

**Aus dem Institut für Pathologie der Universität Tübingen  
Abteilung Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie  
Abteilungsleiter: Professor Dr. B. Bültmann**

**Untersuchungen zur Modulation der Aktivitäten  
der Cathepsine B, L und S in endosomalen und  
lysosomalen Fraktionen menschlicher  
Monozyten/Makrophagen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Ramona Katharina Elisabeth Sauerbrei  
aus Nußloch**

**2004**

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. H. Schmid

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H.-G. Rammensee

„ Niemals setzt sich die Wissenschaft das Phantom zum Ziel, endgültige Antworten zu geben oder auch nur wahrscheinlich zu machen; sondern ihr Weg wird bestimmt durch ihre unendliche, aber keineswegs unlösbare Aufgabe, immer wieder neue, vertiefte und verallgemeinerte Fragen aufzufinden und die immer nur vorläufigen Antworten immer von neuem und immer strenger zu prüfen. “

( Karl Popper, Logik der Forschung, Wien 1935 )

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
APC	antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	engl.: bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
c	Konzentration [mol/l]
CA-074	L-trans-Epoxysuccinyl(propylamid)-Isoleucyl-Prolin
Cat.	Cathepsin
CD	engl.: cluster of differentiation
CLIP	engl.: class-II-associated invariant-chain peptide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
E-64	L-trans-Epoxysuccinyl-Leucin-4-guanidinobutylamid
ECL	engl.: enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorter/scanner
FCS	engl.: fetal calf serum (fötales Kälberserum)
g	Erdbeschleunigung ( $g=9,81 \text{ m/s}^2$ )
HLA	engl.: human leukocyte antigen
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
JPM-565	N-(L-3-trans-Carboxyoxiran-2-yl)-carbonyl-L-Isoleucyl-L-Tyrosin
kDa	Kilodalton
LHVS	N-morpholinurea-leuciny-l-homophenylalanyl-vinyl-sulfonephenyl
li	engl.: invariant chain
MHC	engl.: Major histocompatibility complex
MU	4-Methylumbelliferon
MU-NAG	4-Methylumbelliferon-N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminid

NAG	N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase
NP40	(Octylphenoxy)polyethoxyethanol
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	engl.: phosphate buffered saline
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	engl.: Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween	Polyoxyethylenesorbitan Monolaurat
U	Enzymeinheit (= $\mu$ mol umgesetztes Substrat pro Minute)
V	Volt
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent
Z-Phe-Arg-AMC	Benzyloxycarbonyl-phenylalanyl-Arginin-7-amido-4-methyl- coumarin
Z-Phe-Phe-CHN <sub>2</sub>	Benzyloxycarbonyl-phenylalanyl-Phenylalanin- diazomethylketon

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	MONOZYTEN-MAKROPHAGEN .....	1
1.2	MHC-MOLEKÜLE .....	2
1.2.1	<i>Invariante Kette (Ii)</i> .....	3
1.2.2	<i>MHC-II-Kompartiment</i> .....	4
1.3	LYSOSOMALE PROTEINASEN .....	5
1.3.1	<i>Cathepsine B, L und S</i> .....	6
1.4	PROTEASE-INHIBITOREN .....	8
1.5	INTERFERON- $\gamma$ .....	9
1.6	FRAGESTELLUNG .....	9
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>10</b>
2.1	GERÄTE.....	10
2.2	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN .....	11
2.3	ISOLIERUNG VON MONONUKLEAREN ZELLEN AUS DEM PERIPHEREN BLUT (PBMC).....	13
2.4	ISOLIERUNG DER MONOZYTEN DURCH GRÖBENSEDIMENTATION .....	14
2.5	STIMULATION MIT INTERFERON- $\gamma$ .....	15
2.6	FACS.....	16
2.7	HOMOGENISIERUNG .....	17
2.8	SUBZELLULÄRE FRAKTIONIERUNG (SCHRÖTER ET AL., 1999).....	17
2.9	PROTEINBESTIMMUNG.....	18
2.10	N-ACETYL- $\beta$ -D-GLUCOSAMINIDASE (NAG)-AKTIVITÄT .....	19
2.11	„ACTIVE SITE-LABELING“ (BOGYO ET AL., 2000).....	20
2.11.1	<i>Puffer</i> .....	20
2.11.2	<i>Lösungen</i> .....	21
2.11.3	<i>Gele</i> .....	21
2.11.4	<i>„Active-site“-spezifische Reaktion von Cysteinproteasen mit biotinyliertem JPM-565</i> 22	
2.11.5	<i>SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli, 1970)</i> .....	22
2.11.6	<i>Proteintransfer auf PVDF-Membran</i> .....	23
2.12	WESTERN BLOT MIT CATHEPSIN-ANTIKÖRPERN.....	24
2.12.1	<i>„Stripping“ von Immunoblots</i> .....	24
2.12.2	<i>Immundetektion</i> .....	24
2.13	LÖSUNGEN UND PUFFER FÜR DIE AKTIVITÄTSBESTIMMUNG DER CATHEPSINE B, L UND S (SCHMID ET AL., 1997).....	25
2.13.1	<i>Lösungen</i> .....	25
2.13.2	<i>Puffer</i> .....	26

2.13.3	<i>Reaktionspuffer</i> .....	26
2.13.4	<i>AMC-Standardlösungen zur Kalibrierung</i> .....	27
2.14	MESSUNG VON CATHEPSINAKTIVITÄTEN .....	28
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>30</b>
3.1	GEWINNUNG DER MONOZYTEN.....	30
3.2	HOMOGENISIERUNG .....	30
3.3	SUBZELLULÄRE FRAKTIONIERUNG .....	31
3.4	AUSTESTUNG DER INHIBITOREN.....	32
3.5	CATHEPSINAKTIVITÄTEN DER FRISCH ISOLIERTEN MONOZYTEN.....	33
3.5.1	<i>Spezifische katalytische Aktivitäten</i> .....	33
3.5.2	<i>Darstellung aktiver Cathepsine durch „active-site labeling“</i> .....	37
3.5.3	<i>Einfluß cytosolischer Cysteinproteinasen-Inhibitoren auf die Darstellung aktiver Enzyme</i> .....	40
3.6	EINFLUß VON INTERFERON- $\gamma$ AUF DIE CATHEPSINAKTIVITÄTEN UND EXPRESSION VON MHC KLASSE I- UND MHC KLASSE II-MOLEKÜLEN.....	42
3.7	SPEZIFISCHE KATALYTISCHE AKTIVITÄTEN DER CATHEPSINE B, L UND S IN KULTIVIERTEN MONOZYTEN .....	47
3.8	VERGLEICH DER FRISCH ISOLIERTEN MIT DEN STIMULIERTEN MONOZYTEN.....	50
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>55</b>
4.1	DISKUSSION DER METHODEN .....	55
4.1.1	<i>Isolierung und Kultivieren der Monozyten</i> .....	55
4.1.2	<i>Homogenisieren</i> .....	55
4.1.3	<i>Subzelluläre Fraktionierung</i> .....	56
4.1.4	<i>Cathepsinaktivitäten</i> .....	58
4.1.5	<i>Fehlerquellen bei der Messung der Enzymaktivitäten</i> .....	58
4.1.6	<i>Vergleich des „active-site labeling“ mit der Cathepsin-Aktivitätsmessung</i> .....	59
4.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	60
4.2.1	<i>Frisch isolierte und kultivierte Monozyten</i> .....	60
4.2.2	<i>Regulation der Cathepsinaktivitäten unter dem Einfluß von Interferon-<math>\gamma</math></i> .....	61
4.2.3	<i>Funktion der Cathepsine in den Monozyten/Makrophagen</i> .....	62
4.2.4	<i>Antigenprozessierung und -präsentation</i> .....	64
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>69</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Monozyten-Makrophagen

Alle zellulären Bestandteile des Blutes stammen ursprünglich von denselben Vorläuferzellen, den hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, ab, weshalb sie auch als pluripotent bezeichnet werden. Aus diesen Stammzellen entwickeln sich die allgemeine lymphatische Vorläuferzelle sowie die myeloide Vorläuferzelle.

Die myeloide Vorläuferzelle ist die Vorstufe der Granulozyten und Makrophagen des Immunsystems. Makrophagen stellen die gereifte Form der Monozyten dar, die im Blut zirkulieren und fortwährend zu Makrophagen differenzieren, sobald sie in die Gewebe einwandern. In besonders großer Zahl sind sie im Bindegewebe, in der Leber (Kupffer-Zellen), der Lunge (interstitielle Zellen und Alveolarzellen) sowie in der Milz zu finden und bilden dort die vorherrschenden phagozytischen Zellen des Immunsystems.

Hier sind vor allem die Arbeiten des russischen Immunologen Elie Metchnikoff zu nennen, der herausfand, daß phagozytische Zellen (die Makrophagen) Mikroorganismen aufnehmen und vernichten können (Metchnikoff, 1905). Diese Phagozyten des angeborenen Immunsystems bilden eine erste Verteidigungslinie gegen viele allgemein vorkommende Mikroorganismen und sind für die Bekämpfung bakterieller Infektionen von grundlegender Bedeutung. Auf ihrer Oberfläche tragen sie Rezeptoren für häufige Bestandteile von Bakterien, womit verschiedene Pathogene direkt erkannt und phagozytiert werden können.

Dazu gehören Rezeptoren wie der Mannoserezeptor, den man auf Makrophagen, nicht aber auf Monozyten finden kann, der scavenger-Rezeptor, der Sialinsäureliganden bindet, sowie CD14, ein Molekül, das bakterielles Lipopolysaccharid bindet.

Kommt nun ein Antigen in Kontakt mit den Rezeptoren der Makrophagen, kann die Antigenaufnahme zum einen über rezeptorvermittelte Endozytose oder Phagozytose erfolgen (Röttschke und Falk, 1994; Watts, 1997), andererseits können sich Krankheitserreger wie Leishmania-Arten und Mykobakterien in intrazellulären Vesikeln von Makrophagen vermehren und ebenfalls durch unspezifische Autophagie zum Abbau in das endosomale/lysosomale System aufgenommen werden (Seglen und Bohley, 1992). Der darin herrschende niedrige pH-Wert aktiviert Proteasen, darin enthaltenes Antigen zu Peptiden bzw. Aminosäuren abzubauen.

## 1.2 MHC-Moleküle

MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Moleküle, die eine wesentliche Rolle des speziellen Immunsystems spielen, sind vor allem Präsentationsmoleküle. Wie Peptide den T-Zellen präsentiert werden, wurde in den letzten Jahrzehnten erarbeitet.

Der „major histocompatibility complex“ oder MHC enthält eine Anzahl von Genen, die an der Immunantwort auf eine Infektion beteiligt sind (Hansen et al., 1993). Ihre Genprodukte kommen in zwei verschiedenen Formen, den MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen, vor. Beides sind transmembrane Moleküle, die an am endoplasmatischen Retikulum (ER) gebundenen Ribosomen synthetisiert werden (Kvist et al., 1982; Ploegh et al., 1979).

MHC-I-Moleküle präsentieren auf fast allen Zellen vorwiegend Peptide, welche von Pathogenen aus dem Cytosol stammen (Bsp.: Viren), wogegen die Funktion der MHC-II-Moleküle darin besteht, Peptide aus exogen stammenden Antigenen darzubieten (wie im Falle vieler Bakterien) (Jackson und Peterson, 1993; Wolf und Ploegh, 1995). Diese MHC-II-Antigene werden nur auf antigenpräsentierenden Zellen (APCs) wie Dendritischen Zellen, B-Zellen und Makrophagen präsentiert (Unanue und Askonas, 1968; Schmidtke und Unanue, 1972; Chestnut et al., 1982).

Die Funktion der MHC-Klasse-II-Moleküle besteht darin, die Peptidfragmente, die in den intrazellulären Vesikeln der Makrophagen und anderen APCs entstehen, den CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen anzubieten, damit diese sie erkennen und darauf reagieren können. Um diese essentielle Aufgabe der Antigenpräsentation zu erfüllen, müssen die mit Peptid beladenen MHC-II-Moleküle an die Zelloberfläche transportiert werden.

MHC-II-Moleküle bestehen aus einer alpha-Kette mit einem Molekulargewicht von 35 kDa und einer beta-Kette von 27 kDa (Kappes und Strominger, 1988). Diese transmembranen Moleküle entfalten ihre C-terminale Region cytosolwärts, eine große N-terminale Region verbleibt im Lumen des ER. Diese N-terminale Region ist hoch polymorph und enthält die Peptidbindungsstelle (Cresswell et al., 1987).

Während der Translation wird das MHC-Molekül mit einem dritten Transmembranprotein, der invarianten Kette (Ii,  $\gamma$ -Kette), assoziiert (Lamb et al., 1991; Kvist et al., 1982).

### 1.2.1 Invariante Kette (Ii)

Die Ii organisiert sich mit drei Klasse-II-Molekülen zu einem nanomeren Komplex. Trotz der Bezeichnung „invariant“ können in den meisten Zellen verschiedene Isoformen der Ii zum Ausdruck kommen (Pieters, 1997; Sant und Miller, 1994; Strubin et al., 1986).

Verglichen mit dem MHC-II-Molekül, hat die Ii die gegensätzliche Topographie: ein kleines N-terminales, cytoplasmatisches Segment und eine relativ große C-terminale Region, die ins Lumen hineinragt. Die Ii enthält zwei „*leucine-based*“ Signale in ihrem zytoplasmatischen Teil, welche das MHC-Klasse-II-Molekül zu den Endosomen, entweder unmittelbar aus dem trans-Golgi oder über die Plasmamembran, dirigiert (Lotteau et al., 1990; Bakke und Dobberstein, 1990). Zum einen verhindert die C-terminale Domäne der Ii die vorzeitige Bindung von Antigenpeptiden an das MHC-Molekül im ER (Roche und Cresswell, 1996; Teyton et al., 1990), andererseits besteht deren weitere Funktion darin, den

MHC-Klasse-II/Ii-Komplex durch den Golgi-Apparat zu den Endosomen zu dirigieren.

In diesen angesäuerten endosomalen Kompartimenten, welche Peptide von intrazellulär lebenden Bakterien oder von aufgenommenen extrazellulären Proteinen enthalten, wird der Komplex aus MHC-II- $\alpha$ : $\beta$ -Heterodimeren und Ii in mehreren Stufen durch die darin vorhandenen Proteasen Cathepsin L und S gespalten (Riese et al., 1996), wobei ein kleines Fragment, das sogenannte „class-II-associated invariant-chain peptide“ (CLIP), am MHC-II-Molekül gebunden bleibt und damit weiterhin die Peptidbindungsstelle besetzt (Rudensky et al., 1991; Riberdy et al., 1992).

Das HLA-DM-Molekül, ein MHC-II-artiges Molekül, welches ebenfalls in MIIC-Kompartimenten (MHC-II-Beladungskompartimente) auftritt, bindet an MHC-II-Moleküle und katalysiert die Freisetzung von CLIP und die Bindung von antigenen Peptiden (Denzin und Cresswell, 1995; Roche, 1995; Sherman et al., 1995).

### 1.2.2 MHC-II-Kompartiment

Das MHC-II-Kompartiment in antigenpräsentierenden Zellen könnte als ein spezialisiertes endozytisches Kompartiment angesehen werden. Diese spezialisierten Kompartimente sind Teile des endosomalen/lysosomalen Netzwerkes und ähneln in verschiedenen Aspekten anderen spezialisierten Organellen, welche ebenso Teil des endosomalen Systems sind (Neefjes, 1999).

### 1.3 Lysosomale Proteinasen

Es gibt vier Hauptklassen der proteolytischen Enzyme, eingeteilt nach dem bedeutenden Rest ihres aktiven Zentrums, die Aspartat-, Cystein-, Serin- und Metalloproteinasen.

Die lysosomalen Cysteinproteinase, Cathepsin B, Cathepsin L und Cathepsin S, sind in allen Zellen von Säugetieren anwesend, mit Ausnahme der kernlosen roten Blutzellen. Der Ausdruck „Cathepsin“ stammt aus dem Griechischen (καθέρειν) und bedeutet soviel wie „verdauen“ (Willstätter und Bamann, 1929).

Cathepsine werden an membrangebundenen Ribosomen zu Vorstufen synthetisiert und in das Endoplasmatische Retikulum übertragen. Im Golgi-Apparat erfolgt die Glykosylierung und Phosphorylierung eines terminalen Mannose-6-phosphat-Restes, der das Protein zunächst in endosomale Kompartimente transportiert und für die Lenkung des Proteins zu den Lysosomen notwendig ist. Auf dem Weg durch das endosomale Kompartiment bis zu den Lysosomen mit steigender Ansäuerung des Milieus werden die Vorstufen der Cathepsine durch autolytische oder proteolytische Mechanismen zu ihren aktiven Formen gespalten.

Die Konzentration der Lysosomen und der darin enthaltenen Proteasen variiert von Zelle zu Zelle und ist besonders hoch in Leber, Milz, Niere und Makrophagen. Die Eigenschaften der Cathepsine sind in den verschiedenen Spezies und Zelltypen unterschiedlich.

Im Allgemeinen sind die lysosomalen Proteinase mit einem Molekulargewicht von 20.000-40.000 klein, die optimale Enzymaktivität liegt im sauren pH-Bereich und sie sind, mit Ausnahme von Cathepsin S, instabil im neutralen und basischen Milieu. Alle drei Cathepsine besitzen Cystein als katalytische Gruppe und fungieren als Endopeptidasen, wobei Cathepsin B zusätzlich Exopeptidase-Aktivität (Peptidyl-dipeptidase B) zeigt (Bohley und Seglen, 1992).

Die Hauptfunktion der lysosomalen Cysteinproteinase ist der Abbau von Proteinen. Die Proteine werden in den Lysosomen vollständig degradiert und die Endprodukte wie Dipeptide und Aminosäuren durchdringen die Membran

der Lysosomen und werden wieder für die Protein-Biosynthese benutzt (Brocklehurst et al., 1987; Bohley und Seglen, 1992; Kirschke et al., 1995). Proteine werden dagegen spezifisch und partiell in den Endosomen abgebaut (Berg et al., 1995).

### 1.3.1 Cathepsine B, L und S

Cathepsin B kommt in allen Säugetieren vor und ist dort in nahezu allen Organen und Geweben zu finden. Die Hauptfunktion dieses Enzyms ist in der Aktivierung, Inaktivierung und Degradierung von Gewebeprotein zu sehen. Es verdaut eine Vielzahl von Geweben, wie Kollagen, Proteoglykane und saures Glykoprotein (Barrett und Kirschke, 1981). Cathepsin B hat die Möglichkeit, im Gegensatz zu Cathepsin L und S, welche reine Endopeptidase-Aktivitäten zeigen, als Endo- und Exopeptidase zu wirken (Bohley und Seglen, 1992). Seine Endopeptidase-Aktivität ist jedoch noch nicht ganz klar. Mit einer Molekülmasse seiner einkettigen Form von 30 kDa ist es das schwerste dieser drei Cathepsine. Seine Aktivität gegenüber Proteinsubstraten ist mit weniger als 10 % im Vergleich zu Cathepsin L niedrig (Bohley, 1988).

Cathepsin L ist, verglichen mit den anderen lysosomalen Cysteinproteinasen, die am wenigsten stabile, aber bei weitem wirksamste im Abbau verschiedener Proteine wie Myosin, Aktin, Troponin, Tubulin, Kollagen, Elastin, Laminin, Hämoglobin, Albumin, Histone, Insulin, Glukagon und cytosolischer Enzyme wie Lactatdehydrogenase. Es degradiert Proteine mindestens zehnfach schneller als andere zelluläre Cysteinproteinase einschließlich dem Cathepsin B (Bohley, 1988). Gut untersucht als Substrat ist Z-Phe-Arg-AMC ebenso Z-Phe-Phe-CHN<sub>2</sub> als spezifischer Inhibitor unter speziellen Bedingungen (Barrett und Kirschke, 1981; Bohley, 1988). Untersuchungen ergaben, daß Cathepsin L von Tumorzelllinien sezerniert wird und damit bei der Zerstörung der Basalmembran, der Gewebeinvasion und der Metastasenentstehung eine Rolle spielen kann (Yamaguchi et al., 1990). Damit ist Cathepsin L durch seine

Kollagenase- und Elastase-Aktivität nicht unwesentlich an Erkrankungen wie Krebs und Lungenemphysem mitbeteiligt (Mason et al., 1986).

Die Cysteinproteinase Cathepsin S ist hoch exprimiert in Milz und in professionell antigenpräsentierenden Zellen wie B-Lymphozyten, Makrophagen und anderen Klasse-II-positiven Zellen (Shi et al., 1992, 1994; Morton et al., 1995). Aufgrund dieser Organverteilung ist zu vermuten, daß Cathepsin S nicht am allgemeinem Proteinumsatz einer Zelle beteiligt ist (Kirschke und Wiederanders, 1994), sondern vielmehr eine spezifischere Funktion ausübt (Petanceska und Devi, 1992). Cathepsin S hat mit 5,0-8,0 ein breites pH-Aktivitätsprofil und ist im Gegensatz zu Cathepsin B und Cathepsin L mit einem Aktivitätsoptimum bei pH 7,0 stabil (Shi et al. 1992, 1994; Brömme et al., 1989, 1993; Kirschke et al., 1989). Während einer Vorinkubation von einer Stunde bei pH 7,5 werden die Aktivitäten der Cathepsine B und L vollständig aufgehoben, wogegen Cathepsin S 60 %-70 % seiner Aktivität behält. Cathepsin S ist ein einzelsträngiges Molekül und hat eine Masse von ungefähr 24 kDa und zeigt als Endopeptidase kollagenolytische und elastinolytische Eigenschaften. Die Induzierbarkeit durch Interferon- $\gamma$  und die Fähigkeit, die invariante Kette im Komplex mit MHC-II-Molekülen, die für die Peptidbeladung unerlässlich sind, zu spalten, lassen eine immunmodulatorische Funktion dieses Enzyms erkennen (Riese et al., 1996).

Diese lysosomalen Proteasen sind bei der Aktivierung und Inaktivierung biologisch wichtiger Moleküle miteinander verbunden. Weiterhin sind sie beteiligt an verschiedenen physiologischen Prozessen wie Proteinsynthese, Hormonaktivierung und Inaktivierung. Zusätzlich spielen Cathepsine eine große Rolle in einer Anzahl von Erkrankungen wie Diabetes, Multiple Sklerose, Krebs und Metastasenentstehung (Sloane, 1990).

## 1.4 Protease-Inhibitoren

Eine unangemessene Proteolyse wird durch spezifische Inhibitoren der Aktivitäten dieser Enzyme kontrolliert. Intralysosomale Protease-Inhibitoren wurden bis jetzt nicht gefunden, wobei sich die Zelle durch eine hohe Menge an Protease-Inhibitoren im Cytosol vor einem Selbstverdau schützt (Barrett, 1986). Zu den physiologischen Inhibitoren zählen zum Beispiel die Kininogene und die Cystatine (Turk und Bode, 1991). Die Cystatine sind einkettige Polypeptide und werden in zwei Familien eingeteilt: Der Familie 1 gehören die Cystatine A und B, auch Stefine genannt, mit einer Molekülmasse von 11-12 kDa, an. Zu der Familie 2 zählen die Cystatine C, D, S, SN und SA. Cystatin C ist mit dem Vorkommen in allen Körperflüssigkeiten der am weitesten verbreitete Inhibitor der Cysteinproteinasen.

Um bestimmte Cysteinproteinasen *in vitro* zu inaktivieren, sind Peptidyl Diazomethyl-Ketone wie etwa Z-Phe-Phe-CHN<sub>2</sub> für die irreversible Inhibition von Cathepsin L und teilweiser Hemmung des Cathepsin S in mikromolaren Konzentrationen geeignet (Brömme et al., 1989). Auch das Vinyl-Sulfon LHVS ist in niedrigen Konzentrationen ein spezifischer Hemmstoff für Cathepsin S, hemmt jedoch in höheren Konzentrationen auch andere Proteasen. Die Hemmung durch LHVS ist für Cathepsin S 67-fach größer als für Cathepsin L und 6000-fach größer als die von Cathepsin B (Palmer et al., 1995). CA-074-Epoxide zur spezifischen Hemmung von Cathepsin B und E-64-Epoxide wie E-64 und JPM-565 zur Inhibition aller Cysteinproteinasen können eingesetzt werden (Murata et al., 1991; Towatari et al., 1991; Bogyo et al., 2000). E-64 ist ein spezifischer Inhibitor für alle Cysteinproteinasen. Es hemmt wirksam durch irreversible Bildung einer Thioether-Bindung mit der aktiven SH-Gruppe der Cysteinproteinasen (Hanada et al., 1978).

## 1.5 Interferon- $\gamma$

Das Cytokin Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ist ein Monomer bestehend aus 143 Aminosäuren. Es wird im menschlichen Körper von T-Zellen und natürlichen Killerzellen produziert, wodurch Makrophagen aktiviert werden. Es hat antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Wirkung. Dieser immunologische Effekt trägt zu einer erhöhten MHC-Expression bei und spielt damit eine große Rolle bei Autoimmunerkrankungen, Infektionen und Entzündungen.

## 1.6 Fragestellung

Ziel der Arbeit ist, eine Modulation der Aktivitäten der Cathepsine B, L und S und ihrer subzellulären Verteilung unter Stimulation mit Interferon- $\gamma$  an menschlichen Monozyten und Makrophagen in Korrelation zur Expression von MHC-Molekülen zu untersuchen.

Dazu wird Gesamtzellhomogenat und eine Organellenfraktion mit den darin enthaltenen Mitochondrien, Endosomen, Lysosomen und Mikrosomen untersucht. Zusätzlich wird die Organellenfraktion mittels differentieller Zentrifugation weiter in die subzellulären Fraktionen der Endosomen und Lysosomen differenziert.

Mit diesem Untersuchungsmaterial wird die spezifische katalytische Aktivität der Cathepsine B, L und S fluorometrisch bestimmt und qualitativ mit der Menge aktiver Enzyme verglichen, die nach Markierung des aktiven Zentrums durch SDS-PAGE dargestellt wird. Die Enzymproteine werden durch Immunoblotting identifiziert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Beckman TL100 Ultrazentrifuge+Rotor TL100.3	Beckman, Palo Alto, USA
EBMC-Zell-Homogenisator	EMBL, Heidelberg, Deutschland
FACScan	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Feinwaage	Mettler, Zürich, Schweiz
Filmentwickler X-Ray Film Processor RG II	Fuji, Tokio, Japan
Heraeus Christ Minifuge T	Heraeus, Osterode, Deutschland
Potter-Elvehjem-Homogenisator	Schott, Mainz, Deutschland
Schreiber Kipp & Zonen	Delft, Niederlande
Sorvall RC-5B Zentrifuge+Sorvall-Rotor SS 3	Sorvall, Du Pont Instruments, Bad Homburg, Deutschland
Spectralfluorimeter Mark I	Farrand Optical Co. Inc., New York, USA
µl-Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	Falcon, Heidelberg, Deutschland

## 2.2 Chemikalien und Reagenzien

Von der Firma AMERSHAM BIOSCIENCES, Buckinghamshire, UK wurden bezogen:

ECL-Film und -Reagenz  
Ficoll-Paque<sup>TM</sup>Plus  
Hybond-P (PVDF-Membran)  
Percoll (density 1,131 g/ml)  
Meerrettichperoxidase-gekoppeltes Streptavidin

BACHEM Feinchemikalien AG, Heidelberg, Deutschland:

CA-074  
E-64  
Z-Phe-Arg-AMC  
Z-Phe-Phe-CHN<sub>2</sub>

BECTON DICKINSON, Heidelberg, Deutschland:

Antikörper für die FACS-Analyse

BIOWHITTAKER, Walkersville, Maryland, USA:

serumfreies Medium für die Proliferation von Lymphozyten und Makrophagen (X-Vivo 15)

DIANOVA GmbH, Hamburg, Deutschland:

Meerrettichperoxidase-gekoppelter  
Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper

MERCK, Darmstadt, Deutschland:

Acrylamid-Bis 30% (37,5:1)  
Ammoniumperoxodisulfat  
EDTA

ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland:

Roti-Nanoquant

Roti-Block

TEMED p.a.

SERVA Feinchemikalien, Heidelberg, Deutschland:

BSA (reinst)

Coomassie-Brilliant-Blue R250/1

DTT

MU

MU-NAG

SIGMA, Deisenhofen, Deutschland:

AMC

DMSO

Dulbecco's PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)

NP40

Trypanblaulösung

Tween

STRATHMANN Biotech, Hamburg, Deutschland:

Interferon- $\gamma$

Biotinyliertes JPM-565, 2  $\mu$ M in DMSO wurde mir von Dr. CH. DRIESSEN, Tübingen, Deutschland, überlassen.

Die Buffy coats stammen von gesunden Blutspendern und wurden zu Forschungszwecken von der Blutbank des Katharinenhospitals Stuttgart, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

Die polyklonalen Antikörper gegen MHC I ( $\alpha$ -HC) und II (anti- $\beta$ -human) stammen aus dem Labor H. PLOEGH, Harvard Medical School, Boston, USA.

Der polyklonale Antikörper des Cystatin C (Cy-C-rabbit) ist von der Firma Upstate Biotechnologies, USA.

Folgende polyklonale Antiseren wurden freundlicherweise von Dr. Ekkehard Weber, Institut für Biochemie, Universität Halle, Deutschland, zur Verfügung gestellt:

Anti-Human-Cat.S

Anti-Human-Cat.B

### 2.3 Isolierung von mononuklearen Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC)

Mononukleare Zellen (Monozyten und Lymphozyten) können aus dem peripheren Blut mittels Ficoll-Hypaque über Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert werden. Bei diesem Verfahren wird der Unterschied der Dichte zwischen mononuklearen Zellen und anderen im Blut vorhandenen Bestandteilen ausgenutzt. Das Plasma und die Thrombozyten sammeln sich an der Oberfläche der Ficoll-Hypaque-Schicht, da sie eine niedrigere Dichte als Ficoll-Hypaque haben. Im Gegensatz dazu haben die Erythrozyten und Granulozyten eine höhere Dichte als Ficoll-Hypaque und sammeln sich daher am Boden der Ficoll-Hypaque-Schicht, die PBMC sind in der Phasengrenze konzentriert. Die Ficoll-Hypaque-Dichtezentrifugation erlaubt eine schnelle und effiziente Isolierung der mononuklearen Zellen aus dem peripheren Blut (Boyum, 1968).

Es sollten Schutzmaßnahmen angewandt werden, da Blut immer als infektiös betrachtet werden muß!

Alle Lösungen und Materialien, die mit den Zellen in Kontakt kommen, müssen steril sein und steril gehalten werden!

Der Buffy coat wird mit PBS im Verhältnis 1:2 verdünnt und auf Ficoll gegeben. Um sicher zwei Phasen zu erhalten, ist es hilfreich, das Zentrifugen-Röhrchen in einem 45°C-Winkel zu halten, das Ficoll mit der Pipettenspitze etwas anzusaugen und anschließend das Blut auf den Flüssigkeitsfilm zu legen. Der Gradient wird bei 2000 rpm (686 g) für 20 min. mit einer Temperatur von ca. 20°C hergestellt, die Bremse muß dabei ausgeschaltet sein. Das im Überstand enthaltene Plasma und die Thrombozyten werden verworfen. Die darunterliegende PBMC-Schicht wird vorsichtig abgesaugt, in ein 50 ml-Röhrchen überführt und zweimal mit PBS bei 1300 rpm (290 g) für 5 min. gewaschen.

Um den Rest der Thrombozyten zu eliminieren, wird das Zellpellet in 3 ml PBS aufgenommen, auf 3 ml FCS gelegt, hierbei ist wieder auf zwei Phasen zu achten, und bei 1080 rpm (200 g) für 15 min. ohne Bremse bei 4°C, zentrifugiert.

Die in dem Überstand enthaltenen Thrombozyten werden verworfen und das Pellet in 3 ml PBS aufgenommen.

Um eine maximale Ausbeute und Reinheit der Zellen zu erzielen, ist es wichtig darauf zu achten, daß eine möglichst scharfe Grenze zwischen Ficoll-Hypaque und verdünntem Blut entsteht.

## 2.4 Isolierung der Monozyten durch Größensedimentation

Mit diesem Verfahren werden Monozyten und Lymphozyten getrennt. Hierbei wird ein durchgehender Percoll-Gradient benutzt (Gmelig-Meyling und Waldmann, 1980). Die Trennung der Monozyten durch Adhärenz, bei der viele Zellen aktiviert werden, wird so vermieden (Fuhlbrigge et al., 1987; Haskill et al., 1988).

Um den Percoll-Gradienten zu formen, werden 14 ml Percoll mit 12 ml 2 x PBS in ein steriles Zentrifugenröhrchen gegossen, und anschließend bei 4°C für 40 min. bei ausgeschalteter Bremse mit 15.000 rpm (26.890 g) zentrifugiert.

Die in 3 ml PBS aufgenommenen Zellen werden vorsichtig auf den Percoll-Gradienten gelegt, so daß zwei Phasen entstehen, und bei 4°C und ausgestellter Bremse für 20 min. bei 2400 rpm (990 g) zentrifugiert.

Es entstehen 4 Banden, beginnend von oben:

Bande 1 erfaßt tote Zellen, Schutt und ein paar Thrombozyten;

Bande 2 enthält Monozyten, ein paar Lymphozyten und verbliebene Thrombozyten;

Bande 3 setzt sich zusammen aus Lymphozyten und wenigen Monozyten;

Bande 4 beinhaltet Granulozyten und Erythrozyten.

Bande 2 wird abgesaugt, in ein neues Röhrchen überführt und zweimal mit PBS bei 1300 rpm (290 g) für 5 min. gewaschen.

Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und verworfen.

Mit dieser Methode können pro Buffy coat ungefähr  $2 \times 10^8$  Zellen gewonnen werden.

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente sind jeweils die Ausbeuten zweier Buffy coats benutzt worden.

## 2.5 Stimulation mit Interferon- $\gamma$

Für die Stimulation müssen weiterhin sterile Bedingungen herrschen, um die Zellen während der Kultivierung nicht zu kontaminieren.

Die mit PBS gewaschenen Zellen von zwei Buffy coats werden jeweils in 10 ml serumfreien Mediums aufgenommen und in zwei Portionen mit je 5 ml geteilt, wobei der einen für die Stimulation 10  $\mu$ l Interferon- $\gamma$  (1:500 / 100 U/ml) zugegeben wird.

Von jeder Portion wird 1 ml für den 0-Wert abgenommen.

Die verbliebenen 4 ml je Portion werden wiederum in vier Anteile zu je 1 ml in 15 ml-Röhrchen gegeben, für die Zeitpunkte 24, 48, 72 und 96 Stunden, und bei 37°C vorsichtig geschwenkt.

Zu den jeweiligen Zeitpunkten werden die Zellen im Medium abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das entstandene Zellpellet in PBS gewaschen.

## 2.6 FACS

Die FACS-Analysen wurden freundlicherweise von Dr. Ch. Driessen, Tübingen, durchgeführt.

Mit Hilfe eines fluoreszenzaktivierten Zellsorters (FACS) können einzelne Zellen klassifiziert und voneinander getrennt werden.

Monoklonale Antikörper gegen verschiedene Oberflächenproteine, die die verschiedenen Zellen und deren Subpopulationen exprimieren, werden mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundär-Antikörpern gekoppelt. Aufgrund der Messung der Zellgröße, der Granuladichte und der Fluoreszenzmarkierung der einzeln an einem Photodetektor vorbeiströmenden Zellen, können Monozyten und Makrophagen von anderen Zellen unterschieden und quantifiziert werden.

Hierbei dient der Antikörper anti-CD14 zur Auszählung der Monozyten und Makrophagen, anti-HLA-DR (MHC II) für die Unterscheidung der antigenpräsentierenden Zellen und für den Nachweis des Anteils an verbliebenen Lymphozyten anti-CD3 (T-Zellen) und anti-CD19 (B-Zellen).

## 2.7 Homogenisierung

Nach der Ernte der Monozyten werden die Zellen mit Sucrose (0,25 M) gewaschen, in 500 µl Fraktionierungspuffer (10 mM Tris/Acetat pH 7,0; 0,25 M Sucrose) aufgenommen und mit 10-13 Hüben in einem 5 ml-Gefäß nach Potter-Elvehjem bei einer Drehzahl von 500 rpm homogenisiert.

Alternativ werden die Zellen, die Monozyten und die ohne und mit Interferon- $\gamma$  kultivierten Makrophagen, nach dem Waschen mit PBS und Sucrose (0,25 M) in einem Endvolumen von 2,2 ml in Fraktionierungspuffer aufgenommen. Anschließend werden die Zellen in einem EBMC-Zell-Homogenisator mit einer Spaltbreite von 12 µm in sechs Hüben homogenisiert. Dem dabei entstehenden Gesamtzellhomogenat wird vor der Fraktionierung für die Enzymaktivitäten-Messung eine kleine Menge (Fraktion G) abgenommen.

Da geschädigte Zellen Farbstoff aufnehmen, kann mittels einer Trypanblaulösung mikroskopisch die Zerstörung der Zellmembran überprüft werden.

## 2.8 Subzelluläre Fraktionierung (Schröter et al., 1999)

Jeder Schritt wird bei 4°C durchgeführt. Für die Zentrifugationsschritte wird die Beckman TLA100 Ultrazentrifuge mit dem Rotor TLA100.3 benutzt.

Das Zellhomogenat frisch isolierter, ohne und mit Interferon- $\gamma$  kultivierter Monozyten, wird bei 2000 g 2 min. zentrifugiert. Das daraus entstehende Pellet enthält Kernmaterial und Zelltrümmer (Fraktion K). Der Überstand, der das Cytosol und die Zellorganellen beinhaltet, wird in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und bei 100.000 g 2 min. zentrifugiert. Hierbei wird das Cytosol mit den Mikrosomen von den Mitochondrien, Endosomen und Lysosomen getrennt.

Dieser Überstand wird durch die Zentrifugation bei 400.000 g 12 min. weiter in das Cytosol (Fraktion C) und die Mikrosomen (Fraktion M) aufgetrennt.

Es ist unerlässlich, das Cytosol sauber von den intakten Organellen abzutrennen, da es Cysteinproteinase-Inhibitoren beinhaltet.

Durch 15-minütige hypotone Lyse kann das Pellet, das die Endosomen, Lysosomen und Mitochondrien enthält, weiter aufgetrennt werden. Hierbei wird dem Pellet das 15-fache Volumen seines Gewichts an destilliertem Wasser zugesetzt. Nach weiterer Zentrifugation bei 100.000 g 4 min. kann der Überstand, er enthält die lysosomale Fraktion (Fraktion L), vom Pellet, dieses enthält die Endosomen und Mitochondrien (Fraktion E), abgetrennt werden.

Zur Gewinnung einer Organellenfraktion wird das Zellhomogenat bei 2000 g 2 min. zentrifugiert. Das daraus entstehende Pellet enthält Kernmaterial und Zelltrümmer (Fraktion K). Der Überstand, der das Cytosol und die Zellorganellen beinhaltet, wird in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und bei 400.000 g 2 min. zentrifugiert. Hierbei wird das Cytosol (Fraktion C) von den Mikrosomen, Mitochondrien, Endosomen und Lysosomen (Fraktion O) getrennt.

## 2.9 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der Präparationen wird nach einer modifizierten Bradford-Methode bestimmt (Bradford, 1976). Hierbei wird das Verfahren mit BSA (0,5-10 µg) geeicht und als Doppelbestimmung durchgeführt.

In eine Mikrotiterplatte werden je 200 µl Roti-Nanoquant-Arbeitslösung (handelsübliche Lösung, die mit H<sub>2</sub>O 1:5 verdünnt wird) vorgelegt und jeweils mit 50 µl Proteinlösung versetzt. Die Proteinkonzentration wird so eingestellt, daß die Blaufärbung der Proben unterhalb derjenigen der Eichreihe liegt.

Danach werden die Absorptionen bei 450 nm sowie 610 nm im ELISA-Reader gemessen (Microplate Reader Tecan SpectraFluor, Tecan) und davon der Quotient ( $A_{610}/A_{450}$ ) gebildet.

## 2.10 N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAG)-Aktivität

In eine Mikrotiter-Platte werden 100  $\mu$ l Substratpuffer (0,8 mM, pH 5, mit dem Substrat MU-NAG 0,3 mg/ml in Lysepuffer: 0,2 M Phosphat/ 0,1 M Citrat pH 5, 1% NP40) vorgelegt und 5  $\mu$ l der jeweiligen Probe hinzupipettiert.

Zur Erstellung der Eichgerade werden verschiedene Konzentrationen an MU (zwischen 10  $\mu$ M und 400  $\mu$ M) als Doppelwerte pipettiert, so daß die Proben anschließend daran abgelesen werden können.

Nach einer Anregung bei 360 nm werden die Eichreihe und die Proben, im auf 37°C vorgewärmten ELISA-Reader, bei einer Wellenlänge von 465 nm gemessen.

Die Messung erfolgt zu 5-10 Zeitpunkten in einem Zeitraum von 30-45 min..

### Erstellung der Eichgerade:

Reaktionspuffer: 0,1 M Citrat pH 5,0, 0,02 % BSA

(10  $\mu$ l 10 % BSA + 5 ml 0,1 M Citratpuffer pH 5,0)

Standards: Verdünnungen einer 10 mM MU-Lösung = 17,6 mg/10 ml 0,5 M Glycin pH 10,4, 0,5 M NaCl

Meßpuffer: 0,5 M Glycinpuffer pH 10,4, 0,5 M NaCl

Zur Kalibrierung:

A (400 $\mu$ M):	40 $\mu$ l 10 mM MU	+	960 $\mu$ l Reaktionspuffer
B (300 $\mu$ M):	30 $\mu$ l "	+	970 $\mu$ l "
C (200 $\mu$ M):	20 $\mu$ l "	+	980 $\mu$ l "
D ( 40 $\mu$ M):	4 $\mu$ l "	+	996 $\mu$ l "
E ( 20 $\mu$ M):	2 $\mu$ l "	+	998 $\mu$ l "
F ( 10 $\mu$ M):	1 $\mu$ l "	+	999 $\mu$ l "

Diese Methode wurde nach einer fluorometrischen Bestimmungsmethode (Schmid et al., 1993) an die Bestimmung im ELISA-Reader adaptiert.

## 2.11 „Active Site-Labeling“ (Bogyo et al., 2000)

### 2.11.1 Puffer

Lyse-Puffer: pH 5,0

25,7 ml 0,2 M Phosphat, 24,3 ml 0,1 M Citrat, 1 % NP40, 10 µl 0,1 M EDTA, 10 µl 0,3 M DTT, auf pH 5,0 titriert

Transferpuffer: pH 8,3

12,12 g Tris, 57,68 g Glycin (MG:75,07), 800 ml Methanol auf 4 l H<sub>2</sub>O, bei 4°C abgedeckt gelagert

TBS-T-Puffer: pH 7,6

4,84 g Tris, 16 g NaCl auf 2 l H<sub>2</sub>O, pH 7,6 mit HCl eingestellt + 0,2% Tween 20

Laemmli-Puffer: pH 8,3

10 x Laemmli: 60,6 g Tris, 283 g Glycin, 20 g SDS, auf 2 l H<sub>2</sub>O aufgefüllt

2-fach Reduzierender Probenpuffer (RBS):

SDS-Probenpuffer (150 mM Tris-HCl, pH 6,8, 8 M Harnstoff, 4 % (w/v) SDS, 2 % (w/v) DTT, 10 % (w/v) Saccharose, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau);  
5 % β - Mercaptoethanol

### 2.11.2 Lösungen

10 mM Sucrose/Tris: pH 7,0

1 ml 0,5 M Tris-HCl (39,4 g/500 ml H<sub>2</sub>O), 49 ml 0,25 M Sucrose (42,79 g/500 ml H<sub>2</sub>O), mit NaOH auf pH 7,0 titrieren

Trispuffer für das Trenngel: pH 8,8

1,75 M Tris (159 g/750 ml H<sub>2</sub>O), 1,75 M Tris-HCl (70,8 g/300 ml H<sub>2</sub>O), 0,4 % SDS

Trispuffer für das Sammelgel: pH 6,8

1,75 M Tris (159 g/750 ml H<sub>2</sub>O), 1,75 M Tris-HCl (70,8 g/300 ml H<sub>2</sub>O), 0,4 % SDS

### 2.11.3 Gele

Ausreichend für zwei Platten (à 16x20 cm) wird das Trenngel mit 20,4 ml Acrylamid 30% (37,5:1), 12,5 ml Trispuffer pH 8,8, 16,8 ml H<sub>2</sub>O, 500 µl APS und 50 µl TEMED hergestellt.

Die Herstellung des Sammelgels, ebenfalls ausreichend für zwei Platten (à 16x20 cm), erfolgt aus 2,62 ml Acrylamid, 3,75 ml Trispuffer pH 6,8, 8,65 ml H<sub>2</sub>O, 125 µl APS und 12,5 µl TEMED.

APS und TEMED sollten zuletzt hinzugeben werden, da das Gel sonst schon frühzeitig polymerisiert!

Die doppelte Menge von APS und TEMED im Sammelgel beschleunigen die Polymerisierung.

#### 2.11.4 „Active-site“-spezifische Reaktion von Cysteinproteasen mit biotinyliertem JPM-565

Alle Schritte werden, wenn nicht anders beschrieben, auf Eis oder bei 4°C durchgeführt.

45 µg Protein der Proben werden jeweils in soviel Lysepuffer gegeben, daß ein Endvolumen von 50 µl entsteht, wobei die Kontroll-Probe zusätzlich 2 µl E-64 (10 mM) enthält.

Nach einer 45-minütigen Inkubation bei 37°C, werden in jedes Gefäß 2 µl biotinyliertes JPM-565 zugegeben und bei 37°C 60 min. inkubiert.

Die Reaktion wird mit 50 µl RBS gestoppt und sofort, Gefäße gut verschlossen, für 5 min. auf den 95°C vorgewärmten Heizblock gegeben.

Anschließend können die Proben bei Raumtemperatur stehen gelassen werden.

#### 2.11.5 SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli, 1970)

Zuerst wird das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gefüllt, etwas Ethanol darübergegeben, und gewartet, bis das Gel polymerisiert ist. Im Anschluß wird das Ethanol abgeschüttet und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Ein Kamm muß von der Seite her so eingelegt werden, daß keine Luftblasen entstehen. Nachdem das Gel polymerisiert ist, wird vorsichtig der Kamm entfernt und die entstandenen Taschen mit Wasser nachgespült. Die Glasplatten mit den Gelen werden in die Kammer eingespannt und mit Laemmli-Puffer aufgefüllt. Anschließend werden 70 µl jeder Probe in die Geltaschen gegeben und darauf geachtet, daß keine Luftblasen entstehen.

Nachdem die Kammer in den Tank eingebaut und mit Laemmli-Puffer aufgefüllt wurde, müssen die eventuell entstandenen Luftblasen unter der Gelunterseite mit einer Spritze entfernt werden.

Bei 70 V kann das Gel über Nacht laufen.

### 2.11.6 Proteintransfer auf PVDF-Membran

Nach beendeter Elektrophorese wird das Gel vorsichtig von den Glasplatten gelöst, mit H<sub>2</sub>O gespült und für ½ Stunde in kaltem (4°C) Transferpuffer äquilibriert.

Die PVDF-Membran (nur mit Handschuhen anfassen; besser mit einer Pinzette) kann mit einer Schablone zurecht geschnitten werden, sollte aber links oben markiert werden, um die mit Protein beladene Seite wiederzuerkennen. Nachdem die Membran für 15 sec. in Methanol aktiviert wurde, muß sie sofort in Transferpuffer gegeben werden.

Die mit Transferpuffer durchtränkten Filz- und Papierplatten müssen so zwischen Anode und Kathode gegeben werden, daß, von innen nach außen mit den Filz-Platten beginnend, danach die Papierplatten sowie das Gel und die PVDF-Membran, der Transfer der Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran garantiert ist.

Bei 0,4 A für 2 ½ Stunden können die Proteine bei 4°C transferiert werden.

Um die Vollständigkeit des Proteintransfers zu überprüfen wird das Gel mit einer Coomassie-Lösung (0,2 % (w/v) Serva Coomassie Brilliant Blue R 250, 50 % (v/v) Methanol, 8 % (v/v) Essigsäure) angefärbt.

Nach abgeschlossenem Proteintransfer wird die PVDF-Membran mit TBS-T gut gespült und für eine Stunde in Roti-Block (1:5) geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend muß gründlich mit TBS-T gewaschen werden.

Streptavidin-HRP 1:2000 wird in TBS-T/Roti-Block (10:1) gegeben und für 45 min geschüttelt. Nachdem mit TBS-T ausgiebig gewaschen wurde, wird die gut abgetropfte Membran mit der Proteinseite nach oben auf eine Kunststoffplatte gelegt.

Das ECL-Reagenz (Reagenz 1 : Reagenz 2; 1+1) wird mit einer Pipette gleichmäßig aufgetropft, so, daß die Proteinregion vollständig benetzt ist. Durch

Schwenken wird das Reagenz gleichmäßig verteilt und für 3-5 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wird die PDVF-Membran mit der Proteinseite nach unten auf eine Frischhaltefolie gelegt, eingepackt, je nach gewünschter Intensität, 1-10 min. auf den ECL-Film gelegt und im Automaten entwickelt.

Die PVDF-Membran kann weiter zum Immunblotting (Western Blot) verwendet werden:

## 2.12 Western Blot mit Cathepsin-Antikörpern

### 2.12.1 „Stripping“ von Immunoblots

Die PVDF-Membran wird in TBS-T gewaschen und anschließend für ½ Stunde bei 70°C im Wärmeschrank in 20 mM Tris (pH 6,7; 2 % SDS; 100 mM Mercaptoethanol) inkubiert. Anschließend muß sie gut mit H<sub>2</sub>O gespült und in TBS-T aufgenommen werden.

### 2.12.2 Immundetektion

Nachdem die PVDF-Membran über Nacht in Roti-Block (1:20) mit einer Folie bedeckt auf dem Schüttler bei 4°C geschwenkt wurde, wird die Flüssigkeit abgegossen und anschließend für 10 min. in TBS-T geschwenkt.

Die Erstantikörperlösung, bestehend aus 3 ml Roti-Block (1:20), 30 ml TBS-T und 15 µl Antikörper (1:2000) Anti-Human-Cat.S/oder-Cat.B (r.α-hu-Cat.S/oder-Cat.B; E. Weber/Halle), wird auf die PVDF-Membran gegeben und kann für 45 min. bei Raumtemperatur unter Schwenken einwirken. Danach wird die Membran dreimal je 5 min. mit TBS-T gewaschen.

Im Anschluß daran werden 10 µl des Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers (1:10.000) in 2-3 ml Roti-Block (1:20) und 100 ml TBS-T gegeben und für 45

min. bei Raumtemperatur unter Schütteln auf der Membran gelassen. Nach beendeter Einwirkzeit muß wieder dreimal je 5 min. in TBS-T gewaschen werden.

Die PVDF-Membran wird mit der Proteinseite nach oben auf eine Kunststoffplatte gelegt, das ECL-Reagenz mit einer Pipette gleichmäßig aufgetropft und 3-5 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation wird die PDVF-Membran mit der Proteinseite nach unten auf eine Frischhaltefolie gelegt, eingepackt und, je nach gewünschter Intensität, 1-10 min. auf dem ECL-Film liegend entwickelt.

## 2.13 Lösungen und Puffer für die Aktivitätsbestimmung der Cathepsine B, L und S (Schmid et al., 1997)

### 2.13.1 Lösungen

Die jeweiligen Lösungen werden mit zweifach destilliertem Wasser oder DMSO hergestellt und bei -20°C eingefroren. Benötigte Lösungen werden im Eisbad aufgetaut und gut durchmischt, bevor sie dem Versuchsansatz hinzugegeben werden.

AMC (MG 175,2)	1,75 mg/1 ml DMSO (10 mM)
Aprotinin (MG 6500)	1 mg/1 ml H <sub>2</sub> O (0,154 mM)
BSA (10%)	10 mg/100 µl H <sub>2</sub> O
CA 074 (MG 383,5)	1 mg/260 µl DMSO (10 mM)
DTT (MG 154,3)	3,09 mg/5 ml Puffer (4 mM)
E-64 (MG 357,4)	3,57 mg/1 ml DMSO (10 mM)
EDTA (MG 372,24)	93,1 mg/1 ml H <sub>2</sub> O (0,25 M)
Z-Phe-Arg-AMC (MG 676,17)	4,225 mg/1 ml DMSO (6,25 mM)
Z-Phe-Phe-CHN <sub>2</sub> (MG 470,53)	1,18 mg/5 ml DMSO (0,5 mM)



c) Reaktionspuffer zur Hemmung der Cathepsine L(+S) (1 ml):  
 1 ml Reaktionspuffer für Cathepsine B+L+S + 1 µl 0,5 mM Z-Phe-Phe-CHN<sub>2</sub>

d) Reaktionspuffer zur Hemmung der Cathepsine B+L+S  
 und...(Cysteinproteinasen) (1 ml):  
 1 ml Reaktionspuffer für Cathepsine B+L+S + 1 µl 10 mM E-64

e) Reaktionspuffer für Cathepsin S (1 ml):

0,618 mg DTT	(4 mM)
934 µl 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5	
10 µl 10% BSA	(0,1%)
16 µl 0,25 M EDTA	(4 mM)
40 µl 0,154 mM Aprotinin	(6 µM)

f) Reaktionspuffer zur Hemmung von Cathepsin S (1 ml):  
 1 ml Reaktionspuffer für Cathepsin S + 1 µl 5 µM LHVS

#### 2.13.4 AMC-Standardlösungen zur Kalibrierung

A (20 µM): 1000 µl Reaktionspuffer	+	2 µl AMC-Stammlösung
B (8 µM): 150 µl Reaktionspuffer	+	100 µl A
C (4 µM): 200 µl Reaktionspuffer	+	50 µl A
D (2 µM): 450 µl Reaktionspuffer	+	50 µl A

Zur Aktivitätsbestimmung der Cathepsine B, L und S in den Proben wird als unspezifisches Substrat 0,5 mM Z-Phe-Arg-AMC benutzt (Olbricht et al., 1986). Das Reagenz für die Aktivitätsbestimmung von Cathepsin B+L+S besteht aus 0,5 mM Z-Phe-Arg-AMC in 0,1 M Natrium-Citrat-Puffer (pH 5,0) mit 4 mM DTT, 4 mM EDTA, 6 µM Aprotinin und 0,1% BSA.

Das Reagenz für die Aktivitätsbestimmung von Cathepsin S besteht aus 0,5 mM Z-Phe-Arg-AMC in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,5) mit 4 mM DTT, 4 mM EDTA, 6  $\mu$ M Aprotinin, 0,1% BSA.

Der Zusatz von 4 % DMSO wurde nach erfolgter Reaktion von Cathepsin S wegen der begrenzten Löslichkeit von Z-Phe-Arg-AMC und des geringen Substratverbrauchs benötigt. Die Cathepsinaktivitäten werden in einer Konzentrationsspanne von 4-25% DMSO (v/v) nicht beeinflusst (Olbricht et al., 1986).

## 2.14 Messung von Cathepsinaktivitäten

Die Cathepsine B, L und S besitzen verschiedene katalytische Eigenschaften, spalten aber alle das synthetisch hergestellte Substrat Z-Phe-Arg-AMC so, daß AMC freigesetzt wird. Aufgrund seiner Fluoreszenz bei 350/450 nm ist AMC gut bestimmbar. Da das Substrat bei einer Konzentration von 0,5 mM für alle drei Enzyme im Sättigungsbereich liegt, können die Meßergebnisse direkt miteinander verglichen werden (Schmid et al., 1997). Die Hydrolyse von AMC aus dem Substrat Z-Phe-Arg-AMC ergibt die gemessenen Enzymaktivitäten. Auch wenn AMC noch nicht von Z-Phe-Arg-AMC abgespalten ist, ist eine leichte Fluoreszenz zu messen. Um diesen Fehler klein zu halten, wird ein Reagenzienleerwert bestimmt, der diese Eigenfluoreszenz mit erfasst. Mittels eines Gewebeleerwertes ( $t=0$ ), der vor der Inkubation gemessen wird, wird die Eigenfluoreszenz der jeweiligen Proben nicht in die Berechnung der Enzymaktivitäten einbezogen.

Zuerst wird die Gesamtaktivität der drei Cathepsine B, L und S mit 0,5 mM Z-Phe-Arg-AMC bei pH 5 bestimmt (nach Inkubation von 10 Minuten im 37°C-Wasserbad). Ebenso kann die Aktivität von Cathepsin B über die Hemmung durch 10  $\mu$ M CA-074 gemessen werden. Anschließend wird die Cathepsin S-Aktivität, nach Vorinkubation von 60 Minuten bei pH 7,5, zur Inaktivierung von Cathepsin B und Cathepsin L, bestimmt (Schmid et al., 1997). Die

Aktivitätsbestimmungen werden in kleinen Volumina von ca. 100  $\mu$ l durchgeführt. Zur Messung werden die Ansätze mit 0,1 M Citratpuffer pH 5,0 1:200 verdünnt, um durch niedrige Leerwertsignale den Meßfehler zu verringern.

Bei jeder Messung wird eine Kalibrierung mit vier verschiedenen AMC-Standards, die als Eichung dienen, mitgeführt, um anschließend aus der gemessenen Fluoreszenz auf die Enzymaktivitäten der einzelnen Cathepsine schließen zu können.

Durch die Messung einer Chinin-Hydrobromid-Lösung mit bekannter Fluoreszenz wurde die Intensität der Lampeneinstrahlung überprüft.

Die spezifischen katalytischen Aktivitäten des Gesamtzellhomogenates, der Organellenfraktionen, der Endosomen und der Lysosomen werden in  $\mu$ mol umgesetztes Substrat pro Minute und g Protein (U/g) angegeben.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Gewinnung der Monozyten

Nach der Isolierung der mononuklearen Zellen aus dem peripheren Blut und deren Gewinnung durch Größensedimentation lag deren Ausbeute für jeweils zwei Buffy coats bei ca.  $4 \times 10^8$  Zellen. Mittels FACS-Analysen, die freundlicherweise von Dr. Ch. Driessen, Tübingen, Deutschland, durchgeführt wurden, wurde mit einem Antikörper gegen CD 14, einen Monozytenmarker an der Zelloberfläche, bestätigt, daß Monozyten aus dem Blut isoliert wurden. Zusätzlich konnte die Hochregulation der MHC II-Moleküle durch HLA-DR-Antikörper quantifiziert werden. Die Trennmethode mittels Dichtezentrifugation und Größensedimentation ergab einen Anteil von 60-80 % Monozyten. Den Hauptteil der anderen Zellen bildeten die T-Lymphozyten.

Diese Zellpräparation wurde entweder direkt homogenisiert oder vor dem Homogenisieren in serumfreien Medium, ohne oder mit Zusatz von Interferon- $\gamma$  (100 U/ml), 1-4 Tage lang kultiviert.

### 3.2 Homogenisierung

Durch die Homogenisierung nach Potter-Elvehjem wurden viel weniger Zellen zerstört, mikroskopisch mit Trypanblaufärbung nachgewiesen, als durch das Homogenisieren mit der Kammer, dem EBMC-Zell-Homogenisator.

Die Kammer besitzt einen Hohlraum von 20  $\mu\text{m}$  Durchmesser. Um eine ausreichende Homogenisierung der Zellen zu gewährleisten, wurden verschiedene Ballgrößen (2  $\mu\text{m}$ , 4  $\mu\text{m}$ , 6  $\mu\text{m}$  und 8  $\mu\text{m}$ ) ausgetestet, wodurch ein dem Durchmesser entsprechender Spaltraum entsteht. Mit dem 8  $\mu\text{m}$ -Ball

(=> 12 µm Spaltbreite) wurden die meisten Zellen homogenisiert, da 12 µm auch in etwa dem Durchmesser der Monozyten entspricht.

### 3.3 Subzelluläre Fraktionierung

Für die Trennung der lysosomalen Fraktion von der endosomal-mitochondrialen Fraktion des Endosomen-Lysosomen-Mitochondrien-Pellets mußte die hierfür benötigte Menge an H<sub>2</sub>O für die 15-minütige hypotone Lyse ausgetestet werden. In einem Experiment (Experiment 1) wurden die beiden Fraktionen durch Zugabe des 10-fachen Volumen des Pellet-Gewichts an H<sub>2</sub>O lysiert. Den beiden anderen Experimenten (Experiment 2 und 3) wurde das 15-fache Volumen seines Gewichts an H<sub>2</sub>O zugesetzt.

Da die NAG als Leitenzym für das lysosomale Zellkompartiment gilt (Casciola-Rosen und Hubbard, 1991), wurde die Aktivität dieses Enzyms in den einzelnen Proben bestimmt.

Die NAG-Aktivitäten dieser Fraktionen zeigten in den mit 10-fachem Volumen an H<sub>2</sub>O behandelten Endosomen im Vergleich zu der lysosomalen Fraktion eine ähnliche Aktivität (Faktor 4,8) wie in denjenigen, denen das 15-fache Volumen an H<sub>2</sub>O zugesetzt wurde (Faktor 5,3 und 4,7).

Tabelle 1 gibt einen Überblick der spezifischen NAG-Aktivität der unterschiedlichen Zellbestandteile der verschiedenen Experimente. Die höchste spezifische NAG-Aktivität zeigt sich in den frisch isolierten Monozyten in der endosomal-fraktion, wogegen diese in den mit Interferon-γ stimulierten Zellen und in deren Kontrolle, bis auf die Kern-Fraktion, in den lysosomalen Fraktionen zu finden ist.

**Tabelle 1** NAG-Aktivität der frisch isolierten und kultivierten Monozyten.

NAG	Monozyten (U/g)	ohne IFN- $\gamma$ (U/g)	mit IFN- $\gamma$ (U/g)
G-Fraktion	56,1 $\pm$ 4,0	166,0 $\pm$ 104,8	197,0 $\pm$ 56,3
K-Fraktion	26,4 $\pm$ 12,0	422,2 $\pm$ 200,9	460,9 $\pm$ 141,5
E-Fraktion	749,3 $\pm$ 115,9	190,0 $\pm$ 9,8	224,9 $\pm$ 28,3
L-Fraktion	152,3 $\pm$ 17,1	346,1 $\pm$ 91,1	372,7 $\pm$ 129,3
M-Fraktion	4,62 $\pm$ 1,1	41,5 $\pm$ 4,6	74,6 $\pm$ 20,9
C-Fraktion	3,96 $\pm$ 1,2	0 $\pm$ 0	33,5 $\pm$ 22,0

K: Kerne, G: Gesamtzellhomogenat, L: Lysosomen, E: Endosomen, M: Mikrosomen, C: Cytosol (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung bei frisch isolierten Monozyten: n=2-5 und bei kultivierten Monozyten: n=3).

Auffallend sind die sehr hohen Werte in den Kernfraktionen der kultivierten im Vergleich zu den frisch isolierten Monozyten sowie die hohen Werte in den Mikrosomenfraktionen der kultivierten Monozyten und in der Cytosolfraktion der mit Interferon- $\gamma$  behandelten Monozyten.

Weiter ist zu erkennen, daß die NAG-Aktivität, in allen bis auf die endosomalen Fraktionen, durch Kultivierung der Monozyten ansteigt. Hier wiederum ist in den mit Interferon- $\gamma$  kultivierten Zellen eine höhere Aktivität zu verzeichnen als in den ohne Interferon- $\gamma$  kultivierten Zellen.

### 3.4 Austestung der Inhibitoren

Die Aktivitäten der Cathepsine B, L und S wurden mit 0,5 mM Z-Phe-Arg-AMC, einem gemeinsamen Substrat, fluorometrisch gemessen ( $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g Protein} = \text{U/g}$ ). Für jeden Zelltyp muß ausgetestet werden, welche Cathepsinaktivitäten erfaßt werden. Daher wurden die für die Cathepsine B, L und S geeigneten Inhibitoren ausgetestet. Die Gesamtaktivitäten der Cathepsine B, L und S wurden vollständig durch 10  $\mu\text{M}$  E-64 gehemmt. Cathepsin B wurde bei pH 5 durch 10  $\mu\text{M}$  CA-074 gehemmt, wobei die Restaktivität, hemmbar durch 0,5  $\mu\text{M}$

Z-Phe-Phe-CHN<sub>2</sub>, der Aktivität von Cathepsin L entspricht. Nach der Inaktivierung der Cathepsine B und L durch Inkubation bei 37°C bei pH 7,5 für eine Stunde wurde die Aktivität von Cathepsin S gemessen, welche durch 5 nM LHVS inhibiert wurde. Mit dem Inhibitor CA-074 wurde nachgewiesen, daß nach der Inkubation für die Bestimmung des Cathepsin S wirklich kein Cathepsin B mehr nachweisbar war und dieser Inhibitor auch Cathepsin S nicht hemmt. Weitere Messungen haben ergeben, daß Cathepsin B durch 5 nM LHVS sowie auch durch 20 nM LHVS nicht gehemmt wird.

### 3.5 Cathepsinaktivitäten der frisch isolierten Monozyten

#### 3.5.1 Spezifische katalytische Aktivitäten

Die spezifischen Aktivitäten der Cathepsine B, L und S in Gesamtzellhomogenaten und Organellen (Tabellen 2 + 3) zeigen in den einzelnen Experimenten große Unterschiede für die Gesamtzellhomogenate, bieten dagegen für die Organellenfraktionen ähnliche Werte.

**Tabelle 2** Spezifische Cathepsinaktivitäten in Gesamtzellhomogenaten und Organellen frisch isolierter Monozyten.

Monozyten		B+L+S (U/g)	B (U/g)	L (U/g)	S (U/g)
Exp. I	Homogenat	87,2	83,2	0,9	0,4
	Organellen	162,8	153,0	12,5	3,4
Exp. II	Homogenat	13,5	12,3	0,7	0,3
	Organellen	83,8	76,6	16,8	1,7
Exp. III	Homogenat	12,3	10,4	2,0	-
	Organellen	95,8	86,9	5,5	3,3

**Tabelle 3** Spezifische Cathepsinaktivitäten in Gesamtzellhomogenaten und Organellen frisch isolierter Monozyten.

Monozyten	B+L+S (U/g)	B (U/g)	L (U/g)	S (U/g)
Homogenat	37,7 ± 42,9	35,3 ± 41,5	1,2 ± 0,7	0,4 ± 0,1
Organellen	114,1 ± 42,6	105,5 ± 41,5	11,6 ± 5,7	2,8 ± 1,0

(Mittelwert ± Standardabweichung, n=3).

Daran ist zu sehen, daß der Gehalt der Monozyten an cytosolischen Cysteinproteinase-Inhibitoren stark variiert.

Die Tabellen 4-6 zeigen vier einzelne Experimente mit frisch isolierten Monozyten bezüglich der Cathepsinaktivitäten in Zelllysaten, endosomalen und lysosomalen Fraktionen.

Mittelwerte und Standardabweichungen errechnen sich jeweils aus zwei bis drei unabhängigen Mehrfachmessungen, die wiederum aus Doppelwerten entstehen.

**Tabelle 4** Spezifische Cathepsinaktivitäten in Gesamtzellhomogenaten frisch isolierter Monozyten.

Gesamtzellhomogenat	B+L+S (U/g)	B (U/g)	L (U/g)	S (U/g)
Experiment 1	59,1 ± 23,9	62,0 ± 24,3	7,3	0,3 ± 0,05
Experiment 2	73,8 ± 16,3	72,1 ± 16,0	1,8 ± 0,9	0,2 ± 0,02
Experiment 3	32,5 ± 4,3	28,3 ± 2,4	4,2 ± 1,9	0,6 ± 0,05
Experiment 4	73,9 ± 8,3	69,1 ± 10,2	4,2 ± 1,4	0,2 ± 0,08

**Tabelle 5** Spezifische Cathepsinaktivitäten in endosomalen Fraktionen frisch isolierter Monozyten.

Endosomen	B+L+S (U/g)	B (U/g)	L (U/g)	S (U/g)
Experiment 1	681,2 ± 241,1	615,4 ± 218,3	65,8 ± 53,0	34,8 ± 13,1
Experiment 2	1020,1 ± 441,8	941,9 ± 446,9	78,1 ± 12,0	20,8 ± 3,4
Experiment 3	467,0 ± 44,9	438,7 ± 34,3	28,4 ± 1,2	25,3 ± 3,3
Experiment 4	-	-	-	-

**Tabelle 6** Spezifische Cathepsinaktivitäten in lysosomalen Fraktionen frisch isolierter Monozyten.

lysosomale Fraktion	B+L+S (U/g)	B (U/g)	L (U/g)	S(U/g)
Experiment 1	74,5 ± 5,1	74,5 ± 5,1	0	1,1 ± 0,3
Experiment 2	149,3 ± 84,2	154,9 ± 83,0	38,1 ± 26,1	1,4 ± 0,1
Experiment 3	125,9 ± 5,1	102,5 ± 16,9	23,4 ± 11,9	0,9 ± 0,1
Experiment 4	-	-	-	-

Vergleicht man die Experimente 1-4 miteinander, so zeigen sich große Schwankungen, wobei die Werte für Cathepsin S am konstantesten sind und für Cathepsin L die größten Diskrepanzen bieten.

Die spezifischen Aktivitäten von Cathepsin B, die denen der NAG sehr ähnlich sind (Tabelle 1), machen mit mehr als 90 % den größten Teil der Gesamtaktivität im Zelllysate und in den verschiedenen Kompartimenten aus. Cathepsin S beansprucht dabei mit 0,5 % - 4,2 % den geringsten Anteil.

Die Aktivitäten der Cathepsine B, L und S sind in der endosomalen Fraktion um ein Vielfaches höher als in der lysosomalen Fraktion. Hier ist auffallend, daß Cathepsin S mit im Mittel 27-fach höheren Werten in den Endosomen, verglichen mit den anderen Cathepsinen, die größten Unterschiede in den beiden Fraktionen aufzeigt (Tabelle 5).

Experiment 1 (10-faches Pelletvolumen an Wasser für die hypotone Lyse) ergab im Vergleich zu den Experimenten 2 und 3 (15-faches Pelletvolumen an Wasser) leicht erhöhte Aktivitäten der Cathepsine B, L und S in der endosomalen Fraktion bezogen auf die jeweilige lysosomale Fraktion. Dies entspricht auch den Aktivitätswerten der NAG (3.3).

In der endosomalen Fraktion waren, verglichen mit Gesamtzellhomogenaten, die Aktivitäten der Cathepsine B, L und S stark angereichert (Faktor 11,5; 13,2 und 96,9), während in der lysosomalen Fraktion die Enzyme weniger konzentriert waren (Faktor 2,2; 7,1 und 3,7). In beiden Fraktionen unterscheidet sich der Anteil der Aktivitäten der Cathepsine B, L und S an denen in Gesamtzellhomogenaten stark. In der endosomalen Fraktion betrug die Aktivität von Cathepsin S, verglichen mit der Gesamtaktivität, 4 %, während sich die Aktivität von Cathepsin L, ähnlich der der Gesamtzellhomogenate, auf 8 % belief. In der lysosomalen Fraktion betrug die Aktivität von Cathepsin L 22 % der Gesamtaktivität der Cathepsine B, L und S, während die Aktivität von Cathepsin S mit 0,8 %, ähnlich der des Gesamtzellhomogenates, sehr gering blieb. In den einzelnen Experimenten wird deutlich, daß die Anreicherung von aktivem Enzymprotein, besonders von Cathepsin S, in den endosomalen Fraktionen, im Vergleich zu den lysosomalen Fraktionen, am stärksten ist, ähnlich wie auch für die NAG gezeigt (Tabelle 1).

### 3.5.2 Darstellung aktiver Cathepsine durch „active-site labeling“

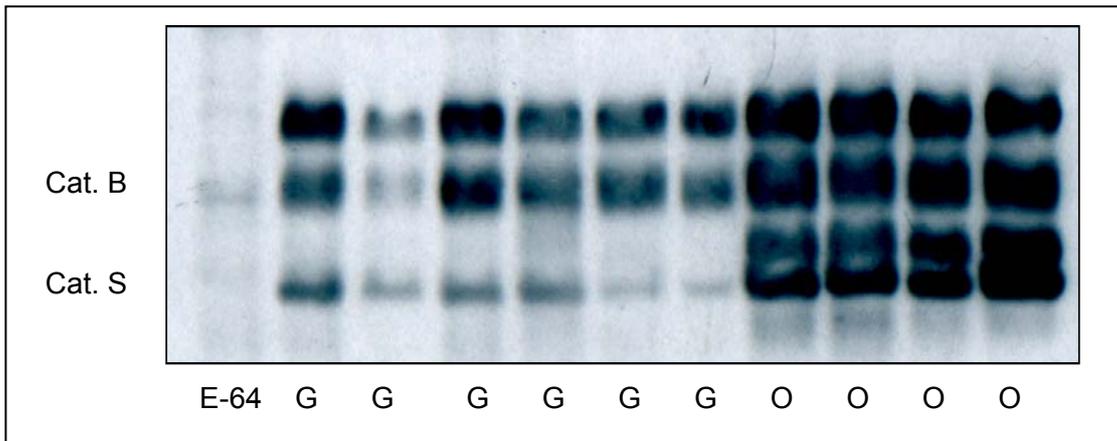
Nachdem 45 µg Protein des Gesamtzellhomogenats bzw. von Organellenfraktionen aus den einzelnen Experimenten mit biotinyliertem JPM-565 durch Bindung an das aktive Zentrum verschiedener Cysteinproteinasen markiert und über SDS-PAGE (12,5 %) aufgetrennt wurde, wurden mittels Streptavidin-Meerrettichperoxidase/ECL-System die aktiven Enzyme sichtbar gemacht.

Auf der selben Membran wurden durch Western Blot mit polyklonalen Antikörpern gegen Cathepsin B und Cathepsin S die beiden Enzyme identifiziert, nachdem die Membran mit 20 mM Tris pH 6,7, 2 % SDS und 100 mM Mercaptoethanol „gestripped“ wurde.

Als eine dominierend diffuse Bande zeigte sich Cathepsin B auf der SDS-PAGE bei ~30 kDa. Die schmalere Bande von Cathepsin S war bei ~ 24 kDa sichtbar.

Abbildung 1 zeigt die Anreicherung der Cathepsine in den Organellenfraktionen (Mitochondrien, Endosomen, Lysosomen und Mikrosomen) gegenüber dem Gesamtzellhomogenat. Daher erscheint nur in den Organellenfraktionen eine Bande zwischen 24 kDa und 30 kDa (den Banden von Cathepsin S und Cathepsin B), die in den Gesamtzellhomogenaten nicht erfaßt wird. Darüber hinaus fällt auf, daß bei gleicher Proteinmenge Muster und Intensität der Markierung in den Organellen sehr ähnlich, in den verschiedenen Gesamtzellhomogenaten dagegen recht unterschiedlich ist, wie auch anhand der Cathepsinaktivitäten zu sehen ist (Tabelle 2).

In Abbildung 1A ist auch zu sehen, daß die Cysteinproteinasenaktivitäten, die durch JPM 565 dargestellt werden, durch den Cysteinproteinasen-Inhibitor E-64 gehemmt werden.

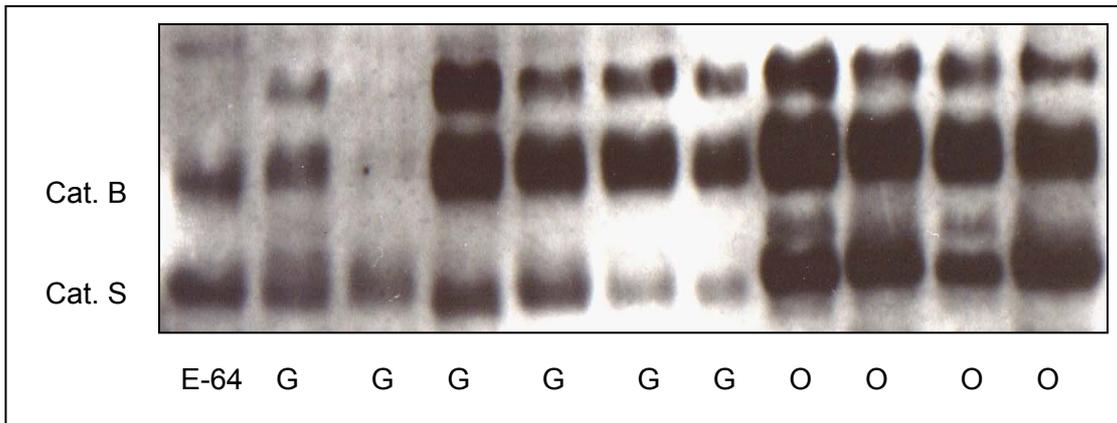


**Abbildung 1A:** Darstellung von aktiven Cathepsinen durch „active-site labeling“ von Zellhomogenaten und Organellenfraktionen frisch isolierter Monozyten (G: Gesamtzellhomogenat; O: Organellenfraktion).

Es wurden jeweils 45 µg Protein mit biotinyliertem JPM-565 gekoppelt, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch das Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase/ECL-System sichtbar gemacht.



**Abbildung 1B:** Darstellung von Cat. S durch Western Blot von Zellhomogenaten und Organellenfraktionen frisch isolierter Monozyten (G: Gesamtzellhomogenat; O: Organellenfraktion) unter Verwendung der selben Membran wie in Abb. 1A benutzt, nachdem diese mit 20 mM Tris pH 6,7, 2 % SDS und 100 mM Mercaptoethanol „gestrippet“ wurde. Die Cathepsin-Antikörper-Komplexe wurden durch Lumineszenz sichtbar gemacht.

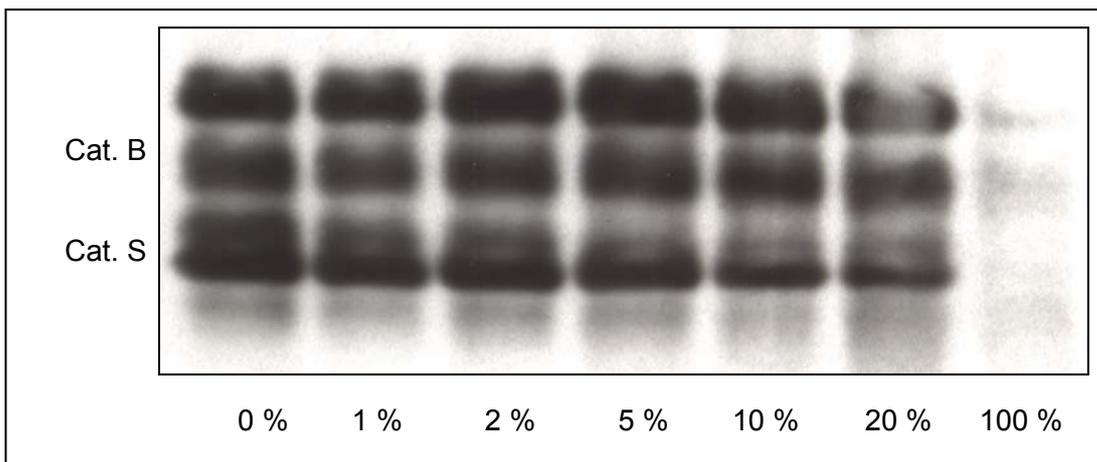


**Abbildung 1C:** Darstellung von Cat. B durch Western Blot von Zellhomogenaten und Organellenfraktionen frisch isolierter Monozyten (G: Gesamtzellhomogenat; O: Organellenfraktion) unter Verwendung der selben Membran wie in Abb. 1B, ohne diese mit 20 mM Tris pH 6,7, 2 % SDS und 100 mM Mercaptoethanol „gestrippt“ zu haben, so daß zusätzlich noch Cat. S zu sehen ist. Die Cathepsin-Antikörper-Komplexe wurden durch Lumineszenz sichtbar gemacht.

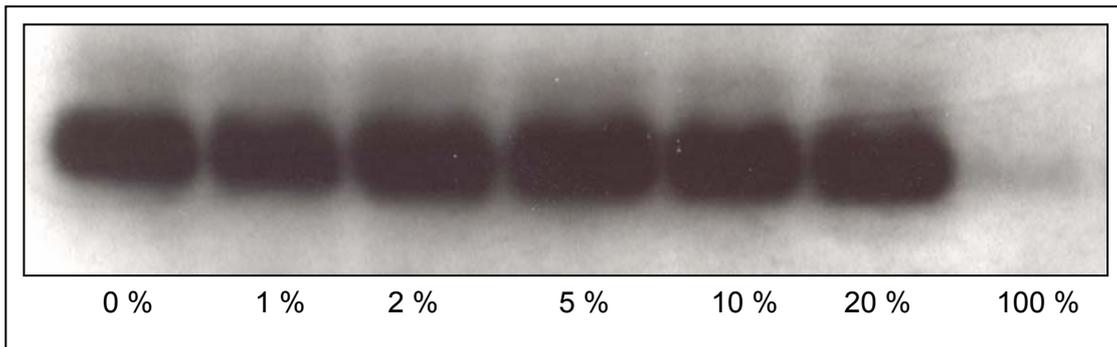
In Abbildung 1B ist das Gesamtprotein von aktivem und inaktivem Cathepsin S, in Abbildung 1C das Gesamtprotein von Cathepsin B und Cathepsin S der Gesamtzellhomogenate und Organellenfraktionen dargestellt. Hier sind die Banden im Vergleich zum „active-site labeling“ kräftiger und breiter darstellbar, was besonders bei den Gesamtzellhomogenaten zu sehen ist. Wie erwartet, war in der ersten Bande in Abbildung 1B Cathepsin S - Protein zu sehen, obwohl es enzymatisch durch E-64 inaktiviert wurde (Abbildung 1A).

### 3.5.3 Einfluß cytosolischer Cysteinproteinasen-Inhibitoren auf die Darstellung aktiver Enzyme

Um die in Abbildung 1A gezeigten unterschiedlichen Cathepsinaktivitäten in den verschiedenen Gesamtzellhomogenaten näher zu untersuchen, wurde zu einer Organellen-Fraktion Cytosol hinzutitriert. Hierbei zeigt Abbildung 2A, daß Cytosol die Cathepsinaktivitäten der Organellenfraktion hemmt. Cathepsin S reagiert auf die cytosolischen Inhibitoren empfindlicher als Cathepsin B, die nicht identifizierte Bande dazwischen wird durch diese jedoch am stärksten beeinflusst.



**Abbildung 2A:** Darstellung unterschiedlicher Mengen an aktivem Enzym mittels „active-site labeling“ durch Titration von 0%-100% Cytosol in eine Organellenfraktion von frisch isolierten Monozyten. Es wurden jeweils 45 µg Protein mit verschiedenen Konzentrationen Cytosol versetzt und, mit biotinyliertem JPM-565 gekoppelt, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch das Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase/ECL-System sichtbar gemacht.

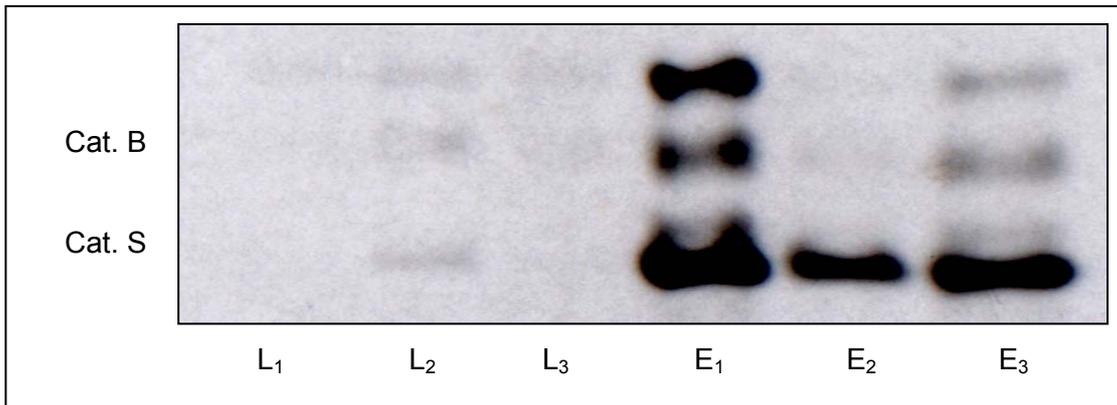


**Abbildung 2B:** Darstellung gleicher Menge an Gesamtprotein von Cat. S nach Titration von 0%-100% Cytosol in eine Organellenfraktion von frisch isolierten Monozyten durch Western Blot unter Verwendung derselben Membran wie in Abb. 2A, nachdem diese mit 20 mM Tris pH 6,7, 2 % SDS und 100 mM Mercaptoethanol „gestriped“ wurde. Die Cathepsin-Antikörper-Komplexe wurden durch Lumineszenz sichtbar gemacht.

Im Gegensatz zur Darstellung von unterschiedlichen Mengen an aktivem Enzym (Abbildung 2A) zeigt Abbildung 2B die gleiche Menge an Gesamtprotein von Cathepsin S. Die Beobachtung, daß Cathepsin B weniger stark durch cytosolische Inhibitoren gehemmt wird als Cathepsin S, stimmt mit quantitativen Befunden von Abrahamson (1994) überein.

Darüber hinaus kann aus Abbildung 1A, 1B und 1C geschlossen werden, daß die Gesamtzellhomogenate der Experimente 1-4 unterschiedliche Konzentrationen an cytosolischen Cysteininhibitoren enthalten.

Ergänzend zu den Aktivitätsbestimmungen von Cathepsin B und Cathepsin S (Tabellen 4, 5, 6), wurden in drei verschiedenen Präparationen die Cysteinproteinasen in den endosomalen und lysosomalen Fraktionen aus frisch isolierten Monozyten mit je 9 µg Protein an biotinyliertes JPM-565 gekoppelt und durch „active-site labeling“ dargestellt (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Darstellung von aktiven Cathepsinen durch „active-site labeling“ der endosomalen und lysosomalen Fraktionen frisch isolierter Monozyten (L<sub>1-3</sub>: lysosomale Fraktionen der Experimente 1-3; E<sub>1-3</sub>: endosomale Fraktionen der Experimente 1-3). Hier wurden L<sub>1</sub> und E<sub>1</sub> durch Lyse mit 10 Vol. H<sub>2</sub>O und L<sub>2+3</sub> und E<sub>2+3</sub> mit 15 Vol. H<sub>2</sub>O gewonnen. Es wurden jeweils 9 µg Protein mit biotinyliertem JPM-565 gekoppelt, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch das Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase/ECL-System sichtbar gemacht.

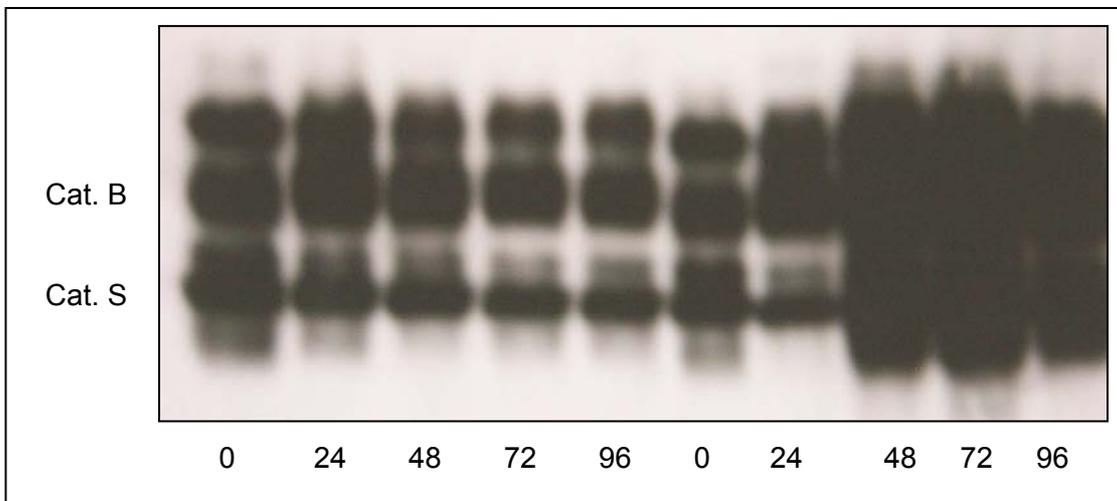
Übereinstimmend mit den quantitativen Befunden sind Cathepsin B und Cathepsin S in der endosomalen Fraktion höher angereichert als in der lysosomalen Fraktion. Diese Verteilung entspricht auch der Verteilung der NAG-Aktivität in denselben Fraktionen (Tabelle 1).

### 3.6 Einfluß von Interferon- $\gamma$ auf die Cathepsinaktivitäten und Expression von MHC Klasse I- und MHC Klasse II-Molekülen

Um den Zeitverlauf eines möglichen Einflusses von Interferon- $\gamma$  auf die Cathepsinaktivitäten zu untersuchen, wurden die frisch isolierten Monozyten über 96 Stunden in serumfreien Medium mit Interferon- $\gamma$  (100 U/ml) kultiviert. Alle 24 Stunden wurden Organellenpellets hergestellt und deren aktives Protein

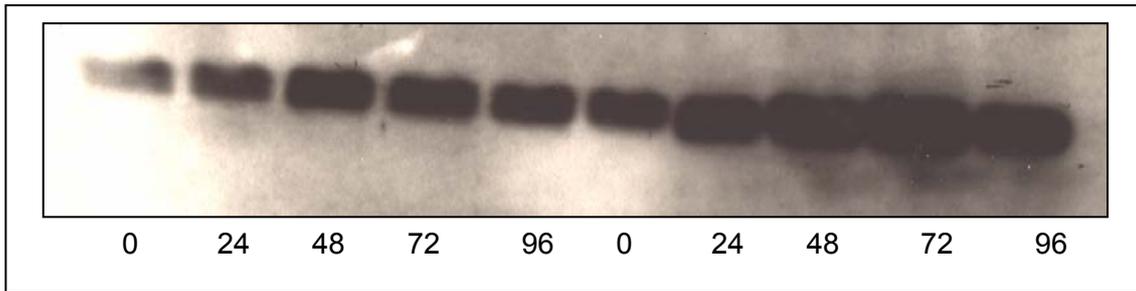
sichtbar gemacht (Abbildung 4A). Dabei wird nach 48 und 72 Stunden eine Hochregulation sämtlicher Cathepsine deutlich. Nach 96-Stunden erscheint die Menge an aktiven Enzymen dagegen geringer.

In Abbildung 4B zeigt sich diese Hochregulation als Zunahme der Gesamtproteinmenge am 2. und 3. Tag. Die Kontrollen dagegen bieten weder im „active-site labeling“ noch im Cathepsin S-Blot diese deutlichen Veränderungen.



**Abbildung 4A:** Darstellung der Kinetik der Hochregulation von aktiven Cathepsinen in Organellenfraktionen durch „active-site labeling“ von ohne und mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  kultivierten Monozyten über 96 Stunden (Tage 0-4).

Es wurden jeweils 45  $\mu$ g Protein mit biotinyliertem JPM-565 gekoppelt, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch das Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase/ECL-System sichtbar gemacht.



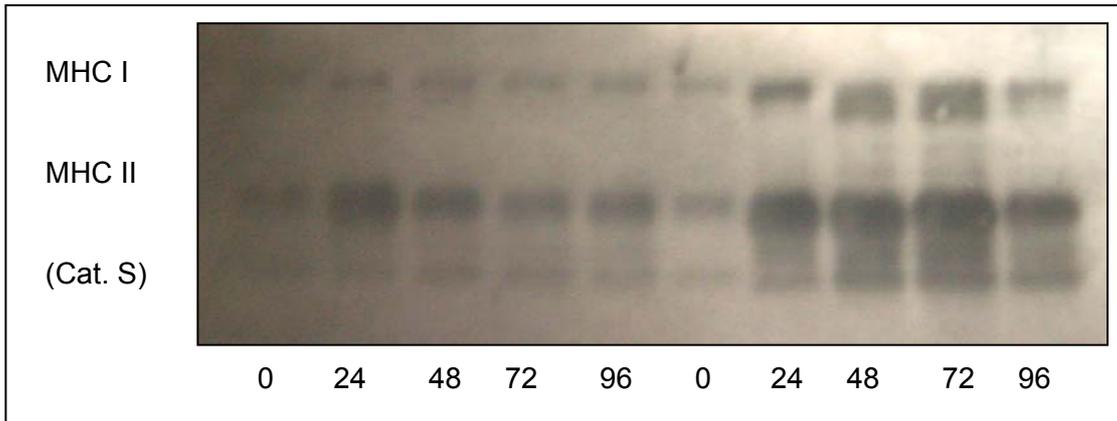
**Abbildung 4B:** Darstellung des Gesamtproteins von Cat. S in Organellenfraktionen von ohne und mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  kultivierten Monozyten über 96 Stunden (Tage 0-4) durch Western Blot unter Verwendung derselben Membran wie in Abb. 4A, nachdem diese mit 20 mM Tris pH 6,7, 2 % SDS und 100 mM Mercaptoethanol „gestripped“ wurde. Die Cathepsin-Antikörper-Komplexe wurden durch Lumineszenz sichtbar gemacht.

Abbildung 4C zeigt die Darstellung der MHC I- und MHC II-Moleküle durch einen Western Blot mit derselben Präparation.

MHC I ( $\alpha$ -heavy-chain) ist mit einem Molekulargewicht von 46 kDa in der oberen Bande sichtbar, MHC II ( $\beta$ -Kette) darunter mit einem MW von 33 kDa.

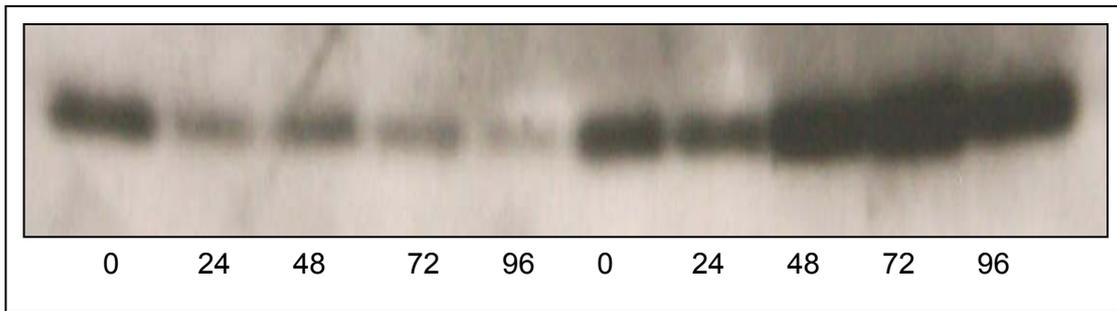
Unter Interferon- $\gamma$ -Stimulation wurden sowohl MHC Klasse I- als auch MHC Klasse II-Moleküle hochreguliert, deren Hochregulation jedoch im Vergleich zu Cathepsin B und Cathepsin S schon am 1. Tag zu sehen ist. Cathepsin B, Cathepsin S und parallel auch die MHC-Moleküle erreichten in gleichem Maße am 2. und 3. Tag ihr Maximum.

Durch Kultivierung der Monozyten in serumfreiem Medium ohne Interferon- $\gamma$  zeigten sich keine Veränderungen der Cathepsinmengen. MHC Klasse I-Moleküle waren unter diesen Bedingungen nur schwach exprimiert, MHC Klasse II-Moleküle etwas deutlicher.



**Abbildung 4C:** Darstellung von MHC Klasse I (46 kDa) und MHC Klasse II (33 kDa) durch Western Blot mit polyklonalen Antikörpern (1:2000) in Organellenfraktionen von ohne und mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  kultivierten Monozyten über 96 Stunden (Tage 0-4) unter Verwendung der selben Membran wie in Abb. 4B, ohne diese zuvor mit 20 mM Tris pH 6,7, 2 % SDS und 100 mM Mercaptoethanol „gestripped“ zu haben, so daß zusätzlich noch Cat. S zu sehen ist. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden durch Lumineszenz sichtbar gemacht.

Um herauszufinden, ob durch Interferon- $\gamma$  neben den Cathepsinen und MHC-Molekülen weitere Proteine induziert wurden, wurde mit denselben Präparationen ein Western Blot zur Darstellung des natürlichen Cysteinproteinase-Inhibitors Cystatin C durchgeführt (Abbildung 5). Auch hier läßt sich bei ~ 15 kDa eine starke Induktion von Cystatin C in den mit Interferon- $\gamma$  stimulierten Monozyten erkennen (Tag 2-4). Gegensätzlich dazu wird in den Kontrollansätzen (Tag 1-4) eine Abnahme des Inhibitors deutlich.



**Abbildung 5:** Darstellung des Inhibitors Cystatin C in Organellenfraktionen von ohne und mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  kultivierten Monozyten über 96 Stunden (Tage 0-4) durch Western Blot mit polyklonalem Antikörper (1:2200).

Es wurden jeweils 40  $\mu$ g Protein durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Cystatin-Antikörper-Komplexe wurden durch Lumineszenz sichtbar gemacht.

Aufgrund dieser Ergebnisse erwies es sich als günstig, weitere Experimente durchzuführen, um die spezifischen katalytischen Cathepsinaktivitäten der einzelnen Cathepsine zu messen. Hierfür erfolgte ausschließlich eine Stimulation frisch isolierter Monozyten mit Interferon- $\gamma$  über 72 Stunden, da durch Interferon- $\gamma$ -Behandlung zu diesem Zeitpunkt durchweg die höchsten Induktionen zu verzeichnen waren.

### 3.7 Spezifische katalytische Aktivitäten der Cathepsine B, L und S in kultivierten Monozyten

In den Tabellen 7-9 sind die Aktivitäten der Cathepsine B, L und S in verschiedenen Experimenten (5-7), mit ohne und mit Interferon- $\gamma$  (100 U/ml) kultivierten Monozyten über 72 Stunden, dargestellt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen errechnen sich jeweils aus zwei bis drei unabhängigen Mehrfachmessungen, die wiederum aus Doppelwerten entstehen. Auch hier sind große Unterschiede in den Aktivitäten der einzelnen Experimente auffallend. Betrachtet man die einzelnen Aktivitäten, so weisen die mit Interferon- $\gamma$  kultivierten Monozyten höhere Werte auf als ihre Kontrolle. Nur Cathepsin L und Cathepsin S in den lysosomalen Fraktionen zeigen die Tendenz zur Aktivitätsabnahme (Tabelle 9).

**Tabelle 7** Spezifische Cathepsinaktivitäten in Gesamtzellhomogenaten kultivierter Monozyten.

Gesamtzellhomogenate				
Kontrolle	B+L+S (U/g)	B (U/g)	L (U/g)	S (U/g)
Experiment 5	14,1 ± 2,7	9,6 ± 3,2	4,5 ± 2,9	0,3 ± 0,1
Experiment 6	82,5 ± 20,2	73,7 ± 19,9	8,8 ± 1,6	0,7 ± 0,2
Experiment 7	39,5 ± 6,2	29,5 ± 4,7	1,5 ± 0,6	2,2 ± 0,9
IFN- $\gamma$	B+L+S (U/g)	B (U/g)	L (U/g)	S(U/g)
Experiment 5	139,3 ± 15,7	128,9 ± 16,3	10,5 ± 1,6	1,3 ± 0,4
Experiment 6	68,6 ± 3,3	64,5 ± 2,9	5,6 ± 2,4	1,1 ± 0,3
Experiment 7	78,8 ± 16,0	68,1 ± 14,6	10,6 ± 2,0	1,0

**Tabelle 8** Spezifische Cathepsinaktivitäten in endosomalen Fraktionen kultivierter Monozyten.

endosomale Fraktionen				
Kontrolle	B+L+S (U/g)	B (U/g)	L (U/g)	S (U/g)
Experiment 5	54,7 ± 12,2	41,7 ± 10,4	13,0 ± 7,6	1,5 ± 0,6
Experiment 6	52,5 ± 9,7	44,6 ± 9,1	8,0 ± 1,2	1,2 ± 0,8
Experiment 7	21,4 ± 5,4	12,5 ± 7,8	9,0 ± 3,5	0,7 ± 0,3
IFN-γ	B+L+S (U/g)	B (U/g)	L (U/g)	S (U/g)
Experiment 5	157,0 ± 10,2	125,6 ± 11,7	31,5 ± 10,9	4,1 ± 1,8
Experiment 6	95,4 ± 41,4	89,5 ± 44,5	7,6 ± 1,5	1,0 ± 0,3
Experiment 7	76,1 ± 18,6	67,3 ± 17,7	10,1 ± 0,7	1,0 ± 0,7

**Tabelle 9** Spezifische Cathepsinaktivitäten in lysosomalen Fraktionen kultivierter Monozyten.

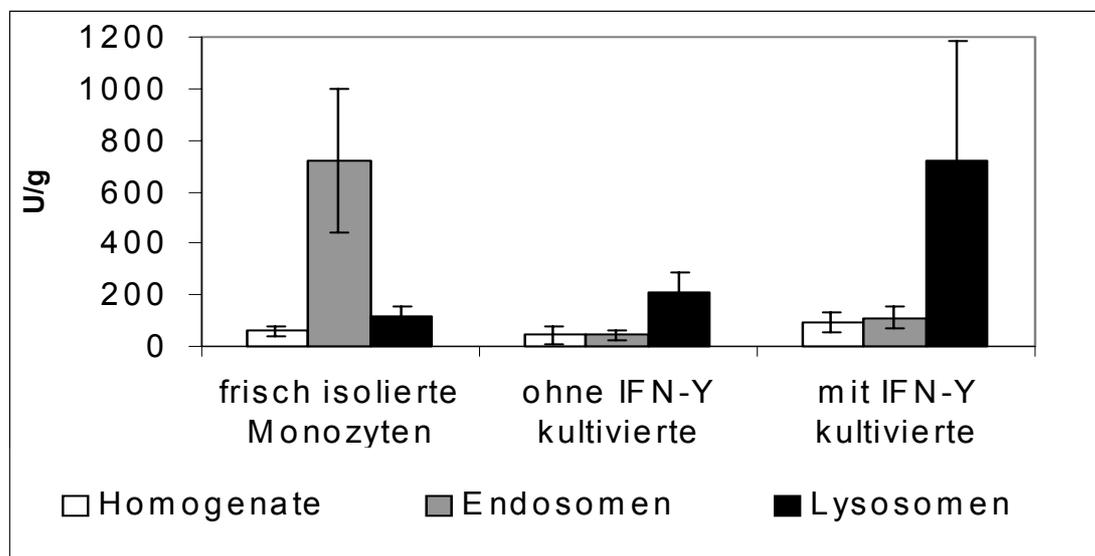
lysosomale Fraktionen				
Kontrolle	B+L+S (U/g)	B (U/g)	L (U/g)	S (U/g)
Experiment 5	148,1 ± 76,8	110,7 ± 75,7	37,4 ± 3,2	10,8 ± 2,4
Experiment 6	296,1 ± 79,4	162,5 ± 38,6	147,4 ± 47,2	29,0 ± 13,0
Experiment 7	178,8 ± 10,1	77,9 ± 1,1	105,9 ± 13,6	7,9 ± 0,04
IFN-γ	B+L+S (U/g)	B (U/g)	L (U/g)	S (U/g)
Experiment 5	1238,7 ± 118,1	1181,3 ± 97,5	86,0 ± 13,2	11,8 ± 5,6
Experiment 6	592,3 ± 89,6	588,8 ± 94,1	10,5	5,7 ± 3,6
Experiment 7	333,1 ± 53,6	311,0 ± 64,0	28,0 ± 1,7	4,1 ± 0,4

Durch die Kultivierung der Monozyten, ob mit oder ohne Interferon-γ, wurden die Gesamtaktivitäten sowie die spezifischen Einzelaktivitäten der Cathepsine B, L und S in den lysosomalen Fraktionen um ein Vielfaches höher als in den endosomalen Fraktionen. Dies entspricht auch der Verteilung der NAG-Aktivität (Tabelle 1). Die Anteile der Aktivitäten der Cathepsine L und S stiegen in beiden

Fraktionen an, in der lysosomalen Fraktion um ein Vielfaches. Cathepsin B machte mit 85 % den größten Teil der Gesamtaktivität des Gesamtzellhomogenates aus, sowohl bei den mit Interferon- $\gamma$  kultivierten Monozyten als auch bei deren Kontrolle. Im Vergleich zu frisch isolierten Monozyten betrug der Anteil in den mit Interferon- $\gamma$  kultivierten Monozyten 74 % in der endosomalen Fraktion und 46 % in der lysosomalen Fraktion.

### 3.8 Vergleich der frisch isolierten mit den stimulierten Monozyten

In frisch isolierten Monozyten ist die Cathepsinaktivität der endosomalen Fraktionen um ein Vielfaches höher als die der Cathepsinaktivitäten in den lysosomalen Fraktionen. Im Gegensatz dazu zeigen die Kontrollzellen und die mit Interferon- $\gamma$  stimulierten Zellen nach 72 Stunden-Stimulation höchste Aktivitäten in den lysosomalen Fraktionen (Abbildung 6, Tabelle 10).



**Abbildung 6:** Endosomale/lysosomale Verteilung der spezifischen Gesamtaktivität der Cathepsine B, L und S frisch isolierter Monozyten und über 72 Stunden kultivierter Monozyten (U/g Protein; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n=3).

In Tabelle 10 sind aus den Experimenten frisch isolierter Monozyten (Tabellen 4-6) und kultivierter Monozyten (Tabellen 7-9) die Mittelwerte der Aktivitäten der Cathepsine B, L und S zusammengefasst. Zusätzlich ist der prozentuale Anteil des einzelnen Enzyms an der Gesamtaktivität aufgeführt.

Die Anteile der einzelnen Proteasen an den Gesamtaktivitäten der Cathepsine B, L und S ist für Cathepsin B im Mittel mit 85,9 % am höchsten, für Cathepsin L 16,9 % und für Cathepsin S mit 2,5 % am geringsten. Die höchsten Cathepsin

L- und Cathepsin S-Anteile lassen sich mit 46,7 % und 7,7 % in der lysosomalen Fraktion der kultivierten Kontroll-Monozyten demonstrieren.

**Tabelle 10** Spezifische Cathepsinaktivitäten frisch isolierter und kultivierter Monozyten.

Monozyten		B+L+S	B(%)	L(%)	S(%)
frisch	Homogenat	59,8 ± 19,5	57,9 (96,8)	4,4 (7,4)	0,3 (0,5)
isolierte	Endosomen	722,8 ± 278,9	665,3 (92,0)	57,4 (7,9)	30,1 (4,2)
	Lysosomen	116,6 ± 38,2	110,6 (94,9)	30,5 (26,2)	1,1 (0,9)
ohne IFN- $\gamma$ kultivierte	Homogenat	45,4 ± 34,6	37,6 (82,8)	4,9 (10,8)	1,1 (2,4)
	Endosomen	42,9 ± 18,6	32,9 (76,7)	10,0 (23,3)	1,1 (2,6)
	Lysosomen	207,7 ± 78,1	117,0 (56,3)	96,9 (46,7)	15,9 (7,7)
mit IFN- $\gamma$ kultivierte	Homogenat	95,6 ± 38,2	87,2 (91,2)	8,9 (9,3)	1,1 (1,2)
	Endosomen	109,5 ± 42,3	94,1 (85,9)	16,4 (15,0)	2,0 (1,8)
	Lysosomen	721,4 ± 466,4	693,7 (96,2)	41,5 (5,8)	7,2 (1,0)

Aktivitäten der Cathepsine B, L und S (U/g Protein) frisch isolierter, kultivierter und mit IFN- $\gamma$  stimulierter Monozyten. In Klammern ist der jeweils prozentuale Anteil der Einzelaktivität an der Gesamtaktivität der Cathepsine B, L und S angegeben (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n = 3).

Werden die endosomalen und lysosomalen Fraktionen frisch isolierter, kultivierter und mit Interferon- $\gamma$  stimulierter Monozyten hinsichtlich ihrer Anreicherung der Cathepsine B, L, S und NAG verglichen, so zeigen diese vier Enzyme in frisch isolierten Monozyten eine höhere Anreicherung in der endosomalen Fraktion als in der lysosomalen Fraktion. Hier wird eine gleichartige Anreicherung der Cathepsine B und L sowie der NAG deutlich. Cathepsin S dagegen ist stärker in der endosomalen Fraktion angereichert. In kultivierten Monozyten entspricht die Anreicherung von Cathepsin B derjenigen der NAG. Cathepsin L und Cathepsin S zeigen ebenfalls einander entsprechende Anreicherungen. Die Anreicherung von Cathepsin B im Vergleich zu Cathepsin L ist in mit Interferon- $\gamma$  stimulierten Monozyten in der

lysosomalen Fraktion um einiges höher als in der endosomalen Fraktion. Die NAG zeigt hier in der lysosomalen Fraktion eine etwa gleiche Anreicherung wie in der endosomalen Fraktion. Cathepsin S dagegen ist in der endosomalen Fraktion mehr angereichert als in der lysosomalen Fraktion.

Werden, wie in Tabelle 11 gezeigt, die prozentualen Veränderungen der Cathepsinaktivitäten durch Kultivierung ohne und mit Interferon- $\gamma$  im Vergleich zu den frisch isolierten Monozyten berechnet, ist durchweg eine Abnahme (in der Kontrolle auf 3,7-17,4 %; in den mit Interferon- $\gamma$  kultivierten Zellen auf 6,6-28,6 %) in den Endosomen zu erkennen.

Dagegen fällt durch Stimulation mit Interferon- $\gamma$  eine starke Zunahme der Cathepsinaktivitäten in den lysosomalen Fraktionen und Homogenaten mit einer prozentualen Steigerung von bis zu 654,5 % (Cathepsin S) in der lysosomalen Fraktion auf. Ebenso sind teilweise sehr hohe Anstiege in der Kontrollgruppe zu verzeichnen, wobei wiederum für Cathepsin S die größten Aktivitätssteigerungen mit 1445,5 % in der lysosomalen Fraktion der Kontrollgruppe zu verzeichnen sind.

**Tabelle 11**      Prozentuale Veränderungen der Cathepsinaktivitäten in kultivierten Monozyten im Vergleich zu frisch isolierten Monozyten.

ohne IFN- $\gamma$	B+L+S(%)	B(%)	L(%)	S(%)
Homogenat	75,9	64,9	111,4	366,7
Endosomen	5,9	5,0	17,4	3,7
Lysosomen	178,1	105,8	317,7	1445,5
mit IFN- $\gamma$				
Homogenat	159,9	150,6	202,3	366,7
Endosomen	15,2	14,1	28,6	6,6
Lysosomen	618,7	627,2	136,1	654,5

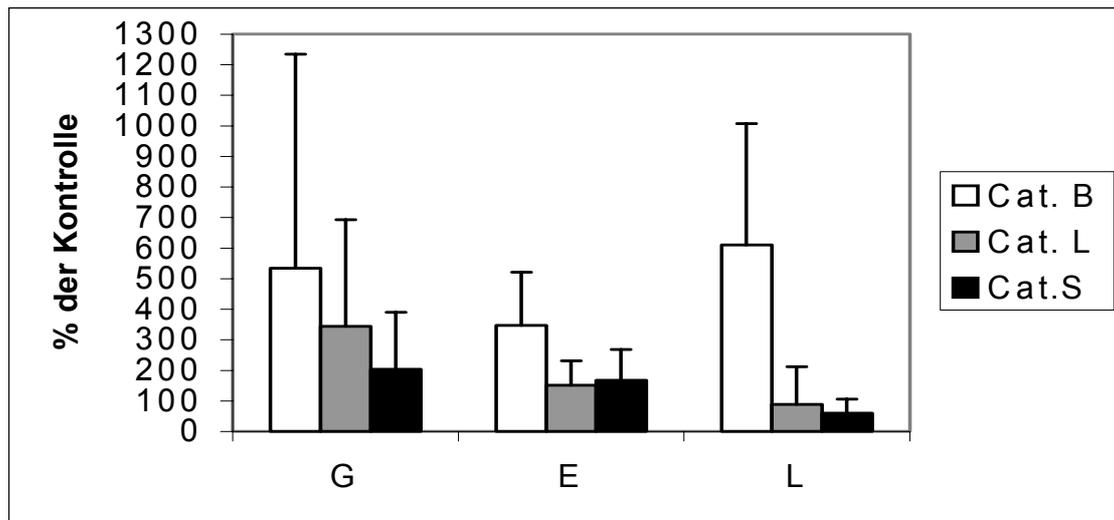
Vergleicht man die durch Interferon- $\gamma$  stimulierten mit den in Kontrollmedium kultivierten Monozyten (Tabelle 12, Abbildung 7), so zeigt sich, daß sich die 3-

4-fach erhöhten Gesamtaktivitäten der Cathepsine B, L und S in Homogenat, Endosomen und Lysosomen in 4-6-fach erhöhte Cathepsin-B-Aktivitäten und 1,5-3,4-fache Aktivitäten der Cathepsine L und S in Homogenat und der endosomalen Fraktion differenzieren lässt. Dagegen waren die Aktivitäten der Cathepsine L und S in der lysosomalen Fraktion eher unverändert oder reduziert.

**Tabelle 12** Prozentuale Veränderung der Cathepsinaktivitäten in kultivierten Monozyten nach 72 h Stimulation mit IFN- $\gamma$  im Vergleich zur Kontrolle.

	B+L+S(%)	B(%)	L(%)	S(%)
Homogenat	416,3 $\pm$ 479,7	533,6 $\pm$ 700,5	342,9 $\pm$ 348,9	202,7 $\pm$ 187,5
Endosomen	274,5 $\pm$ 87,3	346,3 $\pm$ 174,0	150,3 $\pm$ 80,4	166,5 $\pm$ 101,8
Lysosomen	407,6 $\pm$ 371,4	609,6 $\pm$ 396,7	87,8 $\pm$ 123,3	59,1 $\pm$ 46,2

(Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n=3).



**Abbildung 7:** Prozentuale Veränderungen der spezifischen katalytischen Aktivitäten der Cathepsine B, L und S in Gesamtzelllysaten (G), endosomalen (E) und lysosomalen (L) Fraktionen von Monozyten nach 72 h Stimulation mit IFN- $\gamma$  (% der ohne IFN- $\gamma$  kultivierten Monozyten; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n=3).

Zusammenfassend zeigte sich, daß die vier Enzyme unterschiedlich über die endosomalen und lysosomalen Fraktionen frisch isolierter und kultivierter Monozyten verteilt sind und sich unter dem Einfluß von Interferon- $\gamma$  unterschiedlich verhalten.

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Methoden

#### 4.1.1 Isolierung und Kultivieren der Monozyten

Die Isolierung der Monozyten aus dem peripheren Blut durch Größensedimentation über einen Percoll-Gradienten wurde der Trennung der Zellen durch Adhärenz vorgezogen. Möglicherweise werden dadurch weniger Zellen aktiviert als nach Adhäsion (Fuhlbrigge et al., 1987; Haskill et al., 1988).

Darüber hinaus wurde das Kultivieren der Zellen durch vorsichtiges, kontinuierliches Schwenken in serumfreien Medium in 15 ml-Röhrchen durchgeführt, da bei der Kultivierung der Zellen auf Platten durch Adhäsion viele Zellen zerstört werden und damit die Ausbeute sehr gering wird. Desweiteren ist eine nicht unbeträchtliche Aktivierung der adhärierenden Zellen mit Induktion der Genexpression und Proteinsekretion nicht auszuschließen (Fuhlbrigge et al., 1987; Haskill et al., 1988).

Es ist davon auszugehen, daß auf diese Weise eher frühe Differenzierungsstadien der Monozyten erfaßt werden.

#### 4.1.2 Homogenisieren

Das Gesamtzelllysat wurde in einem EBMC-Zell-Homogenisator hergestellt, da die Ausbeute größer war als die Homogenisierung nach Potter-Elvehjem. Hier war es erforderlich, eine für die Größe der Zellen optimale Spaltbreite zu benutzen, die eine vollständige Zerstörung der Plasmamembran, jedoch die Intaktheit der Organellen gewährleistet.

Die hohe NAG-Aktivität in der Kernfraktion läßt vermuten, daß ohne Interferon- $\gamma$  kultivierte Monozyten eine stabilere Plasmamembran besitzen und bei der

Homogenisierung zu viele Zellen intakt geblieben sind, so daß endosomale/lysosomale Enzyme sich dann nach der differentiellen Zentrifugation in der Kern-Fraktion wiederfinden (Tabelle 1).

Andererseits könnte sich auch die Größe der Zellen vermindert haben, so daß sie dem Zellaufschluß entgangen sind.

Während der Herstellung von Gesamtzelllysat werden die intrazellulären Kompartimente zerstört, und die cytosolischen Inhibitoren kommen in Kontakt mit den lysosomalen Cathepsinen. So ist zu erklären, warum der Anteil der Cathepsinaktivitäten im Zellhomogenat so gering ist. Vorallem betroffen ist die Cathepsin S-Aktivität, was sich dadurch erklären läßt, daß diese Protease eine große Affinität zu den im Cytosol vorhandenen Cysteinproteinase-Inhibitoren besitzt (Abrahamson, 1994). Aus diesem Grund spiegeln die gemessenen Cathepsinaktivitäten in Zellhomogenaten nur orientierend die Enzymausstattung der Zelle wieder, da sie sich aus dem Verhältnis tatsächlich vorhandener aktiver endosomaler/lysosomaler Enzyme und ihren physiologischen cytosolischen Inhibitoren ergeben (Abrahamson, 1994). Dies gilt nicht für die NAG, für die keine cytosolischen Inhibitoren bekannt sind. Das ist auch daran zu sehen, daß Cathepsin B, das durch die cytosolischen Cysteinproteinase-Inhibitoren am wenigsten gehemmt wird, mit NAG vergleichbare Anreicherungsfaktoren in den Endosomen und Lysosomen zeigt.

#### 4.1.3 Subzelluläre Fraktionierung

Aufgrund dessen wurden die Zellen durch differentielle Zentrifugation in subzelluläre Fraktionen aufgetrennt (de Duve et al., 1955; Schröter et al., 1999). Dabei unterscheiden sich kultivierte Monozyten von den frisch isolierten Monozyten dahingehend, daß endosomale/lysosomale Bestandteile in die Mikrosomenfraktion verschleppt wurden (Tabelle 1). Dies fällt besonders bei den mit Interferon- $\gamma$  behandelten Zellen auf, bei denen sogar eine hohe NAG-Aktivität im Cytosol gemessen wurde. Das deutet zum einen auf eine höhere Fragilität des endosomalen/lysosomalen Kompartiments nach Interferon- $\gamma$ -

Behandlung hin. Zum anderen führt die Kultivierung (ohne und mit Interferon- $\gamma$ ) offenbar auch zu einer Vergrößerung dieses Kompartiments, so daß möglicherweise die Auftrennung der einzelnen Kompartimente durch Zentrifugation nicht vollständig ist. Die hypotone Lyse des Mitochondrien, Endosomen und Lysosomen enthaltenen Pellets (Bohley et al., 1969) wurde durchgeführt, um durch erneute Zentrifugation eine endosomale und eine lysosomale Fraktion zu gewinnen. Lysosomen können, da sie in hypotoner Umgebung osmotisch besonders instabil sind, von den Endosomen durch hypotone Lyse getrennt werden (de Duve et al., 1955; Park et al., 1988; Bohley et al., 1969).

Die Unterscheidung proteolytischer Aktivität der Cathepsine in der endosomalen und lysosomalen Fraktion ist nur dann möglich, wenn diese effektiv voneinander getrennt werden. Für die hypotone Lyse war das 15-fache Pelletgewicht an  $H_2O$  nötig. Anhand Abbildung 1 ist ersichtlich, welchen Unterschied ein 10-faches Pelletgewicht an  $H_2O$ , wie in Experiment 1 benutzt, und ein 15-faches, wie in den Experimenten 2 und 3 benutzt, ausmachen. Das Endosomen/Lysosomen-Verhältnis in Experiment 1 ist größer als in den Experimenten 2 und 3.

Das endosomale Kompartiment besteht aus frühen Endosomen, späten Endosomen und wahrscheinlich aus einer Art Vorstufe der Lysosomen (Germain, 1994). Die Endosomen der frisch isolierten Monozyten scheinen größten Teils späte Endosomen zu sein, da die NAG-Aktivität hohe Werte bietet.

Die subzelluläre Fraktionierung mittels differentieller Zentrifugation ist im Vergleich zur subzellulären Fraktionierung im Dichtegradienten über Percoll oder Sucrose zeitlich gesehen von großem Vorteil, kann jedoch nicht das endosomale Kompartiment in frühe und späte Stadien der Endosomen auftrennen. Da die subzelluläre Fraktionierung im Percoll-Dichtegradienten eine Stimulation der Monozyten bewirken könnte, wurde dieses Problem durch differentielle Zentrifugation weitgehend ausgeschlossen.

#### 4.1.4 Cathepsinaktivitäten

Die Cathepsine B, L und S spalten dasselbe Substrat Z-Phe-Arg-AMC, besitzen aber verschiedene katalytische Eigenschaften. Es wird für alle drei Enzyme annähernd bei Substratsättigung gearbeitet. Auf diese Weise können die drei Enzymaktivitäten direkt miteinander verglichen werden (Schmid et al., 1997).

Die gemessenen Unterschiede der Cathepsinaktivitäten könnte durch Unreinheiten der Präparationen der Monozyten durch gleichzeitige Anwesenheit von Lymphozyten begründet sein, da diese eine geringere spezifische katalytische Aktivität der Cathepsine B, L und S in Gesamtzelllysaten sowie in endosomalen und lysosomalen Fraktionen besitzen (Schwarz et al., 2002). Unbekannte sekretorische Eigenschaften der verschiedenen Zelltypen hinsichtlich aktiver Cathepsine könnten verantwortlich sein für die beobachtete Vielfalt.

Die große Standardabweichung der Cathepsinmessungen beruht darauf, daß die Einzelergebnisse der Experimente sehr stark voneinander abweichen. Das verwendete Blut stammt von verschiedenen Personen und kann somit in der momentanen Ausstattung variieren, je nach Immunitätslage des Blutspenders.

#### 4.1.5 Fehlerquellen bei der Messung der Enzymaktivitäten

Um die Berechnung der Enzymaktivitäten möglichst genau zu erfassen, ist die Meßgenauigkeit der Reagenzien- und Gewebeleerwerte von Bedeutung. Diese sind jedoch aufgrund der Substratlösung und der konzentrationsabhängigen Eigenfluoreszenz der Probe häufig nicht konstant.

Um eine Restaktivität der Proben nach den Inkubationen zu verhindern, mußte ein schnelles Erreichen der Temperaturen von 37°C im Wasserbad und 4°C im Eisbad gewährleistet sein.

Auch durch die Veränderung der Intensität der Lampeneinstrahlung konnten kleine Meßungenauigkeiten entstehen, die daher eine zügige Messung erforderte.

Um die Genauigkeit der Messungen der Cathepsine B, L und S zu steigern, wurde nach der Inkubation zum Versuchsansatz DMSO hinzugefügt, um während der Reaktion ausgefallenes Z-Phe-Arg-AMC wieder aufzulösen.

#### 4.1.6 Vergleich des „active-site labeling“ mit der Cathepsin-Aktivitätsmessung

Die quantitativen Ergebnisse zeigen Unterschiede zu den qualitativen Ergebnissen des „active-site labeling“ der Cysteinproteinasen. JPM-565 bindet kovalent, vermutlich in unterschiedlichem Maße, an die aktiven Bindungsstellen der verschiedenen Cysteinproteinasen (Bogyo et al., 2000). So erlaubt die Markierung des aktiven Zentrums durch diese Substanz einen relativen Vergleich innerhalb eines Ansatzes zwischen den Veränderungen der Experimente, es läßt sich jedoch keine Aussage über die absoluten Änderungen einzelner Cysteinproteinase-Aktivitäten ableiten. Jedoch können durch das Peptid-Epoxid JPM-565 Veränderungen verschiedener Polypeptide im Bereich von 20-45 kDa aufgezeigt werden (Bogyo et al., 2000).

Die Bande von Cathepsin L konnte durch diese Methode nicht gezeigt werden, da sie durch immunchemische Analysen bis jetzt noch nicht bestätigt wurde (Bogyo et al., 2000). Dieses Protein besitzt eine Molekülmasse von 23 bzw. 28 kDa (Kirschke et al., 1995) und verschwindet dadurch teilweise in der selben Bande wie Cathepsin S. Cathepsin B ist klar bei 30 kDa identifizierbar, während Cathepsin S in der Nähe von Cathepsin H und einer zusätzlichen Cysteinproteinase, welche bei der 12,5 % SDS-PAGE kurz unterhalb Cathepsin S läuft (Driessen et al., nicht veröffentlicht), nicht klar abgrenzbar erscheint. Dadurch kann die Menge an aktiven Cathepsin B im Vergleich mit derjenigen von Cathepsin S unterschätzt werden.

Aufgrund der unterschiedlich verwendeten Substanzen, als Substrat oder Inhibitor, können die Ergebnisse des „active-site labeling“ nicht direkt mit den Ergebnissen der spezifischen Aktivitäten der Cathepsine verglichen werden. Die Messungen der spezifischen Cathepsinaktivitäten zeigen eine größere Sensitivität als die Methode des „active-site labeling“ und machen eine quantitative Aussage möglich, welche aber im Vergleich mit anderen Arbeiten

nur gewährleistet werden kann, wenn ebenfalls Z-Phe-Arg-AMC als Substrat benutzt wird.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 Frisch isolierte und kultivierte Monozyten

Im Vergleich zu frisch isolierten Blutmonozyten können in serumfreien Medium kultivierte Monozyten als in gewebeständige Makrophagen differenzierende Monozyten eines frühen Stadiums angesehen werden. Dieses Stadium ist charakterisiert durch eine schwache Hochregulation der MHC-II-Moleküle und eine Verminderung des organellenständigen Cystatin C. Die geringeren Anreicherungsfaktoren der Cathepsinaktivitäten in den Endosomen und Lysosomen verglichen mit dem Gesamtzellhomogenat lassen in den kultivierten Monozyten darüber hinaus auf eine Reduktion cytosolischer Cysteinproteasen-Inhibitoren schließen. Ferner sind die Aktivitäten der Cathepsine B, L und S von endosomalen Kompartimenten in die lysosomalen Kompartimente umverteilt, mit einem zusätzlichen Anstieg der Aktivitäten der Cathepsine L und S im Vergleich zur Gesamtaktivität der Cathepsine B, L und S. Diese relative Zunahme der endosomalen Aktivitäten der Cathepsine L und S läßt auf eine im Vergleich zu frisch isolierten Monozyten verbesserte Kapazität der Zellen zur Antigenpräsentation schließen. Die hohen lysosomalen Cathepsinaktivitäten könnten eine wesentlich verbesserte Fähigkeit der Zellen zur vollständigen Proteolyse phagozytierter Proteine widerspiegeln.

Die unterschiedliche Lokalisation der vier Enzymaktivitäten (Cathepsine B, L, S und NAG) in den verschiedenen Stadien der Zellen könnte auch auf unterschiedliche intrazelluläre Aktivierungsorte dieser Enzyme hinweisen.

#### 4.2.2 Regulation der Cathepsinaktivitäten unter dem Einfluß von Interferon- $\gamma$

Unter Stimulation mit 100 U/ml Interferon- $\gamma$  läßt sich eine vermehrte Expression der verschiedenen Proteine, also eine Induktion, nachweisen. Nach einer Kultivierung mit Interferon- $\gamma$  von 72 Stunden ist das Maximum erreicht und läßt sich ebenso für aktive Cathepsine wie auch Cathepsin S-Protein und die MHC II-Expression zeigen (Abbildungen 4A, B, C). Parallel dazu steigt jedoch auch der organellengebundene Gehalt der mit Interferon- $\gamma$  behandelten Zellen an Cystatin C (Abbildung 5). Dies könnte die Diskrepanz für deutlich vermehrtes Cathepsin S-Protein und nur als geringfügig verändert gemessene Cathepsin S-Aktivität in endosomalen und lysosomalen Fraktionen erklären. Analog wurde von Pierre und Mellman (1998) eine Regulation von organellenständigen Cathepsin S durch Cystatin C in dendritischen Zellen (DCs) der Maus postuliert, in menschlichen DCs aber nicht gefunden (Fiebiger et al., 2001).

Der hohe Anstieg der Aktivität von Cathepsin B in den endosomalen und lysosomalen Fraktionen, die jedoch nur kleinen Veränderungen der Aktivitäten von Cathepsin L und S könnten aufgrund einer stärkeren Induktion von Cathepsin B gegenüber Cathepsin L und S bedingt sein. Eine gleichzeitige schwächere Induktion unbekannter Proteine könnte bei der Aktivitätsbestimmung verhindern, daß eine ebenso schwache Induktion von Cathepsin L und S nachweisbar ist.

Die Induktion der Synthese der Cathepsine B, L und S durch Interferon- $\gamma$  in Monozyten/Makrophagen (Lah et al., 1995; Nakagawa und Rudensky, 1999) sowie deren Mitbeteiligung am Prozeß der Antigenpräsentation sind auch in anderen Arbeiten beschrieben (Morton et al., 1995). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß eine Regulation der Expression von Cathepsin L über Splice-Varianten geschehen kann (Abudula et al., 2001). Die Aktivierung von neusynthetisierten Proenzymen, welche in vitro in einer sauren Umgebung auch autokatalytisch vorkommt (Nissler et al., 1998), könnte in vivo auch durch die Wirkung von Cathepsin B stattfinden (Driessen et al., 2001). Diese Aktivierung

der Cathepsine aus ihren Zymogenen wurde jedoch bis jetzt noch nicht in vivo dargestellt, was vermutlich durch die kurze Halbwertszeit der Proenzyme, wie für Cathepsin S beschrieben, bedingt ist (Nissler et al., 1999).

Die Abnahme aktiver Enzymproteine nach einer 96-stündigen Kultivierung mit Interferon- $\gamma$  konnte durch ihren Abbau bei möglicherweise veränderter Zellvitalität erklärt werden. Cathepsin B scheint den Umsatz der Cysteinproteinasen zu regulieren (Driessen et al., 2001). In Lymphozyten fand sich eine Regulierung der Cathepsin L-Expression durch Cathepsin S, was jedoch in Makrophagen nicht gezeigt werden konnte (Honey et al., 2001). Somit zeigen verschiedene Typen von antigenpräsentierenden Zellen Varianten bei der Regulation der Expression der Cathepsine B, L und S.

Die Cathepsin L-Aktivität, die in vitro durch p41 gehemmt wird (Bevec et al., 1996), wird in vivo durch Stabilisierung der aktiven Form des Enzyms reguliert (Lennon-Duménil et al., 2001). Damit könnte man die großen Schwankungen bei den Aktivitätsbestimmungen erklären.

Die einzigartige Besonderheit der Makrophagen, aktives Cathepsin zu sezernieren, könnte auch zu einer Regulation über den zellulär reduzierten Gehalt dieser Enzyme (Reddy et al., 1995; Petanceska et al., 1996; Claus et al., 1998; Liuzzo et al., 1999; Punturieri et al., 2000) beitragen.

So kann der Gehalt an intrazellulären aktiven Cathepsinen B, L und S durch Enzyminduktion, Aktivierung von Proenzymen, intrazellulären Inhibitoren, Enzymabbau und, im Falle der Makrophagen, durch extrazelluläre Sekretion reguliert werden. Jeder einzelne dieser Vorgänge davon könnte die beobachteten Auswirkungen herbeiführen.

#### 4.2.3 Funktion der Cathepsine in den Monozyten/Makrophagen

Die unterschiedliche Reaktionsweise der drei Cathepsine unter dem Einfluß von Interferon- $\gamma$  läßt erkennen, daß die Enzyme verschiedene Funktionen innerhalb der Zelle erfüllen. Die Cathepsine B, L und S der Monozyten/Makrophagen sind einerseits in die allgemeine lysosomale Proteinolyse eingebunden, um den Proteinabbau zu leiten. Andererseits regulieren sie mit aktivierten Enzymen die

spezifische endosomale Proteolyse sowie die perizelluläre Proteinolyse, wie an menschlichen kultivierten Makrophagen gezeigt (Reddy et al., 1995). Diese ist in die Gewebeumbildung miteingebunden. Cathepsin B, ein Enzym mit „housekeeping“-Funktion (Qian et al., 1991), ist dazu bestimmt, am allgemeinen lysosomalen Proteinumsatz teilzuhaben. Obwohl seine Anwesenheit für die Präsentation einer Anzahl von Antigenen entbehrlich ist (Deussing et al., 1998), weisen die Ergebnisse dieser Arbeit durch eine beträchtliche endosomale Aktivität auf eine spezifische Funktion von Cathepsin B hin. Durchaus vereinbar mit dieser Vorstellung ist, wie kürzlich gezeigt wurde, daß Cathepsin B in den Abbau exogenen Proteins, welches über Fc $\gamma$ -Rezeptoren durch Makrophagen aufgenommen wurde, mit eingebunden ist (Driessen et al., 2001). Dies könnte durch eine regulierende Beeinflussung von Cathepsin B auf die Aktivität der Cysteinproteinasen erklärt werden. Cathepsin B sowie auch Cathepsin S sind beide in der Lage, reifes Cathepsin L abzubauen, was durch p41 verhindert wird (Lennon-Duménil et al., 2001). Cathepsin L bildet einen Komplex mit p41, einem Fragment der invarianten Kette (Ogrinc et al., 1993; Bevec et al., 1996), welches in vivo den Gehalt der Cathepsin L-Aktivität reguliert, ohne dabei das Enzym zu hemmen (Bevec et al., 1996), sondern dadurch seine reife Form als Chaperon zu stabilisieren (Lennon-Duménil et al., 2001). Die in p41 der invarianten Kette enthaltene Thyreoglobulin-domäne ist ein starker, hochspezifischer Inhibitor für Cathepsin L (Guncar et al., 1999). Dennoch ist die Prozessierung der invarianten Kette ungehindert, da dieser „Inhibitor“ die Aktivität von Cathepsin S nicht beeinflusst.

Dies könnte den großen Schwankungen der Cathepsin L-Aktivität in den durchgeführten Experimenten zugrunde liegen. Es ist außerdem wahrscheinlich, daß Cathepsin L in Makrophagen am Abbau der invarianten Kette mitbeteiligt ist (Nakagawa und Rudensky, 1999). Zusätzlich zu seiner bekannten Funktion bei der Spaltung der invarianten Kette (Riese et al., 1996) ist Cathepsin S auch in die Antigenprozessierung mit eingebunden (Driessen et al., 2001; Beck et al., 2001). Während die Funktion der regulierten Sekretion von endosomalen/lysosomalen Enzymen während der Phagozytose (Claus et al., 1998), wie bei einer Makrophagenzelllinie der Maus beobachtet, unbekannt

ist, erlaubt die Sekretion von aktiven Cathepsinen B, L und S einen Gewebeumbau durch Elastinolyse extrazellulärer Matrix von Langzeit-differenzierten Makrophagen vom Gewebe-zerstörenden Typ (Punturieri et al., 2000).

#### 4.2.4 Antigenprozessierung und -präsentation

Die Phagozytose und Proteolyse von Antigen und zelleigenem Protein sowie die Beladung der MHC II-Moleküle mit antigenen Peptiden zu deren Präsentation findet durch Cathepsine in den endosomalen Kompartimenten statt (Berg et al., 1995). Die Proteolyse ist für eine Antigenprozessierung unerlässlich (Fineschi und Miller, 1997), doch ist sie auch für die Aktivierung lysosomaler Proteasen aus deren Proform unabdingbar (Berg et al., 1995).

Wird die Zelle nun durch Interferon- $\gamma$  aktiviert, wird die MHC-Expression hochreguliert, das heißt, auch die Spaltung der invarianten Kette nimmt zu und das sehr viel mehr in den Endosomen anfallende Material gelangt vermehrt in die lysosomalen Kompartimente, um dort gänzlich verdaut zu werden. Wahrscheinlich wird durch diese Stimulation eine endosomale/lysosomale Fusion verstärkt und damit die Protein degradierende und auch Antigen abtötende Aktivität verstärkt ausgelöst.

Die Spaltung der invarianten Kette durch Cathepsin S sowie die Peptidbeladung erfolgt in den verschiedenen endosomalen Kompartimenten (Castellino und Germain, 1995). Diese mit Antigen beladenen MHC-Moleküle gelangen entweder direkt an die Zelloberfläche, um dort das Antigen zu präsentieren oder erreichen diese über den lysosomalen Weg.

Andere Studien konnten zeigen, daß nicht nur das endosomale Kompartiment bei der Antigenprozessierung beteiligt ist (Pinet et al., 1995; Griffin et al., 1997). So ist es auch möglich, daß noch nicht in endosomalen Kompartimenten prozessierte MHC-II-Komplexe weiter in die sauren lysosomalen Kompartimente gelangen und dort die Spaltung der II und die Antigenbeladung stattfinden. Wahrscheinlich ist hier die Spaltung und Beladung um einiges effizienter, da die

Proteasen in diesem sauren Milieu aktiviert sind. So ist wahrscheinlich, daß die Spaltung der Ii und die Peptidbeladung in allen endozytotischen Organellen, die Lysosomen miteingeschlossen, stattfinden kann.

Neusynthetisierte MHC II-Moleküle durchwandern in Assoziation mit der invarianten Kette die vielen verschiedenen endozytotischen Organellen, den typischen Weg über die frühen Endosomen bis hin zu den Lysosomen. In aktivierten Makrophagen wurden die meisten intrazellulären Klasse II-Moleküle in späten Endosomen oder Lysosomen gefunden (Harding et al., 1990). Die Ii wird mit steigender Leistung und Wirksamkeit gespalten, je weiter die Komplexe in spätere, saure und damit proteolytisch aktivere Organellen gelangen.

Die Fähigkeit der MHC-Moleküle, schon in frühen endosomalen Kompartimenten Antigen mithilfe der Proteasen zu binden, läßt die Verteilung der Cathepsine in frisch isolierten Monozyten erklären, wobei in den Lysosomen der stimulierten Monozyten eher die Degradierung des gesamten Zellproteins im Vordergrund steht.

In dieser Arbeit werden die Auswirkungen der Stimulation mit Interferon- $\gamma$  auf Monozyten gezeigt. Eine Zunahme aller untersuchten an Antigenprozessierung und allgemeinem Proteinabbau beteiligten Enzyme und Proteine ist zu beobachten. Besonders die Modulation der Cathepsinaktivitäten gibt weiter Aufschluß über deren Verteilungsmuster in humanen Monozyten/Makrophagen. Cathepsin B ist die am meisten angereicherte und am weitesten verbreitete Cysteinproteinase, so daß seine Funktion vor allem in der unspezifischen Proteolyse des zu phagozytierenden Materials anzunehmen ist. Die in dieser Arbeit gemessenen niedrigen Aktivitäten von Cathepsin L und Cathepsin S im Vergleich zu Cathepsin B lassen neben einer Mitbeteiligung am allgemeinen Proteinumsatz in einer Zelle eine eher spezifische Funktion bei der Antigenpräsentation dieser Enzyme vermuten.

Die Abwesenheit von Cathepsin L und Cathepsin S hat große Auswirkungen auf die humorale Immunantwort, doch ist wahrscheinlich, daß bis jetzt noch unbekannte lysosomale Enzyme ebenfalls eine Rolle bei der Degradierung der invarianten Kette spielen (Villadangos et al., 1999). Die Funktion von Cathepsin

S, die invariante Kette, die mit MHC II-Molekülen assoziiert ist und damit eine frühzeitige Beladung mit antigenem Peptid verhindert, zu spalten, ist belegt (Riese et al., 1996). So läßt sich die immunmodulatorische Funktion von Cathepsin S weiter dadurch bestätigen, daß das Enzym durch Stimulation mit Interferon- $\gamma$  stark induzierbar ist. Von allen drei untersuchten Cathepsinen zeigte Cathepsin S in Homogenat und in der lysosomalen Fraktion die höchste Aktivitätszunahme bei der Reifung der Monozyten (Tabelle 11).

Zusammenfassend können aus menschlichen Blut frisch isolierte oder 0-4 Tage kultivierte Monozyten in definiertem Medium und in der Gegenwart von Interferon- $\gamma$  ein in-vitro-Modell für gewebeständige differenzierte Makrophagen eines frühen Stadiums unter normalen oder immunmodulierenden Bedingungen darstellen. Die Unterschiede der Aktivitäten von Cathepsin B, L und S und ihre Lokalisation in endosomalen und lysosomalen Fraktionen können als Kennzeichen für die Differenzierung dienen. Monozyten modulieren die subzelluläre Verteilung der endosomalen/lysosomalen Proteinase und dadurch vermutlich verschiedene funktionelle Merkmale der Enzyme entsprechend ihrer zellulären Erfordernisse.

## 5 Zusammenfassung

Monozyten als professionell antigenpräsentierende Zellen spielen eine wichtige Rolle beim Abbau phagozytierten Materials und darüber hinaus dessen Präsentation als Antigen. Diese Prozesse hängen von Cathepsinen ab, die in den Endosomen und Lysosomen der Zelle lokalisiert sind. Daher wurden Expression und Aktivität der Cathepsine B, L und S in diesen Kompartimenten von menschlichen Monozyten/Makrophagen untersucht, die aus Buffy coats frisch isoliert oder mit 100 U/ml Interferon- $\gamma$  kultiviert wurden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß in frisch isolierten Monozyten die Cathepsinaktivitäten der endosomalen Fraktion um ein Vielfaches höhere Werte aufzeigen als die Cathepsin-Aktivitäten in der lysosomalen Fraktion. Im Gegensatz dazu zeigen 72 Stunden lang in Kontrollmedium kultivierte Zellen höchste Cathepsinaktivitäten in der lysosomalen Fraktion. Mit Interferon- $\gamma$  stimulierte Zellen wiesen das gleiche endosomale/lysosomale Verteilungsmuster auf, jedoch mit unterschiedlichen Veränderungen der Cathepsinaktivitäten in diesen Kompartimenten. Interferon- $\gamma$  führte in den Zellen zu einer Hochregulation der MHC Klasse II-Moleküle aller drei Cathepsine sowie des Cysteinproteinase-Inhibitors Cystatin C. Dabei zeigten die Lysosomen eine größere Zunahme der Cathepsin B-Aktivität als die Endosomen. Dagegen waren die Aktivitäten von Cathepsin L und S in den Endosomen nur auf 150 % und 167 % erhöht, während sie in den Lysosomen unverändert oder leicht reduziert waren. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Cathepsine L und S wichtiger für die spezifische Proteolyse bei der Antigenpräsentation sind. Cathepsin B wird unter dem Einfluß von Interferon- $\gamma$  eher bei der unspezifischen Proteolyse des phagozytierten Materials von Bedeutung sein.

Dies läßt erkennen, daß Interferon- $\gamma$  nicht nur die Antigenpräsentation über MHC Klasse II-Moleküle stimuliert, sondern auch an intrazellulärer Proteolyse

beteiligte Enzyme in ihrer Expression, Aktivität und intrazellulären Lokalisation den funktionellen Erfordernissen anpaßt.

## 6 Literaturverzeichnis

**Abrahamson**, M. (1994). Cystatins. *Methods Enzymol.* 224, 685-700

**Abudula**, A., Rommerskirch, W., Weber, E., Günther, D. and Wiederanders, B. (2001). Splice variants of human cathepsin L mRNA show different expression rates. *Biol. Chem.* 382, 1583-1591

**Bakke**, O. and Dobberstein, B. (1990). MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 63, 707-716

**Barrett**, A.J. (1986). The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. *Biomed Biochim Acta* 45, 1363-1374

**Barrett**, A.J. and Kirschke, H. (1981). Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol.* 80, 535-561

**Beck**, H., Schwarz, G., Schröter, C.J., Deeg, M., Baier, D., Stevanovic, S., Weber, E., Driessen, C. and Kalbacher, H. (2001). Cathepsin S and an asparagine-specific endoprotease dominate the proteolytic processing of human myelin basic protein in vitro. *Eur. J. Immunol.* 31, 3726-3736

**Berg**, T., Gjøen, T. and Bakke, O. (1995). Physiological functions of endosomal proteolysis. *Biochem. J.* 307, 313-326

**Bevec**, T., Stoka, V., Pungercic, G., Dolenc, I. and Turk, V. (1996). Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L. *J. Exp. Med.* 183, 1331-1338

**Beynon**, R.J. and Salvesen, G. (1989). Commercially available protease inhibitors. In: *Proteolytic enzymes. A practical approach* (editors: R.J. Beynon und J.S. Bond). Appendix III. IRL Press Oxford

**Bogyo**, M., Verhelst, S., Bellingard-Dubouchaud, V., Toba, S. and Greenbaum, D. (2000). Selective targeting of lysosomal cysteine proteinases with radiolabeled electrophilic substrate analogs. *Chem. Biol.* 7, 27-38

**Bohley**, P. (1988). Proteolysis in hepatocytes. *Adv. Clin. Enzymol.* 6, 203-208

**Bohley**, P. and Seglen, P.O. (1992). Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia* 48, 151-157

**Bohley**, P., Kirschke, H., Langner, J. and Ansorge, S. (1969). Präparative

Gewinnung hochgereinigter Lysosomenenzyme aus Rattenlebern. FEBS Lett. 5, 233-236

**Boyum**, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 9777-9789

**Bradford**, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254

**Brocklehurst**, K., Willenbrock, F. und Salih, E. (1987). Cysteine proteinases. In: Hydrolytic Enzymes, A. Neuberger und K. Brocklehurst, eds. (Amsterdam. New York, Oxford: Elsevier), pp.39-158

**Brömme**, D., Bonneau, P.R., Lachance, P., Wiederanders, B., Kirschke, H., Peters, C., Thomas, D.Y., Storer, A.C. and Vernet, T. (1993). Functional expression of human cathepsin S in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of the recombinant enzyme. J. Biol. Chem. 268, 4832-4838

**Brömme**, D., Steinert, A., Friebe, S., Fittkau, S., Wiederanders, B. and Kirschke, H. (1989). The specificity of bovine spleen cathepsin S. A comparison with rat liver cathepsin L and B. Biochem.J. 264, 475-481

**Casciola-Rosen**, L.A. and Hubbard, A.L. (1991). Hydrolases in intracellular compartments of rat liver cells. Evidence for selective activation and/or delivery. J. Biol. Chem. 266, 4341-4347

**Castellino**, F. and Germain, R.N. (1995). Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. Immunity. 2, 73-88

**Chestnut**, R.W., Grey, H.M. and Colon, S.M. (1982). Antigen presentation by normal B cells, B cell tumors and macrophages: function and biochemical comparison. J. Immunol. 128, 779-788

**Claus**, V., Jahraus, A., Tjelle, T., Berg, T., Kirschke, H., Faulstich, H. and Griffiths, G. (1998). Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes. J. Biol. Chem. 273, 9842-9851

**Cresswell**, P., Blum, J.S., Kelner, D.N. and Marks, M.S. (1987). Biosynthesis and processing of class II histocompatibility antigens. Crit. Rev. Immunol. 7, 31-53

**De Duve**, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F. (1955). Tissue fractionation studies 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. Biochem. J. 60, 604-617

- Denzin**, L.K. and Cresswell, P. (1995). HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell*. 82, 155-165
- Deussing**, J., Roth, W., Saftig, P., Peters, C., Ploegh, H.L. and Villadangos, J.A. (1998). Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4516-4521
- Driessen**, C., Lennon-Duménil, A.-M. and Ploegh, H.L. (2001). Individual cathepsins degrade immune complexes internalized by antigen-presenting cells via Fcγ receptors. *Eur. J. Immunol.* 31, 1592-1601
- Fiebiger**, E., Meraner, P., Weber, E., Fang, I.-F., Stingl, G., Ploegh, H.L. and Maurer, D. (2001). Cytokines regulate proteolysis in major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 193, 881-892
- Fineschi**, B. and Miller, J. (1997). Endosomal proteases and antigen processing. *TIBS* 22, 377-382
- Fuhlbrigge**, R.C., Chaplin, D.D., Kiely, J.M. and Unanue, E.R. (1987). Regulation of interleukin 1 gene expression by adherence and lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 138, 3799-3802
- Germain**, R.N. (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76, 287-299
- Gmelig-Meyling**, F. and Waldmann, T.A. (1980). Separation of human blood monocytes and lymphocytes on a continuous percoll gradient. *J. Immunol. Methods.* 33, 1-9
- Griffin**, J.P., Chu, R. and Harding, C.V. (1997). Early endosomes and late endocytic compartment generate different peptide-class II MHC complexes via distinct processing mechanisms. *J. Immunol.* 158, 1523-1532
- Guncar**, G., Pungercic, G., Klemencic, I., Turk, V. and Turk, D. (1999). Crystal structure of MHC class II-associated p41 li fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsin L and S. *EMBO J.* 18, 793-803
- Hanada**, K., Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J. and Tanaka, I. (1978). Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* 42, 523-528
- Hansen**, T.H., Carreno, B.M. and Sachs, D.H. (1993). The major histocompatibility complex. *Fundamental Immunology*, W.E. Paul, ed. (New York: Raven Press, Ltd.), pp.577-628
- Harding**, C.V., Unanue, E.R., Slot, J.W., Schwartz, A.L. and Geuze, H.J. (1990). Functional and ultrastructural evidence for intracellular formation of major

histocompatibility complex class II-peptide complexes during antigen processing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 5553-5557

**Haskill**, S., Johnson, C., Eierman, D., Becker, S. and Warren, K. (1988). Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and proto-oncogenes. J. Immunol. 140, 1690-1694

**Honey**, K., Duff, M., Beers, C., Brissette, W.H., Elliott, E.A., Peters, C., Maric, M., Cresswell, P. and Rudensky, A. (2001). Cathepsin S regulates the expression of cathepsin L and the turnover of  $\gamma$ -interferon-inducible lysosomal thiol reductase in B lymphocytes. J. Biol. Chem. 276, 22573-22578

**Jackson**, M.R. and Peterson, P.A. (1993). Assembly and intracellular transport of MHC class I molecules. Annu. Rev. Cell Biol. 9, 207-235

**Kappes**, D. and Strominger, J.L. (1988). Human class II MHC genes and proteins. Annu. Rev. Biochem. 57, 991-1028

**Kirschke**, H. and Wiederanders, B. (1994). Cathepsin S and related lysosomal endopeptidases. Methods Enzymol. 244, 500-511

**Kirschke**, H., Barrett, A.J. and Rawlings, N.D. (1995). Proteinases 1: Lysosomal cysteine proteinases. In: Protein Profile, Vol.2, P.Sheterline, ed.(London, UK: Academic Press Ltd.). pp.1587-1643

**Kirschke**, H., Wiederanders, B., Brömme, D. and Rinne, A. (1989). Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. Biochem. J. 264, 467-473

**Kvist**, S., Wiman, K., Claesson, L., Peterson, P.A. and Dobberstein, B. (1982). Membrane insertion and oligomeric assembly of HLA-DR histocompatibility antigens. Cell 29, 61-69

**Laemmli**, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227, 680-685

**Lah**, T.T., Hawley, M., Rock, K.L. and Goldberg, A.L. (1995). Gamma-interferon causes a selective induction of the lysosomal proteases, cathepsin B and L, in macrophages. FEBS Lett. 363, 85-89

**Lamb**, C.A., Yewdell, J.W., Bennink, J.R. and Cresswell, P. (1991). Invariant chain targets HLA class II molecules to acidic endosomes containing internalized influenza virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 5998-6002

**Lennon-Duménil**, A.-M., Roberts, R.A., Valentijn, K., Driessen, C., Overkleeft, H.S., Erickson, A., Peters, P.J., Bikoff, E., Ploegh, H.L. and Wolf Bryant, P. (2001). The p41 isoform of invariant chain is a chaperone for cathepsin L. EMBO J. 20, 4055-4064

**Liuzzo**, J.P., Petanceska, S., Moscatelli, D. and Devi, L.A. (1999). Inflammatory mediators regulate cathepsin S in macrophages and microglia: A role in attenuating heparan sulfate interactions. *Mol. Med.* 5, 320-333

**Lotteau**, V., Teyton, L., Peleraux, A., Nilsson, T., Karlsson, L., Schmid, S.L., Quaranta, V. and Peterson, P.A. (1990). Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* 348, 600-605

**Mason**, R.W., Johnson, D.A., Barrett, A.J. and Chapman, H.A. (1986). Elastinolytic activity of human cathepsin L. *Biochem. J.* 233, 925-927

**Metchnikoff**, E. (1905). *Immunity in infectious diseases*. 1. Aufl. New York (Macmillan Press)

**Morton**, P.A., Zacheis, M.L., Giacoletto, K.S., Manning, J.A. and Schwartz, B.D. (1995). Delivery of nascent MHC class II-invariant chain complexes to lysosomal compartments and proteolysis of invariant chain by cysteine proteinases precedes peptide binding in B-lymphoblastoid cells. *J. Immunol.* 154, 137-150

**Murata**, M., Miyashita, S., Yokoo, C., Tamai, M., Hanada, K., Hatayama, K., Towatari, T., Nikawa, T., and Katunuma, N. (1991). Novel epoxysuccinyl peptides: Selective inhibitors of cathepsin B in vitro. *FEBS Lett.* 280, 307-310

**Nakagawa**, T.Y. and Rudensky, A.Y. (1999). The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol. Rev.* 172, 121-129

**Neefjes**, J.J. (1999). CIIV, MIIC and other compartments for MHC class II loading. *Eur. J. Immunol.* 29, 1421-1425

**Nissler**, K., Kreuzsch, S., Rommerskirch, W., Strubel, W., Weber, E. and Wiederanders, B. (1998). Sorting of non-glycosylated human procathepsin S in mammalian cells. *Biol. Chem.* 379, 219-224

**Ogrinc**, T., Dolenc, I., Ritonja, A. and Turk, V. (1993). Purification of the complex of cathepsin L and the MHC class-II associated invariant chain fragment from human kidney. *FEBS Lett.* 336, 555-559

**Olbricht**, Ch., Cannon, J., Gark, L. and Tisher, C. (1986). Activities of cathepsins B and L in isolated nephron segments from proteinuric and nonproteinuric rats. *Am. J. Physiol.* 250, F1055-F1062

**Palmer**, J.T., Rasnick, D., Klaus, J.L. and Brömme, D. (1995). Vinyl sulfones as mechanism-based cysteine protease inhibitors. *J. Med. Chem.* 38, 3193-3196

**Park**, R.D., Sullivan, P.C. and Storrie, B. (1988). Hypertonic sucrose inhibition of endocytic transport suggests multiple early endocytic compartments. *J. Cell. Physiol.*

135, 443-450

**Petanceska**, S. and Devi, L. (1992). Sequence analysis, tissue distribution, and expression of rat cathepsin S. *J. Biol. Chem.* 267, 26038-26043

**Petanceska**, S., Canoll, P. and Devi, L.A. (1996). Expression of rat cathepsin S in phagocytic cells. *J. Biol. Chem.* 271, 4403-4409

**Pieters**, J. (1997). MHC class II restricted antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 89-96

**Pinet**, V., Vergelli, M., Martin, R., Bakke, O. and Long, E.O. (1995). Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules. *Nature.* 375, 603-606

**Ploegh**, H.L., Cannon, L.E. and Strominger, J.L. (1979). Cell-free translation of the mRNAs for the heavy and light chains of HLA-A and HLA-B antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 2273-2277

**Punturieri**, A., Filippov, S., Allen, E., Caras, I., Murray, R., Reddy, V. and Weiss, S.J. (2000). Regulation of elastolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages. *J. Exp. Med.* 192, 789-800

**Qian**, F., Frankfater, A., Chan, S.J. and Steiner, D.F. (1991). The structure of the mouse cathepsin B gene and its putative promoter. *DNA Cell Biol.* 10, 159-168

**Reddy**, V.Y., Zhang, Q.-Y. and Weiss, S.J. (1995). Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3849-3853

**Riberdy**, J.M., Newcomb, J.R., Surman, M.J., Barbosa, J.A. and Cresswell, P. (1992). HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line area associated with invariant chain peptides. *Nature* 360, 474-476

**Riese**, R.J., Wolf, P.R., Brömme, D., Natkin, L.R., Villadangos, J.A., Ploegh, H.L. and Chapman, H.A. (1996). Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 4, 357-366

**Roche**, P.A. (1995). HLA-DM: an in vivo facilitator of MHC class II peptide loading. *Immunity* 3, 259-262

**Roche**, P.A. and Cresswell, P. (1996). Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 345, 615-618

**Rötzschke**, O. and Falk, K. (1994). Origin, structure and motifs of naturally processed MHC class II ligands. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 45-51

**Rudensky**, A.Y., Preston-Hurlburt, P., Hong, S.C., Barlow, A. and Janeway, C.A.

(1991). Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353, 622-627

**Sant**, A.J. and Miller, J. (1994). MHC class II antigen processing: biology of invariant chain. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 57-63

**Schmid**, H., Koop, M., Utermann, S., Lambacher, L., Mayer, P. and Schaefer, L. (1997). Specific catalytic activity of cathepsin S in comparison to cathepsins B and L along the rat nephron. *Biol. Chem.* 378, 61-69

**Schmid**, H., Lindmeier, I., Schmitt, H., Eissele, R., Neuhaus, G. and Wehrmann, M. (1993). Nephrotoxicity of cyclosporin A in rat. II. Reversible changes in intranephronal and urinary catalytic activities of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase. *Renal Physiol. Biochem.* 16, 222-232

**Schmidtke**, J.R. and Unanue, E.R. (1972). Macrophage-antigen interaction: uptake, metabolism and immunogenicity of foreign albumin. *J. Immunol.* 107, 331-345

**Schröter**, C.J., Beck, H., Deeg, M., Weber, E., Schmid, H. and Kalbacher, H. (1998). The immunodominant epitope is the most protease sensitive region of myelin basic protein: implications for antigen processing. In: Talwar, G.P., Nath, I., Ganguly, N.K. and Rao, K.V.S. (Eds) *Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Congress of Immunology*. Moduzzi Editore, Bologna. 1, 379-382

**Schröter**, C.J., Braun, M., Englert, J., Beck, H., Schmid, H. and Kalbacher, H. (1999). A rapid method to separate endosomes from lysosomal contents using differential centrifugation and hypotonic lysis of lysosomes. *J. Immunol. Methods* 227, 161-168

**Schwarz**, G., Boehncke, W.-H., Braun, M., Schröter, C.J., Burster, T., Flad, T., Dressel, D., Weber, E., Schmid, H. and Kalbacher, H. (2002). Cathepsin S activity is detectable in human keratinocytes and is selectively upregulated upon stimulation with interferon- $\gamma$ . *J. Invest. Dermatol.* 119, 44-49

**Seglen**, P.O. and Bohley P. (1992). Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia* 48, 158-172

**Sherman**, M.A., Weber, D.A. and Jensen, P.E. (1995). DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity* 3, 197-205

**Shi**, G.-P., Munger, J.S., Meara, J.P., Rich, D.H. and Chapman, H.A. (1992). Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease. *J. Biol. Chem.* 267, 7258-7262

**Shi**, G.-P., Webb, A.C., Foster, K.E., Knoll, J.H.M., Lemere, C.A., Munger, J.S. and Chapman, H.A. (1994). Human cathepsin S: chromosomal localization, gene structure, and tissue distribution. *J. Biol. Chem.* 269, 11530-11536

**Sloane**, B.F. (1990). Cathepsin B and cystatins: evidence for a role in cancer progression. *Semin. Cancer Biol.* 1, 137-152

**Strubin**, M., Berte, C. and Mach, B. (1986). Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia-antigen associated invariant chain. *EMBO J.* 5, 3483-3488

**Teyton**, L., O'Sullivan, D., Dickson, P.W., Lotteau, V., Sette, A., Fink, P. and Peterson, P.A. (1990). Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature* 348, 39-44

**Towatari**, T., Nikawa, T., Murata, M., Yokoo, C., Tamai, M., Hanada, K. and Katunuma, N. (1991). Novel epoxysuccinyl peptides: A selective inhibitor of cathepsin B, in vivo. *FEBS Lett.* 280, 311-315

**Turk**, V. and Bode, W. (1991). The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS-Lett.* 285, 213-219

**Unanue**, E.R. and Askonas, B.A.. (1968). Persistence of immunogenicity of antigen after uptake by macrophages. *J. Exp. Med.* 127, 915-923

**Villadangos**, J.A., Bryant, R.A., Deussing, J., Driessen, Ch., Lennon-Duménil, A.-M., Riese, R.J., Roth, W., Saftig, P., Shi, G.-P., Chapman, H.A., Peters, Ch. and Ploegh, H.L. (1999). Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol. Rev.* 172, 109-120

**Watts**, C. (1997). Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 821-850

**Willstätter**, R. und Bamann, E. (1929). Über die Proteasen der Magenschleimhaut. Erste Abhandlung über die Enzyme der Leukozyten. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 180, 127-143

**Wolf**, P.R. and Ploegh, H.L. (1995). How MHC class II molecules acquire peptide cargo: Biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11, 267-306

**Yamaguchi**, N., Chung, S.-M., Shiroeda, O., Koyama, K. and Imanishi, J. (1990). Characterization of a cathepsin L-like enzyme secreted from human pancreatic cancer cell line HPC-YP. *Cancer Res.* 50, 658-663

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Heide Schmid für die Überlassung des interessanten Themas. Ihr großes Interesse am Verlauf der Arbeit, ihre wertvollen und anregenden Hinweise und Ratschläge haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Christoph Driessen für seine Einweisung in die Arbeit im Labor und über lehrreiche Gespräche über den theoretischen Hintergrund dieser Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Hubert Kalbacher danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes in seinem Labor sowie für die Benutzung und Bereitstellung der verschiedenen Materialien, die für meine Arbeit nötig waren.

Hier möchte ich mich auch bei Herrn Dr. rer. nat. Gerold Schwarz bedanken, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mir auch jederzeit half, wenn der Computer anders wollte als ich mir das vorstellte.

Allen genannten und nichtgenannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Medizinisch-Naturwissenschaftlichen Forschungszentrums im 3. Stock danke ich für die nette Aufnahme und Hilfsbereitschaft.

Einen besonderen Dank auch an Sascha Keller, der mich immer wieder aufgebaut hat, wenn entstandene Hindernisse und Probleme unüberwindbar erschienen.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Dr 378/2-1, Ka 767/4-2 und dem Sonderforschungsbereich 510; H.K.) unterstützt.

## Lebenslauf

- 11.10.1976 Geboren in Nußloch (Heidelberg), als Tochter von Ursula  
Woitas-Steinmann, geb. Woitas und Peter Sauerbrei
- 1983-1984 Besuch der Grundschule in Wahlwies
- 1984-1987 Besuch der Grundschule in Radolfzell
- 1987-1988 Besuch des Gymnasiums in Radolfzell
- 1988-1993 Besuch des Gymnasiums in Gaienhofen
- 1993-1996 Besuch des Sozialpädagogischen Gymnasiums in Radolfzell
- Mai 1996 Abitur
- 1997-1998 Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
- 1998-2002 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität  
Tübingen
- 2000-2001 Anfertigung der Dissertation im Biochemischen Labor des  
Instituts für Pathologie
- Nov. 2001 Poster-Präsentation eines Teils der Dissertation auf der 2.  
Konferenz der „International Proteolysis Society“ in Freising
- 2002 Kurzmitteilung eines Teils der Dissertation:  
Schmid, H., Sauerbrei, R., Schwarz, G., Weber, E., Kalbacher,  
H. and Driessen, C. (2002). Modulation of the endosomal and  
lysosomal distribution of cathepsins B, L and S in human  
monocytes/macrophages. *Biol. Chem.* **383**, 1277-1283
- 2002-2003 Praktisches Jahr (PJ) am Lehrkrankenhaus Villingen-  
Schwenningen der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
- Mai 2003 3. Staatsexamen
- Ab Juni 2003 Ärztin im Praktikum am Lehrkrankenhaus Villingen-  
Schwenningen der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg