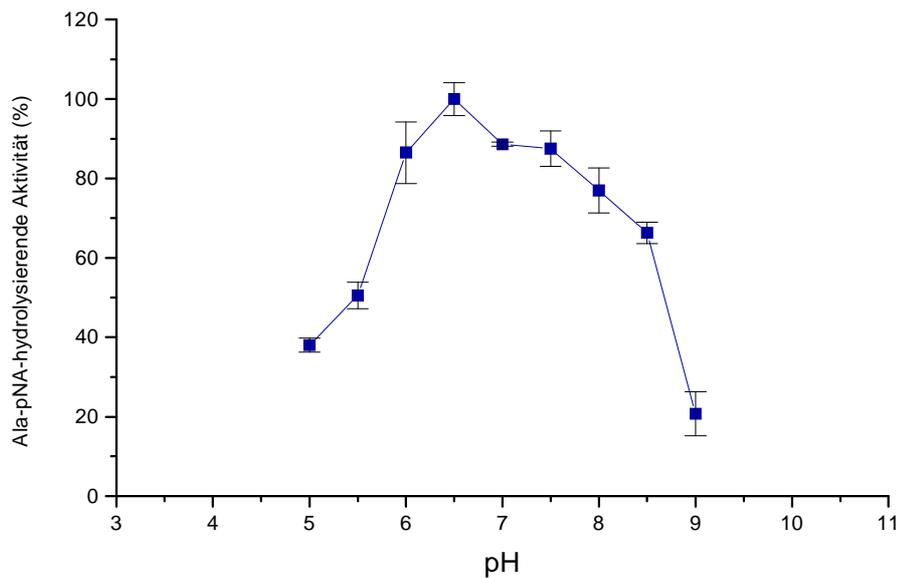


Abbildung 7: Abhängigkeit der Ala-pNA-hydrolysierenden Aktivität der gereinigten zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase vom pH-Wert. (n=4, MW $\pm$ SD<10%)

#### 4.2.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR STABILITÄT DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE

##### ***Stabilisierende Wirkung von DTT.***

Die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase (zAAP) benötigt zum Erhalten der enzymatischen Aktivität die Anwesenheit von Thiolgruppen-Reagenzien. In unseren Untersuchungen (vgl. 3.4.3) hatte sich Dithiothreitol (DTT) in einer Konzentration von 2 mM ( vgl.4.2.4) als ein wirksamer Stabilisator der zAAP erwiesen (Abbildung 8).

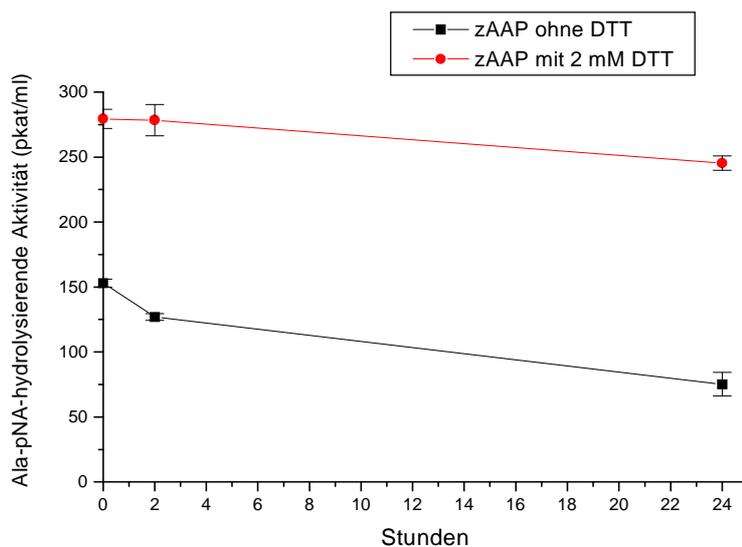


Abbildung 8: Stabilisierende Wirkung von DTT auf die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase.

Das gereinigte Enzym wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden mit und ohne 2 mM DTT in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,5) bei 4°C aufbewahrt. Anschließend wurde die Ala-pNA hydrolysierende Aktivität bestimmt (siehe 3.4.3.). Gezeigt wurde das Ergebnis eines von drei Versuchen.

### ***Bestimmung der Aufbewahrungsbedingungen***

Die beste Aufbewahrungstemperatur lag bei  $-70^{\circ}\text{C}$  (siehe Tabelle 4). Die Aktivitätsverluste der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase betragen dabei innerhalb eines Monats bis zu 17 % und konnten durch Zusatz von 20 % Glycerol fast vollständig verhindert werden.

Deutliche Aktivitätsverluste des gereinigten Enzyms konnten hingegen bei den anderen untersuchten Temperaturen festgestellt werden. Eine Aufbewahrung des Enzyms bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bzw.  $4^{\circ}\text{C}$  verlangt immer einen 20 %igen Glycerol-Zusatz, um das Enzym weitestgehend zu stabilisieren (Tabelle 4).

Tabelle 4: Einfluss von Temperatur und Zusatz von Glycerol auf die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität der gereinigten zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase.

Die gereinigte zAAP wurde in 50 mM Phosphatpuffer, pH 6,5 mit 2 mM DTT und mit 20 % Glycerol-Zusatz (bzw. ohne Glycerol) bei verschiedenen Temperatur aufbewahrt. Nach 7 oder 26 Tage erfolgte die Messung der Ala-pNA hydrolysierenden Aktivität (siehe 3.4.3.). Die gemessenen Aktivitäten wurden mit den Aktivitäten der Kontrolle (Aktivitäten – Tag 0) verglichen. Es wurden Mittelwerte und die Standardabweichung von zwei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Aufbewahrungs- Temperatur	Untersuchungs- zeitraum	Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität in %	
		Kontrolle	20 % Glycerol
$-70^{\circ}\text{C}$	7 Tage	88±2	92±3
	26 Tage	83±4	92±3
$-20^{\circ}\text{C}$	7 Tage	78±3	85±5
	26 Tage	43±5	74±6
$4^{\circ}\text{C}$	7 Tage	43±4	73±4
	26 Tage	39±5	64±2

#### 4.2.3 SUBSTRATSPEZIFITÄT DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE UND ENZYMKINETISCHE DATEN

##### ***Spezifität gegenüber Aminoacyl-para-Nitroanilid (pNA)-Derivaten***

Die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase spaltet ein breites Spektrum von Substraten. Von den para-Nitroanilid-Derivaten wurden folgende Aminosäuren (AS) effektiv abgespalten (vgl. auch Tabelle 5):

- AS mit unverzweigter, aliphatischer Seitenkette (Alanin)
- AS mit verzweigter, aliphatischer Seitenkette (Leucin)
- AS mit einer Seitenkette, die ein Schwefelatom enthält (Methionin)
- oder AS mit einer Seitenkette, die eine Aminogruppe enthält (Arginin).

Tabelle 5: Spaltungsfähigkeit von verschiedenen para-Nitroaniliden durch die zytosolische Aminopeptidase

Die verschiedenen Substrate wurden einheitlich in einer Konzentration von 2.5 mM eingesetzt. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte wie unter 3.4.3 beschrieben.

Substrate	Relative Spaltung (%)	±SD (%)
Met-pNA	127	4
Ala-pNA	100	2
Arg-pNA	54	2
Leu-pNA	42	4
Pro-pNA	6	2
Gly-pNA	4	2

##### ***Bestimmung der kinetischen Konstante verschiedener pNA-Derivate***

Die am besten umgesetzten Substrate (vgl. Tabelle 5): Ala-pNA, Met-pNA, Leu-pNA und Arg-pNA wurden ausgewählt, um deren Affinität zur zAAP zu bestimmen. Um für das jeweilige Substrat eine Sättigung im Reaktionsansatz zu erreichen, wurden

unterschiedliche Substratskonzentrationen benötigt. Für jedes Substrat erfolgte die Bestimmung der Abhängigkeit zwischen Hydrolysegeschwindigkeit und Substratkonzentrationen (Abbildung 9 – 12). Aus den erhaltenen Daten wurde die Michaelis-Menten-Konstante und die maximale Geschwindigkeit mittels der graphischen Methode nach Lineweaver-Burk ermittelt (Abbildung 9 - 12).

Tabelle 6: Kinetische Parameter der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase für N-Acylparanitroanilid-Derivate.

Substrat	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (nkat/ $\mu$ g)	$k_{cat} / K_m$ (nkat/ $\mu$ g/mM)
Ala-pNA	0,217 $\pm$ 0,02	0,180 $\pm$ 0,044	0,83
Met-pNA	0,092 $\pm$ 0,005	0,205 $\pm$ 0,03	2,23
Arg-pNA	0,028 $\pm$ 0,004	0,066 $\pm$ 0,012	2,36
Leu-pNA	0,013 $\pm$ 0,008	0,053 $\pm$ 0,02	4,0

In Tabelle 6 wurden die gemessenen kinetischen Parameter der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase zusammengefasst. Die Analyse der  $K_m$ -Werte ergab, dass das Enzym die höchste Affinität gegenüber dem Leu-pNA Substrat besaß. Die Affinitätsreihenfolge stellte sich wie folgt dar: Leu > Arg > Met > Ala.

Der Quotient aus  $k_{cat} / K_m$  entspricht der Geschwindigkeitskonstante der Reaktion des freien Enzyms mit dem Substrat unter Bildung der Reaktionsprodukte und kann als ein Maß für die Effizienz des Substratumsatzes durch ein Enzym gewertet werden [130]. Bezüglich dem  $k_{cat} / K_m$  – Quotient schien Leu-pNA das beste Substrat für die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase zu sein (Tabelle 6). Dann folgten Arg-pNA und Met-pNA. Ala-pNA stellte sich als das schlechteste Substrat der vier untersuchten para-Nitroanilide dar.

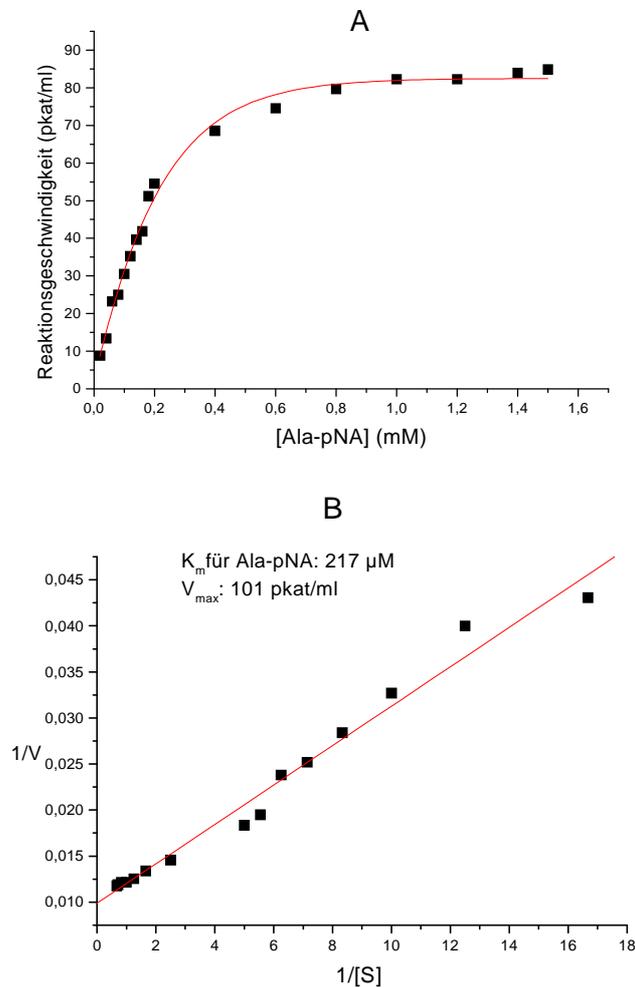


Abbildung 9: A: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (V) von der Konzentration des Ala-pNA-Substrats [S]. B: Graphische Ermittlung des  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Wertes.

Das Substrat wurde in der Konzentration von 0,02 bis 1,50 mM eingesetzt (vgl. 3.4.5.). Gezeigt wird das Ergebnis eines von drei Versuchen. Der Korrelations-Koeffizient  $R^2$  beträgt in diesem Fall 0,9800.

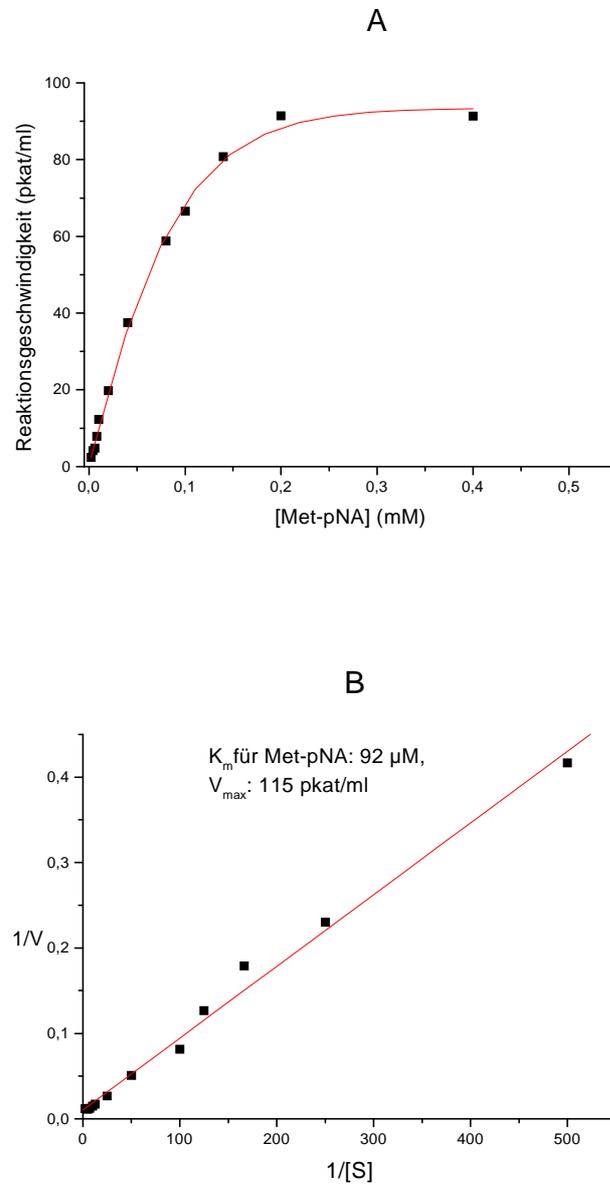


Abbildung 10: A: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit ( $V$ ) von der Konzentration des Met-pNA-Substrats  $[S]$ . B: Graphische Ermittlung des  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Wertes.

Das Substrat wurde in der Konzentration von 0,002 bis 0,40 mM eingesetzt (vgl. 3.4.5.). Gezeigt wird das Ergebnis eines von drei Versuchen. Der Korrelations-Koeffizient  $R^2$  beträgt in diesem Fall 0,9944.

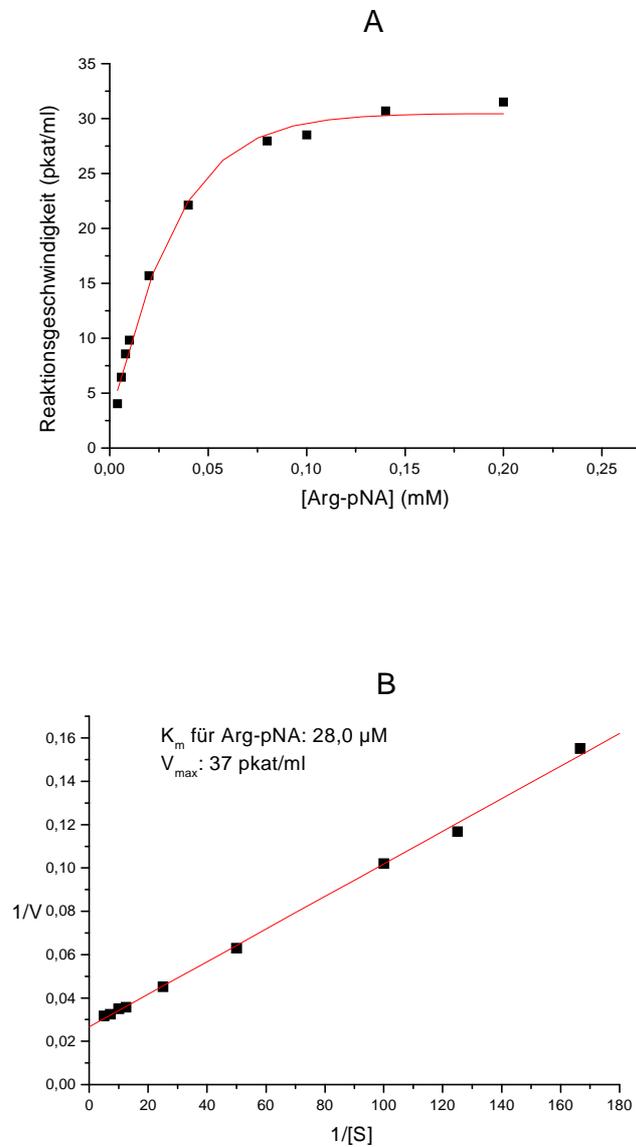


Abbildung 11:A: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit ( $V$ ) von der Konzentration des Arg-pNA-Substrats  $[S]$ . B: Graphische Ermittlung des  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Wertes.

Das Substrat wurde in der Konzentration von 0,004 bis 0,20 mM eingesetzt (vgl. 3.4.5.). Gezeigt wird das Ergebnis eines von drei Versuchen. Der Korrelations-Koeffizient  $R^2$  beträgt in diesem Fall 0,9949.

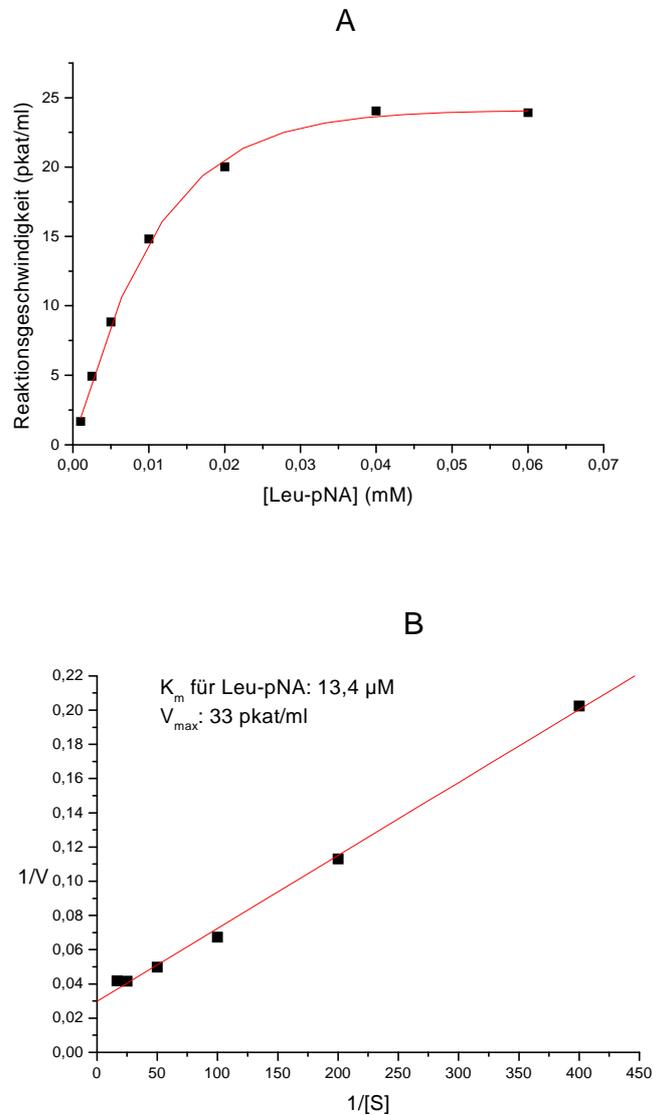


Abbildung 12: A: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit ( $V$ ) von der Konzentration des Leu-pNA-Substrats  $[S]$ . B: Graphische Ermittlung des  $K_m$ - und  $V_{\text{max}}$ -Wertes.

Das Substrat wurde in der Konzentration von 0,001 bis 0,06 mM eingesetzt (vgl.3.4.5.). Gezeigt wird das Ergebnis eines von zwei Versuchen. Der Korrelations-Koeffizient  $R^2$  beträgt in diesem Fall 0,9902.

### ***Spaltungsfähigkeit von Peptiden***

Die Spaltungsfähigkeit der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase wurde an acht Peptiden untersucht:

- Cholecystokinin (CCK 3-8)
- Bradykinin (MK-Bradykinin)
- Interleukin-2 (IL-2)
- Met-Interleukin-2 (Met-IL-2, 1-12)
- Gastrin-freisetzendes Peptid (GRP)
- Tuftsin
- HIV-Tat (1-9)-Peptid
- Peptidfragment VKPFY

Die meisten dieser Peptidfragmente enthielten am N-Terminus ein Methionin. Trotzdem wurden sie unterschiedlich gespalten (vgl. Tabelle 7). Eine relativ gute Spaltungsrate von 46% konnte für Met-Interleukin-2 (1-12) ermittelt werden. Niedrigere Hydrolyseraten zeigten CCK (3-8) mit 17%, das Peptidfragment VKPFY mit 18% und Tuftsin mit 16%. MK-Bradykinin, GRP (14-20), IL-2 (1-12) und das Tat (1-9)-Peptid wurden nicht hydrolysiert (Effizienz unter 10%), obwohl sich ein Methionin am N-Terminus befand. Die Untersuchungen zeigten deutlich, dass die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase fähig ist, die von ihr bevorzugten Aminosäuren vom N-Terminus bestimmter Peptidfragmente zu spalten. Wie an den unterschiedlichen Spaltungsfrequenzen jedoch zu erkennen war, beeinflusste die Belegung der zweiten und wahrscheinlich weiterer Aminosäureposition vom N-Terminus des Peptidfragmentes die Fähigkeit zur Hydrolyse entscheidend.

Tabelle 7: Spaltungsfrequenz unterschiedlicher Peptidfragmente durch die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase.

Die Peptide wurden mit einer Konzentration von 0,4 mM eingesetzt und 30 min bei 37°C mit der gereinigten zAAP inkubiert (siehe 3.4.6). Die Bestimmung der Hydrolyserate erfolgte mittels Kapillar-Elektrophorese (CE). Eine erfolgreiche Spaltung wird bei einer Hydrolyserate von mehr als 10% angenommen.

Peptid	Sequenz	Anzahl der AS	Spaltung in %
Met-IL-2 (1-12)	MAPTSSSTKKTQL	13	46
VKPFY	VKPFY	5	18
CCK (3-8)	MGWMDF	6	17
Tuftsinsin	TKPR	4	16
Tat (1-9)	MDPVDPNIE	9	8
MK-Bradykinin	MKRPPGFSPFR	11	3
GRP (14-27)	MYPRGNHWAVGHLM	14	2
IL-2 (1-12)	APTSSSTKKTQL	12	2

#### 4.2.4 EFFEKTOREN DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE

##### ***Einfluss des SH-aktiven Reagenzes.***

Der Einfluss von DTT auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase ist konzentrationsabhängig. In einem Konzentrationsbereich von 1-10 mM DTT fand die Aktivierung der zAAP aus H9-Zellen statt. Die zweifache Erhöhung der Ala-pNA hydrolysierenden Aktivität wurde durch den Zusatz von 2 mM DTT erreicht. Die Konzentrationen von 25 mM oder 50 mM DTT hatten einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität der zAAP (vgl. Abbildung 13).

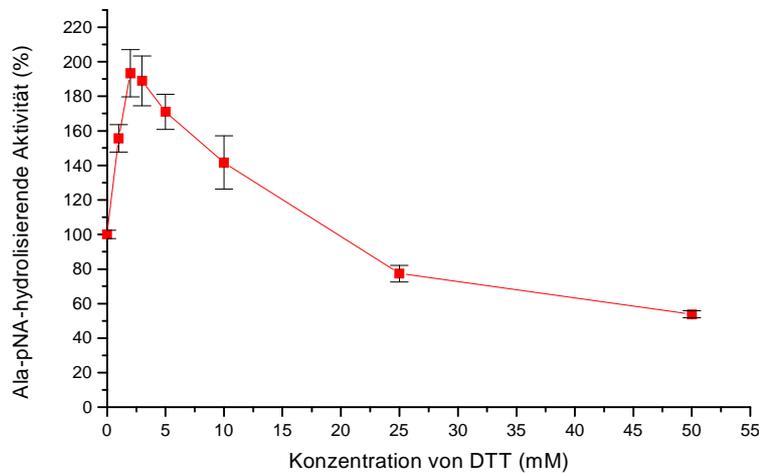


Abbildung 13: Einfluss des SH-aktiven Reagenzes Dithiothreitol (DTT) auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase.

Gereinigte zAAP im 50 mM Phosphatpuffer, pH 6,5 ohne Zusatz von Thiolreagenzien wurde mit entsprechender Konzentration von DTT 15 Minuten bei RT vorinkubiert und im Anschluss die Aktivität bestimmt (siehe 3.4.3.)(n=4, MW  $\pm$ SD <14 %).

***Einfluss von Iodacetamid.***

Thiolabhängige Proteasen können durch Reagenzien, die mit freien Thiolgruppen reagieren, inaktiviert werden. Iodacetamid bildet mit Thiolgruppen des Cysteins die Verbindung S-Carboxy-Amidomethylcystein [4]. Die Bildung dieser Verbindung innerhalb eines Enzyms kann zu einer Inaktivierung führen. Daher wurde der Einfluss von Iodacetamid auf die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität der zytosolischen (zAAP) und der membranständigen Alanyl-Aminopeptidase (APN) untersucht. Die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9 hatte sich in den Untersuchungen als eine Thiol-abhängige Protease erwiesen, da deren enzymatische Aktivität durch Iodacetamid beeinflusst werden konnte. Der IC<sub>50</sub>-Wert betrug dabei 97,5  $\mu$ M (Tabelle 8). Im Gegensatz dazu wurde die membranständige Alanyl-Aminopeptidase nicht vom Thiolreagenzien beeinflusst (vgl. Abbildung 14).

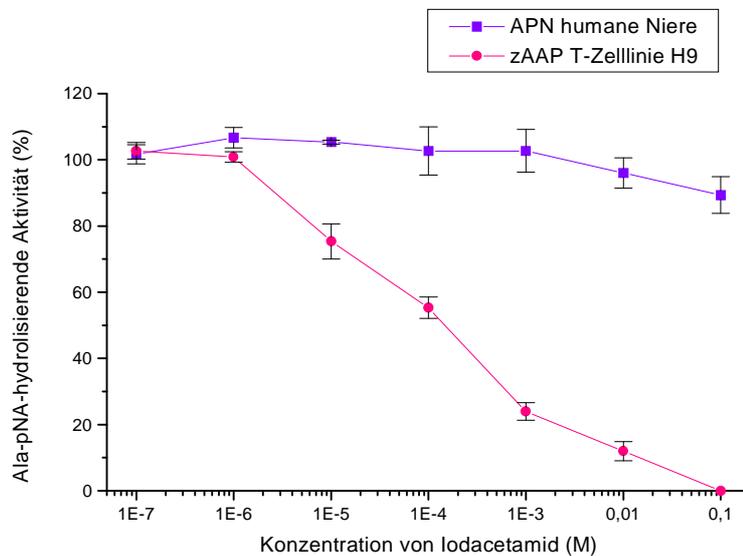


Abbildung 14: Vergleich: Iodacetamid-Einfluss auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase (zAAP) und der membranständigen Alanyl-Aminopeptidase (APN).

Gereinigte zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus H9-Zellen, bzw. gereinigte APN aus humanen Nieren wurden in PBS (pH8,0) ohne Zusatz von DTT 15 Minuten mit verschiedenen IAA-Konzentrationen bei 37°C vorinkubiert und im Anschluss wurde die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität bestimmt (siehe 3.4.3)(n=3, MW±SD <7 %).

### ***Einfluss Chelat-bildender Effektoren.***

Für die Untersuchung des Einflusses Chelat-bildender Effektoren auf die Aktivität der zAAP wurden EDTA und o-Phenanthrolin verwendet. Beide Verbindungen erwiesen sich als Inhibitoren, wobei jedoch ein Unterschied in der Empfindlichkeit der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase gegenüber diesen beiden Substanzen zu verzeichnen wurde (vgl. Abbildung15 und 16). EDTA erwies sich als der effektivere

Hemmstoff. Der berechnete  $IC_{50}$  Wert für diese Verbindung betrug  $9,0 \mu\text{M}$ . Für o-Phenanthrolin wurde ein  $IC_{50}$  Wert von  $24 \mu\text{M}$  bestimmt (vgl. Tabelle 8).

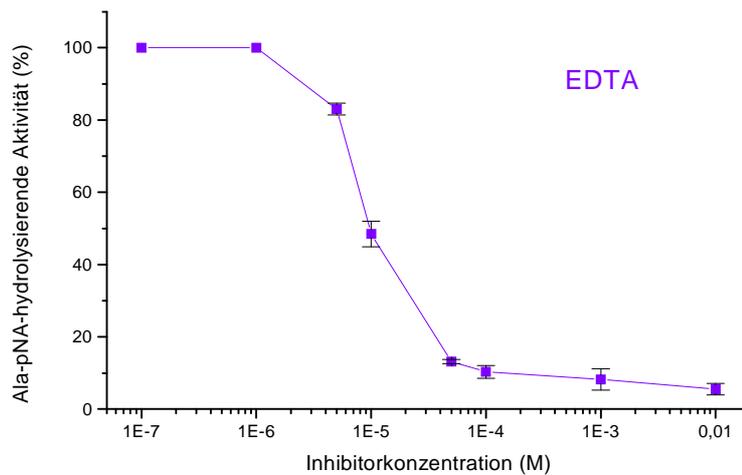


Abbildung 15: EDTA-Einfluss auf die Aktivität der zytosolischen

#### Alanyl-Aminopeptidase

Gereinigte zAAP wurde mit den verschiedenen Konzentrationen von EDTA 15 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  vorinkubiert. Die Messungen erfolgten im 50 mM Phosphatpuffer, pH 6.5 mit Zusatz von 2 mM DTT. Im Anschluss wurde die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität bestimmt (siehe 3.4.3).

( $n=3$ ,  $MW \pm SD < 4\%$ ).

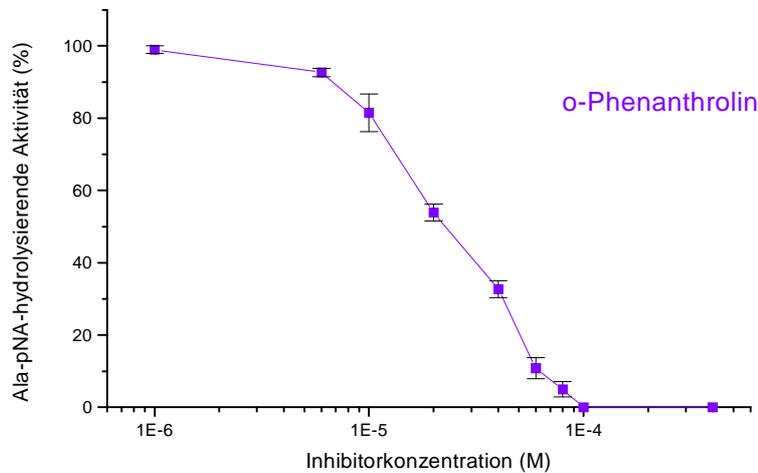


Abbildung 16: Einfluss von o-Phenanthrolin auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase

Gereinigte zAAP wurde mit den verschiedenen Konzentrationen von o-Phenanthrolin 15 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die Messungen erfolgten im 50 mM Phosphatpuffer, pH 6.5 mit Zusatz von 2 mM DTT. Im Anschluss wurde die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität bestimmt (siehe 3.4.3) (n=3, MW  $\pm$ SD <5%).

#### ***Einfluss von Aminopeptidase – Inhibitoren auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase.***

Zur weiteren Charakterisierung der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase wurden die Aminopeptidase-Inhibitoren Actinonin, Bestatin, Probestin, Puromycin, RB3014 und Phebestin verwendet. In Abbildung 17 ist der Einfluss der verschiedenen Aminopeptidase-Inhibitoren auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9 dargestellt. Deutlich sind die Unterschiede in der Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber dem jeweiligen Inhibitor erkennbar. Als effektivste Inhibitoren haben sich Phebestin ( $IC_{50}=0,015 \mu\text{M}$ ), Probestin ( $IC_{50}=0,016 \mu\text{M}$ ) und RB3014 ( $IC_{50}=0,025 \mu\text{M}$ ) erwiesen. Als weniger effektiv stellten sich hingegen die

Aminopeptidase-Inhibitoren Puromycin ( $IC_{50}=3,1 \mu M$ ) und Bestatin ( $IC_{50}=0,40 \mu M$ ) dar.

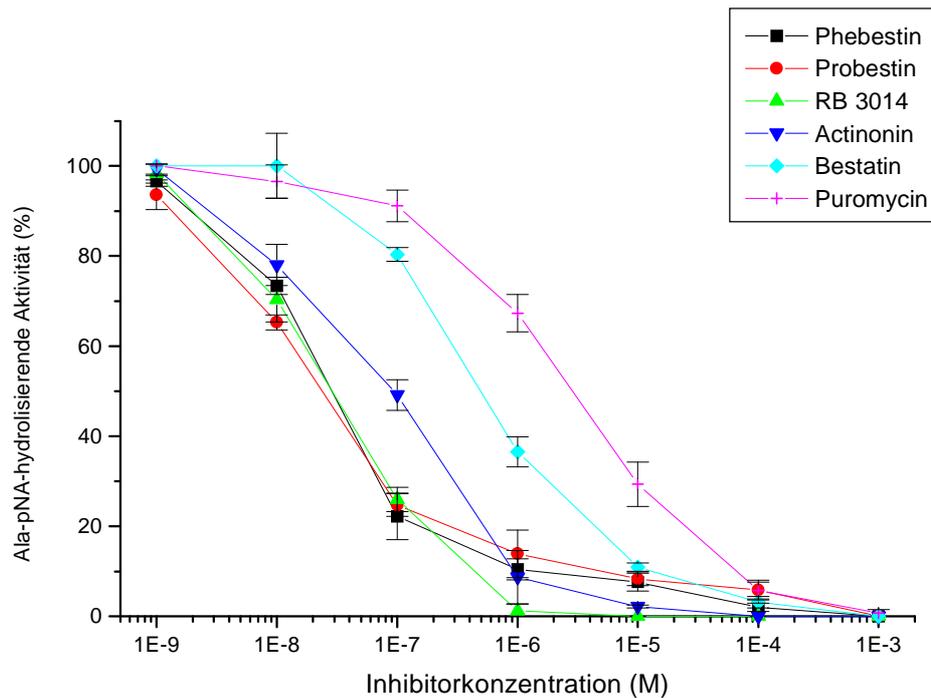


Abbildung 17: Vergleich des Einflusses von unterschiedlichen Aminopeptidase-Inhibitoren auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase aus H9-Zellen.

Gereinigte zAAP wurde mit verschiedenen Inhibitoren 15 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die Messungen erfolgten im 50 mM MOPS/NaOH Puffer, pH 6.5 mit Zusatz von 2 mM DTT. Das Puffersystem wurde gewechselt, um einen Vergleich mit publizierten Daten betreffend der zAAP zu ermöglichen (n=3, MW  $\pm$ SD <6%).

### ***Einfluss von PAQ-22.***

PAQ-22 ist ein neuentwickelter, spezifischer Inhibitor der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase, dessen Einfluss auf die humane membranständige Alanyl-Amino-peptidase (APN) noch nicht untersucht wurde (persönliche Mitteilung von Y.Hashimoto, Tokio). Die zAAP aus der T-Zelllinie H9 erwies sich sensitiv gegenüber diesem Inhibitor (Abbildung 18). Der berechnete  $IC_{50}$ -Wert für diese Reaktion betrug  $0,29 \mu\text{M}$ . Im Gegensatz dazu, blieb die Aktivität der humanen, membranständigen Alanyl-Amino-peptidase unbeeinträchtigt durch PAQ-22.

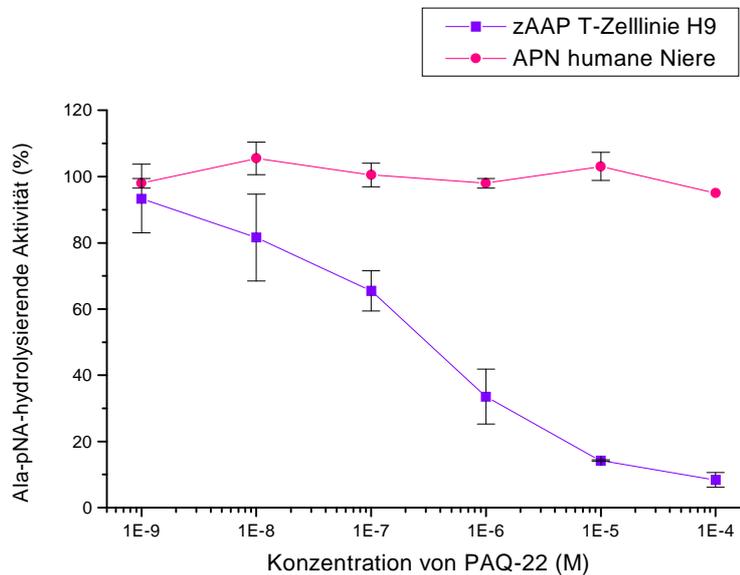


Abbildung 18: Einfluss von PAQ-22 auf die Aktivitäten der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase (zAAP) und der membranständigen Alanyl-Amino-peptidase (APN).

Gereinigte zAAP wurde mit den verschiedenen Konzentrationen von PAQ-22 15 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  vorinkubiert. Die Messungen erfolgten im 50 mM Phosphatpuffer, pH 6.5 mit Zusatz von 2 mM DTT. Im Anschluss wurde die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität bestimmt (siehe 3.4.3) ( $n=3$ ,  $MW \pm SD < 13\%$ ).

Zum Vergleich der Effektivität der Inhibitoren sind deren  $IC_{50}$ -Werte (die Inhibitor-konzentrationen, die eine 50%ige Hemmung bewirken) für die zytosolische Alanyl-Amino-peptidase in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8:  $IC_{50}$ -Werte der verwendeten Inhibitoren der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase.

Inhibitor	$IC_{50}$ -Wert
Phebestin	0,015 $\mu$ M
Probestin	0,016 $\mu$ M
RB 3014	0,025 $\mu$ M
Actinonin	0,075 $\mu$ M
PAQ-22	0,29 $\mu$ M
Bestatin	0,4 $\mu$ M
Puromycin	3,1 $\mu$ M
EDTA	9,0 $\mu$ M
o-Phenanthrolin	24 $\mu$ M
IAA	97,5 $\mu$ M

#### 4.2.5 EINFLUSS VON IONEN AUF DIE AKTIVITÄT DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE

##### *Einfluss von Kationen*

Der Einfluss verschiedener Metallionen auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase wurde in zwei Konzentrationen von 1 mM (Abbildung 19) und 0,1 mM (Abbildung 20) untersucht. Eine deutliche Aktivierung der Ala-pNA-hydrolysierenden Aktivitäten wurde nur durch Kobaltionen beobachtet, wobei die Aktivierung konzentrationsabhängig ist. Die Konzentration von 1 mM Kobaltionen

bewirkte einen Anstieg der Enzymaktivitäten um 50 % und die von 0,1 mM Kobaltionen um 130%.

Eine leichte aber signifikante Aktivierung der Enzymaktivitäten bewirkten Barium-, Ammonium- und Strontiumionen in 0,1 mM Konzentration.

Stark inhibitorisch wirkten Schwermetallionen wie Kupfer-, Zink-, Cadmium- und Nickelionen auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase. Die vollständige Hemmung der Ala-pNA-hydrolysierenden Aktivitäten wurde durch Kupfer-, Zink-, Cadmiumionen bei einer Konzentration von 1mM erreicht. Nickelionen bewirkten in der gleichen Konzentration einen Aktivitätsverlust von 75%. Schwach hemmende Wirkung zeigten Calciumionen (1 mM).

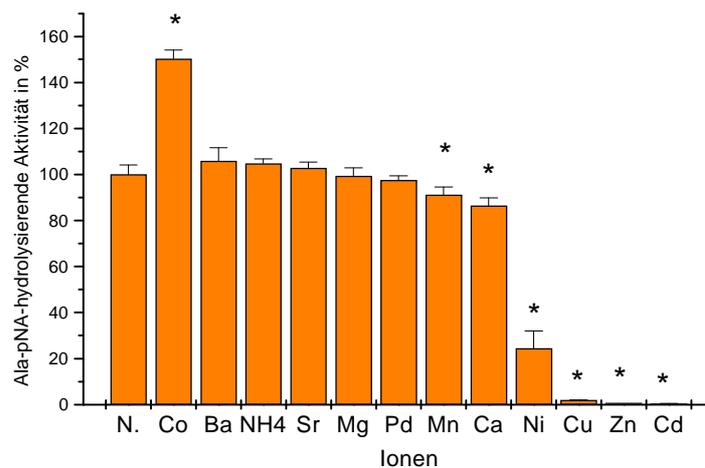


Abbildung 19: Einfluss der Kationen (1 mM) auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase.

Das gereinigte Enzym wurde mit verschiedenen Kationen in der Konzentration von 1mM 15 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die Messungen erfolgten in 50mM MOPS/NaOH, pH 6.5 mit Zusatz von 2mM DTT. Die Kontrolle (N) enthielt keinen Zusatz von Kationen. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SD < 8% aus vier unabhängigen Experimenten. \*p<0,01 im Vergleich zur Kontrolle.

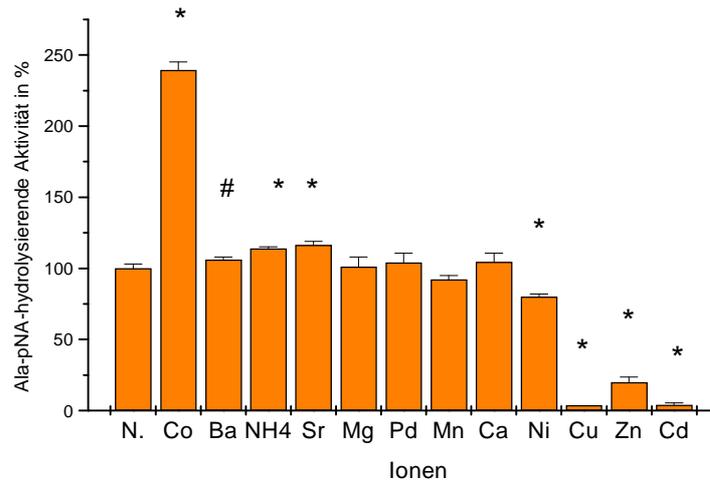


Abbildung 20: Einfluss der Kationen (0,1 mM) auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase.

Das gereinigte Enzym wurde mit verschiedenen Kationen in der Konzentration von 0,1mM 15 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die Messungen erfolgten in 50mM MOPS/NaOH, pH 6.5 mit Zusatz von 2mM DTT. Die Kontrolle (N) enthielt keinen Zusatz von Kationen. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SD < 7% aus vier unabhängigen Experimenten. \*p<0,01, #p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

### ***Einfluss von Chloridionen***

Die Stimulierbarkeit durch Chloridionen ist zwar charakteristisch für die Arginyl-Aminopeptidase [18], jedoch wurde auch im Zytosol humaner Erythrozyten eine zytosolische Alanyl-Aminopeptidase beschrieben [2], deren Aktivität mit Chloridionen stimulierbar war. Daher wurde für die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase der Einfluss von Chloridionen im Bereich von 0,05 bis 1,0 M auf die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität untersucht. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Chloridionen keinen Einfluss auf die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase haben (Abbildung 21).

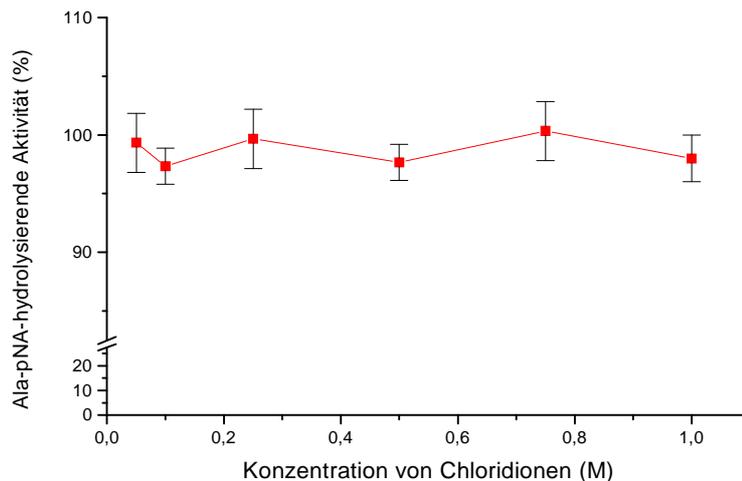


Abbildung 21: Einfluss von Chloridionen auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase.

Gereinigte zAAP wurde mit den verschiedenen Konzentrationen der Chloridionen 15 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Die Messungen erfolgten in 50 mM Phosphatpuffer, pH 6.5 mit Zusatz von 2 mM DTT. Im Anschluss wurde die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität bestimmt (siehe 3.4.3) (n=3, MW  $\pm$ SD <3 %).

### 4.3 IMMUNREAKTIVITÄT DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE

Die Immunreaktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase (zAAP) wurde unter Anwendung von drei verschiedenen Antikörpern gegen die membranständige Alanyl-Aminopeptidase (APN) getestet. Die zwei Antikörper 7B und WM15 wiesen eine Kreuzreaktivität gegenüber der zAAP auf (Abbildung 22). Der 7B-Antikörper wurde mittels einer Immunisierung gegen die bekannte Struktur des katalytischen Zentrums



der APN erhalten.

Da das katalytische Zentrum der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase



zu diesem Sequenzmotiv eine große Ähnlichkeit aufweist, ist die beobachtete Kreuzreaktion erklärbar.

Der APN-Antikörper Leu M7 zeigte keine Kreuzreaktivität gegenüber Strukturen der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase (Abbildung 22).

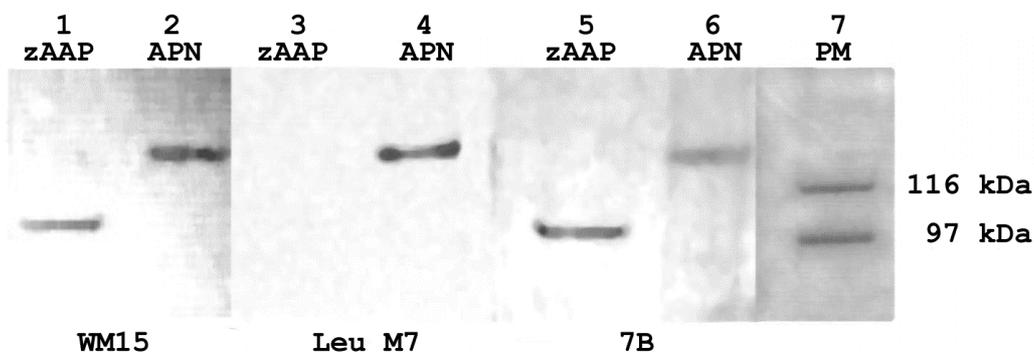


Abbildung 22: Immunreaktivität der beiden Alanyl-Aminopeptidasen (APN und zAAP) gegenüber APN-spezifischen Antikörpern. 0,5 µg APN aus humaner Niere und 0,5 µg zAAP aus der humanen T-Zelllinie H9 wurden unter nativen Bedingungen elektrophoretisch getrennt und auf eine Nitrozellulose Membran transferiert. Anschließend wurde die Antikörper-Nachweisreaktion durchgeführt (3.3.4). PM – Proteinmarker (Mark 12, Novex)

#### 4.4 AKTIVIERUNGSABHÄNGIGE EXPRESSION DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE AUS HUMANEN LYMPHOZYTEN

##### 4.4.1 STIMULATION HUMANER T-LYMPHOZYTEN UND EXPRESSION DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE

Humane periphere T-Lymphozyten wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden ohne Zusatz von Stimulatoren bzw. unter Zusatz einer der beiden Kombinationen aus PHA/PMA oder PWM/PMA inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Expression der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase auf der mRNA-Ebene durch Anwendung der quantitativen RT-PCR Technik bestimmt. Unabhängig vom verwendeten Stimulationssystem wurde ein aktivierungsabhängiger Anstieg der zAAP-mRNA-Gehalte beobachtet (PHA:  $311,7 \pm 65$  %; PWM:  $278,6 \pm 14$  % der unstimulierten Kontrolle;  $p < 0.01$ ) (Abb.23).

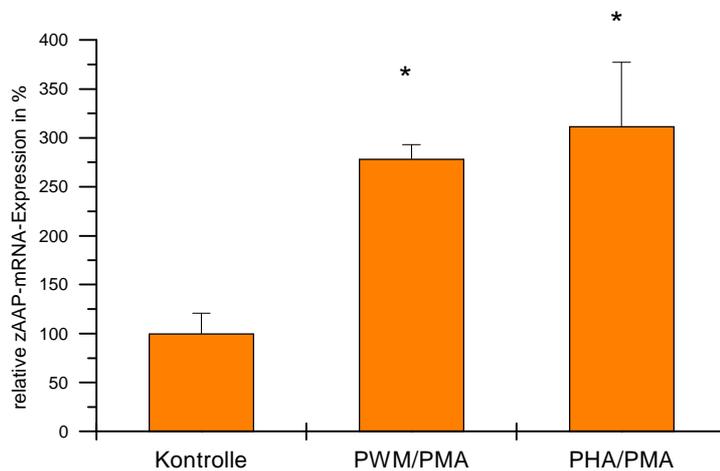


Abbildung 23: Aktivierungsabhängige Induktion der mRNA-Gehalte der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase in humanen T-Zellen. Humane T-Lymphozyten wurden 24 Stunden in Anwesenheit von PHA mit

---

PMA bzw. PMA mit PWM oder in Abwesenheit von Stimulatoren (Kontrolle) kultiviert (siehe 3.5.). Die Bewertung der Induktion der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase erfolgte auf der mRNA-Ebene mittels RT-PCR-Technik. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$ SD aus vier unabhängigen Experimenten. \* $p < 0,01$

#### 4.4.2 MODULATION DER mRNA-EXPRESSION DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE DURCH AMINOPEPTIDASE-INHIBITOREN

Erfolgte die mitogene Aktivierung von humanen peripheren T-Lymphozyten mittels PHA/PMA in Anwesenheit der Amino-peptidase-Inhibitoren Actinonin oder RB3014, war nach 24 Stunden eine deutliche Verminderung der aktivierungsabhängigen Induktion der zAAP-mRNA-Gehalte nachweisbar. Die Bestimmung der zAAP-mRNA-Gehalte erfolgte dabei mittels quantitativer RT-PCR (Lightcycler LC24). Die erhaltenen zAAP-mRNA-Gehalte betragen im Vergleich zu PHA/PMA-aktivierten Zellen für Actinonin  $59,7 \pm 5 \%$  ( $p=0,002$ ) und für RB3014  $60,76 \pm 16 \%$  ( $p= 0,007$ ). Der durch Leuhistin hervorgerufene Effekt erreichte aufgrund erheblicher Schwankungen keine statistische Signifikanz (Abbildung 24).

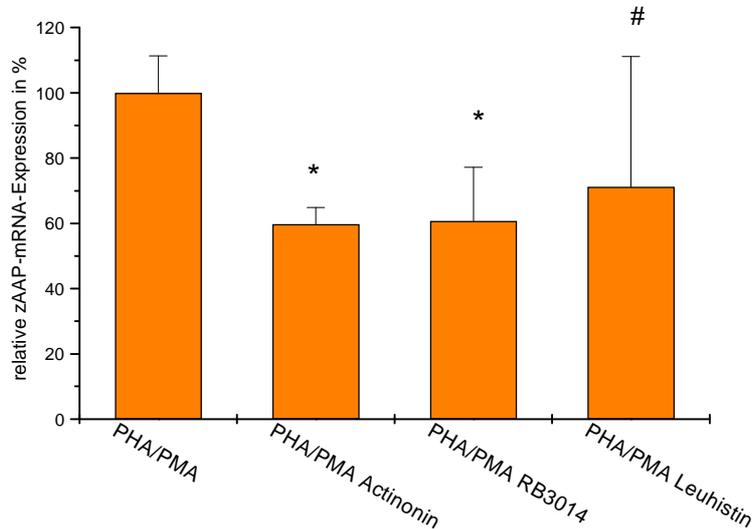


Abbildung 24: Einfluss von Aminopeptidase-Inhibitoren auf die Expression der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase PHA/PMA-aktivierter humaner T-Lymphozyten.

Humane T-Zellen wurden 24 Stunden mit PHA/PMA und den entsprechenden Inhibitoren kultiviert und die mRNA-Expression unter Anwendung der PCR-Technik bestimmt (siehe 3.5.). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus vier unabhängigen Experimenten. \* $p < 0,01$ , # $p = ns$  im Vergleich zur PHA/PMA-Kontrolle.

Andere Effekte auf die aktivierungsabhängige Induktion der zAAP-mRNA wurden durch die Applikation von Aminopeptidase-Inhibitoren erreicht, wenn die T-Zell-Aktivierung durch die Kombination von PMA und PWM erfolgte. Der Inhibitor RB 3014 bewirkte in diesem System einen leichten, aber signifikanten Anstieg der zAAP-mRNA-Gehalte ( $133 \pm 17$  % der PWM/PMA-aktivierten Zellen;  $p = 0,009$ ). Leuhistin und Actinonin hatten dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die zAAP-mRNA-Gehalte PWM/PMA-stimulierter T-Lymphozyten ( $110 \pm 14$ ,  $p = ns$ ;  $108 \pm 12$  %,  $p = ns$ ) (vgl. Abbildung 25).

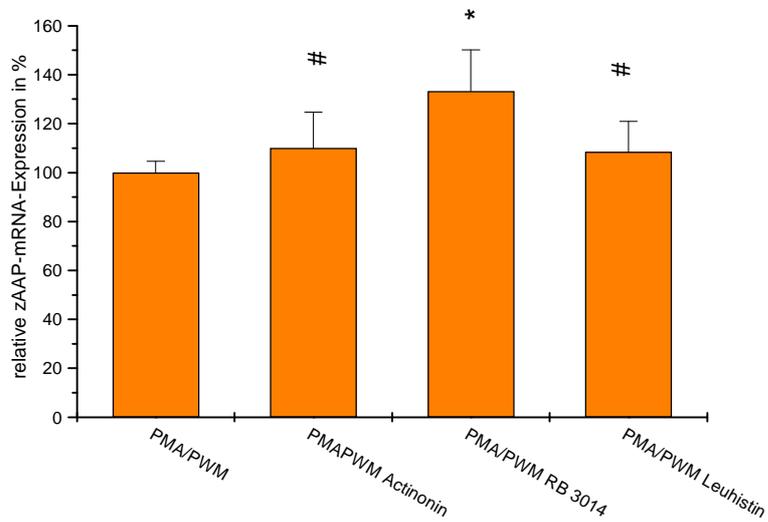


Abbildung 25: Regulation der zAAP-mRNA-Expression nach PMA/PWM

Stimulation und Behandlung mit Inhibitoren.

Humane T-Zellen wurden 24 Stunden mit PMA/PWM und den entsprechenden Inhibitoren kultiviert und die mRNA-Expression unter Anwendung der PCR-Technik bestimmt (siehe 3.5.). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Experimenten.. \* $p < 0,01$ ; # $p = n.s.$  im Vergleich zur PMA/PWM-Kontrolle.



## 5 DISKUSSION

### 5.1 BIOCHEMISCHER VERGLEICH DER IDENTIFIZIERTEN ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE AUS DER T-ZELLINIE H9 MIT DENEN AUS ANDEREN GEWEBEN

In der vorliegenden Arbeit wurde eine zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus der humanen T-Zelllinie H9 identifiziert und charakterisiert, die sich aufgrund ihrer biochemischen Charakteristik von anderen, bekannten Aminopeptidasen unterscheidet. Für die entsprechenden Untersuchungen wurde diese Aminopeptidase zunächst mittels konventioneller, chromatographischer Methoden gereinigt und mit Hilfe der Massenspektrometrie als zytosolische Alanyl-Aminopeptidase (EC.3.4.11.14, zAAP, PSA) identifiziert.

Die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase gehört zur Peptidasen-Familie M1 und enthält ein zinkbindendes Motiv HEXXH(X)<sub>18</sub>E, welches charakteristisch für die Gluzincin-Gruppe der Zink-Metalloproteasen ist. Zu dieser Familie gehören auch Aminopeptidase A, Aminopeptidase N und die Leukotrien-A4-Hydrolase. Bisher wurde die cDNA der zAAP aus humanem Gehirn [29,149] und von der Maus [28] kloniert und sequenziert. Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt zwischen den beiden Spezies eine 98 %ige Identität. Das humane zAAP-Gen setzt sich aus 23 Exonen und 22 Intronen zusammen, befindet sich auf dem Chromosom 17 und ist ca. 40 kbp groß [149].

Die lösliche Alanyl-Aminopeptidase wurde oft als ein jeweils eigenständiges Enzym betrachtet und trägt daher unterschiedliche Namen wie Enkephalin-degradierende Aminopeptidase [36,131], Neuropeptid-degradierende Aminopeptidase [100], Aminopeptidase III [135,136], Thiol-Aminopeptidase [157], Puromycin-sensitive Aminopeptidase [102,61,164] oder breitenspezifische Aminopeptidase [3].

Im humanen System wurde die zytosolische Alanyl-Amino-peptidase aus Gehirn [100], Skelettmuskel [79,95], Niere [97], Augenlinse [134,135], Leber [164], Plazenta [157], Erythrozyten [3,2,99] und während der Fertigung der vorliegenden Arbeit aus der lymphoblastischen T-Zelllinie (MOLT-4 Zellen [75]) isoliert und biochemisch charakterisiert. Mit Hilfe von spezifischem Antiserum wurde die zytosolische Alanyl-Amino-peptidase in myelo-monozytären Zelllinie U937 [41] und der Nasenschleimhaut [111] identifiziert. Die stärkste Expression der zAAP wurden in Gehirn, Herz und Skelettmuskel nachgewiesen [102]. Die humane zAAP ist hauptsächlich im Zytosol lokalisiert [61]. Eine Ausnahme bildet hierbei tierisches Gehirngewebe, in dem eine membran-assoziierte Form der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase beschrieben wurde [62,53,60,39,54,102,131].

Die enzymatischen Eigenschaften der zAAP in den oben erwähnten humanen Geweben unterscheiden sich. Barrett und Dando [18] haben folgende gemeinsame Eigenschaften definiert:

- einzelne Polypeptid-Kette mit einer Molekularmasse von ca. 100 kDa;
- maximale enzymatische Aktivität im pH-Bereich von 7,3 bis 7,5;
- sensitiv gegenüber Thiolreagenzien;
- sensitiv gegenüber Metallchelatoren;
- unikale Sensitivität gegenüber Puromycin in nanomolarer Konzentration;
- Hemmung durch Bestatin;
- maximale Aktivierung durch 0,5 mM  $\text{CaCl}_2$  und starke Hemmung der Aktivitäten durch Schwermetallionen wie Kupferionen, Zinkionen
- eine breite Substrat-Spezifität

---

### 5.1.1 MONOMER-CHARAKTER DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE

Die humane cDNA ist 3747 bp groß, kodiert 874 Aminosäuren mit einer daraus resultierenden theoretischen Molekularmasse von 99 kDa [29,149]. Bisher wurden zAAP mit folgenden Molekularmassen beschrieben:

- Plazenta zAAP 95 kDa;
- Leber zAAP 98 kDa;
- Augenlinsen zAAP 100 kDa;
- zAAP aus der Zelllinie U937 100 kDa;
- Skelettmuskel zAAP 102 kDa;
- zAAP aus der T-Zelllinie MOLT-4 102 kDa;
- Nieren zAAP 103 kDa;
- Gehirn zAAP 105 kDa;
- Erythrozyten zAAP 110 kDa;

Die mittels PAGE und Antikörper-Färbung ermittelte molekulare Masse der aus der T-Zelllinie H9 isolierten zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase beträgt 101 kDa. Da das Enzym die gleiche elektrophoretische Mobilität unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen zeigt, spricht dies für einen monomeren Charakter. Diese Werte fügen sich gut in die Charakteristik der bisher identifizierten zAAP aus anderen Geweben bzw. Zelllinien und der vorhergesagten Molekülmasse ein (vgl. obige Aufzählung).

### 5.1.2 ABHÄNGIGKEIT DER ZYTOSOLISCHEN AMINOPEPTIDASE-AKTIVITÄT VOM pH-WERT

Im generellen liegt die maximale Aktivität der verschiedenen humanen zytosolischen Alanyl-Aminopeptidasen im pH-Bereich von 7,3 bis 7,5 [100,95,97,164]. Zu den Ausnahmen gehört die zAAP aus der Plazenta mit einem pH-Optimum von 8,0 [157], die zAAP aus der Augenlinse mit einem Optimum von 6,0 [135] und die von mir isolierte zAAP aus H9-Zellen, die ihre höchste Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität

bei 6,5 hat. Mit diesem pH-Optimum findet man eine weitere Aminopeptidase in neutrophilen Granulozyten des Rinderblutes [11]. Für zAAP in humanen Erythrozyten konnte kein exakter Wert, sondern einen pH-Bereich von 6,0 bis 7,0 bestimmt werden [3]. Die Unterschiede in den pH-Optima deuten möglicherweise auf eine gewebsspezifische Funktion der verschiedenen zytosolischen Alanyl-Aminopeptidasen hin.

### 5.1.3 ZYTOSOLISCHE ALANYL-AMINOPEPTIDASE ALS THIOLABHÄNGIGE PROTEASE

Thiolproteinasen sind Enzyme, deren Aktivität an das Vorhandensein einer gewissen Anzahl von freien Thiolgruppen gebunden ist. Diese Eigenschaft wurde für die humane zytosolische Alanyl-Aminopeptidasen mit verschiedenen Thiolgruppen-Inhibitoren wie PCMB [95,157,164], PHMB [3,135], IAA [157] und PHMS [95,97] bestätigt. Die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte für die PHMS-Hemmung der Aminopeptidase-Aktivität befanden sich im Bereich von 0,1 bis 0,2 mM [94]. Die Empfindlichkeit der von mir isolierten zAAP gegenüber freien Thiolgruppen wurde mit dem Sulfhydrylinhibitor Iodacetamid (IAA) untersucht, der mit der Thiolgruppe des Cysteins S-Carboxyamidomethylcystein bildet [4]. Das entstandene Produkt wirkte inhibitorisch auf die Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase, wobei der ermittelte  $IC_{50}$ -Wert der Hemmung 97,5  $\mu$ M beträgt. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Empfindlichkeit der zAAP aus T-Zelllinie H9 gegenüber IAA höher ist als die der zAAP aus Plazenta, mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 1,25 mM [157].

Zum Vergleich wurde die Empfindlichkeit der membranständigen Alanyl-Aminopeptidase (EC 3.4.11.2, APN) gegenüber Iodacetamid untersucht, die keine Thiolproteinase ist. Erwartungsgemäß konnte keine Hemmung der enzymatischen Aktivität der APN festgestellt werden.

Angesichts dieser Eigenschaften ist der dringende Bedarf des Enzyms nach Anwesenheit von Thiol-Reagenzien wie Mercaptoethanol (2-ME) oder Dithiothreitol (DTT), während des Reinigungsverfahrens und der Untersuchung der biochemischen Eigenschaften verständlich. Für die meisten beschriebenen zAAP fehlen die Angaben

über die genaue Auswirkung der Thiol-Reagenzien auf die Enzymaktivität. Es wird jedoch darauf hingewiesen, dass Thiol-Reagenzien eine stabilisierende Wirkung ausüben und deren Anwesenheit während der Isolation notwendig ist [97,100,164].

Aus den vorliegenden Untersuchungen für die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9 folgt, dass die Thiolreagenzien die stabilisierende und aktivierende Wirkung auf die Aktivität erzielten. Diese positive Wirkung der Thioldonatoren ist dabei konzentrationsabhängig und wurde nur im Bereich von 1 bis 10 mM festgestellt. Die höchste Aktivierung der zAAP aus T-Zelllinie H9 findet bei der Konzentration von 2 mM DTT statt. Höhere Konzentrationen von DTT (z.B. 25 mM) wirkten hingegen inhibitorisch.

Die gleiche Auswirkung von Sulfhydrylreagenzien wurde für zAAP aus Plazenta beschrieben [157], wobei 5 mM DTT einen 20-fachen Anstieg der enzymatischen Aktivität bewirkte. Der zweifache Anstieg der Enzymaktivität wurde für die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus Schweine-Skelettmuskeln und Rattenleber festgestellt [42,165].

Dagegen konnte keine aktivierende Wirkung durch Sulfhydrylreagenzien für zAAP aus humanen Erythrozyten [3] oder für zAAP aus Augenlinse [135] bestätigt werden.

#### 5.1.4 DIE ZAAP AUS DER HUMANEN T-ZELLINIE H9 IST EINE METALLOPROTEASE

Die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9 ist eine Metalloprotease. Die Hemmung der Aktivität der zAAP durch EDTA oder o-Phenanthrolin weist darauf hin, dass die metallbindende Region im zAAP-Molekül wichtig für die Regulation der Enzymaktivitäten ist. O-Phenanthrolin hemmt vollständig alle humanen, zytosolischen Alanyl-Aminopeptidasen in einer Konzentration von 1 mM [18]. Die  $IC_{50}$ -Werte für viele humane zAAP befinden sich im Bereich von 0,23 mM (Plazenta) [157] bis 0,5 mM (Niere, Skelettmuskel, Gehirn) [97,95]. Die zAAP aus der T-Zelllinie H9 stellt sich mit dem  $IC_{50}$ -Wert von 24  $\mu$ M 10-fach empfindlicher gegenüber o-Phenanthrolin dar.

Die vollständige Hemmung der enzymatischen Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidasen durch EDTA wird in einer Konzentration von 5 mM erreicht [18]. Die meisten  $IC_{50}$ -Werte liegen für die humanen zAAP im Bereich von 0,5 bis 1,0 mM [97,95,100].

Die zAAP aus der T-Zelllinie H9 reagiert auf EDTA deutlich sensitiver, was ein  $IC_{50}$ -Wert von 9,0  $\mu$ M für diese Hemmung belegt. Noch empfindlicher gegenüber EDTA als die von mir isolierte zAAP, zeigte sich eine zAAP aus Erythrozyten ( $IC_{50}$ -Wert von 0,9  $\mu$ M; [3]).

#### 5.1.5 EINFLUSS UNTERSCHIEDLICHER IONEN AUF DIE ENZYMATISCHE AKTIVITÄT

Die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus den H9-Zellen ist durch Kobaltionen stark aktivierbar. Eine leichte, signifikante Aktivierung wurde auch durch andere bivalente Metallionen wie Strontium-, Barium- sowie durch Ammoniumionen nur in der Konzentration von 0,1 mM festgestellt. Dieses Ergebnis entspricht dem der zytosolischen Aminopeptidase aus humanen Erythrozyten [3,99] bzw. aus neutrophilen Granulozyten des Rinderblutes [11]. Beide Proteasen konnten ebenfalls nur durch Kobaltionen stark stimuliert werden. Im Gegensatz dazu wird die zAAP aus der Leber durch Kobaltionen sogar gehemmt [164].

Mit der fehlenden Stimulierung durch Calciumionen unterscheidet sich die charakterisierte zAAP von vielen anderen humanen zytosolischen Aminopeptidasen. So wird die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus der Niere [97], dem Skelettmuskel [95] und dem Gehirn [100] mit 0,5 mM Calciumionen am höchsten aktiviert. Neben der starken Aktivierung durch Calciumionen wurde auch eine Stimulierung der enzymatischen Aktivität dieser zAAP durch Mangan-, Magnesium- und Kobaltionen beschrieben. Die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9 zeigt sogar bei einer Konzentration von 1 mM Calciumionen eine leichte Hemmung der Enzymaktivität. Weiterhin ist die fehlende Aktivierung durch Mangan- und Magnesiumionen ein gutes Mittel zur Abgrenzung von der zytosolisch

---

lokalisierten Leucyl-Aminopeptidase [101]. Die zAAP der Augenlinse wurde an erster Stelle durch Manganionen und dann erst durch Kobaltionen stimuliert [135]. Schwermetallionen wie Kupfer-, Cadmium-, Zink- und Nickelionen in der Konzentration von 1 mM hemmen vollständig die Enzymaktivitäten der zAAP aus H9-Zellen. Möglicherweise kann die hemmende Wirkung auf die Metall-katalysierte Oxidation der freien SH-Gruppen als auch auf die Bildung von stabilen Komplexen mit der Beteiligung von SH-Gruppen zurückgeführt werden [65]. Gleiche inhibitorische Effekte durch Kupfer-, Cadmium-, Zinkionen wurden für andere humane Alanyl-Aminopeptidasen beschrieben [97,95,135,164,100].

Die Untersuchung des Chloridionen-Einflusses auf die Enzymaktivität diente vor allem der Abgrenzung gegenüber anderen Aminopeptidasen, da die Ala-pNA-hydrolysierende Aktivität der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9 gegenüber diesen Ionen unbeeinflusst bleibt. Dies unterscheidet sie von der „Chlorid-aktivierbaren Alanyl-Aminopeptidase“ [2] aus dem Zytosol der Erythrozyten, bei der eine maximale Aktivierung durch 0,2 M Chloridionen festgestellt wurde. Eine Aktivierung durch Chloridionen ist eine charakteristische Eigenschaft der Arginyl-Aminopeptidase (EC 3.4.11.6, APB) [18,99].

#### 5.1.6 SENSITIVITÄT GEGENÜBER PUROMYCIN.

Puromycin ist ein Inhibitor der Proteinsynthese, der den Vorgang des programmierten Zelltodes – der Apoptose - in verschiedenen Zelltypen induziert [33,34]. Zur gemeinsamen Charakteristik der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidasen aus verschiedenen Geweben und Zellen gehört ihre hohe Empfindlichkeit gegenüber Puromycin, was sie von den anderen Aminopeptidasen unterscheidet [18]. Weit verbreitet ist daher die Bezeichnung „Puromycin-sensitive Aminopeptidase“ (PSA). Die humanen, zytosolischen Alanyl-Aminopeptidasen unterscheiden sich jedoch stark in ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem charakteristischen Inhibitor – Puromycin. Bisher wurden folgende  $IC_{50}$ -Werte für die Inhibierung durch Puromycin beschrieben:

- Leber zAAP                      0,6  $\mu\text{M}$  [164]
- zAAP aus MOLT-4-Zellen      0,4  $\mu\text{M}$  [75]
- Plazenta zAAP                  2,0  $\mu\text{M}$  [157]
- Erythrozyten zAAP            2,5  $\mu\text{M}$  [3]
- Gehirn zAAP                    6,5  $\mu\text{M}$  [100]
- Nieren zAAP                    20,0  $\mu\text{M}$  [97].

Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert der Inhibierung mit Puromycin beträgt für die zytosolische Alanyl-Amino-peptidase aus den H9-Zellen 3,1  $\mu\text{M}$  und entspricht ungefähr dem der zAAP aus der Erythrozyten (vgl. obige Aufzählung). Mit dem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 20  $\mu\text{M}$  ist die zAAP aus humaner Niere weniger sensitiv gegenüber Puromycin [97].

Zum Vergleich hat die membranständige Alanyl-Amino-peptidase (EC 3.4.11.2) je nach Gewebeherkunft  $\text{IC}_{50}$ -Werte gegenüber Puromycin von 50  $\mu\text{M}$  (Samenflüssigkeit; [59]) bis 90  $\mu\text{M}$  (neuronaies Gewebe; [25]) und gilt als Puromycin-insensitive Amino-peptidase.

#### 5.1.7 SENSITIVITÄT GEGENÜBER AMINOPEPTIDASE-INHIBITOREN

Die Empfindlichkeit gegenüber dem wenig spezifischen Amino-peptidase-Inhibitor Bestatin [132,143] gehört zur gemeinsamen Charakteristik der Amino-peptidasen [147,148,18]. Für die verschiedenen humanen zytosolischen Alanyl-Amino-peptidasen sind die folgenden  $\text{IC}_{50}$ -Werte beschrieben:

- Skelettmuskel zAAP -        0,1  $\mu\text{M}$  [95]
- Gehirn/Nieren zAAP -      0,2  $\mu\text{M}$  [97,100]
- Plazenta zAAP            -      0,25  $\mu\text{M}$  [157]
- Erythrozyten zAAP        -      1,0  $\mu\text{M}$  [3].

Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierte zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9 stimmt hinsichtlich des  $IC_{50}$ -Wertes von  $0,4 \mu M$  mit anderen humanen zAAP gut überein.

Effektiver als Bestatin haben sich spezifische Inhibitoren der membranständigen Alanyl-Aminopeptidase (EC 3.4.11.2) wie Actinonin [151], Probestin [10,167], Phebestin [104] und RB3014 [26] erwiesen. Am effektivsten gegenüber der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase stellten sich Phebestin ( $IC_{50}$ -Wert von  $0,015 \mu M$ ), Probestin ( $IC_{50}$ -Wert von  $0,016 \mu M$ ) und RB3014 ( $IC_{50}$ -Wert von  $0,025 \mu M$ ) dar. Die beiden Aminopeptidasen APN und zAAP lassen sich daher nicht anhand ihrer Empfindlichkeit gegenüber diesen Inhibitoren unterscheiden. Dieses Resultat wirft neue Fragen nach der spezifischen Selektivität dieser APN-Inhibitoren auf. Die Analyse der Aminosäuresequenzen der APN und der zAAP, zeigt eine 40 %ige Ähnlichkeit bei einer 33 %igen Identität [149], die vor allem in drei konservierten Bereichen auftritt. Beide Proteasen gehören zur Familie der Gluzincin-Metallopeptidasen. Um die APN und die zAAP in weiteren Untersuchungen unterscheiden und damit Aussagen zur biologischen Bedeutung treffen zu können, ist die Entwicklung spezifischer Inhibitoren unabdingbar.

#### 5.1.8 SENSITIVITÄT GEGENÜBER PAQ-22

PAQ-22 ist ein neuentwickelter, spezifischer Inhibitor der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase [68]. Der Inhibitor hemmt zAAP auf nicht-kompetitive Weise [145] und basiert auf einer Homophthalimid-Struktur. Bisher wurde lediglich die Hemmung der zAAP aus MOLT-4 Zellen nachgewiesen ( $IC_{50}$ -  $3,8 \mu M$ .; [68]), wogegen neutrale Aminopeptidasen wie APN (Schwein), LAP (Schwein), DPPIV (Schwein), Trypsin (Rind) und Chymotrypsin (Rind) durch PAQ-22 nicht beeinflusst werden.

Die von mir untersuchte, zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus der T-Zelllinie H9 ist sensitiv gegenüber PAQ-22. Der  $IC_{50}$ -Wert für diese Hemmung beträgt  $0,29 \mu M$ . Die membranständige Alanyl-Aminopeptidase (EC 3.4.11.2) aus humaner Niere ist dagegen resistent gegenüber diesem Inhibitor. Damit ist ein Inhibitor verfügbar, der

eine Unterscheidung der beiden Alanyl-Amino-peptidasen in biologischen Systemen ermöglicht.

#### 5.1.9 SUBSTRATSPEZIFITÄT DER ISOLIERTEN ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE

Die zytosolische Alanyl-Amino-peptidase ist als ein Enzym mit breiter Substratspezifität bekannt [11,18,42,56,165], was auch durch eigene Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit belegt wurde. So konnte gezeigt werden, dass die zAAP effektiv Alanin, Methionin, Arginin und Leucin vom N-Terminus der p-Nitro-anilidderivate abspalten kann. Die Abspaltung von Prolin und Glycin hat sich dabei als wenig effektiv erwiesen. Diese Beobachtung wurde auch von anderen Autoren gemacht [11,42]. Die Affinität des Enzyms zum Substrat beschreibt in diesem Zusammenhang die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ). Basierend auf den ermittelten  $K_m$ -Werten sieht die Substrat-Affinitätsreihenfolge der zytosolischen Alanyl-Amino-peptidase aus der T-Zelllinie H9 wie folgt aus: Leu- > Arg- > Met- > Ala-pNA. Damit zeigt das Enzym die höchste Affinität zu Leucin und nicht, wie der Name suggeriert, zu Alanin. Alanin-pNA wird jedoch *in vitro* schneller hydrolysiert, was im hohem  $V_{max}$ -Wert seinen Niederschlag findet. Die Situation, die mit hoher Wahrscheinlichkeit *in vivo* vorkommt, wird durch den Quotienten von  $V_{max}/K_m$  oder  $k_{cat}/K_m$  widergespiegelt [127]. Auf der Grundlage dieser Bewertung wird das Leucin-Derivate *in vivo* wahrscheinlich am besten umgesetzt, da es den höchsten  $k_{cat}/K_m$ -Wert erreichte. Danach folgen Arginin- und Methionin-pNA. Die Substratspezifität und die Kinetik-Konstanten der identifizierten zAAP wurde mit Hilfe von p-Nitroaniliden (zAAP aus Plazenta, H9-Zellen), AMC (zAAP aus Leber, Gehirn, Niere, Skelettmuskel) und  $\beta$ -Naphthylamiden untersucht (zAAP aus Erythrozyten, U937-Zellen). Die  $K_m$ -Werte von zAAP's aus verschiedenen Geweben unterschieden sich trotz Verwendung des gleichen Substrates (Ala-AMC) und bei gleicher Methode beträchtlich. So wurden für die zAAP des humanen Skelettmuskels ein  $K_m$ -Wert von 70  $\mu$ M [95], des humanen Gehirns ein  $K_m$ -Wert von 170  $\mu$ M [100]

und der humanen Niere ein  $K_m$ -Wert von 200  $\mu\text{M}$  [97] bestimmt. Im Ansatz vergleichbar mit dieser Arbeit ist die Bestimmung des Ala-pNA  $K_m$ -Werte für die zAAP aus der humanen Plazenta mit 510  $\mu\text{M}$  [157]. Dieser Wert weicht auch wesentlich von dem für die zytosolische Alanyl-Amino-peptidase der H9-Zellen ermittelten  $K_m$ -Wert (217  $\mu\text{M}$ ) ab.

Festzustellen ist die generelle Tendenz, dass die zAAP die höchste Affinität gegenüber basischen und langen, aliphatischen Aminosäuren besitzt [11,42,135]. Die Affinitätsreihenfolge für Substrate zytosolischer Amino-peptidasen ist vergleichbar mit Ergebnissen, die für die zAAP aus der T-Zelllinie H9 erhalten wurde:

zAAP aus H9-Zellen	Leu > Arg > Met > Ala-pNA;
zAAP aus Leber	Arg > Met > Leu > Lys > Phe > Ala- AMC;
zAAP aus Schwein Skelettmuskel	Leu = Arg > Lys > Met > Phe > Ala- AMC;
zAAP aus Erythrozyten	Lys > Arg > Leu > Met > Phe > Tyr- $\beta$ -NA
zAAP aus neutrophilen Granulozyten des Rinderblutes	Lys > Leu > Arg > Phe > Ala- $\beta$ -NA.

In der vorliegenden Arbeit wurden Peptid-Substrate, die meist ein Methionin am N-Terminus hatten, hinsichtlich ihres Umsatzes durch die isolierte zAAP untersucht. Trotz der gleichen Aminosäure an der P1-Position, konnten Unterschiede festgestellt werden. Dieser Befund legt nahe, dass die Aminosäure an der zweiten Position der Peptid-Substrate ebenfalls eine Rolle spielt. Ob jedoch, wie in anderen Studien vermutet, kurze aliphatische [100] oder basische [11] Aminosäuren die Spezifität erhöhen, konnte auch durch meine Untersuchungen nicht geklärt werden. Die jeweils am besten umgesetzten Substrate entsprachen beiden Theorien. Andererseits konnte in einigen Fällen nachgewiesen werden, dass ein Prolin an der zweiten Position die Stabilität des Peptides erhöht. Ein typisches Beispiel dafür ist Bradykinin, welches wie Substanz P nicht durch die zytosolische Alanyl-Amino-peptidase umgesetzt wird [95,97,100].

Die Länge der Aminosäurekette soll ebenfalls eine wichtige Rolle spielen, da kurze Peptide bevorzugt werden [42,44,56]. Dieser limitierende Einfluss kann angesichts

der gewonnenen Ergebnisse für die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase der H9-Zellen nicht bestätigt werden. Die beste Hydrolyse wurde für das mit 13 Aminosäuren längste Substrat erzielt.

#### 5.1.10 IMMUNREAKTIVITÄT DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE

Obwohl spezifische zAAP-Antikörper existieren, kann eine Kreuzreaktivität mit anderen Mitgliedern der Gluzincin Familie nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die eigenen Untersuchungen haben dabei eine Kreuzreaktion monoklonaler APN-Antikörper mit der isolierten zAAP belegt. Beide Proteasen gehören zur oben erwähnten Zinkpeptidasen-Familie. Murray und Mitarbeiter [103] zeigten eine Reaktion spezifischer APN-Antikörpern mit dem Zytosol von Jurkat-Zellen. Es könnte sich dabei um eine Bindung der Antikörper an die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase handeln. Diese Daten verdeutlichen, wie schwierig es ist, die beiden Aminopeptidasen zAAP und APN aufgrund ihrer Reaktion mit spezifischen APN-Antikörpern als auch der Inhibierbarkeit mit spezifischen APN-Inhibitoren, voneinander zu unterscheiden.

Insgesamt zeigt die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase aus der humanen T-Zelllinie H9 in ihrer Charakteristik quantitative wie auch qualitative Differenzen zu den bisher beschriebenen zAAP-Formen aus anderen Geweben. Die vorgestellten Unterschiede in den biochemischen Eigenschaften können als die notwendige Anpassung an das jeweilige Gewebe interpretiert werden und gewebespezifische Modifikationen repräsentieren. Die beschriebenen Differenzen in den biochemischen Daten erschweren oft die Zuordnung des Enzyms zu einer bekannten Protease. Dies wird erst durch eine Isolation mit nachfolgender massenspektrometrischer Untersuchung möglich.

---

## 5.2 STIMULATIONSABHÄNGIGE EXPRESSION DER ZYTOSOLISCHEN ALANYL-AMINOPEPTIDASE IN PERIPHEREN T-LYMPHOZYTEN

Nachdem das Vorkommen der zytosolische Alanyl-Aminopeptidase in der T-Zelllinie H9 nachgewiesen wurde, lag es nahe, die Expression dieses Enzyms in peripheren T-Lymphozyten zu untersuchen. Mit dieser Arbeit wird zum ersten Mal eine stimulationsabhängige Induktion der Expression der mRNA der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase in peripheren T-Lymphozyten nachgewiesen. Sowohl PHA/PMA als auch PMA/PWM bewirkten nach 24 Stunden einen drastischen Anstieg der zAAP-mRNA-Menge. Die Stimulierbarkeit der Expression ist ein deutlicher Hinweis der Beteiligung der zAAP an der T-Zell-Aktivierung.

Eine stimulationsabhängige Induktion der Expression von Aminopeptidasen im Immunsystem wurde in verschiedenen Untersuchungen sowohl auf der Ebene der Protein-Expression als auch durch die Erhöhung der enzymatischen Aktivitäten dokumentiert [5,19,20,52,76,22,15].

Eine signifikante Erhöhung der Leu- und Ala-Aminopeptidase-Aktivitäten in intakten Thymocyten konnte nach einer Concanavalin A-Stimulation beobachtet werden [19]. Auf der Oberfläche von humanen Lymphozyten konnten Ala-pNa-hydrolysierende Aktivitäten nach einer 72-stündigen Inkubation mit Concanavalin A oder PHA nachgewiesen werden [5]. Ein wesentliches Ergebnis unserer Arbeitsgruppe ist, dass die mRNA-Expression der Aminopeptidase N (APN EC 3.4.11.2) von mononukleären Zellen (MNZ) und T-Zellen nach Stimulation *in vitro* mit unterschiedlichsten Effektoren (z.B. Mitogenen, Interleukinen, Antigenen) erhöht ist [82,87]. Der Grad der Stimulation der Zellen lässt sich dabei mit spezifischen Aminopeptidase-Inhibitoren verändern. Eine hemmende Wirkung auf die Proliferation und die Expression unterschiedlichster Gene (z.B. IL-2) konnte durch spezifische APN-Inhibitoren wie z.B. Leuhistin, RB3014 oder Actinonin bewirkt werden [9,80,81,83,84,87,166].

Auch für die zytosolisch lokalisierten Arginyl-Aminopeptidase [20] und Leucyl-Aminopeptidase [74] konnte die stimulationsabhängige Erhöhung der enzymatischen

Aktivität nachgewiesen werden, wobei die Stimulierung durch PWM nur eine leichte Aktivierung der LAP ergab. Die *in vitro* erreichte Induktion der zytosolischen Aminopeptidasen konnte auch durch spezifische Inhibitoren reguliert werden. So konnte die Expression der Arginyl-Aminopeptidase durch den spezifischen Inhibitor Arphamenin B herabreguliert werden [20]. Der Aminopeptidase-Inhibitor Bestatin erzielte dagegen eine induzierende Wirkung in *in vitro* stimulierten Lymphozyten [128].

Die in dieser Arbeit eingesetzten APN-Inhibitoren RB 3014 und Actinonin, erzielten in ihrer Wirkung auf die Expression der zAAP abhängig von der Stimulator-kombination völlig unterschiedliche Resultate. So zeigten die Inhibitoren nur bei PHA/PMA-stimulierten T-Zellen eine Hemmung der zAAP-mRNA Expression. Ein völlig anderes Resultat wurde bei T-Zellen beobachtet, die durch PWM/PMA stimuliert wurden. Hier führte die Behandlung mit dem spezifischen APN-Inhibitor RB3014 zu einer Induktion der Expression der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase. Actinonin und Leuhistin hatten hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die zAAP-Expression. Eine Erklärung für die hier festgestellten Unterschiede könnte in den verschiedenen Stimulationsmechanismen bzw. Signaltransduktionswegen liegen, über welche jeweils die Aktivierung der Zellen vermittelt wird.

Neben den *in vitro* Befunden konnte auch auf Lymphozyten aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis eine erhöhte Expression der APN nachgewiesen werden [76]. Insgesamt vermutet man daher, dass die Exopeptidasen eine modulierende Wirkung auf proliferative Prozesse von Immunzellen besitzen könnten. Die Bedeutung der zytosolisch lokalisierten Aminopeptidasen an diesen immunologischen Prozessen ist zur Zeit noch nicht aufgeklärt.

---

### 5.3 FUNKTION DER ZAAP

Nachdem die humane zAAP als hauptsächlich zytosolisch lokalisiert beschrieben wurde [39,42], blieb die Funktion *in vivo* zunächst unklar. Ein Vorkommen im Nukleus und an den Mikrotubuli des Spindelapparates mitotischer Zellen [28] führte zu einer Diskussion über die Beteiligung an der Zell-Zyklus-Regulation. Daneben wird die zAAP als Kandidat des Enkephalin-Metabolismus im Gehirn betrachtet [53,102]. Weitere Studien wiesen dem Enzym eine entscheidende Rolle in der Inaktivierung verschiedener Neuropeptide wie Somatostatin, Cholecystokinin und Dynorphin zu [62,53,55,102,127,36]. Bisher konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen den Mengen von zAAP und der Lokalisation von Neuropeptiden gefunden werden. In verschiedenen Gebieten von *post mortem* Gehirnen von Schizophrenie-Patienten wurden signifikant niedrigere Mengen von zAAP im Vergleich zum gesunden Gehirn festgestellt [63].

Mit der „goku“ Maus, in der das Gen der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase mutiert ist, steht seit kurzer Zeit ein gutes Modell zur Untersuchung der Rolle der zAAP *in vivo* zur Verfügung [112]. Die „goku“ Mäuse sind kleinwüchsig und zeigen einige Abweichungen vom normalen Verhalten bezüglich Schmerz- und Angstempfindlichkeit [112]. Dieser Phänotyp wird dem Fehlen der zAAP zugeschrieben. Weitere Versuche zeigten, dass die weiblichen „goku“ Mäuse unfruchtbar sind [113,114] und eine verzögerte Bildung des *Corpus Luteum* aufwiesen. Männliche „goku“ Mäuse sind kopulationsunfähig und weisen eine beeinträchtigte Spermato-genese auf. Diese Defizite lassen sich nicht mit der Verabreichung von Androgenen wiederherstellen [114]. Im Zusammenhang mit der starken Expression der zAAP im Gehirn und in den Sertoli-Zellen kann eine Beteiligung an den von Hormonen vermittelten Signalwegen vermutet werden [114]. Andere Studien berichten von einer Abhängigkeit der zAAP-Aktivität vom Östrogengehalt [35], was diese Hypothese unterstützen würde. Der genaue Mechanismus bleibt allerdings ungeklärt.

Neueste Daten zeigen, dass die zAAP innerhalb des Antigenprozessierungsweges für Liganden der MHC-Klasse I Moleküle nach dem Proteasom als „trimming peptidase“ fungieren kann [142]. Die zytosolische Alanyl-Aminopeptidase übernimmt dabei

zusammen mit der Bleomycin-Hydrolase die endgültige N-Terminale Prozessierung in einer redundanten Weise. Durch diese Redundanz ist eine effizientere Generierung von CTL-Epitopen möglich, die es Viren und Tumorzellen erschwert, vom Immunsystem nicht entdeckt zu werden. Da neben diesem Befund auch die stimulationsabhängige Induktion der Expression der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase für eine Rolle der zAAP in der Immunantwort spricht, ist die Frage interessant, ob das Fehlen des Enzyms Auswirkungen auf das Immunsystem nach sich zieht. Zur näheren Beschreibung würden sich dann vorrangig „knockout“ bzw. „goku“ Mäuse eignen.

Um weitere Funktionen der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase aufzudecken, ist die Suche nach natürlichen Substraten und hochspezifischen Inhibitoren für dieses Enzym eine vordringliche Aufgabe. Vor kurzem wurde ein zAAP-Inhibitor, PIQ-22 (bzw. PAQ-22), entwickelt. PIQ-22 oder PAQ-22 sind Phthalimid-Derivate, die das Enzym auf nicht kompetitive Weise hemmen. Bisher wurde der Inhibitor gegenüber der tierischen APN, LAP, DPiV, Trypsin und Chymotrypsin getestet und es konnte keine Hemmung festgestellt werden. Die eigenen Untersuchungen bringen die Bestätigung für die inhibitorische Wirkung von PAQ-22 auf die zAAP aus der T-Zelllinie H9 und zeigen gleichzeitig, dass auch die humane APN resistent gegenüber PAQ-22 ist. Weitere Untersuchungen müssen die exakte Spezifität gegenüber der zAAP noch belegen. Dieser Inhibitor kann die Tumor-Invasion *in vitro* verhindern [145,75,68]. Bisher wurde keine direkte Beteiligung der zAAP an der Tumor-Invasion untersucht.

Auf der anderen Seite konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die bekannten APN-Inhibitoren auch auf die zAAP einen inhibitorischen und regulatorischen Effekt erzielen können. Dieses Ergebnis stellt einen therapeutisch interessanten Aspekt dar, der weitergehender Erklärung bedarf.

---

## 5.4 ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Im Zytosol der humanen T-Zelllinie H9 wurde eine zytosolische Alanyl-Aminopeptidase EC 3.4.11.14 molekular identifiziert und biochemisch charakterisiert. Dazu wurde das Enzym zunächst unter Nutzung der Methoden der FPLC-Chromatographie gereinigt und dann mittels Massenspektrometrie (Maldi-TOF) der zAAP zugeordnet. Die biochemischen Eigenschaften der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase (zAAP) aus H9-Zellen zeigten Gemeinsamkeiten aber auch Differenzen im Vergleich zu bisher bekannten zytosolischen Alanyl-Aminopeptidasen aus anderen humanen Geweben. Allen zAAP-en gemeinsam ist die Eigenschaft der Metallo- und Thiolpeptidase sowie eine breite Substratspezifität. Sie sind sensitiv gegenüber dem Inhibitor Puromycin, wobei quantitative Unterschiede vorhanden sind. Die wichtigsten Differenzen wurden in der Aktivierung durch Metallionen und im pH-Optimum der Enzymaktivität festgestellt. Dies könnte auf eine Anpassung der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase an die Funktion im jeweiligen Gewebe hinweisen. Die zytosolische Aminopeptidase aus humanen Erythrozyten weist die höchste Ähnlichkeit mit der zAAP aus der T-Zelllinie H9. Ein Vergleich der Eigenschaften der bisher beschriebenen humanen zAAP's wurde in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Biochemische Eigenschaften der bisher aus humanen Geweben und Zellen charakterisierten zytosolischen Alanyl-Aminopeptidasen.

Humane zytosolische Alanyl-Aminopeptidasen (EC 3.4.11.14)								
Eigenschaft	H9-Zellen	Gehirn	Niere	Skelett- muskel	Plazenta	Augen -linse	Leber	Ery- thro- zyten
Molekularmasse (kDa)	<b>101</b>	105	103	102	95	100	98	110
pH-Optimum	<b>6,5</b>	7,3	7,3	7,3	8,0	6,0	7,5	6,0-7,0
Substratspezifität*	<b>Ala-, Leu-, Phe-, Arg-, Lys-, Met-</b>							
K <sub>m</sub> Wert (Ala-Substrate)	<b>217 µM (-pNA)</b>	170 µM (-AMC)	200 µM (-AMC)	70 µM (-AMC)	510 µM (-pNA)	n.v.	n.v.	n.v.
Aktivierung mit Metallionen	<b>Co<sup>++</sup></b>	Ca <sup>++</sup>	Ca <sup>++</sup>	Ca <sup>++</sup>	n.v.	Mn <sup>++</sup> Co <sup>++</sup>	n.v.	Co <sup>++</sup>
Puromycin (IC <sub>50</sub> -Wert)	<b>3,1 µM</b>	6,5 µM	20 µM	n.v.	2,0 µM	n.v.	0,6 µM	2,5µM
Metallchelatoren	<b>Sensitiv</b>							
Thiolproteasen- Inhibitoren	<b>Sensitiv</b>							
Bestatin	<b>Sensitiv</b>							

\* Für die Charakterisierung wurden Aminosäure-pNA, -AMC oder β-NA – Derivate genutzt.

n.v. – nicht vorhanden

Die hohe Sensitivität der charakterisierten zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase gegenüber Aminopeptidase N (APN)-Inhibitoren wie Phebestin, Probestin oder RB3014, kann mit einer hohen Ähnlichkeit der katalytischen Motive beider

---

Peptidasen erklärt werden. Beide gehören zur Zinkpeptidasenfamilie (Zinkine) mit einem Zn-bindenden Motiv im aktiven Zentrum. Da auch einige APN-Antikörper gegen die Struktur des aktiven Zentrums gerichtet sind, wurde eine Kreuzreaktivität mit der zAAP aus der T-Zelllinie H9 beobachtet. Dies betraf den monoklonalen WM15-Antikörper als auch das 7B-Antiserum. Nicht betroffen war der Leu-M7 Antikörper, der direkt neben dem katalytischen Zentrum der APN bindet.

Auf der Inhibitorebene lassen sich beide Aminopeptidasen, zAAP und APN, mit dem Thiolpeptidasen-Inhibitor Iodacetamid und dem neuentwickelten Inhibitor PAQ-22 sicher voneinander unterscheiden, da die Aminopeptidase N gegenüber beiden Inhibitoren resistent ist.

Die Expression der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase in peripheren T-Zellen konnte durch PHA/PMA und PWM/PMA induziert werden. Diese aktivierungsabhängige Expression wurde auf der mRNA-Ebene mit Hilfe der quantitativen RT-PCR-Technik gemessen. Das belegt eine Beteiligung der zytosolischen Alanyl-Aminopeptidase an der Immunantwort. Die induzierbare Aktivierung des Enzyms konnte auch durch die Behandlung mit verschiedenen APN-Inhibitoren modifiziert werden. Der Effekt der Wirkung war dabei abhängig von den verwendeten Mitogen-Kombinationen.



## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology (NC-IUBMB), Enzyme Supplement 5 (1999). Eur.J.Biochem. 264(2):610-650, 1999
- [2] Abramic M, Vitale L: New chloride-activated aminopeptidase from human erythrocytes. FEBS Letters 253:79-82, 1989
- [3] Abramic M, Vitale L: Basic Amino Acids Preferring Broad Specificity Aminopeptidase from Human Erythrocytes. Biol.Chem.Hoppe-Seyler 373:375-380, 1992
- [4] Aitken A, Learmonth M: Carboxymethylation of Cysteine using Iodacetamide/Iodacetic Acid, chap. 51, in The Protein Protocols Handbook, edited by John M.Walker 1996, pp 339-340
- [5] Amoscato AA, Alexander JW, Babcock W: Surface aminopeptidase activity of human lymphocytes. Biochemical and biologic properties of intact cells. J.Immunolog. 142(4):1245-1252, 1989
- [6] Ansorge S, Bühling F, Kähne T, Lendeckel U, Reinhold D, Träger M, Wrenger S: CD 26/dipeptidyl peptidase IV in lymphocyte growth regulation. Adv.Exp.Med.Biol. 421:127-140, 1997
- [7] Ansorge S, Langner J: *Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases* (vol 421). Plenum Press, New York, 1997
- [8] Anton LC, Snyder HL, Bennink JR, Vinitsky A, Orłowski M, Porgador A, Yewdell JW: Dissociation of proteasomal degradation of biosynthesized viral proteins from generation of MHC class I-associated antigenic peptides. J Immunol. 160:4859-4868, 1998
- [9] Aoyagi T, Yoshida S, Matsuda N, Ikeda T, Hamada M, Takeuchi T: Leuhistin, a new inhibitor of Aminopeptidase M, produced by *Bacillus laterosporus* BM156-14F1. The Journal of Antibiotics (Tokyo) 44 No.6:573-578, 1991

- 
- [10] Aoyagi T, Yoshida S, Nakamura Y, Shigihara Y, Hamada M, Takeuchi T: Probestin, a new inhibitor of aminopeptidase M, produced by *Streptomyces azureus* MH663-2F6. I. Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J Antibiot.(Tokyo)* 43:143-148, 1990
- [11] Aratani H, Kawata S, Tsuruyama S, Yoshida N, Makisumi S: Purification and Characterization of an Aminopeptidase from Bovine Leukocytes. *J.Biochem.* 96:107-115, 1984
- [12] Arfin SM, Bradshaw RA: Cotranslational processing and protein turnover in eukaryotic cells. *Biochemistry* 27:7979-7984, 1988
- [13] Arfin SM, Kendall RL, Hall L, Weaver LH, Stewart AE, Matthews BW, Bradshaw RA: Eukariotic methionyl aminopeptidases: Two classes of cobalt-dependent enzymes. *Biochemistry* 92:7714-7718, 1995
- [14] Arndt M, Lendeckel U, Spiess A, Faust J, Neubert K, Reinhold D, Ansorge S: Dipeptidyl peptidase IV (DP IV/CD26) mRNA expression in PWM-stimulated T-cells is suppressed by specific DP IV inhibition, an effect mediated by TGF-beta(1). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 274:410-414, 2000
- [15] Arndt M, Reinhold D, Lendeckel U, Spiess A, Faust J, Neubert K, Ansorge S: Specific inhibitors of dipeptidyl peptidase IV suppress mRNA expression of DP IV/CD26 and cytokines. *Adv.Exp.Med.Biol.* 477:139-143, 2000
- [16] Ashmun RA, Look TA: Metalloprotease Activity of CD13/Aminopeptidase N on the Surface of Human Myeloid Cells. *Blood* 75 No.2:462-469, 1990
- [17] Bank U, Kruger S, Langner J, Roessner A: Review: peptidases and peptidase inhibitors in the pathogenesis of diseases. Disturbances in the ubiquitin-mediated proteolytic system. Protease-antiprotease imbalance in inflammatory reactions. Role of cathepsins in tumour progression. *Adv.Exp.Med.Biol.* 477:349-378, 2000
- [18] Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF: *Handbook of Proteolytic Enzymes.* (vol 343), Academic Press. ed. 1998
- [19] Bauvois B: Murine thymocytes possess specific cell surface-associated exoaminopeptidase activities: preferential expression by immature CD4-CD8-subpopulation. *Eur.J.Immunol.* 20:459-468, 1990
- [20] Belhacene N, Mari B, Rossi B: Characterization and purification of T lymphocyte aminopeptidase B: a putative marker of T cell activation. *Eur.J.Immunol.* 23:1948-1955, 1993

- [21] Boes B, Hengel H, Ruppert T, Multhaup G, Koszinowski UH, Kloetzel PM: Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J.Exp.Med.* 179(3):901-909, 1994
- [22] Bongiorno L, Marini M, Urbani A, Ausiello CM, Roda LG: Effect of stimulation on soluble proteolytic enzymes released by peripheral blood mononuclear cells. *Int J Immunopharmacol* 15(5):621-629, 1993
- [23] Boyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *J.Clin.Invest.* 22:923-930, 1968
- [24] Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israel A: A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol.Cell* 5:207-216, 2000
- [25] Brownlees J, Williams CH: Peptidases, peptides, and the mammalian blood-brain barrier. *J Neurochem.* 60:793-803, 1993
- [26] Chen H, Roques BP, Fournie-Zaluski MC: Design of the first highly potent and selective aminopeptidase N (EC 3.4.11.2) inhibitor. *Bioorg. Med.Chem.Lett.* 9:1511-1516, 1999
- [27] Chen W, Norbury CC, Cho Y, Yewdell JW, Bennink JR: Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J Exp.Med.* 193:1319-1326, 2001
- [28] Constam DB, Rensing-Ehl A, Kemler K, Hersh LB, Fontana A: Puromycin-sensitive Aminopeptidase. *The Journal of Biological Chemistry* 270, No.45:26931-26939, 1995
- [29] Constam DB, Tobler AR, Schmitt-Gräff A, Malipiero U, Schlapbach R, Fontana A: Cloning of the Puromycin-Sensitive Aminopeptidase and Evidence for Expression in Neurons. *J.of Neurochemistry* 68:889-897, 1997
- [30] Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, Alhenc-Gelas F: Angiotensin I - converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem.J* 290 ( Pt 1):33-40, 1993
- [31] Cotrell GS, Hooper NM, Turner AJ: Cloning, expression, and characterization of human cytosolic aminopeptidase P: a single Manganase(II)-dependent enzyme. *Biochemistry* 39 (49):15121-15128, 2000
- [32] Coux O, Tanaka K, Goldberg AL: Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu.Rev.Biochem.* 65:801-847, 1996

- [33] Davidoff AN, Mendelov BV: Unexpected cytokinetic effects by puromycin include a G2-arrest, a metaphase-mitotic-arrest, and apoptosis. *Leukemia Res.* 16:1077-1085, 1992
- [34] Davidoff AN, Mendelov BV: Substituted purines elicit differential cytokinetic, molecular and phenotypic effects in HL-60 cells. *Exp.Hematol.* 21:456-460, 1993
- [35] de Gandarias JM, Irazusta J, Gil J, Fernandez D, Casis L: Brain soluble and membrane-bound Tyr-aminopeptidase activities during the stages of estrous and proestrous in the female rat. *Brain Res.* 620(1):146-148, 1993
- [36] de Souza ANC, Bruno JA, Carvalho KM: An enkephalin degrading Aminopeptidase of human brain preserved during the vertebrate phylogeny. *Comp.Biochem.Physiol.* 99 C:363-367, 1991
- [37] Desser L, Holomanova D, Zavadova E, Pavelka K, Mohr T, Herbacek I: Oral therapy with proteolytic enzymes decreases excessive TGF-beta levels in human blood. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 47 Suppl:S10-S15, 2001
- [38] Doedens JR, Black RA: Stimulation-induced down-regulation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol.Chem.* 275:14598-14607, 2000
- [39] Dyer SH, Slaughter CA, Moomaw CR, Hersh LB: Comparison of the Soluble and Membrane-Bound Forms of the Puromycin-Sensitive Enkephalin-Degrading Aminopeptidases from Rat. *J.of Neurochemistry* 54:547-554, 1990
- [40] Engelbrecht S, Macartey HW, Pieper S, Rautenberg W, Tschesche H, Wenzel HR: Separation of the human Leucocyte Enzymes. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 363:305-315, 1982
- [41] Erbeznik H, Hersh LB: A Novel Mammalian High-Molecular-Weight Aminopeptidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 344 No.1:228-234, 1997
- [42] Flores M, Aristoy MC, Toldra F: HPLC Purification and Characterization of Soluble Alanyl Aminopeptidase from Porcine Skeletal Muscle. *J.of Agricultural and Food Chemistry* 44, No.9:2578-2583, 1996
- [43] Gaczynska M, Rock KL, Goldberg AL: Role of proteasomes in antigen presentation. *Enzyme Protein* 47:354-369, 1993
- [44] Gibson AM, McDermott JR, Lauffart B, Mantle D: Specificity of action of human brain alanyl aminopeptidase on leu-enkephalin and dynorphin-related peptides. *Neuropeptides* 13:259-262, 1989

- 
- [45] Glickman MH: Getting in and out of the proteasome. *Semin.Cell Dev.Biol.* 11(3):149-158, 2000
- [46] Goding JW: Ecto-enzymes: physiology meets pathology. *J Leukoc.Biol.* 67:285-311, 2000
- [47] Grdisa M, Vitale L: Types and Localisation of Aminopeptidases in Different Human Blood Cells. *Int.J.Biochem.* 23 No.3:339-345, 1991
- [48] Griffin TA, Nandi D, Cruz M, Fehling HJ, Kaer LV, Monaco JJ, Colbert RA: Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J Exp.Med.* 187:97-104, 1998
- [49] Grisk O, Küster U, Ansorge S: The activity of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in population of mononuclear cells from human peripheral blood. *Biol.Chem.Hoppe-Seyler* 374:287-290, 1993
- [50] Harris ELV, Angal S: *Protein purification methods.* 1989.
- [51] Heemels MT, Ploegh H: Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu.Rev.Biochem.* 64:463-491, 1995
- [52] Hendriks D, De Meester I, Umiel T, Vanhoof G: Aminopeptidase P and dipeptidyl peptidase IV activity in human leukocytes and stimulated lymphocytes. *Clinica Chimica Acta* 196:96, 1991
- [53] Hersh LB: Solubilization and Characterization of Two Rat Brain Membrane-Bound Aminopeptidases Active on Met-Enkephalin. *Biochemistry* 20:2345-2350, 1981
- [54] Hersh LB: Characterization of Membrane-Bound Aminopeptidases from Rat Brain: Identification of the Enkephalin-Degrading Aminopeptidase. *J.of Neurochemistry* 44:1427-1435, 1985
- [55] Hersh LB, McKelvy JF: An Aminopeptidase from Bovine Brain which catalyzes the Hydrolysis of Enkephalin. *J.of Neurochemistry* 36:171-178, 1981
- [56] Hiroi Y, Endo Y, Natori Y: Purification and properties of an aminopeptidase from rat-liver cytosol. *Arch.Biochem.Biophys.* 294:440-445, 1992
- [57] Hooper N: Families of zinc metalloproteases. *FEBS Letters* 354:1-6, 1994
- [58] Hooper NM, Turner AJ: Protein processing mechanisms: from angiotensin-converting enzyme to Alzheimer's disease. *Biochem.Soc.Trans.* 28:441-446, 2000

- 
- [59] Huang K, Takahara S, Kinouchi T, Takeyama M, Ishida T, Ueyama H, Nishi K, Ohkubo I: Alanyl aminopeptidase from human seminal plasma: purification, characterization, and immunohistochemical localization in the male genital tract. *J Biochem.(Tokyo)* 122:779-787, 1997
- [60] Hui KS, Hui MP, Lajtha A: Major Rat Brain Membrane-Associated and Cytosolic Enkephalin-degrading Aminopeptidases: Comparison studies. *Journal of Neuroscience Research* 20:231-240, 1988
- [61] Hui KS, Hui MP, Lajtha A, Saito M: Cellular Localization of Puromycin-Sensitive Aminopeptidase Isozymes. *Neurochemical Research* 15 No.12:1147-1151, 1990
- [62] Hui KS, Wang Y, Lajtha A: Purification and Characterization of an Enkephalin Aminopeptidase from Rat Brain Membranes. *Biochemistry* 22 No.5:1062-1067, 1983
- [63] Hui M, Budai ED, Lajtha A, Palkovits M, Hui KS: Changes in puromycin-sensitive aminopeptidases in post mortem schizophrenic brain regions. *Neurochem.Int.* 4/5:433-441, 1995
- [64] Janeway CA, Travers P: *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1997
- [65] Jocelyn PC: *Biochemistry of the SH Group*, Academic Press, London, New York ed. 1972, 77-100
- [66] Julius MH, Simpson E, Herzenberg LA: A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur.J.Immunol.* 3:645-649, 1973
- [67] Kahne T, Lendeckel U, Wrenger S, Neubert K, Ansorge S, Reinhold D: Dipeptidyl peptidase IV: a cell surface peptidase involved in regulating T cell growth (review). *Int.J Mol.Med.* 4:3-15, 1999
- [68] Kakuta H, Koiso Y, Takahashi H, Nagasawa K, Hashimoto Y: Novel specific puromycin-sensitive aminopeptidase inhibitors:3-(2,6-Diethylphenyl)-2,4 (1*H*,3*H*)-Quinazolin-2-one and N-(2,6-Diethylphenyl)-2-Amino-4*H*-3,1-Benzoxazin-4-One. *Heterocycles* 55, No.8:1433-1438, 2001
- [69] Kehlen A, Gohring B, Langner J, Riemann D: Regulation of the expression of aminopeptidase A, aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 in renal carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by cytokines and cAMP-increasing mediators. *Clin.Exp.Immunol.* 111:435-441, 1998

- [70] Kenny AJ, Turner A, Murray H: The aminopeptidase activity in the human T-cell lymphoma line (Jurkat) is not at the cell surface and is not aminopeptidase N (CD13). *Biochem.J* 298:353-360, 1994
- [71] Kleber HP, Schlee D, Schöpp W: *Biochemisches Praktikum*. VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1988
- [72] Kleining H, Sitte M: *Zellbiologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm., 1999
- [73] Kohno H, Kanno T: Intracellular localization and properties of aminopeptidases in human peripheral lymphocytes. *Int.J.Biochem.* 17:1143-1148, 1985
- [74] Kohno H, Kanno T: Properties and activities of aminopeptidases in normal and mitogen-stimulated human lymphocytes. *Biochem.J.* 226:59-65, 1985
- [75] Komoda M, Kakuta H, Takahashi H, Fujimoto Y, Kadoya S, Kato F, Hashimoto Y: Specific inhibitor of puromycin-sensitive aminopeptidase with a homophthalimide skeleton: identification of the target molecule and a structure-activity relationship study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9(1):121-131, 2001
- [76] Kunz D, Bühling F, Hutter HJ, Aoagi T, Ansorge S: Aminopeptidase N (CD13, EC 3.4.11.2) occurs on the surface of resting and concavalin A-stimulated lymphocytes. *Biol.Chem.Hoppe-Seyler* 374(4):291-296, 1993
- [77] Langner J, Ansorge S: *Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases 2*. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, 2000
- [78] Lasch J, Moschner S, Sann H, Zellmer S, Koelsch R: Aminopeptidase P a cell-surface antigen of endothelial and lymphoid cells: catalytic and immunohistological evidences. *Biol.Chem.* 379:705-709, 1998
- [79] Lauffart B, Mantle D: Rationalization of aminopeptidase activities in human skeletal soluble extract. *Biochimica et Biophysica Acta* 956:300-306, 1988
- [80] Lendeckel U, Arndt M, Frank K, Wex T, Ansorge S: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (review). *Int J Mol.Med.* 4:17-27, 1999
- [81] Lendeckel U, Kahne T, Arndt M, Frank K, Ansorge S: Inhibition of alanyl aminopeptidase induces MAP-kinase p42/ERK2 in the human T cell line KARPAS-299. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 252:5-9, 1998
- [82] Lendeckel U, Kähne T, Riemann D, Neubert K, Arndt M, Reinhold D: Review: The Role of Membrane peptidases in Immune Functions, in Cellular

---

Peptidases in Immune Functions and Diseases 2, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York ed., edited by Langner and Ansorge 2000, pp 1-24

- [83] Lendeckel U, Scholz B, Arnd M, Frank K, Spiess A, Chen A, Roques B, Ansorge S: Inhibition of Alanyl-Amino-peptidase Suppress the Activation-Dependent Induktion of Glykogen Synthase Kinase-3 $\beta$  in Human T cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 273:62-65, 2000
- [84] Lendeckel U, Wex T, Ittenson A, Arndt M, Frank K, Mayboroda O, Schubert W, Ansorge S: Rapid mitogen-induced amino-peptidase N surface expression in human T cells is dominated by mechanism independent of de novo protein biosynthesis. *Immunobiology* 197:55-69, 1997
- [85] Lendeckel U, Wex T, Kähne T, Frank K, Reinhold D, Ansorge S: Expression of the Amino-peptidase N (CD13) Gene in the Human T Cell Lines HuT78 and H9 Cellular Immunology 153:214-226, 1994
- [86] Lendeckel U, Wex T, Reinhold D, Arndt M, Ittenson A, Frank K, Ansorge S: Activation-dependent induction of T cell alanyl amino-peptidase and its possible involvement in T cell growth. *Adv.Exp.Med.Biol.* 421:59-66, 1997
- [87] Lendeckel U, Wex T, Reinhold D, Kähne T, Frank K, Faust J, Neubert K, Ansorge S: Induction of the membrane alanyl amino-peptidase gene and surface expression in human T-cells by mitogenic activation. *Biochem.J* 319:817-821, 1996
- [88] Letarte M, Vera S, Tran R, Addis JB, Onizuka RJ, Quackenbush EJ, Jongeneel CV, McInnes R: Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J.Exp.Med.* 168(4):1247-1253, 1988
- [89] Li X, Chang YH: Evidence that the human homologue of a rat initiation factor-2 associated protein (p<sup>67</sup>) is a methionine amino-peptidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 227(1):152-159, 1996
- [90] Look TA, Ashmun RA, Shapiro LH, Peiper SC: Human Myeloid Plasma Membrane Glycoprotein CD13 is identical to Amino-peptidase N. *J.Clin.Invest.* 83:1299-1307, 1989
- [91] Lowther WT, Matthews BW: Structure and function of the methionine amino-peptidases. *BBA* 1477(1-2):157-167, 2000
- [92] Luckey CJ, King GM, Marto JA, Venketeswaran S, Maier BF, Crotzer V, Colella TA, Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH: Proteasomes can either generate or destroy MHC class I epitopes: evidence for nonproteasomal epitope generation in the cytosol. *J.Immunolog.* 161(1):112-121, 1998

- 
- [93] Lundgren E, Roos G, Tärnik A: Subcellular Distribution of Amino Acid Naphthylamidase Isozymes in human Leucocytes. *Acta path. microbiol. scand. Sect.A* 83:176-182, 1975
- [94] Mantle D: Comparison of soluble aminopeptidases in human cerebral cortex, skeletal muscle and kidney tissues. *Clinica Chimica Acta* 207:107-118, 1992
- [95] Mantle D, Hardy MF, Lauffart B, McDermott JR, Smith AI, Pennington RJT: Purification and characterization of the major aminopeptidase from human skeletal muscle. *Biochem.J* 211:567-573, 1983
- [96] Mantle D, Lauffart B, Gibson A: Purification and characterization of leucyl aminopeptidase and pyroglutamyl aminopeptidase from human skeletal muscle. *Clinica Chimica Acta* 197(1):35-45, 1991
- [97] Mantle D, Lauffart B, McDermott J, Gibson A: Characterization of aminopeptidases in human kidney soluble fraction. *Clinica Chimica Acta* 187:105-114, 1990
- [98] Mantle D, Lauffart B, McDermott JR, Kidd AM, Pennington RJ: Purification and charakterisation of two Cl-activated aminopeptidases hydrolysing basic termini from human skeletal muscle. *J.Biochem.* 147:307-312, 1985
- [99] Mäkinen KK, Mäkinen PL: Purification and Characterization of Two Human Erythrocyte Arylamidases preferentially Hydrolysing N-Terminal Arginine or Lysine Residues. *Biochem.J* 175:1051-1068, 1978
- [100] McDermott JR, Mantle D, Lauffart B, Kidd AM: Purification and Characterization of a Neuropeptide-Degrading Aminopeptidase from human Brain. *J.of Neurochemistry* 45:752-759, 1985
- [101] McDonald JK: Exopeptidases, in *Mammalian Proteases* London Academic Press, 1986,
- [102] McLellan S, Dyer S, Rodriguez G, Hersh L: Studies of the Tissue Distribution of the Puromycin-Sensitive Enkephalin-Degrading Aminopeptidases. *J.of Neurochemistry* 51:1552-1559, 1988
- [103] Murray H, McClaren H, Turner A, Kenny AJ: Immunocytochemical Studies of an Antigen in a Human T-cell Lymphoma Line (Jurkat) Recognized by Certain Monoclonal Antibodies to CD-13 ( Aminopeptidase-N). *Leukemia and Lymphoma* 17:501-508, 1995
- [104] Nagai M, Kojima F, Naganawa H, Hamada M, Aoyagi T, Takeuchi T: Phebestin, a new inhibitor of aminopeptidase N, produced by *Streptomyces* sp. MJ716-m3. *J.Antibiot.(Tokyo)* 50:82-84, 1997

- [105] Nagaoka I, Yamashita T: Leucine Aminopeptidase as an ecto-Enzyme of polymorphonuclear neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta* 598(1):169-172, 1980
- [106] Nagaoka I, Yamashita T: Inactivation during phagocytosis of leucine aminopeptidase, an ecto-enzyme of polymorphonuclear neutrophils. *BBA* 678:342-351, 1981
- [107] Nagaoka IYT: Inactivation of phagocytosis-stimulating activity of Tuftsin by polymorphonuclear neutrophils. *BBA* 675:85-93, 81 A.D.
- [108] Nagata Y, Mizutani S, Nomura S, Kurauchi O, Kasugai M, Tomoda Y: Purification and properties of human placental aminopeptidase B. *Enzyme* 45(4):165-173, 1991
- [109] Nano R, De Piceis Polver P, Gerzeli G: Leucine Aminopeptidase activity in blood and hemopoietic organs of different Vertebrates. *Acta histochem.* 82:83-88, 1987
- [110] Naquet P, Pierres M: Cell-surface enzymes and lymphocyte functions. *Current Opinion in Immunology* 3:326-329, 1991
- [111] Ohkubo K, Baraniuk JN, Hohman R, Merida M, Hersh LB, Kaliner MA: Aminopeptidase activity in human nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 102(5):741-750, 1998
- [112] Osada M, Ikegami S, Takiguchi-Hayashi K, Yamazaki Y, Katoh-Fukui Y, Higashina-Kagawa T, Sakaki Y, Takeuchi T: Increased anxiety and impaired pain response in puromycin-sensitive aminopeptidase gene-deficient mice obtained by a mouse gene-trap method. *Journal of Neuroscience Research* 19(14):6068-6078, 1999
- [113] Osada M, Watanabe G, Kondo S, Toyoda M, Sakaki Y, Takeuchi T: Male Reproductive Defects Caused by Puromycin-Sensitive Aminopeptidase Deficiency in Mice. *Mol.Endocrinol.* 15(6):960-971, 2001
- [114] Osada M, Watanabe G, Sakaki Y, Takeuchi T: Puromycin-sensitive Aminopeptidase Is Essential for the Maternal Recognition of Pregnancy in Mice. *Mol.Endocrinol.* 15(6):882-893, 2001
- [115] Patterson EK, Hsiao SH, Keppel A: Studies on Dipeptidases and Aminopeptidases. *The Journal of Biological Chemistry* 238 No.11:3611-3620, 1963
- [116] Proost P, Struyf S, Schols D, Durinx C, Wuyts A, Lenaerts JP, De Clercq E, De Meester I, Van Damme J: Processing by CD26/dipeptidyl-peptidase IV

- reduces the chemotactic and anti-HIV-1 activity of stromal-cell-derived factor-1alpha. *FEBS Lett.* 432:73-76, 1998
- [117] Rautenberg W, Tschesche H: Detection and Partial Purification of Four Proteases from Human Leucocytes. *Biol.Chem.Hoppe-Seyler* 362:230, 1981
- [118] Rautenberg W, Tschesche H: Aminopeptidases from Human Leucocytes. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 365:49-58, 1984
- [119] Rawlings ND, Barrett AJ: Evolutionary families of peptidases. *Biochem.J* 290 ( Pt 1):205-218, 1993
- [120] Rehli M, Krause SW, Kreutz M, Andreesen R: Carboxypeptidase M is identical to the MAX.1 antigen and its expression is associated with monocyte to macrophage differentiation. *J Biol.Chem.* 270:15644-15649, 1995
- [121] Reinhold D, Bank U, Buhling F, Lendeckel U, Ulmer AJ, Flad HD, Ansorge S: Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) inhibits DNA synthesis of PWM-stimulated PBMC via suppression of IL-2 and IL-6 production. *Cytokine* 6:382-388, 1994
- [122] Reinhold D, Bank U, Böhling F, Täger M, Born I, Neubert K, Faust J, Ansorge S: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DPIV,CD 26) induces secretion of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in stimulated mouse splenocytes and thymocytes. *Immunol.Lett.* 58(1):29-35, 1997
- [123] Reinhold D, Hemmer B, Gran B, Steinbrecher A, Brocke S, Kahne T, Wrenger S, Born I, Faust J, Neubert K, Martin R, Ansorge S: Dipeptidyl peptidase IV (CD26): role in T cell activation and autoimmune disease. *Adv.Exp.Med.Biol.* 477:155-160, 2000
- [124] Riemann D, Kehlen A, Langner J: Stimulation of the expression and the enzyme activity of aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 on human renal cell carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by T cell-derived cytokines, such as IL-4 and IL-13. *Clin.Exp.Immunol.* 100:277-283, 1995
- [125] Rivett AJ, Bose S, Brooks P, Broadfoot KI: Regulation of proteasome complexes by gamma-interferon and phosphorylation. *Biochimie.* 83:363-366, 2001
- [126] Rusu I, Yaron A: Aminopeptidase P from human leukocytes. *Eur.J Biochem.* 210:93-100, 1992

- [127] Safavi A, Herrsh LB: Degradation of Dynorphin-Related Peptides by the Puromycin-Sensitive Aminopeptidase and Aminopeptidase M. *J. of Neurochemistry* 65:389-395, 1995
- [128] Saito M, Takegoshi K, Aoyagi T, Umezawa H, Hagai Y: Stimulatory Effect of Bestatin, A New specific Inhibitor of Aminopeptidases, on the Blastogenesis of Guinea Pig Lymphocytes. *Cellular Immunology* 40:247-262, 1978
- [129] Sandernik GJ, Artur Y, Siest G: Human Aminopeptidases: A Review of the literature. *J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* 26 No.12:765-807, 1988
- [130] Schellenberger A: *Enzymkatalyse* (vol 2). VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1989
- [131] Schnebli HP, Phillipps MA, Bardey RK: Isolation and characterization of an enkephalin-degrading aminopeptidase from rat brain. *Biochimica et Biophysica Acta* 569:89-98, 1979
- [132] Scornik OA, Botbol V: Bestatin as an experimental tool in mammals. *Curr Drug Metab* 2:67-85, 2001
- [133] Shah T, Webster DB, Peters T: Enzyme Analysis and subcellular fractionation of human peripheral blood lymphocytes with special reference to the localisation of putative plasma membrane enzymes. *Cell Biochemistry and Function* 1:117-124, 1983
- [134] Sharma KK, Elsner NJ, Kester K: Comparison of leucine aminopeptidase and aminopeptidase III activities in lens. *Curr Eye Res* 15(7):774-781, 1996
- [135] Sharma KK, Ortwerth BJ: Aminopeptidase III activity in normal and cataractous lenses. *Curr Eye Res* 5(5):373-380, 1986
- [136] Sharma KK, Ortwerth BJ: Isolation and Characterization of a New Aminopeptidase from Bovine Lens. *The Journal of Biological Chemistry* 261 No.9:4295-4301, 1986
- [137] Shipp AM, Look AT: Hämatopoietic Differentiation Antigens That Are Membrane-Associated Enzymes: Cuuting is the key? *Blood* 82(4):1052-1070, 1993
- [138] Smith GP, MacGregor RR, Peters TJ: Subcellular localisation of leucine aminopeptidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 728:222-227, 1983

- [139] Söderling E: Substrate Specificities of Cl<sup>-</sup>-Activated Arginine Aminopeptidases from Human and Rat Origin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 220:1-10, 1983
- [140] Sprinkle TJ, Caldwell C, Ryan JW: Cloning, chromosomal sublocalization of the human soluble aminopeptidase P gene (XPNPEP1) to 10q25.3 and conservation of nthe putative proton shuttle and metal ligand binding sites with XPNPEP2. *Arch.Biochem.Biophys.* 378(1):51-56, 2000
- [141] Steinbrecher A, Reinhold D, Quigley L, Gado A, Tresser N, Izikson L, Born I, Faust J, Neubert K, Martin R, Ansorge S, Brocke S: Dipeptidyl peptidase IV in inflammatory CNS disease. *Adv.Exp.Med.Biol.*; 477:145-153, 2000
- [142] Stoltze L, Schirle M, Schwarz M, Schroter C, Thompson MW, Hersh LB, Kalbacher H, Stevanovic S, Rammensee HG, Sxchild H: Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat.Immunol.* 1(5):413-418, 2000
- [143] Suda H, Aoyagi T, Takeuchi T, Umezawa H: Inhibition of Aminopeptidase B and Leucine Aminopeptidase by Bestatin and Its stereoisomer. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 177:196-200, 1976
- [144] Swanson AA, Davis RM, Albers-Jackson B, McDonald JK: Lens exopeptidases. *Curr Eye Res* 32 (2):163-173, 1981
- [145] Takahashi H, Komoda M, Kakuta H, Hashimoto Y: [Preparation of novel specific aminopeptidase inhibitors with a cyclic imide skeleton]. *Yakugaku Zasshi* 120:909-921, 2000
- [146] Tanaka K: Role of proteasomes modified by interferon-gamma in antigen processing. *J Leukoc.Biol.* 56:571-575, 1994
- [147] Taylor A: Aminopeptidases: structure and function. *FASEB* 7:290-298, 1993
- [148] Taylor A: Aminopeptidases: towards a mechanism of action. *TIBS* 18:167-172, 1993
- [149] Thompson MW, Tobler A, Fontana A, Hersh LB: Cloning and Analysis of the Gene for the Human Puromycin-Sensitive Aminopeptidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 258:234-240, 1999
- [150] Ulmer AJ, Mattern T, Feller AC, Heymann E, Flad HD: CD26 antigen is a surface dipeptidyl peptidase IV (DPIV) as characterized by monoclonal antibodies clone TII-19-4-7 and 4EL1C7. *Scand.J.Immunol.* 31(4):429-435, 1990

- 
- [151] Umezawa H, Aoyagi T, Tanaka T, Suda H, Okuyama A, Naganawa H, Hamada M, Takeuchi T: Production of actinonin, an inhibitor of aminopeptidase M, by actinomycetes. *J Antibiot.(Tokyo)* 38:1629-1630, 1985
- [152] Van den Eynde BJ, Morel S: Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Curr Opin.Immunol.*; 13:147-153, 2001
- [153] van Hal PT, Hopstaken-Broos JP, Prins A, Favalaro EJ, Huijbens RJ, Hilvering C, Figdor CG, Hoogsteden HC: Potential indirect anti-inflammatory effects of IL-4. Stimulation of human monocytes, macrophages, and endothelial cells by IL-4 increases aminopeptidase-N activity (CD13; EC 3.4.11.2). *J Immunol.* 153:2718-2728, 1994
- [154] Vanhoof G, De M, I, Goossens F, Hendriks D, Scharpe S, Yaron A: Kininase activity in human platelets: cleavage of the Arg1-Pro2 bond of bradykinin by aminopeptidase P. *Biochem.Pharmacol.* 44:479-487, 1992
- [155] Vinitzky A, Anton LC, Snyder HL, Orłowski M, Bennink JR, Yewdell J: The generation of MHC class I-associated peptides is only partially inhibited by proteasome inhibitors: involvement of nonproteasomal cytosolic proteases in antigen processing? *J.Immunolog.* 159(2):554-564, 1997
- [156] Vitale L, Grdisa M, Wrisher M: Human Polymorphonuclear Leukocytes Aminopeptidases. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 24 No.2:139-148, 1986
- [157] Watanabe Y, Kumagai Y, Shimamori Y, Fujimoto Y: Purification and Characterization of Thiol Aminopeptidase from the Cytosolic Fraction of Human Placenta. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* 37:235-245, 1987
- [158] Welch PA: Regulation of B cell precursor proliferation by aminopeptidase A. *Int Immunol.* 7:737-746, 1995
- [159] Wex T, Lendeckel U, Kähne T, Ittenson A, Frank K, Ansorge S: The main neutral aminopeptidase activity of human lymphoid tumor cell lines does not originate from the aminopeptidase N-( APN; CD 13) gene. *Biochimica et Biophysica Acta* 1355:147-154, 1997
- [160] Wilk S, Wilk E, Magnusson RP: Purification, characterization, and cloning of a cytosolic aspartyl aminopeptidase. *J.Biol.Chem.* 273(26):15961-15970, 1998
- [161] Wu Q, Li L, Cooper MD, Pierres M, Gorvel JP: Aminopeptidase A activity of the murine B-lymphocyte differentiation antigen BP-1/6C3. *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:676-680, 1991

- 
- [162] Xu Y, Lai LT, Gabrilowe JL, Scheinberg DA: Antitumor activity of actinonin in vitro and in vivo. *Clin.Cancer Res* 4(1):171-176, 1998
- [163] Yamamoto S, Higuchi Y, Yoshiyama K, Shimizu E, Kataoka M, Hijiya N, Matsuura K: ADAM family proteins in the immune system. *Immunol.Today* 20:278-284, 1999
- [164] Yamamoto Y, Li YH, Ushiyama I, Nishimura A, Ohkubo I, Nishi K: Puromycin-sensitive alanyl aminopeptidase from human liver cytosol: purification and characterization. *Forensic Sci Int* 113(1-3):143-146, 2000
- [165] Yamamoto Y, Yao-Hua L, Huang K, Ohkubo I, Nishi M: Isolation and Characterization of an Alanyl Aminopeptidase from Rat Liver Cytosol as a Puromycin-Sensitive Enkephalin-Degrading Aminopeptidase. *Biol.Chem.* 379:711-719, 1998
- [166] Yoshida S, Naganawa H, Aoyagi T, Takeuchi T, Takeuchi Y, Kodama Y: Leuhistin, a new inhibitor of aminopeptidase M, produced by *Bacillus laterosporus* BMI156-14F1. II. Structure determination of leuhistin. *J.Antibiot.(Tokyo)* 44:579-581, 1991
- [167] Yoshida S, Nakamura Y, Naganawa H, Aoyagi T, Takeuchi T: Probestin, a new inhibitor of aminopeptidase M, produced by *Streptomyces azureus* MH663-2F6. II. Structure determination of probestin. *J Antibiot.(Tokyo)* 43:149-153, 1990
- [168] Ziaber J, Baj Z, Pasnik J, Chmielewski H, Tchorzewski H: Increased expression of neutral endopeptidase (NEP) and aminopeptidase N (APN) on peripheral blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis. *Immunol.Lett.* 71 (2):127-129, 2000



## DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. S. Ansorge für die Überlassung des Themas und sein permanentes Interesse an dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. U. Lendeckel für die Demonstration eines außergewöhnlichen Führungsstils in seiner Arbeitsgruppe. Dies beinhaltet besonders die Förderung der Selbständigkeit beim Arbeiten, eine wunderbare Arbeitsatmosphäre und seine motivierende Wirkung.

Herrn Prof. K. Neubert und Herrn Dr. J. Faust danke ich für die Bereitstellung einiger von mir verwendeten Peptid-Verbindungen.

Bei Herrn Dr. T. Kähne bedanke ich mich für die Durchführung der Massenspektrometrischen Untersuchungen sowie bei Frau Dr. S. Wrenger für die Durchführung der Kapillarelektrophorese.

Frau Dr. C. Wolke und Frau Dr. B. Firla möchte ich ganz herzlich für die ständige Diskussionsbereitschaft sowie für zahlreiche anregende und kritische Hinweise danken.

Herrn Dr. M. Arndt danke ich für die unschätzbare Hilfe bei der Gestaltung dieser Arbeit und für hilfreiche kritische Hinweise.

Die ganze Mannschaft des Institutes für Experimentelle Innere Medizin bekommt ein Dankeschön für ihre Hilfsbereitschaft und Verlässlichkeit. Frau Ch. Wolf sei für ihre motivierende Arbeitshaltung und ihre Bereitwilligkeit, mir jede dumme Frage zu beantworten, gedankt. Für die tatkräftige Unterstützung in der Zellkultur bedanke ich mich bei Frau R. Hädicke. Frau A. Spieß danke ich für die Einführung in die PCR-Technik.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die alle meine Höhen und Tiefen während dieser Arbeit miterlebt hat.



## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Alicja Bukowska, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Diese Arbeit wurde an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung vorgelegt.

Magdeburg, den 2.03.2002



**Angaben zur Person**

Name: Bukowska Alicja geb. Chmura  
Geburtsdatum: 08.09.1966  
Geburtsort: Rzeszów / Polen  
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder

Ausbildung

1973-1981 Grundschule  
1981-1985 Lyzeum „Stanisław Konarski“ in Rzeszów;  
biologisch-chemische Richtung  
1985 Abitur

Wissenschaftlicher Werdegang

1985-1990 Studium an der Medizinischen Akademie „Mikołaj Kopernik“ in  
Krakau, Richtung: Medizinische Analytik  
1990 Magisterarbeit am Institut für Biochemie in Krakau  
Thema: „Das chromatographische Bild der alkalischen Amino-  
säuren, die der Wirkung von Pyruvatkinase unterzogen worden  
sind“  
Abschluss als Magister der Medizinischen Analytik  
seit 1998 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Experimentelle  
Innere Medizin der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
unter der Leitung von Prof. Dr. S. Ansorge.

