

To cleave or not to cleave

-

**Das Schnittverhalten des 20S-Proteasoms:
von der *in vitro* Analyse zur *in silico* Modellierung**

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2004

vorgelegt von

Stefan Tenzer

Tag der mündlichen Prüfung:

02.11.2004

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. H.-G. Rammensee

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. H. Schild

To cleave or not to cleave

-

**Das Schnittverhalten des 20S-Proteasoms:
von der *in vitro* Analyse zur *in silico* Modellierung**

Diese Arbeit wurde an der Universität Tübingen am Interfakultären
Institut für Zellbiologie in der Abteilung Immunologie durchgeführt
und von Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee betreut

Inhaltsverzeichnis:

I. Einleitung:	1
1. Das Immunsystem	1
1.1. Angeborenes Immunsystem	2
1.2. Adaptives Immunsystem	3
1.3. Funktion und Eigenschaften der Histokompatibilitäts-(MHC)-Moleküle	5
1.4. Peptidbindung durch MHC-Moleküle	6
1.5. Antigenerkennung durch T-Zellen	7
1.6. Effektorfunktionen von CD4+ und CD8+ T-Zellen	8
2. Antigenprozessierung im MHC-Klasse-I Weg	9
2.1. Das Ubiquitinsystem	10
2.2. Das 20S-Proteasom	11
2.3. Einfluß von IFN- γ auf die Zusammensetzung und Spezifität des 20S-Proteasoms	13
2.4. Die Rolle der α -Untereinheiten – „Gating“	14
2.5. Der Proteasom-Aktivator PA28	15
2.6. Das 26S-Proteasom	16
2.7. Die Rolle von Tripeptidylpeptidase-II	17
2.8. Zytosolische Aminopeptidasen	18
2.9. Der TAP-Transporter	19
2.10. Aminopeptidasen im Endoplasmatischen Retikulum	20
3. Vorhersage von CTL-Epitopen	21
3.1. Vorhersage proteasomaler Schnitte	21
3.2. Vorhersage des Transportes durch TAP	24
3.3. MHC-Bindungsvorhersage	25
3.4. ROC-Kurven als Werkzeug zur Evaluierung der Vorhersagequalität	26
4. Das Prion-Protein als Substrat für das 20S-Proteasom	27
5. Zielsetzung	28
II. Material und Methoden	29
1. Biologische und chemische Materialien	29
1.1. Bakterien	29
1.2. Chromatographieharze	29
1.3. Oligonukleotide und Primer	30
1.4. Peptide	32
1.5. Plasmide	32
1.6. Primärantikörper	32
1.7. Restriktionsenzyme	33
1.8. Sekundärantikörper	33
1.9. Standard-Chemikalien	33
1.10. Weitere Materialien	34
1.11. Zelllinien	34
1.12. Geräte, Plastikwaren	35

2. Methoden	36
2.1 Zellkultur	36
2.1.1 Kultur eukaryontischer Zellen	36
2.1.2 Bestimmung von Lebendzellzahlen	37
2.1.3 Kryokonservierung	37
2.1.4. Transfektion mittels Elektroporation	37
2.1.5. Transfektion mittels Lipofektion	38
2.1.6. Die Funktionsweise des Flp-In Systems	38
2.1.7. Analyse von Zellen mittel Durchflußcytometrie (FACS)	40
2.1.8. Acid Wash	41
2.2. Proteinaufreinigung und Methoden zur Proteinanalyse	41
2.2.1. Aufreinigung von 20S aus humanen Erythrocyten	41
2.2.2. Auf Aufreinigung c20S und i20S aus LCL721 und LCL721.174	43
2.2.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	44
2.2.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
2.2.5. Coomassie-Färbung	44
2.2.6. Semi-Dry- Elektrotransfer und Immundetektion von Proteinen (Western Blot)	45
2.2.7. Fluorogene Aktivitätsassays	45
2.3. In vitro Verdau von Peptiden und Proteinen	46
2.3.1. Reinheitsvoraussetzungen für den Verdau von Peptiden und Proteinen	46
2.3.2. Verdau von Peptiden	46
2.3.3. Verdau von Proteinen	46
2.3.4. Auftrennung der Verdauprodukte mittels Reversed-Phase-HPLC	47
2.3.5. Analyse der Verdauprodukte mittels MALDI- TOF-Massenspektrometrie	47
2.3.6. Analyse der Verdauprodukte mittels Edman-Abbau	48
2.4. Methoden zur Klonierung und Analyse von DNA	49
2.4.1. Aufreinigung von DNA aus Bakterienkulturen	49
2.4.2. Konzentrationsbestimmung von DNA	49
2.4.2. Ethanol-Fällung von DNA	49
2.4.3. Phenol-Chloroform-Extraktion	49
2.4.4. Restriktionsverdau von DNA	50
2.4.5. Ligation von DNA-Fragmenten	50
2.4.6. Analyse von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese	50
2.4.7. Sequenzierung von Plasmid-DNA	51
2.4.8. Ortsspezifische Mutagenese mittels Quickchange-PCR	51
2.4.9. Annealing von Oligonukleotiden	52
2.4.10. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	52
2.4.11. Konversion 5'-überhängender Enden zu „blunt-ends“	53
2.4.12. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	53
2.4.13. Hitzeschock-Transformation kompetenter Bakterien	54
2.4.14. Herstellung kompetenter Bakterien	54
2.5. Die Stabilized Matrix Methode (SMM) zur Generierung von Vorhersagematrizen	55

III. Ergebnisse	57
1. Aufreinigung von i20S- und c20S-Proteasomen aus LCL721 und LCL721.174	57
2. In vitro Verdau von rekombinantem Schaf-Prion-Protein (Prp23-234) durch c20S- und i20S-Proteasomen	64
2.1. Analyse der generierten Fragmente	84
2.2. Analyse der Schnittpräferenzen von c20S- und i20S-Proteasomen	85
2.3. Verteilung der Fragmente	90
2.4. Analyse der Kinetiken des Abbaus zweier unterschiedlicher allelischer Formen des Prion-Proteins durch 20S-Proteasomen	92
3. In vitro Verdau von Peptiden	94
3.1 In vitro Verdau des Peptides WT1314-329	94
3.2. In vitro Verdau eines Peptides aus der Fusionsregion von BCR-ABL	95
3.3. In vitro Verdau des Peptides PRAME133-159	96
3.4. In vitro Verdau eines Peptides aus der Fusionsregion von ETV6-AML1	98
3.5. In vitro Verdau des Peptides CP α 185-109	99
4. Identifikation neuer Substrate für das 20S-Proteasom	100
4.1 Aufreinigung und proteasomaler Verdau von Adipophilin	101
4.2. Verdau von Glutamat-Dehydrogenase und Aldolase durch c20S- und i20S-Proteasomen	102
5. Das „Reverse Analysis of Processing“-Projekt (RAP)	104
5.1. Funktionsweise des Systems	104
5.2. Detektion der Expression des H2-K ^b -SIINFEKL-Komplexes	106
5.3. Detektion von endogen prozessiertem SIINFEKL	107
5.4. Klonierung der Expressionsvektoren	108
5.5. Expression von SIINFEKL durch das RAP-Konstrukt	117
5.6. Homogenität des Expressionlevels von Einzelzellklonen	119
5.7. Repräsentationsrate nach „Acid Wash“	120
5.8. Einfluß der Position P1' auf das Prozessierungsverhalten	123
6. Proteasomale Schnittvorhersage	125
6.1. Evaluierung des PaProC-Algorithmus und Vergleich mit der SMM-Methode	126
6.2. Vergleich öffentlich verfügbarer Vorhersagealgorithmen für proteasomale Schnitte	128
6.3. Relativer Einfluß der zur Vorhersage verwendeten Sequenzpositionen	130
6.4. Vorhersagequalität der SMM-Algorithmen für natürliche MHC Klasse-I Liganden	133
6.5. Kombination der Vorhersage von proteasomaler Prozessierung und TAP-Transport	134
6.6. Der Testdatensatz: MHC Klasse-I Liganden aus Nierenzell-Karzinom	139
6.7. Einfluß der immuno-Untereinheiten auf die präsentierten MHC Klasse-I Liganden	139
6.8. Vergleich mit NetChop C2.0	140
6.9. Kombination mit MHC-Bindungsvorhersagen	141
6.10. Vergleich der Vorhersagequalität mit anderen Methoden	142

IV. Diskussion	144
1. Aufreinigung von 20S-Proteasomen	144
2. In vitro Verdau von PrP	145
3. In vitro Verdau von Peptiden	148
4. Neue Substrate für das 20S-Proteasom	149
5. Das “Reverse Analysis of Processing” (RAP) –Projekt	150
6. Evolution von Algorithmen zur Vorhersage von proteasomalen Schnitten und die kombinierte Vorhersage der Einflüsse von Proteasom, TAP, und MHC	153
V. Zusammenfassung	158
VI. Publikationsverzeichnis	160
VII. Abkürzungen	161
VIII. Referenzen	164
IX. Danksagung	175
X. Verzeichnis der Akademischen Lehrer	177
XI. Lebenslauf	178

„Every act of creation is first of all an act of destruction.“

[Pablo Picasso \(1881-1973\)](#)

I. Einleitung

1. Das Immunsystem

Unser Immunsystem ist ein bemerkenswert adaptionsfähiges Verteidigungssystem, das sich in Wirbeltieren zum Schutz des Organismus vor Pathogenen und Krebs entwickelt hat. Es ist in der Lage, eine enorme Vielzahl von Zellen und Molekülen zu bilden, die eine scheinbar unlimitierte Vielfalt von Pathogenen spezifisch erkennen und eliminieren können. Das Immunsystem schützt den Körper jedoch nicht nur vor dem Eindringen und der Schädigung durch Viren, Bakterien, Pilze und andere Parasiten, sondern überwacht auch körpereigene Zellen, die im Falle von Mutationen und Entartungen erkannt und daraufhin zerstört werden können. Das Immunsystem besteht aus einer großen Palette unterschiedlicher Komponenten, die in verschiedenen Verteidigungslinien organisiert sind und dadurch erst einen wirksamen Schutz des Organismus vor Infektionen ermöglicht. Das komplexe Zusammenspiel der einzelnen zellulären und molekularen Bestandteile des Immunsystems wird als Immunantwort bezeichnet. Diese kann funktionell in zwei eng verknüpfte Prozesse aufgeteilt werden: Erkennung und Antwort.

Die Immunerkennung besitzt eine außergewöhnliche Spezifität, die es erlaubt, minimale molekulare Unterschiede zu erkennen, die ein Pathogen von einem anderen unterscheiden. Gleichzeitig ist es in der Lage, zwischen „selbst“, d.h. körpereigenen Zellen und Molekülen und „nicht-selbst“, d.h. körperfremden Organismen, Molekülen und auch entarteten Zellen zu unterscheiden.

Wenn das Immunsystem ein Ziel erkennt, steht eine Vielzahl unterschiedlicher Zellen und Moleküle zur Verfügung, um die jeweils erforderliche Effektor-Antwort zu starten, die letztendlich zur Eliminierung oder Neutralisierung des Pathogens führt. Auf diese Weise ist das Immunsystem in der Lage, je nach erkanntem Ziel unterschiedlicher Effektorantworten zu starten, die spezifisch auf das jeweilige Pathogen zugeschnitten sind. Kommt der Organismus später wieder in Kontakt mit demselben Pathogen, wird eine sogenannte Gedächtnis-Antwort induziert, die sich durch eine höhere Immunreaktivität auszeichnet und so in der Lage ist, das Pathogen frühzeitig zu eliminieren und eine Erkrankung zu verhindern.

1.1. Angeborenes Immunsystem

Als natürliche oder angeborene Immunantwort bezeichnet man alle diejenigen Abwehrmechanismen, die bereits vor dem Kontakt mit einem Pathogen vorhanden sind, und allenfalls gruppenspezifisch gegen bestimmte Pathogene wirken. Man kann die angeborene Immunität in vier Typen defensiver Barrieren unterteilen: anatomische, physiologische, endozytische und inflammatorische. Zu den anatomischen Barrieren zählt man die Haut, die als mechanische Barriere den Eintritt von Mikroben erschwert oder verhindert. Außerdem sorgt ein saurer pH von 3-5 auf der Hautoberfläche für eine Retardierung mikrobiellen Wachstums. Schleimhäute zählen ebenfalls zu den anatomischen Barrieren. Sie produzieren einen viskosen Schleim, der fremde Mikroben umhüllt, und von Cilien auf der Schleimhautoberfläche abtransportiert wird, die körpereigene mikrobielle Flora kompetitiert dort mit Pathogenen um notwendige Nährstoffe und auch um Anheftungsstellen.

Zu den physiologischen Barrieren zählt man Körpertemperatur, pH-Wert und verschiedene lösliche Faktoren wie Lysozym, Komplement oder Interferone, die ebenfalls zur angeborenen Immunität beitragen. So stellt der saure pH-Wert des Magens eine wirkungsvolle Barriere gegen das Eindringen von Mikroorganismen dar. Lysozym, eine Mureinhydrolase, die man in Schleimhautsekreten findet, ist in der Lage, die Zellwände von Bakterien abzubauen. Als Interferone bezeichnet man eine Gruppe von Proteinen, die von virusinfizierten Zellen produziert werden und die neben anderen Funktionen in benachbarten Zellen einen antiviralen Status induziert. Im Blutserum findet man die Effektormoleküle des Komplementsystems. Diese Proteine können durch eine Vielzahl spezifischer und unspezifischer immunologischer Mechanismen aktiviert werden, die die inaktiven Proenzyme des Komplementsystems in ihre aktive Form umwandeln. Beispielsweise kann durch gezielte Aggregation von Komplementbestandteilen eine Porenbildung in der Membran der Zielzelle induziert werden, was letztendlich zu ihrer osmotischen Lyse führt. Desweiteren markieren Bestandteile des Komplementsystems ihre Ziele zur Aufnahme durch phagozytische Zellen, wiederum andere Komponenten vermitteln Entzündungsreaktionen durch ihre Bindung an Rezeptoren von Granulozyten, Mastzellen und B-Zellen.

Die Phagozytose ist ein weiterer wichtiger Mechanismus der angeborenen Immunität. Makrophagen, Mikrogliazellen, Langerhanssche Zellen und viele weitere Zelltypen sind in der Lage, körperfremde Partikel aufzunehmen und im Falle einer Aktivierung durch Pathogene Botenstoffe zu sezernieren. Diese induzieren Entzündungsreaktionen und aktivieren andere Zellen des Immunsystems und regen diese zur Proliferation an.

Unter inflammatorischen Barrieren fasst man die Vorgänge einer Entzündungsantwort zusammen, die in den meisten Fällen ein weiteres Eindringen oder die Proliferation von Pathogenen hemmen oder verhindern können. Hierzu zählen Vasodilatation, die zu einer lokal erhöhten Gewebetemperatur und Rötung führt, ein Anstieg in Kapillarpermeabilität, der einen Übertritt von Zellen und Proteinen in das Zielgewebe erleichtert, und letztendlich die Wanderung phagozytischer Zellen von den Kapillaren in das Gewebe, wo sie Bakterien phagozytieren und lytische Enzyme ausscheiden, die neben Pathogenen auch Zellen des umliegenden Gewebes schädigen können.

Die an der ersten, nicht adaptiven Phase der Immunantwort beteiligten Leukozyten besitzen spezifische Rezeptoren, die endogene oder mikrobielle Moleküle erkennen können. Diese signal-transduzierenden Rezeptoren gehören unter anderem zur Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR), die elf Transmembranrezeptoren umfasst, die auf der Basis ihrer genetischen Ähnlichkeit mit Rezeptoren des Toll-Signalweges in *Drosophila* identifiziert wurden. Beispielsweise wird der in Säugetieren exprimierte Rezeptor TLR4 durch bakterielle Lipopolysaccharide aktiviert, was letztendlich in der Aktivierung einer inflammatorischen Signalkaskade resultiert. Zu dieser Gruppe von Leukozyten zählt man natürliche Killerzellen, bestimmte $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten und $NK1.1^+$ - $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten und Granulozyten. Diese benötigen für die Ausübung ihrer Effektorfunktionen keine vorangehende Expansionsphase und können nach ihrer Aktivierung infizierte Zellen oder Pathogene auf direktem Wege lysieren oder in Zielzellen Apoptose induzieren.

1.2. Adaptives Immunsystem

Während Zellen, die an der angeborenen Immunantwort beteiligt sind, eine breite Palette unterschiedlicher Ziele mit Hilfe von TLR und anderen spezifischen Rezeptoren für konservierte Strukturen von Pathogenen erkennen und angreifen können, zeichnen sich die an der adaptiven Immunantwort beteiligten Zellen durch die Präsenz eines jeweils einzigartigen Erkennungsrezeptor aus, der klonalen Ursprungs ist und für die hohe Spezifität der Pathogenerkennung durch diese Zellen verantwortlich ist. Im Laufe der Reifung dieser Zellen entsteht durch die Mechanismen der somatischen Rekombination eine große Vielfalt klonaler Zellen mit jeweils einzigartigen Rezeptoren. Eine selektive klonale Expansion der jeweils für ein bestimmtes Pathogen spezifischen Lymphozyten erfolgt erst nach dem ersten Kontakt mit dem entsprechenden Antigen. Die an der adaptiven Immunantwort beteiligten Lymphozyten werden in B-Zellen, T-Helfer-Zellen, inflammatorische T-Zellen und zytotoxische T-Zellen

unterteilt, die sich allesamt durch die vier Grundcharakteristiken des adaptiven Immunsystems auszeichnen: Spezifität, Diversität, immunologisches Gedächtnis und die Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „nicht-Selbst“.

B-Zellen reifen im Knochenmark heran und verlassen dieses als naive B-Zellen, die auf ihrer Oberfläche membrangebundene IgM- und IgD-Moleküle mit einer für diese Zelle einzigartigen Spezifität exprimieren. Diese wird während der Reifung im Knochenmark durch eine geordnete Abfolge von Rearrangements von Immunoglobulin-Gensegmenten festgelegt. Erst nach initialem Kontakt mit einem Antigen beginnt die Proliferation und damit klonale Expansion der B-Zelle, hierfür ist sie in Falle von Thymus-abhängigen Antigenen auf ein Aktivierungssignal von T-Helferzellen angewiesen, welches durch Interaktion von CD40 auf der B-Zell-Membran mit CD40L, das von der T-Zelle exprimiert wird, zustande kommt. Durch Cytokine, die von T-Helfer-Zellen sezerniert werden, kann die B-Zelle weiter zu Plasma- und Gedächtniszellen ausdifferenzieren und außerdem durch „Class-Switching“ unterschiedliche Subtypen von Antikörpern produzieren.

Genau wie B-Zellen entstehen T-Zellen aus hämatopoetischen Zellen im Knochenmark. Jedoch erfolgt die Reifung zur naiven Zelle erst nach der Einwanderung in den Thymus. Während der Reifung im Thymus erfolgt die Genese des für jede T-Zelle einzigartigen T-Zell-Rezeptors durch somatische Rekombination. Im Gegensatz zu B-Zellen, deren membranständige Rezeptoren Antigene per se erkennen können, sind T-Zell-Rezeptoren nur in der Lage, Antigene zu erkennen, die mit Major Histocompatibility Complex (MHC)-Molekülen assoziiert sind. Naive T-Zellen zirkulieren solange inaktiv im Körper, bis sie durch Erkennung ihres kognaten Antigens und gleichzeitige kostimulatorische Signale aktiviert werden und beginnen, zu proliferieren und sich schließlich in Effektor- und Memory-T-Zellen zu differenzieren.

Man unterscheidet im wesentlichen drei Subtypen von T-Zellen: inflammatorische T-Zellen (T_H1), deren Aufgabe in der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und auch Makrophagen liegt, T-Helferzellen (T_H2), deren Funktion unter anderem die Produktion von für die Aktivierung von B-Zellen notwendigen Interleukine ist, sowie zytotoxische T-Zellen (CTL), die nach ihrer Aktivierung in der Lage sind, virusinfizierte oder entartete Zellen zu eliminieren. Außerdem existieren spezialisierte $CD4^+$ -T-Zellen, die konstitutiv CD25 exprimieren. Diese werden auch als regulatorische T-Zellen bezeichnet und sind in der Lage, T-Zell Antworten zu inhibieren, ihre Funktion liegt vermutlich in der Erhaltung der Selbst-Toleranz des Immunsystems. $CD25^+$ Zellen stellen ca. 5-15% der gesamten $CD4^+$ T-Zellen und werden im Thymus generiert. Der genaue Mechanismus der Suppression von T-Zell-

Antworten durch $CD25^+CD4^+$ Zellen ist noch nicht vollständig geklärt, es wurden sowohl TGF- β als auch IL-10 vermittelte Suppressorfunktionen dieser T-Zellen beschrieben (Jonuleit and Schmitt, 2003). Zur ihrer Aktivierung sind sowohl die beiden Klassen der $CD4^+$ T-Helferzellen, als auch die $CD8^+$ cytotoxischen T-Zellen auf kostimulatorische Signale angewiesen, die normalerweise durch antigenpräsentierende Zellen (APC), besonders effektiv durch reife dendritische Zellen (DC) zur Verfügung gestellt werden.

1.3. Funktion und Eigenschaften der Histokompatibilitäts-(MHC)-Moleküle

Alle bisher untersuchten Säugerspezies besitzen ein eng organisiertes Cluster von Genen, dessen Genprodukte eng verknüpft sind mit der Fähigkeit eines Organismus, zwischen Selbst und Nichtselbst zu unterscheiden. Diese sogenannte MHC (Major histocompatibility complex) – Genregion enthält eine Vielzahl von Genloci, die eine entscheidende Rolle bei der Frage spielen, ob transplantiertes Gewebe vom Organismus akzeptiert oder abgestoßen wird. Das Konzept, dass die Abstoßung von fremdem Gewebe auf einer Immunreaktion gegen Zelloberflächenmoleküle beruht stammt ursprünglich aus der Arbeit von P.A. Gorer aus den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts (Gorer, 1937). Die Eingrenzung und letztendlich genaue Identifikation dieses Genclusters wurde ab 1948 durch die Hauttransplantationsexperimente G. Snells und später unter Verwendung von Inzuchtstämmen möglich (Graff et al., 1971). Die Notwendigkeit dieser Genprodukte für die Erkennung virusinfizierter Zellen durch CTL und die Restriktion von CTL auf diese Genprodukte wurde viel später von R. Zinkernagel und P. Doherty gefunden (Zinkernagel and Doherty, 1974).

Die im humanen Genom auf Chromosom 6 und im Genom der Maus auf Chromosom 17 lokalisierten Genloci zeichnen sich durch einen extremen Polymorphismus aus, im menschlichen Genom waren im April 2004 schon 309 Allele für HLA-A, 563 für HLA-B und 167 Allele für HLA-C bekannt (Robinson et al., 2000). In Kombination mit der kodominanten Expression jeweils zweier HLA-A, HLA-B und HLA-C Genprodukte wird auf diese Weise eine enorme Variationsbreite an individuell unterschiedlicher Expression dieser Genprodukte innerhalb einer Population ermöglicht.

MHC-Moleküle sind hoch glykosylierte Heterodimere, die in zwei Klassen unterteilt werden: MHC Klasse-I Moleküle werden auf jeder kernhaltigen Zelle des Körpers exprimiert und bestehen aus einer ca. 45 kDa großen schweren α -Kette, die nichtkovalent mit der sogenannten leichten Kette, dem ca. 12 kDa großen β_2 -Mikroglobulin assoziiert ist. Die α -

Kette ist mit ihrem hydrophoben Transmembransegment in der Zellmembran verankert und besitzt drei extrazelluläre Domänen (α_1 , α_2 , α_3), die jeweils ca. 90 Aminosäuren umfassen. Die α_1 und α_2 -Domänen formen gemeinsam eine Plattform aus acht antiparallelen β -Faltblatt-Strängen, das von zwei langen α -helikalen Regionen überspannt wird. Diese bilden zusammen eine ca. $25\text{Å} \times 10\text{Å} \times 11\text{Å}$ großen Bindungstasche (Bjorkman et al., 1987), die an der Oberseite des MHC-Moleküls lokalisiert ist und Peptide mit einer Größe von 8-12 Aminosäuren aufnehmen kann, wie durch Isolation von MHC-gebundenen Peptiden (Rotzschke et al., 1990; Falk et al., 1991) und weitere röntgenkristallographischen Untersuchungen bewiesen wurde (Fremont et al., 1995).

MHC-Klasse-II Moleküle bestehen aus zwei unterschiedlichen Ketten, der ca. 33 kDa schweren α -Kette und der ca. 28 kDa schweren β -Kette, die nichtkovalent miteinander assoziiert sind. Ebenso wie die MHC-Klasse-I Moleküle sind sie membrangebundene Glykoproteine, die aus einem zytosolischen, einem Transmembransegment und extrazellulären Domänen bestehen. Jede Kette der MHC Klasse-II Moleküle besitzt zwei extrazelluläre Domänen. Die membranproximalen Domänen besitzen ebenso wie die α_3 -Domäne des MHC-Klasse-I Moleküls eine Immunglobulin-Faltung, die α_1 und β_1 Domänen bilden gemeinsam eine Peptidbindungstasche, die aus einem Boden aus acht antiparallelen Faltblattsträngen und zwei seitlichen antiparallelen α -Helices besteht. Im Gegensatz zur Peptidbindungstasche der Klasse I Moleküle ist die Bindungstasche der Klasse II Moleküle an den Enden nicht abgeschlossen, so dass auch längere Peptide von bis zu 25 AA binden können, sofern sie das passende Bindungsmotiv besitzen (Stern et al., 1994; Brown et al., 1997).

1.4. Peptidbindung durch MHC Moleküle

Jedes Klasse von MHC-Molekülen ist in der Lage ein spezielles Set von Peptiden spezifisch zu binden. Außerdem finden sich große Unterschiede in den Bindungseigenschaften der einzelnen Klasse-I und Klasse-II Allelprodukte. Jede einzelne Zelle exprimiert auf ihrer Oberfläche ca. 10^5 Kopien eines jeden MHC-Moleküls, dadurch ist die Präsentation einer großen Vielfalt von Peptiden gleichzeitig gewährleistet. Die gebundenen Peptide interagieren mit den Bindungstaschen sowohl über elektrostatische Wechselwirkungen, also auch über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen. An dieser Bindung können sowohl der Amino- und Carboxyterminus des Peptides, als auch die einzelnen

Seitenketten der Aminosäuren beteiligt sein. Jedes MHC-Allelprodukt stellt durch seine Sequenz im Bereich der Bindungsfurche spezifische Anforderungen an die Peptide, die von diesem Allelprodukt gebunden werden können. In jedem Allelprodukt beeinflussen bestimmte Positionen des gebundenen Peptides seine Bindungsaffinität in besonderem Maße, diese werden als Ankerreste bezeichnet. Die Seitenketten der Ankerreste interagieren mit entsprechenden Taschen in der Peptidbindungsfurche des MHC-Moleküls. Diese Taschen werden durch polymorphe Aminosäureresten des MHC-Moleküls gebildet, die zwischen den unterschiedlichen allelischen Varianten differieren. Dementsprechend müssen Peptide, die von einem bestimmten Allelprodukt gebunden werden können, bestimmten Anforderungen an ihre Aminosäurezusammensetzung genügen, um eine ausreichende Bindungsaffinität zu dem MHC-Molekül zu besitzen. Für viele Allelprodukte wurden sogenannte Bindungsmotive oder –matrices bestimmt, dies wurde experimentell durchgeführt durch Aufreinigung der peptidbeladenen MHC-Moleküle gefolgt von saurer Extraktion der gebundenen Peptide und anschließender Poolsequenzierung (Rotzschke et al., 1990; Falk et al., 1991) oder Separation der Peptide über HPLC und anschließende massenspektroskopische Identifikation (Lemmel and Stevanovic, 2003).

Alle bisher identifizierten MHC-Klasse-I Bindungsmotive besitzen carboxyterminale Ankerreste, wobei die meisten Allelprodukte hydrophobe Aminosäurereste an dieser Position des Peptides bevorzugen, jedoch sind auch Allelprodukte bekannt, die nur basische Aminosäuren an dieser Position akzeptieren. Zusätzliche Ankerreste finden sich meist an Position 2 oder 3 des aminoterminalen Endes des Peptides. Durch die Tatsache, dass die Bindungstasche der Klasse-I Moleküle an beiden Enden geschlossen ist, besitzen die meisten gebundenen Peptide eine Länge von 8 - 10 Aminosäuren (Rammensee et al., 1993) , für manche MHC-Klasse-I Allelprodukte wurden jedoch auch Liganden von bis zu 12 Aminosäuren Länge identifiziert. Im Gegensatz hierzu besitzen Klasse-II Moleküle eine an beiden Enden offene Bindungsfurche, was die Bindung längerer Peptide von 13 bis zu 25 AA Länge ermöglicht. Peptide, die an ein bestimmtes MHC-Klasse-II Molekül binden, besitzen meist ein konserviertes Kernmotiv von 7 - 10 AA Länge, in dem sich häufig hydrophobe oder aromatische Aminosäuren finden.

1.5. Antigenerkennung durch T-Zellen

Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen sind nur in der Lage, Antigene zu erkennen, die im Kontext von Selbst-MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche von Zielzellen präsentiert

werden. Diese Eigenschaft, die als MHC-Restriktion bezeichnet wird, unterscheidet die Antigenerkennung durch T-Zellen von der durch B-Zellen. Jede T-Zelle exprimiert auf ihrer Oberfläche einen für jeden Klon einzigartigen T-Zell-Rezeptor, man unterscheidet entsprechend dem auf der Oberfläche exprimierten Rezeptor $\alpha\beta$ -T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen.

T-Zell-Rezeptoren (TCR) sind heterodimere Glykoproteine, deren in die Superfamilie der Immunglobuline eingeordnet werden. Jede Kette des TCR besitzt 2 Domänen, die eine Disulfidbrücke besitzen, welche 60-75 AA überspannt. Während die membranproximale carboxyterminale Domäne und die Transmembrandomäne konserviert sind, findet man in der aminoterminalen Domäne beider Ketten einen sehr hohen Grad an Sequenzvariabilität, der durch die somatische Rekombination von V-D-J und C- Elementen generiert wird. Die für die Spezifität des TCR entscheidenden Bereiche finden sich in den sogenannten CDR (Complementarity determining regions), welche im membrandistalen Bereich des TCR zu finden sind. Durch Röntgenstrukturanalyse (Garcia et al., 1996; Garboczi et al., 1996) von Kristallen trimerer Komplexe aus MHC, Peptid und TCR konnte gezeigt werden, dass der TCR in diesem Komplex eine zum MHC-Molekül diagonale Anordnung besitzt, bei der die CDR1 und CDR2-Regionen des TCR Kontakt mit den α -Helices der α_2 -Domäne des MHC-Moleküls haben, die CDR3-Region jedoch primär mit dem gebundenen Peptid interagiert.

Für die Erkennung einer Zielzelle spielt neben der peptidspezifischen Interaktion des TCr mit einem entsprechend beladenen MHC-Molekül auf der Zelloberfläche der Zielzelle auch die Interaktion von CD8 (im Falle von MHC-Klasse-I restringierten T-Zellen) bzw. CD4 (für MHC-Klasse-II restringierte T-Zellen) mit konservierten Regionen der MHC-Klasse-I bzw. Klasse-II Moleküle eine wichtige Rolle. Für die Aktivierung einer naiven T-Zelle sind außerdem noch die Interaktion von CD80 oder CD86 auf der antigenpräsentierenden Zelle mit CD28 auf der T-Zelle von entscheidender Bedeutung (Linsley and Ledbetter, 1993).

1.6. Effektorfunktionen von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Naive T-Zellen können über Jahre im Blut zirkulieren, ohne sich zu teilen, erst nach ihrer Aktivierung treten sie wieder in den Zellzyklus ein und beginnen zu proliferieren. Für die Proliferation von T-Zellen notwendig ist das Zytokin IL-2, welches sowohl autokrin von T-Zellen als auch parakrin von APC und CD4⁺-Helferzellen sekretiert wird und über den hochaffinen IL-2-Rezeptor (IL2-R $\alpha\beta\gamma$), welcher durch aktivierte T-Zellen exprimiert wird (Minami et al., 1993). Weitere Proliferations- und Differenzierungsstimuli erfolgen durch die Ligation von CD40L mit CD40, welcher von APC exprimiert wird. Hierdurch erfolgt eine

Stabilisierung der IL-2 mRNA (Linsley et al., 1991), welche das Proliferationsignal rückkoppelnd verstärkt.

Die Funktion der MHC-Klasse-II restringierten CD4⁺ T_H2-Zellen liegt in der Aktivierung von B-Zellen und der Bildung von „germinal centers“ in lymphoiden Follikeln sowohl im Cortex von Lymphknoten, als auch in anderen lymphatischen Geweben. Diese Funktion erfüllen sie durch die Expression von CD40L und die Sekretion der Zytokine IL-4, IL-5, und IL-6, die für die Ausdifferenzierung von B-Zellen zu Plasma- und Gedächtniszellen und den Wechsel der exprimierten Immunglobulin-Klassen notwendig sind.

Die Hauptaufgabe von T_H1-Zellen ist die Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen. Sie exprimieren auf ihrer Oberfläche ebenfalls CD40L und sekretieren hauptsächlich die für diese Funktion erforderlichen Zytokine IL-2, TNF-β und IFN-γ.

Zytotoxische Zellen erfüllen die Aufgabe, virusinfizierte oder entartete Zellen zu eliminieren, die sie an auf der Oberfläche präsentierten MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexen erkennen.

Die Zerstörung der Zielzellen erfolgt entweder durch die gerichtete Endozytose von Perforinen (Podack et al., 1991), welche in der Zellwand der Zielzellen Poren bilden, und Granzymen, die in der Zielzelle die für die Apoptose verantwortlichen Caspasen aktivieren. Alternativ kann die Apoptose in Zielzellen durch Fas-Ligand induziert werden, welcher auf der Oberfläche von CTL exprimiert wird und an das auf Zielzellen exprimierte Fas bindet. Diese Bindung führt zu einer Oligomerisierung dieses Rezeptor führt, was in der Zielzelle eine letztendlich zur Apoptose führende Signalkaskade aktiviert (Berke, 1995).

2. Antigenprozessierung im MHC-Klasse-I Weg

Die auf der Zelloberfläche von MHC-Klasse-I Molekülen präsentierten Peptide werden zum größten Teil im Zytosol generiert (Rock et al., 2002) (Kloetzel, 2001). Dort werden falsch gefaltete oder nicht mehr von der Zelle benötigte und daher zur Degradation bestimmte Proteine durch das Ubiquitinsystem erkannt und markiert. Die polyubiquitinylierten Proteine werden anschließend durch das Proteasom in Fragmente zwischen 4 und 25 Aminosäuren Länge abgebaut (Kisselev et al., 1999). Einige Antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen und Dendritische Zellen können in einem als „Crosspresentation“ bezeichneten Prozess auch extrazelluläre, durch Makropinozytose aufgenommene Proteine in diesen Präsentationsweg einschleusen (Heath and Carbone, 2001). Die entstehenden Peptide werden anschließend im Zytosol zum größten Teil durch Aminopeptidasen schrittweise bis hin zu

einzelnen Aminosäuren abgebaut, die dann wiederum zur Proteinsynthese recycelt werden können. Ein kleiner Teil der proteasomal generierten Peptide entkommt jedoch dem Abbau durch Aminopeptidasen und wird in einem ATP-abhängigen Prozess durch TAP (Transporter associated with antigen presentation) in das endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert. Ein Teil der durch TAP in das ER transportierten Peptide ist in der Lage, an neu synthetisierte MHC-Klasse-I Moleküle zu binden (Rock et al., 1997). Für die Beladung der MHC-Klasse-I Moleküle sind die ER-residenten Proteine Calretikulin, Calnexin, ERp57 und Tapasin erforderlich (Cresswell et al., 1999). Die trimeren Komplexe aus der schweren Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls, β_2 -Mikroglobulin und Peptid werden anschließend durch den Golgi-Apparat, wo die Glykosylierung der MHC-Klasse-I Moleküle stattfindet, an die Zelloberfläche transportiert, wo sie durch CTL erkannt werden können.

2.1. Das Ubiquitinsystem

Das nur 76 Aminosäuren große Ubiquitin ist eines der höchst konservierten bekannten Proteine, zwischen Mensch und Hefe bestehen nur drei konservative Aminosäureaustausche in der Primärsequenz. Ubiquitin wurde neben allen eukaryontischen Organismen auch in Cyanobakterien (Durner and Boger, 1995), Archaeobakterien und einigen den Actinomyceten zugehörigen Eubakterien (Wolf et al., 1993) (Lupas et al., 1997) nachgewiesen. Ubiquitin wird in mehreren unterschiedlichen Genloci kodiert, in denen jeweils bis zu fünf sequentiell in „head-to-tail“-Anordnung verknüpfte Ubiquitineinheiten kodiert sind. Posttranslational werden diese durch eine Ubiquitin-Hydrolase mit hoher Effizienz in die einzelnen Ubiquitinmoleküle zerlegt. Die Kristallstruktur von Ubiquitin wurde bereits 1987 durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt (Vijay-Kumar et al., 1987). Ubiquitin besitzt eine globuläre, aus α - und β -Strukturen aufgebaute Struktur mit einem hydrophoben Kern. Sämtliche geladenen Aminosäurereste liegen auf der Oberfläche des Moleküls, dessen außergewöhnlich hohe Stabilität durch die Partizipation von fast 90% aller Aminosäurereste an Wasserstoff- und Salzbrückenbindungen bedingt ist. Ubiquitin besitzt sieben Lysinreste, deren ϵ -Aminogruppen über Isopeptidbindungen mit den α -Carboxygruppen der C-terminalen Glycinreste anderer Ubiquitinmoleküle verknüpft werden können. Hierdurch ist die Bildung von verzweigten Polyubiquitinketten möglich, deren Aufgabe die Markierung von Proteinen zur selektiven Degradation durch das 26S-Proteasom ist. Für diese Markierung spielen die drei C-terminalen Aminosäuren des Ubiquitinmoleküls eine zentrale Rolle. Diese dienen als Erkennungsmotiv für die Enzyme des Ubiquitin-konjugierenden Systems, welche die

Aktivierung und Bindung von Ubiquitinmolekülen an abzubauen Proteine durch Bildung einer Isopeptidbindung mit der ϵ -Aminogruppe eine Seitenkette des Proteins katalysieren. Alle Komponenten des Ubiquitin-konjugierenden Systems finden sich im Zyto- und Nukleoplasma. In einem ATP-anhängigen Prozess bilden Ubiquitin-aktivierende Enzyme der E1-Familie zunächst einen Thioester zwischen der α -Carboxygruppe des C-terminalen Glyinrestes und der SH-Gruppe eines Cysteinrestes im aktiven Zentrum des E1-Proteins. Das auf diese Weise aktivierte Ubiquitinmolekül wird im nächsten Schritt auf ein Enzym der Familie der E2-Enzyme übertragen, die alle ein konserviertes UBC-Motiv besitzen. Das Ubiquitinmolekül kann anschließend entweder direkt durch das E2-Enzym auf das Substratmolekül übertragen werden, in den meisten Fällen ist hierzu jedoch mindestens noch ein Enzym der E3-Familie notwendig. Diese sind letztendlich für die Substratspezifität des Ubiquitin-konjugierenden Systems verantwortlich. Die E3-Enzyme, die auch als Ub-Protein-Ligasen oder „ubiquitin recognins“ bezeichnet werden (Ciechanover, 1998), bilden eine sehr heterogene Gruppe von Enzymen, die man in zwei Gruppen unterteilen kann. Eine Gruppe erkennt sowohl den E2-Ubiquitin-Komplex als auch das Substratmolekül und bringt diese in enge räumliche Nähe zueinander, wodurch der direkte Transfer des Ubiquitinmoleküls vom E2-Enzym auf das Zielsubstrat ermöglicht wird. E3-Proteine der zweiten Gruppe besitzen in ihrem aktiven Zentrum einen Cysteinrest, der das aktivierte Ubiquitinmolekül übernimmt und es anschließend auf das zu markierende Protein überträgt. Anschließend werden weitere Ubiquitinmoleküle über Isopeptidbindungen mit dem angehängten Ubiquitin verknüpft. Das zu degradierende Protein wird auf diese Weise polyubiquitinyliert und zur Degradation durch das 26S-Proteasom markiert.

2.2. Das 20S-Proteasom

Proteasomen sind die wichtigsten nichtlysosomalen Proteasen in eukaryontischen Zellen, ihre Anwesenheit wurde erstmals im Jahre 1968 beschrieben (Harris, 1969). Das 20S-Proteasom ist ein ca. 700 kDa schwerer, im Zytoplasma lokalisierter multikatalytischer Enzymkomplex, dessen Aufgabe in der Degradation falsch gefalteter oder nicht mehr von der Zelle benötigter Proteine liegt (Coux et al., 1996). Proteasomen finden sich in allen eukaryotischen Zellen, jedoch auch in Archaeobakterien und einigen Eubakterien. Durch Röntgenstrukturanalyse wurde 1995 die Struktur des archaeobakteriellen Proteasoms aufgeklärt (Lowe et al., 1995). Es besteht aus vier versetzt übereinander liegenden heptameren Ringen in der Konformation $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$, die auf diese Weise eine fassartige symmetrische Struktur bilden. Die beiden außen

liegenden Ringe werden durch die α -Untereinheiten gebildet, in den innen liegenden β -Untereinheiten finden sich die proteolytisch aktiven Zentren. Diese liegen zur Innenseite des 15 nm x 11 nm großen Proteasoms ausgerichtet vor. Im Inneren des Proteasoms findet man entlang der Längsachse drei Hohlräume, die durch Verengungen voneinander abgegrenzt sind. Da die Öffnungen an zwischen Hohlräumen und Zytoplasma an der engsten Stelle nur 10 Å groß sind, können nur entfaltete Polypeptidketten in den zentralen Hohlraum gelangen, in dem sich die proteolytisch aktiven Zentren der β -Untereinheiten befinden. Korrekt gefaltete Proteine sind durch diese Kompartimentisierung vor einem unkontrollierten proteolytischen Angriff durch das Proteasom geschützt.

Der katalytische Mechanismus der aktiven Zentren des Proteasoms wurde 1995 aufgeklärt. Proteasomen gehören zur Familie der N-terminal-Nukleophil-(Ntn-)Hydrolasen (Brannigan et al., 1995). Alle Mitglieder dieser Familie von Proteinasen teilen mehrere gemeinsame Eigenschaften: die N-terminale Aminogruppe spielt eine Rolle bei der Steigerung der Nukleophilität des aktiven Oxyanions, mehrere wichtige strukturelle Elemente der Oxy-Anion-Tasche sind konserviert und sie besitzen die Kapazität zur Autoprozessierung. Das katalytisch aktive Zentrum der aktiven β -Untereinheiten des Proteasoms wird durch den N-terminalen Threoninrest gebildet, das im *Thermoplasma*-Proteasom eine katalytische Triade mit Glu₁₇ und Lys₃₃ bildet. Im eukaryontischen Proteasom ist Lys₃₃ konserviert, Glu₁₇ wird jedoch durch Asp₁₇ ersetzt, was eine homologe Konformation zur katalytischen Triade der L-Asparaginase ergibt. Während der koordiniert ablaufenden Assemblierung der Untereinheiten erfolgt auch die autokatalytische Prozessierung der aktiven β -Untereinheiten, hierbei wird ein N-terminales Segment der jeweiligen Polypeptidkette entfernt, was zur Freilegung des N-terminalen katalytisch aktiven Threoninrestes führt.

Die Kristallstruktur des eukaryontischen Proteasoms wurde 1997 aufgeklärt (Groll et al., 1997). Es besteht analog zum archaebakteriellen *Thermoplasma*-Proteasom aus vier versetzt übereinander liegenden heptameren Ringen, deren Untereinheiten sich aber im Gegensatz zum den untereinander identischen α - und β -Untereinheiten des *Thermoplasma*-Proteasoms unterscheiden. Von den sieben β -Untereinheiten sind nur noch drei (β_1 , β_2 und β_5) proteolytisch aktiv, so dass man im Innenraum des Proteasoms insgesamt sechs aktive Zentren findet. In humanen und murinen Zellen sowie in einigen anderen Säugerspezies können nach Stimulation durch IFN- γ die proteolytisch aktiven Untereinheiten β_1 , β_2 und β_5 durch die immuno-Untereinheiten LMP-2 (β_{1i}), MECL-1(β_{2i}) und LMP-7 (β_{5i}) ersetzt werden (Groettrup et al., 1995).

Die proteolytisch aktiven Threoninreste der aktiven β -Untereinheiten werden analog zum Thermoplasma-Proteasom erst während der Assemblierung der Untereinheiten durch autokatalytische Prozessierung in einem zweistufigen Mechanismus freigesetzt. Die dabei entfernten aminoterminalen Sequenzabschnitte (Prosequenzen) unterscheiden sich zwischen den einzelnen β -Untereinheiten in Länge und Sequenz. Der erste Schritt erfolgt durch aktive Zentren benachbarter Untereinheiten, wobei innerhalb der Prosequenz geschnitten wird, der zweite Schritt erfolgt autokatalytisch und generiert den N-terminalen Threoninrest, und damit das aktive Zentrum der β -Untereinheit. (Chen and Hochstrasser, 1996) (Schmidtke et al., 1996). Durch die Analyse mit Hilfe kurzer fluorogener Peptidsubstrate wurde gezeigt, dass jede der aktiven konstitutiven β -Untereinheiten eine unterschiedliche Substratspezifität für Schnitte nach sauren, hydrophoben und basischen Aminosäuren besitzt (Tanaka et al., 1988).

2.3. Einfluss von IFN- γ auf die Zusammensetzung und Spezifität des 20S-Proteasoms

Eine der Charakteristiken des MHC-Klasse-I Prozessierungsweges ist die Induzierbarkeit mehrerer Komponenten durch das von T-Zellen sekretierte Zytokin IFN- γ . hierzu zählen neben den MHC-Klasse-I Molekülen auch beide Untereinheiten des TAP Transporters, der Proteasom-Aktivator PA28 und die IFN- γ induzierbaren β -Untereinheiten des 20S-Proteasoms, LMP-2 (β_{1i}), MECL-1(β_{2i}) und LMP-7 (β_{5i}). Diese werden auch als Immuno-Untereinheiten bezeichnet und ersetzen die proteolytisch aktiven β -Untereinheiten β_1 , β_2 und β_5 . Eine Inkorporation in das 20S Kernpartikel kann nur in *de novo* synthetisierten Proteasomen geschehen, ein nachträglicher Austausch ist nicht möglich. Hierdurch werden neue 20S komplexe gebildet, in denen die konstitutiven Untereinheiten β_1 (δ), β_2 (Z) und β_5 (MB1) durch die entsprechenden immuno-Untereinheiten ausgetauscht sind. Der Einbau der IFN- γ -induzierbaren Einheiten ist ein kooperativer Prozess, für den Einbau von β_{2i} ist β_{1i} erforderlich, während β_{1i} unabhängig von anderen Immununtereinheiten eingebaut werden kann. β_{5i} besitzt einen unterstützenden Einfluss auf die Kinetik der Bildung von Immunoproteasomen (Griffin et al., 1998).

Der Einbau von immuno-Untereinheiten führt zu einer Veränderung der Schnittspezifität des 20S-Kernpartikels (Gaczynska et al., 1993; Eleuteri et al., 1997; Cardozo and Kohanski, 1998), die generell eine Verbesserung der Antigen-Präsentation mit sich bringt. Diese Veränderung der Spezifität kann einerseits durch die unterschiedliche Primärsequenz der induzierbaren β -

Untereinheiten bedingt sein, andererseits aber auch durch strukturelle Veränderungen, die durch den Einbau der immuno-Untereinheiten hervorgerufen werden. Beispielsweise ist für die Generierung eines HBV-Epitopes die Präsenz von β_5i erforderlich, jedoch erfüllt eine inaktive β_5i (T1A) Mutante diese Aufgabe ebenfalls (Schmidtke et al., 1998) Besonders die C-Termini viraler Epitope werden bevorzugt durch Immunoproteasomen generiert, die Präsentation einiger Epitope ist sogar vollständig von Immunoproteasomen abhängig (Sijts et al., 2000a; Schwarz et al., 2000b; Sijts et al., 2000b). Andere Epitope erfahren keine Unterschiede in ihrer Präsentationseffizienz (van Hall et al., 2000), einige werden auch in Anwesenheit von Immunoproteasomen schlechter oder überhaupt nicht mehr generiert. (Morel et al., 2000). Im Vergleich zu konstitutiven Proteasomen werden Schnitte nach hydrophoben und basischen Aminosäuren durch Immunoproteasomen verstärkt durchgeführt, während die Schnittaktivität nach sauren Aminosäuren vermindert ist.

2.4. Die Rolle der α -Untereinheiten – „Gating“

Im archaebakteriellen Proteasom liegen die N-Termini der α -Untereinheiten ungeordnet vor, d.h. sie sind in der Kristallstruktur nicht detektierbar. Hierdurch ist der Zugang zu dem katalytischen Kompartiment prinzipiell geöffnet, jedoch durch die geringe Größe der entstehenden Öffnung für gefaltete Proteine nicht zugänglich. Das eukaryotische Proteasom liegt jedoch in Abwesenheit regulatorischer Proteine in geschlossener Konformation vor, wie am Beispiel der Kristallstruktur des *S. cerevisiae*-20S Proteasoms gezeigt wurde (Groll et al., 1997). Der Grund hierfür ist die geordnete Struktur der N-Termini der α -Untereinheiten, die den Zugang zum inneren Kompartiment des 20S-Proteasoms blockieren. Durch Mutationsanalysen wurde gezeigt, dass die N-terminalen zehn Aminosäuren der α_3 -Kette hierfür unbedingt notwendig sind, allein eine Mutation Asp₉ zu Ala₉ genügt, um das Proteasom in eine proteolytisch aktive Form zu bringen (Groll et al., 2000).

In vitro kann das Proteasom aus seinem latenten oder inaktiven Status durch Lipide, SDS oder Wärmebehandlung in seine aktive Konformation gebracht werden, was den Schluss zulässt, dass diese Agenzien in der Lage sind, den Zugang zum 20S-Proteasom zu öffnen. *In vivo* erfüllt diese Aufgabe entweder der IFN- γ induzierbare Proteasomaktivator PA28 oder die 19S Regulatorischen Partikel (RP), die zusammen mit dem 20S-Partikel das 26S-Proteasom bilden. Durch Röntgenstrukturanalyse konnte gezeigt werden, dass PA28 das „Gate“ zum Proteasom öffnet. Durch die Bindung von PA28 an die α -Untereinheiten kommt es zu einer

Konformationsänderung der N-Termini der α -Untereinheiten, die nun nach oben in den Hohlraum des PA28-Komplexes ragen (Whitby et al., 2000). Für die Bindung der 19S-RP konnte der hier vorliegende Mechanismus noch nicht geklärt werden, da die entsprechende Kristallstruktur noch nicht vorliegt.

2.5. Der Proteasom-Aktivator PA28

Als PA28 bezeichnet man einen heptameren Komplex aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten ($\alpha_3\beta_4$) (Knowlton et al., 1997), der in der Kristallstruktur einen ringförmigen Komplex bildet (Whitby *et al.*, 2000;Forster et al., 2003). PA28 ist ein ATP-unabhängiger Regulator des 20S-Proteasoms, der diese Funktion durch eine Öffnung des im latenten Zustand durch die N-Termini der α -Ketten verschlossenen Zugangs (Gate) zum katalytischen Kompartiment des 20S-Proteasoms erfüllt. Beide PA28 Untereinheiten werden in der MHC-Genregion kodiert und sind durch IFN- γ (Realini et al., 1994), in manchen Zellen auch TNF- α induzierbar (Ahn et al., 1996). PA28 wurde ursprünglich durch seine Fähigkeit, die Hydrolyse fluorogener Peptidsubstrate durch das 20S-Proteasom zu verstärken (Dubiel et al., 1992;Ma et al., 1993), entdeckt und kann *in vivo* die Präsentation einiger viraler Epitope positiv beeinflussen (Groettrup *et al.*, 1995;Dick et al., 1996;van Hall *et al.*, 2000). Diese Verstärkung der Präsentation ist unabhängig von der Expression von Immunoproteasomen (Schwarz et al., 2000a). Neuere Studien zeigen, dass PA28 die Affinität des Proteasoms zu manchen Substraten verstärkt, aber die maximale Geschwindigkeit der Reaktion nicht verändert und dass dieser Effekt wahrscheinlich auf einer Verstärkung entweder der Aufnahme der Substratmoleküle oder der Abgabe der Produkte beruht (Stohwasser et al., 2000). Nach Stimulation mit IFN- γ sind auch heteromere PA28-20S-19S Partikel detektierbar (Tanahashi et al., 2000), in dieser Situation ist der 19S-RP limitierend für den Zugang der Substrate zu den aktiven Zentren im inneren des 20S-Proteasoms. Dies weist darauf hin, dass PA28 wahrscheinlich den Austritt der Produkte aus dem Kernpartikel erleichtert. In einigen Fällen wurde gezeigt, dass PA28 *in vitro* Degradationsexperimenten in synthetischen Peptiden koordinierte Doppelschnitte induziert, dieser Effekt konnte allerdings nicht bei allen eingesetzten Substraten beobachtet werden. (Dick *et al.*, 1996). PA28 verändert die Frequenz bestimmter Schnitte, die auch in Abwesenheit von PA28 beobachtet werden können, was zu einer quantitativen Veränderung des Peptidspektrums führt und in manchen Fällen die Generierung einiger MHC-Klasse-I restringierter CTL-Epitope fördert (Niedermann et al.,

1997). Mit Hilfe der „PA28-Knock-Out“ Maus konnte gezeigt werden, dass einige CTL-Epitope (Ovalbumin 257-264, Influenza A34 Nukleoprotein 336-372, male minor H antigen HY) in Abwesenheit von PA28 $\alpha\beta$ überhaupt nicht mehr generiert werden können, die Präsentation anderer Epitope (LCMV, MCMV) im Vergleich zur Wildtypmaus stark reduziert ist (Preckel et al., 1999).

2.6. Das 26S-Proteasom

Das 26S-Proteasom besteht aus einem 20S-Kernpartikel, das mit einer oder zwei 19S regulatorischen Partikeln (RP) assoziiert ist, die ATP-abhängig an die α -Ringe des 20S Partikels binden. Das RP wird alternativ auch als PA700 (Proteasom-Aktivator 700 kDa), 19S Cap, oder μ -Partikel (*Drosophila melanogaster*) bezeichnet. Es besteht aus 17 konstitutiven Proteinuntereinheiten, deren Anwesenheit in mehreren Organismen nachgewiesen werden konnte (Glickman et al., 1998b). Neben diesen 17 Untereinheiten sind in manchen Präparationen auch noch andere Proteine in Assoziation mit dem 19S-Komplex nachgewiesen worden, die entweder spezie- oder gewebespezifisch sind (Deveraux et al., 1995; Fujimuro et al., 1998). Das 19S RP aus *Saccharomyces cerevisiae* kann *in vitro* in zwei Subkomplexe dissoziiert werden, die als „base“ und „lid“ bezeichnet werden und sich strukturell als auch funktional unterscheiden. Die „base“ besteht aus sechs ATPasen, die allesamt zur AAA(ATPases associated-with-different-cellular-activities)-Familie gehören, und drei nicht-ATPasen. Die „base“ interagiert mit den α -Untereinheiten des 20S-Kernpartikels, wodurch der Zugang zum katalytischen Kompartiment geöffnet wird. Des Weiteren besitzt sie *in vitro* Chaperon-Aktivität, was mit der Hypothese übereinstimmt, dass sie *in vivo* als reverses Chaperon funktioniert, welches zu degradierende Proteine entfaltet, bevor diese in das 20S-Kernpartikel transloziert und dort proteolytisch gespalten werden. Diese Hypothese wurde durch die Ähnlichkeit der „base“ mit dem aus Archaeobakterien isolierten Chaperon GroEL begründet (Fenton and Horwich, 1997). Nullmutanten aller sechs ATPasen der „base“ sind in der Hefe letal und führen jeweils zu unterschiedlichen Phänotypen (Rubin et al., 1998).

Der zweite, distale Subkomplex des RP wird als „lid“ bezeichnet und ist unter anderem über die Untereinheit Rpn10 mit der „base“ verbunden. Diese Untereinheit, die auch als S5a bezeichnet wird, gehört zu den am besten untersuchten des 19S Komplexes und ist die einzige bekannte Untereinheit, die in der Lage ist, an polyubiquitinylierte Substrate zu binden (Deveraux et al., 1994). Das „lid“ besteht aus acht Nicht-ATPasen und ist mit der „base“ außer über Rpn10 noch durch weitere Interaktionen verbunden. Da noch nicht gezeigt werden

konnte, das aufgereinigte „base“-Komplexe in der Lage sind, polyubiquitinylierte Substrate abzubauen (Glickman et al., 1998a; Braun et al., 1999), nimmt man an, dass das „lid“ für diese Funktion notwendig ist.

In der Bäckerhefe sind die ca. 15.000- 30.000 Proteasomen (entsprechend einer Konzentration von 13 - 26 μM innerhalb der Zelle) (Russell et al., 1999) hauptsächlich mit der Kernmembran und kernnahem ER assoziiert, wie durch GFP-Markierung von Untereinheiten sowohl des RP als auch des Kernpartikel gezeigt werden konnte (Enenkel et al., 1999). In murinen Hepatozyten wurden Proteasomen nicht nur in Zytoplasma und Zellkern, sondern auch in der Mikrosomenfraktion nachgewiesen (Brooks et al., 2000). In Säugerzellen sind ca. 70% der Proteasomen im Zytoplasma lokalisiert, der Kern enthält ca. 16% und ca. 14% sind mit der ER-Membran assoziiert (Rivett, 1998). In Maus-Lymphomzellen assoziieren neu synthetisierte RP sofort mit 20S- Kernpartikeln, das 26S-Proteasom hat insgesamt einen Anteil von ca. 25% an der Gesamtproteasomenpopulation (Yang et al., 1995). Durch Studien mit dem proteasom-spezifischen Inhibitor Lactacystin konnte eine Vielzahl von Proteinen als Substrate des Proteasoms identifiziert werden, unter anderem bekannte Proto-Onkogene und Onkogene wie c-jun, c-fos und β -Catenin (Jariel-Encontre et al., 1997; Aberle et al., 1997), eine Anzahl von regulatorischen Proteinen des Zellzyklus (King et al., 1996), virale Proteine (Hu et al., 1999; Ott et al., 1999; Schubert et al., 2000), Strukturproteine (Bercovich et al., 1997), Enzyme, die für Haushaltsfunktionen der Zelle notwendig sind (Murakami et al., 1992) (Johnson et al., 1998) sowie auch eine Reihe nichtphysiologischer Proteine wie β -Casein, Lysozym, Ovalbumin, α -Lactalbumin und β -Galactosidase (Kisselev *et al.*, 1999; Emmerich et al., 2000). Durch Studien mit rekombinanter Ornithindecaboxylase, die ein MHC-Klasse-I-Epitop integriert hat (SIINFEKL aus Ovalbumin) konnte gezeigt werden, dass das 26S-Proteasom in der Lage ist, Epitope aus einem intakten Protein heraus zu prozessieren und dem MHC-Klasse-I Präsentationsweg zuzuführen (Ben Shahr et al., 1997; Ben Shahr et al., 1999).

2.7. Die Rolle von Tripeptidylpeptidase-II

Im Normalfall ist das Proteasom für den größten Teil der zytosolischen Proteindegradation verantwortlich. Werden Zellen jedoch in Gegenwart von subletalen Konzentration der Proteasominhibitoren NLVS (Glas et al., 1998; Wang et al., 2000) oder Lactacystin (Geier et al., 1999) kultiviert, so sind ein Teil der Zellen in der Lage, sich an diese unter diesen Bedingungen fast vollständige Inhibition der proteasomalen Degradation zu adaptieren. Adaptierte Zellen sind weiterhin in der Lage, ubiquitinylierte Proteine abzubauen und ein

MHC-Klasse-I präsentierte Epitop (FAPGNYPAL, Sendai-Virus Nukleoprotein) zu prozessieren, für ein Überleben ist allerdings eine residuale Proteasomaktivität erforderlich (Princiotta et al., 2001). Die Adaption ist mit einer Hochregulation der Tripeptidylpeptidase-II (TPPII) assoziierten, durch AAF-CMK und Butabindid inhibierbaren peptidhydrolytischen Aktivität verbunden. TPPII ist eine ATP-abhängige, subtilisinartige zytosolische Protease, deren 138 kDa schwere Monomere zu Komplexen von mehreren hundert kDa bis zu zwei MDa assoziieren (Tomkinson et al., 1987; Geier *et al.*, 1999). TPPII funktioniert primär als Exopeptidase, die Tripeptide vom N-Terminus ihrer Substrate entfernt. Aufgrund dieser Aminopeptidaseaktivität könnte sie eine Rolle als Trimmpeptidase für N-terminal verlängerte Epitopprecursoren spielen (Levy et al., 2002). Neben dieser Exopeptidaseaktivität besitzt TPPII auch die Fähigkeit, endoproteolytische Schnitte zu katalysieren, bevorzugt nach Lysinresten (Geier et al., 1999). Diese endoproteolytische Aktivität ist auch in der Lage, C-Termini von CTL-Epitopen zu generieren, wie am Beispiel des HLA-A3 und HLA-A11 restringierten Epitops (HIV Nef73-82) gezeigt wurden (Seifert et al., 2003). Die Präsentation dieses Epitops kann durch eine Inhibierung des Proteasoms nicht verhindert werden (Choppin et al., 2001), auch *in vitro* ist eine proteasomale Generierung des korrekten C-Terminus nicht möglich (Seifert et al., 2003). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass aufgereinigte TPPII *in vitro* sowohl den N- als auch den C-Terminus dieses Epitops generieren kann und dass sowohl durch den TPPII spezifischen Inhibitor AAF-CMK als auch durch TPPII-siRNA die Präsentation dieses Epitops spezifisch gehemmt wird (Seifert *et al.*, 2003).

2.8. Zytosolische Aminopeptidasen

Die Länge proteasomal generierter Peptide bewegt sich in einem Bereich von drei bis 25 Aminosäuren, wobei ca. 60% der generierten Fragmente zu klein für eine Bindung an MHC Klasse-I Moleküle sind, nur ca. 15% besitzen die korrekte Länge und die restlichen 25% sind zu groß für eine direkte Präsentation auf MHC Klasse-I Molekülen (Cascio et al., 2001). Dies impliziert, dass die meisten längeren Peptide weiter getrimmt werden müssen, bevor sie an MHC-Klasse-I Moleküle binden können. Da bisher keine zytosolische oder ER-residente Carboxypeptidase-Aktivität nachgewiesen werden konnte (Reits et al., 2003), können nur N-terminal verlängerte Peptide durch Aminopeptidasen zu MHC Klasse-I-Liganden getrimmt werden. Bisher wurden mehrere Peptidasen beschrieben, die diese Aufgabe erfüllen können (Stoltze et al., 2000; Seifert et al., 2003; York et al., 2003; Reits et al., 2003). Die hexamere, aus 56 kDa schweren Untereinheiten bestehende, IFN- γ -induzierbare Leucin-Aminopeptidase

entfernt bevorzugt die Aminosäuren Phe, Tyr, Leu, Ile, Ala, Pro jedoch keine geladenen Aminosäuren (Lys, Arg, Asp, Glu) (Turzynski and Mentlein, 1990; Beninga et al., 1998). Thimet Oligopeptidase ist eine 79 kDa schwere Metalloproteinase, die Peptide mit einer Länge von 6 -17 Aminosäuren Länge als Substrate akzeptiert und auch in der Lage ist, antigene Peptide abzubauen (Saric et al., 2001). Bleomycin-Hydrolase (ein Homohexamer aus 52kDa schweren Untereinheiten) und Puromycin-sensitive-Amino-peptidase (100 kDa) sind zwei weitere zytosolische Amino-peptidasen, für die eine Beteiligung am Trimming N-terminal verlängerter Epitop-Prekursoren nachgewiesen werden konnte (Stoltze *et al.*, 2000).

2.9. Der TAP-Transporter

Der heterodimere TAP-Komplex gehört zur Superfamilie der ABC (ATP binding cassette) Transporter und besteht aus den beiden Untereinheiten TAP1 und TAP2, die beide in der MHC-Genregion kodiert werden und deren Expression durch IFN- γ verstärkt wird. Weitere Mitglieder dieser Superfamilie von Transporterproteinen, die man sowohl in Eukaryonten als auch Prokaryonten findet, sind unter anderem das Multidrug-resistance-P-Glykoprotein (MDR), der Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) und der Oligopeptidtransporter von *Salmonella typhimurium*. Die Rolle von TAP als Peptidtransporter wurde durch Transfektion von TAP-defizienten Zelllinien, in denen hierdurch die MHC-Klasse-I Oberflächenexpression wiederhergestellt wurde, durch *in vitro* Transportassays mit semipermeabilisierten Zellen und durch heterologe Expression von TAP in Insekten- und Hefezellen nachgewiesen (Uebel and Tampe, 1999). TAP-abhängiger Transport konnte außerdem durch Trapping translozierter Peptide, die eine Erkennungstelle für N-Glykosylierung beinhalten, auf der luminalen Seite der ER-Membran gezeigt werden (Neefjes et al., 1993; Androlewicz et al., 1993). Mit Hilfe dieses Assays konnte auch erstmalig durch Vergleich der Mengen an glykosylierten Peptiden die Substratspezifität von TAP analysiert werden (Schumacher et al., 1994; Heemels and Ploegh, 1994; Neefjes et al., 1995). Eine weitere Methode zur Analyse der Spezifität von TAP ist die direkte Messung der Bindungsaffinität zwischen Peptiden und TAP, was Einflüsse durch die Kinetik der Glykosylierung und durch retrograde Transporter verhindert (van Endert et al., 1994; Uebel et al., 1995; van Endert et al., 1995; Uebel et al., 1997). TAP ist in der Lage, Peptide mit einer Länge von 8 - 16 AA zu transportieren, wobei Peptide zwischen 9 und 12 AA bevorzugt werden. Die Selektivität von TAP wird neben dem C-Terminus des zu transportierenden Peptides besonders von den drei N-terminalen Aminosäuren beeinflusst, wobei P2 die

wichtigste Rolle spielt (Uebel *et al.*, 1999). Interessanterweise sind dies auch die Positionen, die für die Bindung an MHC-Klasse-I Moleküle meist als Ankerpositionen dienen. Für den C-Terminus stimmen die Präferenzen von humanem TAP-Transporter und MHC-Klasse-I Molekülen gut überein. Phe, Leu, Arg, Tyr und Val, die von humanem TAP an dieser Position bevorzugt werden, machen ca. 80% der Aminosäurereste aus, die am C-Terminus von MHC Klasse-I Liganden gefunden werden (Rammensee *et al.*, 1995).

Den stärksten negativen Einfluss auf den Transport durch TAP besitzt die Aminosäure Pro an Position P2, das einen Transport von entsprechenden Peptiden durch humanes TAP fast vollständig verhindert. Im Falle von MHC Klasse-I Allelen wie HLA-B*07 oder HLA-B*35, die als Ankeraminosäure an Position P2 Pro bevorzugen, müssen also die bindenden Peptide entweder durch andere Prozesse in das ER gelangen, oder durch TAP als N-terminal verlängerte Prekursoren transportiert und dann im ER durch Aminopeptidasen auf die endgültige Länge getrimmt werden (Peters *et al.*, 2003a).

2.10. Aminopeptidasen im Endoplasmatischen Retikulum

Im Endoplasmatischen Retikulum können Peptide, die von TAP transportiert wurden, jedoch aufgrund N-terminaler Extensionen zu lang für eine Bindung an MHC-Moleküle sind, durch Aminopeptidasen bis zu den entsprechenden MHC-Liganden abgebaut werden. Dies wurde unter anderem gezeigt durch Transfektion von Zellen mit Minigenen, die N-terminal verlängerten Versionen antigener Peptide kodieren, die an eine ER-Signalsequenz gekoppelt sind. Diese Epitope werden nach Entfernung der Signalsequenz durch spezielle Signalpeptidase und anschließender Entfernung der N-terminalen Extensionen durch Aminopeptidasen auf der Zelloberfläche auf MHC-Klasse-I Molekülen präsentiert (Snyder *et al.*, 1994; Elliott *et al.*, 1995; Lobigs *et al.*, 2000). Die für dieses Trimming hauptsächlich verantwortliche Protease ERAP1 (ER Aminopeptidase I) / ERAAP (ER Aminopeptidase Associated with Antigen Processing) wurde erst kürzlich identifiziert (Serwold *et al.*, 2002; Saric *et al.*, 2002). Es handelt sich hierbei um eine 106 kDa schwere Zink-Metalloproteinase, die vorher bereits unter den Namen Adipocyte-derived Leucine Aminopeptidase und Puromycin-insensitive Aminopeptidase bekannt war. ERAP1/ERAAP ist im ER lokalisiert und kann wie viele andere Komponenten des MHC-Klasse-I Prozessierungsweges durch IFN- γ induziert werden. ERAP1/ERAAP ist notwendig, um N-terminal verlängerte Prekursorpeptide zu trimmen, jedoch erfolgt dieses Trimming bis hinunter zu einer Länge von acht bis neun Aminosäuren. ERAP1/ERRAP ist also in vielen

Fällen auch in der Lage, Peptide bis zu einer Länge abzubauen, die eine Bindung an MHC-Klasse I Moleküle nicht mehr erlaubt und damit einen negativen Einfluss auf die Präsentation dieser Epitope auszuüben. In IFN- γ stimulierten Zellen, in denen verstärkt Immunoproteasomen exprimiert werden, die in der Lage sind, aus Ovalbumin eine größere Zahl N-terminal verlängerter Prekursorpeptide zu generieren (Cascio *et al.*, 2001), wird die Antigenpräsentation durch ERAP1/ERAAP verstärkt, wie durch Experimente mit siRNA gezeigt werden konnte (York *et al.*, 2002).

3. Vorhersage von CTL-Epitopen

Die Entwicklung neuer Impfstoffe und Methoden zum Monitoring von CTL Antworten ist stark von der Identifizierung von CTL Epitopen aus immunologisch relevanten Antigenen abhängig. Die Generierung von CTL Epitopen hängt von der Spezifität mehrerer intrazellulärer Prozesse ab, nämlich der Generierung von Peptidfragmenten durch das Proteasom, dem Transport von Peptiden durch TAP in das ER und letztendlich der Bindung der Peptide an MHC Klasse-I Moleküle (Yewdell and Bennink, 2001; Rock *et al.*, 2002). Wenn diese Prozesse Regeln unterliegen, die durch Computeralgorithmen extrahierbar und simulierbar sind, sollte es möglich sein, mit hoher Effizienz aus jedem möglichen Protein die entsprechenden CTL-Epitope vorherzusagen. Diese Genauigkeit solcher Vorhersagen hängt in erheblichem Maße davon ab, ob die Regeln aller Prozesse, die an der Antigenpräsentation beteiligt sind, mit hinreichend hoher Genauigkeit bekannt sind, was bis dato noch nicht der Fall ist. Allerdings sind für die wichtigsten selektiven Schritte der Antigenpräsentation, nämlich proteasomale Prozessierung, TAP-Transport und die Bindung an MHC-Klasse-I Moleküle, bereits grundlegende Regeln bekannt, die prinzipiell auch mit Hilfe unterschiedlicher computerbasierter Algorithmen modelliert werden können. Der Einfluss nichtproteasomaler Proteasen auf die Generierung von CTL-Epitopen ist bisher noch nicht ausreichend untersucht, daher ist eine computerbasierte Modellierung dieser Prozesse noch nicht möglich.

3.1. Vorhersage proteasomaler Schnitte

Im Gegensatz zu vielen anderen Proteasen, die eine sehr definierte Schnittspezifität besitzen, zum Teil nur nach einer bestimmten Aminosäure schneiden, oder sogar ein mehrere

Aminosäuren umfassendes invariantes Schnittmotiv besitzen, ist das Proteasom in der Lage, eine Vielzahl unterschiedlicher Aminosäuremuster in unmittelbarer Umgebung eines Schnittes zu akzeptieren. Zudem schneiden Proteasomen innerhalb einer festgelegten Sequenz nicht in jedem Molekül an den gleichen Stellen, was durch die Generierung überlappender Fragmente in *in vitro* Verdauexperimenten gezeigt werden konnte (Nussbaum et al., 1998). Des Weiteren besitzt das Proteasom drei unterschiedliche aktive Zentren, die in unterschiedlichen β -Untereinheiten lokalisiert sind und jeweils andere Aminosäuren in unmittelbarer Umgebung des Schnittes bevorzugen. Während im Falle der Untersuchung von Hefeproteasomen durch genetische Manipulation Proteasomen mit jeweils nur einem aktiven Zentrum aufgereinigt und auf diese Weise die einzelnen Spezifitäten separat analysiert werden konnten (Nussbaum et al., 1998), ist dies im Falle von humanen Proteasomen nicht möglich. Die aus *in vitro* Degradationsexperimenten erhaltenen Fragmente sind daher Ergebnis des Zusammenspiels unterschiedlicher Spezifitäten, was die mathematische Modellierung durch computerbasierte Algorithmen erschwert. Durch den Verdau synthetischer Peptide und intakter Proteine konnten bereits erste Präferenzen an Positionen N-terminal (bezeichnet als P1, P2... beginnend bei der Schnittstelle) und C-terminal (bezeichnet als P1', P2'..) definiert werden (Niedermann et al., 1997;Emmerich et al., 2000;Toes et al., 2001). Der bei weitem größte Datenpool konnte durch den *in vitro* Verdau von unmodifizierter Enolase und die biochemische Analyse aller Verdauprodukte über Edmansequenzierung und Massenspektrometrie generiert werden (Toes et al., 2001). Auf Basis dieser Daten wurden bereits drei unterschiedliche Vorhersagealgorithmen implementiert (siehe Tabelle 1).

Das erste Vorhersagemodell wurde von der Gruppe um HG Holzhütter publiziert. Es basiert auf proteasomalen Schnittdaten, die aus dem Verdau von sieben Peptidsequenzen generiert wurden. Zur Vorhersage werden sogenannte „cleavage determining amino acid motifs“ durch das Programm bestimmt und zur Vorhersage verwendet. Eine spätere Version, Fragpredict, basiert auf kinetischen Parametern und verwendet ein Sequenzfenster von 14 Aminosäuren um die Schnittstelle für die Vorhersage (Holzhutter et al., 1999;Holzhutter and Kloetzel, 2000).

Kuttler et al. veröffentlichten im Jahr 2000 ein unterschiedliches Proteasomenmodell (Kuttler et al., 2000) Schnittdaten basiert, die aus dem *in vitro* Verdau des 436 AA großen Proteins Enolase durch 20S Proteasomen generiert wurden. Dieses Modell wurde im WWW auf einer inzwischen häufig frequentierten Website öffentlich zugänglich gemacht (Nussbaum et al., 2001).

Tabelle 1: Vorhersagealgorithmen für proteasomale Schnitte			
Programm	FragPredict	PAProC	NetChop
Referenzen	(Holzhutter <i>et al.</i> , 1999; Holzhutter <i>et al.</i> , 2000)	(Kuttler <i>et al.</i> , 2000; Nussbaum <i>et al.</i> , 2001)	(Kesmir <i>et al.</i> , 2002)
URL	http://www.mpiib-berlin.mpg.de/MAPPP/	http://www.paproc.de	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/
Experimentelle Daten auf denen das Modell basiert	> 100 <i>in vitro</i> Schnitte von 20S Proteasomen verschiedener Säuger in 7 unterschiedlichen Peptidsequenzen	100-150 Schnitte von <i>in vitro</i> Verdaus eines vollständigen Modellproteins durch aufgereinigte humane und Hefe-20S Proteasomen	Verschiedene Datensätze: MHC- Klasse-I Liganden und <i>in vitro</i> 20S-Proteasom-Schnitte
Schnittvorhersage basierend auf:	Zwei Eigenschaften der Aminosäureseitenketten : Volumen und Transferenergie in einem Fenster von P8-P6´	Aminosäuresequenz im Fenster P6-P4´	Aminosäuresequenz in einem symmetrischen Fenster von bis zu 29 Aminosäuren
Besondere Features	Verlinkung zu zwei bekannten MHC-Vorhersage-Algorithmen (SYFPEITHI und BIMAS) Vorhersage von Fragmenten	I20S und c20S Vorhersage nach Registrierung möglich, Hintergrundinformationen über Proteasomen	Komplette Genomanalyse möglich, Quantitative Vorhersageergebnisse
Mathematisches Modell	“Empirische Regressionsfunktionen” “Mathematische Entscheidungsfunktion”	Evolutionärer Algorithmus (Einfaches einschichtiges neuronales Netz)	Neuronales Netz mit einer verborgenen Schicht

Das auf einem neuronalen Netz basierende Programm NetChop (Kesmir *et al.*, 2002) wurde 2002 publiziert und verwendet als Trainingsdaten neben den Enolase-Verdaudaten auch Sequenzen, die MHC-Liganden flankieren. Dieser Ansatz wurde erstmals von Altuvia und Margalit vorgeschlagen, die aus 286 MHC-Klasse-I Liganden Sequenzsignale extrahierten (Altuvia and Margalit, 2000). Die identifizierten Sequenzsignale der C-Termini von MHC-Liganden zeigen eine gute Übereinstimmung mit proteasomalen Schnittmotiven (Nussbaum *et al.*, 1998; Toes *et al.*, 2001), was die Hypothese unterstützt, dass zwar alle C-Termini, aber nicht die N-Termini von MHC-Liganden durch das Proteasom generiert werden.

3.2. Vorhersage des Transportes durch TAP

Die experimentelle Grundlage für eine Vorhersage der Transporteffizienz einzelner Peptide durch TAP bilden Daten, die *in vitro* über die Messung der Bindungsaffinität von kombinatorischen Peptidbibliotheken zu TAP gewonnen wurden (Uebel *et al.*, 1997; Gubler *et al.*, 1998). Aus diesen basiert die erste Generation von TAP-Vorhersage-Algorithmen (Daniel *et al.*, 1998; Brusic *et al.*, 1999), die jedoch nur in der Lage sind, Vorhersagen für 9mere zu generieren. Die Fähigkeit dieser Programme, Epitope von Nicht-Epitopen zu unterscheiden schwankt jedoch stark in Abhängigkeit der untersuchten HLA-Allele. Daher nimmt man an, dass manche Allele entweder in unterschiedlich starkem Maß von Peptiden beladen werden, die durch TAP-unabhängigen Transport in das ER gelangen (Brusic *et al.*, 1999), oder aber dass die Epitope durch TAP als N-terminal verlängerte Prekursoren (Lauvau *et al.*, 1999) in das ER transportiert werden. Die Abhängigkeit der Präsentation mehrerer Epitope vom TAP-abhängigen Transport N-terminal verlängerter Prekursorpeptide konnte inzwischen nachgewiesen werden (Lauvau *et al.*, 1999; Paz *et al.*, 1999; Goldberg *et al.*, 2002). Ein neuer Ansatz wurde von Peters *et al.* im Jahr 2003 veröffentlicht, für die Vorhersage wurde aus *in vitro* Bindungsdaten und mit Hilfe der „stabilized matrix method“ (SMM) (Peters *et al.*, 2003b) eine Konsensus-Vorhersagematrix etabliert (Peters *et al.*, 2003a). Der Unterschied dieser Methode zu den zuvor veröffentlichten ist die Miteinbeziehung der Transporteffizienz von N-terminal verlängerten Prekursorpeptiden in die endgültige Vorhersage. Dieser Algorithmus verwendet für die Vorhersage jeweils den C-Terminus des Peptides sowie die drei N-terminalen Aminosäurereste, der Einfluss der mittleren Aminosäurereste wird vernachlässigt. Die bei diesem Ansatz erhaltene Vorhersagequalität erreicht ihr Maximum bei Einbeziehung nur der um eine Aminosäure verlängerten Prekursoren und einer relativen Gewichtung von 0,2 des Einflusses der N-terminalen Resten zu dem des C-Terminus. Zur Evaluierung der Vorhersagequalität wurden ROC (Receiver-Operator-Characteristics)-Kurven verwendet (Bradley, 1997), die aus der Vorhersage eines aus SYFPEITHI extrahierten Datensatzes generiert wurden.

3.3. MHC-Bindungsvorhersage

Die Regeln, die die Bindung von Peptiden an MHC Klasse-I Moleküle bestimmen, sind im Vergleich zu der Spezifität von TAP und Proteasom wesentlich stringenter und auch besser untersucht. Momentan existiert eine größere Zahl von Algorithmen, die der Bindungsvorhersage von Peptiden dienen (siehe Tabelle 2). Diese Algorithmen basieren sowohl auf unterschiedlichen Rohdaten, einerseits der Struktur- und Sequenzinformation aus den MHC-Molekülen, zum anderen aus den Sequenzinformationen der jeweils bindenden Peptide, als auch auf unterschiedlichen Methoden der Algorithmusgenerierung, nämlich Bindungsmotiven, Bindungsmatrizen und neuronalen Netzen.

Strukturbasierte Algorithmen verwenden die aus kristallographischen Analysen gewonnenen konformationellen Parameter der Peptide und MHC-Moleküle um Sequenzabschnitte einer gegebenen Proteinsequenz vorherzusagen, die in der Lage sind, an das entsprechende MHC Klasse-I Molekül zu binden. Motivbasierte Algorithmen verwenden für die Bindungsvorhersage nur bestimmte Positionen der Peptidsequenz, was im Vergleich zu Matrixbasierten Algorithmen eine verringerte Vorhersagequalität liefert, da in den Bindungsmotiven nicht alle zur Bindung relevanten Sequenzinformationen enthalten sind, andererseits einige Epitope nicht exakt das passende Motiv besitzen. Durch die Verwendung kompletter Bindungsmatrizen, die für jede Aminosäure an jeder Position des MHC-Liganden einen Parameter in die Vorhersage miteinbeziehen können diese den motivbasierten Algorithmen inhärenten Nachteile überwunden werden. Ein interessantes Beispiel für matrixbasierte Algorithmen ist die Datenbank SYFPEITHI (Rammensee et al., 1999), die eine matrixbasierte Vorhersage für über 200 HLA-Allele zur Verfügung stellt. Im Gegensatz zu anderen matrixbasierten Algorithmen wurden für die Generierung der Bindungsmatrizen nur natürlich vorkommende MHC-Liganden, die direkt durch analytische Verfahren nachgewiesen werden konnten, verwendet.

Vorhersagealgorithmen, die auf neuronalen Netzen beruhen, benötigen für das Training dieser Netze eine große Menge an Trainingsdaten, welche aber zurzeit nur für eine kleine Anzahl von HLA-Allelen zur Verfügung steht. Dadurch ist die Anwendung dieser Methode zurzeit limitiert.

Tabelle 2: Vergleich unterschiedlicher Algorithmen zur MHC-Bindungsvorhersage

Programm	URL	Basiert auf	Service verfügbar
SYFPEITHI	http://www.syfpeithi.de	Matrix	>200 MHC-I-Allele verschiedener Spezies >60 humane MHC-II Allele
BIMAS	http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/hla_bind/	Matrix	>40 MHC-I Allele verschiedener Spezies
PREDEP	http://bioinfo.md.huji.ac.il/marg/Teppred/mhc-bind/	Struktur	9 HLA- und 4 H2-Allele
EPIPREDICT	http://www.epipredict.de	Matrix	6 HLA-DR/DQ –Allele + humanes TAP
TEPITOPE	http://www.vaccinome.com	Matrix	25 HLA-DR-Allele
ProPred	http://www.imtech.res.in/raghava/propred/index.html	Matrix	51 HLA-DR-Allele
Predict	http://sdmc.lit.org.sg:8080/predict-demo/	ANN	Demo-Server 2 HLA-Allele
EPIMATRIX	http://www.brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html	Matrix	

3.4. ROC-Kurven als Werkzeug zur Evaluierung der Vorhersagequalität

Eine sehr genaue Methode zur Evaluation von der Genauigkeit von Vorhersageergebnissen sind ROC (Receiver-Operator-Characteristics)- Kurven (Bradley, 1997). Diese werden generiert, in dem man für jeden möglichen durch den Algorithmus gelieferten Vorhersagewert die zwei Variablen Sensitivity (entsprechend dem Verhältnis der „true positives“ zu „all positives“) und 1-Specificity (entsprechend dem Verhältnis „false positives“ zu „all negatives“) bestimmt. Man variiert nun den Cutoff-Wert für die Unterscheidung von positiven und negativen Vorhersagen vom niedrigsten zum höchsten Vorhersageergebnis. Für jeden Cutoff-Wert werden die beiden Parameter Sensitivität und Spezifität bestimmt und die dadurch definierten Punkte in ein Diagramm eingetragen, dadurch erhält man sogenannte ROC-Kurven. Die Vorhersagequalität wird durch die Fläche unterhalb dieser Kurve als AUC-Wert (Area under the ROC-Curve) bestimmt, wobei sich der Wert der AUC normalerweise zwischen 0,5 für eine rein zufallsbedingte Vorhersage bis zu 1,0 für eine perfekte Vorhersage bewegt.

4. Das Prion-Protein als Substrat für das 20S Proteasom

Vor kurzem wurde beschrieben, dass auch Prion-Protein (PrP) *in vivo* durch das Proteasom abgebaut wird (Yedidia et al., 2001). PrP ist ein 27 kDa schweres zelluläres Glykoprotein, das über einen GPI-Anker in der Zellmembran verankert ist und eine Schlüsselrolle bei übertragbaren spongiformen Enzephalopathien (TSE) spielt (Prusiner et al., 1998; Weissmann, 1999). Die genaue zelluläre Funktion von PrP ist bis jetzt noch nicht geklärt, PrP könnte aber eine Funktion im Kupfertransport oder Aufgaben in der Signaltransduktion besitzen (Brown et al., 1997; Mouillet-Richard et al., 2000; Kretzschmar et al., 2000). Bisher wurden zwei unterschiedliche Formen von PrP beschrieben, die sich in ihrer Sekundärstruktur voneinander unterscheiden. Die normale Form PrP^c innerhalb einer Zelle ist reich an α -Helices und kann leicht durch verschiedene Proteasen abgebaut werden, während die krankheitsassoziierte Form PrP^{sc}, dessen Sekundärstruktur hauptsächlich aus β -Faltblattstrukturen (Caughey et al., 1991) besteht und eine höhere Resistenz gegenüber Proteasen besitzt als PrP^c (Caughey et al., 1990; Parchi et al., 2000). Der C-Terminus beinhaltet den Großteil der strukturellen Domänen von PrP^c, während der N-Terminus keine hoch geordnete Konformation besitzt, wie durch NMR-Spektroskopie nachgewiesen wurde (Hornemann et al., 1997). In Schafen kommen mehrere unterschiedliche Allele von PrP natürlich vor, deren Expression stark mit der Suszeptibilität gegenüber Scrapie-Infektion (Scrapie ist die in Schafen vorkommende Form von TSE) korreliert ist. Dies reicht von einer sehr hohen Empfindlichkeit gegenüber Scrapie-Infektionen für die V₁₃₆-R₁₅₄-Q₁₇₁ Variante (VRQ) bis hin zur Resistenz gegenüber Scrapie-Infektionen für die A₁₃₆-R₁₅₄-R₁₇₁ Variante (ARR) (Goldmann et al., 1990; Belt et al., 1995; Cloucard et al., 1995). Diese Unterschiede können zum Teil durch die beschriebenen unterschiedlichen Entfaltungswege und -energien der beiden PrP-Varianten erklärt werden (Rezaei et al., 2002).

PrP^c wird im sekretorischen Weg prozessiert und befindet sich zum Großteil auf der Zelloberfläche. Der normale Abbau von PrP beinhaltet ein N-terminales Trimming und den letztendlichen Abbau in sauren Kompartimenten der Zelle (Taraboulos et al., 1992). Ca. 10% der neu synthetisierten PrP-Moleküle, die nicht korrekt falten, werden jedoch durch ERAD in das Zytosol überführt und dort durch das Proteasom abgebaut (Yedidia et al., 2001). Hemmt man die proteasomale Aktivität innerhalb einer Zelle durch den Inhibitor Lactacystin, akkumuliert PrP^c im Zytosol (Ma and Lindquist, 2001), welches eine reduzierende Umgebung bietet, die eine Konversion von PrP^c zu einer proteaseresistenten Form favorisiert (Ma and Lindquist, 1999; Ma and Lindquist, 2002a; Ma et al., 2002b).

5. Zielsetzung

In dieser Arbeit sollten die bereits in Grundzügen beschriebenen Schnittmotive des 20S-Proteasoms durch die Identifikation weiterer *in vitro* abbaubarer Substrate für das 20S-Proteasom und der anschließenden quantitativen und qualitativen Analyse der generierten Verdauprodukte verfeinert und auf der Grundlage der daraus gewonnenen Schnittdaten neue Vorhersagealgorithmen zur proteasomalen Schnittvorhersage entwickelt werden.

Folgende Ziele sollten in dieser Arbeit im einzelnen bearbeitet werden

- Etablierung der Aufreinigung von konstitutiven und immuno-20S-Proteasomen aus humanen EBV-transformierten Zelllinien
- Etablierung eines Protokolls, das *in vitro* den Verdau unterschiedlicher Proteine durch 20S-Proteasomen ermöglicht
- Exakte qualitative und quantitative Analyse der proteasomal generierten Degradationprodukte von Peptiden und Proteinen durch Massenspektrometrie und Edman-Sequenzierung
- *In silico* Modellierung des proteasomalen Schnittverhaltens und Etablierung eines Algorithmus zur Vorhersage von Schnitten durch konstitutive und immuno-Proteasomen

Des Weiteren sollte ein System entwickelt werden, mit dem der Einfluß flankierender Sequenzen auf die Präsentation eines Modell-Epitopes in lebenden Zellen untersucht werden kann. Hierzu sollte ein in Grundzügen von N. Emmerich beschriebenes System weiter verfeinert und die zur Analyse notwendigen molekularbiologischen und zellbiologischen Methoden etabliert werden.

II. Material und Methoden

1. Biologische und chemische Materialien

1.1. Bakterien

Für molekularbiologische Zwecke (Aufreinigung von Plasmid-DNA) wurden die *E. coli*-Stämme TOP-10 und XL-1 blue MRF⁺ benutzt; zur bakteriellen Expression von Proteinen der Stamm BL21(DE3)

Genotypen:

XL1-Blue MRF⁺: D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1
gyrA96 relA1 lac [F⁺proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]

TOP-10 F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1
araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

BL21(DE3) F⁻ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm

1.2 Chromatographieharze

DEAE-52 Servacel, Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
TSK-DEAE-650 S Toyopearl: Tosohaas GmbH, Stuttgart, Deutschland
Arginin-Sepharose 4B Amersham-Pharmacia Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Hi-Trap Streptavidin-Sepharose 4B Amersham-Pharmacia Europe GmbH
Mono-Q HR5/5 Amersham-Pharmacia Europe GmbH
μRPC C2/C18 SC 2.1/10 Amersham-Pharmacia Europe GmbH
Talon Superflow Metal Affinity Resin, BD Clontech Germany, Heidelberg, Deutschland
Superdex S200 HR10/30 Amersham-Pharmacia Europe GmbH
Ni-NTA Superflow Amersham-Pharmacia Europe GmbH

1.3 Oligonukleotide und Primer

Die für das RAP-Projekt benötigten synthetischen chimären Gensequenzen wurden von der Firma Entelechon, Regensburg, Deutschland synthetisiert, alle übrigen Primer wurden von der Firma Thermo Electron, Dreieich, Deutschland bezogen.

RAP-Ligationsprodukt mit vollständig randomisierten Sequenzabschnitten

(„Scouting Construct“)

```

1           11           21           31           41           51           61
ATAAGAATGC GGCCGCGCAA GTAACGAGAA TATGGAAACA ATGNNNNNNN NNNNNNNNAG TATTATAAAT
71          81          91          101         111         121         131
TTCGAAAAGC TTNNNNNNNN NNNNNNNTGT TATCCATACG ATGTACCAGA CTATGCAAGT TTATGAATTCC

```

RAP-Ligationsprodukt mit den flankierenden Sequenzen aus Ovalbumin

(„Control Construct“)

```

1           11           21           31           41           51           61
ATAAGAATGC GGCCGCGCAA GTAACGAGAA TATGGAAACA ATGTTAGAGC AATTAGAAAG TATTATAAAT
71          81          91          101         111         121         131
TTCGAAAAGC TTACAGAATG GACAAGTTGT TATCCATACG ATGTACCAGA CTATGCAAGT TTATGAATTC C

```

5'Library

CGAAAAGCTTNNBNNBNNBNNBNNBTGTTATCCATACGATGTACCAGACTATGCAAGTTTATG

3'Library

AATTCATAAACTTGCATAGTCTGGTACATCGTATGGATAACAVNNVNNVNNVNNVNNNAAGCTTTT

5'P1

CGAAAAGCTTNNBGAATGGACAAGTTGTTATCCATACGATGTACCAGACTATGCAAGTTTATG

3'P1

AATTCATAAACTTGCATAGTCTGGTACATCGTATGGATAACAACCTTGTCCATTVCNNAAGCTTTT

5'P1-Stop-A

CGAAAAGCTTNDGTAATGGACAAGTTGTTATCCATACGATGTACCAGACTATGCAAGTTTATG

5'P1-Stop-B

CGAAAAGCTTNNCTAATGGACAAGTTGTTATCCATACGATGTACCAGACTATGCAAGTTTATG

3'P1-Stop-A

AATTCATAAACTTGCATAGTCTGGTACATCGTATGGATAACAACCTTGTCCATTACHNAAGCTTTT

3'P1-Stop-B

AATTCATAAACTTGCATAGTCTGGTACATCGTATGGATAACAACCTTGTCCATTAGNNAAGCTTTT

Ub-C+Not

TGCGGCCGCCTCTCAGGCGAAGGACCAG

Ub-N+Xho

CACTCGAGCCATGCAGATTTTCGTGAAG

pcDNA5-FRT-1405

TCCTTTCTCGCCACGTTCCG

pcDNA5-FRT-1598

TGAACTCACCGCGACGTCTG

FRT-Ecomut-Sense

AGTGCTTGACATTGGGGAGTTCAGCGAGAGCCTGACC

FRT-Ecomut-Antisense

GGTCAGGCTCTCGCTGAACTCCCAATGTCAAGCACT

P1[´]Ile-Sense:

ATAAATTTTCGAAAAGCTTATAGAATGGACAAGTTGTTATC

P1[´]Ile-AS:

GATAACAACCTTGCCATTCTATAAGCTTTTCGAAATTTAT

P1[´]Leu-Sense:

ATAAATTTTCGAAAAGCTTCTAGAATGGACAAGTTGTTATC

P1[´]Leu-AS:

GATAACAACCTTGCCATTCTAGAAGCTTTTCGAAATTTAT

P1[´]Val-Sense:

ATAAATTTTCGAAAAGCTTGTAGAATGGACAAGTTGTTATC

Val-AS:

GATAACAACCTTGCCATTCTACAAGCTTTTCGAAATTTAT

P1[´]Gly-Sense:

ATAAATTTTCGAAAAGCTTGGAGAATGGACAAGTTGTTATC

P1[´]Gly-AS :

ATAACAACCTTGCCATTCTCCAAGCTTTTCGAAATTTAT

P1[´]Ala-Sense:

ATAAATTTTCGAAAAGCTTGCAGAATGGACAAGTTGTTATC

P1[´]Ala-AS:

GATAACAACCTTGCCATTCTGCAAGCTTTTCGAAATTTAT

P1[´]Pro-Sense:

ATAAATTTTCGAAAAGCTTCCAGAATGGACAAGTTGTTATC

P1[´]Pro-AS:

GATAACAACCTTGCCATTCTGGAAGCTTTTCGAAATTTAT

P1[´]Stop-Sense:

ATAAATTTTCGAAAAGCTTTAAGAATGGACAAGTTGTTATC

P1[´]Stop-AS:

GATAACAACCTTGCCATTCTTAAAGCTTTTCGAAATTTAT

RAP-IR-Sense

ATAAATTTTCGAAAAGCTTATACGGTGGACAAGTTGTTATC

RAP-IR-AS

GATAACAACCTTGCCACCGTATAAGCTTTTCGAAATTTAT

1.4. Peptide

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden von der Arbeitsgruppe Stevanović, Institut für Zellbiologie, Abt. Immunologie Universität Tübingen in einer Reinheit von über 95 % (Analysiert über HPLC und MALDI) synthetisiert.

Folgende Peptide wurden in dieser Arbeit verwendet:

SIINFEKL (Hühner-Ovalbumin 257-264)

NVIVHSATGFKQSSKALQRPVASFDFE (BCR-ABL-Fusionsregion)

HAMPIGRIAECILGMNPSRDVH (ETV6-AML Fusionsregion)

WTVWSGNRASLYSFPEPEAAQPMTKKR (PRAME133-159)

LDPRNQISFKFDHLRKEASDPQPE (CP α 1 85-109)

SASETSEKRPFMCAYPGCNKRYFK (WT1 314-337)

1.5. Plasmide

pcDNA3-H2-K ^b	Laboreigene Bestände
pcDNA5-FRT	Invitrogen
pIRES2-EGFP	Clontech
pIRES-CD4t	Steve Pascolo, Universität Tübingen
pCR-Ubiquitin	Jonathan Yewdell
pET30a-Adipophilin	Laboreigene Bestände
pOG44	Invitrogen

1.6. Primärantikörper

- gegen die proteasomale Untereinheit α 2: Maus-mAb, Klon: MCP-21, laboreigene Produktion aus Hybridomüberstand. Eingesetzt als 1: 100 Verdünnung in TBB
- gegen die proteasomale Untereinheit β 1 (Y): Maus-mAb anti-human, Klon: MCP-421, Affiniti Research Products Ltd, Mamhead, Exeter, Großbritannien Eingesetzt als 1: 1000 Verdünnung in TBB
- gegen die proteasomale Untereinheit β 1i (LMP2): polyklonales Kaninchenserum anti-human, Affiniti Research Products Ltd, Mamhead, Exeter, Großbritannien Eingesetzt als 1: 20000 Verdünnung in TBB
- gegen die proteasomale Untereinheit β 5i (LMP7): polyklonales Kaninchenserum anti-human, Affiniti Research Products Ltd, Mamhead, Exeter, Großbritannien Eingesetzt als 1: 20000 Verdünnung in TBB

- gegen H2-K^b: Maus-mAb, Klon: Y3, laboreigene Produktion aus Hybridomüberstand.

Eingesetzt als 1: 100 Verdünnung in FACS-Puffer

- gegen H2-K^b-SIINFEKL : Maus-mAb, Klon: 25.D1.16, laboreigene Produktion aus Hybridomüberstand. Eingesetzt als 1: 100 Verdünnung in FACS-Puffer

1.7. Restriktionsenzyme

ApaI, BamHI, BspTI, EcoRI, EcoRV, HindIII, NheI, NotI, XbaI, XhoI: New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland

1.8. Sekundärantikörper

- gegen Maus IgG: Sheep anti-mouse IgG HRP-konjugiert, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg. Eingesetzt als 1: 5000 Verdünnung in TBB

- gegen Kaninchen IgG: goat-anti-rabbit IgG, HRP-konjugiert, Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland, Eingesetzt als 1: 5000 Verdünnung in TBB

- gegen Maus IgG: Goat anti-mouse IgG(H+L) F(ab)₂-Fragment, PE-konjugiert, Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland. Eingesetzt als 1:200 Verdünnung in FACS-Puffer

1.9. Standard-Chemikalien

Standardchemikalien wurden von Sigma-Aldrich, Fluka, oder Roth bezogen (Acetonitril, Acrylamid:Bis-Acrylamid 29:1, Ammoniumchlorid, Ammonium-peroxodisulfat, Borsäure, beta-Mercaptoethanol, Bis-Tris-Propan, Calcium-chlorid, DMSO, DTT, EDTA, Essigsäure, Ethanol, Methanol, Harnstoff, HEPES, IPTG, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Natriumchlorid, MgCl₂, MOPS, Natriumacetat, NaOH, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, 2-Propanol, Salzsäure, TEMED, Trifluoressigsäure, Trizma-Base

1.10. Weitere Materialien

Agarose, Electrophoresis grade, ultra pure: Gibco BRL, Life Technologies GmbH Eggenstein, Deutschland

Bovines Serum Albumin (BSA) Fraction V: Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland

Chromatographie-Papiere; Whatman 3MM

DMEM: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

DNA-Molekulargewichtsstandard: SMART-Ladder, Eurogentec, Köln, Deutschland

ECL-Detektionsreagenz für Western Blot: Amersham Pharmacia Europe

Epoxomicin: Affinity Research Products

Erythrocytenkonzentrat: Blutbank des Universitätsklinikum Tübingen, Prof. Nordhoff

Fluorogene Peptidsubstrate: Bachem Biochimica GmbH, Heidelberg, Deutschland

FCS: Diverse Hersteller

L-Glutamin: Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Glycerin puriss. Fluka-Riedel de Haen, über Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Lactacystin: E.J. Corey, Harvard University, Boston MA, USA

LB Medium: eigene Herstellung

Nitrocellulosemembran: Hybond ECL von Amersham Pharmacia Europe GmbH

Non-essential Amino Acids: Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Penicillin/Streptomycin: Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Roti-Nanoquant: Carl Roth GmbH

Pfu DNA-Polymerase: Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

Triton X-100 Serva Feinbiochemika GmbH & Co. KG Heidelberg, Deutschland

1.11. Zelllinien

EL.4: Maus-Thymom-Zelllinie (Old et al., 1965)

EG.7: EL-4 transfiziert mit pcDNA3-Ovalbumin (Moore et al., 1988)

Flp-In 293: Fibroblastenzelllinie aus Humaner embryonaler Niere, mit singulärer FRT-Erkennungssequenz (Invitrogen)

LCL-721: EBV-transformierte humane B-Zelllinie (Salter et al., 1985)

LCL-721.174: durch Mutagenese aus LCL721 generierte Zelllinie, defizient für LMP-2 und LMP-7 (Salter et al., 1985)

25.D1.16: Hybridomzelllinie; der produzierte Antikörper erkennt das Maus-MHC-Klasse-I Protein H2-K^b in Komplex mit dem Peptid SIINFEKL (Porgador et al., 1997)

1.12. Geräte, Plastikwaren

ÄKTA-FPLC Explorer 10: Amersham-Pharmacia Europe GmbH , Freiburg, Deutschland

Amicon Ultrafree 15 (100kD cutoff): Millipore, Eschborn, Deutschland

DNA-Kapillarsequenzierer ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems

Edman Sequenzer: Abi Procise 494 Applied biosystems

ELISA-Reader (Spectramax 340; Molecular Devices)

Elektrophoresekammer für Agarose-Gelelektrophorese: Modell B1a, Peqlab

FRENCH[®]-Pressure Cell: Sim-Aminco

Geldokumentationssystem: Vilber-Lourmat

Kühlzentrifuge: Sorvall RC-5S Kendro Laboratory Products, Stuttgart-Weilimdorf

Leersäulen (Modelle HR5/5, HR 16/25, HR 10/10): Amersham-Pharmacia Europe GmbH

Mikro-Pipetten: Eppendorf AG, Hamburg

Minigelkammern: Dual Vertical Mini-Gel Unit und Vertical Mini-Gel Unit, CBS Scientific Co.

Papierfilter „Black Ribbon“, aschefrei, 589, 12,5 cm / 8,9cm Durchmesser: Schleicher & Schuell, Einbek, Deutschland

pH-Meter 765 Calimatic Knick GmbH

Präzisionswaage BC210S Sartorius GmbH Göttingen, D

Reagenzgefäße, diverse Größen: Falcon[®] bezogen über: Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

Schüttelinkubator: Multitron HAT, INFORS AG Bottmingen, CH

SMART-HPLC: Amersham-Pharmacia Europe GmbH

Spannungsquelle: EPS 600, Amersham-Pharmacia Europe GmbH

Sterilbank: 3F150-II GS; Technoflow; Integra Biosciences

Temperaturstabilisiertes Wasserbad: Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel

Thermocycler: PCR-Sprint, Hybaid Ltd. Großbritannien

Thermomixer (Modell 5436) , Eppendorf AG, Hamburg

Ultrazentrifuge Optima L-80: Beckman Coulter, München, Deutschland

Ultrafiltrationseinheit Amicon Ultra 100kD NMWL, Millipore, Eschborn

UV/VIS Spektrometer Ultrospec 3000 Amersham-Pharmacia Europe GmbH

UV-Transilluminator AGS Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH Heidelberg

Western Blot Apparatur („Semi-Dry“ SD-2): CTI Chemie + Werkstoff-Technik GmbH, Idstein, Deutschland

Zellkulturflaschen und Plastikwaren: Greiner Holding AG, Frickenhausen, Deutschland; Nunc GmbH Co. KG, Wiesbaden, Deutschland; Corning Costar, Bodenheim, Deutschland
Zentrifugen: Sorvall RC-5 plus, Heraeus Megafuge 1.0R, Heraeus Biofuge Fresco: Kendro Laboratory Products, Stuttgart-Weil im Dorf, Deutschland; Eppendorf Centrifuge 5415 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zellkulturflaschen Greiner Holding AG, Frickenhausen, Nunc GmbH & Co. KG Wiesbaden, Corning Costar, Bodenheim, Falcon: über Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg

2. Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Kultur eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung aller Zellen (außer Rollerflaschen-Kultivierung, siehe unten) erfolgte bei 37°C in 7,5% CO₂ und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre. Als Kulturmedium diente RPMI 1640 (GibcoBRL) oder DMEM (Sigma Aldrich), supplementiert mit 10% FCS (PAA Laboratories; 1 h bei 56°C hitzeinaktiviert), 2 mM Glutamin (PAA Laboratories), 30 µM β-Mercaptoethanol (Roth), 100 µg*ml⁻¹ Penicillin, 100 µg*ml⁻¹ Streptomycin (Penicillin-Streptomycin 100x; PAA Laboratories), 1x nicht-essentielle Aminosäuren (Sigma), 1 mM Natriumpyruvat (Sigma). Die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Transfektanten wurden in denselben Medien unter Zugabe von 1000 mg/l G418-Sulfat (PAA Laboratories) und/oder 100 mg/l Hygromycin (Roche) oder Zeocin (Invitrogen) kultiviert.

Die Hybridomzelllinie 25.D1.16 wurde in demselben nicht-selektiven Medium gehalten; zur Kultivierung in Rollerflaschen für die Antikörperproduktion wurde der FCS-Anteil auf 5 % reduziert.

Die Kultivierung der adhärennten FlpIn-293 Zellen und ihrer Transfektanten wurde in Gewebekulturflaschen mit Filterverschlüssen der Größen 25 ml und 250 ml (Greiner) oder 6-Well-Platten durchgeführt. Passagieren der Zellen erfolgt durch Zugabe von 0,5 ml (6-Well-Platte); 1 ml (25 ml Flasche), 3 ml (250 ml Flasche) Trypsin-EDTA (GibcoBRL). Durch Klopfen an die Flasche wird die Ablösung der Zellen, die am Mikroskop verfolgt wird, beschleunigt. Das Trypsin wird mit mindestens dem Dreifachen der verwendeten Trypsinmenge an Medium abgestoppt, die Zellen werden in 50 ml Zentrifugationsgefäße überführt, abzentrifugiert (3

min; 500 x g), nochmals mit Medium gewaschen und nach Zellzahlbestimmung in der gewünschten Dichte in eine neue Zellkulturflasche überführt

Hybridome werden zur Expansion der Zellen in denselben Zellkulturflaschen kultiviert. Zur Antikörpergewinnung werden die Zellen in einem Volumen von 1 l Medium in 2 l Rollerflaschen gehalten. Der Hybridomüberstand wurde nach 10-tägiger Wachstumsphase („totwachsen“) gewonnen, der Überstand mit 10 M NaOH auf pH = 7.5 eingestellt und nach Abzentrifugieren (1000 x g; 15 min) steril filtriert.

2.1.2 Bestimmung von Lebendzellzahlen

Ein Aliquot aus einer homogenen Zellsuspension wurde 1:1 mit Trypanblau-Lösung (0,05% (w/v); Gibco BRL) verdünnt und die Zahl der ungefärbten, d.h. lebenden Zellen in 16 Kleinquadraten der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Lebendzellzahl pro ml wurde aus dem so ermittelten Wert wie folgt berechnet:

$$\text{Zellzahl [Zellen / ml]} = \text{gezählte Zellen} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10^4$$

2.1.3 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung von Zellen wurden $2-5 \cdot 10^6$ Zellen bei 500 x g für 3 min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, in 1 ml Einfriermedium (10 % DMSO (Merck), 90 % FCS (PAA Laboratories)) resuspendiert, in Cryoröhrchen mit Schraubverschluß (Merck) überführt und in dem auf 4°C vorgekühlten isopropanolgepuffertem Einfriergefäß (Nalgene) in den –80°C-Gefrierschrank überführt. Auf diese Weise erfolgte eine kontinuierliche (ca. 1°C/min) Absenkung der Temperatur. Für kurzzeitige Lagerung verblieben die Zellen im –80°C Gefrierschrank bzw. wurden zur Langzeitlagerung in den Stickstofftank überführt.

Das Auftauen von Zellen soll möglichst schnell geschehen; dazu wurde das Cryoröhrchen im 37°C Wasserbad aufgetaut und der Inhalt sofort in ein mit 10 ml Zellkulturmedium gefülltes 14 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 400 x g für 3 min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 6 ml Medium aufgenommen und in einer 6-Loch-Zellkulturplatte eine serielle 1:2 Verdünnung der Zellen angelegt. Am nächsten Tag wurden die Zellen in eine 25 ml Kulturflasche überführt.

2.1.4. Transfektion mittels Elektroporation

Eine häufig genutzte Methode, um DNA und RNA in Zellen zu transfizieren ist die Elektroporation. Am Tag vor der Transfektion werden die Zellen frisch gesplittet, damit sie sich zum Zeitpunkt der Transfektion im logarithmischen Wachstum befinden. Am Tag der Transfektion wurden die Zellen durch Trypsin abgelöst und nach Abzentrifugieren (500 x g; 3

min) je einmal mit Medium und PBS gewaschen. Das Zellpellet wird je $1 \cdot 10^7$ Zellen in 0,5 ml PBS resuspendiert und je 0,5 ml in eine Elektroporationsküvette (Biorad, 0,4cm Elektrodenabstand) überführt. Zu der Zellsuspension wurden 10 µg linearisierte DNA zupipettiert und die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 250 V und einer Pulskapazität von 960 µF; die resultierende Pulszeit lag im Bereich von 20-30 ms. Nach der Elektroporation wurden die Zellen für 24 h in nichtselektivem Medium kultiviert; danach wurde von einem Teil der transfizierten Zellen eine Einzelzellklonierung in 96-Well-Platten in selektivem Medium angesetzt, der übrige Teil der Zellen wurde im entsprechenden Selektivmedium passagiert.

2.1.5. Transfektion mittels Lipofektion

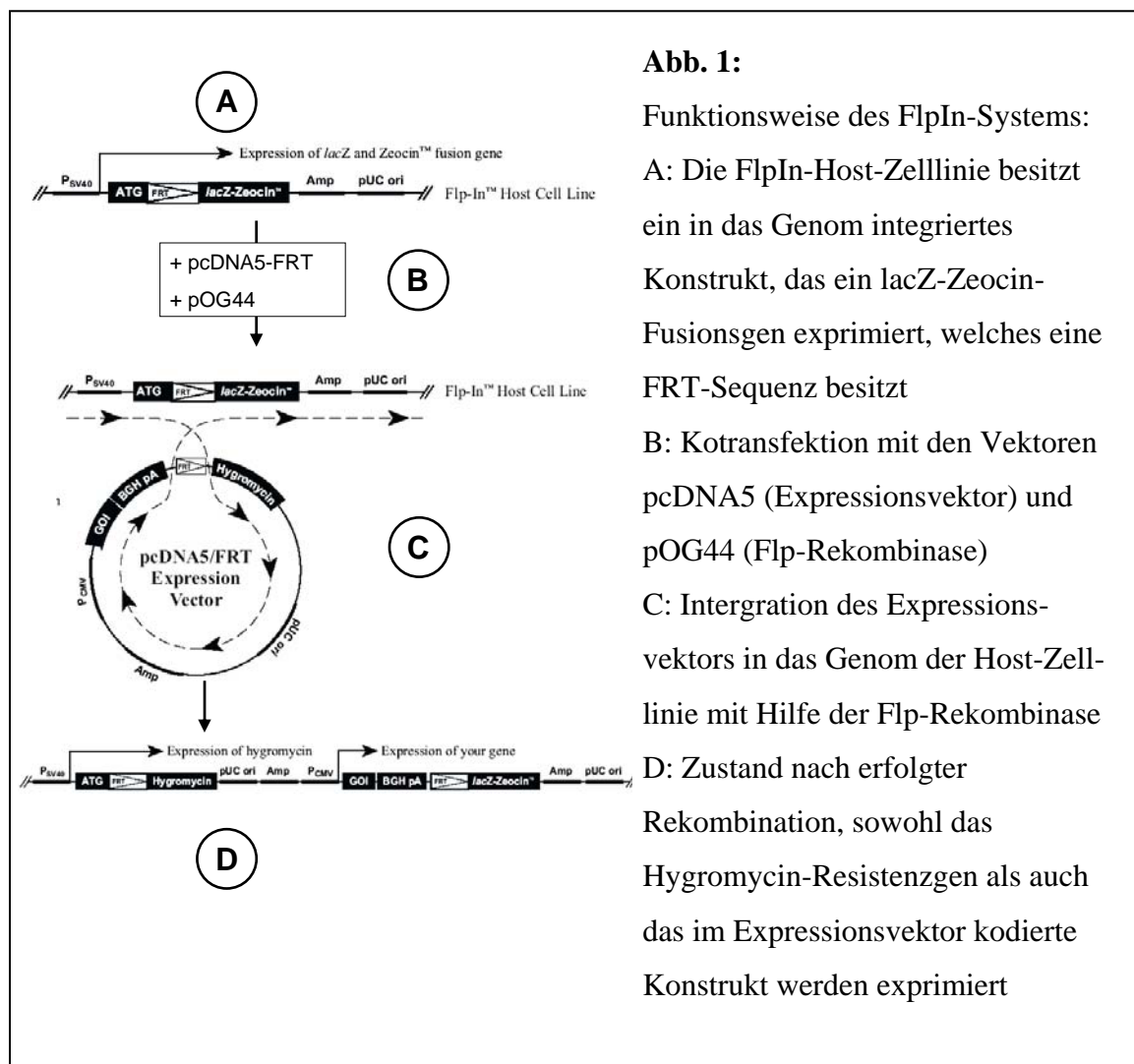
Für adhärenente Zellen empfiehlt sich eine Transfektion mittels Lipofektion, da hierbei sehr hohe Transfektionsraten erzielbar sind, wie sie für die Anwendung des Flp-In Systems benötigt werden. Fugene-6 ist ein hocheffektives Transfektionsreagenz, dessen Prinzip auf der Komplexierung der zu transfizierenden DNA mit kationischen Polymeren beruht.

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einer Zelldichte von 600.000 Zellen pro Loch einer 6-Loch-Zellkulturplatte gesplittet. Für die Transfektion wurde das Fugene-6-Reagenz mit der zu transfizierenden Plasmid DNA in 100 µl RPMI (ohne FCS) im Verhältnis 3:1 (Fugene-6 / µg DNA) gemischt und für 20 min unter mehrmaligem Mischen bei Raumtemperatur inkubiert. Von den zu transfizierenden Zellen wurde das Medium entfernt und durch 1 ml frisches Medium (DMEM + 10% FCS) ersetzt. Die vorbereitete Transfektionsmischung wurde tropfenweise zu den Zellen pipettiert und diese für 4 h bei 37°C im Feuchtinkubator inkubiert. Nach 4 Stunden wurden weitere 3 ml Medium (DMEM + 10 % FCS) in jedes Loch pipettiert. Die Zellen wurden dann für 24 h inkubiert und entweder sofort analysiert, oder aber zur Selektion trypsinisiert und in 20 ml selektivem Medium (DMEM + 10 % FCS + 0.1 g/l Hygromycin + 1 g/l G418) in 10 cm Zellkulturschalen überführt. Alle sieben Tage wurde das Medium ersetzt, bis nach 14 – 21 Tagen Foci resistenter Zellen sichtbar wurden. Zur weiteren Expansion wurden diese trypsinisiert und in 6-Loch-Zellkulturplatten überführt.

2.1.6. Funktionsweise des Flp-In Systems

Die Etablierung von stabil transfizierten Säugerzelllinien durch normale Transfektion ist ein zeit- und arbeitsaufwändiger Prozess. Die Integration des Expressionsvektors erfolgt dabei rein zufällig an unterschiedlichen Stellen im Genom der Zelle, die zu einer signifikanten Variationsbreite im Expressionsniveau der einzelnen Zellen führt. Auch mehrfache

Integrationen in das Genom der Zelle werden häufig beobachtet. Die Integration des Expressionsvektors an einer transkriptionell inaktiven Stelle des Genoms kann in niedriger oder vollständig fehlender Expression resultieren. Zusätzlich erschwert dieser positionelle Effekt den direkten Vergleich unterschiedlicher Expressionskonstrukte. Diese Variationsbreite kann durch Verwendung des Flp-In Systems von Invitrogen auf ein Minimum reduziert werden. Mit diesem System ist es möglich unterschiedliche Zelllinien zu etablieren, die nach der Transfektion jeweils unterschiedliche Konstrukte in derselben Stelle im Genom integriert haben, diese aber aufgrund der übereinstimmenden Integrationsstelle mit geringer Variation im Expressionsniveau exprimieren. Dies ist möglich durch die Verwendung von Flp-In™ host- Zelllinien, die eine einzige Flp Recombinase Target (FRT) Sequenz im Genom an einer transkriptionell aktiven Stelle integriert haben (Abb. 1a). Diese Zelllinien werden durch Transfektion mit dem Vektor pFRT/lacZeo gewonnen und mittels Southern Blot und β -Galaktosidaseassay auf Anzahl der Integrationsstellen und Expressionslevel untersucht. Für diese Arbeit wurde die Zelllinie FlpIn293 (Invitrogen Europe, Freiburg, Deutschland) verwendet, die nachträglich noch mit H2-K^b transfiziert wurde.



Aus diesen Zellen lassen sich durch Kotransfektion der FlpIn-Host Zelllinie mit dem FlpIn-Expressionsvektor pcDNA5-FRT und dem Flp-Rekombinase-Expressionsvektor pOG44 (Abb. 1b) leicht Zelllinien mit einer isogenen Expression des transfizierten Konstruktes gewinnen. Durch die transient exprimierte Flp-Rekombinase wird die Rekombination des Expressionsvektor mit der im Genom integrierten FRT-Sequenz katalysiert, alle dadurch entstandenen Hygromycin-resistenten Zelllinien sind isogen, da eine Expression der Hygromycinrestistenz nur nach einer erfolgreichen Rekombination möglich ist, weil das im Genom integrierte Startcodon benötigt wird. Dadurch sind alle mit Hilfe des FlpIn-Systems generierten Zelllinien sind in Bezug auf die Integrationsstelle isogen und alle transfizierten Klone exprimieren äquivalente Mengen des transfizierten Konstrukts.

2.1.7. Analyse von Zellen mittel Durchflußzytometrie (FACS)

Die Durchflußzytometrie oder FACS-Analyse ist eine Methode, die ursprünglich zur Analyse von Zelloberflächenmolekülen entwickelt wurde. Es können jedoch auch intrazelluläre Proteine analysiert werden, sofern diese fluoreszieren, oder die Zelle vorher fixiert und permeabilisiert wurde. Durch eine Inkubation mit einem spezifischen Erstantikörper, der (falls nicht fluoreszenzmarkiert) durch einen fluorochromgekoppelten Zweitantikörper detektiert werden kann, können die Oberflächenmoleküle einer Zelle sowie anhand der Fluoreszenzintensität deren Expressionsgrad bestimmt werden. Unspezifische Wechselwirkungen zwischen Antikörper und Zelle können durch eine Vergleichsfärbung mit einem Kontrollantikörper gleichen Isotyps ausgeschlossen werden. Als Fluorochrome werden Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Cychrome (Cy) eingesetzt.

Subpopulationen von Zellen (z.B. von Lymphozyten) können durch Mehrfarbenfärbung (gleichzeitige Färbung mit Antikörpern mit unterschiedlicher Spezifität und Fluorochromkoppelung) unterschieden werden. Im FACS-Gerät passieren die Zellen in einem speziellen Puffer einzeln einen Laserstrahl. Das entstehende Streulicht gibt Auskunft über Größe (FSC = "forward scatter" = In Laserstrahlrichtung gestreutes Licht) und Granularität (SSC = "side scatter" = senkrecht zur Strahlrichtung gestreutes Licht) der untersuchten Zellen. Durch den Laserstrahl werden außerdem die an die Antikörper gekoppelten Fluorochrome angeregt, das emittierte Licht wird durch entsprechende Filter geleitet und die der Antigenmenge proportionale Intensität gemessen.

Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst in der 96-Loch-V-Bodenplatte abzentrifugiert (500 x g, 3 min) und mit 150 µl FACS-Puffer (PBS mit 5 % (v/v) FCS; 0,5 mM EDTA; 0,01 % (w/v) NaN₃) gewaschen und erneut abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach

Resuspendierung mittels eines Vortex-Schüttlers wurden die Zellen in 70 µl Antikörperlösung versetzt und für 60 min bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (Abzentrifugieren, Verwerfen des Überstandes, Resuspendieren, Zugabe von Waschpuffer) mit je 200 µl FACS-Puffer wurden die Zellen in 50 µl Sekundärantikörperlösung resuspendiert und wiederum für 60 min bei 4°C inkubiert und danach nochmals gewaschen. Die Zellen wurden in 150 µl Fixierlösung (PBS mit 1% Formaldehyd) aufgenommen und zur Analyse in 400 µl FACS-Röhrchen überführt.

2.1.8. Acid Wash

Die zu behandelnden Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen, und der überstand komplett abgenommen. Zu den Zellen wurden 200 µl Saure Lösung (0,131 M Zitronensäure, 0,66 M NaH₂PO₄) gegeben und die Zellen nach Mischen für 1 min bei RT inkubiert. Danach wurden 1 ml Stop-Lösung (0,15 M NaHPO₄ pH 7.5) zugegeben und die Zellen bei 1500 rpm für 2 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen noch zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen, bevor sie wieder in Kulturmedium aufgenommen und für festgelegte Zeiträume bei 37° inkubiert wurden, um die Repräsentation von MHC Klasse-I Molekülen durch anschließende FACS-Färbung zu verfolgen.

2.2. Proteinaufreinigung und Methoden zur Proteinanalyse

2.2.1. Aufreinigung von 20S aus humanen Erythrocyten

Ausgangsmaterial für eine Aufreinigung von 20S-Proteasomen waren zwei Konserven (Haltbarkeitsdatum abgelaufen) mit Erythrozytenkonzentrat. Die Erythrocyten wurden dreimal mit jeweils 800 ml Volumen eiskaltem PBS gewaschen, indem das Konzentrat in PBS aufgenommen und für jeweils 20 min bei 1.500 x g bei 4°C in einem GS-3 (oder SLA-3000)-Rotor abzentrifugiert wurde. Nach jeder Zentrifugation wurde Überstand über dem Erythrozytenkissen einschließlich der sich absetzenden Leukozyten vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Nach dem dritten Waschschrift werden die Erythrozyten in 400 ml eiskaltem Lysepuffer aufgenommen (30 mM Tris-HCl pH 8.0 bei 4°C, 2,1 mM MgCl₂, 100 µM EDTA, 1,6 mM DTT) und für 45 min bei 4°C auf einem Schüttler hypoton aufgebrochen. Anschließend wird für 20 min bei 15.000 x g und 4°C in einem GS-3 (oder SLA-3000)-Rotor zentrifugiert, um ungelöste Bestandteile abzutrennen. Das Pellet wurde in 200 ml Lysepuffer resuspendiert und für weitere 20 min bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren (15.000 x g; 20 min, 4°C) wurden beide Überstände

vereinigt. Der Überstand wurde auf 75 g mit Lysepuffer aufgeschlammte und mit äquilibrierte DEAE-52-Servacel-Zellulose (präaktiviert mit 500 mM NaCl), die in einen Büchner-Porzellantrichter über einer Saugflasche über ein Filterpapier aufgebracht wurde, vorsichtig aufgetragen und unter leichtem Vakuum durch den Ionentauscher gesaugt. Das am Anionenaustauschermaterial absorbierte Material wird mit 1000 ml Waschpuffer TSDG₂₅ (20 mM Tris-HCl pH 7.6 bei 4°C, 25 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 5 % Glycerol, 2.1 mM MgCl₂, 100 µM EDTA) und 500 ml TSDG₁₂₅ (20 mM Tris-HCl pH 7,6-7,8 bei 4°C, 125 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 5 % Glycerol, 2,1 mM MgCl₂, 100 µM EDTA) gewaschen und anschließend mit 500 ml TSDG₃₀₀ (20 mM Tris-HCl pH 7,6-7,8 bei 4°C, 300 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 5 % Glycerol, 2,1 mM MgCl₂, 100 µM EDTA) in Fraktionen von 50 ml eluiert. Nach Aktivitätsbestimmung wurden die Fraktionen mit mindestens 30% der maximalen Aktivität vereinigt, diese für 20 min bei 15.000 x g und 4°C im GS-3-Rotor zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Kristallines Ammoniumsulfat wurde in kleinen Portionen bis zu einer Sättigung von 30% (w/v, respektive v/v) gleichmäßig über 30 min hinweg bei 4°C zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation wurde das Präzipitat durch Zentrifugation (SS-34, 25.000 x g, 20 min., 4°C) abgetrennt. Der Überstand des ersten Fällungsschrittes wird bis zu einer Sättigung von 70% (w/v) gleichmäßig über 30 min hinweg bei 4°C mit Ammoniumsulfat versetzt. Das entstehende Präzipitat wurde durch Zentrifugation (SS-34, 25.000 x g, 20 min., 4°C) abgetrennt und in 50 ml TSDG₂₅ resuspendiert. Das resuspendierte Pellet wurde erneut zentrifugiert (SS-34, 25.000 x g, 20 min, 4°C), um ungelöste Bestandteile abzutrennen. Nach Sterilfiltration durch einen 0,22 µm Filter wurde das "Präzipitat 70%" mit Hilfe einer Superloop an der ÄKTA-HPLC auf eine mit 100 ml TSK-DEAE 650 S Toyopearl-Anionenaustauscherharz befüllte HR 16/60-Säule aufgetragen, die zuvor mit 10 % Puffer B(TSDG₁₀₀₀; Puffer A = TSDG₀) äquilibriert wurde. Nach einem Waschschrift (500 ml; 10 % B) wurden die an das Anionenaustauschermaterial gebundenen Proteine mit einem Gradienten von 10% B bis 25% B über ein Volumen von 400 ml und von 25% B bis 40% B in 200 ml eluiert und Fraktionen à 4 ml gesammelt. Die Flussrate betrug 2 ml/min. Nach einer Aktivitätsbestimmung wurden alle Fraktionen mit mindestens halbmaximaler Aktivität wurden und durch Zentrifugation in mit 200 mM Glycin vorkontaminierten Amicon Ultra-Free 15 Zentrifugationseinheiten (100 kDa NMWL) bei 4.000 x g in einer auf 4°C gekühlten Heraeus-Tischzentrifuge auf 1,5 ml eingeeengt. Das aufkonzentrierte Material wurde mit maximal 0.3 ml pro Röhrchen auf einen Glycerol-Dichtegradienten (15%-35% Glycerol in TSDG₁₀₀) in Beckman-Ultrazentrifugationsröhrchen für einen Schwenkwinkelrotor des Typs SW40Ti aufgetragen. Die Proben werden für 18 h bei

28.000 rpm mit langsamer Beschleunigung und ohne Bremse in einem vorgekühlten Rotor SW40Ti bei 4°C zentrifugiert. Der Gradient wurde mit 500 µl/ Fraktion geerntet, die mit proteasomaler Aktivität korrespondierenden Fraktionen mit mindestens halbmaximaler Aktivität vereinigt und mittels Zentrifugation in mit Glycin (200 mM) blockierten Amicon Ultra-Free 15 Zentrifugationseinheiten (100 kDa NMWL) bei 4.000 x g in einer auf 4°C gekühlten Heraeus-Tischzentrifuge auf ca. 2 ml eingengt. Das Konzentrat wurde auf seinen Proteingehalt überprüft (BioRad-Nanoquant, siehe hierzu auch "Proteinbestimmung") und in Aliquots à 50 µg aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die typische Ausbeute einer Aufreinigung lag bei 1,5 - 2 mg 20S-Proteasomen bei einer Reinheit von > 95% (Coomassie-Färbung)

2.2.2. Aufreinigung c20S und i20S aus LCL721 und LCL721.174

Die Aufreinigung von i20S-Proteasomen aus der Zelllinien LCL 721 bzw. c20S-Proteasomen aus der Zelllinie LCL 721.174 erfolgte bis auf die Präparation des Lysates und den ersten Ionenaustauschchromatographieschritt im Batchverfahren identischem Protokoll wie die Aufreinigung von 20S-Proteasomen aus Erythrocyten. Als Ausgangsmaterial wurde für eine Aufreinigung je ca. 30 ml bei -80°C eingefrorenes Zellpellet verwendet (Das Pellet wurde bereits vor dem Einfrieren 2x mit PBS gewaschen, um Medienbestandteile zu entfernen). Das Pellet wurde auf Eis aufgetaut und mit dem doppelten Volumen an Lysepuffer (30 mM Tris-HCl, 1,6 mM DTT; 0,1 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 0,1 % (w/v) Triton X-100) resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch 30-40 Passagen mit einem Dounce-Homogenisator (schmaler Spalt) und anschließende je zweimalige sequentielle Passage durch Spritzenkanülen der Größen 21G, 23G, 25G, 26G. Das Lysat wurde abzentrifugiert (100.000 x g; 60 min; 4°C; Ti-70 Rotor) und der Überstand vorsichtig abgenommen und 5 M NaCl bis zu einer Endkonzentration von 300 mM zugegeben (ca. 0,07 vol). Anschließend wurde das Lysat auf 75 g mit TSDG 300 prääquilibrierte DEAE-52-Servacel-Zellulose (präaktiviert mit 500 mM NaCl), die in einen Büchner-Porzellantrichter über einer Saugflasche über ein Filterpapier aufgebracht wurde, vorsichtig aufgetragen und unter leichtem Vakuum durch den Ionentauscher gesaugt und mit 250 ml TSDG₃₀₀ eluiert, wobei beginnend mit dem Auftragen des Lysates Fraktionen à 50 ml gesammelt wurden. Nach Aktivitätsbestimmung wurden die Fraktionen mit mindestens 30% der maximalen Aktivität vereinigt, diese für 20 min. bei 15.000 x g und 4°C im GS-3-Rotor zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die weitere Aufreinigung mittels Ammoniumsulfatfällung, Anionenaustausch-HPLC und

Glycerol-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation und abschließender Aufkonzentrierung erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie die Aufreinigung aus Erythrocyten.

2.2.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgt in Anlehnung an Bradford (Peters et al., 2003; Taxis et al., 2003). Dazu werden in Dreifachbestimmung in einer 96-Loch-Flachbodenplatte (Greiner) jeweils 50 μl einer BSA-Standardreihe ($0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bis $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) und 50 μl der zu bestimmenden Proteinlösungen (eventuell vorher verdünnt) vorgelegt und mit je 200 μl des auf das fünffache Volumen verdünnten 5x Roti-Nanoquant versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Absorption bei 590 nm und 450 nm im ELISA-Reader gemessen; die 590/450-Quotienten der unbekanntenen Proben werden mit denen der BSA-Standards verglichen

2.2.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die in dieser Arbeit verwendeten SDS-PAGE Gele wurden als zweischichtige Minigele mit einer Sammel- und einer Trenngelschicht angefertigt.

Sammelgel: 0,35M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 5% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, 0,1% APS, 0,05% TEMED

Trenngel: 0,35M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 8-15% (w/v) Acrylamid/ Bisacrylamid 29:1, 0,1% APS, 0,05% TEMED

Die zu analysierenden Proben mit Probenpuffer (5x: 50% Glycerin, 2% SDS, 5% β -Mercaptoethanol, 0,1% Bromphenolblau, 0,5 M Tris-HCl pH 6.8) versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend in die Geltaschen geladen. Die Gele laufen in Laufpuffer (5x: 1,25M Glycin, 0,125 M Tris-HCl, 0,5% SDS) bei einer Spannung von 100- 150V und ca. 20 mA pro Gel bis zu der Elution des Farbstoffes Bromphenolblau (je nach Acrylamidkonzentration zwischen 150 und 250 Vh)

2.2.5. Coomassie-Färbung

Coomassie Brilliant Blue R-250 ist ein Triphenylmethanfarbstoff, mit dem Proteinbanden in Gelen nachgewiesen werden können. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel für 30 min bei RT in Färbelösung (0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in 80 % Methanol / 20 % Essigsäure) geschwenkt. Die anschließende Entfärbung erfolgte für mehrere Stunden in Entfärbelösung (50 % Methanol; 40 % $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$, 10 % Essigsäure), dabei wurde die Lösung mehrfach ausgetauscht. Zum Trocknen wurde das Gel zwischen befeuchtetes Whatman-

Papier und Kunststoff-Folie gelegt und 150 min bei 65°C im Gelrockner unter Vakuum getrocknet. Die Geldokumentierung erfolgte durch Scan der Gele vor der Trocknung.

2.2.6. Semi-Dry-Elektrotransfer und Immundetektion von Proteinen

Beim Western-Blotting werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond ECL, Pharmacia) transferiert und anschließend mit spezifischen Antikörpern detektiert. Der Transfer erfolgte mit Hilfe einer semidry-Apparatur (Transfer-Blot Kammer SD1,CTI) auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Auf vier Lagen in Anodenpuffer (50 mM Natriumborat (Sigma),

20% Methanol, pH 9) getränktes Filterpapier (Whatman 3MM), wurden die ebenfalls in Anodenpuffer getränkte Blotmembran, das Polyacrylamidgel und abschließend weitere vier Lagen Filterpapier (getränkt in Kathodenpuffer (50 mM Natriumborat (Sigma), 0,05% SDS, pH 9) geschichtet. Luftblasen wurden durch vorsichtiges Rollen mit Hilfe eines Stabes entfernt und die Apparatur mit einem Gewicht von ca. 2 kg beschwert. Der Transfer erfolgt über eine Zeit von 4h mit einer konstanten Stromstärke von 1 mA pro cm² Membranfläche. Nach erfolgtem Transfer werden unspezifische Bindungsstellen der Membran durch Inkubation in TBB (0,1% IGEPAL CA-630 (Sigma), 3% BSA (Sigma),

5mM EDTA in TBS) blockiert. Die Inkubation mit Primärantikörper erfolgt für 1h bei RT, anschließend wird die Membran dreimal für je fünf Minuten in TWB

(0,1% IGEPAL CA-630 (Sigma) in TBS) gewaschen. Anschließend wird die Membran mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (Verdünnung 1: 5000 in TBB) inkubiert. Die Membran wurde abschließend dreimal für je 10 Minuten mit TWB und zweimal für je fünf Minuten in TBS gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran für drei Minuten in der Dunkelheit mit 1 ml Entwicklungslösung (Western Blot Chemiluminescence extra plus, NEN Life Science Products) inkubiert. Die Detektion des emittierten Lichtes erfolgte durch eine Image-Station (Fuji Film, LAS-1000).

2.2.7. Fluorogene Aktivitätsassays

Aktivitäts- und Inhibitortests erfolgten bei 37°C. Für einen Test wurden entweder 1 µg aufgereinigtes 20S-Proteasom, oder aber ein Volumen von 10 – 50 µl der zu untersuchenden Probe verwendet. Zum Reaktionspuffer (30 mM Tris-HCl pH 7,6, 2 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT) wurden 100 µM des zu testenden Substrates (normalerweise suc-LLVY-AMC) zugegeben. Von dieser Reaktionsmischung wurden 200 µl für einen Test verwendet. Nach Zugabe der zu untersuchenden Probe wurden die

Reaktionsansätze für 30 min bei 37° C inkubiert und danach mittels eines Fluoreszenzspektrometers die Menge an freigesetztem AMC bestimmt (Excitationswellenlänge: 380 nm; Emissionswellenlänge: 450 nm). Im Falle der Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Inhibitoren wurden die untersuchenden Proben für 30 min bei 37°C in Gegenwart des Inhibitors vorinkubiert, erst dann erfolgte die Zugabe der Reaktionsmischung.

2.3. In vitro Verdau von Peptiden und Proteinen

Zur direkten Analyse der proteasomalen Schnittspezifität und deren Einfluß auf die Generierung bestimmter CTL-Epitope liefert der *in vitro* Verdau synthetischer Peptide, die sowohl das zu analysierende Epitop als auch flankierende Sequenzen enthalten, genaue und reproduzierbare Ergebnisse.

2.3.1. Reinheitsvoraussetzungen für den Verdau von Peptiden und Proteinen

Da die Präsenz von Verunreinigungen (z.B. verkürzte Peptide, Peptide mit fehlenden Aminosäuren oder nicht vollständig von Schutzgruppen befreite Peptide) den Detektionsprozess negativ beeinflussen und sogar falsch interpretierbare Resultate in Verdauxperimenten liefern können, wurden alle für *in vitro*-Verdau Experimente benutzten Peptide in einer Reinheit von über 98% verwendet, die Reinheit wurde vor dem Verdau mittels RP-HPLC und MALDI-MS überprüft. Für den Verdau vorgesehene Proteine wurde in der höchstmöglichen Reinheit (mind. 90%) eingesetzt.

2.3.2. Verdau von Peptiden

Die zu analysierenden Peptide wurden je nach Löslichkeit in einer Konzentration von 1 mM in ddH₂O oder 50% DMSO/50% ddH₂O gelöst. Für den Verdau wurden je 10 nmol des Peptids pro analysiertem Zeitwert zusammen mit 0,5 µg aufgereinigtem 20S-Proteasom in Verdaupuffer (20 mM HEPES-NaOH pH 7,6; 2 mM MgCl₂) für einen Zeitraum von 3 h, 6 h oder 18 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von TFA zu einer Endkonzentration von 0,1 % (v/v) gestoppt und bis zur chromatographischen Auftrennung und weiteren Analyse der Verdauprodukte bei -20°C gelagert.

2.3.3. Verdau von Proteinen

Für einen Verdau wurden 200 µg des zu verdauenden Proteins mit ddH₂O auf ein Volumen von 65 µl eingestellt. Danach erfolgte die Zugabe von 120 µl 10x Verdaupuffer (300 mM

Tris-HCl pH 7,6, 100 mM NaCl, 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0,2% SDS). Nach 20 minütiger Inkubation wurden 420 µl ddH₂O zugegeben (Endvolumen: 600 µl). Zu diesem Ansatz wurden 25 - 75 µg 20S-Proteasom (mit 1X Verdaupuffer ohne SDS auf ein Volumen von 600 µl verdünnt) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 0 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h wurden Aliquots entnommen, die durch SDS-PAGE analysiert wurden. Sämtliche Arbeiten wurden bei 37°C durchgeführt

2.3.4. Auftrennung der Verdauprodukte mittels Reversed-Phase-HPLC

Zu der zu untersuchenden Probe wurde TFA bis zu einer Endkonzentration von 0.1% zugegeben. Die Probe wurde anschließend für 30 min bei 15.000 x bei 4°C zentrifugiert, um mögliche Präzipitate zu entfernen. Für die Separation über die HPLC wurde eine Flussrate von 150 µl /min eingestellt, als Puffer A wurde ddH₂O mit 0,1% TFA, als Puffer B 80% AcN mit 0,081% TFA verwendet. Die verwendete µRPC PC 2.1/10 Säule wurde mit 100% B für 15 min und 0% B für weitere 15 min voräquilibriert. Die zu separierende Probe wurde über eine 500 µl Probenschleife mit einer Flussrate von 150 µl/min auf die Säule appliziert. Die elution erfolgte mit folgendem Gradienten:

0% B auf 10% B in 5 min

10% B auf 50% B in 60 min

60% B auf 100% B in 20 min

100% B für 15 min

Durch automatische Peakfraktionierung wurden Fraktionen mit einem Maximalvolumen von 500 µl gesammelt. Diese wurden anschließend bei RT in einer Speed-Vac getrocknet und in 50% Methanol/1% Ameisensäure gelöst und bei -80°C bis zur weiteren Analyse eingefroren.

2.3.5. Analyse der Verdauprodukte mittels MALDI- TOF-

Massenspektrometrie

Der Vorteil der MALDI (Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation)- Massenspektrometrie liegt in der Realisierung einer besonders schonenden Ionisierungstechnik; dadurch ist es möglich, auch von hochmolekularen Proteinen unfragmentierte Spektren zu erzeugen. Die Technik beruht auf der Cokristallisation des Analyten mit der niedermolekularen, UV-absorbierenden Matrix, die in der Lage ist, Laserenergie zu absorbieren und diese auf den Analyten zu übertragen. So ist es möglich, auch empfindliche Biomoleküle zu ionisieren, die generierten Ionen sind meist einfach geladen. Die Matrix muss bei der Wellenlänge des verwendeten Lasers (meist ein N₂-Laser mit einer Wellenlänge von 337 nm). In dieser Arbeit

wurden als Matrices DHAP (2,5-Dihydroxyacetophenon) und HABA (2'-(4-Hydroxyphenyl)-azo-Benzoesäure) verwendet. Von diesen wurde eine gesättigte Lösung von 15 mg DHAP bzw. HABA mit 5 mg Ammoniumcitrat in 200 µl H₂O und 800 µl Isopropanol hergestellt, die vor Benutzung abzentrifugiert wurde.

Die Analysen wurden mit einem MALDI-TOF-Gerät HP G2025A von Hewlett Packard durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein Gerät, das ohne Reflektor mit einer linearen Flugbahn arbeitet. Die Auflösung dieses Gerätes liegt im Bereich von $R = 500$ FWHM (Full width at half maximum), die Sensitivität bei ca. 100 bis 500 femtomol in einem Massenbereich von 0 - 200.000 Da.

Die entsalzten Proben wurden nach dem „dried droplet“-Verfahren auf den Probenträger appliziert. Dazu wurde zuerst 1 µl der Matrixlösung auf den Probenträger (Target) getropft und unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurde 1 µl der Probenlösung auf die getrocknete Matrix getropft und ebenfalls im Vakuum getrocknet. Nach dem Laden des Probenträgers in das Massenspektrometer wurde die Probe analysiert. Um Auflösungsverluste und Matrixsignale zu minimieren, wurde die Probenanalyse stets mit geringer Laserenergie begonnen und diese im Laufe der Messung langsam erhöht, um ein optimales Signal zu erhalten. Zur Verbesserung des Signal/Rausch -Verhältnisses wurden mehrere Einzelspektren aus verschiedenen Bereichen des Probenträgers aufsummiert.

2.3.6. Analyse der Verdauprodukte mittels Edman-Abbau

Aminosäuresequenzen von Proteinen und Peptiden können mit Hilfe des Edman-Abbaus bestimmt werden. Dieser gut automatisierbare Prozess besteht aus den drei Schritten Kupplung, Spaltung und Konvertierung, die zyklisch wiederholt werden. Im Kupplungsschritt wird die N-terminale Aminosäure unter mild alkalischen Bedingungen mit Phenylisothiocyanat unter Bildung eines Phenylthiocarbamoyl (PTC)-Addukts umgesetzt. Im nächsten Schritt, der Spaltung, wird die derivatierte N-terminale Aminosäure mit wasserfreier Trifluoressigsäure selektiv als Thiazolinon-Derivat abgespalten, ohne dass andere Peptidbindungen hydrolysiert werden. Die abgespaltene Thiazolinon-Aminosäure wird im Konvertierungsschritt mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert und mit wässriger Säure in das stabilere Phenylthiohydantoin (PTH)-Derivat umgesetzt. Die entstandene PTH-Aminosäure wird nun chromatographisch über einen Vergleich mit den Retentionszeiten einer Referenzprobe, die PTH-Derivate aller Aminosäuren enthält, identifiziert. Eine quantitative Bestimmung der PTH-Derivate erfolgt über die Peakhöhen der Absorptionskurve bei 269 nm.

In dieser Arbeit wurde ein automatisches Proteinsequenziergerät („Procise“ 494A Protein Sequencer, ABI) verwendet, das die PTH-Derivate über eine spezielle C18-Säule (Spheri-5 PTH 5µm, 220 x 2,1 mm, Perkin Elmer) separiert und eine genaue Quantifizierung der untersuchten Proben ermöglicht.

2.4. Methoden zur Klonierung und Analyse von DNA

2.4.1. Aufreinigung von DNA aus Bakterienkulturen

Plasmidpräparationen im Mini- und Maxi-Maßstab erfolgten nach dem Protokoll des „QIAfilter Plasmid Maxi Kit“ bzw. nach dem „QiaSpin Kit“ (Qiagen) und werden daher hier nicht weiter beschrieben.

2.4.2. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA Lösungen wurde entweder durch Vergleich der Bandenstärke im Agarosegel mit einer Probe bekannter Konzentration oder durch UV-Spektrometrie bei 260 nm und 280 nm bestimmt.

2.4.2. Ethanol-Fällung von DNA

Die DNA-haltige Lösung wurde mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,4 und dem 3fachen Volumen 100% Ethanol (-20 °C) versetzt. Nach Schütteln wurde die Lösung für 30 min bei -20°C inkubiert und für 30 min bei 13000 UpM und 4°C in der Mikrozentrifuge zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde danach mit 500 µl 70% Ethanol (-20°C) gewaschen und nochmals für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde an der Luft oder in der Speedvac getrocknet und im gewünschten Volumen ddH₂O aufgenommen.

2.4.3. Phenol-Chloroform-Extraktion

Diese Methode dient der Aufreinigung von DNA aus proteinhaltigen Lösungen, beispielsweise nach einem Restriktionsverdau. Die DNA-haltige Lösung wurde auf ein Volumen von 200 µl gebracht und das gleiche Volumen Phenol (Roth) zugegeben, gevortext und 5 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Die obere DNA-haltige Phase wurde in ein anderes Eppendorfgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (Roth) versetzt,

gehortext und 5 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und in einem neuen Eppendorfgefäß mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (Roth) versetzt und gehortext. Nach 5 min Zentrifugation bei 14.000 x g wird die DNA aus der oberen Phase in einem frischen Reaktionsgefäß durch Ethanolfällung präzipitiert.

2.4.4. Restriktionsverdau von DNA

Pro µg DNA wurden 2-3 U Restriktionsenzym eingesetzt. Der Verdau erfolgte in möglichst kleinem Volumen in vom Hersteller angegebenem Reaktionspuffer bei 37 °C für 1 h.

2.4.5. Ligation von DNA-Fragmenten

Für Ligationen von DNA-Fragmente wurde T4-DNA-Ligase verwendet.. Für eine Ligation wurden 300 ng Vektor mit der dreifachen molaren Menge an Insert mit 1,5 µl 10x Ligasepuffer und 0,1 µl T4-DNA-Ligase (Roth) in einem Gesamtvolumen von 15 µl versetzt. Die Ligrationsreaktion erfolgte ü.N. bei 16°C im Wasserbad.

2.4.6. Analyse von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Ein Verfahren zur Auftrennung von DNA-Molekülen in einem elektrischen Feld ist die Agarosegelelektrophorese. Agarose, bestehend aus glykosidisch verbundener D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose, dient als interne Matrix, in dem DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld wegen der negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückrad der DNA zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird durch verschiedene Faktoren, wie die Molekülgröße, die Konformation der DNA, die Agarosekonzentration und die angelegte Gleichspannung, beeinflusst. Lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente bewegen sich im Agarosegel indirekt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Die bei der Agarosegelelektrophorese eingesetzte Agarosekonzentration (üblich sind 0,5 – 2,5 %) ist abhängig von dem DNA-Molekulargewichtsbereich, in dem eine effektive Auftrennung der Fragmente erfolgen soll. Die aufgetrennten DNA-Fragmente werden sichtbar gemacht durch die Substanz Ethidiumbromid (Buus, 1999), welche in die DNA interkaliert und durch UV-Licht im interkalierten Zustand zur Fluoreszenz angeregt wird. Bei der Durchführung von Agarose-Gelelektrophoresen wurde Ethidiumbromid sowohl in das Gel eingegossen als auch zum Laufpuffer zugegeben.

2.4.7. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde nach dem Prinzip des Cycle-Sequencing durchgeführt.

Für die Sequenzierung ist eine hochreine DNA-Präparation notwendig, daher wurde in dieser Diplomarbeit ausschließlich mit QIAgen Mini- oder Maxi-Prep aufgereinigte DNA verwendet, die aufgrund eines Filtrierungsschrittes und einer Reinigung über eine Säule mit Silikamatrix frei von partikulären Bestandteilen und Proteinen sind. Dies ist absolut notwendig, um eine Verstopfung der Kapillare des Sequenzers zu vermeiden.

In einem 500 µl PCR-Reaktionsgefäß wurde der Reaktionsansatz (0,4 µg Plasmid-DNA, 5 pmol Primer, 1,5 µl BigDye Ready Mix (Perkin Elmer) in einem Gesamtvolumen von 9 µl) vorbereitet und die Sequenzierreaktion über 35 Zyklen (30 sec bei 95°C; 30 sec bei 55 °C; 4 min bei 60°C) durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz auf 25 µl mit d_4H_2O verdünnt und auf das nach Herstellerangaben vorbereitete AutoSeq-G50 Säulchen aufgetragen. Das Säulchen wurde 1 min bei 3000 x g in der Mikrozentrifuge zentrifugiert und das Eluat bei 95°C für 2 min denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt.

Die so vorbereitete Probe wurde mit einer Injektionszeit von 70 sec auf die Kapillare des Sequenzers (Abi Prism 310) geladen.

2.4.8. Ortsspezifische Mutagenese mittels Quickchange-PCR

Die spezifische Mutagenese ist eine unverzichtbare Technik zur Identifizierung von Struktur-Funktions-Beziehungen in Proteinen und zur Identifizierung der Aminosäuren, welche für diese Funktionen von Bedeutung sind. Die Technik benötigt keine speziellen Vektoren oder Restriktions-Schnittstellen.

Für die Mutagenese wird die DNA-Polymerase Pfu (aus *Pyrococcus furiosus*) eingesetzt, diese besitzt die geringste Fehlerhäufigkeit aller thermostabilen DNA-Polymerasen und ist nicht in der Lage, die mutagenen Primer von der Plasmid-DNA abzu dissoziieren.

Die in sich komplementären mutagenen Primer paaren sich mit der Plasmid-DNA und werden durch die DNA-Polymerase verlängert, so dass nach mehreren Zyklen Plasmide entstehen, welche zwei Nicks enthalten, die um die Primerlänge verschoben sind.

Die Produkte werden sodann mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut; dieses Enzym ist spezifisch für methylierte und hemimethylierte (Zielsequenz: 5'-G^{m6}ATC-3') DNA und wurde eingesetzt um die als Template eingesetzte Plasmid-DNA zu verdauen und somit auf in

der Mutagenese-Reaktion synthetisierte DNA zu selektionieren. Dies ist möglich, da DNA die aus E.coli isoliert wurde, dam-methyliert und damit Ziel des DpnI-Verdaus ist.

Das Produkt des Verdaus, welches nur noch genickte, mutagenisierte DNA enthält wurde zur Transformation von E.coli XL1-Blue MRF['] Zellen verwendet.

2.4.9. Annealing von Oligonukleotiden

Eine Möglichkeit zur Mutagenese von Genen ist die Insertion synthetischer Genfragmente, deren Enden zu entsprechenden Restriktionsschnittstellen im zu mutagenisierenden Konstrukt kompatibel sind. Zum Annealing der komplementären Stränge wurde je 100 pmol beider komplementärer Oligonukleotide in 100 µl Annealing-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) auf für 5 min auf 95°C erhitzt und sehr langsam (ca. 0,5°C/min) auf Raumtemperatur abgekühlt. Von diesem Ansatz wurden für die Ligation in den mit den passenden Restriktionsschnittstellen geschnittenen Vektor je 0,1 µl verwendet.

2.4.10. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wird zur starken Amplifikation von definierten DNA-Bereichen benutzt. Das Grundprinzip der PCR ist die enzymatische Duplikation einer DNA-Sequenz. Hierzu benötigt werden zwei Oligonukleotide, die Primer, die jeweils komplementär homolog zu dem (+)-Strang des einen Endes und zu dem (-)-Strang des anderen Endes der zu amplifizierenden DNA-Region sind. Nach Hitze-Denaturierung der DNA können sich die Primer bei der anschließenden Abkühlung des Reaktionsansatzes an die DNA-Matrize anlagern. Eine hitzestabile Polymerase, z.B. Taq-Polymerase, erstellt -ausgehend vom 3'-OH-Ende des Primers - durch Primer-Extension eine Kopie der DNA-Matrize. Die Primer müssen so orientiert sein, dass die Synthesen der DNA-Moleküle aufeinander zulaufen. Nachdem die gewünschte Sequenz synthetisiert ist, werden die Stränge durch Hitzeeinwirkung voneinander getrennt. Durch erneute schnelle Senkung der Temperatur wird eine spezifische Bindung der Primer an die entstandenen DNA-Stücke ermöglicht. Durch Primerverlängerung wird dann wieder eine neue Kopie der Template-DNA erstellt. Durch dreißig- bis vierzigfaches Wiederholen dieses Zyklus erreicht man eine vieltausendfache Vermehrung des definierten DNA-Bereiches zwischen den Primern.

2.4.11. Konversion 5'-überhängender Enden zu „blunt-ends“

Waren die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen von Vektor und Insert nicht kompatibel, wurden die 5'-Überhänge in Anwesenheit der entsprechenden Nukleotide mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I zu „blunt-ends“ konvertiert. Die Auffüllreaktion erfolgte direkt nach dem Restriktionsverdau im jeweiligen Puffer der Restriktionsenzyme durch die Zugabe der erforderlichen Nukleotide (Endkonz.: 0,5 mM dNTP) und 1 µl Klenow-Enzym (Fa. Gibco BRL, 1 U/µl). Der Zusatz der dNTPs richtete sich jeweils nach der Basenzusammensetzung des erzeugten Überhangs. Die Reaktion wurde für 30 min bei RT durchgeführt, anschließend wurde das Enzym durch Erhitzen auf 72° C für 15 min inaktiviert und die Fragmente im Agarosegel aufgetrennt und isoliert.

2.4.12. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde der kommerziell erhältliche Kit „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) verwendet.

Die Solubilisierung der Agarose erfolgt durch chaotrope Salze, welche auch die Adsorption der DNA an die Silicagel Matrix vermitteln (Vogelstein 1979). Die DNA wird nach einigen Waschsritten (welche Salze, Enzyme, Nucleotide, Agarose, Farbstoffe, EtBr etc. von der Säule waschen) unter Niedrigsalzbedingungen eluiert.

Zu der aus dem Agarosegel präparierten DNA-Bande (siehe Agarosegelelektrophorese) wurde für je 100 mg Gelgewicht 300 µl QG-Puffer zugegeben und das Reaktionsgefäß bei 50°C für 10 min im Schüttler inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde ein Gelvolumen an Isopropanol zugegeben. Dieser Schritt dient der Verbesserung der Ausbeute bei kleinen (< 500 bp) und sehr großen (> 4000 bp) DNA-Fragmenten. Diese die DNA enthaltende Lösung wurde nun auf die QIAquick-Säulchen pipettiert und in der Mikrozentrifuge zentrifugiert (1 min, 13000 UpM). Die Waschsritte (500 µl QG-Puffer, danach 750 µl PE-Puffer) wurden in gleicher Weise durchgeführt, zwischen Zugabe des PE-Puffers und Zentrifugation wurde für 5 min inkubiert. Um Ethanolreste des PE-Puffers vollständig zu entfernen wurde das Säulchen nun in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) platziert und ein weiteres Mal zentrifugiert. Für die Elution der DNA wurde die Säule in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert, 30 µl H₂O_{dd} auf die Mitte der Silikamatrix pipettiert und einminütiger Inkubation in einem letzten Zentrifugationsschritt die DNA eluiert.

2.4.13. Hitzeschock-Transformation kompetenter Bakterien

Ein 200 µl-Aliquot transformations-kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut.

Zu je 100 µl Bakteriensuspension wurde der zu transformierende Vektor (1-50 ng) bzw. 10 µl Ligationsansatz zupipettiert, gut vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden sodann einem 90 sec. Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und sofort auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Bakterien für 60 min im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 2 min bei 300 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterien auf bei 37°C vorgewärmte LB^{Amp}-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Warmraum inkubiert.

2.4.14. Herstellung kompetenter Bakterien

Bakterien sind normalerweise nicht in der Lage, exogene DNA aufzunehmen. Jedoch können Bakterien in der log-Phase ihres Wachstums durch eine Behandlung mit Ca/Mn-Salzen bei tiefen Temperaturen in einen Zustand versetzt werden, in dem sie in der Lage sind, DNA aus dem umgebenden Medium aufzunehmen. Die genauen Mechanismen dieser Herstellungsmethode sind bislang unbekannt.

Der gewünschte Bakterienstamm wurde auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen und die Kulturplatte 16 h bei 37°C im Warmraum inkubiert. Von einer Einzelkolonie wurde eine Übernachtskultur in 5 ml LB-Medium im Schüttelinkubator bei 37°C und 225 rpm angesetzt. Davon wurden 50 µl in 5ml LB gegeben und im Schüttelinkubator für 2 h inkubiert. Mit dieser Kultur wurden dann 100 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD₅₅₀ von 0.2 – 0,3 wachsen gelassen. Die Bakterienkultur wurde auf Eis heruntergekühlt (alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C) und bei 1800 x g in der (vorgekühlten) Tischzentrifuge bei 1800 x g für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml eisgekühltem TfbI (30 mM KAc pH = 5,8; 50 mM MnCl₂; 100 mM KCl; 10 mM CaCl₂; 15 % (v/v) Glycerin) resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (5 min, 900 x g, 4°C). Das Pellet wurde in 4 ml eiskaltem TfbII (10 mM MOPS pH = 7,0; 75 mM CaCl₂; 10 mM KCl; 15% (v/v) Glycerin) vorsichtig resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde aliquotiert (200 µl) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -70°C.

2.5. Die Stabilized Matrix Methode zur Generierung von Vorhersagematrizen

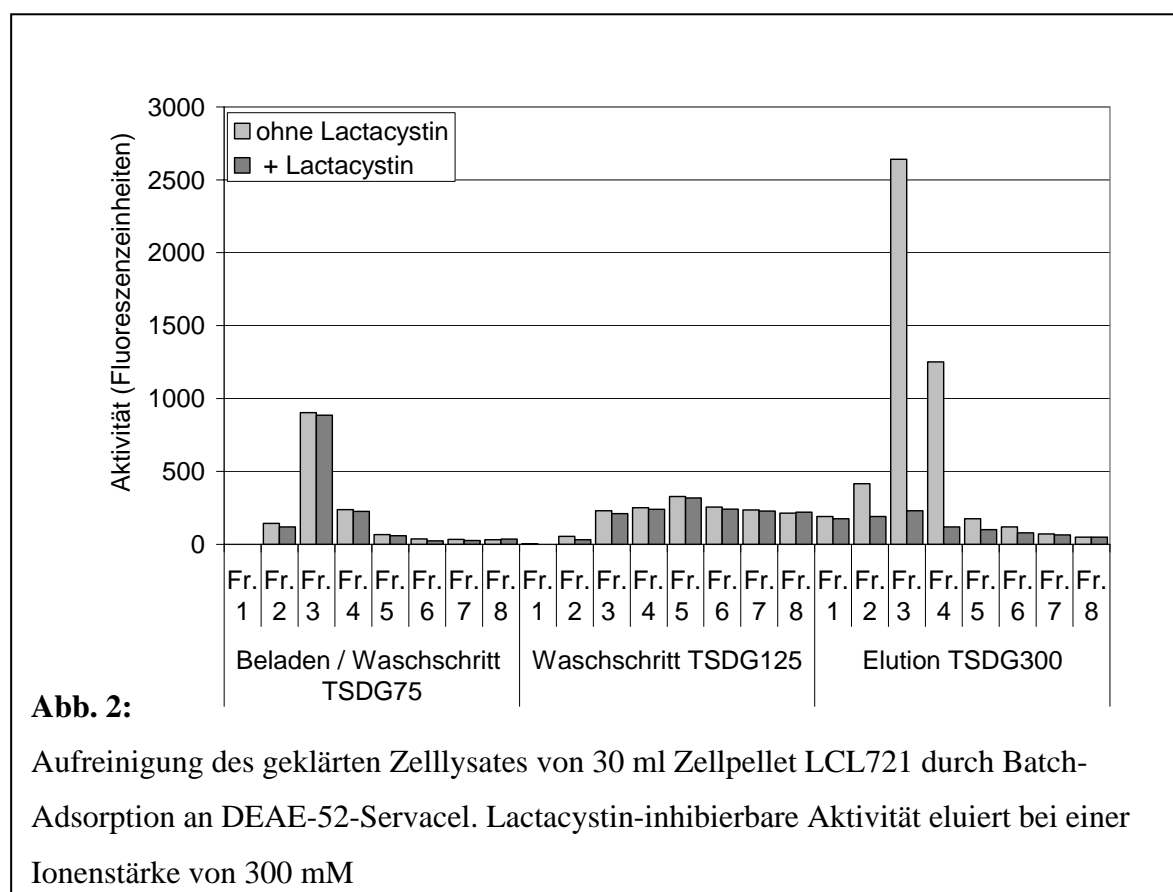
Zur Vorhersage proteasomaler Schnitte wurde eine modifizierte Version der SMM Methode verwendet, die im Detail von Peters et al. beschrieben wurde. Diese Version wurde mit Hilfe von in-vitro Schnittdaten trainiert, die jeweils verwendeten Datensätze sind im Ergebnisteil näher erläutert. Kurz zusammengefaßt kann eine 20×10 Matrix ($\text{mat}(\text{aa}, \text{pos})$) benutzt werden, um Schnitte innerhalb eines 10 Aminosäuren umfassenden Sequenzfensters (aa_{pos}) vorherzusagen, indem über die Matrixeinträge aufsummiert wird ($\text{prediction} = \sum \text{mat}(\text{aa}_{\text{pos}}, \text{pos})$), die durch die Sequenz des untersuchten 10mer spezifiziert werden. Die Matrixeinträge selbst werden numerisch bestimmt, indem die Distanz Φ zwischen den im Experiment bestimmten logarithmierten Schnittstärken und den von dem Algorithmus vorhergesagten Schnittstärken minimiert wird ($\Phi = \sum_{\text{cleavage sites}} (\log(\text{measured amount}) - \text{prediction})^2$). Im Falle von Sequenzpositionen, für die experimentell keine Schnittstelle verifiziert werden konnte, wurde die Schnittintensität auf den geschätzten Detektionsschwellenwert von 5 pmol festgesetzt. Jede Vorhersage für diese Schnittstellen, die sich unterhalb dieses Schwellenwertes bewegt, wird als perfekt betrachtet ($\Phi=0$). Um ein Overfitting der Matrixeinträge zu vermeiden, wird ein zweiter Term zu der Minimierungsfunktion addiert, der jede Abweichung der Matrixeinträge von null bestraft $\Psi = \Phi + \sum_{\text{pos}} \lambda_{\text{pos}} \sum_{\text{aa}} \text{mat}(\text{aa}, \text{pos})^2$. Durch die Minimierung dieser Zielfunktion mit einem positiven λ_{pos} -Wert, wird ein Ausgleich erzielt zwischen einer optimalen Reproduktion der Trainingsdaten (welche natürlich auch die inhärenten experimentellen Fehler mit reproduzieren würde) und einer Minimierung der Matrixeinträge $\text{mat}_{\text{aa}, \text{pos}}$. Dieser Ausgleich erzwingt eine Minimierung aller Matrixeinträge, die nicht signifikant zu einer Verringerung der Distanz Φ beitragen. Im Gegensatz zu früheren Anwendungen der SMM-Methode ist der eingeführte Regulierungsparameter λ_{pos} in dem in dieser Arbeit verwendeten Ansatz abhängig von der betrachteten Position innerhalb des Sequenzfensters. Dies ist notwendig, da nicht bekannt ist, welche exakte Ausdehnung diese Sequenzfenster haben muß, um sicher alle signifikanten Positionen zu beinhalten. Die optimalen Werte für λ_{pos} werden sukzessive durch eine schrittweise Aufweitung des Sequenzfensters bestimmt. Als Startpunkt wurde eine Matrix verwendet, die nur die Position P1 umfaßt, und damit der optimale Dämpfungparameter λ_{P1} durch 5fache Kreuzvalidierung bestimmt. In den folgenden Schritten wird die Matrix schrittweise mit den Positionen P1', P2, P2', P3, P3', P4, P4', P5, P6 erweitert und neu trainiert auf die experimentellen Daten. Nach jedem Trainingsschritt werden alle Matrixeinträge auf Null gesetzt, aber die bereits

bestimmten positionellen Dämpfungparameter λ_{pos} beibehalten und für den nächsten Trainingsschritt verwendet, bis alle 10 Positionen in der Vorhersagematrix enthalten sind. Diese Prozedur wird 20mal wiederholt, wobei jedesmal eine unterschiedliche Aufspaltung des experimentellen Datensatzes in Trainings- und Testdaten für die Kreuzvalidierung verwendet wird. Die endgültigen Matrizes und die assoziierten Dämpfungparameter λ_{pos} sind definiert als der Mittelwert dieser 20 unabhängig generierten Vorhersagematrizes und Dämpfungsfaktoren. Die optimalen Dämpfungsfaktoren für Sequenzpositionen, die weiter von der Schnittstellen entfernt sind, als das in der letztendlichen Vorhersagematrix verwendete, 10 AA umfassende Fenster waren sehr hoch, was die korrespondierenden effektiven Matrixeinträge gegen null tendieren läßt. Dies zeigt, daß keine verlässlichen Informationen über die Einflüsse von Aminosäuren in diesen Sequenzpositionen aus den Trainingsdaten extrahiert werden konnten, was letztendlich die Korrektheit des gewählten Sequenzfensters bestätigt.

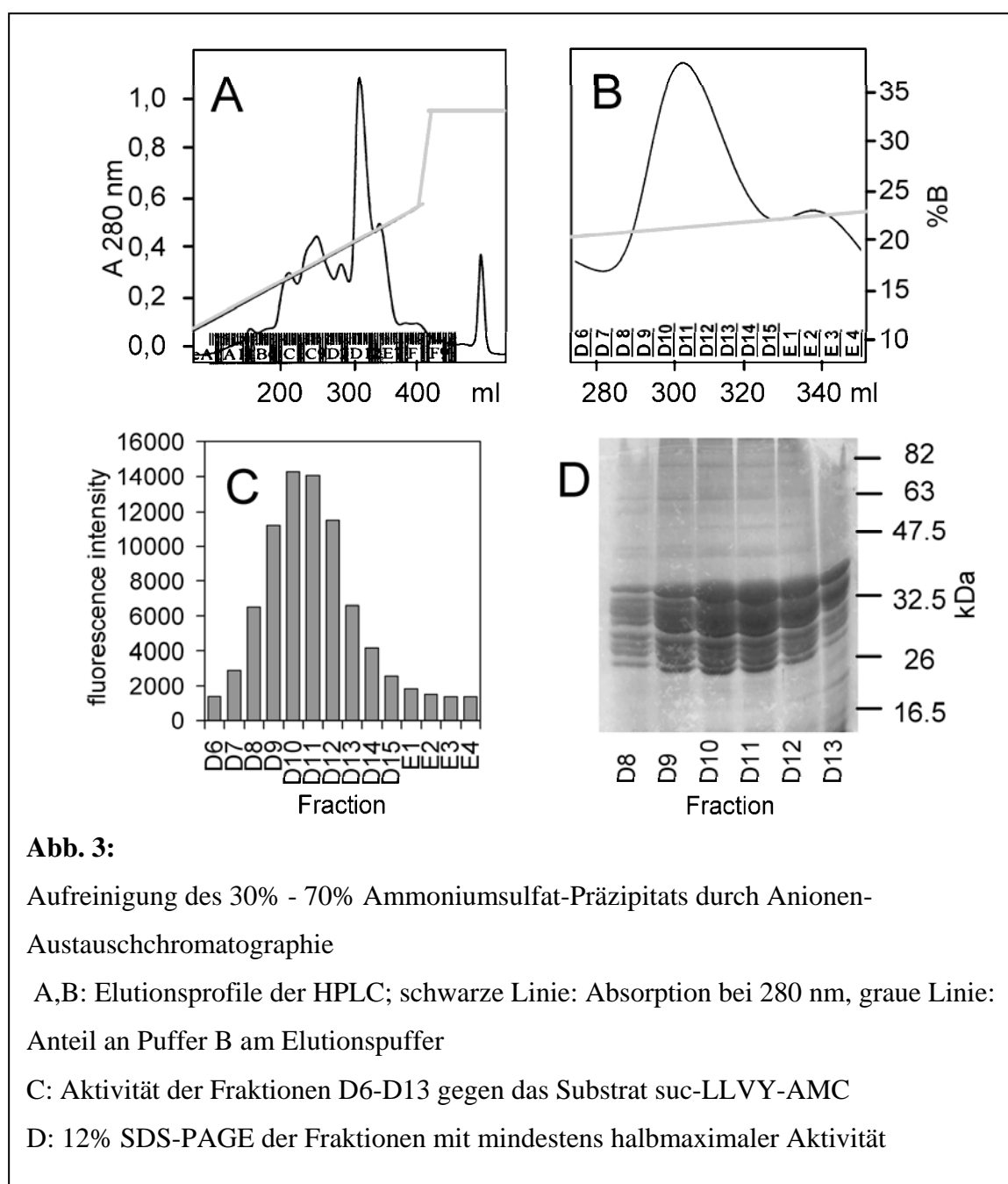
III. Ergebnisse

1. Aufreinigung von i20S- und c20S-Proteasomen aus LCL721 und LCL721.174 Zellen

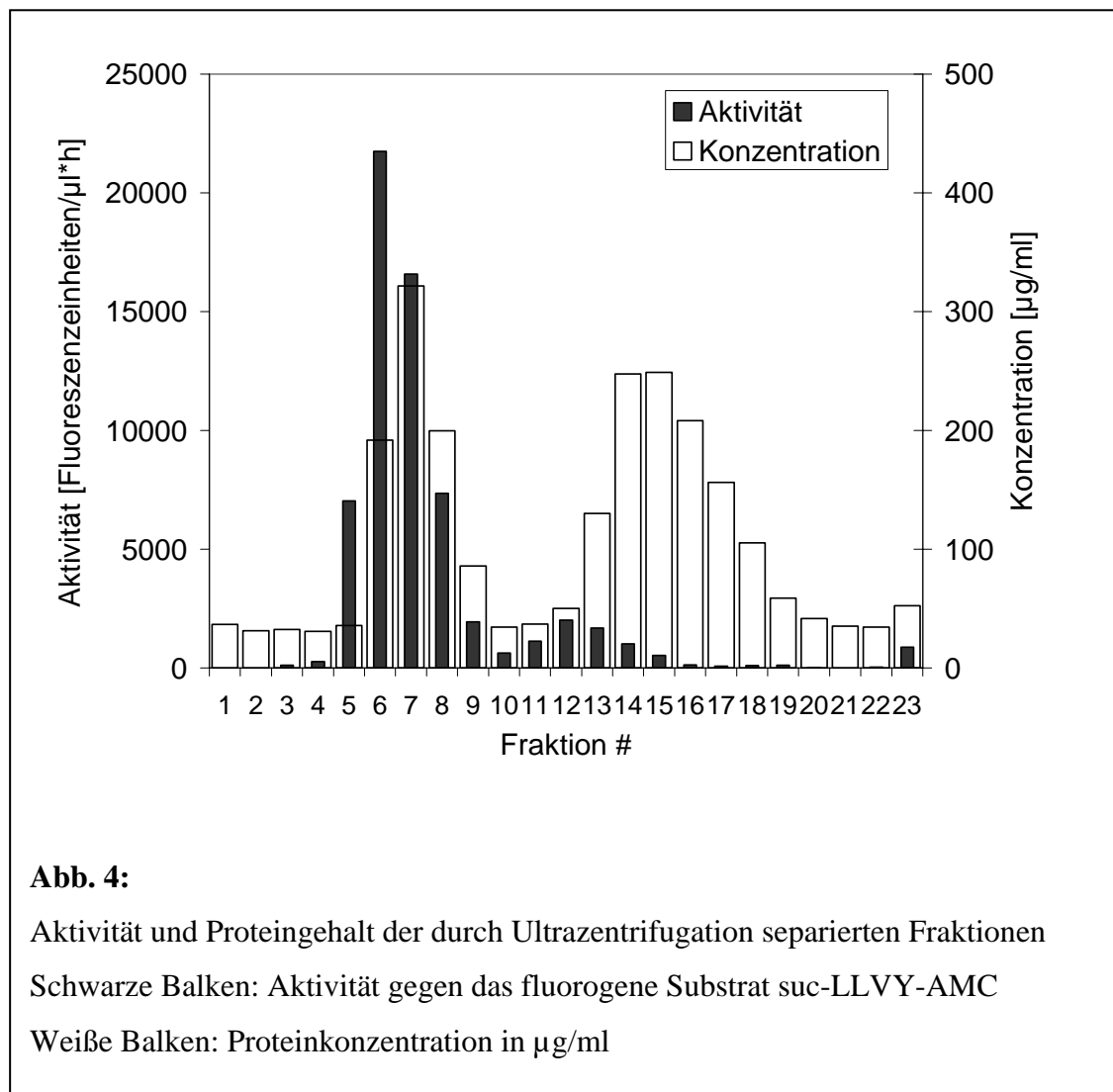
Nach erfolgter Lyse der Zellen im Douncehomogenisator und Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation erfolgt als erster Reinigungsschritt die Adsorption des Zelllysates an DEAE-52-Servacel im Batchverfahren. Hierdurch erfolgt die Abtrennung eines großen Teils zellulärer Proteine sowie auch von Membranbestandteilen, die durch den Zentrifugationschritt nicht abgetrennt werden konnten. Nach Adsorption des Lysates wurde das Ionenaustauschermaterial mit jeweils 250 ml TSDG₇₅ und TSDG₁₂₅ gewaschen und das gebundene Proteasom mit TSDG₃₀₀ eluiert. Am Elutionsprofil der Batchadsorption (Abb. 2) erkennt man, dass sowohl während des Lade/Waschschrtes mit TSDG₇₅ als auch während des Waschschrtes mit TSDG₁₂₅ Proteasen von dem Ionenaustauschermaterial eluiert werden, die jedoch nicht durch den proteasomspezifischen Inhibitor Lactacystin hemmbar sind. Erst durch Elution mit TSDG₃₀₀ kann schließlich das Proteasom eluiert werden, die Aktivität der entsprechenden Fraktionen lässt sich fast vollständig durch Lactacystin inhibieren. Für die weitere Aufreinigung durch Ammoniumsulfatpräzipitation wurden Fraktionen mit mehr als halbmaximaler Aktivität gepoolt und weiterverwendet.

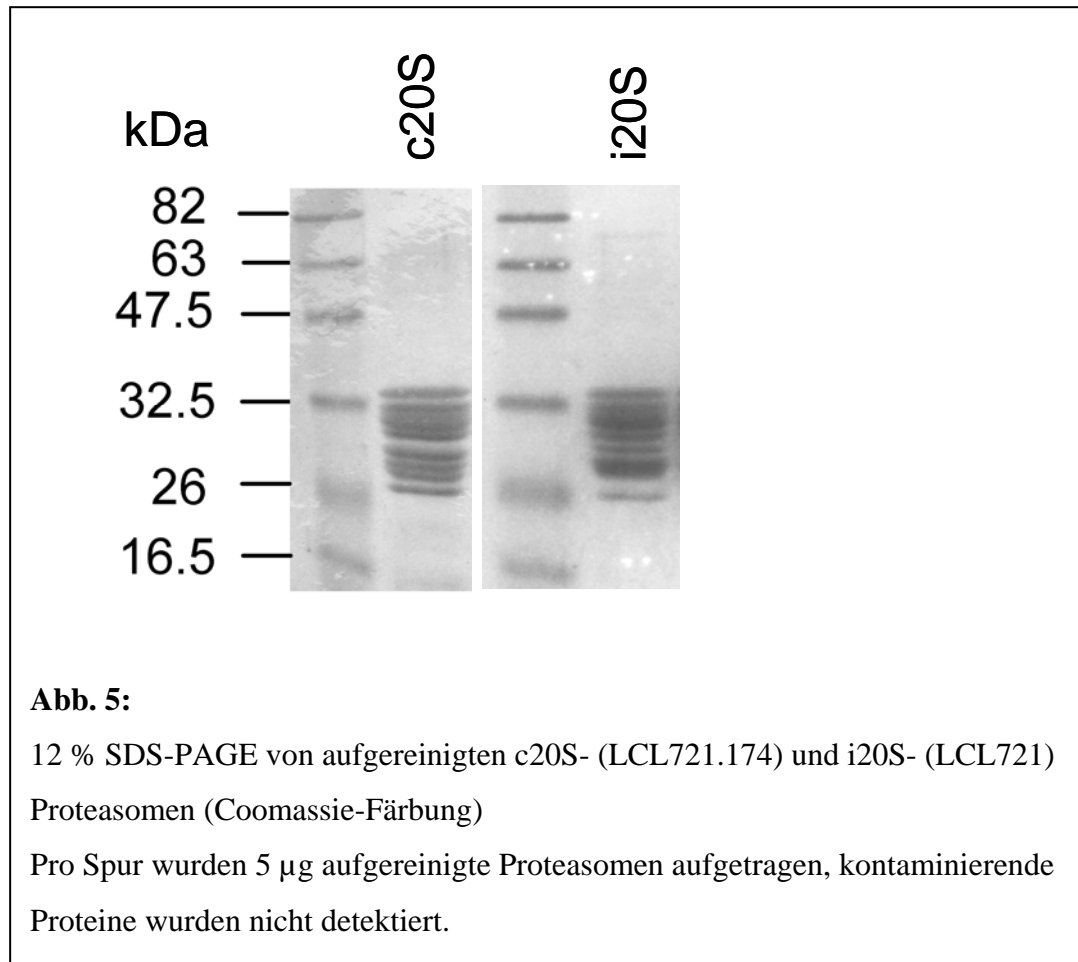


Durch eine zweistufige (0-30%) und (30-70%) Ammoniumsulfatpräzipitation wurde das Eluat weiter fraktioniert. Der Großteil (ca. 80-90%) der Lactacystin-inhibierbaren Aktivität findet sich in dem Präzipitat 30-70%, das in TSDG₂₅ resuspendiert und weiter durch eine Anionenaustauschchromatographie über eine TSK-DEAE-650S Säule mit einem Volumen von 100 ml aufgereinigt wurde (Elutionsprofil: Abb. 3a). Das 20S-Proteasom eluiert bei einer Konzentration von 22% B entsprechend einer Leitfähigkeit von ca. 210 mM (Abb. 3 b/c). Alle Fraktionen mit mindestens halbmaximaler Aktivität wurden durch SDS-PAGE analysiert und vereinigt. Die Proteasomenpräparation besitzt nach diesem Reinigungsschritt bereits eine Reinheit von ca. 80% (Abb. 3d).



Anschließend wurde das Proteasom weiter über eine Glyceringradienten-Ultrazentrifugation mit einem Gradienten von 15 % bis 40 % (w/v) Glycerin aufgereinigt (Abb. 4) und abschließend durch Ultrafiltration über eine 100 kD Cutoff-Membran aufkonzentriert, wodurch verunreinigende Proteine fast vollständig abgetrennt werden konnten. Die durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung bestimmte Reinheit der aufgereinigten Proteasomen liegt bei über 95 % (Abb. 5).

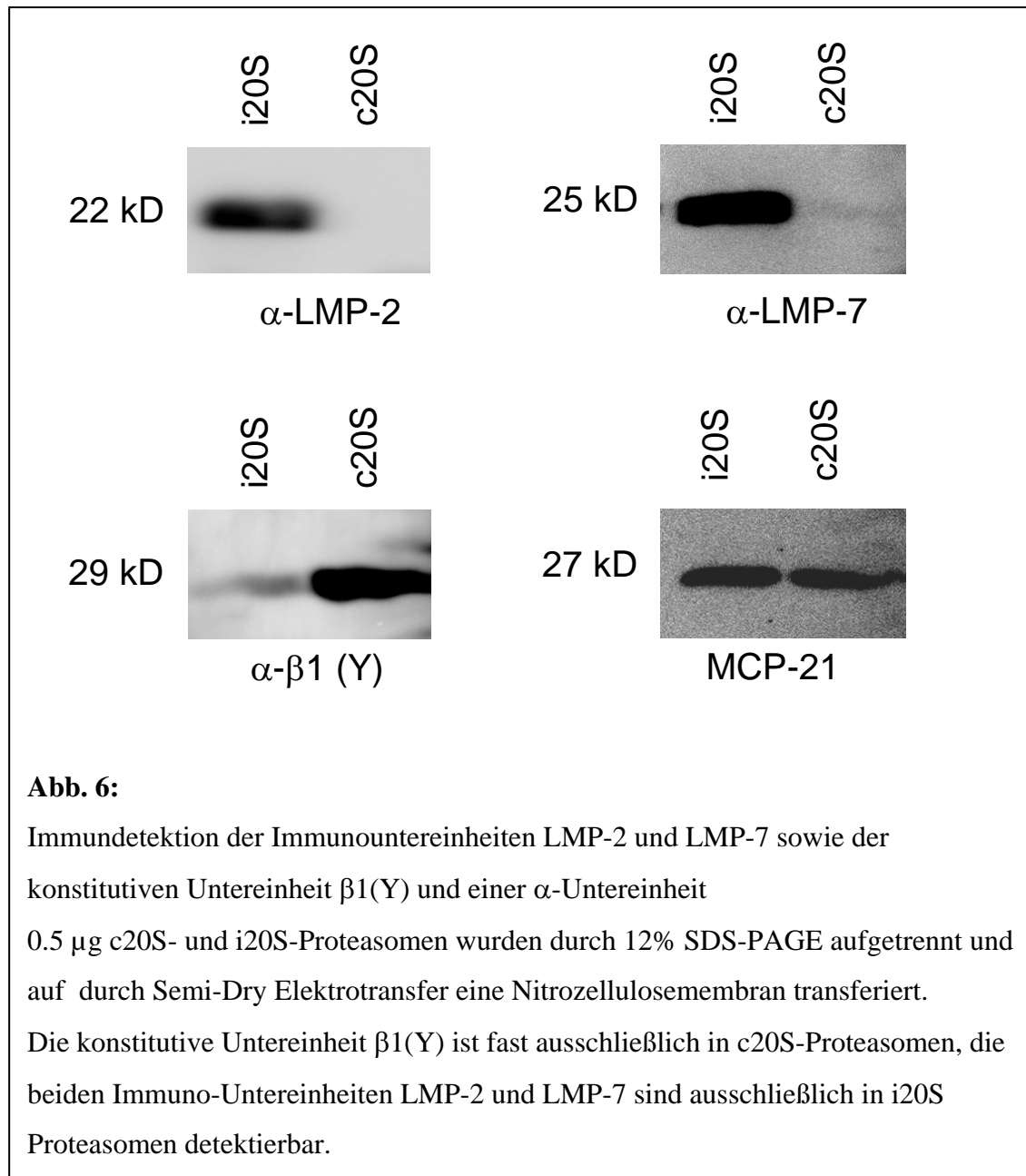




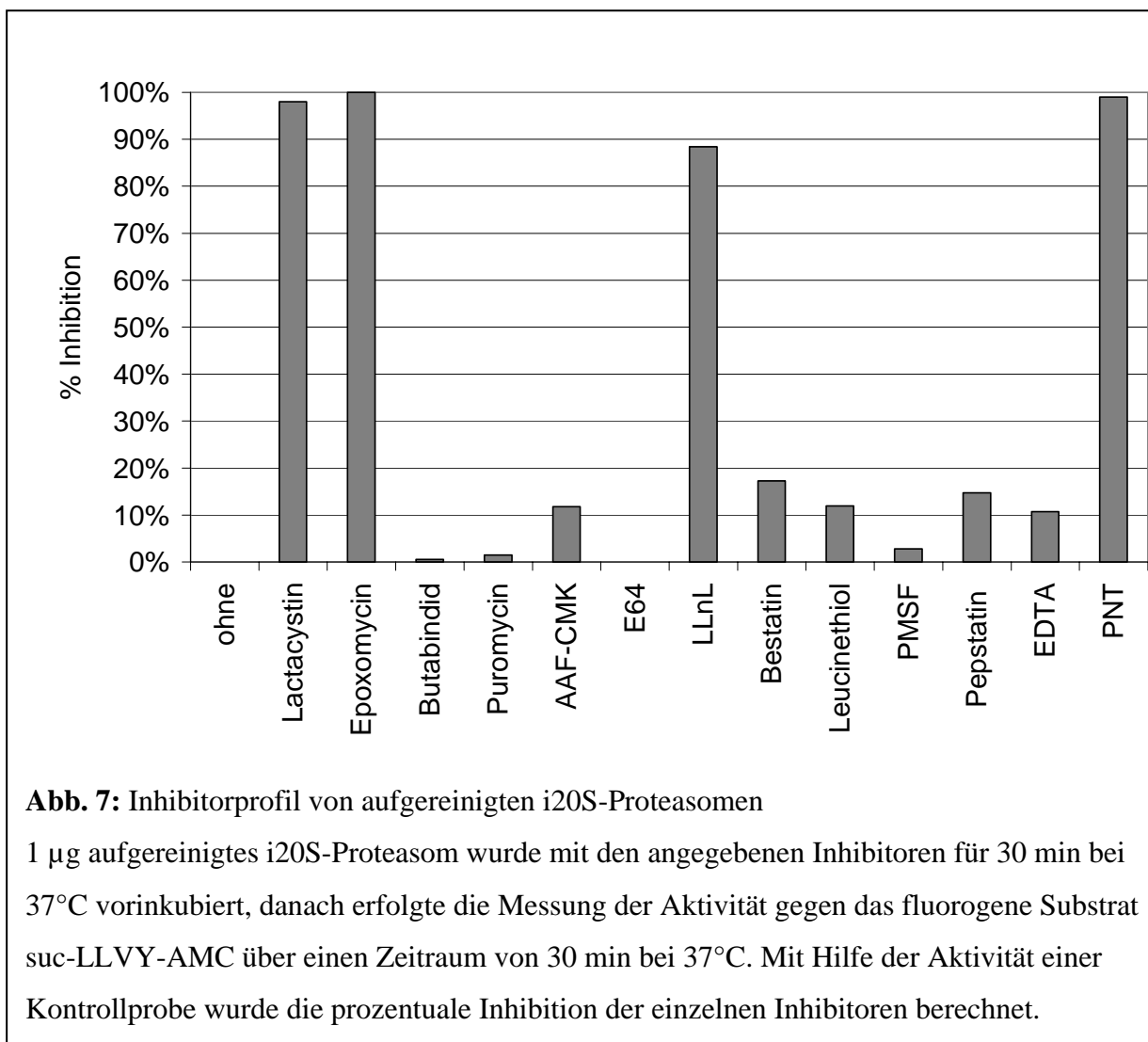
Sowohl immuno-20S-Proteasomen als auch konstitutive 20S-Proteasomen konnten in hoher Reinheit aus den Zelllinien LCL 721 und LCL 721.174 aufgereinigt werden. Zur weiteren Charakterisierung der beiden unterschiedlichen Proteasomenspezies wurden diese durch Immunoblotting mit Antikörpern gegen eine α -Untereinheit, die konstitutive Untereinheit β_1 (Y) sowie gegen die Immuno-Untereinheiten LMP-2 und LMP-7 untersucht (Abb. 6).

Der Antikörper MCP-21 ist gegen eine der α -Untereinheiten des 20S-Proteasoms gerichtet, diese Färbung dient der Kontrolle der geladenen Proteinmenge. Die Anwesenheit der konstitutive Untereinheit β_1 konnte in c20S-Proteasomen sehr gut detektiert werden, eine Detektion in der i20S-Präparation ist zwar möglich, jedoch lässt die beobachtete Bandenintensität auf einen Anteil dieser Untereinheit von maximal 5% schließen. Die beiden Immuno-Untereinheiten LMP-2 und LMP-7 können ausschließlich in der Immunoproteasomen-Präparation detektiert werden. Die Anwesenheit der dritten Interferon- γ induzierbaren Untereinheit MECL-1 kann nicht detektiert werden, da für diese Untereinheit keine spezifischen Antikörper verfügbar sind, eine Anwesenheit dieser Untereinheit in der

konstitutiven 20S-Präparation kann jedoch ausgeschlossen werden, da für ihren Einbau unbedingt die Immuno-Untereinheit LMP-7 benötigt wird (Groettrup et al., 1997).

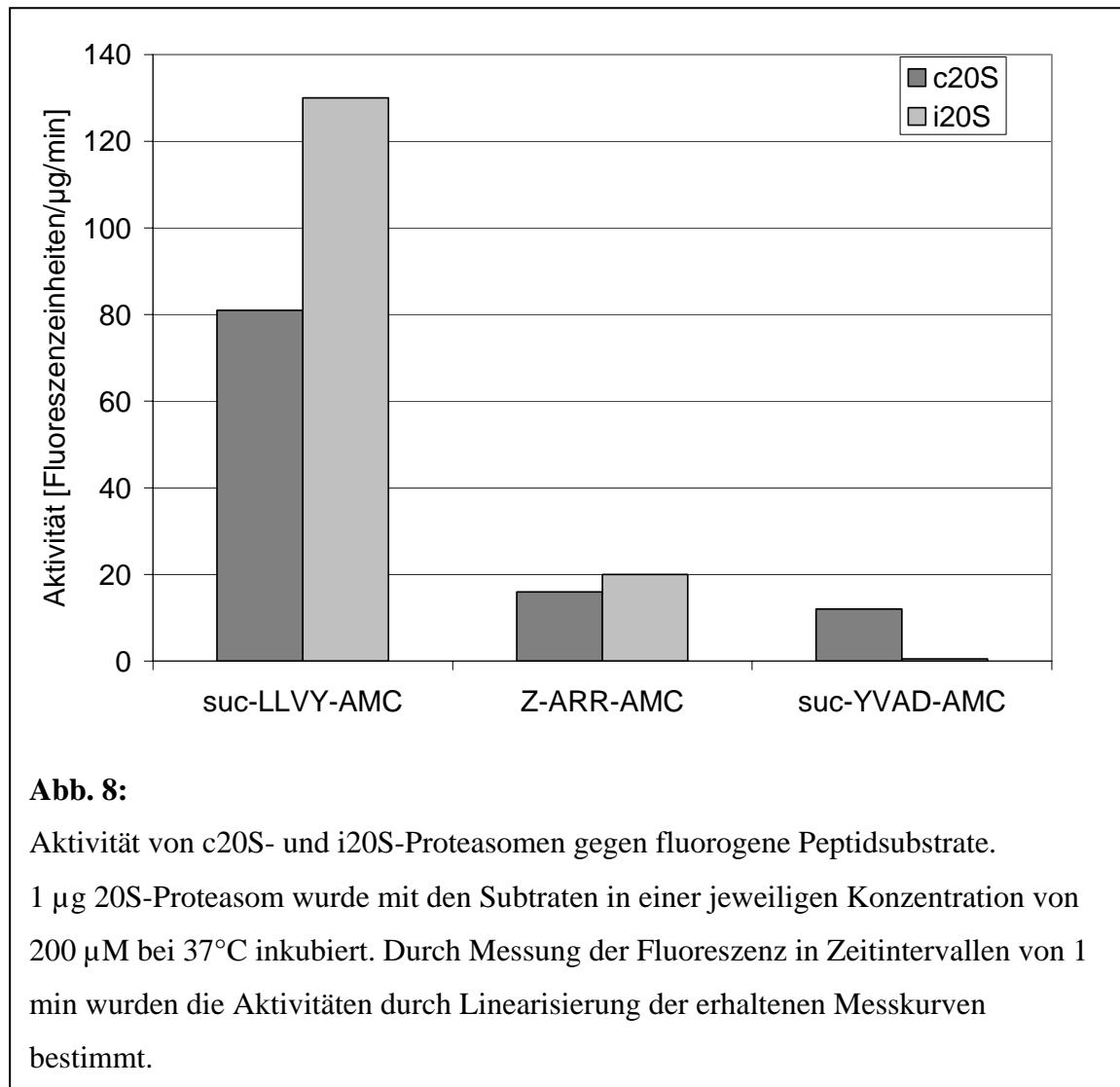


Die Anwesenheit der zytosolischen Protease TPPII konnte durch die Aufnahme eines Inhibitorprofils ausgeschlossen werden. Abb. 7 zeigt den Einfluß unterschiedlicher Inhibitoren auf die Aktivität von i20S Proteasomen, für c20S-Proteasomen wurden entsprechende Ergebnisse erhalten.



Die aufgereinigten Proteasomen sind fast vollständig durch die proteasomenspezifischen Inhibitoren Lactacystin und Epoxomycin inhibierbar, auch die Inhibitor PNT und LLnL, die relativ unspezifisch zytosolische Proteasen inhibieren, inhibieren das Proteasom zu über 80%. Der TPPII-spezifische Inhibitor Butabindid, Puromycin (hemmt die Aminopeptidase PSA), der Cysteinproteaseinhibitor E64 sowie der Serinproteaseinhibitor PMSF zeigen keine signifikante Inhibition der proteasomalen Aktivität. AAF-CMK, Bestatin, Leucinethiol, Pepstatin und EDTA inhibieren das Proteasom nur in geringem Maße.

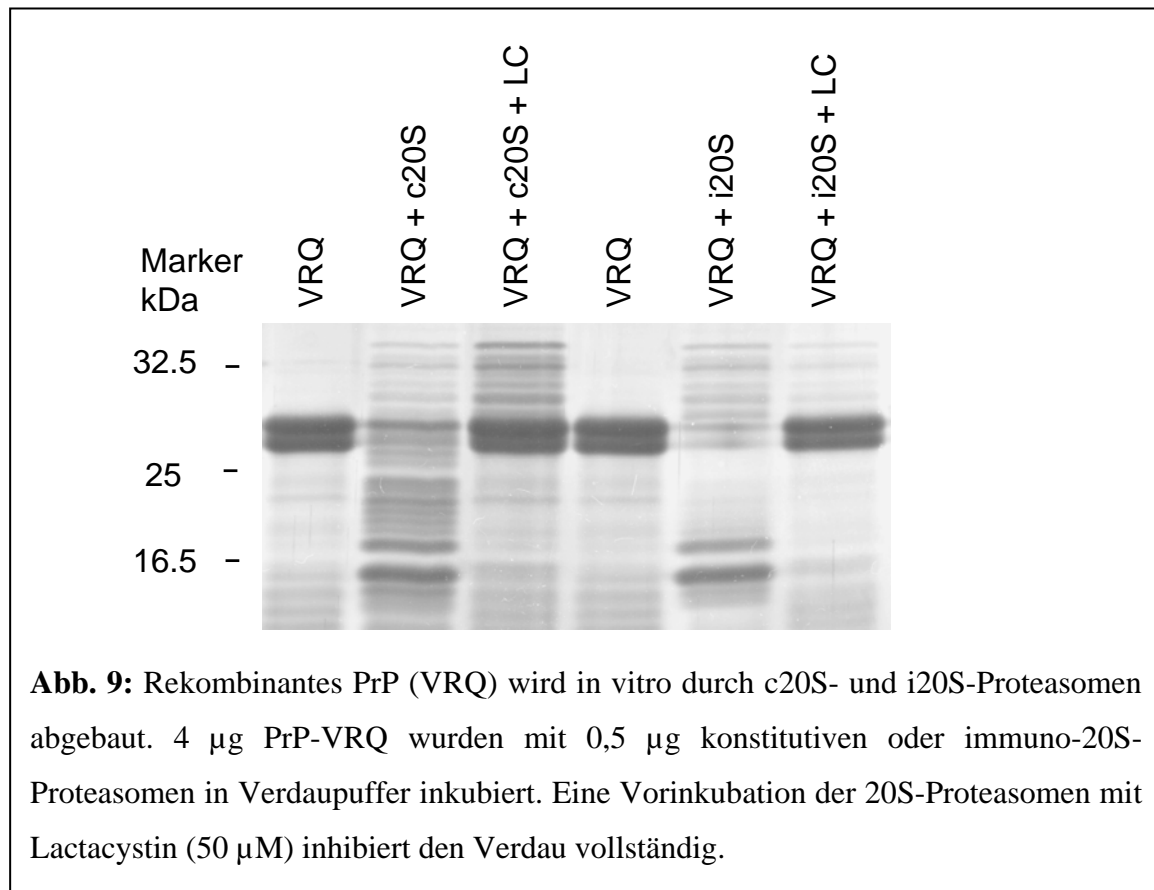
Durch die Verwendung unterschiedlicher fluorogener Substrate, die durch unterschiedliche Aktivitäten des Proteasoms geschnitten werden können, erfolgte eine zusätzliche Charakterisierung der beiden Proteasomenspezies (Abb. 8).



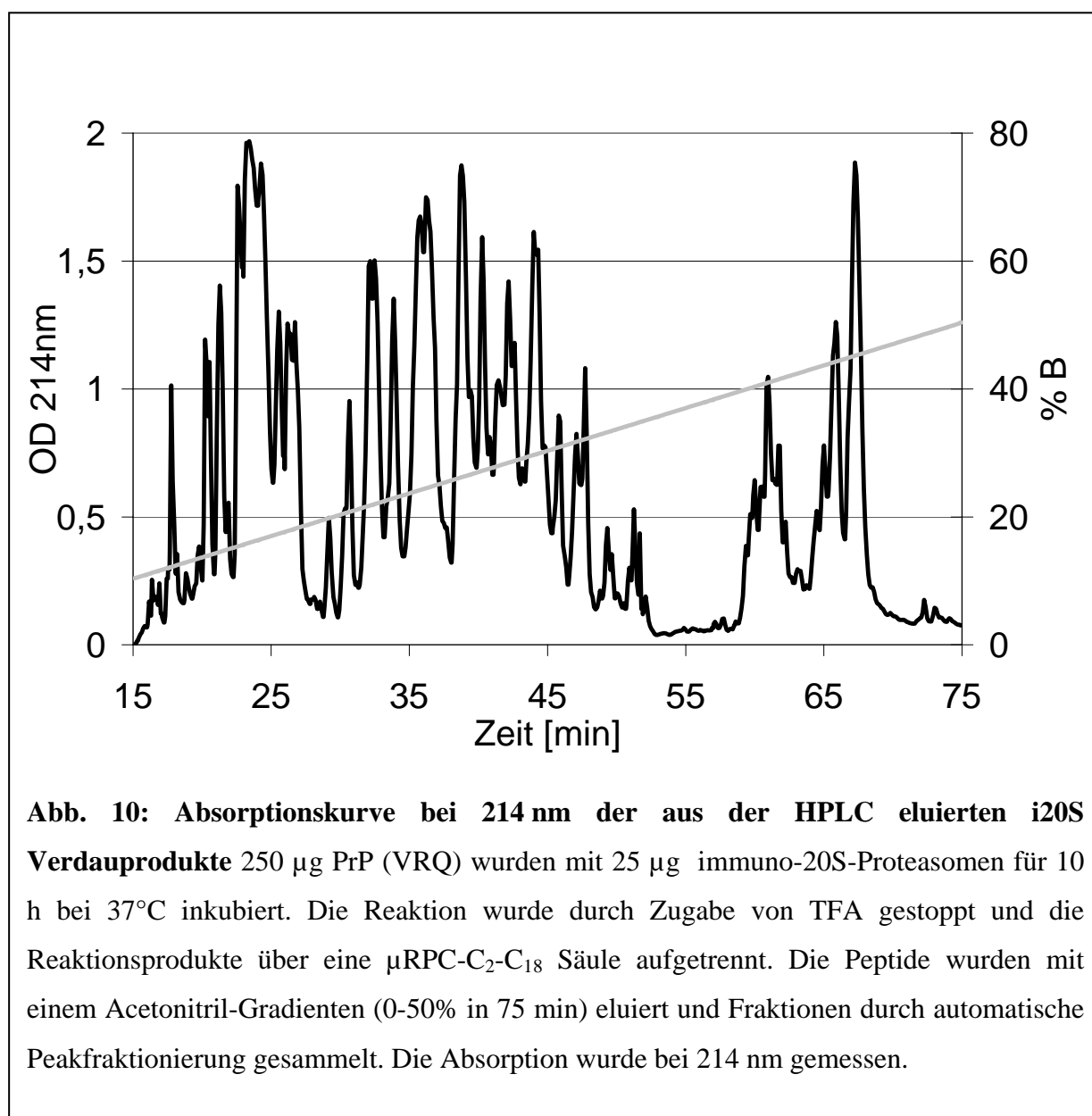
Während sich die durch das Substrat Z-ARR-AMC gemessene tryptische Aktivität zwischen beiden Proteasomenspezies wenig unterscheidet, findet man bei i20S-Proteasomen eine gegenüber c20S-Proteasomen um ca. 55% erhöhte chymotryptische Aktivität (gemessen durch suc-LLVY-AMC). Die mit dem Substrat suc-YVAD-AMC gemessene „saure“, auch als „caspase-like“ oder PGPH (Post-Glutamyl-Peptidyl-Hydrolyzing-) bezeichnete Aktivität ist nur bei c20S-Proteasomen detektierbar, was auf einen geringen Anteil der konstitutiven Untereinheit $\beta_1(\text{Y})$ in der i20S Präparation hinweist.

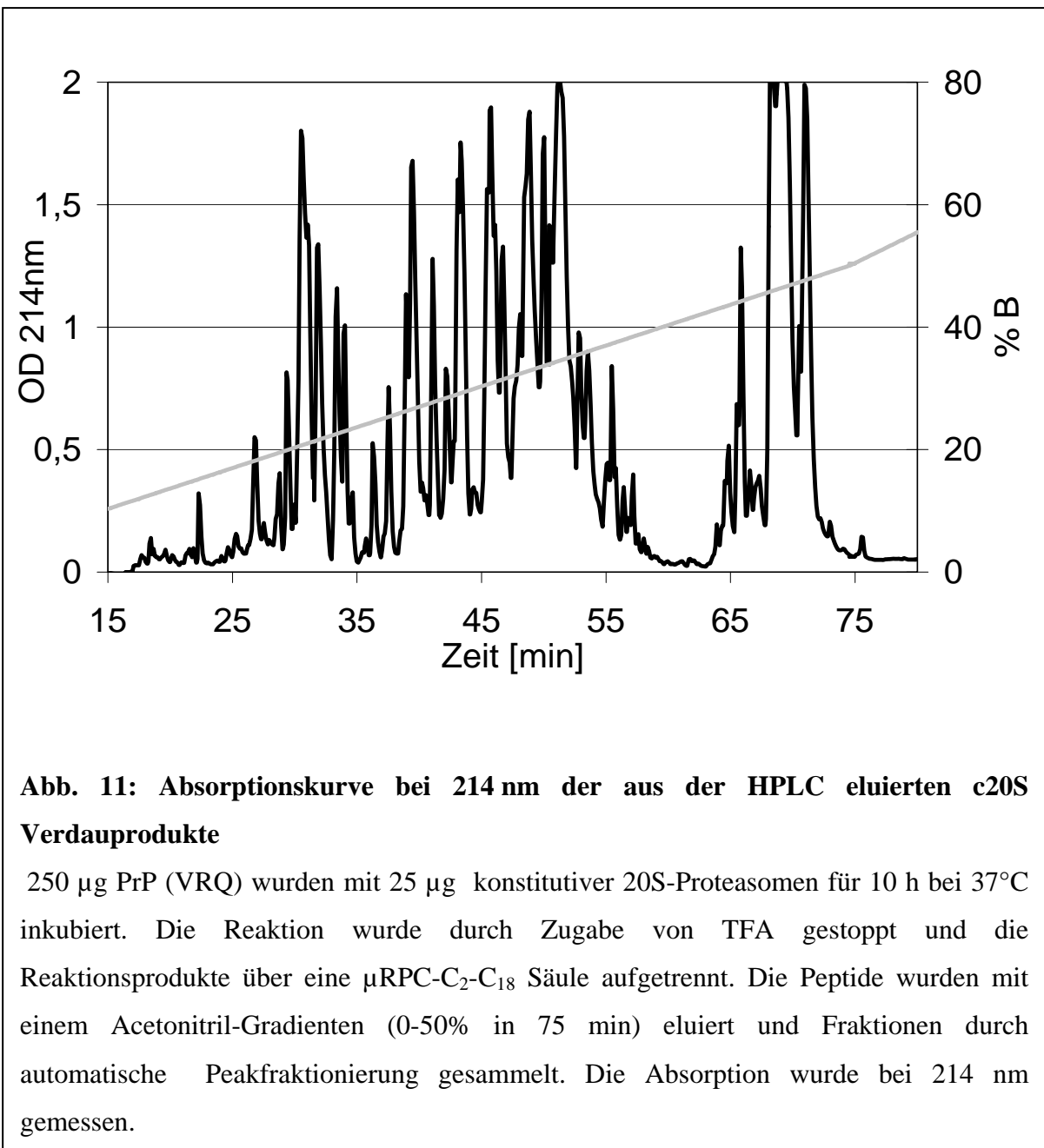
2. In vitro Verdau von rekombinantem Schaf-Prion-Protein (Prp23-234) durch c20S- und i20S-Proteasomen

Der Großteil der zum Schnittverhalten von konstitutiven und immuno-20S-Proteasomen verfügbaren Daten wurde entweder durch kurze fluorogene Peptidsubstrate oder aber durch den *in vitro* Verdau von Peptiden bis zu 27 Aminosäuren Länge generiert. Im Gegensatz dazu stehen bislang wenige Informationen über proteasomale Schnittstellen in intakten Proteinen zur Verfügung ((Emmerich et al., 2000; Toes et al., 2001; Lucchiari-Hartz et al., 2003). Diese Verdaudaten wurden zum Teil in Anwesenheit von SDS generiert, dessen exakter Einfluss auf das Proteasom bisher nicht geklärt ist. Allerdings nimmt man an, dass SDS nur der Öffnung des durch die N-Termini der α -Ketten blockierten Zugangs zum katalytischen Kompartiment des 20S-Proteasoms dient (Gating-Effekt). Zudem sind nicht für alle untersuchten Substrate quantitative Daten verfügbar, außerdem wurde zum Teil nur eine Proteasomenspezies untersucht. Um den existierenden Datenpool zu vergrößern, wurde rekombinantes Schaf-Prion-Protein (PrP) als Substrat für konstitutive und immuno-20S-Proteasomen verwendet. Im Gegensatz zu Verdauexperimenten mit Hefe-Enolase-1 wurde für den Verdau von PrP kein SDS benötigt. Die Inkubation von 20S-Proteasomen mit einem 200-fachen Überschuss von PrP führt nach 16 h zu einem kompletten Abbau dieses Substrates, wobei der Verdau vollständig durch Zugabe des proteasomalen Inhibitors Lactacystin inhibiert werden kann (Abb. 9).



Für die quantitative Analyse der Verdauprodukte wurden 250 µg PrP mit 25 µg 20S-Proteasomen (entsprechend einem 250-fachen molaren Substratüberschuss) für eine Dauer von 10 h bei 37°C inkubiert. Innerhalb dieser Zeitspanne werden zwischen 50% und 70% des eingesetzten Substrates durch beide Spezies des 20S-Proteasoms abgebaut, wie durch Vorversuche ermittelt wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von TFA bis zu einer Endkonzentration von 0,1% und anschließendes Einfrieren bei -80°C gestoppt. Die Degradationsprodukte wurden mittels reversed-Phase-HPLC über eine µRPC PC2.1/10 Säule mit einem Acetonitrilgradienten aufgetrennt (Abb. 10 + 11)





Die eluierten Peptide wurden durch automatische Peak-Fraktionierung separiert und alle gesammelten Fraktionen durch MALDI-MS und Edman-Abbau analysiert, wodurch eine quantitative Identifizierung aller generierten Peptide möglich ist. Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle 3 und 4 zusammengefasst. Die generierten Fragmente lassen sich graphisch als Verdaukarten darstellen (Abb. 12 + 13). In den Karten sind alle Fragmente, die mit einer Menge von mindestens 30 pmol identifiziert wurden, sowie sämtliche identifizierten Schnittstellen dargestellt.

Tabelle 3: Identifizierte Fragmente aus dem Verdau von PrP mit c20S-Proteasomen

Fraktion	MALDI	MALDI	Sequenzen	Position	pmol
	M (real)	M (gemessen)			
1	326,2	327,0	HVA	114-116	5
2	326,2		HVA	114-116	5
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9	954,6	955,4	SKKRP...	24-32	15
	1013,6	1014,3	NKPSKPKTN	103-111	10
10	1013,6	1013,6	NKPSKPKTN	103-111	10
	596,3	596,9	HVAGAAA	114-120	7
11		955,5	SKKRPKPGG	24-32	5
			HVAGA	114-	3
12	899,5	899,5	NKPSKPKT	103-110	20*
	1272,7	1288,3	NKPSKPKT...	103-113	20*
	754,3	754,2	NTGGSRY	35-41	15
13	754,3	754,3	NTGGSRY	35-41	10
14					
15					
16			GSVMSRP...	134-	25
17	636,3	636,7	GSVMSR	134-139	30
18	754,3	754,3	NTGGSRY	35-41	10
19	636,3	636,5	GSVMSR	134-139	20
	1272,7	1272,6	NKPSKPKT...	103-113	80
	636,3	636,5	GSVMSR	134-139	20
20					
21					
22					
23	1180,5	1181,0	NTGGSRY...	35-46	5*
	1036,5	1036,7	NTGGSRY...	35-44	5*
	796,4	796,7	TTKGENF	195-201	
24					
25	712,3	713,0	YRENM	153-157	10
	1044,5	1043,9	MVKSHI...	1-9	6*
	1157,6	1157,8	MVKSHI...	1-10	6*
26	1508,8	1509,8	NKPSKPKT...	103-112	80
	1089,5	1089,9	PGQGSPG...	42-52	40
	828,4	829,2	QAYYQR	226-231	20*
	1043,5	1044,0	QAYYQRG..	226-234	20*
27	777,4	777,0	RPVDQY	167-172	20
	1508,8	1510,1	NKPSKPKT...	103-115	8*
	1707,9	1707,7	NKPSKPKT...	103-118	8*
	678,3	677,4	GWNTGGS...	33-39	3*
	997,4	998,3	GWNTGGS...	33-41	3*
			AGAAAA...	116-	
	1044,5	1044,1	ESQAYYQR	224-231	5*
	1259,6	1259,3	ESQAYYQR...	224-234	5*

Tabelle 3: Identifizierte Fragmente aus dem Verdau von PrP mit c20S-Proteasomen (Fortsetzung)

Fraktion	MALDI	MALDI	Sequenz	Position	pmol
	M (real)	M (gemessen)			
28	1375,6	1376,0	GQPHGGG...	85-99	10*
	1462,6	1462,8	GQPHGGG...	85-100	10*
	1590,7	1591,3	GQPHGGG...	85-101	10*
29	1311,7	1311,6	SKKRPKPGG...	24-35	10*
	1469,8	1468,9	SKKRPKPGG...	24-37	10*
	1526,8	1526,5	SKKRPKPGG...	24-38	10*
	1328,6	1328,1	QRESQAY...	222-231	10*
	1385,7	1385,2	QRESQAY...	222-232	10*
	1543,7	1543,7	QRESQAY...	222-234	10*
	776,4	776,0	RYPNQV	159-164	15
30	757,3	757,8	GQGGSHS...	94-101	120*
	943,4	943,5	GQGGSHS...	94-102	120*
	1469,8	1470,3	SKKRPKP...	24-37	10
31	1469,8	1470,8	SKKRPKP...	24-37	60
			PGGNRY...	47-	
			PKTNMK	108-	
32	1412,8	1413,7	SKKRPKP...	24-36	90
	1031,4	1031,6	GNDYEDR...	145-152	30
	1044,5	1044,8	QRESQAY...	222-229	20*
	1328,6	1329,6	QRESQAY...	222-231	20*
	795,4	796,1	GQPHGGG...	61-68	450*
	852,4	852,7	GQPHGGG...	61-69	450*
	1272,4	1271,6	GQPHGGG...	61-73	450*
33	1031,4	1032,0	GNDYEDR...	145-152	40
	795,4	796,0	GQPHGGG...	61-68	100
34			SKKRPKP...		450
	1198,6	1199,1	TVTTTTK...	191-201	60
	632,3	633,1	MYRY	157-160	50
35			GQPHGGG...	61-	20
	1824,8	1826,0	NTGGSRY...	35-52	70
	756,0	757,4	YYQRGA	228-233	50
	1609,7	1610,3	GGSRYPG...	37-52	10
	1552,7	1553,4	GSRYPGQ...	38-52	20
	1231,6	1252,1	PPQGGGG...	53-65	100
	698,4	698,5	PKPGGGW	28-34	30
36	2433,2	2435,1	GQGGSHS...	94-115	100
	754,3	755,7	NTGGSRY	35-41	20*
	1824,8	1826,5	NTGGSRY...	35-52	20*
	940,5	940,9	YRPVDQY	166-172	30
37	1593,7	1593,1	GNDYEDR...	145-156	20
	2433,2	2434,4	GQGGSHS...	94-115	15
38	939,4	939,1	YRYPNQV	158-164	20*
	1421,7	1422,2	YRYPNQV...	158-167	20*
39			PGQGSPG...	42-	70
	1479,6	1478,9	GNDYEDR...	145-155	10
	1933,0	1933,2	SKKRPKP...	24-41	10

Tabelle 3: Identifizierte Fragmente aus dem Verdau von PrP mit c20S-Proteasomen (Fortsetzung)

Fraktion	MALDI	MALDI	Sequenzen	Position	pmol
	M (real)	M (gemessen)			
40	1933,0	1931,7	SKKRPKP...	24-41	70*
	2215,1	2214,0	SKKRPKP...	24-44	70*
	2359,2	2357,9	SKKRPKP...	24-46	70*
	2684,3	2683,0	SKKRPKP...	24-50	70*
	2771,3	2770,2	GQPHGGG...	85-111	10
41	3030,5	3028,6	GQPHGGG...	85-113	40
	1933,0	1932,8	SKKRPKP...	24-41	15*
	2570,3	2569,9	SKKRPKP...	24-49	15*
	1250,6	1249,8	PNQVYYR...	161-170	20
	1103,5	1102,6	YYRPVDQY	165-172	40*
	3282,5	3281,6	YYRPVDQY	165-191	40*
???			MERYYEQ...	209-	10
	1164,6	1177,5	AGAVVGGGL...	121-133	5
??	1193,5	1193,5	YEDRYR...	148-155	20*
	1438,6	1437,5	YEDRYR...	148-157	20*
42	3003,5	3004,9	SKKRPKP...	24-52	15
	3265,5	3266,5	GQPHGGG...	85-115	50*
	2151,9	2152,6	GQPHGGG...	77-99	50*
	2239,0	2239,5	GQPHGGG...	77-100	50*
43	3003,5	3003,2	SKKRPKP...	24-52	380
	1102,5	1102,2	YRYPNQVY	158-165	30
	1724,7	1724,3	GNDYEDR...	145-157	60
			CITQYQR...	217-	5
44	3003,5	3004,7	SKKRPKP...	24-52	15
	2104,9	2106,3	GQPHGGG...	61-	10
45	1756,8	1756,8	GQPHGGG...	61-	20*
	2047,9	2047,8	GQPHGGG...	61-	20*
	3003,5	3004,1	SKKRPKP...	24-52	10
46	1776,8	1777,3	GQPHGGG...	85-102	80
	1412,8	1413,4	SKKRPKP...	24-36	15
	2504,1	2504,4	GGGWNTG...	31-55	80
	1601,7	1601,5	YEDRYR...	148-158	10
			GAVVGGGL...	122-	10
47	1233,6	1233,5	MYRYPNQV...	157-165	10
	3806,8	3806,4	GQPHGGG...	77-	10
	1541,7	1541,8	PNQVYYR...	161-172	150
	2560,3	2560,3	AGAVVGGGL...	121-146	5
48			SKKRPKP...	24-	10
	1887,8	1888,1	GNDYEDR...	145-158	50
	2561,2	2561,2	GGGWNTG...	31-56	5
	1716,7	1717,1	DYEDRYR...	147-158	10
	1571,7	1571,5	GQPHGGG...		100*
49	1628,7	1629,1	GQPHGGG...		100*
	4042,9	4042,0	GQPHGGG...		100*
	1887,8	1887,4	GNDYEDR...	145-158	15
	2561,2	2560,5	GGGWNTG...	31-56	10
	2346,1	2345,8	GSRYPGQ...	38-61	20
			SKKRPKP...	24-	10
			ITQYQRES...	218-	30

Tabelle 3: Identifizierte Fragmente aus dem Verdau von PrP mit c20S-Proteasomen (Fortsetzung)

Fraktion	MALDI	MALDI	Sequenz	Position	pmol
	M (real)	M (gemessen)			
50	1571,7	1572,1	GQPHGGG...		400
			SKKRPKP...	24-	35
	1265,6	1265,6	YRYPNQVYY	158-161	20
51	1732,8	1732,6	YRYPNQVYY	158-170	15
			TNMKH...	110-	50
52			SKKRPKP...	24-	5
	1038,4	1039,1	YYRENMR...	152-158	30*
	1795,8	1796,6	YYRENMR...	152-164	30*
		2561,9			
53	3739,8	3740,4	SKKRPKP...	24-60	230
	1553,6	1554,0	DYEDRY...	147-157	20
	1860,9	1861,4	RYPNQVYY...	159-172	30
	2206,9	2207,4	GNDYEDR...	145-160	30
		4584,2	GQPHGGG...		20
	1261,7	1262,3	AGAAAAG...	116-131	10
	959,5	960,0	GSVMSRPL...	134-142	40
54			SKKRPKP...	24-	30
	3742,8	3742,0	AGAAAAG...	116-152	10
	767,4	767,0	GGLGGYML	126-133	10
	1396,6	1397,3	MYRYPNQV...	157-166	50
55			AGAAAAG...	116-	5
			GQPHGGG...		30
	2645,1	2644,5	GNDYEDR...	145-164	5
	4820,4	4819,8	SNQNNFV...	173-214	5
	3739,8	3739,1	SKKRPKP...	24-60	20
56	1870,8	1869,5	GQPHGGG...	77-96	70*
	2553,1	2552,1	GQPHGGG...	77-102	70*
	3739,8	3738,9	SKKRPKP...	24-60	80
	2024,0	2023,4	YRYPNQVYY...	158-172	20
57	1011,6	1012,5	SKKRPKP...	24-33	10*
	2840,5	2841,2	SKKRPKP...	24-51	10*
	2024,0	2023,5	YRYPNQV...	158-172	10
	2426,1	2425,6	YREMYR...	153-170	10
	1422,6	1423,8	NDYEDRY...	146-155	10
	1171,5	1171,9	GLGGYMLG...	127-138	5
58			SKKRPKP...	24-	10
			GQPHGGG...		20
	869,5	869,5	SRPLHF	138-144	20
	782,5	782,5	RPLHF	139-144	20
			NTGGSRY...	35-	50
	3335,7	3335,7	TVKQHTV...	186-214	10
59	4516,2	4514,2	SKKRPKP...	24-68	200
	2348,0	2347,3	GQPHGGG...		80
			REMYRY...	154-	20
			NTGGSRY...	35-	15
	2808,2	2807,2	GNDYEDR...	145-165	20

Tabelle 3: Identifizierte Fragmente aus dem Verdau von PrP mit c20S-Proteasomen (Fortsetzung)

Fraktion	MALDI	MALDI	Sequenzen	Position	pmol	
	M (real)	M (gemessen)				
60	4516,2	4515,4	SKKRPKP...	24-68	60	
	3329,4	3328,1	GQPHGGG...		30	
			AVVGGLG...	123-	20	
	626,4	626,5	PLIHF	140-144	50*	
	1075,5	1075,5	PLIHFGND...	140-148	50*	
	2201,0	2200,6	PLIHFGND...	140-156	50*	
	3438,5	3437,7	GNDYEDR...	145-170	15	
101			AGAVVGG...	121-	10	
			TNMKHVA...	110-	10	
102			PLIHF	140-144	25	
			GNDYEDR...	145-166	20	
			SPGGNRY...	46-58	30	
103			SKKRPKP...	24-	150	
	1098,6	1099,8	AGAAAAG...	116-130	40*	
	1392,7	1393,0	AGAAAAG...	116-132	40*	
	3179,6	3180,1	AGAAAAG...	116-148	40*	
	1300,7	1300,9	GSVMSRP...	134-145	30*	
	1692,8	1692,7	GSVMSRP...	134-148	30*	
	2818,3	2818,6	GSVMSRP...	134-156	30*	
	3377,6	3377,5	SNQNNFV...	173-202	20	
	3729,6	3728,8	GNDYEDR...	145-172	20	
	2647,1	2646,7	GQPHGGG...	69-96	40	
	1521,8	1522,3	YQRGASV...	229-234	50	
	626,4	626,4	PLIHF	140-144	10	
	2308,0	2307,5	PPQGGGGW...	53-76	80	
	104	1243,7	1243,7	GSVMSRP...	134-144	100*
		2256,1	2256,1	GSVMSRP...	134-153	100*
2332,0		2332,0	PLIHFGN...	140-157	10	
105			SKKRPKP...	24-	30	
	3084,4	3085,8	PPQGGGGW...	53-84	50	
			GSVMSRP...	134-	15	
106	2513,3	2514,2	SKKRPKP...	24-48	10	
			SVMSRPL...	135-	15	
			LIHFGN...	141-	10	
			AVVGGLG...	123-	20	
107		AGAVVGG...	121-	90		
108	1051,5	1053,3	AGAVVGG...	121-132	20	
109			NKPSKPK...	103-	40	
			AAAGAVV:::	119-	50	
110			GAAAAGA...	117-	20	
			GGGWNTG...	31-	20	
	697,3	397,3	DYEDR	147-151	20	
		GQPHGGG...		20		
111	1505,8	1505,8	AGAAAAG...	116-133	100	
112			AGAAAAG...	116-	20	
113			HVAGAAA...	114-	20	
			TNMKHVA...	110-	25	
114						

Tabelle 3: Identifizierte Fragmente aus dem Verdau von PrP mit c20S-Proteasomen (Fortsetzung)

Fraktion	MALDI M (real)	MALDI M (gemessen)	Sequenzen	Position	pmol
115	1036,6	1052,3	AGAVVGG...	121-	60
116					
117			AGAVVGG...	121-	40
118	1505,8	1505,8	AGAAAAG...	116-133	
119					
120					
121					
122					
123					
124					
125			AGAAAAG...	116-	20
			TETDIKI...	202-	15
			SRPLIHF...	138-	10
			SNQNNFV...	173-	10
126			TETDIKI...	202-	10
			SNQNNFV...	173-	10
		540,6			
127			TETDIKI...	202-	15
			SNQNNFV...	173-	20
128			TETDIKI...	202-	20
			SNQNNFV...	173-	20
129	2267,1	2267,0	TETDIKI...	202-220	30
			SNQNNFV...	173-	30
			AVVGGLG...	123-	15
	1051,5	1053,1	AGAVVGG...	121-132	10
130			TETDIKI...	202-	20
			SNQNNFV...	173-	20
			GSVMSRP...	134-	35
131			TETDIKI...	202-	10
			SNQNNFV...	173-	10
			GSVMSRP...	134-	7
132			AGAVVGG...	121-	10
			TETDIKI...	202-	10
			SNQNNFV...	173-	20
			YQRGASVI...	229-	10
133			SNQNNFV...	173-	20
			AGAAAAG...	116-	20
			SKKRPKP...	24-	80
			MERVVEQ...	209-	20
134			SNQNNFV...	173-	30
			AGAAAAG...	116-	10
			MERVVEQ...	209-	20
	7639,7	7638,4	NKPSKPK...	103-170	90
	3394,6	3396,0	GQPHGGG...	85-117	100*
	4232,1	4248,4	GQPHGGG...	85-128	100*
135			MERVVEQ...	209-	10
			AGAVVGG...	121-	15
			NKPSKPK...	103-	15

Tabelle 3: Identifizierte Fragmente aus dem Verdau von PrP mit c20S-Proteasomen (Fortsetzung)

Fraktion	MALDI M (real)	MALDI M (gemessen)	Sequenz	Position	pmol
136	6884,2	6885,9	AGAAAAG...	116-176	150
			MERVVEQ...	209-	10
			SNQNNFV...	173-	10
			TETDIKI...	202-	5
137			AGAAAAG...	116-	20
	2732,2	2733,1	GGGWNTG...	31-59	30
138			WGQPHGG...		20
			AGAAAAG...	116-	15
139			AGAAAAG...	116-	5
			MERVVEQ...	209-	5
140			AVVGGLG...	123-	30
	3583,7	3614,9	TETDIKI...	202-230	5

Tabelle 4: Identifizierte Fragmente aus dem Verdau von PrP mit i20S-Proteasomen

Fraktion	MALDI M (real)	MALDI M (gemessen)	Sequenz	Position	pmol
1					
2					
3					
4		667,7	HVAGAAAA	114-117	20
			SKK	24-26	2
			YRENM...	153-...	2
5			HVA	114-116	3
6	954,6	954,7	SKKRP.....	24-32	8
			HVAGA	114-118	5
7					
8	1013,6	1014,1	NKPSKPK...	103-111	20
9	1013,6	1014,1	NKPSKPK...	103-111	50
10	1013,6	1014,4	NKPSKPK...	103-111	10
	754,3	754,9	NTGGSRY	35-41	10
11	954,6	955,2	SKKRP.....	24-32	30
			HVAGA	114-118	20
	754,3	754,8	NTGGSRY	35-41	25
	1013,6	1013,5	NKPSKPK...	103-111	10
12	899,5	899,9	NKPSKPK...	103-110	35
13			TNM...	110-112	70
14	754,3	753,7	NTGGSRY	35-41	50
15	636,3	636,1	GSVMR	134-139	120
	754,3	754,0	NTGGSRY	35-41	40
16	636,3	636,4	GSVMR	134-139	185
	754,3	754,4	NTGGSRY	35-41	35
	1272,7	1272,9	NKPSKPK...	103-113	380
17	636,3	637,5	GSVMR	134-139	125
18	831,4	831,8	NRYPPOG	50-56	2
19			NKPSKPK...	103-	45
			YRYPNQV	158-	15
			TTKGE	195-199	10
20	649,3	649,0	TTKGEN	195-200	100
	796,4	796,0	TTKGENF	195-201	5
	712,3	712,3	YRENM	153-157	20
	819,4	818,9	YPGQSP...	41-49	45
	1636,9	1636,3	NKPSKPK...	103-117	10
21	1144,6	1145,8	NKPSKPK...	103-112	165
	1508,8	1510,2	NKPSKPK...	103-115	35
	712,3	712,4	YRENM	153-157	40
22	1089,5	1089,9	PGQGSPGG...	42-52	185
	1043,5	1044,3	QAYYQRGAS	226-234	90
	828,4	828,5	QAYYQR	226-231	10
	1508,8	1510,7	NKPSKPKTN...	103-115	115
	796,4	797,2	TTKGENF	195-201	70
23	1328,6	1329,2	QRESQAYYQ...	222-231	85
	1543,7	1544,4	QRESQAYYQ...	222-234	5
	777,4	777,0	RPVDQY	167-172	210
			NKPSKPKTN...	103-	10

Tabelle 4: Identifizierte Fragmente aus dem Verdau von PrP mit i20S-Proteasomen (Fortsetzung)

Fraktion	MALDI M (real)	MALDI M (gemessen)	Sequenzen	Position	pmol
24			GQPHG...	61-...	10
	777,4	776,1	YRPVDQ	166-171	10
25	1412,8	1413,0	SKKRPKPGGG....	24-36	65
	1469,8	1470,2	SKKRPKPGGG...	24-37	5
	1770,0	1770,5	SKKRPKPGGG...	24-40	5
	1031,4	1031,2	GNDYEDR...Y	145-152	50
	943,4	943,3	GQGGSHSQ...	94-102	325
26	1031,4	1032,1	GNDYEDR...Y	145-152	150
	795,4	796,2	GQPHGGG...	61-68	2140*
	852,4	853,0	GQPHGGG...	61-69	2140*
27	1197,7	1198,7	SKKRPKPGGG	24-34	770
	795,4	796,1	GQPHGGG...	61-68	440
	1198,6	1198,7	TVTTTTKG...	191-201	240
28	1824,8	1826,1	NTGGSRYPGQ...	35-52	205
	1252,6	1253,5	YPGQSPGGNRY	41-52	60
	1197,7	1198,9	SKKRPKPGGG	24-34	15
	1609,7	1611,0	GGSRYPGQGS...	37-52	80
	632,3	632,7	MYRY	157-160	130
29	1824,8	1825,2	NTGGSRYPGQ...	35-52	15
	940,5	940,6	YRPVDQY	166-172	160
	755,3	755,7	PPQGGGGW	53-60	260
30	1593,7	1593,8	GNDYEDRYRE..	145-156	225
	2433,2	2433,8	GQGGSHSQ...	94-115	240
	3171,6	3187,6	GQGGSHSQ...	94-125	240
	783,4	783,5	PNQVYY	161-166	30
	940,5	939,9	YRPVDQY	166-172	10
31	939,5	939,0	YRYPNQV	158-164	20
	1421,7	1422,3	YRYPNQV	158-167	1
	1031,4	1031,4	GNDYEDR...	145-152	2
	1724,7	1740,2	GNDYEDR...	145-157	1
	939,5	939,4	YRYPNQV	158-164	30
32	1479,6	1479,4	GNDYEDR...	145-155	2
	1479,6	1479,4	GNDYEDR...	145-155	30
33	1194,5	1194,9	GNDYEDR...	145-153	15
	939,5	939,6	YRYPNQV	158-164	5
			GSPGGNR...	45-	2
34	1933,0	1932,7	SKKRPKP...	24-41	4
	2203,0	2203,0	GQPHGGG...	85-106	20
	1933,0	1932,9	SKKRPKP...	24-41	30
35	2771,3	2772,3	GQPHGGG...	85-111	30
	1194,5	1194,5	GNDYEDR...	145-153	20
	1103,5	1103,6	YYRPVDQ...	165-172	330
36	3030,5	3030,6	GQPHGGG...	85-113	40
	1438,6	1438,7	EDRYRE...	149-158	15
	1933,0	1934,4	SKKRPKP...	24-41	12

Tabelle 4: Identifizierte Fragmente aus dem Verdau von PrP mit i20S-Proteasomen (Fortsetzung)

Fraktion	MALDI M (real)	MALDI M (gemessen)	Sequenz	Position	pmol
37	3030,5	3031,3	GQPHGGG...	85-113	160
	1103,5	1103,9	YYRPVDQ...	165-172	85
	1178,5	1179,2	FGNDYEDR...	144-152	10
	1438,6	1439,0	EDRYRE...	149-158	20
38	1438,6	1439,2	EDRYRE	149-158	40
	1194,5	1195,0	YRENMYR...	153-160	25
39	3266,6	3268,9	GQPHGGG...	85-115	260
	3003,5	3005,5	SKKRPKP...	24-52	130
	1102,5	1103,3	RYPNQV	158-165	105
	1194,5	1195,4	GNDYEDRYRE..	145-153	205
	1724,7	1725,7	GNDYEDRYRE..	145-157	100
40	3003,5	3003,2	SKKRPKP...	24-52	480
			GQPHGGG...	85-	75
	1102,5	1102,3	RYPNQVYY	159-166	60
	1825,8	1826,0	PGQGSPGG...	42-60	30
41	1776,8	1775,9	GQPHGGG...	85-102	495
	3003,5	3003,9	SKKRPKP...	24-52	65
	1632,8	1632,6	YRENMYR...	153-164	7
	1601,7	1601,4	YEDRYR...	148-158	30
42	1233,6	1233,9	MYRYPNQY	157-165	90
	1541,7	1542,0	PNQVYYR...	161-172	220
	1887,8	1887,7	GNDYEDR...	145-158	220
			GQPHGGG...	85-	360
	2561,2	2561,4	NTGGSRY...	35-60	45
	1629,8	1629,6	SKKRPKP...	24-39	5
	1757,8	1758,0	YEDRYR...	148-159	90
43	1571,7	1572,1	GQPHGGG...	61-76	1040
	1265,6	1265,8	RYPNQVYYR	158-167	200
			AAAGAVV...	119-	50
	2561,2	2561,7	NTGGSRY...	35-60	40
44	2928,3	2929,0	GQPHGGG...	69-99	10
	1860,9	1861,0	RYPNQVY...	159-172	2
	1795,8	1796,0	YRENMYR...	153-165	2
	2561,2	2561,6	GGGWNTG...	31-56	10
	2561,2	2561,6	NTGGSRY...	35-60	2
45	1531,7	1532,7	PPQGGGG...	53-68	765
	3740,7	3741,8	MYRYPN...	157-186	210
	1860,9	1862,4	RYPNQVY...	159-172	170
			GQPHGGG...	61-/85-/77-	85
			SKKRPKP...	24-	35
			YYRPVDQ...	165-	170
	2206,9	2208,0	GNDYEDR...	145-160	50
	1261,7	1262,5	AGAAAAG...	116-131	100
	1396,6	1397,5	MYRYPN...	157-166	210

Tabelle 4: Identifizierte Fragmente aus dem Verdau von PrP mit i20S-Proteasomen (Fortsetzung)

Fraktion	MALDI M (real)	MALDI M (gemessen)	Sequenzen	Position	pmol	
46	1334,7	1335,7	TETDIKI...	202-212	11	
	3739,8	3741,7	TETDIKI...	202-231	11	
	2826,3	2826,6	NMYRYPNQ...	156-177	4	
	2359,2	2361,5	SKKRPKP...	24-42	35	
	2553,1	2555,0	GQPHGGG...	77-102	90	
	1870,8	1871,2	GQPHGGG...	77-96	90	
	2645,1	2646,6	GNDYEDRY...	145-164	5	
47	2645,1	2646,6	GNDYEDRY...	145-164	100	
	2024,0	2025,2	YRYPNQV...	158-172	110	
			YYRE	165-	70	
	1011,6	1013,4	SKKRPKP...	24-33	70	
	3341,6	3341,3	SKKRPKP...	24-55	70	
	2553,1	2554,9	GQPHGGG...	77-102	575	
	1870,8	1872,0	GQPHGGG...	77-96	575	
48	2024,0	2024,7	YRYPNQV...	158-172	85	
			WGQPHGG...		340	
	1011,6	1013,2	SKKRPKP...	24-33	12	
	3337,5	3339,9	NTGGSRY...	35-(68)	7	
	49	3337,5	3337,5	NTGGSRY...	35-68	90
		869,5	869,5	SRPLIHF	138-144	75
		782,5	782,4	RPLIHF	139-144	50
1497,7		1497,8	RVVEQMC...	211-222	80	
	1653,8	RVVEQMC...	211-223	80		
	3106,5	RVVEQMC...	211-236	80		
50	2808,2	2806,9	GNDYEDRY...	145-165	60	
	3337,5	3337,1	NTGGSRY...	35-68	30	
			GQPHGGG...		200	
	2356,1	2355,5	MYRYPN...	157-174	35	
51	3337,5	3337,0	NTGGSRY...	35-68	30	
	2808,2	2807,4	GNDYEDRY...	145-165	20	
	2155,0	2154,2	MYRYPN...	157-172	25	
			GQPHGGG...		165	
		SKKRPKP...	24-	15		
52			SKKRPKP...	24-	30	
	1243,7	1259,2	GSVMSRP...	134-144	15	
	2717,3	2716,0	YYREMY...	152-171	60	
		WGQPHGGG...		50		
53	626,4	626,0	PLIHF	140-144	340	
	2201,0	2200,7	PLIHFGN...	140-156	340	
	3329,4	3329,3	GQPHGGG...	69-102	155	
	1074,5	1075,7	SNQNNFV...	173-181	55	
			SKKRPKP...	24-	35	
54	2308,0	2307,9	PPQGGGG...	53-76	270	
	1638,8	1638,8	PLIHFGN...	140-152	50	
		SKKRPKP...	24-	15		

Tabelle 4: Identifizierte Fragmente aus dem Verdau von PrP mit i20S-Proteasomen (Fortsetzung)

Fraktion	MALDI M (real)	MALDI M (gemessen)	Sequenzen	Position	pmol
55	1638,8	1638,7	PLIHFGN...	140-152	5
	2488,1	2487,9	RPLIHFGN...	139-157	2
	2087,0	2087,0	PLIHFGN...	140-155	5
	2575,2	2574,9	SRPLIHFG...	138-157	2
56			AGAAAAG...	116-	75
			AGAAAAG...	116-	20
			NTGGSRY...	35-	25
	3729,6	3728,1	GNDYEDRY...	145-172	45
	2818,3	2817,8	GSVMSRP...	134-156	25
57			SNQNNFV...	173-	15
	1243,7	1243,5	GSVMSRP...	134-144	640
			SNQNNFV...	173-	20
		2651,2	RPLIHFGN...	139-158	10
58	2332,0	2331,5	PLIHFGN...	140-157	5
	1243,7	1244,2	GSVMSRP...	134-144	20
	3084,4	3084,7	PPQGGGG...	53-84	145
	1541,7	1543,1	LIHFGND...	141-152	12
	2446,3	2446,6	AGAVVGG...	121-145	10
59	2949,3	2947,4	GSVMSRP...	134-157	15
			LIHFGND...	141-	35
			TNMKHVA...	110-	10
			HDCVNIT...	180-	10
60	1164,6	1164,3	AGAVVGG...	121-133	350
	1093,3	1093,3	AVVGGGLG...	123-134	80
102	1235,6	1236,6	AAGAVVG...	120-133	25
			YYRENMI...	152-	50
	3919,7	3919,8	GQPHGGG...	61-101	125*
	1442,6	1441,4	GQPHGGG...	77-92	125*
	1959,9	1960,8	PGGGWNT...	30-50	50*
	3015,4	3016,0	PGGGWNT...	30-60	50*
	1166,5	1165,8	WGQPHGG...	60-70	150
103	1306,7	1307,5	AAAGAVV...	119-133	150
			RYPNQVY..	159-	10
104	1377,7	1378,2	AAAAGAVV...	118-133	40
			TETDIKI...	202-	10
105	2995,6	2996,7	NKPSKPK...	103-133	60
	1434,7	1435,7	GAAAAGAVV...	117-133	30
	1497,8	1499,2	HVAGAAAA...	114-131	10
	1356,7	1357,5	LGSVMSR...	133-144	15
106	1505,8	1507,0	AGAAAAGA...	116-133	500
	2995,6	2997,9	NKPSKPK...	103-133	30
	1870,8	1872,3	GQPHGGG...	77-96	20*
	3433,6	3434,4	GQPHGGG...	77-110	20*
107	1505,8	1506,6	AGAAAAGA...	116-133	75
	2995,6	2997,9	NKPSKPK...	103-133	10

Tabelle 4: Identifizierte Fragmente aus dem Verdau von PrP mit i20S-Proteasomen (Fortsetzung)

Fraktion	MALDI M (real)	MALDI M (gemessen)	Sequenz	Position	pmol
108	1505,8	1506,8	AGAAAAGA...	116-133	40
	1743,8	1742,9	YRPVDQYS...	166-179	15
			HVAGAAAA...	114-	60
	959,4	961,4	SNQNNFVH	173-180	5
109	1505,8	1506,9	AGAAAAGA...	116-133	25
			TNMKHVAG...	110-	50
			VVGGLGGY...	124-	50
110	1505,8	1507,1	AGAAAAGA...	116-133	30
			SNQNNFV...	173-	10
	4546,2	4545,2	AVVGGLG...	123-161	30
111			AVVGGLG...	123-	30
	1781,9	1799,9	AGAVVGG...	121-139	90
			SNQNNFV...	173-	10
112			GAAAAGA...	117-	40
			AVVGGLG...	123-	20
113					
114			AVVGGLG...	123-	200
			TNMKHVA...	110-	10
115					
116					
117	1508,8	1506,2	NKPSKPK..	103-115	4
118					
119					
120	1821,9	1823,9	TETDIKI...	202-216	30*
	2139,0	2141,8	TETDIKI...	202-219	30*
	7244,4	7246,4	AGAAAAG...	116-179	20
121	6067,2	6069,3	TETDIKI...	202-253	80
	2123,1	2125,4	AGAAAAG...	116-139	15*
	7244,4	7244,2	AGAAAAG...	116-179	15*
			SNQNNFV...	173-	80
122	3954,9	3987,7	TETDIKI...	202-234	90*
	5807,0	5837,3	TETDIKI...	202-251	90*
	3506,7	3508,5	SNQNNFV...	173-203	140*
	4337,1	4369,8	SNQNNFV...	173-210	140*
	2097,0	2098,6	SNQNNFV...	173-190	140*
	1036,6	1036,87	AVVGGLG...	123-133	15
123			TETDIKI...	202-	90
			SNQNNFV...	173-	150
124			TETDIKI...	202-	190
			SNQNNFV...	173-	100
	1036,6	1036,3	AVVGGLGG...	123-133	20
125	1036,6	1036,3	AVVGGLGG...	123-133	15
			TETDIKI...	202-	380
			SNQNNFV...	173-	460
			AGAAAAG...	116-	15

Tabelle 4: Identifizierte Fragmente aus dem Verdau von PrP mit i20S-Proteasomen (Fortsetzung)

Fraktion	MALDI M (real)	MALDI M (gemessen)	Sequenzen	Position	pmol
126			TETDIKI...	202-	100
			SNQNNFV...	173-	100
			GSVMSRP...	134-	60
127			SNQNNFV...	173-	60
	4698,3	4732,0	TETDIKI...	202-241	50
128			SNQNNFV...	173-	20
	5297,6	5297,2	HDCVNIT...	180-224	290
	5266,8	5266,1	MERVVEQ...	209-253	270
129			HDCVNIT...	180-	15
			MERVVEQ...	209-	55
	5815,8	5814,7	SNQNNFV...	173-222	40
130			SNQNNFV...	173-	25
			HDCVNIT...	180-	25
			MERVVEQ...	209-	25
131	2042,9	2045,5	MERVVEQ...	209-224	40
			SNQNNFV...	173-	70
			AGAAAAG...	116-	30
			HDCVNIT...	180-	20
132			SNQNNFV...	173-	150
			AGAAAAG...	116-	20
			SKKRPKP...	24-	60
133			NKPSKP...	103-	125
			HDCVNIT...	180-	60
			SNQNNFV...	173-	60
			MERVVEQ...	209-	125
134			NKPSKP...	103-	25
			HDCVNIT...	180-	20
			SNQNNFV...	173-	35
			MERVVEQ...	209-	25
			AGAAAAG...	116-	600
135			SNQNNFV...	173-	15
			AGAAAAG...	116-	40
			TETDIKI...	202-	15
			HDCVNIT...	180-	5
			MERVVEQ...	209-	10
136			MERVVEQ...	209-	20
			HDCVNIT...	180-	20
			AGAAAAG...	116-	20
			TETDIKI...	202-	5
	2134,0	2133,1	GSPGGNR...	45-67	5
137			AGAAAAG...	116-	20
			TETDIKI...	202-	30
			HDCVNIT...	180-	50
			MERVVEQ...	209-	10

Tabelle 4: Identifizierte Fragmente aus dem Verdau von PrP mit i20S-Proteasomen (Fortsetzung)

Fraktion	MALDI M (real)	MALDI M (gemessen)	Sequenzen	Position	pmol
138			AGAAAAG...	116-	15
			TETDIKI...	202-	10
			SNQNNFV...	173-	10
			AVVGGLG...	123-	80
			MERVVEQ...	209-	15
139			AGAAAAG...	116-	20
			TETDIKI...	202-	10
			SNQNNFV...	173-	10
			AVVGGLG...	123-	10
140			SNQNNFV...	173-	3
			MERVVEQ...	209-	25
141			SNQNNFV...	173-	5
			AGAAAAG...	116-	25
			TETDIKI...	202-	3
			MERVVEQ...	209-	10
142			AVVGGLG...	123-	10
			SNQNNFV...	173-	10
			AVVGGLG...	123-	10
143			GYMLGSV...	130-	3
144			GYMLGSV...	130-	50
			AVVGGLG...	123-	5
145			GYMLGSV...	130-	5
			AVVGGLG...	123-	4
146			AGAAAAG...	116-	15
			TETDIKI...	202-	5
147			AGAAAAG...	116-	5
			GYMLGSV...	130-	2
148			GYMLGSV...	130-	1
			AGAAAAG...	116-	15
			TETDIKI...	202-	3
149			MSRPLIH...	137-	10
			AGAAAAG...	116-	25
			SNQNNFV...	173-	5
150			AVVGGLG...	123-	6
			AGAAAAG...	116-	25
			GYMLGSV...	130-	5
			SNQNNFV...	173-	4
151			TETDIKI...	202-	3
			SNQNNFV...	173-	3
			AVVGGLG...	123-	3
152			TETDIKI...	202-	3
			AVVGGLG...	123-	10
153			MERVVEQ...	209-	5
			FGNDYED..	144-	10
			AVVGGLG...	123-	10
			TETDIKI...	202-	5
			MSRPLIH...	137-	7

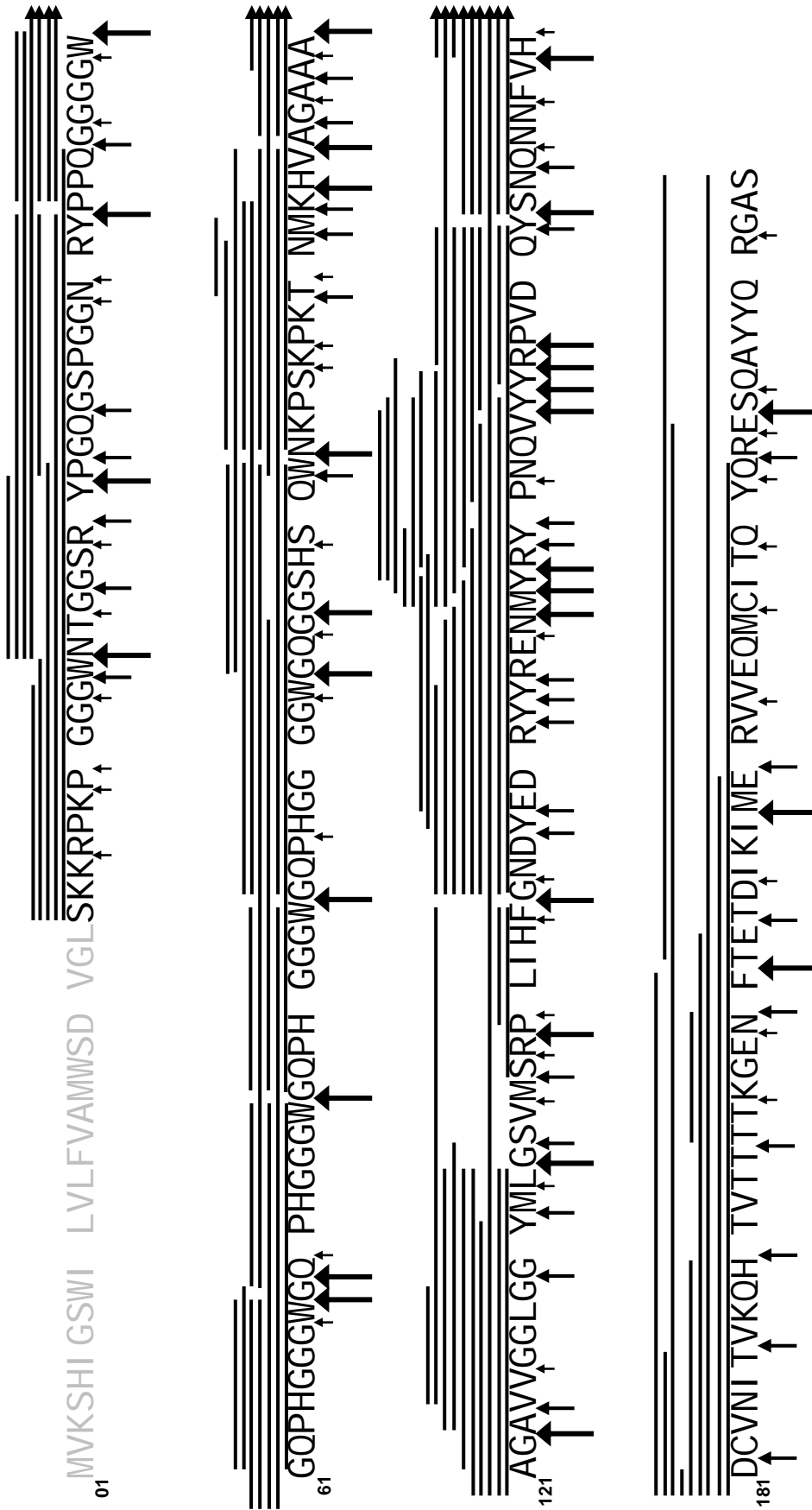
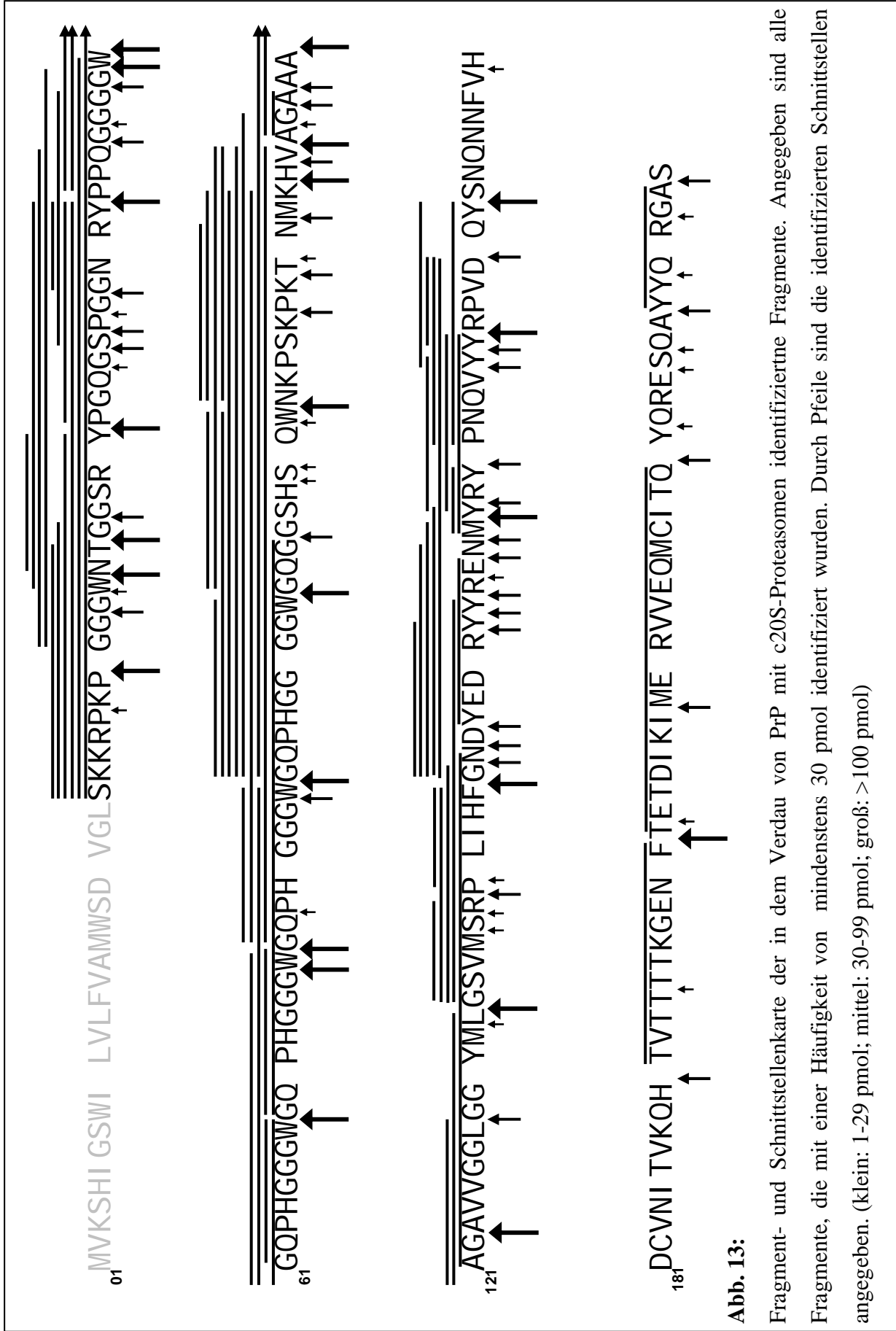


Abb. 12:

Fragment- und Schnittstellenkarte der in dem Verdau von PrP mit i20S-Proteasomen identifizierten Fragmente. Angegeben sind alle Fragmente, die mit einer Häufigkeit von mindestens 30 pmol identifiziert wurden. Durch Pfeile sind die identifizierten Schnittstellen angegeben. (klein: 1-29 pmol; mittel: 30-99 pmol; groß: >100 pmol)



2.1. Analyse der generierten Fragmente

Im Verdau von PrP mit konstitutiven Proteasomen (c20S) wurden 104 unterschiedliche Fragmente mit einer Gesamtmenge von 8604 pmol detektiert. Die mittlere Fragmentlänge beträgt 20,2 AA (Abb. 14). Die stärkste identifizierte Schnittstelle war Position 84 mit einer Schnittintensität von 1055 pmol. Ähnliche Daten wurden aus dem Verdau mit Immuno-20S Proteasomen erhalten. Hier wurden 162 Peptide mit einer Gesamtmenge von 13040 pmol und einer mittleren Fragmentlänge von 17,5 AA identifiziert (Abb. 15). Mit 1163 pmol stellt Position 115 die stärkste Schnittstelle von insgesamt 113 Schnittstellen in diesem Experiment dar. In beiden Verdauexperimenten variiert die Schnittintensität in substantiellem Maße zwischen individuellen Schnittstellen. Die in diesen Daten enthaltene quantitative Information ist für die Entwicklung von Vorhersagealgorithmen von hoher Bedeutung. Der Substratumsatz durch immuno-20S-Proteasomen war unter sonst identischen Bedingungen ca. 50% höher als bei konstitutiven Proteasomen, was ein möglicher Hinweis auf eine im Vergleich zu konstitutiven Proteasomen erhöhte proteolytische Aktivität des Immunoproteasoms sein kann.

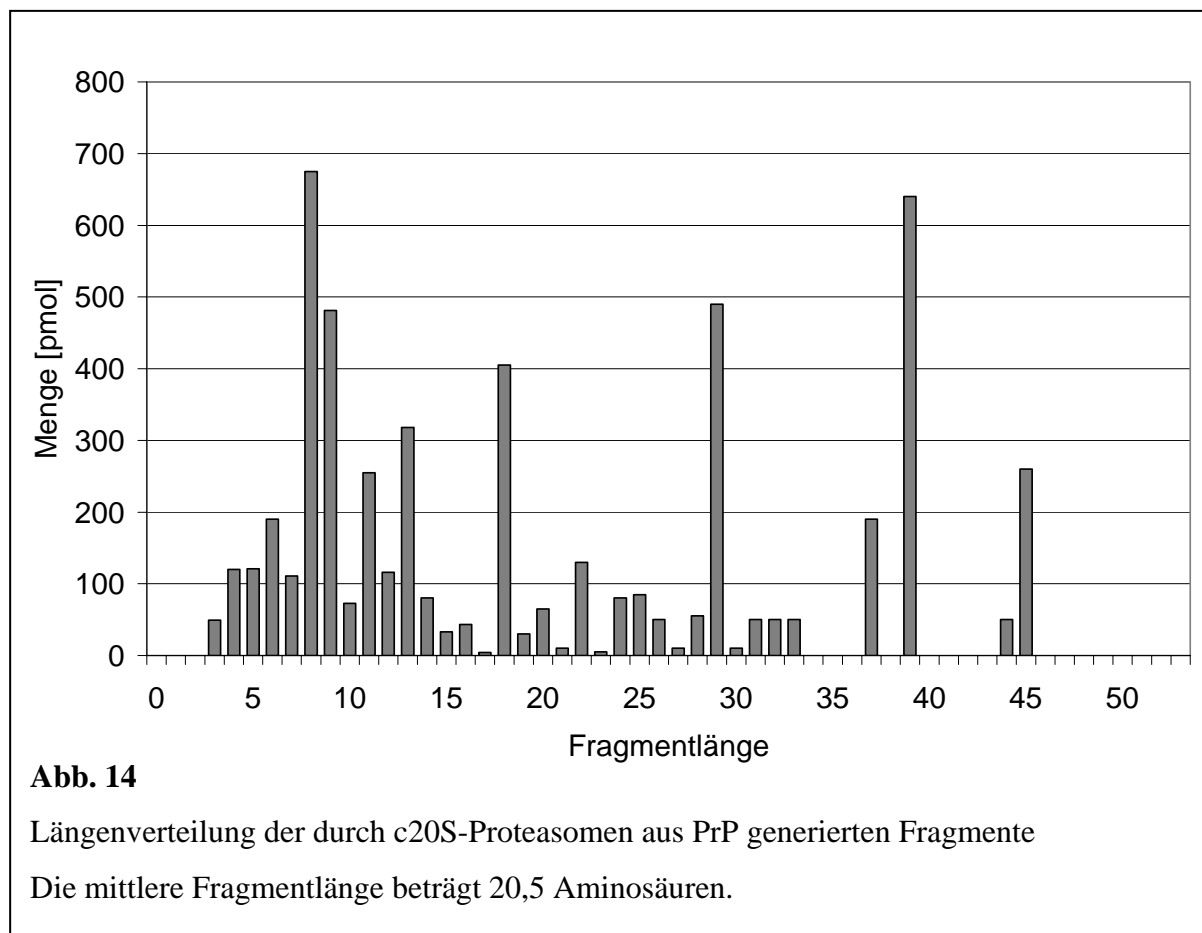
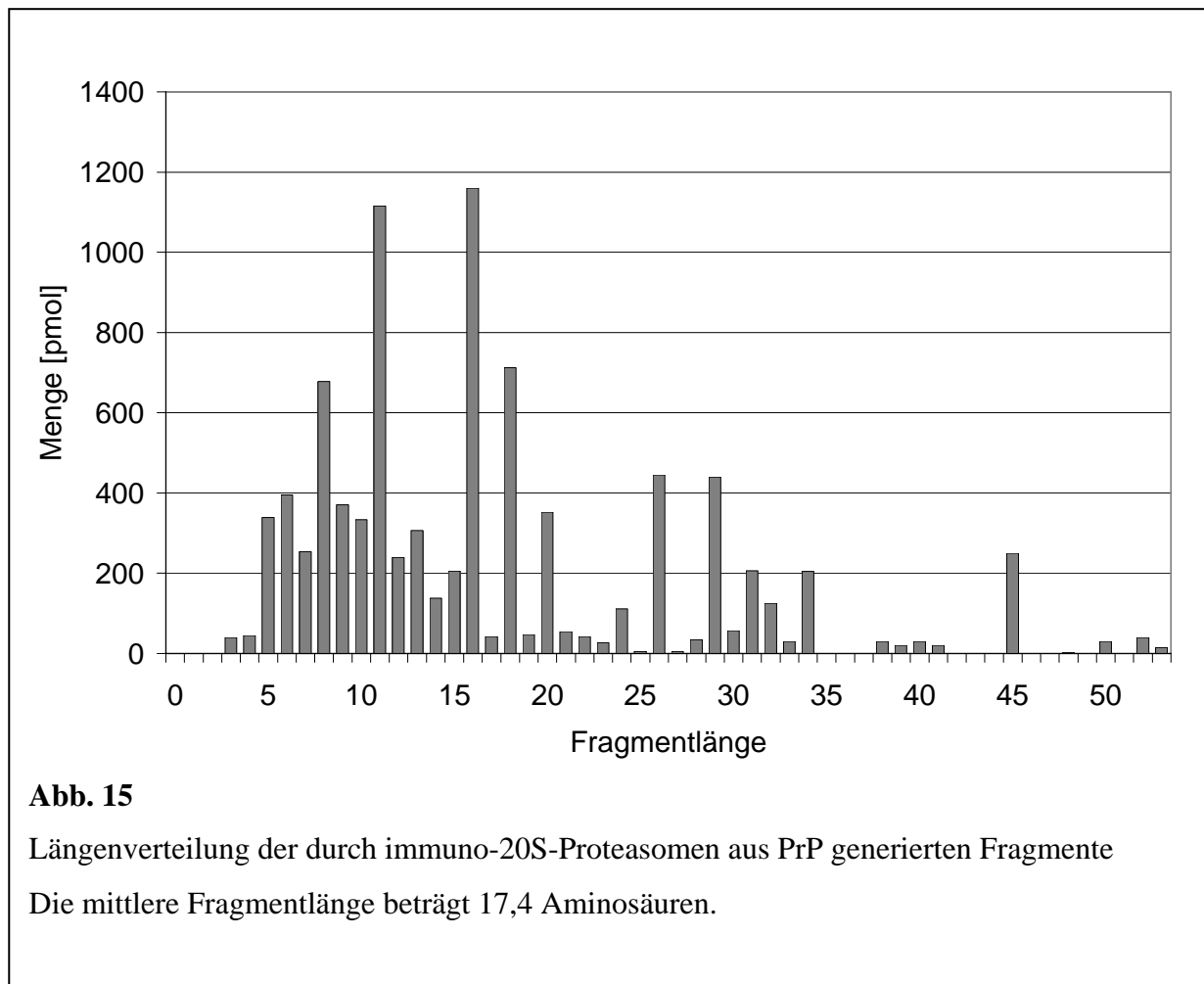


Abb. 14

Längenverteilung der durch c20S-Proteasomen aus PrP generierten Fragmente

Die mittlere Fragmentlänge beträgt 20,5 Aminosäuren.



2.2. Analyse der Schnittpräferenzen von c20S- und i20S-Proteasomen

Von den 162 Peptiden, die im Verdau mit immuno-20S-Proteasomen identifiziert wurden, wurden nur 55 (entsprechend 34%) auch im Verdau mit konstitutiven Proteasomen gefunden. Dies zeigt, dass konstitutive und immuno-20S-Proteasomen in der Lage sind, substantiell unterschiedliche Pools von Peptiden zu generieren, wie schon früher durch den *in vitro* Verdau von Hefe Enolase-I gezeigt wurde (Toes *et al.*, 2001). Wenn man individuelle Schnittstellen betrachtet, findet man, dass nur 55 der 113 (49%) immunoproteasomalen Schnittstellen auch im Verdau mit konstitutiven Proteasomen gefunden werden konnten.

Um eine genauere Analyse der Einflüsse einzelner Aminosäuren in unmittelbarer Schnittumgebung zu erlauben wurden die quantifizierten Daten in einer Tabelle zusammengefasst und die relativen Häufigkeiten (definiert als Verhältnis zwischen der Häufigkeit dieser Aminosäure an einer bestimmten Position und der Häufigkeit dieser

Aminosäure in der Sequenz von PrP) jeder Aminosäure an den Positionen P6-P6' berechnet (Tabelle 5 + 6). Nähere Untersuchungen durch Chi-Quadrat-Analysen ergaben mehrere Abweichungen, die als signifikant gegenüber dem Hintergrundlevel zu betrachten sind und eine relative Häufigkeit von ≥ 3.0 besitzen.

Im Verdau mit immuno-20S-Proteasomen wurden die stärksten Präferenzen für Trp in P1 und His in P4 gefunden. Generell findet man eine Anreicherung von großen, hydrophoben Aminosäuren in Position P1; an Position P1' findet man bevorzugt Ala, Pro und kleine polare Aminosäuren wie Ser und Thr. Stark reduzierte relative Häufigkeiten findet man beispielsweise für G in Position P1 und Pro in den Positionen P1, P2 und P3.

Eine analoge Untersuchung der Schnittdaten, die aus dem Verdau mit konstitutiven 20S-Proteasomen erhalten wurden, liefert starke Schnittpräferenzen für Trp und andere hydrophobe Aminosäuren wie Leu, Phe und Tyr an P1. Ähnlich wie bei i20S-Proteasomen findet man eine Anreicherung der Aminosäuren Ala und Gly in P1', nicht aber Ser und Thr. Negative Einflüsse auf die Schnittpräferenz lassen sich auch für Val an Position P1' und Gly an P1 feststellen. Die unterschiedlichen Präferenzen von c20S und i20S sind in den Positionen P1 und P1' sind in Abbildung 16 dargestellt.

Tabelle 5:

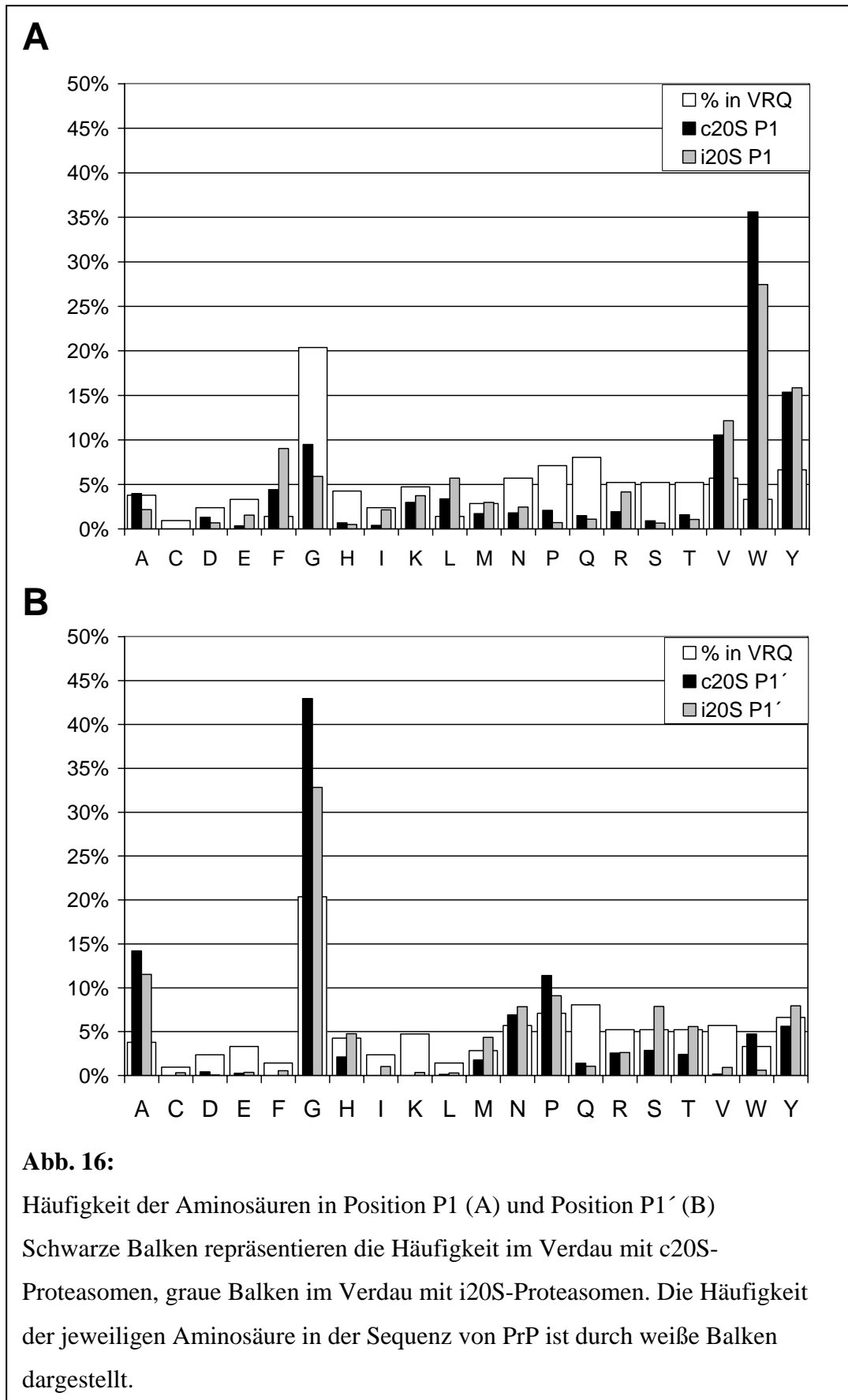
Absolute Mengen (pmol; weißer Hintergrund) und relative Häufigkeiten (grau hinterlegt) aller Aminosäuren in den Positionen P6 bis P1 und P1' bis P6' der im Verdau mit von PrP-VRQ mit konstitutiven 20S Proteasomen identifizierten Schnittstellen.

	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'	P6'
A	50 0,1	329 0,9	120 0,3	373 1,1	378 1,1	363 1,0	1301 3,7	156 0,4	1377 4,0	968 2,8	1168 3,4	1198 3,4
C	0 0,0	21 0,2	30 0,3	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	20 0,2	0 0,0	0 0,0	0 0,0
D	110 0,5	75 0,3	87 0,4	243 1,1	60 0,3	120 0,6	40 0,2	50 0,2	355 1,6	254 1,2	80 0,4	360 1,7
E	127 0,4	50 0,2	200 0,7	304 1,0	110 0,4	31 0,1	25 0,1	236 0,8	140 0,5	120 0,4	305 1,0	37 0,1
F	0 0,0	0 0,0	45 0,3	40 0,3	60 0,5	404 3,1	0 0,0	0 0,0	0 0,0	25 0,2	135 1,0	178 1,4
G	858 0,5	1875 1,0	4770 2,6	3582 1,9	3634 1,9	870 0,5	3937 2,1	2109 1,1	827 0,4	1750 0,9	3394 1,8	4058 2,2
H	250 0,6	2255 5,8	633 1,6	54 0,1	1191 3,0	63 0,2	195 0,5	20 0,1	85 0,2	2555 6,5	493 1,3	295 0,8
I	105 0,5	40 0,2	50 0,2	367 1,7	0 0,0	37 0,2	0 0,0	25 0,1	135 0,6	25 0,1	135 0,6	30 0,1
K	484 1,1	529 1,2	96 0,2	1037 2,4	212 0,5	273 0,6	1 0,0	428 1,0	24 0,1	56 0,1	361 0,8	153 0,4
L	313 2,4	48 0,4	300 2,3	0 0,0	0 0,0	308 2,4	13 0,1	85 0,7	30 0,2	65 0,5	50 0,4	136 1,0
M	85 0,3	50 0,2	963 3,7	85 0,3	508 1,9	158 0,6	162 0,6	45 0,2	68 0,3	358 1,4	128 0,5	60 0,2
N	180 0,3	1108 2,1	70 0,1	1025 2,0	404 0,8	165 0,3	634 1,2	685 1,3	88 0,2	456 0,9	573 1,1	183 0,4
P	3430 5,3	1047 1,6	135 0,2	398 0,6	213 0,3	191 0,3	1045 1,6	816 1,3	2931 4,5	629 1,0	243 0,4	736 1,1
Q	619 0,8	349 0,5	240 0,3	81 0,1	792 1,1	137 0,2	128 0,2	2739 3,7	1503 2,0	30 0,0	325 0,4	226 0,3
R	663 1,4	223 0,5	405 0,8	210 0,4	987 2,1	176 0,4	235 0,5	315 0,7	397 0,8	260 0,5	85 0,2	599 1,3
S	48 0,1	458 1,0	72 0,2	646 1,4	157 0,3	83 0,2	262 0,5	341 0,7	209 0,4	408 0,9	918 1,9	76 0,2
T	1133 2,4	97 0,2	180 0,4	20 0,0	110 0,2	145 0,3	222 0,5	226 0,5	214 0,4	75 0,2	60 0,1	220 0,5
V	193 0,4	60 0,1	408 0,8	180 0,3	160 0,3	968 1,9	15 0,0	405 0,8	488 0,9	419 0,8	305 0,6	173 0,3
W	45 0,1	0 0,0	80 0,3	135 0,4	0 0,0	3264 10,7	434 1,4	48 0,2	3 0,0	165 0,5	80 0,3	61 0,2
Y	470 0,8	550 0,9	280 0,5	384 0,6	188 0,3	1408 2,3	515 0,8	435 0,7	270 0,4	546 0,9	326 0,5	385 0,6

Tabelle 6:

Absolute Mengen (pmol; weißer Hintergrund) und relative Häufigkeiten (grau hinterlegt) aller Aminosäuren in den Positionen P6 bis P1 und P1' bis P6' der im Verdau mit von PrP-VRQ mit konstitutiven 20S Proteasomen identifizierten Schnittstellen

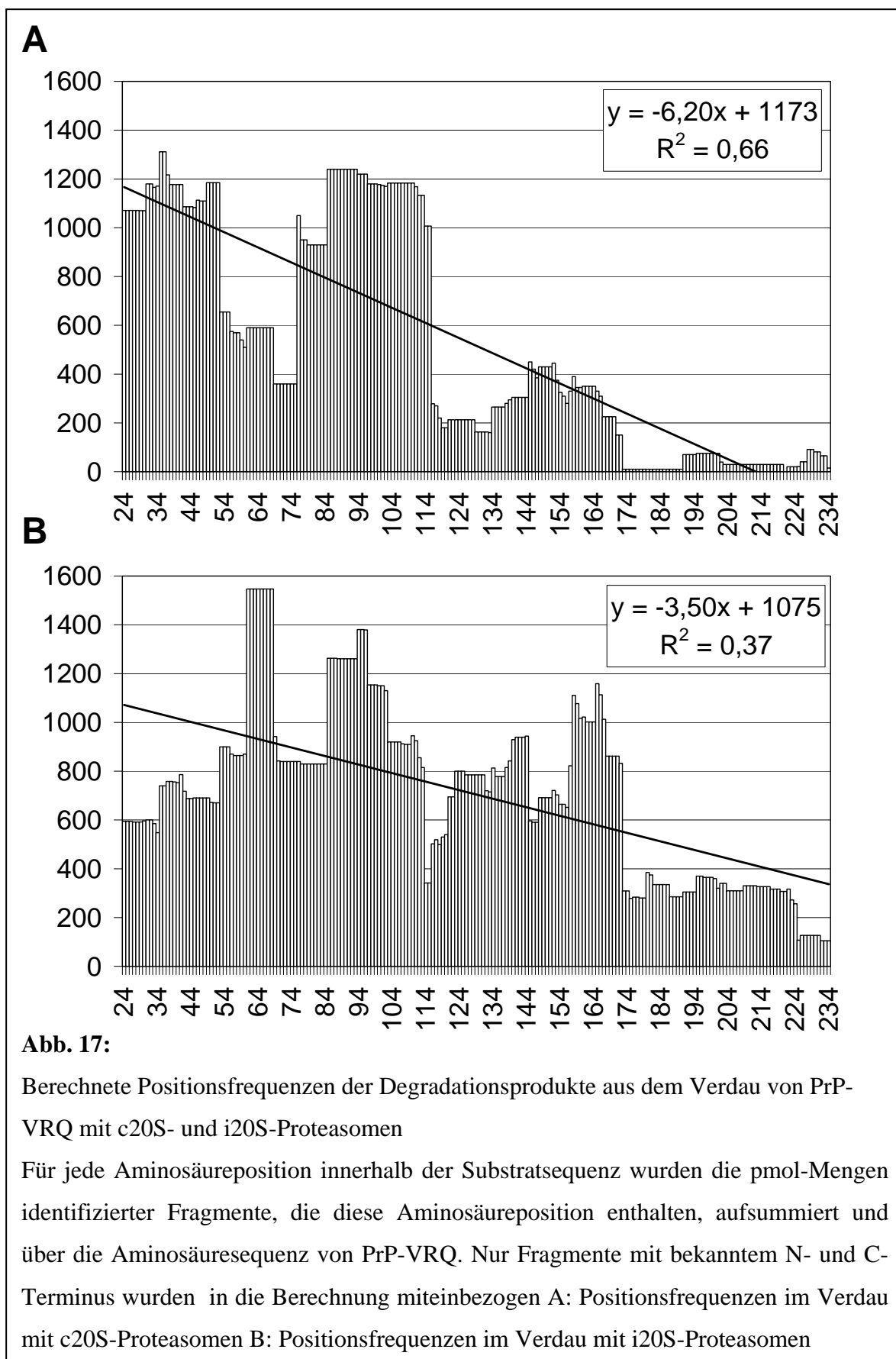
	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'	P6'
A	65	645	478	713	633	345	1841	202	2123	1288	1913	1758
	0,1	1,1	0,8	1,2	1,0	0,6	3,0	0,3	3,5	2,1	3,2	2,9
C	49	60	0	12	0	0	50	10	255	0	7	0
	0,3	0,4	0,0	0,1	0,0	0,0	0,3	0,1	1,7	0,0	0,0	0,0
D	174	60	338	1090	105	110	10	335	998	821	163	1282
	0,5	0,2	0,9	2,9	0,3	0,3	0,0	0,9	2,6	2,2	0,4	3,4
E	384	129	173	1092	305	246	60	1113	113	85	862	314
	0,7	0,2	0,3	2,1	0,6	0,5	0,1	2,1	0,2	0,2	1,6	0,6
F	0	210	135	72	420	1444	89	20	5	100	357	1059
	0,0	0,9	0,6	0,3	1,9	6,4	0,4	0,1	0,0	0,4	1,6	4,7
G	2019	3068	6312	4302	3928	944	5243	1579	839	2632	4674	4705
	0,6	0,9	1,9	1,3	1,2	0,3	1,6	0,5	0,3	0,8	1,5	1,5
H	245	2552	832	75	1985	79	762	42	424	3558	127	157
	0,4	3,7	1,2	0,1	2,9	0,1	1,1	0,1	0,6	5,3	0,2	0,2
I	160	125	15	1286	75	344	165	80	447	69	761	341
	0,4	0,3	0,0	3,4	0,2	0,9	0,4	0,2	1,2	0,2	2,0	0,9
K	573	1302	206	1381	325	598	53	937	125	115	814	694
	0,8	1,7	0,3	1,8	0,4	0,8	0,1	1,2	0,2	0,2	1,1	0,9
L	805	77	1022	15	111	908	45	447	87	113	95	427
	3,5	0,3	4,5	0,1	0,5	4,0	0,2	2,0	0,4	0,5	0,4	1,9
M	67	73	1276	447	1440	474	692	36	166	795	65	178
	0,1	0,2	2,8	1,0	3,2	1,0	1,5	0,1	0,4	1,8	0,1	0,4
N	606	1433	485	2172	1178	391	1252	2076	229	1226	1741	401
	0,7	1,6	0,5	2,4	1,3	0,4	1,4	2,3	0,3	1,4	1,9	0,4
P	3757	2425	650	129	127	111	1451	1084	4251	949	312	1023
	3,3	2,1	0,6	0,1	0,1	0,1	1,3	1,0	3,7	0,8	0,3	0,9
Q	969	628	205	317	2672	176	170	3428	2048	331	560	688
	0,8	0,5	0,2	0,2	2,1	0,1	0,1	2,7	1,6	0,3	0,4	0,5
R	2655	238	431	358	1160	665	418	625	1124	111	35	1233
	3,2	0,3	0,5	0,4	1,4	0,8	0,5	0,8	1,4	0,1	0,0	1,5
S	302	1188	222	1045	498	105	1258	1065	109	1190	1389	349
	0,4	1,4	0,3	1,3	0,6	0,1	1,5	1,3	0,1	1,4	1,7	0,4
T	2148	444	633	55	177	170	892	456	766	113	145	69
	2,6	0,5	0,8	0,1	0,2	0,2	1,1	0,5	0,9	0,1	0,2	0,1
V	233	96	1735	322	235	1939	148	1473	1408	1034	1129	394
	0,3	0,1	1,9	0,4	0,3	2,1	0,2	1,6	1,6	1,2	1,3	0,4
W	5	8	229	24	100	4385	97	15	4	10	34	229
	0,0	0,0	0,4	0,0	0,2	8,3	0,2	0,0	0,0	0,0	0,1	0,4
Y	746	1201	585	1057	490	2530	1268	941	443	1264	621	473
	0,7	1,1	0,6	1,0	0,5	2,4	1,2	0,9	0,4	1,2	0,6	0,5



2.3. Verteilung der Fragmente

Ausgehend von den Fragmentdaten der beiden unterschiedlichen Degradationsexperimente wurden die Positionsfrequenzen (als Positionsfrequenz einer Aminosäureposition (gemessen in pmol) ist die Gesamtmenge aller Fragmente definiert, die diese bestimmte Aminosäureposition beinhalten) jeder Aminosäure in der Substratsequenz berechnet. In die Berechnung wurden ausschließlich Fragmente mit eindeutig identifiziertem N- und C-Terminus miteinbezogen. Wie in Abbildung 17 gezeigt, nehmen die Positionsfrequenzen vom N-Terminus zum C-Terminus von PrP VRQ ab. Dieses ist deutlicher sichtbar für den Verdau mit konstitutiven Proteasomen (Korrelationskoeffizient von $R^2=0.66$) als für immuno-Proteasomen ($R^2=0.37$).

In beiden Verdauexperimenten wurde dementsprechend eine größere Menge von Fragmenten detektiert, die aus dem weniger strukturierten N-Terminus des Prion-Proteins stammen. Aus dem C-terminalen Sequenzabschnitt, der eine stärkere Sekundärstruktur aufweist, wurden signifikant weniger Fragmente gefunden, was darauf hinweist, dass dieser Bereich des Prion-Proteins resistenter gegen proteasomalen Abbau ist. Dieses wurde auch durch die Detektion eines ca. 15 kDa schweren C-terminalen Fragmentes durch Geextraktion aus einem SDS-PAGE-Gel und anschließender massenspektroskopischer Detektion dieses Fragmentes durch MALDI-MS nachgewiesen. Auch in einem Parallelversuch mit PrP ARR konnte ein entsprechendes Fragment detektiert werden.



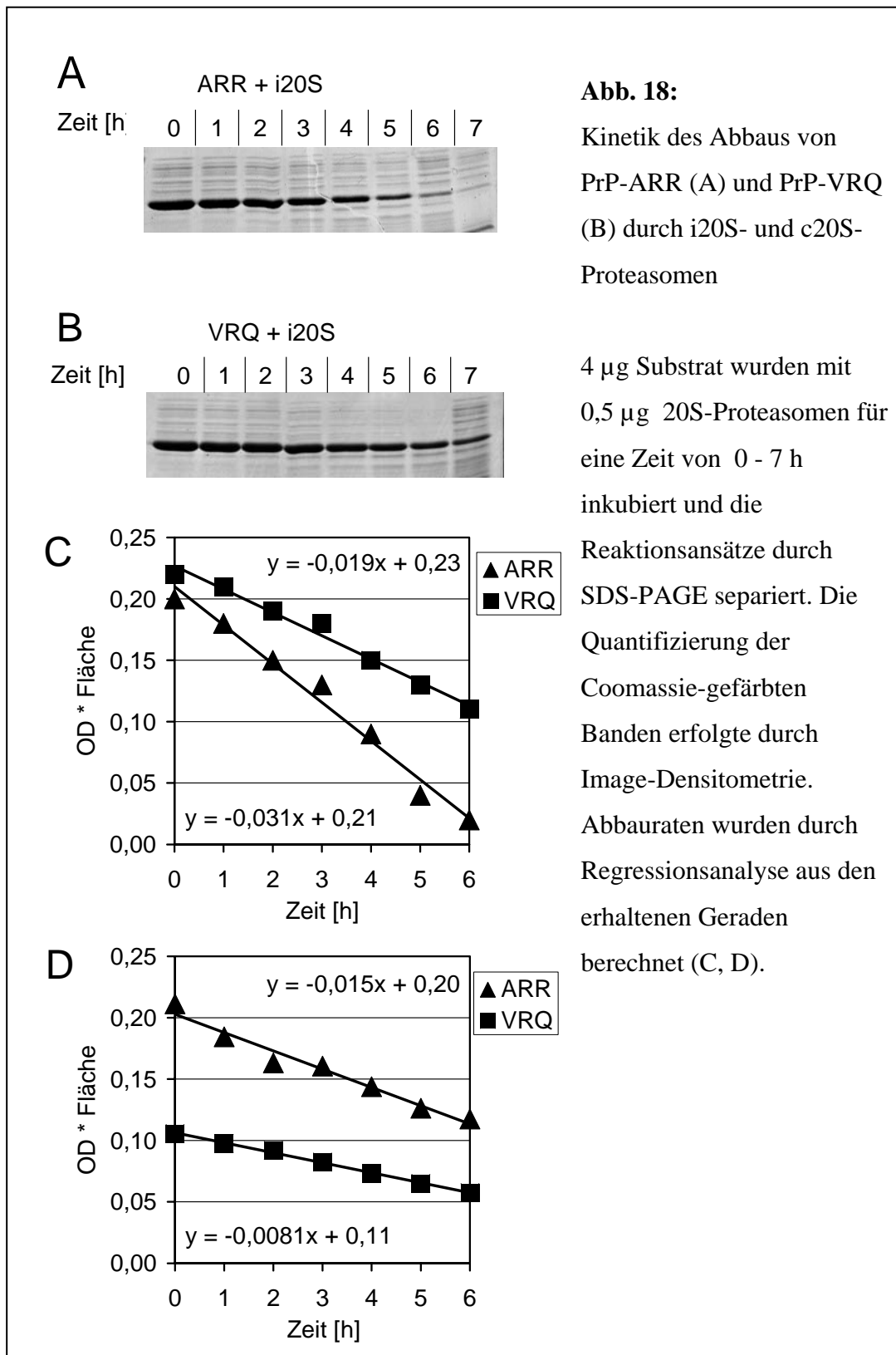
2.4. Analyse der Kinetiken des Abbaus zweier unterschiedlicher allelischer Formen des Prion Proteins durch 20S-Proteasomen

Um den Einfluss kleiner Mutationen, die in unterschiedlichen allelischen Varianten des Prion-Proteins vorkommen, auf den proteasomalen Abbau näher zu untersuchen wurden die Verdaukinetiken zweier unterschiedlicher natürlich vorkommender genetischer Varianten des Prion-Proteins, nämlich der Varianten VRQ und ARR, experimentell betrachtet. Diese beiden Varianten unterscheiden sich nur in zwei Aminosäurepositionen, sind aber mit deutlich unterschiedlichen Phänotypen assoziiert. Schafe, die homozygot für das Allel VRQ sind, zeigen eine sehr hohe Suszeptibilität für Scrapie-Infektionen, während Schafe, die ausschließlich das Allel ARR tragen, resistent gegen diese Krankheit sind. Beide rekombinanten Proteine wurden vor den Experimenten gegen den Verdauopuffer dialysiert und auf gleiche Proteinkonzentration eingestellt, um eventuelle Einflüsse von Pufferkomponenten auszuschließen. Nach festgelegten Zeitpunkten wurden den Verdaureaktionen Aliquots entnommen und die Reaktion direkt durch Einfrieren bei -80°C gestoppt. Alle Aliquots wurden auf ein 14% SDS-PAGE Gel geladen und dieses nach dem Lauf durch Coomassie-Färbung gefärbt (Abb. 18a +b).

Die Banden wurden durch Densitometrie quantifiziert und die erhaltenen Werte gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Durch Regressionsanalyse wurde ein linearer Verlauf des Abbaues über einen Zeitraum von 6 h bestätigt, was auf eine konstante Aktivität der eingesetzten Proteasomen hinweist.

Die Abbaugeschwindigkeit des PrP-ARR durch i20S-Proteasomen (Steigung der Regressionsgeraden $m = -0.031$) ist ca. 63% schneller als der Abbau der scrapie-assoziierten VRQ-Variante ($m = -0.019$) (Siehe Abb. 18c).

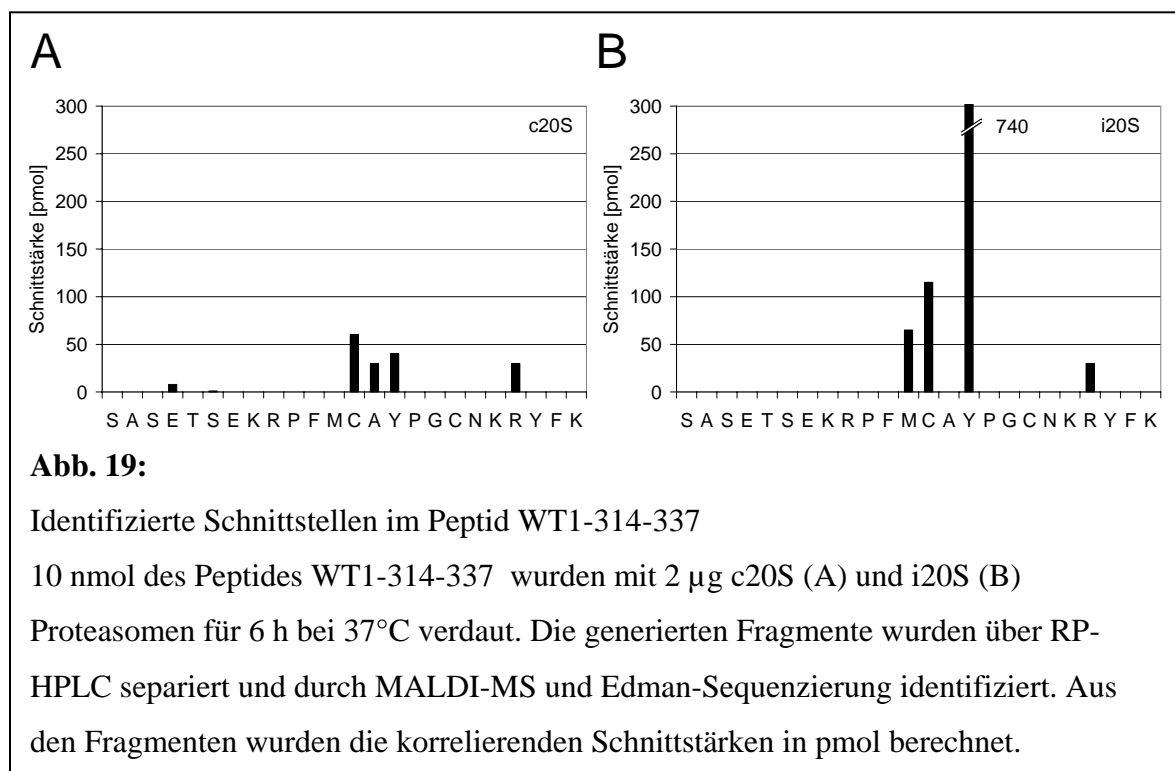
Durch c20S-Proteasomen wurden sowohl PrP-ARR als auch PrP-VRQ wesentlich langsamer abgebaut (Abb. 18 d). Auch durch c20S Proteasomen wird PrP-VRQ ca. 45% langsamer abgebaut als PrP-ARR.



3. In vitro Verdau von Peptiden

3.1 In vitro Verdau des Peptides WT1₃₁₄₋₃₂₉

Der Transkriptionsfaktor Wilms Tumor Protein 1 (WT1) ist ein mögliches Zielprotein für eine Immunotherapie von Leukämie (Rosenfeld et al., 2003). In ersten klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Impfung mit dem HLA-A*0201-bindenden WT1 Epitop 126-134 mit hoher Frequenz T-Zell Antworten in den vakzinierten Patienten induziert. In einem Fall wurde sogar eine komplette Remission der Leukämie beschrieben (Mailander et al., 2004). Bis jetzt sind nur drei HLA-Klasse-I bindende Epitope für HLA- A*0201 und HLA-A*24 in der Literatur beschrieben (Oka et al., 2000; Bellantuono et al., 2002), die Identifikation weitere T-Zell Epitope aus WT-1 ist daher von hohem klinischen Interesse. Durch eine Bindungsvorhersage für HLA-A01 mittels SYFPEITHI wurden fünf Epitop-Kandidaten identifiziert. Gegen eines dieser Epitope, WT1.A1-318-328, konnte eine peptidspezifische T-Zell Antwort mittels intrazellulärer Färbung gegen IFN- γ bei 2 von 4 untersuchten Patienten gezeigt werden.



Die Analyse der proteasomalen Prozessierung des 24 AA langen Peptides WT1-314-337, das das neu identifizierte Epitop beinhaltet, lieferte im Verdau mit i20S-Proteasomen ein Hauptfragment (314-328), dessen C-terminaler Tyr-328-Rest mit dem C-Terminus des

Epitops identisch ist. Das komplementäre Fragment 329–337 stellt das andere im Verdau detektierte Hauptfragment dar, damit ist die beobachtete Schnittstelle nach Tyr-328 mit einer Intensität von 740 pmol die stärkste beobachtete Schnittstelle im Verdau mit i20S-Proteasomen (Abb. 19a).

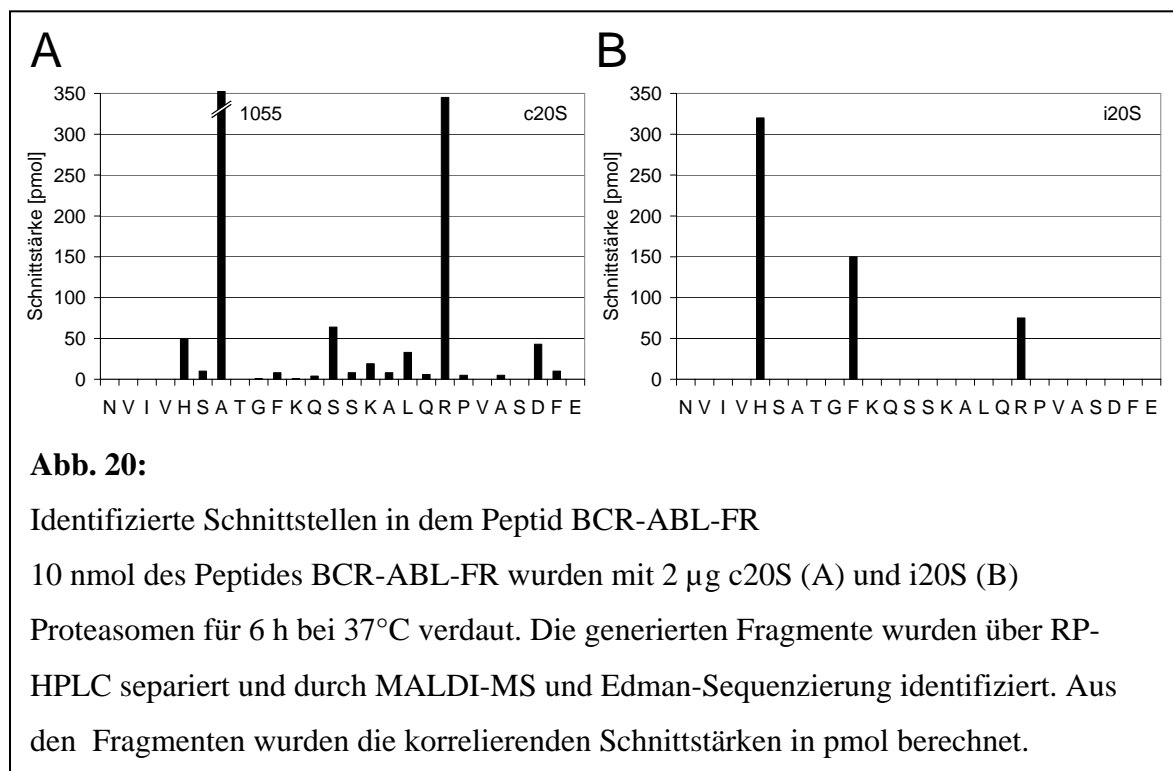
Die Generierung des C-Terminus des Epitops konnte auch im Verdau mit c20S-Proteasomen nachgewiesen werden, da das Fragment 329-337 mit einer Schnittstärke von 40 pmol generiert wurde (Abb. 19b). Eine Prozessierung des korrekten N-Terminus des Epitops konnte nur im Verdau mit c20S-Proteasomen nachgewiesen werden, während durch i20S-Proteasomen lediglich N-terminal verlängerte Prekursorpeptide generiert werden, was in guter Übereinkunft mit anderen Arbeiten steht, in denen die eine proteasomale Generierung des exakten C-Terminus und N-terminal verlängerter Prekursorpeptide für andere CTL-Epitope gezeigt wurde (Kessler et al., 2001) (Snyder et al., 1994; Mo et al., 1999).

3.2. In vitro Verdau eines Peptides aus der Fusionsregion von BCR-ABL

Kennzeichnend für die Chronische Myeloische Leukämie ist die Expression des BCR-ABL Fusionsproteins, das bei über 95 % der erkrankten Leukämiepatienten nachweisbar ist. Einer der möglichen Ansätze zur Behandlung von CML Patienten ist die Vakzinierung mit Peptiden aus der Fusionsregion des BCR-ABL Proteins. Obwohl die MHC-Klasse-I restringierte Präsentation von BCR-ABL Fusionsregionspeptiden Gegenstand intensiver Forschung ist, wurde bislang lediglich für das Peptid KQSSKALQR eine mögliche Präsentation nachgewiesen. Um einen direkten Einblick in die Prozessierung der BCR-ABL Fusionsregionspeptide zu erhalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine *in vitro* Analyse der proteasomalen Degradation eines 25 AA langen Peptides aus der Fusionsregion von BCR-ABL durchgeführt. Es wurde untersucht, ob die in *in vitro* Bindungsstudien beschriebenen HLA-A*03 und HLA-B*08 bindenden Peptide (Bocchia et al., 1995; Bocchia et al., 1996) aus der BCR-ABL Fusionsregion durch den Abbau über das 20S-Proteasom generiert werden können. Ebenso wurde eine mögliche Generierung des C-Terminus des BCR-ABL Fusionsregionspeptids SSKALQRPV analysiert, das einen HLA-A*02 bindenden Liganden aus der BCR-ABL Fusionsregion darstellen soll (Yotnda et al., 1998a).

Der C-Terminus des Peptids ATGFKQSSK wird durch das c20S-Proteasom mit einer Intensität von 25 pmol generiert, für die Generierung des C-Terminus von GFKQSSKAL wurde eine Schnittstärke von 35 pmol festgestellt. (Abb. 20a) Im Gegensatz dazu kann das immuno-Proteasom (i20S) die C-Termini dieser Peptide nicht generieren (Abb. 20b). Nur die

Schnittstelle zur Prozessierung des HLA-A*03 assoziierten Peptids KQSSKALQR wurde im *in vitro* Verdau des Peptides mit i20S-Proteasomen mit einer Schnittintensität von 70 pmol identifiziert. Anhand der analysierten Schnittprodukte gibt es keinen Hinweis darauf, dass der C-Terminus des von Yotnda et al. postulierten HLA-A*02 bindenden Peptids SSKALQRPV durch c20S- oder i20S-Proteasom hergestellt werden kann.



3.3. *In vitro* Verdau des Peptides PRAME₁₃₃₋₁₅₉

Das tumorassoziierte Protein PRAME (Kessler *et al.*, 2001) wird in einer Vielzahl unterschiedlicher Tumoren mit hoher Frequenz exprimiert, darunter Melanom (95%), Nierenzellkarzinom (41%) Lungenkarzinom (50%), Brustkrebs (27%), akuter Leukämie (30%) und multiplem Myelom (52%) (van Baren et al., 1998; Neumann et al., 1998; Pellat-Deceunynck et al., 2000). Da es in normalem Gewebe mit Ausnahme der Hoden nicht exprimiert wird, stellt es ein attraktives Ziel für eine Immunotherapie dar. Durch eine Kombination von MHC-Bindungsvorhersagen, MHC-Bindungsassays und dem immunoproteasomalen Verdau von Peptiden, die die Umgebung von möglichen Epitopen

beinhalten, konnten vier HLA-A*0201 restringierte CTL-Epitope identifiziert werden (Kessler *et al.*, 2001).

In dieser Arbeit wurde die Analyse der proteasomalen Prozessierung für eines der identifizierten Epitope, PRAME₁₄₂₋₁₅₁ (SLSFPEPEA) sowohl durch i20S- als auch c20S-Proteasomen untersucht. Dazu wurde ein 27 AA langes Peptid (PRAME₁₃₃₋₁₅₉) sowohl durch i20S als auch c20S Proteasomen verdaut und die Degradationsprodukte nach der Auftrennung über HPLC mittels MALDI-MS und Edman-Sequenzierung analysiert. Die aus den identifizierten Fragmenten ermittelten Schnittintensitäten sind in Abb. 21 angegeben.

Der N-Terminus des Epitops kann durch einen Schnitt nach Ala₁₄₁ sowohl durch c20S- (100 pmol) als auch durch i20S-Proteasomen (190 pmol) mit guter Effizienz generiert werden. Im Gegensatz dazu ist die Generierung des korrekten C-Terminus, die für eine Präsentation des Epitops zwingend erforderlich ist, nur im Verdau mit i20S-Proteasomen mit einer Schnittintensität von 20 pmol zu beobachten. Im Verdau durch c20S-Proteasomen wurde kein Schnitt nach Ala₁₅₁ beobachtet.

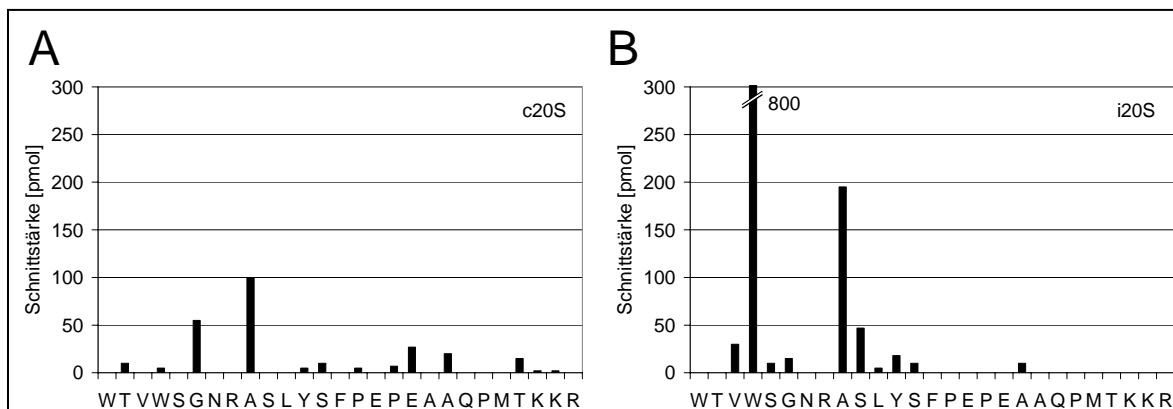


Abb. 21:

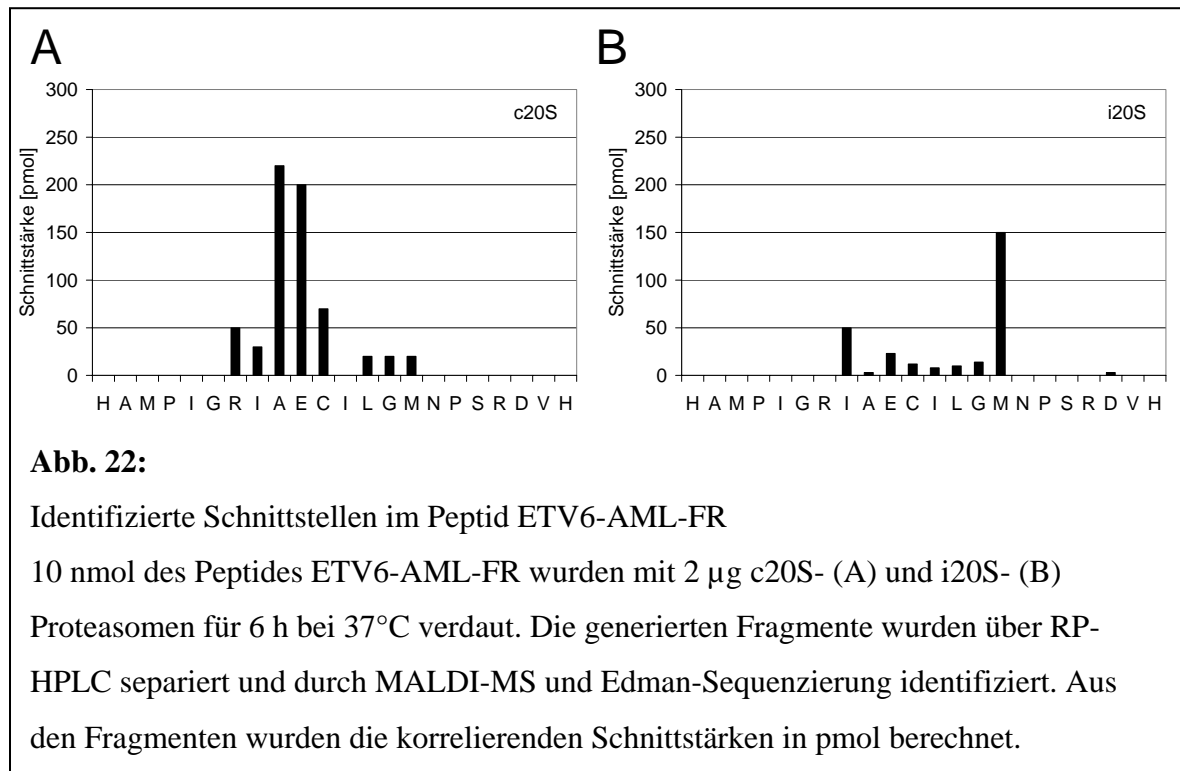
Identifizierte Schnittstellen im Peptid PRAME₁₃₃₋₁₅₉

10 nmol des Peptides PRAME₁₃₃₋₁₅₉ wurden mit 2 µg c20S- (A) und i20S- (B) Proteasomen für 6 h (c20S) bzw. 3 h (i20S) bei 37°C verdaut. Die generierten Fragmente wurden über RP-HPLC separiert und durch MALDI-MS und Edman-Sequenzierung identifiziert. Aus den identifizierten Fragmenten wurden die korrelierenden Schnittstärken in pmol berechnet.

3.4. In vitro Verdau eines Peptides aus der Fusionsregion von ETV6-AML1

Die Translokation t(12,21) ist die am häufigsten beobachtete genetische Anomalie in pre-B-Zell akutem lymphoblastischen Lymphomen, die in der Kindheit auftreten. Diese Translokation kann in ca. 25% der Patienten nachgewiesen werden (Shurtleff et al., 1995;Raynaud et al., 1996;Cayuela et al., 1996;Baruchel et al., 1997) und führt zur Expression eines chimären, 336 AA großen Fusionsproteins (ETV6-AML) aus der helix-loop-helix-Domäne des Transkriptionsfaktors ETV6 und AML1, der DNA bindenden Domäne des AML1/CFBb Transkriptionsfaktor-Komplexes. In den meisten Patienten mit t(12,21) findet sich exakt die gleiche Fusionsstelle (Romana et al., 1999). Aus dieser Fusionsregion ist ein HLA-A*0201 bindendes Nonapeptid (RIAECILGM) beschrieben, für dieses Peptid spezifische T-Zellen, die in der Lage sind, ETV6-AML endogen exprimierende Tumorzellen zu lysieren, konnten in Patienten nachgewiesen werden (Yotnda et al., 1998b).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Prozessierung des Peptids RIAECILGM bevorzugt durch c20S- oder i20S- Proteasomen erfolgt. Die Analyse erfolgte durch proteasomalen Verdau des 22 AA langen Peptides HAMPIGRIAECILGMNPSRDVH, das aus der Fusionsregion von ETV6-AML stammt. (Abb. 22). Der C-Terminus des Peptides RIAECILGM kann sowohl durch c20S- als auch i20S- Proteasomen generiert werden, allerdings erfolgt die Prozessierung durch i20S-Proteasomen wesentlich effektiver als durch c20S-Proteasomen (150 pmol vs. 25 pmol Schnittstärke des Schnittes zwischen Met₁₅/Asn₁₆). Im Verdau mit c20S Proteasomen wurden außerdem zwei sehr starke Schnitte nach Ala₉ (220 pmol) und Glu₁₀ (200 pmol) beobachtet, die zu einer Zerstörung des Epitops führen.



3.5. In vitro Verdau des Peptides CP α 1₈₅₋₁₀₉

Für die positive Selektion von CTL im Thymus ist die Expression von MHC-Klasse-I Molekülen notwendig, die mit Selbst-Peptiden beladen sind. Kürzlich konnten mehrere Peptide identifiziert werden, die für die positive Selektion von T-Zellen in OT1-Mäusen verantwortlich sind (Stefanski et al., 2001; Santori et al., 2002). OT-1 Mäuse sind transgen für einen T-Zell-Rezeptor, der das Hühner-Ovalbumin 257-264 Peptid SIINFELK im Kontext von H2-K^b erkennt. Da OT-I-LMP7^{-/-}-Mäuse, die defizient für die proteasomale Untereinheit LMP7 sind, und daher keine Immunproteasomen exprimieren, eine deutlich geringeres Verhältnis von OT-I Zellen zu CD8-Zellen aufweisen (Osterloh et al., unpublizierte Ergebnisse), wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eines der bekannten, für die positive Selektion notwendigen Peptide, CP α 1₉₂₋₉₉, präferentiell durch Immunproteasomen prozessiert wird, was diese Beobachtung erklären würde.

Zu diesem Zweck wurde ein 25 AA langes Peptid, CP α 1₈₅₋₁₀₉, welches das Peptid ISFKFDHL (CP α 1₉₂₋₉₉) enthält, das für die positive Selektion von OT-1 Zellen notwendig ist, in vitro durch c20S- und i20S-Proteasomen verdaut. Die Degradationsprodukte wurden über eine RP-HPLC aufgetrennt und mittels MALDI-MS und Edman-Sequenzierung quantitativ

analysiert. Aus den identifizierten Fragmenten wurden die Schnittintensitäten berechnet. (siehe Abb. 23)

Der korrekte C-Terminus, der für eine Präsentation des Epitops zwingend erforderlich ist, kann durch einen Schnitt nach Leu₉₉ sowohl im Verdau mit c20S- als auch im Verdau mit i20S-Proteasomen beobachtet werden. Allerdings ist die beobachtete Schnittstärke durch i20S-Proteasomen mit 2580 pmol mehr als 100fach höher als im Verdau mit c20S-Proteasomen (25 pmol). Die Präsentation des Peptides ISFKFDHL wird dementsprechend durch i20S Proteasomen stark erhöht. Der N-Terminus des Epitops kann durch einen Schnitt nach Gln₉₁ sowohl durch c20S- (150 pmol) als auch durch i20S-Proteasomen (90 pmol) mit annähernd vergleichbarer Effizienz generiert werden.

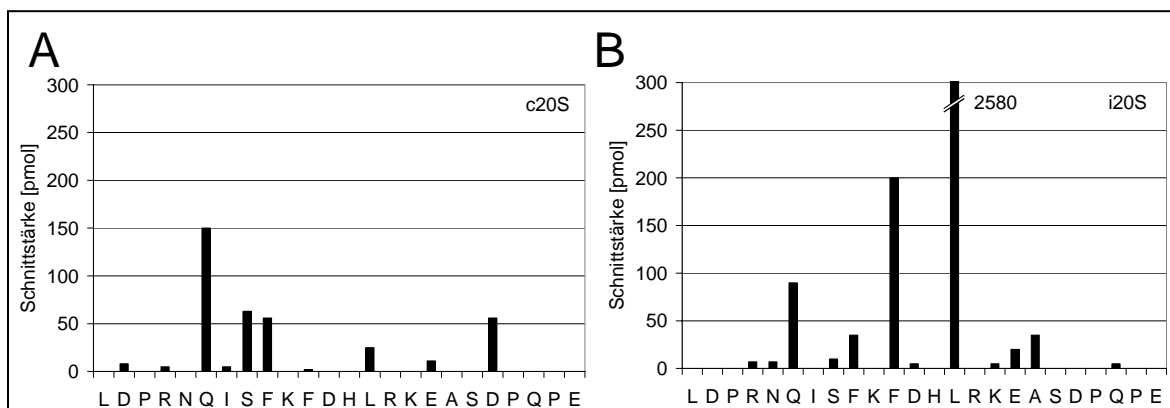


Abb. 23:

Identifizierte Schnittstellen im Peptid CP α 1₈₅₋₁₀₉

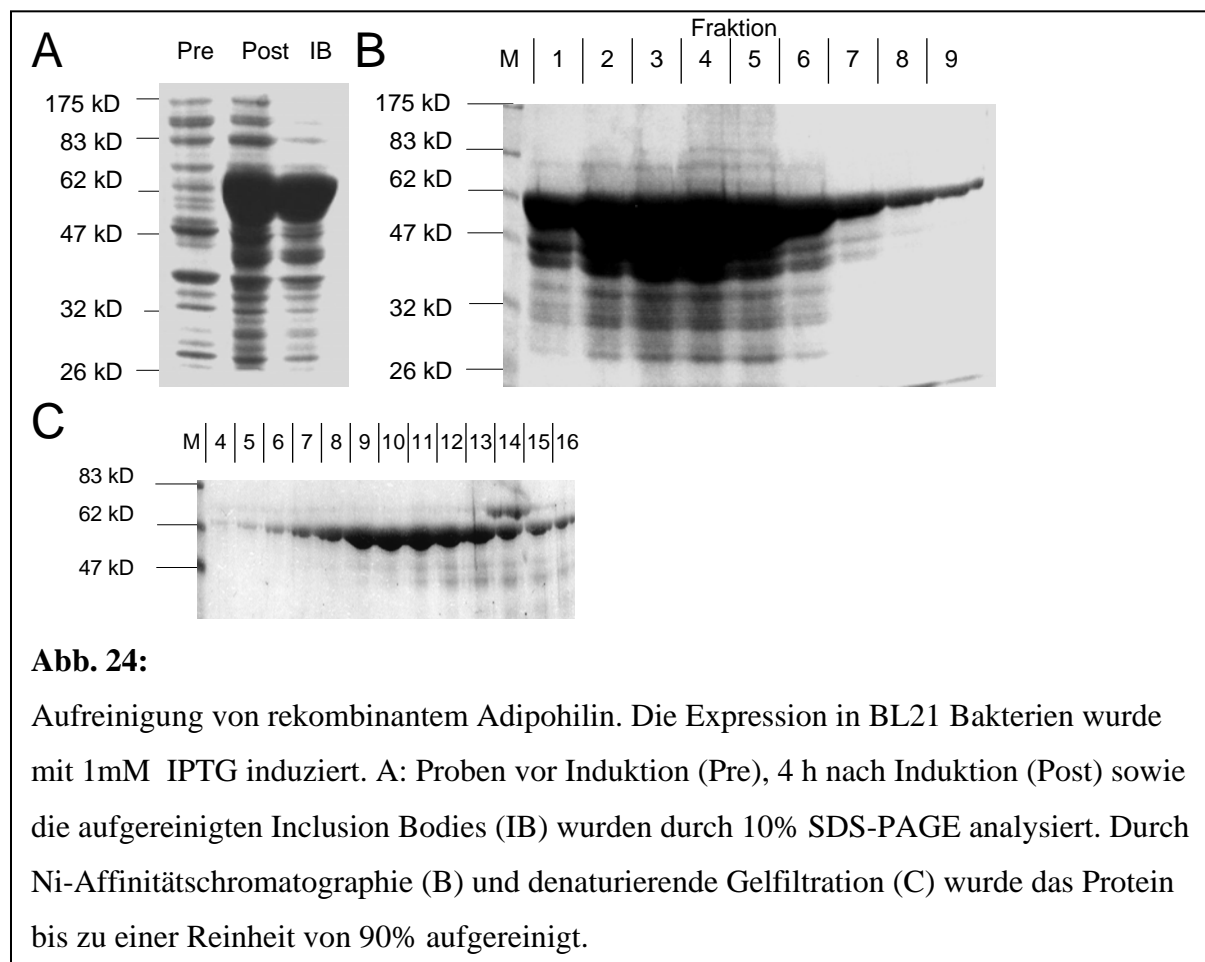
10 nmol des Peptides Peptid CP α 1₈₅₋₁₀₉ wurden mit 2 μ g c20S- (A) und i20S- (B) Proteasomen für 6 h bei 37°C verdaut. Die generierten Fragmente wurden über RP-HPLC separiert und durch MALDI-MS und Edman-Sequenzierung identifiziert. Aus den identifizierten Fragmenten wurden die korrelierenden Schnittstärken in pmol berechnet.

4. Identifikation neuer Substrate für das 20S Proteasom

4.1 Aufreinigung und proteasomaler Verdau von Adipophilin

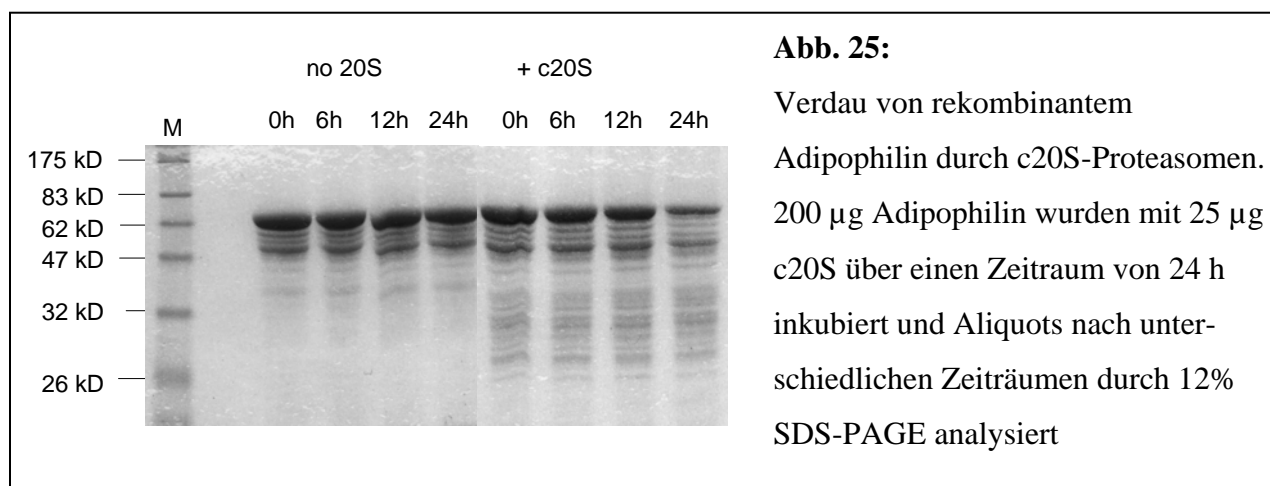
Zur Aufreinigung von rekombinantem Adipophilin wurden E.coli BL21 Bakterien mit dem Vektor pET30a-Adipophilin transfiziert. Die Expression des His₆-markierten Proteins wurde durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1mM induziert (Abb. 24a) und die Bakterien nach 4 h geerntet. Durch Behandlung in der FrenchPress wurden die Bakterien lysiert und die gebildeten Einschlusskörper (inclusion bodies) aufgereinigt. In diesen liegt das Protein bereits in einer Reinheit von ca. 50% vor. (Abb. 24a).

Die Einschlusskörper wurden in 8 M Harnstoffpuffer aufgelöst und das rekombinante Protein weiter über eine Ni-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. (Abb. 24b). Die Fraktionen 2-5 wurden vereinigt und durch Ultrafiltration mit einer 50 kDa NWML-Membran aufkonzentriert. Mittels einer Gelfiltration über eine Sephadex S300 Säule unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) wurde das Protein bis zu einer Reinheit von ca. 90 % gereinigt. (Abb. 24c) Die Fraktionen 9-12 wurden vereinigt und bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml aufkonzentriert.



Mit dem gereinigten Protein (200 µg) wurde anschließend ein proteasomaler Verdau mit c20S-Proteasomen (25 µg) durchgeführt. Es konnte ein ca. 50% Abbau des eingesetzten Substratproteins in einem Zeitraum von 24 h beobachtet werden. (Abb. 25)

Die entstandenen Fragmente wurden durch RP-HPLC aufgetrennt und durch Edman-Sequenzierung analysiert. Allerdings konnten keine Fragmente in den gesammelten Fraktionen identifiziert werden, was eventuell an der Anwesenheit von Harnstoff liegen könnte. Auch in einem Zweitversuch konnten keine Fragmente durch MALDI-MS oder Edmansequenzierung nachgewiesen werden.



4.2. Verdau von Glutamat-Dehydrogenase und Aldolase durch c20S- und i20S-Proteasomen

Aldolase und Glutamat-Dehydrogenase sind zwei zytosolische Enzyme, die ähnlich wie Enolase im normalen Haushaltsstoffwechsel der Zelle eine Rolle spielen. Die Aminosäureverteilung in diesen beiden Proteinen ist im Gegensatz zu PrP der durchschnittlichen Aminosäureverteilung aller Proteine sehr ähnlich. Daher stellt die Analyse des Verdau dieser beiden Proteine eine gute Möglichkeit dar, weitere Informationen über die Schnittspezifität von c20S- und i20S-Proteasomen zu gewinnen und letztendlich dem Ziel einer optimalen proteasomalen Schnittvorhersage wesentlich näher zu kommen.

Die beiden Proteine wurden in einer Reinheit von über 95% von Sigma-Aldrich als kristalline Suspension in Ammoniumsulfat bezogen.

Durch eine Optimierung der Verdaubedingungen (Pufferzusammensetzung, Konzentration von SDS) konnten diese beiden Proteine *in vitro* sowohl durch c20S- als auch i20S-Proteasomen abgebaut werden (Abb. 26). Die benötigte Inkubationszeit bewegt sich je nach eingesetzter Menge an Proteasomen zwischen 2 h und 4 h.

Als besonders wichtig erwies sich das Arbeiten in einer auf konstant 37° C temperierten Umgebung, jede auch nur kurze Abkühlung des Reaktionsansatzes unter diese Temperatur scheint den Verdau negativ zu beeinflussen oder ganz zu verhindern. Dies könnte durch einen reversiblen Entfaltungsprozess des eingesetzten Substrates durch SDS bedingt sein, wobei eine Abkühlung nach dieser Hypothese zum Zurückfallen des Substratproteins in eine nicht durch das Proteasom prozessierbare Form führt.

In einem Vorversuch konnten in den Verdauansätzen über LC-MS/MS Fragmente aus den eingesetzten Substratproteinen nachgewiesen werden. Die komplette Analyse und Quantifizierung der erzeugten Fragmente ist für ein Anschlussprojekt geplant.

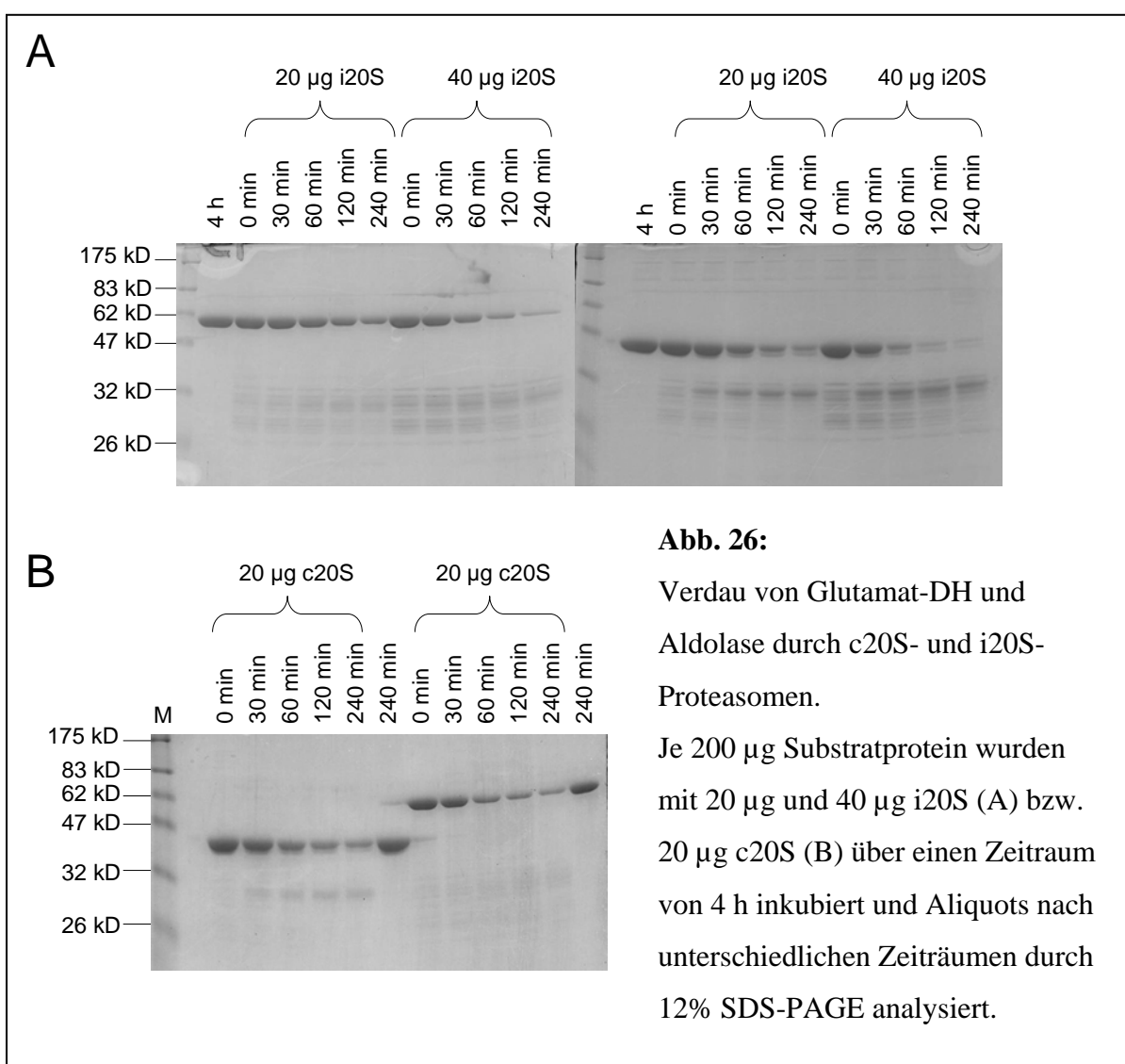


Abb. 26:

Verdau von Glutamat-DH und Aldolase durch c20S- und i20S-Proteasomen.

Je 200 µg Substratprotein wurden mit 20 µg und 40 µg i20S (A) bzw. 20 µg c20S (B) über einen Zeitraum von 4 h inkubiert und Aliquots nach unterschiedlichen Zeiträumen durch 12% SDS-PAGE analysiert.

5. Das „Reverse Analysis of Processing“-Projekt (RAP)

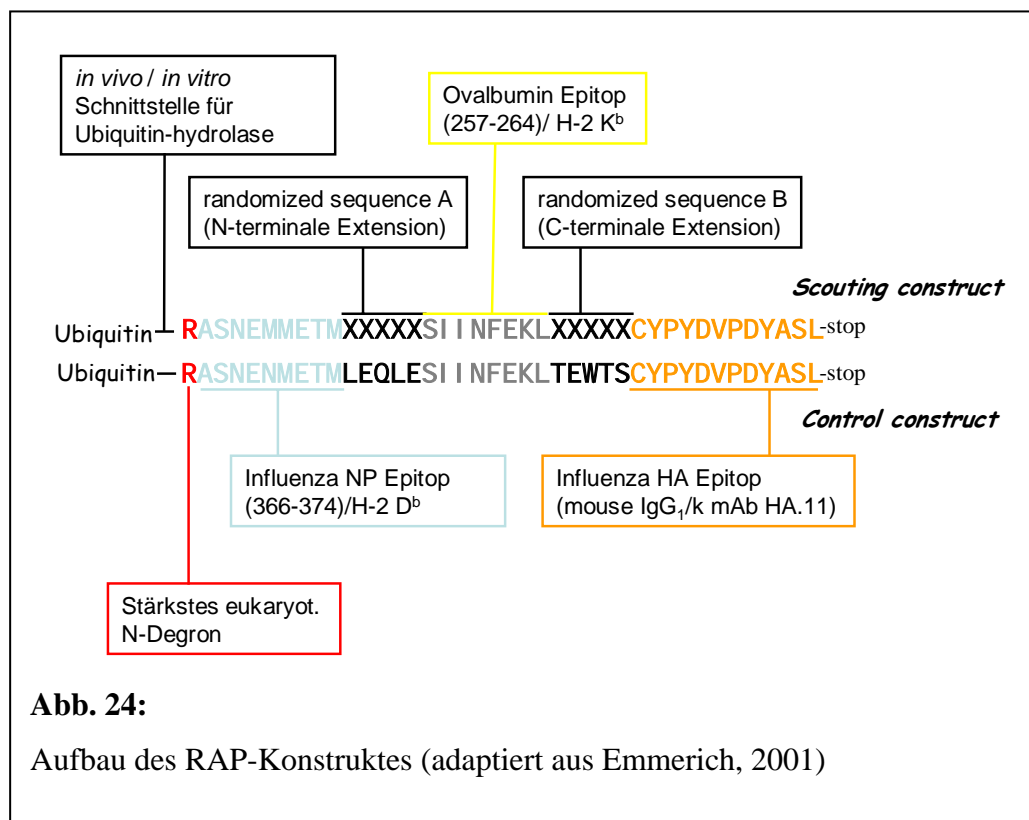
5.1. Funktionsweise des Systems

Bisherige Versuche zur Analyse der Antigenprozessierung analysieren den Einfluss unterschiedlicher Prozesse, wie proteasomales Schnittverhalten, die Spezifität von Aminopeptidasen in Zytosol und ER und TAP-Transport voneinander getrennt, meist durch *in vitro* Experimente, wie den proteasomalen Abbau von Modellsubstraten. Dieser traditionelle Ansatz liefert zwar sehr genaue Informationen über den Einfluss einzelner Prozesse, jedoch ist nicht geklärt, ob sich die *in vitro* beobachtete Spezifität auch ohne weiteres auf die Situation innerhalb einer Zelle übertragen lässt. Ein dazu völlig unterschiedlicher Ansatz wurde von N. Emmerich vorgeschlagen (Emmerich, 2001). Er basiert auf der Betrachtung des Einflusses unterschiedlicher flankierender Aminosäuren auf die Präsentation eines bekannten CTL-Epitopes (SIINFEKL aus Ovalbumin), das auf H2-K^b präsentiert wird. Die Expression dieses sehr gut charakterisierten Epitops kann auf einfache Art durch FACS-Analyse mit dem monoklonalen Antikörper 25.D1.16 (Porgador et al., 1997) analysiert werden. Die Oberflächenexpression bzw. die beobachtete Präsentationsrate, die sich durch Saures Waschen (Acid Wash) und anschließendes Monitoring der Oberflächenexpression über einen Zeitraum von 6 h messen lässt, sollte der Gesamteffizienz der an der Prozessierung beteiligten Prozesse proportional sein.

Für dieses Projekt wurde ein chimäres Genkonstrukt (siehe Abb. 24) synthetisiert, das die Expression unterschiedlicher Aminosäuren in N- und C-terminal flankierenden Sequenzen erlaubt. Die Proteintranslation beginnt mit dem Methionin eines Ubiquitinmoleküls. Auf das C-terminale Glycin des Ubiquitins folgt ein Argininrest, der die erste Aminosäure des sogenannten RAP-Konstruktes darstellt. In eukaryotischen Zellen wird diese Peptidbindung zwischen Glycin und Arginin kotranslationell durch sogenannte ubiquitin-prozessierende Proteasen gespalten, so dass das Arginin letztendlich als N-terminaler Rest generiert wird. Damit wird der Abbau des durch das Konstrukt exprimierten Polypeptids stark beschleunigt, da Arginin das stärkste bekannte N-terminale Degron darstellt (Varshavsky, 1997). Das aus dem Influenza A34 Nukleoprotein stammende Peptid ASNENMETM ist ein Ligand von H2-D^b und CTL Epitop (Townsend et al., 1986) und kann im Falle einer Transfektion des Konstruktes in H2-D^b-positive Zellen als zusätzliche Kontrolle für das Expressionslevel verwendet werden. Die als „randomized sequence A“ und „randomized sequence B“ bezeichneten Sequenzabschnitte umfassen die Aminosäurepositionen P5-P1 vor und P1'-P5'

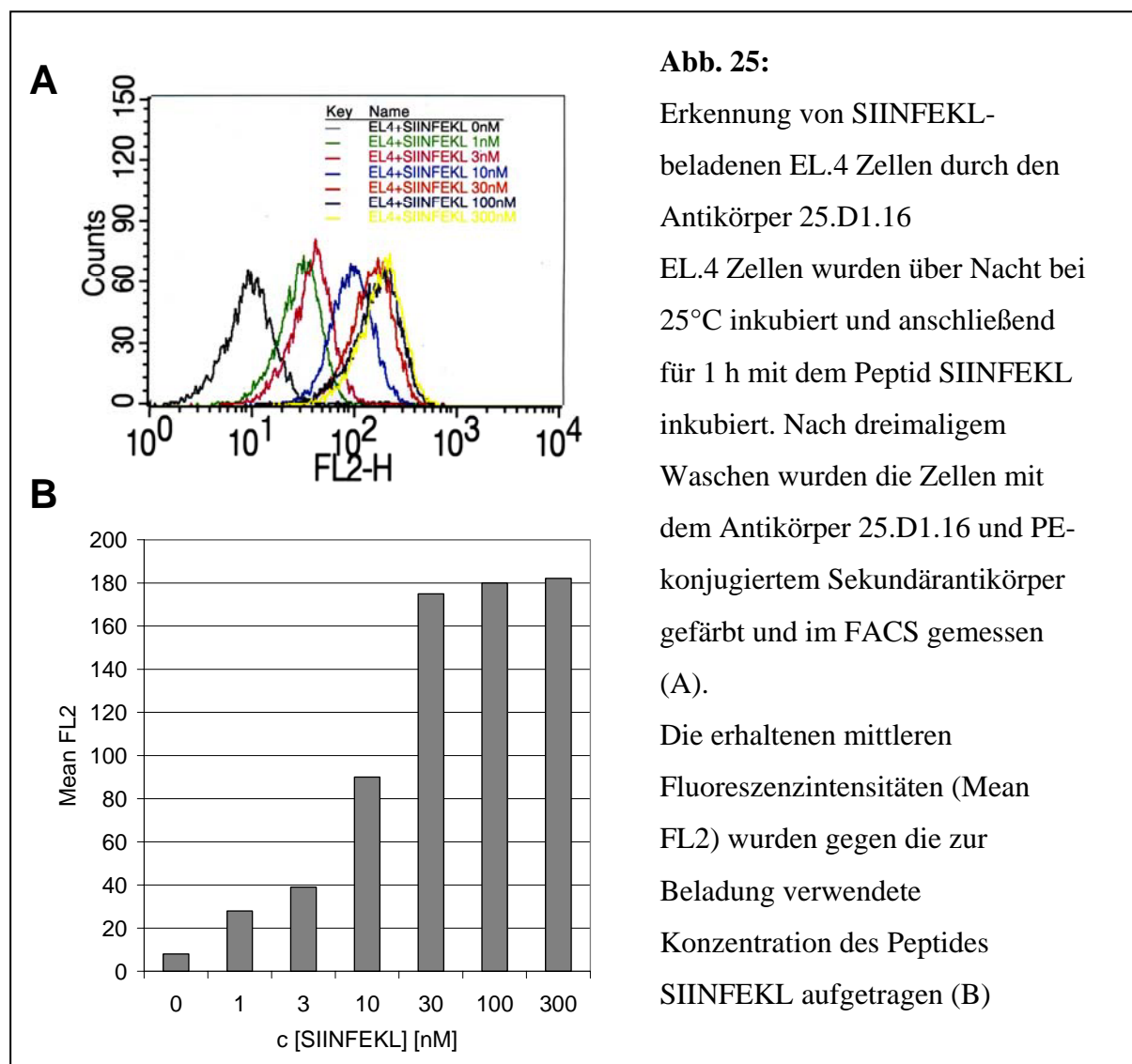
nach dem Epitop SIINFEKL, die Sequenz dieser Abschnitte kann durch Verwendung einer entsprechenden Bibliothek von Oligonukleotiden frei verändert werden. Durch Verwendung entsprechender Oligonukleotid-Bibliotheken ist auch die separate Analyse des Einflusses einzelner Positionen auf einfache Weise möglich. Das sehr gut charakterisierte Epitop CYPYDVPDYASL aus dem Hämagglutinin des Influenza-A Virus kann durch den Antikörper HA.11 des Hybridomklons 16B12 im Western Blot nachgewiesen werden, auf diese Weise kann eine zusätzliche Standardisierung des Expressionsniveaus erfolgen, hierdurch können beispielsweise Klone von einer Analyse ausgeschlossen werden, die innerhalb der randomisierten Sequenzen ein Stop-Codon aufweisen, oder aber eine Leserasterverschiebung beinhalten.

Durch die Verwendung des FlpIn-Systems ist eine Integration des Konstruktes in eine definierte, in allen Transfektanten identische Stelle des Genoms gewährleistet. Das Expressionsniveau der Konstrukte kann zusätzlich auf einfache Weise im FACS kontrolliert werden, da im endgültigen Expressionsvektor eine bicistronische RNA codiert wird, die über eine IRES-Sequenz die gleichzeitige Expression von EGFP ermöglicht.



5.2. Detektion der Expression des H2-K^b-SIINFEKL-Komplexes

Um die Funktion des Antikörpers 25.D1.16 zu testen, wurden EL.4 Zellen über Nacht bei 25°C inkubiert. Hierdurch können auch niedrig affine Peptide im ER auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen und auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Durch Inkubation über einen Zeitraum von 1 h mit unterschiedlichen Konzentrationen des synthetischen Peptides SIINFEKL und einem ebenfalls H2-K^b-restringiertem Kontrollpeptid (RTYTYEKL) wurden die so präparierten Zellen mit Peptid beladen und nach Inkubation überschüssiges Peptid durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit dem Primärantikörper 25.D1.16 und Ziege-anti-Maus-PE als Sekundärantikörper gefärbt.

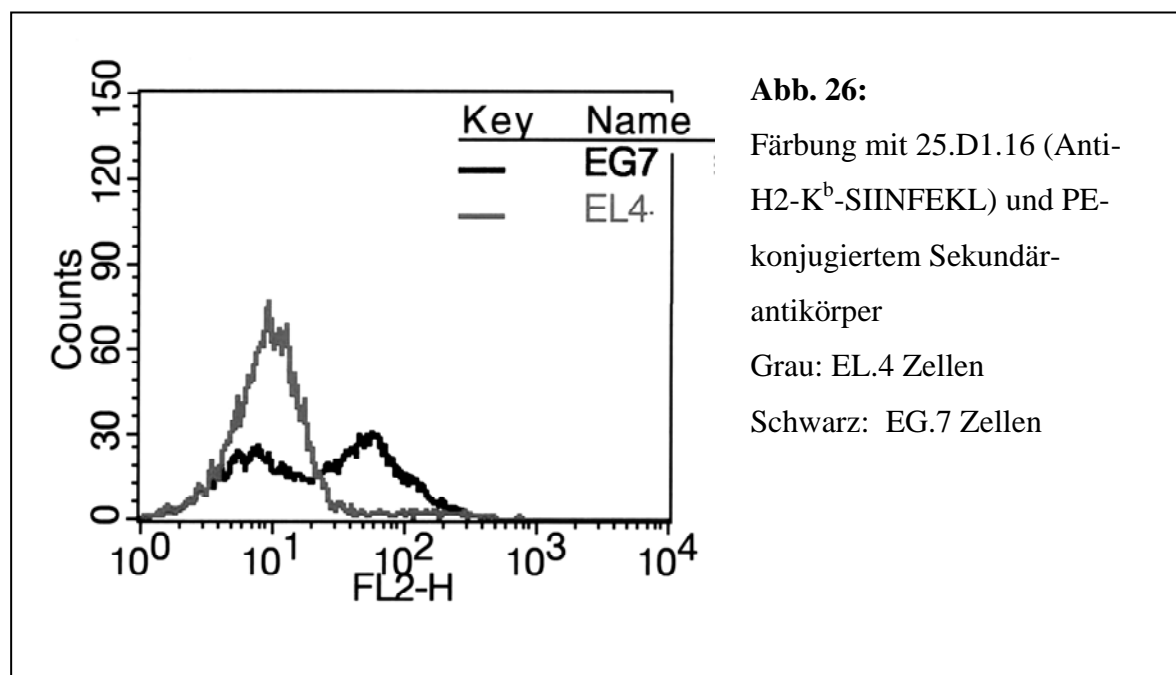


Während die mit dem Kontrollpeptid beladenen Zellen durch den Antikörper im gleichen Maße wie unbeladene Zellen erkannt wurden, erfolgte nach Beladung der Zellen mit SIINFEKL eine konzentrationsabhängige Erkennung durch den Antikörper. Unter diesen Bedingungen wurde eine Sättigung im Bereich zwischen 100 nM und 300 nM SIINFEKL erreicht (Abb. 25).

5.3. Detektion von endogen prozessiertem SIINFEKL

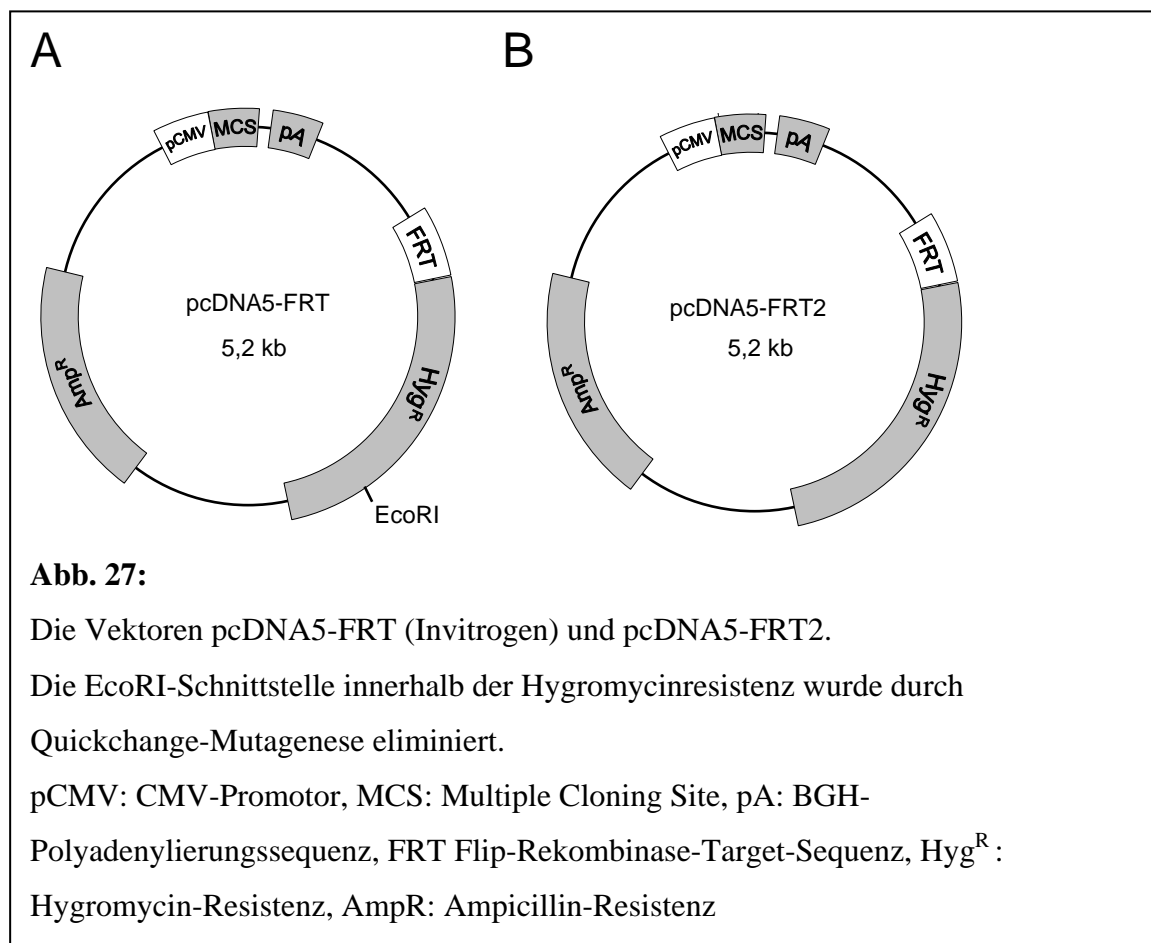
Zum Nachweis, dass auch endogen prozessiertes SIINFEKL durch den Antikörper 25.D1.16 erkannt werden kann, bzw. die in diesem Fall vorliegenden Expressionslevel detektiert werden können, wurde die Ovalbumin-exprimierende Zelllinie EG.7 verwendet, die durch Transfektion der Maus-Zelllinie EL.4 ($H2-K^{b+}$) mit einem Ovalbumin-enkodierenden Vektor erhalten wurde.

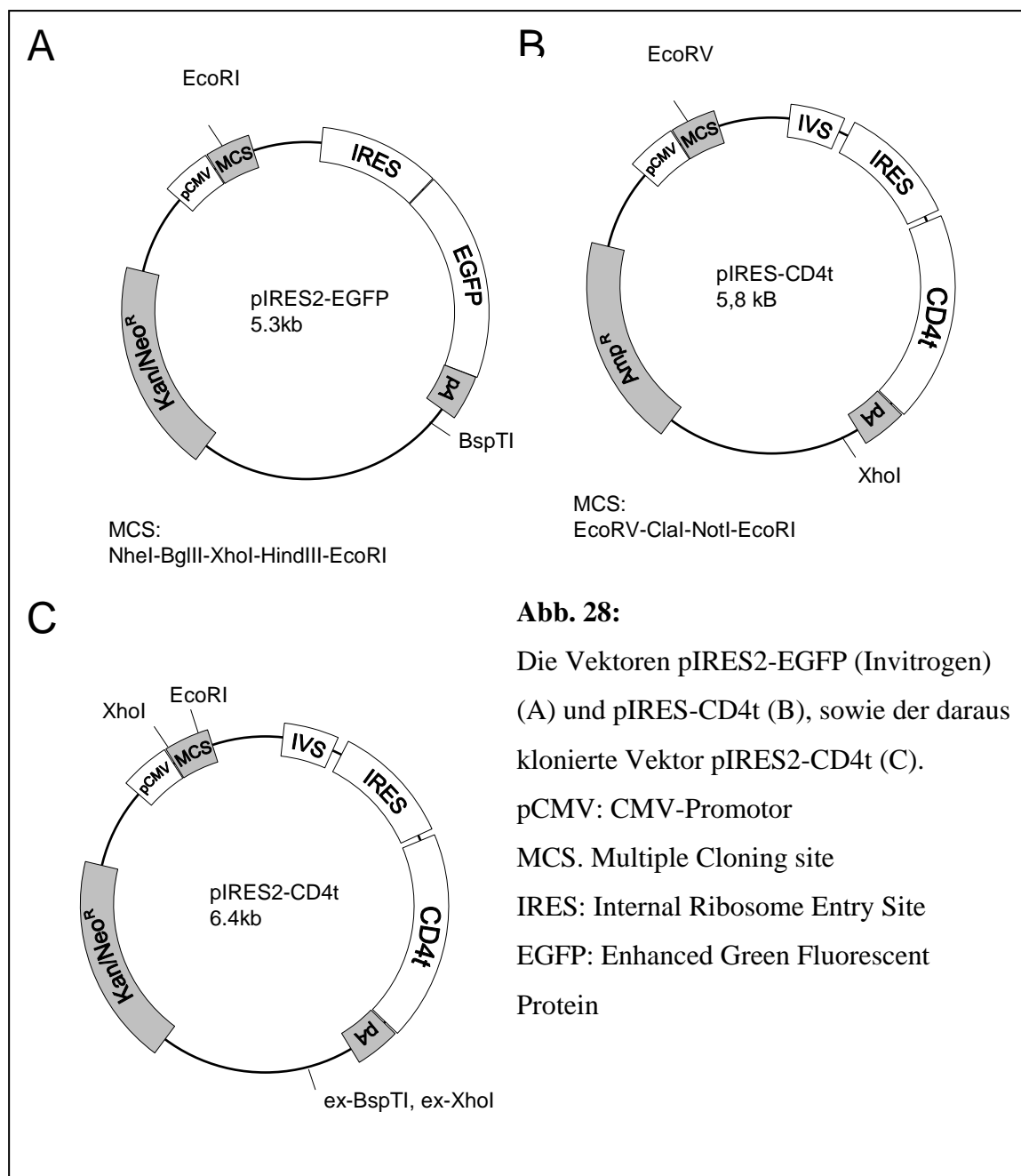
Im Vergleich zur parentalen Kontrolllinie EL.4 konnte bei ca. 50% der untersuchten EG.7-Zellen eine deutliche Färbung des Antikörpers nachgewiesen werden (Siehe Abb. 26). Das nicht alle Zellen der Linie EG.7 durch den Antikörper 25.D1.16 erkannt werden, ist auf eine hohe Zahl von Kulturpassagen der verwendeten Zellen zurückzuführen, die zum Verlust der Expression von Ovalbumin bei einem Teil der Zellen führte.



5.4. Klonierung der Expressionsvektoren

Zur Klonierung des RAP-Konstruktes wird eine EcoRI-Schnittstelle benötigt, allerdings beinhaltet die Sequenz des Vektors pcDNA5-FRT (Invitrogen) zwei EcoRI-Schnittstellen, eine innerhalb der Multiple Cloning Site und eine weitere innerhalb des Hygromycin-Resistenzgens. Letztere wurde durch Quickchange-Mutagenese mit Hilfe der Primer pcDNA5Ecomut-S und pcDNA5Ecomut-AS eliminiert, und die Mutation erst durch Restriktionsverdau mit dem Enzym EcoRI durch anschließend durch Sequenzierung bestätigt. Der so erhaltene Vektor wird als pcDNA5-FRT2 bezeichnet (Abb. 27).



**Abb. 28:**

Die Vektoren pIRES2-EGFP (Invitrogen) (A) und pIRES-CD4t (B), sowie der daraus klonierte Vektor pIRES2-CD4t (C).

pCMV: CMV-Promotor

MCS: Multiple Cloning site

IRES: Internal Ribosome Entry Site

EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein

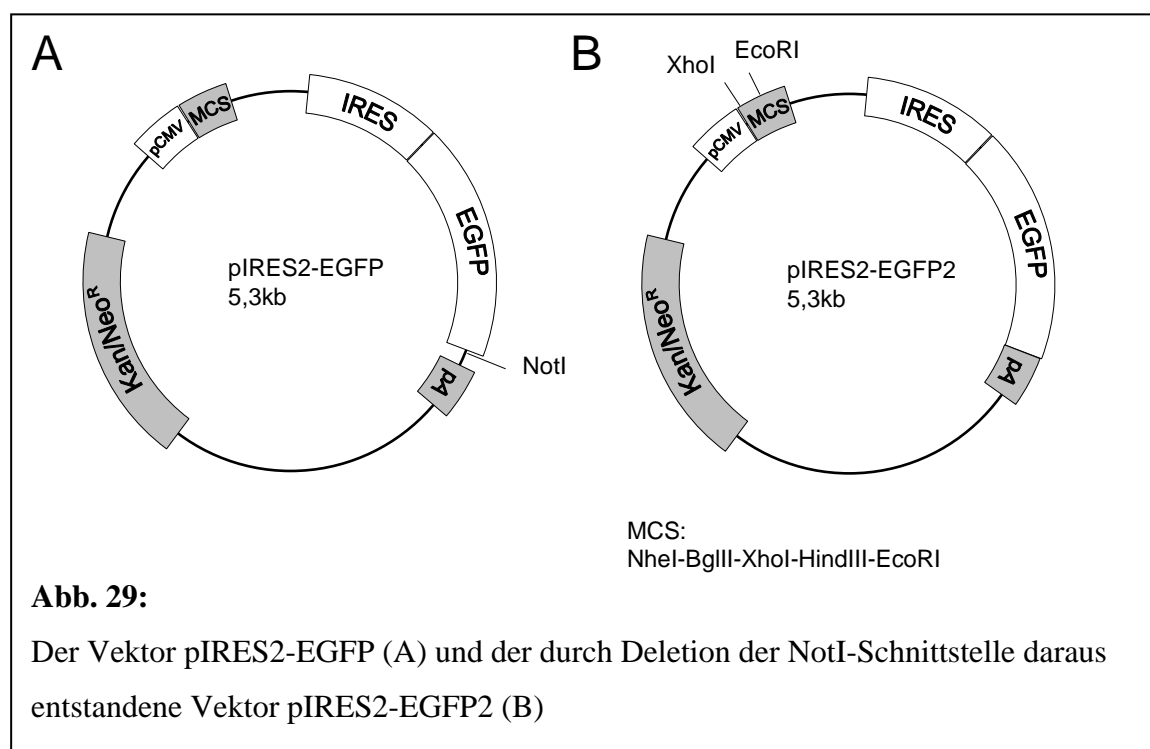
Protein

Zur Generierung einer Multiple Cloning Site (MCS) mit den Schnittstellen XhoI, NotI und EcoRI wurde der Vektor pIRES2-EGFP (Abb.28 a) mit EcoRI und BspT1 verdaut und die Verdauprodukte über ein 1% Agarosegel aufgereinigt. Das 3,8 kb große Fragment wurde mit Hilfe des QiaQuick-Kits aus dem Gel eluiert und die überhängenden Enden durch Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt. Parallel dazu wurde der Vektor pIRES-CD4t (Abb. 28b) mit EcoRV und XhoI verdaut, und die Verdauprodukte über ein 1% Agarosegel aufgereinigt. Das 2,6 kb große Fragment wurde mit Hilfe des QiaQuick-Kits aus dem Gel eluiert und die überhängenden Enden durch Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt. Beide Fragmente wurden durch T4-DNA-Ligase ligiert, das Reaktionsprodukt ist

der Vektor pIRES2-CD4t (Abb. 28c), dessen Identität durch mehrere Restriktionsverdau bestätigt wurde.

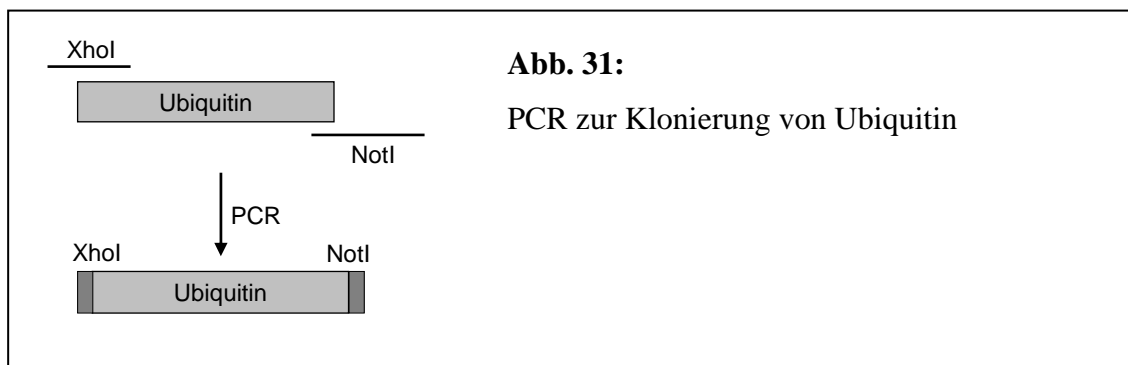
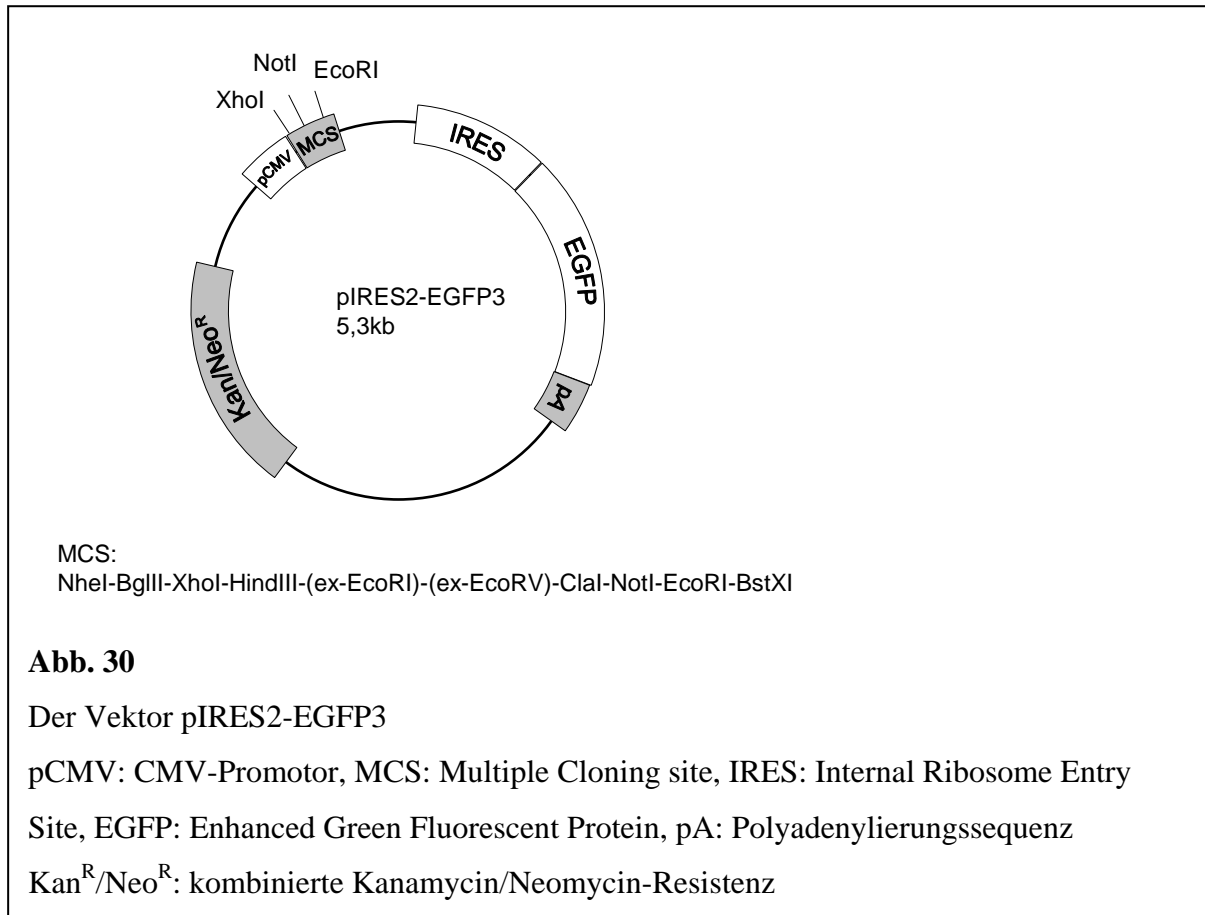
Aus dem Vektor pIRES2-EGFP (Abb. 29a) wurde eine NotI Schnittstelle zwischen EGFP und Polyadenylierungssequenz deletiert, da im weiteren Verlauf der Klonierung eine NotI-Schnittstelle in die Multiple Cloning Site integriert wird, die sonst nicht verwendet werden könnte. Die Deletion der NotI-Schnittstelle erfolgt durch Restriktionsverdau mit NotI, die überhängenden Enden wurden durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt und die entstandenen Blunt-Enden im Beisein des Enzyms NotI religiert.

Durch Restriktionsverdau und Sequenzierung wurde die Deletion bestätigt, der entstandene Vektor wird als pIRES2-EGFP2 bezeichnet (Abb. 29b).



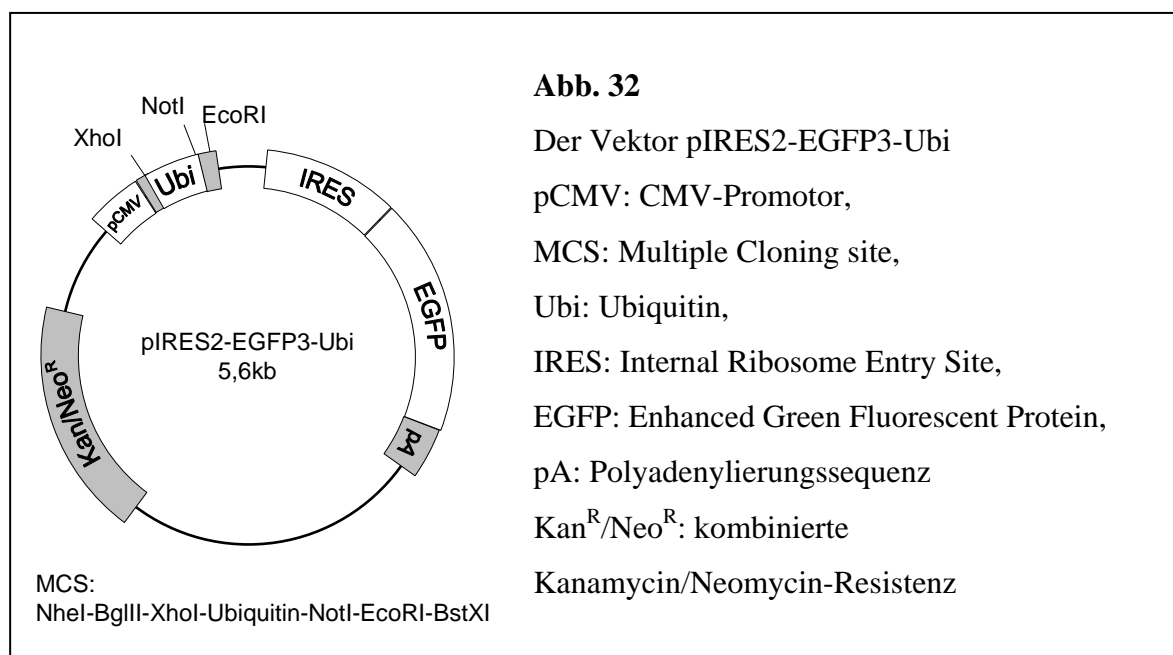
Die Vektoren pIRES2-EGFP2 (Abb. 29b) und pIRES2-CD4t (Abb. 28a) wurden beide mit den Restriktionsenzymen XhoI und EcoRI verdaut und die entstandenen Verdauprodukte über ein 0,5% (pIRES2-EGFP2) bzw. 1,5% Agarosegel (pIRES2-CD4t) aufgetrennt. Das 5,2 kb große Fragment von pIRES2-EGFP2 und das 150 bp große Fragment von pIRES2-CD4t wurden aus den Agarosegelen mit Hilfe des Qiaquick-Kits aufgereinigt und durch T4-DNA-Ligase ligiert. Das Reaktionsprodukt ist der Vektor pIRES2-EGFP3 (Abb. 30), dessen Identität durch Restriktionsverdau und Sequenzierung bestätigt wurde. Dieser Vektor besitzt

eine Multiple Cloning Site, die die Restriktionsenzyme XhoI, NotI, EcoRI in der korrekten Orientierung beinhaltet.



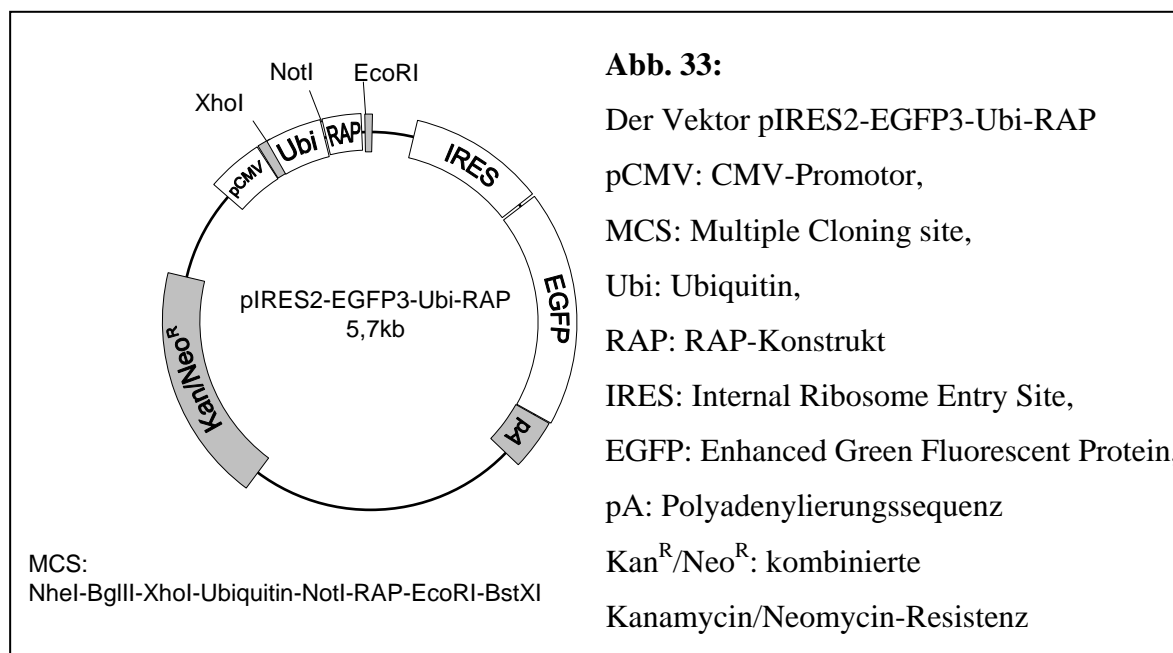
Durch PCR wurde mit Hilfe der Primer Ubi-N+Xho und Ubi-C+Not aus dem Vektor pKS-Ubiquitin ein DNA-Fragment generiert, das die kodierende Sequenz von Ubiquitin, flankiert von den Schnittstellen XhoI und NotI trägt (Abb. 31). Dieses Fragment wurde durch Agarose-Gelelektrophorese und anschließende Elution aus dem Gel aufgereinigt und mit den Restriktionsenzymen XhoI und NotI verdaut, die Reaktionsprodukte wiederum durch Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion gereinigt und in den mit den gleichen Enzyme geschnittenen Vektor pIRES2-EGFP3 ligiert.

Der neu entstandene Vektor wird als pIRES2-EGFP3-Ubi bezeichnet, die Sequenz wurde durch DNA-Sequenzierung betätigt. (Abb. 32)

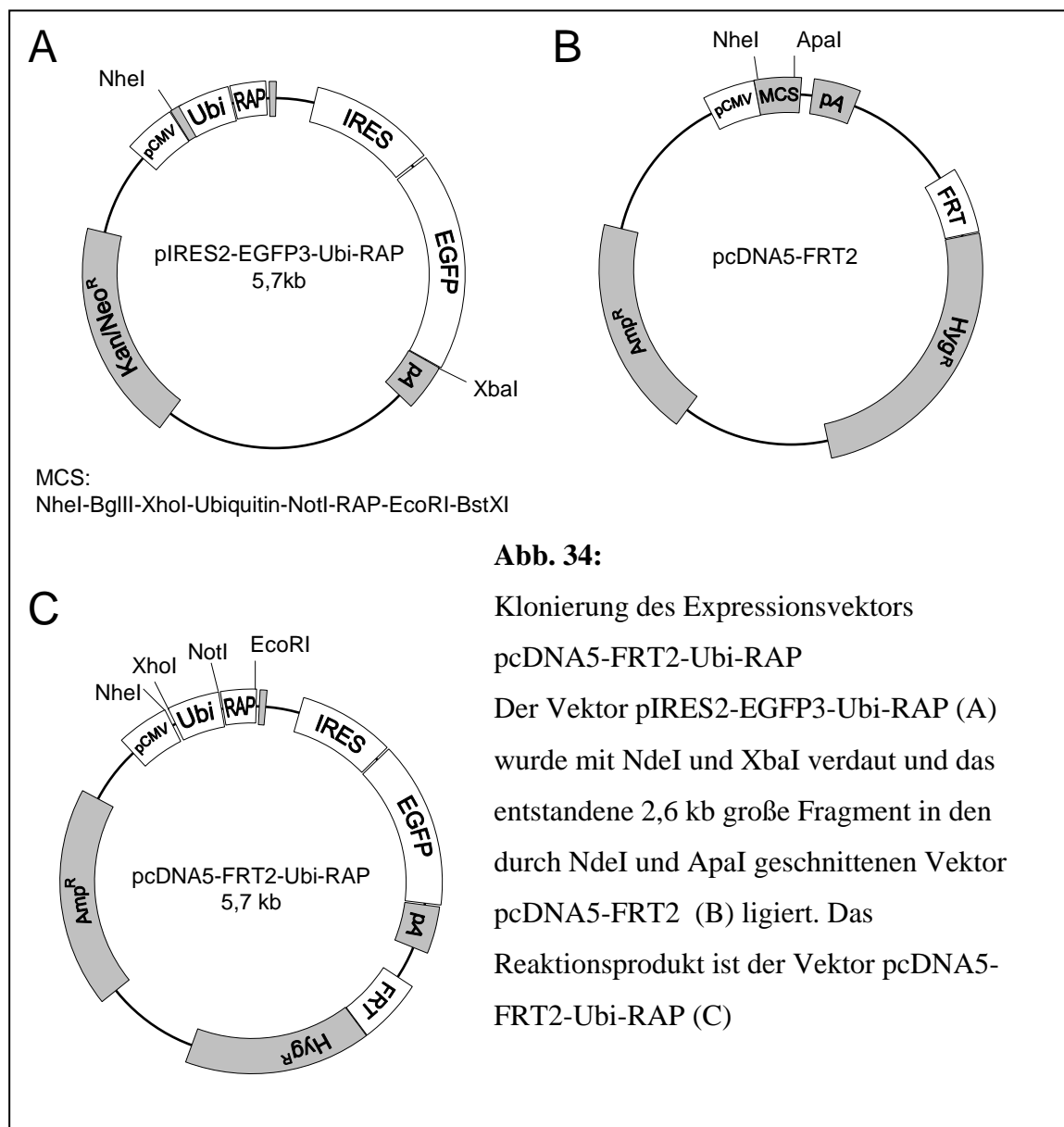


Das für die Sequenz des RAP-Konstruktes kodierende Ligationsprodukt (siehe Abb. 24) wurde von der Firma Entelechon synthetisiert, es trägt an den Enden die Schnittstellen NotI und EcoRI. Dieses Ligationsprodukt wurde mit den Restriktionsenzymen NotI und EcoRI verdaut, die Reaktionsprodukte wiederum durch Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion gereinigt und in den mit den gleichen Enzyme geschnittenen Vektor pIRES2-EGFP3-Ubi ligiert.

Der neu entstandene Vektor wird als pIRES2-EGFP3-Ubi-RAP bezeichnet, die Sequenz wurde durch DNA-Sequenzierung betätigt (Abb. 33).



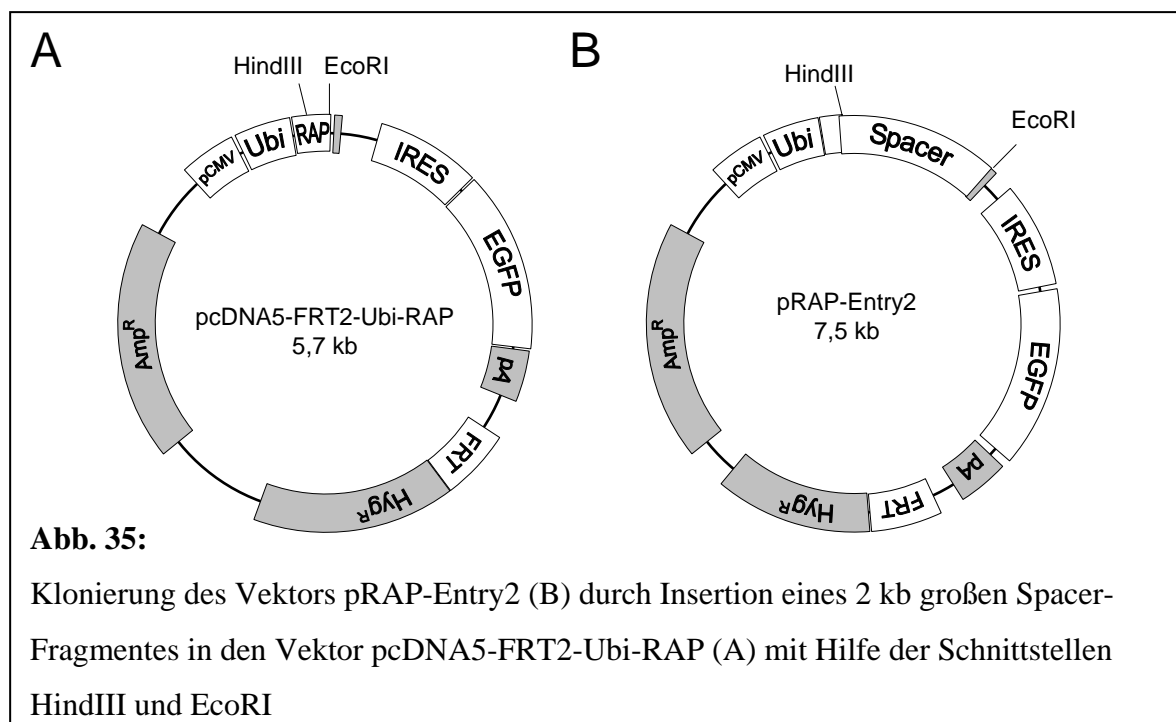
Im letzten Schritt der Klonierung (Abb. 34) des Expressionsvektors wurde der Vektor pIRES2-EGFP3-Ubi-RAP mit dem Restriktionsenzym XbaI verdaut und die Verdauprodukte über ein 0,5% Agarosegel aufgetrennt. Der linearisierte Vektor wurde mit Hilfe des Qiaquick-Kits aus dem Gel eluiert und die überhängenden Enden durch Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt. Parallel dazu wurde der Vektor pcDNA5-FRT2 mit ApaI verdaut, und der linearisierte Vektor mit Hilfe des Qiaquick-Kits aus dem Gel eluiert und die überhängenden Enden durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt. Nach Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung wurden beide linearisierten Vektoren mit dem Enzym NheI verdaut und die Verdauprodukte über ein 1% Agarosegel aufgereinigt. Das 2,6 kb große Fragment von pIRES2-EGFP3-Ubi-RAP und das 5,2 kb große Fragment von pcDNA5-FRT2 wurden mit Hilfe des Qiaquick-Kits aus dem Gel eluiert und durch T4-DNA-Ligase ligiert. Das Reaktionsprodukt ist der Vektor pcDNA5-FRT2-Ubi-RAP (Abb. 34c), dessen Identität durch Restriktionsverdau und Sequenzierung bestätigt wurde.



Die Einführung von Mutationen in den flankierenden Sequenzen des Epitops SIINFEKL ist auf zwei unterschiedliche Wege möglich. Zur spezifischen Generierung einer bestimmten Aminosäuresequenz bietet sich eine Mutagenese mittels der Quickchange-Methode an. Allerdings funktioniert diese Methode bei Vektoren über einer Größe von 4 kb nicht immer zuverlässig. Aus diesem Grund wurde der Vektor pcDNA5-FRT2-Ubi-RAP mit den Restriktionsenzymen XhoI und EcoRI verdaut und das entstehende Fragment in den Vektor pBlueskriptKS kloniert.

In diesem Vektor wurde eine Reihe von Konstrukten mit unterschiedlichen Aminosäuren (Gly, Ala, Leu, Val, Pro, Ile, Ser und ein Stop-Codon) in Position P1' generiert, sowie auch ein Konstrukt, das die Aminosäuren Ile in P1' sowie Arg in P2' (im Folgenden bezeichnet als RAP-IR) enthält. Nach Verifizierung der korrekten Sequenz wurden die mutagenisierten Expressionskassetten wieder mit Hilfe der Restriktionsenzyme XhoI und EcoRI in den Vektor pcDNA5-FRT2-Ubi-RAP zurückkloniert.

Eine weitere Methode, die sich besonders zur Untersuchung des Einflusses aller möglichen Aminosäuren an einer bestimmten Position um die Schnittstelle eignet, ist die Integration eines Fragmentes, das durch Annealing zweier komplementärer Oligonukleotid-Primer gewonnen wird. Durch entsprechende Wahl der Sequenz der Primer können auf diese Weise DNA-Fragmente generiert werden, die bereits die entsprechenden überhängenden Enden zur Ligation enthalten und direkt in einen mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittenen Vektor ligiert werden. Da die für diesen Zweck verwendeten Restriktionsschnittstellen EcoRI und HindIII sehr nahe beieinander liegen (Abb. 35a), was die Abtrennung unvollständig verdauter Reaktionsprodukte durch Agarose-Gelelektrophorese erschwert, wurde der Vektor pRAP-Entry2 (Abb. 35b) kloniert, der zwischen den beiden Restriktionsschnittstellen HindIII und EcoRI ein 2 kb großes Spacer-DNA-Fragment enthält.



Konstrukte, die für sämtliche unterschiedlichen Aminosäuren in Position P1' kodieren, wurden entweder durch Annealing der Oligonukleotide P1'-Sense und P1'- Antisense und Ligation des Produktes in den durch EcoRI und HindIII geschnittenen Vektor pRAP-Entry2 und Transformation der Ligationsprodukte in E. coli oder durch Mutagenese mit dem QuickchangeKIT kloniert (Tabelle 7)

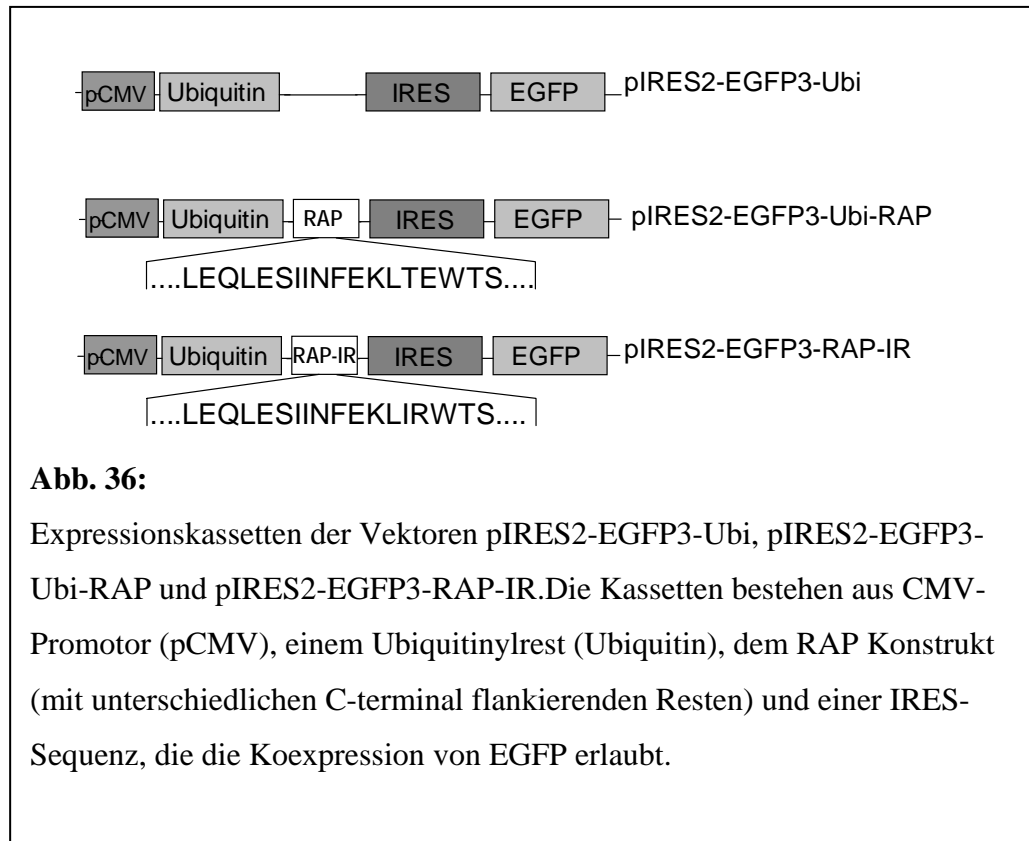
Aminosäure	Klon Nummer					
Ala	1					
Cys	Mutagenese					
Asp	2	35				
Glu	28					
Phe	7					
Gly	23	5	38			
His	6	25	30			
Ile	17	40	47			
Lys	13					
Leu	22	16	33			
Met	49	26				
Asn	21	3	15	10	36	39
Pro	Mutagenese					
Gln	55	56				
Arg	43	31				
Ser	48	20	19	9	41	
Thr	50	8	18			
Val	4	34	42			
Trp	Mutagenese					
Tyr	11	32				

Tabelle 7:

Generierung von Konstrukten mit unterschiedlichen Aminosäuren an Position P1. Angegeben sind die Nummern der jeweiligen Klone für jede Aminosäure, bzw. ob diese Aminosäure durch Quickchange-Mutagenese generiert wurde.

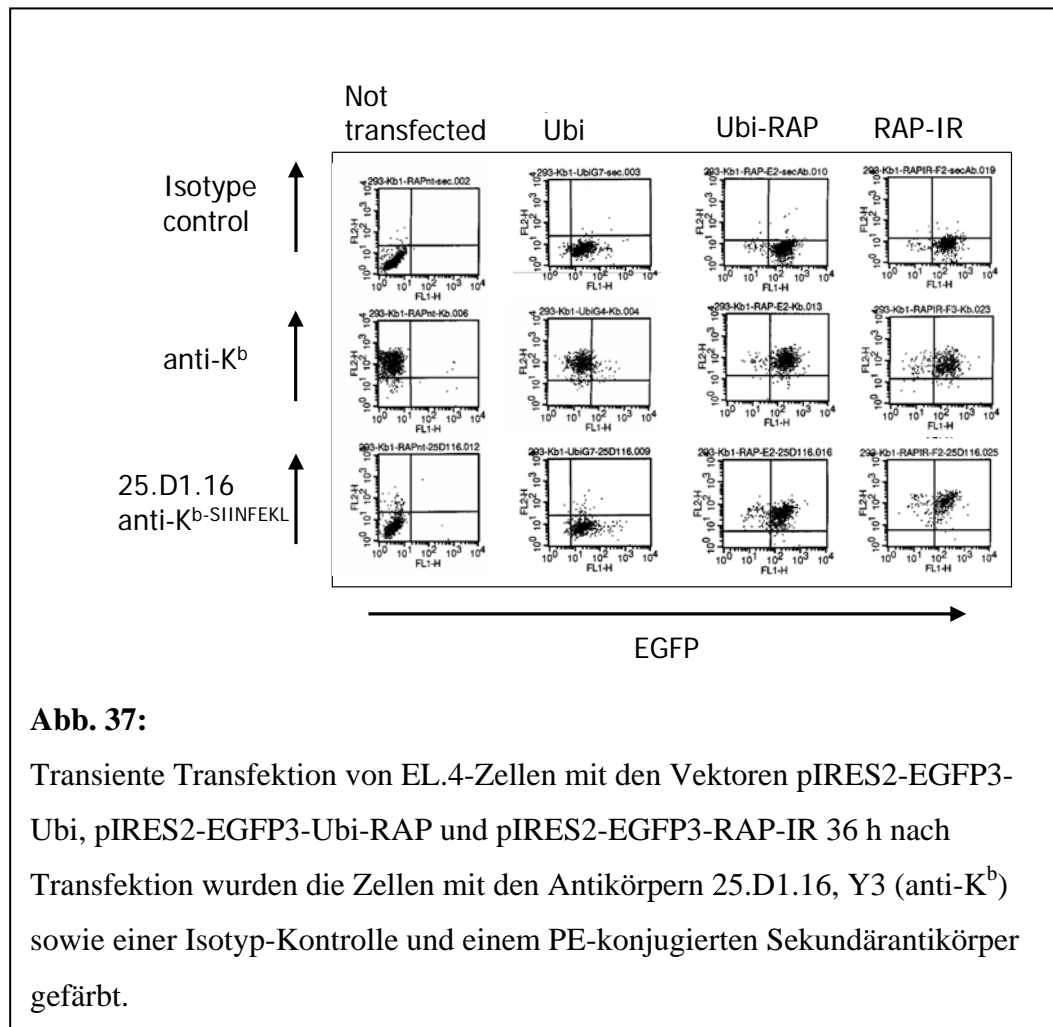
5.5. Expression von SIINFEKL durch das RAP-Konstrukt

Zellen der Linie EL.4 wurden mit den Vektoren pIRES2-EGFP3-Ubi, pIRES2-EGFP3-Ubi-RAP und pIRES2-EGFP3-RAP-IR (siehe Abb. 36) transfiziert.



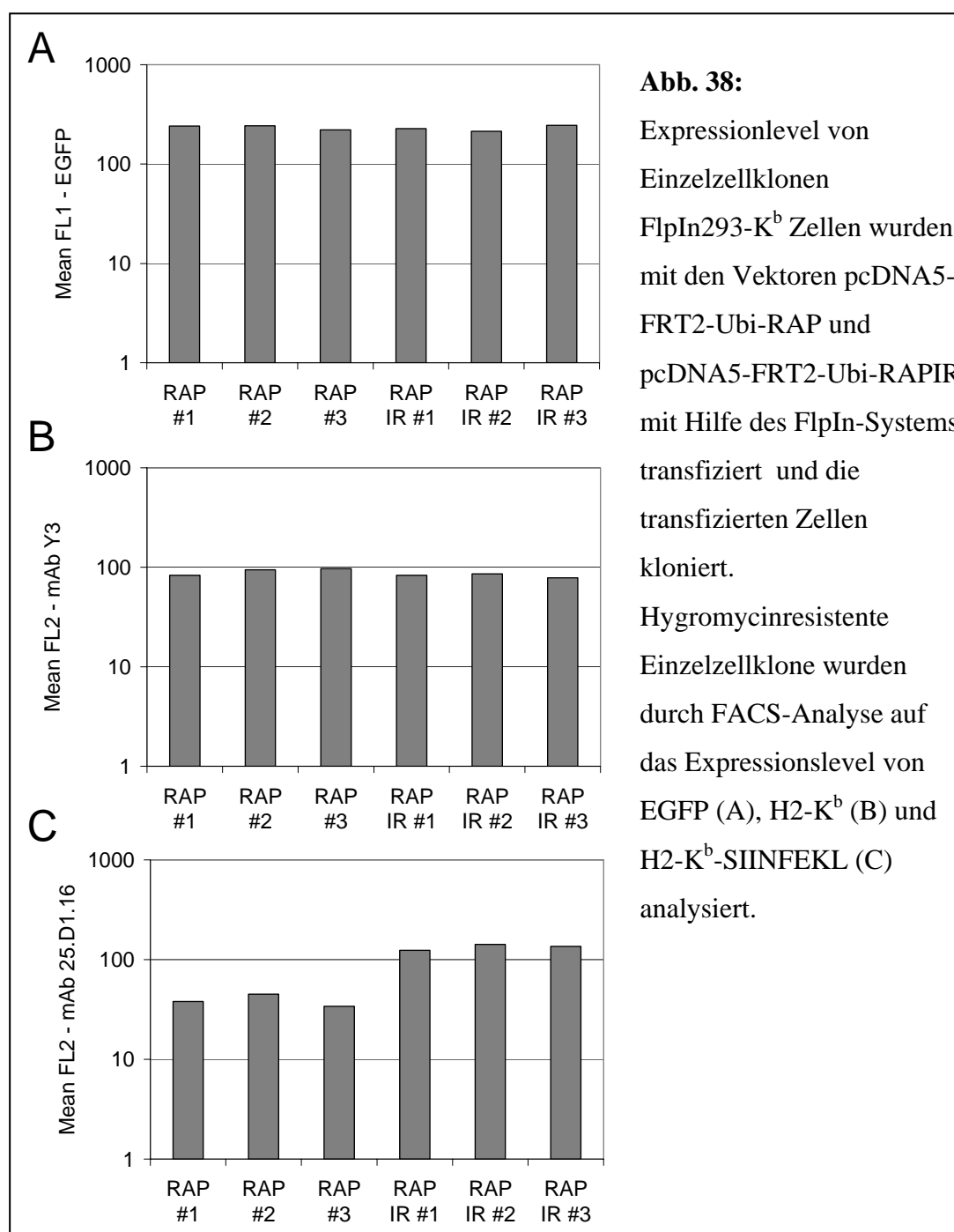
Die Transfektion erfolgte durch Elektroporation mit Hilfe des RF-Moduls (Biorad), hierdurch konnten nach einer Optimierung der Bedingungen Transfektionsraten von über 50% erreicht werden. Die transfizierten Zellen, sowie die untransfizierte Kontrolle wurden 36h nach der Transfektion mit Antikörpern gegen H2-K^b (Y3), H2-K^b-SIINFEKL (25.D1.16) sowie einer Isotyp-Kontrolle und Ziege-Anti-Maus-PE-konjugiertem Sekundärantikörper gefärbt. Wie in Abb. 37 ersichtlich, exprimieren sowohl transfizierte Zellen als auch die untransfizierte Kontrolle auf der Zelloberfläche H2-K^b, während durch die Isotypkontrolle keine Färbung erfolgt. Durch den Antikörper 25.D1.16 werden nur die mit den Vektoren pIRES-Ubi-RAP und pIRES-Ubi-RAP-IR transfizierten Zellen erkannt. Untransfizierte Zellen, sowie die durch den Vektor pIRES-Ubi transfizierten Zellen zeigen keine Färbung mit diesem Antikörper, die Expression von SIINFEKL auf der Zelloberfläche ist also von der Präsenz des RAP-Konstruktes abhängig. Bereits hier ist erkennbar, dass unterschiedliche C-terminal flankierende Aminosäuren einen Einfluß auf die Prozessierungseffizienz haben, da mit dem

Vektor pIRES-Ubi-RAP-IR transfizierte Zellen durch den Antikörper 25.D1.16 in stärkerem Maße gefärbt werden als mit dem Vektor pIRES-Ubi-RAP.



5.6. Homogenität des Expressionlevels von Einzelzellklonen

Mit Hilfe des FlpIn Systems wurden FlpIn-293-K^b Zellen mit zwei unterschiedlichen Vektoren (pcDNA5-FRT2-Ubi-RAP und pcDNA5-FRT2-Ubi-RAPIR) transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden kloniert und das Expressionslevel von jeweils drei Einzelzellklonen untersucht. Hierzu wurde einerseits die EGFP-Expression untersucht (Abb. 38a), außerdem wurden das Oberflächenexpressionslevel von H2-K^b mit dem Antikörper Y3 (Abb. 38b) und die Präsentation von des Peptides SIINFEKL mit dem Antikörper 25.D1.16 (Abb. 38c) untersucht.



In allen untersuchten Einzelzellklonen unterliegt das beobachtete Expressionslevel der transfizierten Konstrukte (detektiert über die Fluoreszenz des durch eine IRES-Sequenz koexprimierten EGFP (Abb. 38a) und von H2-K^b (Abb. 38b) nur sehr geringen Schwankungen. Die Färbung mit dem monoklonalen Antikörper 25.D1.16 zeigt jedoch deutliche Unterschiede zwischen den mit pcDNA5-Ubi-RAP und pcDNA5-Ubi-RAPIR-transfizierten Einzelzellklonen, während sich die jeweils drei untersuchten Klone pro Transfektion nur marginal untereinander in der Färbung durch 25.D1.16 unterscheiden. Die beobachteten Unterschiede in der durch 25.D1.16 detektierten Oberflächenexpression des H2-K^b-SIINFEKL Komplexes sind dementsprechend auf eine unterschiedliche Prozessierungseffizienz des exprimierten SIINFEKL-Konstruktes zurückzuführen, die durch die Unterschiede in den C-terminal flankierenden Aminosäuren bedingt wird.

5.7. Repräsentationsrate nach „Acid Wash“

Durch eine kurzzeitige Behandlung von Zellen mit einem pH3-Puffer ist es möglich, sämtliche auf der Oberfläche vorhandenen MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe zu dissoziieren. Nach dieser als „Acid Wash“ bezeichneten Behandlung werden weiterhin beladene MHC-Moleküle aus dem ER über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. Durch Färbung mit MHC-spezifischen Antikörpern nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem „Acid Wash“ kann die Präsentationsrate von MHC-Molekülen untersucht werden, wenn ein peptidspezifischer Antikörper vorliegt, sogar die Präsentationsrate eines einzelnen Epitops. Weiterhin können durch die Verwendung von Inhibitoren der Einfluss unterschiedlicher Proteasen auf die Generierung dieses Epitops untersucht werden.

Wie in Abb. 39 gezeigt, verhindert die Anwesenheit von Lactacystin die Repräsentation des Epitops SIINFEKL, wenn dieses in einem Konstrukt exprimiert wird, in dem das Epitop nicht am C-Terminus des exprimierten Polypeptids liegt. Ist jedoch direkt C-terminal des SIINFEKL im Konstrukt ein Stop-Codon vorhanden, hat der proteasomenspezifische Inhibitor Lactacystin keinen Einfluss auf die SIINFEKL-Repräsentationsrate der transfizierten Zellen.

Für die Aminosäuren Ile, Pro, Gly, Leu, Val und Thr in der P1' Position wird eine Repräsentation von SIINFEKL vollständig durch Lactacystin inhibiert, bei Ala in P1' ist jedoch noch ein, wenn auch geringer, Anstieg der Färbung durch den Antikörper 25.D1.16 über einen Zeitraum von 6 h nach dem „Acid Wash“ zu beobachten.

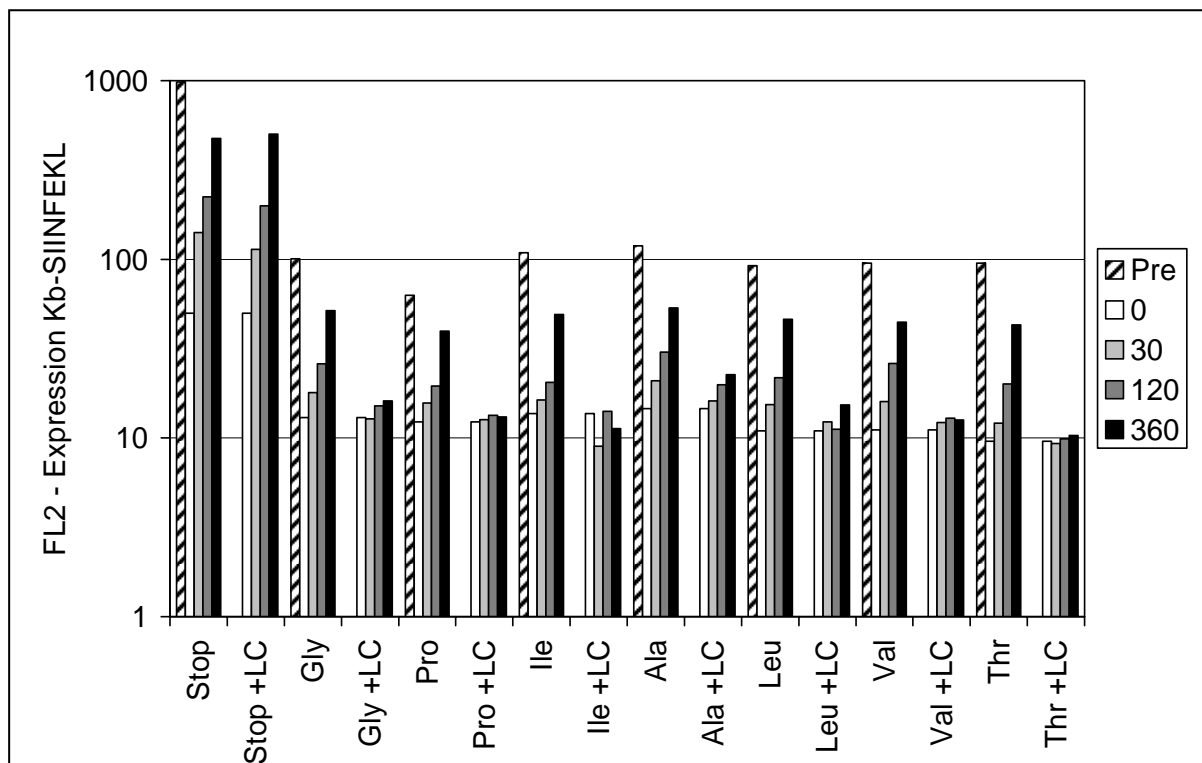


Abb. 39:

Repräsentation nach Acid Wash

FlpIn-293-K^b-Zellen wurden mit RAP-Konstrukten transfiziert, die an Position P1' unterschiedliche Aminosäuren exprimieren.

Die untersuchten Zelllinien wurden mit und ohne Vorinkubation (30 min) mit dem proteasomalen Inhibitor Lactacystin (LC) einem Acid Wash unterworfen und die Oberflächenexpression von K^b-SIINFEKL durch den Antikörper 25.D1.16 unmittelbar vor dem Acid Wash (PRE), unmittelbar (0) sowie 30, 120 und 360 Minuten nach Acid Wash detektiert und im FACS analysiert

Trägt man die beobachtete Repräsentationsrate nach „Acid Wash“ gegen die Oberflächenexpression von H2-K^b-SIINFEKL in normal wachsenden Zellen auf, so findet man bei Zelllinien, die mit unterschiedlichen P1'-Konstrukten transfiziert sind, eine sehr gute Korrelation von $R^2=0,96$ (siehe Abb. 40). Dementsprechend lassen sich nicht nur über die nur relativ arbeitsaufwändig durch „Acid Wash“ zu bestimmende Repräsentationsrate Aussagen über die Einflüsse unterschiedlicher flankierender Aminosäuren auf die Prozessierungseffizienz machen, sondern auch direkt über die Menge an H2-K^b-SIINFEKL Komplexen, die auf normal wachsenden Zellen im Gleichgewichtszustand vorliegen.

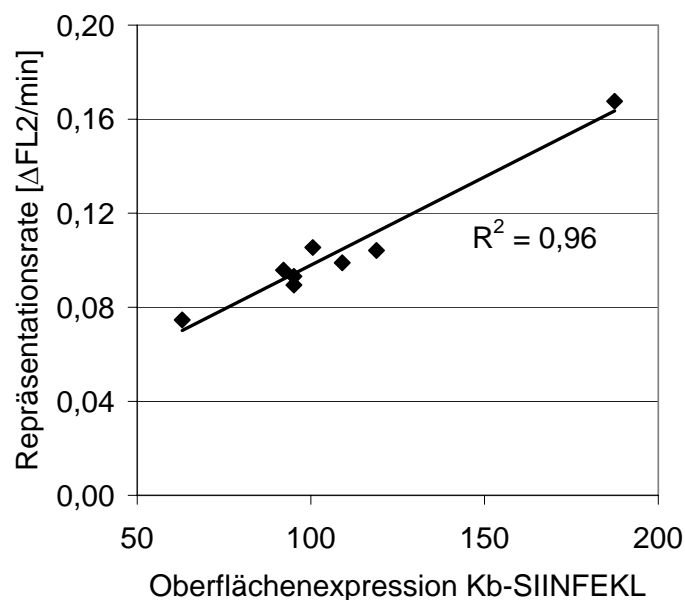


Abb. 40:

Korrelation zwischen Repräsentationsrate nach „Acid Wash“ und dem Expressionslevel von H2-K^b-SIINFEKL auf normal wachsenden Zellen (Steady-state Level) für FlpIn-293-K^b-Zellen, die mit RAP-Konstrukten transfiziert wurden, die an Position P1' unterschiedliche Aminosäuren exprimieren.

5.8. Einfluss der Position P1' auf das Prozessierungsverhalten

Untersucht man FlpIn293-K^b Zellen, die mit RAP-Konstrukten transfiziert wurden, deren Expressionskassetten sich ausschließlich in Position P1' unterscheiden, so unterscheiden sich die durch EGFP-Expression direkt detektierten Expressionslevel der unterschiedlichen Transfektanten kaum, man findet jedoch Unterschiede in der Oberflächenexpression von H2-K^b-SIINFEKL, die durch 25.D1.16 detektiert wird (Abb. 41).

Negativen Einfluss auf die Prozessierungseffizienz findet man vor allem für Asp, Glu und Pro an Position P1', während die Aminosäuren Ala, Gly, His, Leu, Lys, Gln und besonders Arg an dieser Position eine Verbesserung der Prozessierungseffizienz bewirken. Am effektivsten erfolgt jedoch die Präsentation, wenn im Konstrukt C-terminal von SIINFEKL keine weiteren Aminosäuren vorhanden sind (& = Stop-Codon)

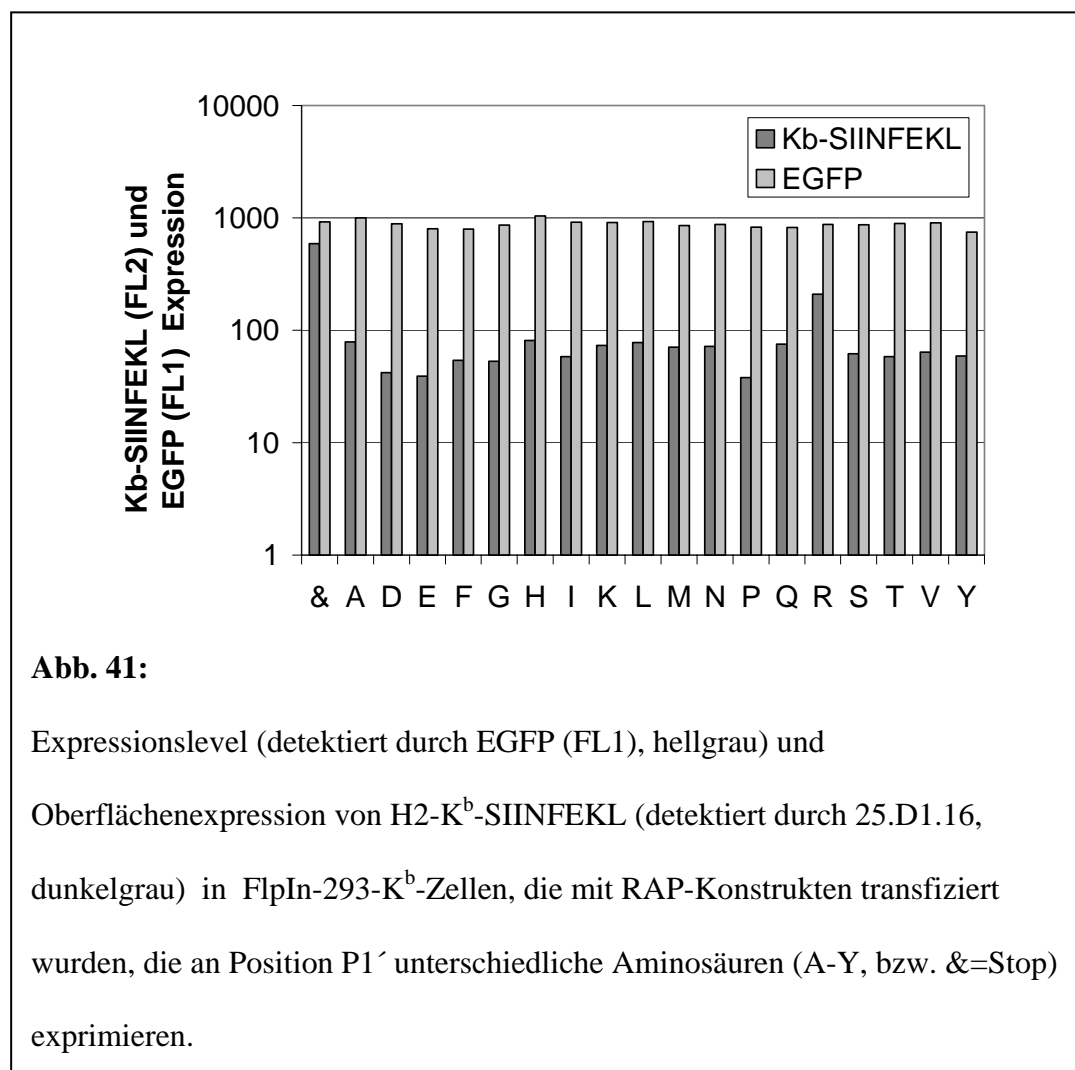


Abb. 41:

Expressionslevel (detektiert durch EGFP (FL1), hellgrau) und

Oberflächenexpression von H2-K^b-SIINFEKL (detektiert durch 25.D1.16,

dunkelgrau) in FlpIn-293-K^b-Zellen, die mit RAP-Konstrukten transfiziert

wurden, die an Position P1' unterschiedliche Aminosäuren (A-Y, bzw. &=Stop)

exprimieren.

Um den Einfluss der einzelnen Aminosäuren an Position P1' besser vergleichen zu können, wurden die beobachteten Oberflächenlevel von H2-K^b-SIINFEKL auf das durch EGFP-Expression detektierte Expressionslevel der einzelnen Transfektanten normiert, der so berechnete Quotient kann als Maß für die Prozessierungseffizienz verwendet werden.

Als Vergleichswert wurden für ca. 900 humane MHC-Liganden aus der Datenbank SYFPEITHI die flankierenden Sequenzen aus dem Quellproteinen bestimmt und die relativen Häufigkeiten (definiert als Quotient zwischen Anteil der jeweiligen Aminosäure in der untersuchten Position und Anteil der jeweiligen Aminosäure in den untersuchten Proteinen) aller Aminosäuren für die Positionen P6-P6' bestimmt. Diese Logarithmen der relativen Häufigkeiten der einzelnen Positionen können als ein additives Maß für den Einfluss der jeweiligen Aminosäure auf das durchschnittliche Prozessierungsverhalten verwendet werden.

Ein Vergleich der in diesem System beobachteten Prozessierungseffizienz mit den Logarithmen der relativen Häufigkeiten der an Position P1' von bisher identifizierten Epitopen (extrahiert aus SYFPEITHI) ergibt eine gute Korrelation von $R^2=0,68$ (Siehe Abb. 42). Einziger Ausreißer ist Arg, für das eine sehr hohe Prozessierungseffizienz beobachtet wurde, andererseits findet sich Arg auch unter den AA mit den höchsten beobachteten relativen Häufigkeiten, so dass diesem Ausreißer eine geringe Bedeutung beigemessen werden kann

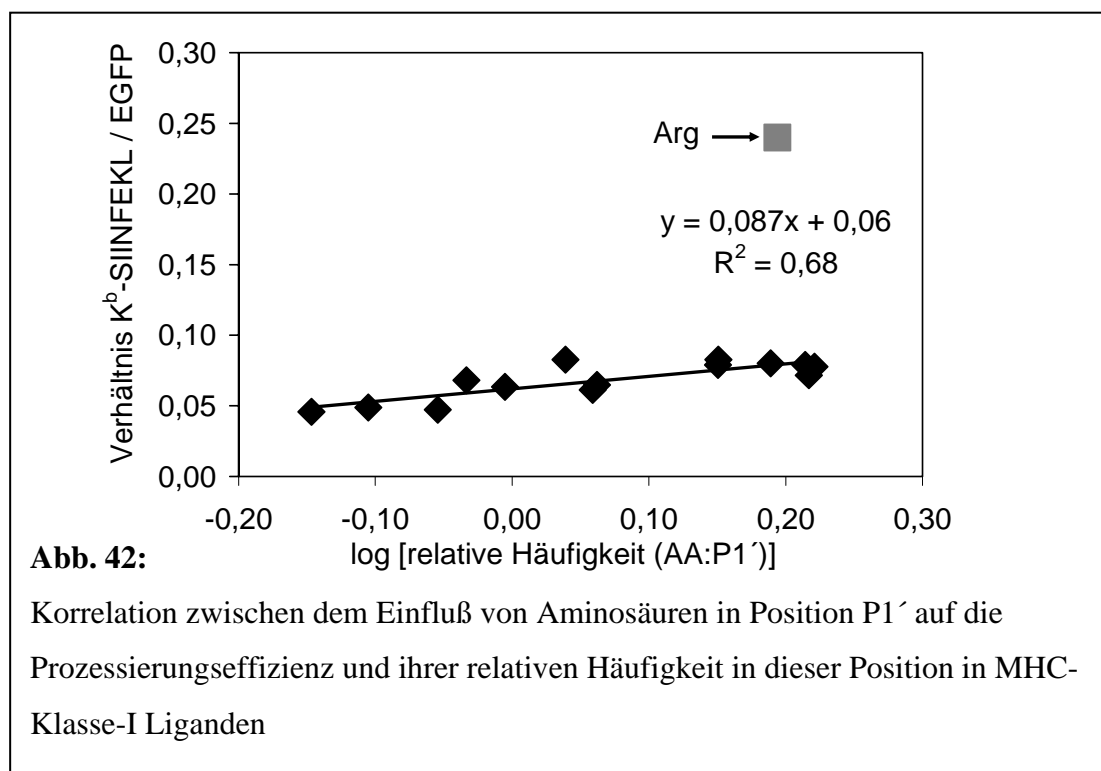


Abb. 42:

Korrelation zwischen dem Einfluß von Aminosäuren in Position P1' auf die Prozessierungseffizienz und ihrer relativen Häufigkeit in dieser Position in MHC-Klasse-I Liganden

6. Proteasomale Schnittvorhersage

Zurzeit sind drei publizierte Methoden zur Vorhersage von proteasomalen Schnitten verfügbar, die mit Hilfe von *in vitro* Schnittdaten trainiert wurden: FragPredict, PaProC 1.0 und NetChop 20S. Des Weiteren existiert noch eine bisher unpublizierte, aber nach Anmeldung öffentlich zugänglichen Version von PaProC, die eine differenzierte Schnittvorhersage für konstitutive (PaProC 2.0c) und immuno-Proteasomen anbietet (PaProC 2.0i). Alle PaProC Versionen und NetChop 20S wurden auf Schnittdaten trainiert, die aus proteasomalen *in vitro* Verdaus der Proteine Hefe-Enolase-1 und β -Casein gewonnen wurden, während die publizierte Version von FragPredict auf einem limitierten Datensatz von Peptidverdaus trainiert wurde.

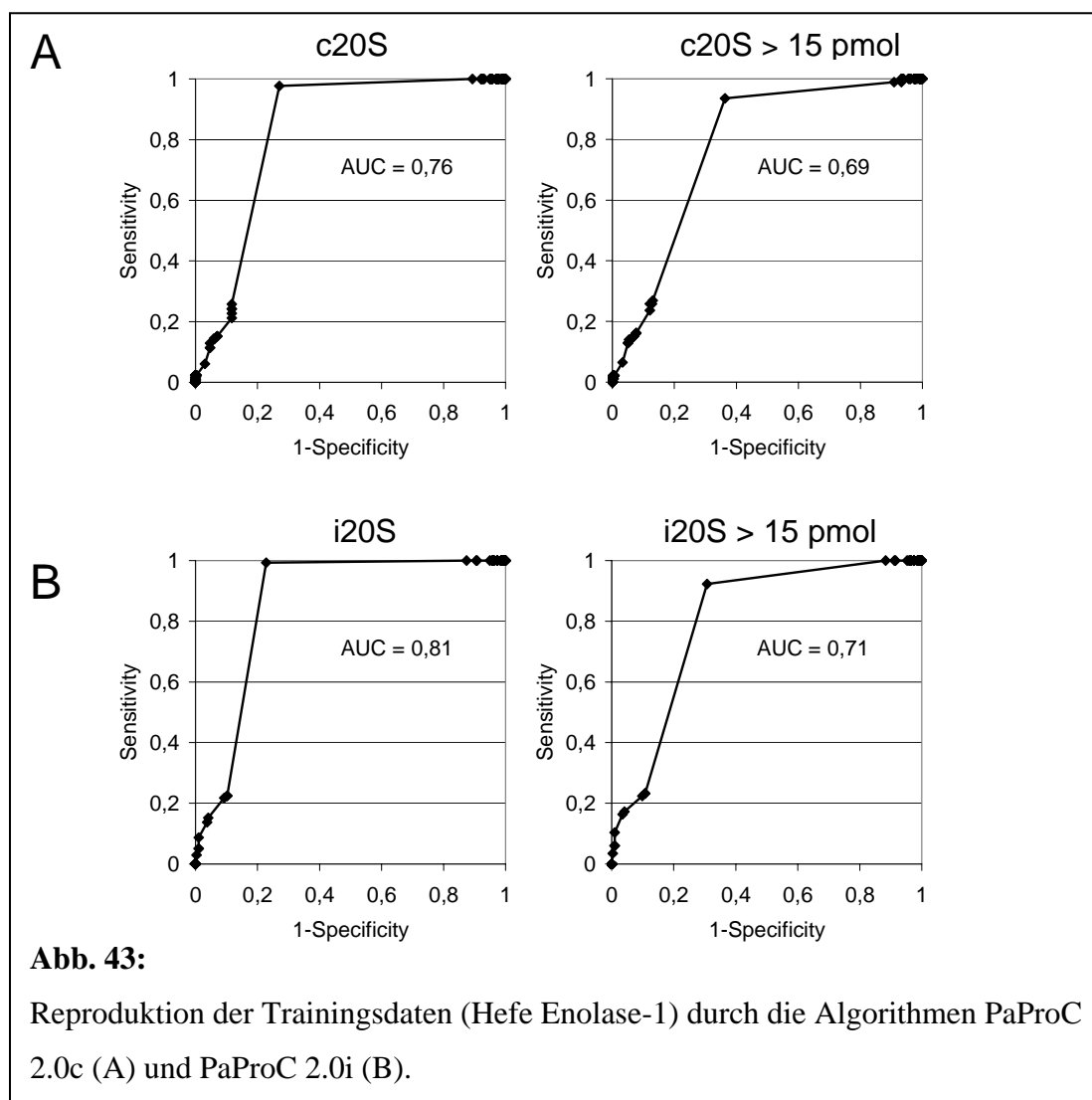
Um einen fairen Vergleich aller Vorhersagemethoden zu erlauben, wurde FragPredict mit Hilfe der Enolase-1 und β -Casein-Schnittdaten neu trainiert. Diese Daten wurden ebenfalls verwendet, um eine neue matrix-basierte Vorhersagemethode zu etablieren, die im Folgenden als ProteaSMM (Stabilized Matrix Method) bezeichnet wird. Diese Vorhersagemethode ordnet jeder Aminosäure in einem Fenster mit einer Breite von 10 Aminosäuren um die Schnittstelle (6 N-terminale und 4 C-terminale Aminosäuren) einen Wert zu. Diese Werte werden addiert, um den letztendlichen Vorhersagewert für die untersuchte Schnittstelle zu erhalten (Das exakte Verfahren wird genauer in Material und Methoden erläutert). Es wurden zwei unterschiedliche Vorhersagematrices generiert, die auf jeweils unterschiedlichen Trainingsdaten basieren: ProteaSMM-c wurde mit Schnittdaten von konstitutiven Proteasomen trainiert, während ProteaSMM-i mit Schnittdaten, die durch immuno-Proteasomen generiert wurden, trainiert wurde.

Ein prinzipiell unterschiedlicher Ansatz wird von NetChop C2.0 verfolgt, die von diesem Algorithmus gemachten Vorhersagen basieren auf einem Training des verwendeten neuronalen Netzes auf Sequenzinformationen, die in den C-Termini von MHC-Klasse-I-Liganden enthalten sind. Nach der diesem Ansatz zugrunde liegende Annahme werden die C-Termini von MHC-Klasse-I-Liganden ausschließlich durch Proteasomen generiert, dementsprechend sollte es möglich sein, aus den flankierenden Sequenzen Informationen über das proteasomale Schnittverhalten zu extrahieren.

6.1. Evaluierung des publizierten PaProC-Algorithmus und Vergleich mit der SMM-Methode

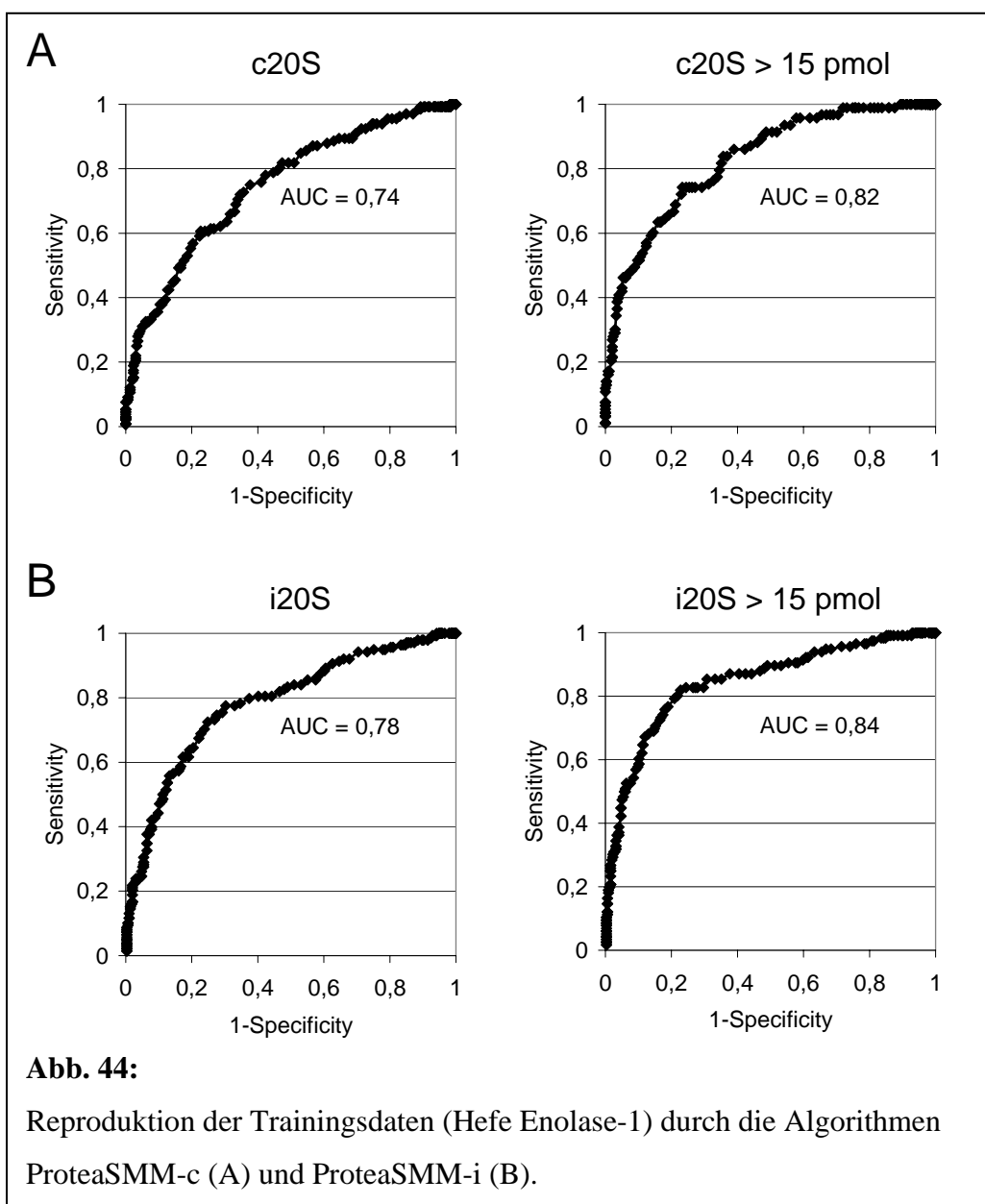
PaProC 1.0 benutzt zur Vorhersage ein Sequenzfenster von 10 Aminosäuren um die Schnittstelle (6 N-terminale Positionen P6-P1 und 4 C-terminale Positionen P1'-P4').

Eine Besonderheit von PaProC 1.0 ist die Verwendung eines Aminosäure-Paares P1-P1', d.h. die beiden in unmittelbarer Schnittumgebung liegenden Aminosäuren. Hierdurch werden in diesem Modell eine hohe Zahl von freien Parametern verwendet (alleine 400 für das Paar P1-P1', zusätzlich noch 120 für die Positionen P6, P5, P4, P3, P2 und P4'; die Positionen P2' und P3' fließen nicht mit in die Vorhersage mit ein). Mit diesen insgesamt über 500 freien Parametern ist eine nahezu perfekte Reproduktion der Trainingsdaten möglich (Abb. 43). Allerdings kann durch diese hohe Zahl freier Parameter ein „Overfitting“ der Trainingsdaten nicht ausgeschlossen werden und ist in hohem Maße wahrscheinlich. Dies wird schon daran deutlich, dass für die Vorhersage von stärkeren Schnitten im Enolase-Trainingsdatensatz (>15 pmol) eine geringere Vorhersagequalität (gemessen als AUC-Wert) erreicht wird.



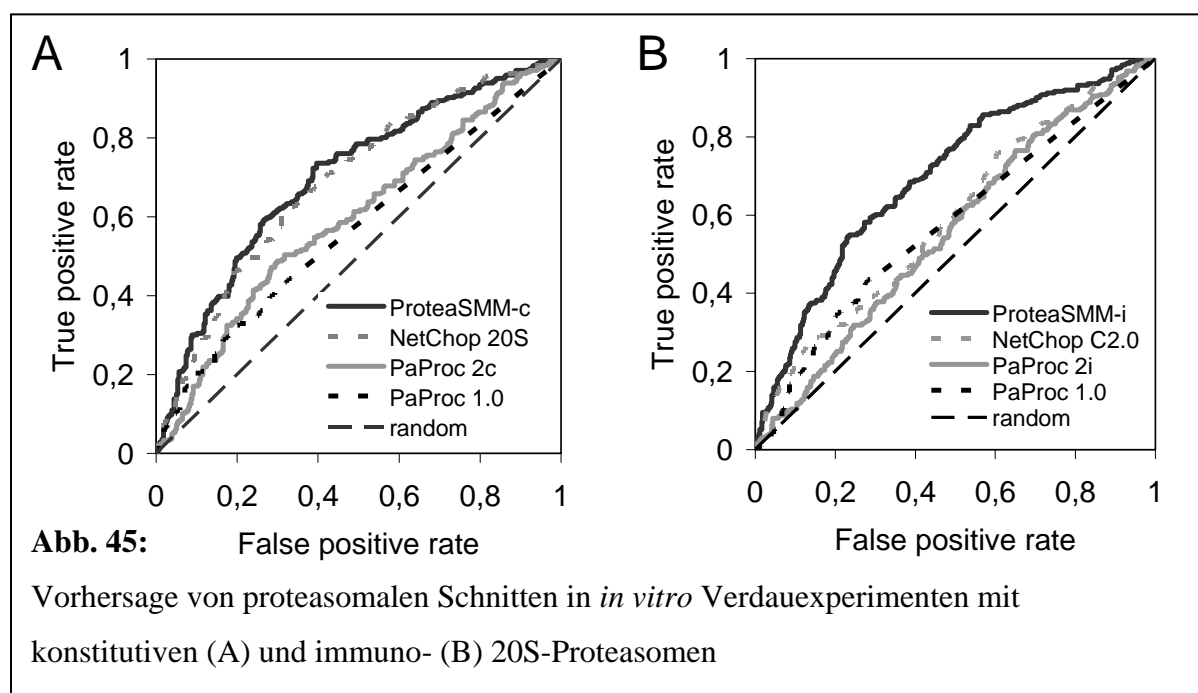
Im Gegensatz dazu verwendet die SMM-Methode eine weitaus geringere Anzahl freier Parameter (10 Sequenzpositionen mit jeweils 20 freien Parametern, daher insgesamt 200 freie Parameter) und außerdem eine Abwertung weiter von der Schnittstelle entfernter Positionen deren Einfluss durch mehrfache Kreuzvalidierung nicht eindeutig nachweisbar ist.

Durch die SMM-Methode werden vergleichbar gute Reproduktionsergebnisse erzielt wie mit dem PaProC-Algorithmus (siehe Abb. 44). Jedoch ist der SMM-Algorithmus weitaus besser in der Lage, die den experimentellen Daten inhärenten Regeln zu extrahieren, die einen proteasomalen Schnitt bedingen. Dies wird schon durch die Tatsache klar, dass der SMM-Algorithmus stärkere Schnitte über 15 pmol weitaus besser vorhersagt als die Gesamtheit aller Schnitte.



6.2. Vergleich öffentlich verfügbarer Vorhersagealgorithmen für proteasomale Schnitte

Um die Vorhersagequalität der SMM-Methode und der oben genannten publizierten Methoden anhand von mehreren unabhängigen Datensätzen vergleichen zu können, wurden mehrere Datensätze proteasomaler Verdaus kompiliert, die entweder in der Literatur oder in dieser Arbeit beschrieben wurden. Für jeden dieser Testdatensätze wurden die Schnittvorhersagen durch die unterschiedlichen Programme benutzt, um Peptidbindungen innerhalb der untersuchten Sequenzen als entweder Schnitt oder Nicht-Schnitt zu klassifizieren, je nachdem ob die vorhergesagten Werte über oder unter einem festgesetzten Schwellenwert liegen. Durch Vergleich mit den tatsächlichen experimentellen Daten können sowohl „true positives“ also auch „false positives“ berechnet werden (siehe Material and Methoden) und durch Variation des Schwellenwertes die ROC-Kurven generiert werden. Die Fläche unter dieser Kurve (AUC = Area under the ROC-Curve) ist ein sehr gutes Maß für die Vorhersagequalität. Dieser Wert schwankt zwischen 0.5 für eine zufallsbasierte Vorhersage bis zu 1.0 für eine perfekte Vorhersage. In Tabelle 8 sind die AUC-Werte für alle Testdatensätze und untersuchten Vorhersagemethoden sowie die im jeweiligen Experiment verwendete Proteasomenspezies angegeben. Die sich aus der Kombination aller konstitutiven Datensätze ergebenden ROC-Kurven sind in Abb. 45a, die entsprechenden ROC-Kurven für immuno-proteasomale Schnitt Datensätze in Abb. 45b dargestellt.



	Proteasomen-spezies im Verdau		Vorhersagemethode									
	c20S	i20S	NetChop 20S	NetChop C20	PaProc 1.0	PaProc 2c	PaProc 2i	ProteaSMM-c	ProteaSMM-i			
Peptide c20S	X		0,71	0,65	0,63	0,61	0,60	0,72	0,75			
Peptide i20S		X	0,74	0,67	0,62	0,56	0,58	0,74	0,80			
Peptide sxx2	X		0,78	0,70	0,56	0,60	0,67	0,80	0,81			
Peptide prame		X	0,79	0,67	0,61	0,57	0,56	0,80	0,83			
Prion	X		0,59	0,57	0,52	0,60	0,54	0,64	0,67			
Prion		X	0,60	0,50	0,53	0,63	0,52	0,63	0,63			
HIV-nef	X	X	0,63	0,62	0,52	0,53	0,57	0,67	0,69			
SYFPEITHI-Epitope	-		0,69	0,83	0,60	0,64	0,58	0,67	0,76			

Tabelle 8:

Vorhersagequalität (AUC-Werte) unterschiedlicher Vorhersagemethoden

Die Vorhersagequalität der einzelnen Algorithmen wurde anhand von in-vitro-Schnittdaten verglichen, die teils aus der Literatur (Peptide SXX2, Peptide PRAME, HIV-nef), teils aus Ergebnissen dieser Arbeit (Prion i20S/c20S, Peptide i20S / c20S) stammen.

Für alle untersuchten Testdatensätze wird die höchste Vorhersagequalität durch den neuen ProteaSMM-i Algorithmus erreicht (Tabelle 8), der mit Hilfe von Schnittdaten aus immunoproteasomalen Verdaus generiert wurde. Dies ist sogar für Schnittdatensätze der Fall, die *in vitro* mit konstitutiven Proteasomen generiert wurden, in diesem Falle würde man eigentlich ein besseres Abschneiden der Version ProteaSMM-c erwarten.

Im Falle der Vorhersage der C-Termini der aus SYFPEITHI extrahierten MHC-Klasse-I-Liganden liefert ebenfalls die Methode ProteaSMM-i die höchste Vorhersage aller Algorithmen, die mit Hilfe von *in vitro* Schnittdaten trainiert wurden. Erwartungsgemäß ist die Vorhersage durch NetChop C2.0 in diesem Falle von höherer Qualität, da die als Testdatensatz verwendeten MHC-Klasse-I-Liganden zum großen Teil als Trainingsdaten zur Etablierung des neuronalen Netzes verwendet wurden. Aus diesem Grunde kann dieser Datensatz für diesen Algorithmus nicht als reiner Testdatensatz gewertet werden, der erhaltene AUC-Wert basiert dementsprechend teilweise auf einer naturgemäß besseren Reproduktion der Trainingsdaten.

6.3. Relativer Einfluss der zur Vorhersage verwendeten Sequenzpositionen

Nachdem sich die ProteaSMM-Methode in einem auf identischen Trainingsdaten basierenden Vergleich als zuverlässiger als bisher publizierte Algorithmen erwies, wurden beide Algorithmen durch die Inkorporation des Schnittdaten aus dem *in vitro* Verdau von Prion Protein weiter verfeinert. Für das Training des ProteaSMM-i Algorithmus wurde auf die Schnittdaten aus β -Casein verzichtet, da diese durch *in vitro* Verdaus mit konstitutiven Proteasomen generiert wurden. Die auf diese Weise neu trainierten Algorithmen weisen eine leicht bessere Vorhersagequalität sowohl für *in vitro* Peptidverdaus als auch für die Vorhersage von C-Termini von MHC-Klasse-I-Liganden auf, während eine Aufnahme von Datensätzen aus Peptidverdaus in den Trainingsdatensatz keine weitere Verbesserung der Vorhersagequalität mit sich brachte. In Abb. 46 und 47 sind die endgültigen Vorhersagematrizen für die ProteaSMM-c und ProteaSMM-i Algorithmen dargestellt. Der relative Einfluss der jeweiligen Positionen auf das proteasomale Schnittverhalten kann durch Betrachten der Standardabweichung der korrespondierenden Matrixeinträge der 20 Aminosäuren in der untersuchten Position bestimmt werden. Sowohl für konstitutive, als auch für immuno-Proteasomen hat Position P1 den größten Einfluss auf das Schnittverhalten, gefolgt von den Positionen P4-P2' ebenfalls in unmittelbarer Umgebung der Schnittstelle.

Position P4' hat in beiden Algorithmen keinen relevanten Einfluss auf das Schnittverhalten, ebenso Position P5 für das durch ProteaSMM-i simulierte Schnittverhalten des Immunoproteasoms. Die SMM-Methode extrahiert durch mehrfache Kreuzvalidierung nur die besonders evidenten Informationen aus den Trainingsdaten, auf diese Weise erfolgt eine Unterdrückung des in den Trainingsdaten enthaltenen „Hintergrundrauschens“ welches experimentell nicht vermeidbar ist.

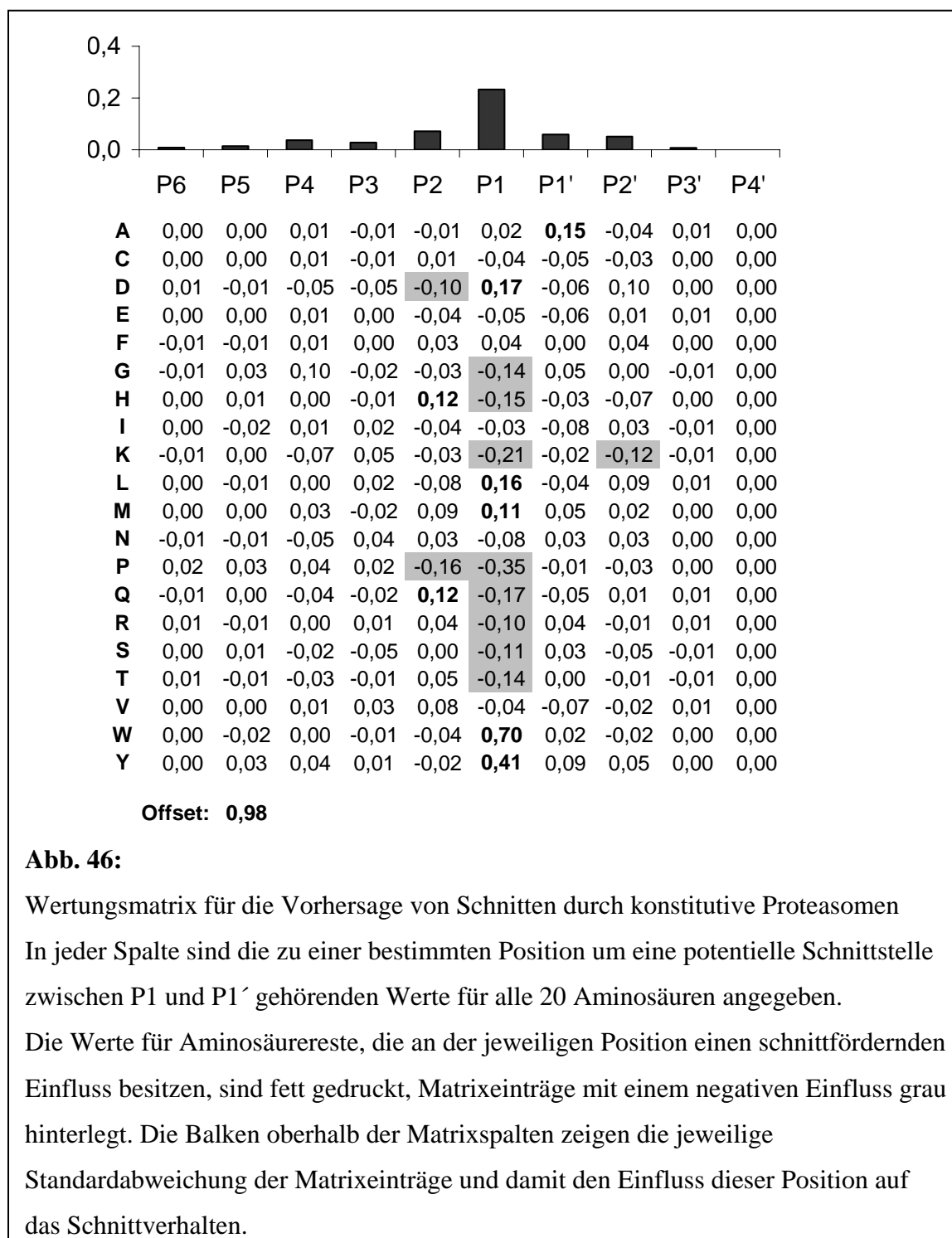


Abb. 46:

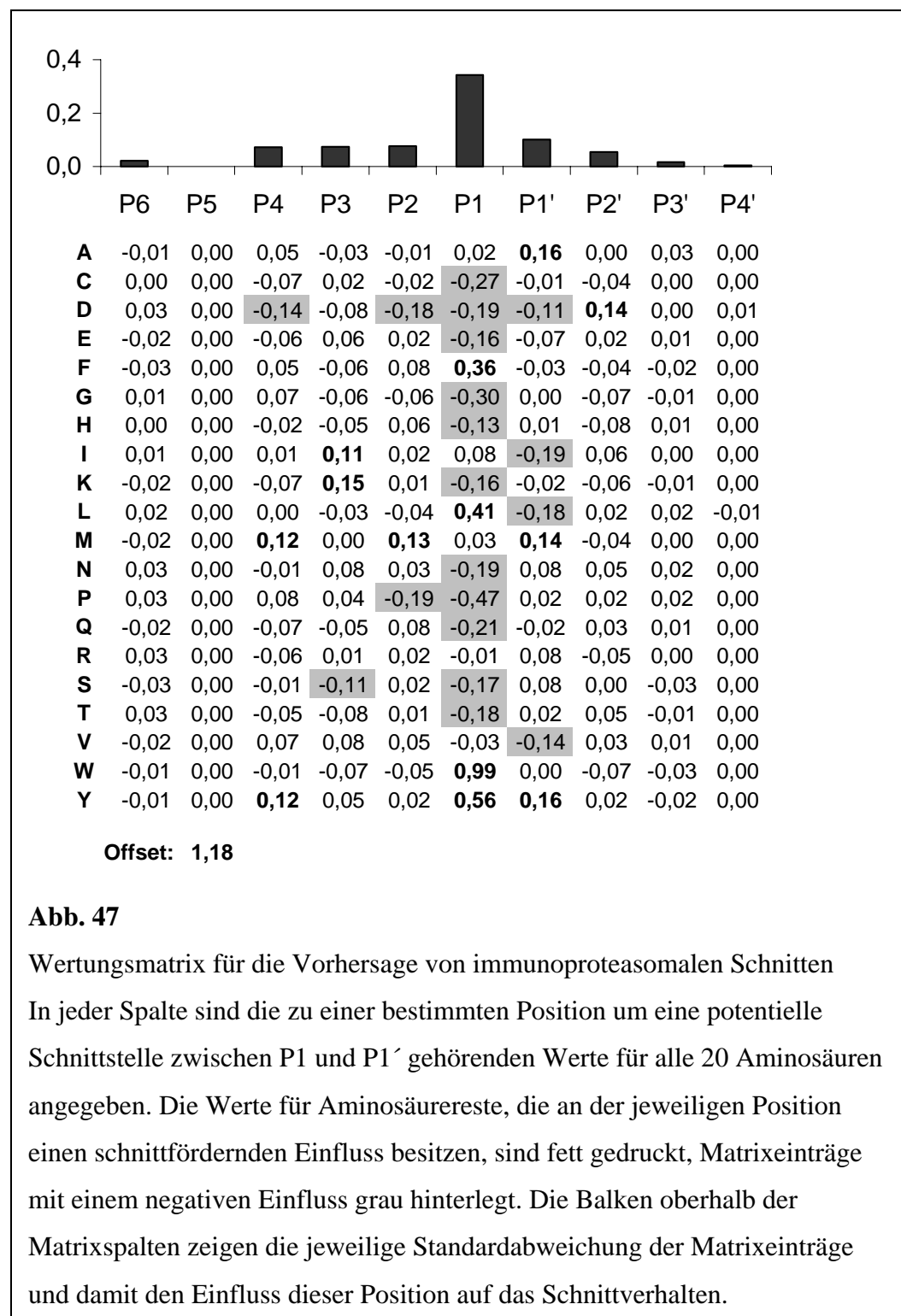
Wertungsmatrix für die Vorhersage von Schnitten durch konstitutive Proteasomen

In jeder Spalte sind die zu einer bestimmten Position um eine potentielle Schnittstelle zwischen P1 und P1' gehörenden Werte für alle 20 Aminosäuren angegeben.

Die Werte für Aminosäurereste, die an der jeweiligen Position einen schnittfördernden Einfluss besitzen, sind fett gedruckt, Matrixeinträge mit einem negativen Einfluss grau hinterlegt. Die Balken oberhalb der Matrixspalten zeigen die jeweilige

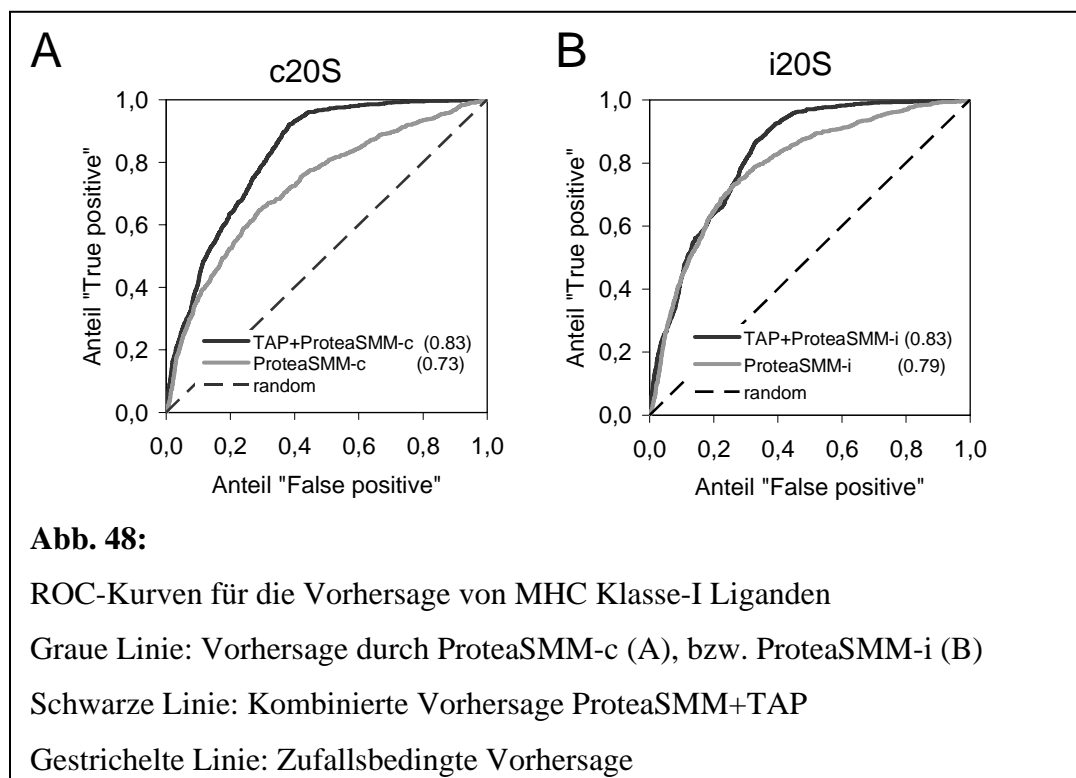
Standardabweichung der Matrixeinträge und damit den Einfluss dieser Position auf das Schnittverhalten.

Aus diesem Grund ist es prinzipiell möglich, dass auch weiter entfernte Positionen einen Einfluss auf das proteasomale Schnittverhalten haben können. Diese Einflüsse können jedoch durch den Trainingsalgorithmus nicht in der Matrix abgebildet werden, da sie nicht in dem erforderlichen Maße aus den verwendeten Trainingsdaten ersichtlich sind.



6.4. Vorhersagequalität der SMM-Algorithmen für natürliche MHC-Klasse-I Liganden

Der C-Terminus der meisten bekannten MHC-Klasse-I-Liganden wird durch das Proteasom generiert, während der letztendliche N-Terminus auch durch Trimming durch Aminopeptidasen aus einem N-terminal verlängerten Prekursorpeptid entstehen kann. Daher ist es möglich, die Effizienz, mit der ein bestimmtes Epitop durch das Proteasom generiert wird, aus der vorhergesagten Schnittintensität nach der C-terminalen Aminosäure abzuschätzen. Benutzt man die vorhergesagten Schnittstärken, um zwischen bekannten natürlich prozessierten Epitopen und Nichtepitopen aus Proteinsequenzen zu unterscheiden, so erhält man die in Abb. 48 gezeigten grauen ROC-Kurven. Die Vorhersage durch ProteaSMM-i erreicht einen Wert von 0,79, was eine im Vergleich zu ProteaSMM-c (0,73) signifikant bessere Vorhersage bedeutet. Diese hohen AUC-Werte geben einen klaren Hinweis darauf, dass das Proteasom den C-Terminus von MHC Klasse-I Epitopen mit einer höheren Effizienz generiert als die C-Termini anderer Peptide aus der gleichen Proteinsequenz.



6.5. Kombination der Vorhersage von proteasomaler Prozessierung und TAP-Transport

Die durch ProteaSMM vorhergesagte Schnittstärke ist proportional zu dem Logarithmus der Menge der durch diesen Schnitt generierten Peptide. Diesen Wert kann man mit der Vorhersage der TAP-Transport-Effizienz für ein Peptid oder seine N-terminal verlängerten Prekursoren kombinieren, diese liefert als Vorhersagewert den Logarithmus des IC50-Wertes der jeweiligen Peptide. Durch Addition dieser beiden Vorhersagewerte, Menge und Transporteffizienz, ist dementsprechend eine Vorhersage der im ER vorhandenen Menge eines Peptides und seiner N-terminal verlängerten Vorläufer möglich. Benutzt man nun diese durch Kombination von TAP und Proteasom vorhergesagten Werte zur Epitopvorhersage, so erhält man ROC-Kurven mit einem AUC-Wert von 0,83 (Abb. 48, schwarze Linie). Diese sind im oberen Sensitivitätsbereich von höherer Qualität als die ROC-Kurven, die durch Proteasom- oder TAP-Vorhersage alleine erhalten werden.

Der C-Terminus eines potentiellen Epitops besitzt den bei weitem größten Einfluss auf die Vorhersage sowohl von proteasomalen Schnittverhalten als auch von TAP-Transport. In Tabelle 9 wird die durchschnittliche Effizienz, mit der ein proteasomaler Schnitt vorhergesagt wird, wenn eine bestimmte Aminosäure am C-Terminus eines Epitops liegt, und der Einfluss dieser C-terminalen Aminosäure auf den Transport durch TAP mit der Anzahl bekannter humaner MHC-Klasse-I Liganden (extrahiert aus SYFPEITHI) verglichen, die diese Aminosäure an ihrem C-Terminus tragen. Berechnet man die zugehörigen relativen Häufigkeiten, findet man eine sehr gute Korrelation von $R^2=0,83$ (Abb. 49), besonders, wenn man berücksichtigt, dass die Bindung an manche MHC-Allelprodukte sehr restriktive Anforderungen an die C-Termini von möglichen Liganden stellt. Ausnahmen bilden die Aminosäuren Lys und Val, die häufiger unter den C-Termini von MHC-Klasse-I Liganden gefunden werden, als durch die kombinierte Vorhersage zu erwarten wäre. Generell stellt man fest, dass Aminosäuren, nach denen von der SMM-Methode ein proteasomaler Schnitt vorhergesagt wird (mittlere Vorhersage $> -0,1$) und die nicht durch die Spezifität von TAP verboten sind (TAP $> -1,0$) in hoher Frequenz in den C-Termini von MHC Klasse-I Liganden gefunden werden. Man findet jedoch eine offensichtliche Ausnahme von dieser Regel (Tabelle 9): Epitope mit einem Lysin am C-Terminus (P1K-Epitope) stellen ca. 10% der humanen MHC Klasse-I Liganden in SYFPEITHI, durch den SMM Algorithmus werden aber Schnitte nach dem C-Terminus dieser Epitope weder von konstitutiven, noch von immuno-

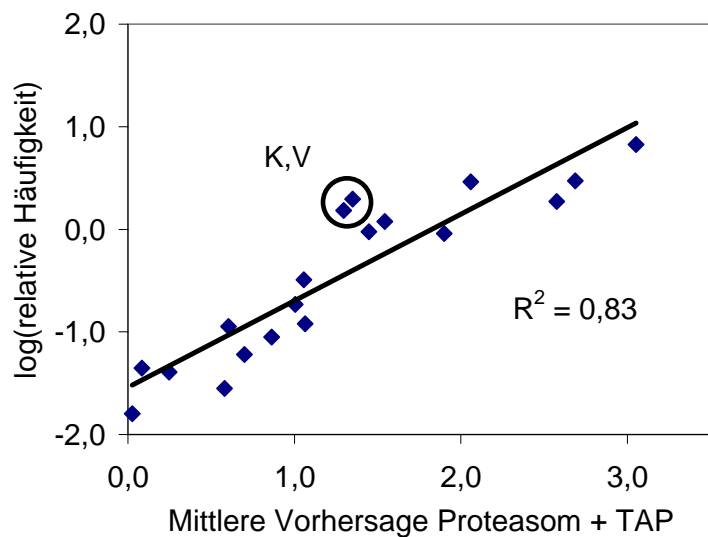
Proteasomen vorhergesagt. Berechnet man ROC-Kurven für die Vorhersage von humanen MHC Klasse-I Liganden, so verbessert sich der AUC-Wert, wenn man alle Peptide mit einem Lysin an Position P1 von der Analyse ausschließt (Abb. 50). Im Gegensatz dazu werden diese Epitope und ihre Vorläufer durch TAP gut transportiert.

AA	c20S	i20S	Mittelwert	TAP	Anzahl Epitope
W	0,70	0,99	0,85	0,87	20
Y	0,41	0,56	0,48	2,91	178
L	0,16	0,41	0,29	0,94	266
F	0,04	0,36	0,20	2,52	96
M	0,11	0,03	0,07	0,29	20
I	-0,03	0,08	0,02	0,52	54
A	0,02	0,02	0,02	-0,55	22
D	0,17	-0,19	-0,01	-1,83	2
V	-0,04	-0,03	-0,03	0,3	118
R	-0,10	-0,01	-0,06	1,47	46
E	-0,05	-0,16	-0,11	-1,58	2
N	-0,08	-0,19	-0,13	-1,33	0
S	-0,11	-0,17	-0,14	-2,26	3
H	-0,15	-0,13	-0,14	-0,55	4
C	-0,04	-0,27	-0,15	0	2
T	-0,14	-0,18	-0,16	-0,72	3
K	-0,21	-0,16	-0,19	0,45	89
Q	-0,17	-0,21	-0,19	-0,12	4
G	-0,14	-0,30	-0,22	-1,41	1
P	-0,35	-0,47	-0,41	0,09	6

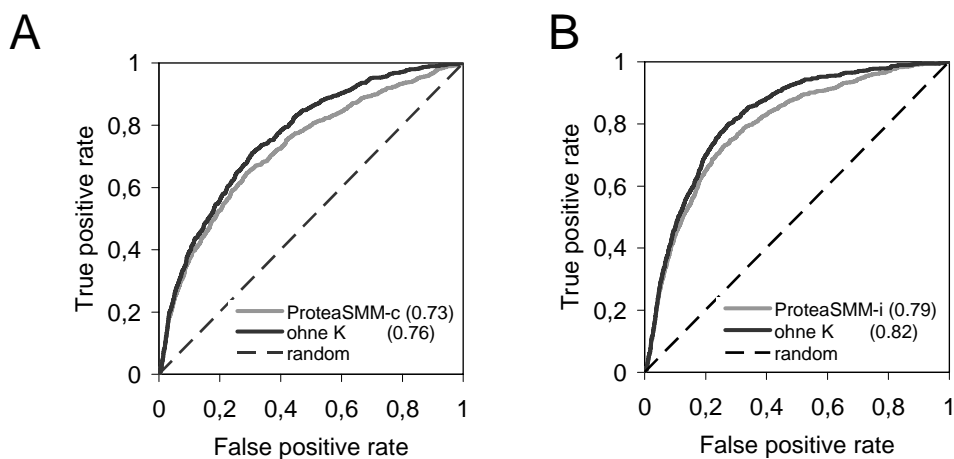
Tabelle 9:

Vergleich der vorhergesagten proteasomalen Schnitt-Effizienzen und TAP-Transport-Effizienzen C-terminaler Aminosäuren mit ihrer Frequenz in MHC Klasse-I-Liganden
Hellgrau schattiert: Werte mit stark negativem Einfluss auf die proteasomale Schnittvorhersage

Dunkelgrau schattiert: Werte, die einen Transport durch TAP verhindern

**Abb. 49:**

Korrelation zwischen relativer Häufigkeit der Aminosäuren in den C-Termini von MHC Klasse-I Liganden und der vorhergesagten kombinierten proteasomalen Schnitt- und TAP-Transport-Effizienz. Hervorgehoben sind die Werte der Aminosäuren Lys (K) und Val (V), für die die stärkste Abweichung festgestellt wurde

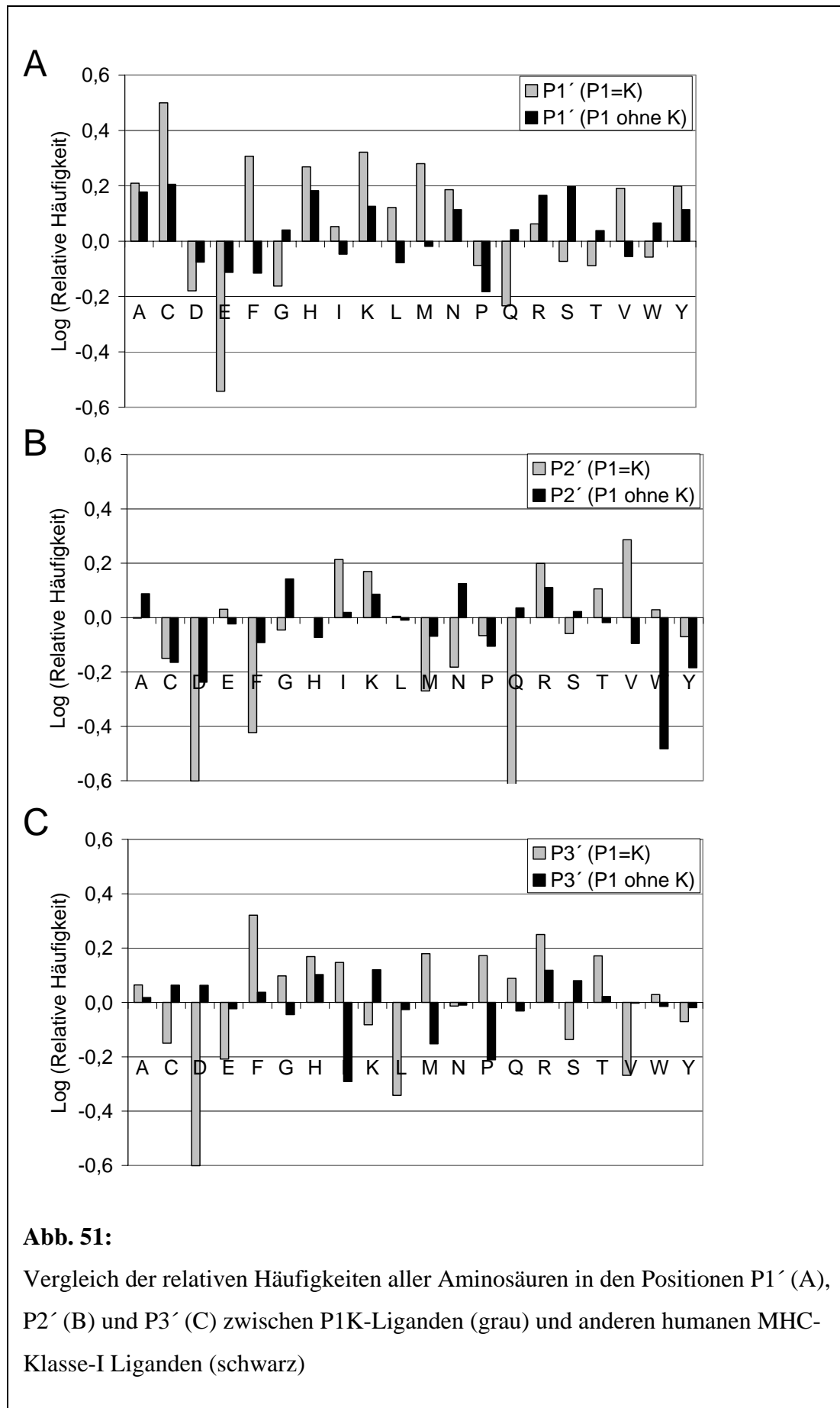
**Abb. 50:**

P1K Epitope werden durch ProteaSMM-c (A) und ProteaSMM-i (B) schlechter vorhergesagt als der Durchschnitt aller humanen SYFPEITHI-Epitope

Graue Linie: ROC-Kurve für alle humanen MHC-Klasse-I Liganden

Schwarze Linie: ROC-Kurve für alle humanen MHC-Klasse-I Liganden, die kein Lys am C-Terminus besitzen.

Analysiert man die Aminosäureverteilung in der Position P1' von P1K Epitopen und vergleicht diese mit anderen Epitopen, so findet man deutliche Unterschiede (Abb. 51a). Im Prozess der Antigenprozessierung kann diese Position jedoch nur einen Einfluss auf die Protease ausüben, die den C-Terminus des Epitops generiert, eine unterschiedliche Aminosäureverteilung kann daher als Hinweis auf eine Prozessierung dieser Epitope durch eine andere Protease gelten. Für die hydrophoben Aminosäuren F,V,L,M und I wurden für P1K Epitope signifikant höhere relative Häufigkeiten in Position P1' gefunden als andere humane MHC-Klasse-I-Liganden. Die Aminosäuren G,Q,S und T findet man im Gegensatz dazu in signifikant geringeren relativen Häufigkeiten an der Position P1' von P1K-Liganden. Eine Korrelation der beobachteten relativen Häufigkeiten ist nicht festzustellen ($R^2=0,15$). Diese Tatsache unterstützt die Hypothese, dass P1K-Liganden nicht durch das Proteasom generiert werden, da die Aminosäuren F,V,L und I in Position P1' einen negativen Einfluss auf das Schnittverhalten von konstitutiven und immuno-Proteasomen ausüben (Abb. 46 und 47). Auch in den Positionen P2' und P3' findet man relevante Differenzen in den relativen Häufigkeiten einzelner Aminosäuren zwischen P1K-Liganden und anderen Epitopen, eine Korrelation ist auch hier auszuschließen (P2': $R^2=0,02$; P3': $R^2=0,05$) (siehe Abb. 51b,c). Interessanterweise findet man eine Übereinstimmung zwischen den Aminosäuren, die sich in Position P1' und P2' eines TPPII-abhängigen MHC-Klasse-I Epitops von HIV-nef und den beobachteten relativen Häufigkeiten in Position P1' und P2' nach P1K-Liganden. Daher besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass P1K-Liganden zum großen Teil oder sogar ausschließlich durch TPPII und nicht das Proteasom prozessiert werden.



6.6. Der Testdatensatz: MHC-Klasse-I Liganden aus Nierenzell-Karzinom

In der Arbeitsgruppe Rammensee wurde in eine große Anzahl (79 aus RCC-75, 95 aus RCC-98, 123 aus RCC-69) von MHC Klasse-I Liganden aus Tumorgewebe von Nierenzellkarzinomen (RCC, renal cell carcinoma) durch Massenspektroskopie identifiziert. Durch Gen-Chip-Analyse wurde in der Arbeitsgruppe unter anderem die Expression der immuno-Untereinheiten des Proteasoms in Tumor- und Normalgewebe bestimmt. (Siehe Tabelle 10)

	RCC 68		RCC 75		RCC 98	
	TvN_SLR	TvN_Change	TvN_SLR	TvN_Change	TvN_SLR	TvN_Change
LMP2	2,56	I	-0,89	D	1,34	I
LMP7	4,64	I	-0,04	NC	4,36	I
MECL1	1,6	I	-1,25	D	0,92	I

Tabelle 10:
Chip-Genexpressionsdaten der Tumoren RCC-68, RCC-75 und RCC-98
Angabe sind logarithmierten (log₂) Verhältnisse zwischen Expression im Tumor und Normal-Gewebe (TvN_SLR) und die Veränderung (TvN_change) gegenüber Normalgewebe (I: increase = verstärkte Expression, D: decrease = verminderte Expression, NC: no change = keine Veränderung).
In den Normalgeweben war eine Expression der immuno-Untereinheiten nicht detektierbar.

Durch Verwendung bekannter Bindungsmotive konnten die identifizierten Liganden aus RCC-75 und RCC-98 eindeutig den durch die Patienten exprimierten MHC-Klasse-I-Allelen zugeordnet werden. Im Falle von RCC-68 war eine eindeutige Zuordnung nicht möglich, da die von diesem Patienten exprimierten HLA-Allele überlappende Bindungsmotive aufweisen.

6.7. Einfluss der immuno-Untereinheiten auf die präsentierten MHC Klasse-I Liganden

Mit diesen RCC-Datensätzen ist es möglich, den Einfluss von immuno-Untereinheiten auf die Epitop-Generierung zu untersuchen. Tabelle 11 vergleicht die durch ProteaSMM-c und ProteaSMM-i, TAP-Vorhersage, sowie die kombinierte Vorhersage von TAP und Proteasom

erreichte Vorhersagequalität. Für beide Datensätze sind die durch ProteaSMM-i generierten Vorhersagen substantiell besser, was auf den ersten Blick überraschend ist, da RCC-75 keine Immuno-untereinheiten des Proteasoms exprimiert (Tab. 10). Durch Kombination der ProteaSMM-Vorhersagen mit der TAP-Vorhersage verschwindet diese Differenz in der Vorhersagequalität fast vollständig, die kombinierten Vorhersagen sind besser sowohl als TAP-Vorhersage als auch SMM-Vorhersage für sich genommen. Durch die Selektivität von TAP werden also ein Großteil der durch konstitutive Proteasomen generierten Peptide nicht ins ER transportiert. Dieser Filtereffekt ist weniger stark ausgeprägt für Peptide, die durch das Immuno-Proteasom generiert werden.

	ProteaSMM-i	ProteaSMM-c	TAP	TAP +	
				ProteaSMM-i	ProteaSMM-c
RCC-i	0,829	0,766	0,844	0,863	0,857
RCC-c	0,784	0,715	0,818	0,829	0,822

Tabelle 11:

Vorhersagequalität (AUC-Werte) für die Vorhersage von MHC Klasse-I

Liganden aus Nierenzellkarzinomen, die immuno- (RCC-i) oder konstitutive (RCC-c) Proteasomen exprimieren

6.8. Vergleich mit NetChop C2.0

Die Vorhersagemethode NetChop C2.0 basiert auf der Analyse von C-Termini von MHC Klasse-I-Liganden. Diese reflektieren jedoch nicht nur die Selektivität des Proteasoms, sondern auch die von TAP und dem Durchschnitt der verwendeten MHC-Allele und können daher nicht als rein proteasomale Vorhersage interpretiert werden. Dies reflektiert unter anderem Tabelle 8, hier erreicht NetChop 2.0 eine deutlich schlechtere Vorhersagequalität für *in vitro* Schnittdaten als sowohl NetChop 20S und die ProteaSMM Methode. Andererseits besitzt die NetChop C2.0 Methode deutliche Vorteile bei der Identifizierung der C-Termini von natürlich präsentierten MHC Klasse-I-Liganden. Um einen fairen Vergleich zwischen NetChop C2.0 und der kombinierten TAP- und ProteaSMM-Vorhersage zu ermöglichen, wurden die kombinierten RCC-c und RCC-i Datensätze verwendet, ein Vergleich mit Hilfe des SYFPEITHI-Datensatzes ist nicht sinnvoll, da ein nicht unerheblicher Teil dieser MHC-Klasse-I-Liganden zum Training des neuronalen Netzes verwendet wurde. Für den kombinierten RCC-Datensatz erreicht NetChop C2.0 einen AUC-Wert von 0,83, was im

Vergleich zu ProteaSMM-i (0,85) und ProteaSMM-c (0,84) eine schlechtere Qualität der Vorhersage bedeutet.

6.9. Kombination mit MHC-Bindungsvorhersagen

Um die Bindungsaffinität von Peptiden zu MHC Klasse-I Molekülen vorherzusagen, wurden Affinitätsmatrizen benutzt, die durch in vitro Experimente gewonnen wurden. Diese sind für eine große Anzahl unterschiedlicher MHC Klasse-I Allele in der Literatur beschrieben.

Diese Affinitätsmatrizen wurden normalisiert, um als Ausgabewert logarithmierte IC50-Werte zu erhalten, die dann einfach durch Addition mit den Werten der Proteasom- und TAP-Vorhersage kombiniert werden können. In Tabelle 12 sind für alle Allele, für die mehr als 10 Liganden in der Datenbank SYFPEITHI vorhanden sind, die erzielte Vorhersagequalität unter Verwendung dieser Affinitätsmatrices angegeben (mit und ohne Kombination mit der Vorhersage von TAP und Proteasom). Wie aus Tabelle 12 ersichtlich ist, wird für alle betrachteten Allele die schon an sich sehr hohe Vorhersagequalität der MHC-Bindungsvorhersage durch Hinzunahme der TAP- und Proteasomvorhersage weiter verbessert.

Allele	# Epitope	MHC	ProteaSMM-c	ProteaSMM-i
			+ TAP + MHC	
HLA-A0201	97	0,951	0,956	0,955
HLA-A24 + HLA-A2402	29	0,951	0,958	0,958
HLA-B07 + HLA-B0702	16	0,989	0,993	0,993
HLA-B5101	14	0,943	0,952	0,951
HLA-A01	10	0,992	0,997	0,997

Tabelle 12:
Vorhersagequalität von MHC-Bindungsvorhersage und kombinierter Vorhersage für humane MHC Klasse-I Liganden aus SYFPEITHI

6.10. Vergleich der Vorhersagequalität mit anderen Methoden

Um einen fairen Vergleich der Vorhersagequalität zwischen kombinierter Vorhersage und anderen öffentlich zugänglichen Methoden zu gewährleisten, können die in SYFPEITHI enthaltenen MHC-Klasse-I Liganden nicht verwendet werden, da diese zur Etablierung der Vorhersagen von SYFPEITHI und BIMAS verwendet wurden. Als unabhängiger Testdatensatz zum Vergleich wurden daher die RCC-Liganden verwendet. Dieser Datensatz enthält nur Liganden der MHC-Allele HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-B*18, und HLA-B*40. Eine SYFPEITHI-Vorhersage ist allerdings nur für Allele HLA-A*01 und A*03 verfügbar, BIMAS bietet zusätzlich auch eine Vorhersage für HLA-B*40.

Die erzielte Vorhersagequalität der unterschiedlichen Methoden ist in Tabelle 13 angegeben. Die erzielten Werte bewegen sich allesamt in einem sehr engen Bereich zwischen $AUC=0,974$ und $AUC=0,999$. Allerdings haben diese auf den ersten Blick nur sehr geringen Unterschiede einen deutlichen Einfluss auf die Rate der Falsch-Positiven Vorhersagen. Für eine Sensitivität der Vorhersage von 90% bewegt sich die Rate der Falsch-Positiven zwischen 6,8% (SYFPEITHI-Vorhersage für HLA-A*03) und 0,3% (SYFPEITHI-Vorhersage für HLA-A*01).

Der Vergleich zeigt, dass die kombinierte Vorhersage durchweg bessere Vorhersagequalität liefert als BIMAS. Ein Vergleich mit SYFPEITHI ist nicht eindeutig, für HLA-A*01 erreicht SYFPEITHI sowohl den höchsten AUC-Wert, als auch die geringste Rate an Falsch-Positiven (Abb. 52). Für HLA-A*03 wird die höchste Vorhersagequalität (AUC-Wert) unter ausschließlicher Verwendung der MHC-Bindungsmatrix erreicht, eine Kombination mit TAP- oder Proteasomvorhersage führt zu einer Verschlechterung. Dies ist erklärbar durch die hohe Zahl an P1K-Epitopen, die von HLA-A*03 präsentiert werden, die wahrscheinlich nicht proteasomal prozessiert werden.

RCC-Epitope	MHC + TAP +			SYFPEITHI	BIMAS
	MHC	ProteaSMM-c	ProteaSMM-i		
HLA-A01	0,991	0,997	0,997	0,999	0,993
HLA-A03	0,979	0,976	0,975	0,974	0,977
HLA-B18	0,995	0,997	0,998	-	-
HLA-B40	0,993	0,995	0,995	-	0,993

Tabelle 13:

Vorhersagequalität (AUC-Werte) von kombinierter Vorhersage, SYFPEITHI und BIMAS für MHC-Liganden aus RCC-Tumoren Die jeweils besten Werte sind fett gedruckt.

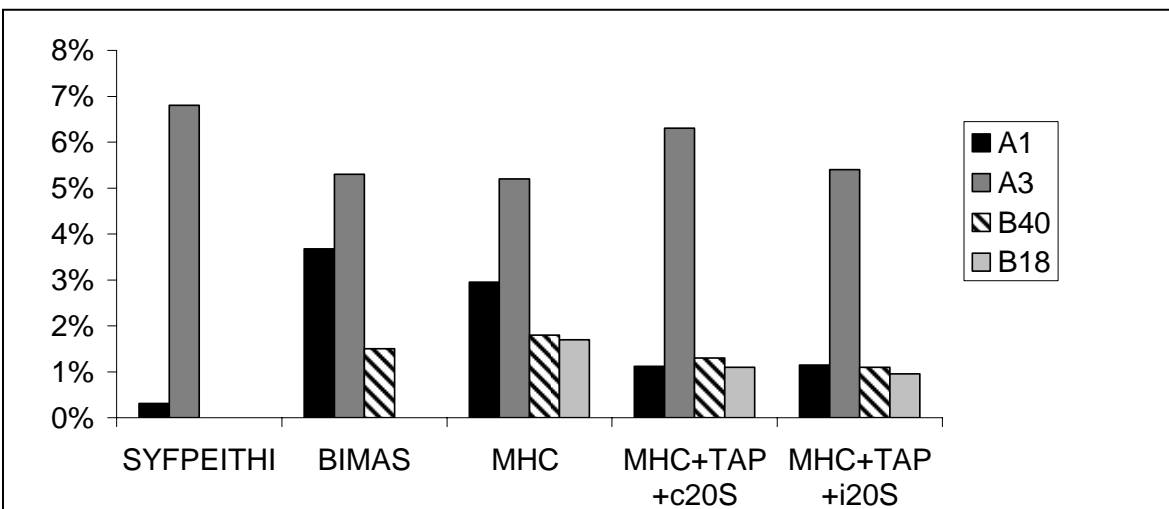


Abb. 52:

Vergleich der Vorhersagequalität unterschiedlicher Methoden
 Angegeben ist der Prozentsatz an Falsch-Positiven bei einer Sensitivität von 90% für die Vorhersage von MHC-Klasse-I-Liganden aus RCC-Tumoren

IV. Diskussion

1. Aufreinigung von 20S-Proteasomen

Durch die Optimierung einer publizierten Methode zur Aufreinigung von 20S-Proteasomen (Emmerich et al., 2000) ist es nun möglich, sowohl konstitutive 20S-Proteasomen aus der Zelllinie LCL721.174, die defizient für die Immununtereinheiten LMP2 und LMP7 ist, als auch immuno-20S-Proteasomen aus der Zelllinie LCL 721 in sehr hoher Reinheit zu präparieren. Die Aufreinigung erfolgte in vier Schritten, Batchadsorption an DEAE-Servacel, Ammoniumsulfatfällung, Anionenaustauschchromatographie über HPLC und Glycerol-Gradienten-Ultrazentrifugation. Durch die Kombination dieser Aufreinigungsschritte können aus einem Zellpellet von 20 ml ca. 1,5 mg bis 2 mg 20S Proteasomen in einer Reinheit von über 95% aufgereinigt werden. Kontaminierende Proteine konnten in den finalen Präparationen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung nicht detektiert werden. Da die Aktivität der Proteasom-Präparationen vollständig durch die beiden spezifischen Inhibitoren Lactacystin und Epoxomicin inhibierbar ist, kann eine Kontamination durch andere Proteasen wie TPPII ausgeschlossen werden.

Die aufgereinigten c20S-Proteasomen weisen keine durch Western-Blot detektierbaren immuno-Untereinheiten auf und können in dieser Hinsicht als rein konstitutiv betrachtet werden. In der immuno-20S Präparation können die beiden immuno-Untereinheiten LMP-2 und LMP-7 durch Western Blot detektiert werden, die konstitutive Untereinheit β_2 ist im Vergleich zu konstitutiven Proteasomen nur sehr schwach (ca. 5% der Intensität) durch Western-Blot detektierbar. Die Aktivität der beiden Proteasomen gegen das fluorogene Substrat Z-ARR-AMC, das von der tryptischen Aktivität des Proteasoms geschnitten wird, ist vergleichbar zwischen konstitutiven und immuno-Proteasomen. Während immuno-20S-Proteasomen eine gegenüber konstitutiven Proteasomen um ca. 50% erhöhte chymotryptische Aktivität (gemessen durch Suc-LLVY-AMC), ist eine Aktivität von Immunoproteasomen gegenüber dem Substrat Suc-YVAD-AMC nicht, bzw. nur in sehr geringem Maß nachweisbar.

2. In vitro Verdau von Prion-Protein

Die in dieser Arbeit generierten Daten zeigen, dass rekombinantes Prion-Protein sowohl durch konstitutive als auch immuno-20S Proteasomen in vitro degradiert werden kann. Dies ist im Gegensatz zum Verdau von Hefe-Enolase-1 (Nussbaum et al., 1998) ohne die Zugaben des Detergenzes SDS möglich. Die beobachteten Schnittmotive für c20S und i20S Proteasomen zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Schnittmotiven, die aus dem Verdau von Hefe-Enolase-1 ermittelt wurden (Toes et al., 2001), besonders die Präferenz für große hydrophobe Aminosäuren in Position P1, sowie die Präferenz für Alanin in P1' (Siehe Abb. 16, Tabelle 5+6). Dies zeigt, dass die Anwesenheit von SDS keine Veränderung der Spezifität des 20S-Proteasoms mit sich bringt, der Grund für die Notwendigkeit zur Zugabe dieses Detergenzes liegt vermutlich entweder in der notwendigen Entfaltung des untersuchten Substrates, oder aber in der Öffnung des Kanals zum katalytischen Kompartiment des 20S-Proteasoms. Auf den Einfluss von SDS auf die Entfaltung des Substratmoleküls weist auch die Tatsache hin, dass Enolase-1 über die gesamte Länge von 436 AA eine definierte Sekundärstruktur besitzt, während der N-Terminus von PrP keine detektierbare Sekundärstruktur aufweist. Daher ist es möglich, dass PrP auch in Abwesenheit von SDS mit dem N-Terminus in das 20S Proteasom „einfädelt“ und dann prozessiv abgebaut wird. Das stabiler gefaltete Enolase-Protein sowie auch Aldolase und Glutamat-Dehydrogenase bedürfen im Gegensatz dazu erst einer zumindest teilweisen Entfaltung, um proteasomal abgebaut zu werden.

Wenn man die Schnittmotive von c20S und i20S in den aus PrP generierten Fragmenten vergleicht, findet man analog zu den aus Enolase berechneten Schnittmotiven, dass die hydrophoben Aminosäuren Ile, Phe und Leu durch das immuno-20S Proteasom an Position P1 sowie kleine und polare Aminosäuren wie Ser und Thr an Position P1' gegenüber dem konstitutiven Proteasom präferiert werden. Die Aminosäuren Ala und Gly werden durch beide Proteasomenspezies an Position P1' präferiert. Andere Unterschiede in den Schnittmotiven von konstitutiven und immuno-20S-Proteasomen, die in der Analyse des Verdaus von Hefe Enolase-I beschrieben wurden, sind im Verdau von PrP nicht so deutlich ausgeprägt. Beispielsweise kann die Präferenz des konstitutiven Proteasoms für saure Aminosäuren an Position P1 nicht in vergleichbarem Maße beobachten werden. Der Grund für diese Unterschiede kann auch in der Aminosäuresequenz von PrP liegen, da man saure Aminosäuren nur im stärker gefalteten C-Terminus des Protein findet, der resistenter gegen proteasomalen Abbau zu sein scheint. Hierdurch wird demonstriert, dass die Sequenz des

untersuchten Substrates durchaus einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die beobachteten Schnittmotive besitzen kann, ein Grund mehr, warum für die exakte Vorhersage proteasomaler Schnitte auf eine Analyse von weiteren Substratproteine nicht verzichtet werden kann.

Unter sonst identischen Bedingungen findet man einen höheren Substratumsatz von immuno-20S Proteasomen im Vergleich zu konstitutiven Proteasomen. Dieser Effekt könnte spezifisch für PrP sein, jedoch andererseits auch auf eine im direkten Vergleich höhere katalytische Aktivität von Immunoproteasomen hinweisen. Die durch immuno-20S Proteasomen generierten Fragmente sind im Durchschnitt etwas kürzer (17,4 AA) als die durch konstitutive Proteasomen generierten Bruchstücke (20,5 AA). Die Daten zeigen außerdem einen Abfall der Menge der detektierten Fragmente von N-Terminus zum C-Terminus von PrP. Dies weist in starkem Maß auf eine directionale Prozessierung des Substratmoleküls vom ungefalteten N-Terminus zu dem eine stärkere Sekundärstruktur aufweisenden C-Terminus von PrP hin. Allerdings kann auch die Möglichkeit endoproteolytischer Schnitte (Liu et al., 2003), die erst kürzlich demonstriert wurde, nicht ausgeschlossen werden. Da kein SDS in dem Reaktionsansatz vorhanden war, können die Unterschiede auch auf die beschriebene stärkere Sekundärstruktur des C-Terminus zurückzuführen sein, die den Zugang zum katalytischen Kompartiment und damit den aktiven Zentren des 20S-Proteasoms erschweren könnte. Diese Faktoren sollten jedoch nur die beobachtete Prozessierungseffizienz beeinflussen, nicht aber die Schnittspezifität.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist durch diese Schnittdaten eine immense Verbesserung der Algorithmen zur Vorhersage proteasomaler Schnitte möglich, außerdem stehen hiermit genügend Daten für die Entwicklung von Algorithmen zur Verfügung, die zwischen Schnitten von konstitutiven und immuno-Proteasomen differenzieren können.

Nach der kürzlichen Identifizierung von CD4⁺ T-Zell Epitopen in PrP (Stoltze et al., 2003), können diese Daten zur direkten Identifizierung von CTL Epitopen aus der Sequenz von PrP verwendet werden. PrP-spezifische CD8⁺ T-Zellen wurden in PrP-infizierten Mäusen durch MHC-Tetramere detektiert, diese Zellen waren aber nicht in der Lage, Zielzellen zu lysieren, oder intrazelluläres TNF- α oder IFN- γ zu synthetisieren, nachdem sie in Kontakt mit peptidbeladenen Zielzellen gebracht wurden (Lewicki et al., 2003). Ob dies auf Anergie der untersuchten T-Zellen, oder auf Toleranzinduktion zurückzuführen ist, ist bis dato noch nicht geklärt. Die Verwendung zusätzlicher CTL-Epitope, die durch eine Kombination der gezeigten Schnittdaten mit MHC-Bindungsvorhersagen identifiziert werden können, wird eine genauere Untersuchung der CTL-Antworten gegen PrP ermöglichen und könnte auch bei der

Antwort auf Fragen bezüglich Toleranzinduktion und einem möglichen Brechen dieser Toleranz von großer Hilfe sein.

Das für die Verdauexperimente verwendete rekombinante PrP wurde aus *E. coli* aufgereinigt und ist dementsprechend nicht glykosyliert. Diese Situation ist jedoch vergleichbar mit derjenigen in einer lebenden Zelle. Während der Proteinsynthese wird PrP kotranslationell in das ER transloziert. Ca. 10% des neu synthetisierten PrP können im ER nicht korrekt falten und erreichen niemals die Zelloberfläche. Diese PrP-Moleküle werden einem retrograden Transport vom ER ins Zytosol unterworfen und dort durch das Proteasom abgebaut, diesen Reaktionsweg bezeichnet man als ERAD (Plempner and Wolf, 1999). Er beinhaltet die Deglykosylierung des Substratmoleküls, die Translokation in das Zytosol über ein modifiziertes Sec61p Translokon und schließlich die Ubiquitinylierung und den proteasomalen Abbau des Substratproteins. Dementsprechend ist PrP, welches in einer Zelle für den Abbau durch das Proteasom bestimmt ist, nicht glykosyliert. Im Gegensatz dazu wird vollständig glykosyliertes PrP von der Zelloberfläche nach Endozytose in azidischen Kompartimenten der Zelle abgebaut (Taraboulos et al., 1992). Eine Reduktion proteasomaler Aktivität führt zur Akkumulation einer proteaseresistenten Form von PrP im Zytosol (Ma and Lindquist, 1999; Ma and Lindquist, 2002). Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten zeigen, dass zwei allelische Varianten des PrP sowohl durch konstitutive als auch durch immuno-20S-Proteasomen mit unterschiedlicher Effizienz abgebaut werden. Die Variante, die mit einer höheren Suszeptibilität gegenüber Prion-Infektionen assoziiert ist (VRQ) wird signifikant langsamer abgebaut als die mit Resistenz gegen Prion-Infektionen assoziierte Variante ARR. Diese Tatsache steht auch in guter Übereinstimmung mit der beschriebenen höheren Entfaltungsenergie von PrP-VRQ (Rezaei et al., 2002). Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass die Kinetik des proteasomalen Abbaus direkt zu den *in vivo* beschriebenen Unterschieden in der Pathogenität der unterschiedlichen Allele beiträgt. Die verlangsamte Degradation des PrP-VRQ sowohl durch c20S- als auch durch i20S-Proteasomen (siehe Abb. 18) könnte *in vivo* zu einem höheren Gleichgewichtslevel von PrP-VRQ im Zytosol verglichen mit PrP-ARR führen. Da das Zytoplasma eine Umgebung bietet, die eine Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} favorisiert, könnte dieses höhere Gleichgewichtslevel von PrP-VRQ im Zytosol wiederum die Aggregation und Konversion zu einer proteaseresistenten Form positiv beeinflussen und damit direkt zur Pathogenese von PrP beitragen.

3. In vitro Verdau von Peptiden

In dieser Arbeit wurden der Verdau mehrerer unterschiedlicher Peptide durch c20S- und i20S-Proteasomen analysiert. Durch den in vitro Verdau des Peptides WT1₃₁₄₋₃₂₉ konnte gezeigt werden, dass sowohl c20S- als auch i20S-Proteasomen den C-Terminus eines neu identifizierten HLA-A*01 restringierten Epitops generieren können.

Im Verdau eines 25 AA langen Peptides aus der Fusionsregion von BCR-ABL konnte gezeigt werden, dass eine proteasomale Prozessierung des C-Terminus dreier in der Literatur beschriebener CTL-Epitope durch c20S-Proteasomen möglich ist, durch i20S-Proteasomen kann jedoch nur eines dieser Epitope, das HLA-A*03 restringierte KQSSKALQR, generiert werden. Für ein weiteres beschriebenes Epitop, das HLA-A*02 bindende SSKALQRPV konnte keine proteasomale Schnittstelle identifiziert werden, die den C-Terminus freisetzt. Dieses Epitop kann dementsprechend nicht durch 20S-Proteasomen generiert wären, eine Prozessierung durch TPP-II wäre eine mögliche Alternative.

Durch den Verdau eines Peptides aus dem tumorassoziierten Protein PRAME konnte ein weiteres CTL-Epitop identifiziert werden, für dessen Präsentation die Anwesenheit von i20S-Proteasomen unbedingt notwendig ist, da c20S-Proteasomen im Gegensatz zu i20S-Proteasomen nicht in der Lage sind, den korrekten C-Terminus des Epitops PRAME₁₄₂₋₁₅₁ (SLSFPEPEA) zu generieren.

Für das HLA-A*0201 bindende Nonapeptid (RIAECILGM) aus dem ETV-6/AML Fusionsprotein konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus dieses Epitops durch beide Spezies von 20S-Proteasomen generiert werden kann.

Die Präsentation des Peptides CP α ₁₉₂₋₉₉, das bei der positiven Selektion von OT-I-T-Zellen eine Rolle spielt ist in starkem Maße von der Anwesenheit von i20S-Proteasomen abhängig, da der C-Terminus des Epitops zwar von c20S-Proteasomen generiert werden kann, dieses aber im Gegensatz zum i20S-Proteasom auch sehr starke Schnitte durchführt, die einer Präsentation des Epitops entgegenwirken. Durch i20S-Proteasomen erfolgt die Generierung des korrekten C-Terminus in vitro um den Faktor 100 effizienter, Schnittstellen innerhalb des Epitops wurden zwar auch festgestellt, diese sind jedoch um den Faktor 12 schwächer als der Schnitt nach dem C-Terminus des Peptides CP α ₁₉₂₋₉₉.

4. Neue Substrate für das 20S-Proteasom

Durch eine Optimierung der Verdaubedingungen wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, weitere Substrate *in vitro* durch das 20S-Proteasom abzubauen. Dies konnte sowohl für die beiden Proteine Glutamat-Dehydrogenase und Aldolase, deren Funktion im normalen Stoffwechsel der Zelle anzusiedeln ist, als auch für das tumor-assoziierte Protein Adipophilin gezeigt werden. Adipophilin wurde zu diesem Zweck in *E.coli* exprimiert und durch eine mehrstufige Aufreinigung in hoher Reinheit erhalten. Leider konnten aus dem Verdau von Adipophilin aus ungeklärten Gründen keine Peptidfragmente identifiziert werden, ein Grund hierfür könnte in einer stark reduzierten Trennleistung der verwendeten RP-HPLC-Säule aufgrund der Anwesenheit von Harnstoff liegen. In Vorversuchen wurde die Verdauansätze von Aldolase und Glutamat-Dehydrogenase durch c20S-Proteasomen mittels LC-MS-MS analysiert. Durch diese Methode konnten in den Degradationsexperimenten Peptide nachgewiesen werden können, die eindeutig aus den eingesetzten Substraten proteasomal erzeugt wurden. Allerdings ist durch eine Analyse, die ausschließlich auf einer massenspektroskopischen Detektion beruht, keine quantitative Aussage über die generierten Peptide möglich. Für das Training von Vorhersagealgorithmen kann jedoch auf quantifizierte Daten nicht verzichtet werden, da nur so eine weitere Verbesserung der in dieser Arbeit erreichten Vorhersagequalität der Vorhersagealgorithmen erzielt werden kann, wie durch eine probeweise Inkorporation der rein massenspektroskopisch generierten Daten aus dem Verdau von Aldolase durch c20S-Proteasomen festgestellt wurde.

Die genaue quantitative Analyse der durch c20S- und i20S-Proteasomen generierten Fragmente aus diesen beiden neuen Substraten durch Kombination von Edmansequenzierung und massenspektroskopischer Auswertung ist für ein Anschlussprojekt geplant.

5. Das “Reverse Analysis of Processing” (RAP) –Projekt

Zur exakten Modellierung des Einflusses der proteasomalen Spezifität auf die Antigenprozessierung im MHC-Klasse-I Weg mittels computerbasierter Algorithmen werden trotz der jetzt schon erreichten hohen Vorhersagequalität noch weitere Experimente erforderlich sein, die *in vitro* das proteasomale Schnittverhalten untersuchen. Die aus *in vitro* Experimenten generierten Daten stellen eine solide Basis für die Etablierung solcher Vorhersagealgorithmen dar, jedoch ist nicht vollständig geklärt, inwieweit die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse über das proteasomale Schnittverhalten auf die Situation innerhalb einer lebenden Zelle übertragbar sind. Einflüsse, die durch die im Vergleich zur *in vitro* Situation stark unterschiedlichen Bedingungen innerhalb einer lebenden Zelle aus das proteasomale Schnittverhalten können jedoch wenn überhaupt nur unvollständig durch computerbasierte Algorithmen modelliert werden, da eine genaue Analyse dieser Einflüsse sowohl qualitativer als auch quantitativer Natur bislang nicht möglich ist. Auch der Einfluss anderer zellulärer Proteasen wie TPPII oder der zytosolischen Aminopeptidasen LAP, TOP, PSA und BH kann bislang in den Modellen nicht abgebildet werden. Des Weiteren ist es zwar sehr wahrscheinlich, dass das Schnittverhalten des 26S-Proteasoms durchaus dem des 20S-Proteasoms vergleichbar ist und daher mit den bekannten Algorithmen mit hoher Zuverlässigkeit modelliert werden kann, andererseits wurde anhand von *in vitro* Degradationsexperimenten gezeigt, dass durchaus qualitative und quantitative Unterschiede zwischen den *in vitro* generierten Schnittprodukten nachweisbar sind.

Um letztendlich die Fragen beantworten zu können, inwieweit sich flankierende Sequenzen *in vivo* auf das tatsächlich beobachtbare Schnittverhalten auswirken, und auch welche flankierenden Sequenzen eine Prozessierung durch konstitutive oder immuno-Proteasomen wahrscheinlicher machen, wurde in dieser Arbeit ein System etabliert, das auf der Transfektion von lebenden Zellen mit einem Genkonstrukt beruht, in dem ein bekanntes H2-K^b restringiertes CTL-Epitop aus Ovalbumin (SIINFEKL) von variablen flankierenden Sequenzen umgeben ist.

Die Detektion des prozessierten Epitops SIINFEKL erfolgt durch einen monoklonalen Antikörper, 25.D1.16, der spezifisch an H2-K^b gebundenes SIINFEKL erkennt (Porgador et al., 1997). Diese Färbung ist spezifisch und über einen weiten Bereich proportional zur Menge der auf der Oberfläche der Zelle präsentierten H2-K^b-SIINFEKL-Komplexe.

Für dieses Projekt wurde eine Zelllinie etabliert, die das MHC-Klasse-I Molekül H2-K^b exprimiert und gleichzeitig in der Lage ist, durch eine Kotransfektion des

Expressionskonstruktes mit einem Vektor, welcher die Flp-Rekombinase exprimiert, das Expressionskonstrukt in eine definierte Stelle im Genom zu integrieren. Es konnte gezeigt werden, dass eine Transfektion mit den hergestellten Genkonstrukten auf eine einfache und reproduzierbare Weise unter Benutzung des FlpIn-Systems möglich ist. Besonders wichtig ist hierbei der Nachweis, dass sich das Genexpressionsniveau der verwendeten Konstrukte in allen untersuchten Transfektanten in einem sehr engen Bereich bewegt, was eine spätere Normierung der gewonnenen Daten weitaus vereinfacht.

Das Expressionsniveau der H2-K^b-SIINFEKL-Komplexe in stabil transfizierten Zellen ist proportional zur Repräsentationsrate dieser Komplexe, die durch Acid-Wash bestimmt wurde. Dementsprechend kann schon aus der Oberflächenexpression einer transfizierten Zelle direkt auf die Prozessierungseffizienz innerhalb der Zelle zurückgeschlossen werden. Durch eine Analyse der Repräsentationsrate von unterschiedlichen Konstrukten, die sich in den flankierenden Sequenzen unterscheiden können jedoch durch Parallelversuche unter Verwendung von spezifischen Proteasominhibitoren zusätzliche Informationen gewonnen werden, ob die Prozessierung rein proteasomal erfolgt, oder auch zumindest teilweise von anderen Proteasen übernommen werden kann. Beispielsweise ist die SIINFEKL-Präsentationsrate von Zellen, die mit einem Konstrukt transfiziert wurden, welches SIINFEKL direkt am C-Terminus (d.h. ohne C-terminal flankierende Sequenz) exprimiert nicht durch den Inhibitor Lactacystin hemmbar, auch für ein Konstrukt, das an Position P1' die Aminosäure Alanin exprimiert, konnte eine, wenn auch im Vergleich zur Kontrolle geringere, Repräsentationsrate in Gegenwart von Lactacystin gezeigt werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass in diesem speziellen Fall die Prozessierung des C-Terminus auch durch eine andere Protease erfolgen kann.

Zur kompletten Analyse der Schnittspezifität gibt es zwei komplett unterschiedliche Ansätze: Eine Möglichkeit ist die Transfektion von Zellen mit einer kompletten Bibliothek von Konstrukten, die für randomisierte Sequenzabschnitte in den fünf Aminosäuren N- und C-terminal des exprimierten SIINFEKL kodieren. Dies ist nur möglich, weil durch die Verwendung des FlpIn-System sichergestellt werden kann, dass jeweils nur eine singuläre Integration in das Genom der transfizierten Zelle stattfindet. Nach der Transfektion erfolgt in diesem Fall eine Selektion durch Färbung mit dem Antikörper 25.D1.16 auf besonders hoch- oder niedrig exprimierende Einzelzellklone. Von diesen Einzelzellklonen kann nun die genomische DNA, welche das transfizierte Konstrukt integriert hat, gewonnen werden und die Sequenz des transfizierten Konstruktes durch PCR und anschließende automatisierte DNA-Sequenzierung bestimmt werden. Durch die Analyse einer Vielzahl von transfizierten hoch-

und niedrigexprimierenden Einzellzellklonen kann eine Datenbasis erzeugt werden, die für das Training von computerbasierten Algorithmen verwendet werden kann. Diese Algorithmen wären dann in der Lage, den Einfluss der N- und C-terminal flankierenden Sequenzen auf kompletten Prozess der Antigenprozessierung zu modellieren.

Der zweite mögliche Ansatz ist ein schrittweises Scannen der einzelnen C- und N-terminal flankierenden Positionen. Hierbei können jeweils entweder Konstrukte betrachtet werden, die nur in einer bestimmten flankierenden Position jeweils unterschiedliche Aminosäuren tragen und so die maximale Variationsbreite des Einflusses einer bestimmten Position auf das Prozessierungsverhalten bestimmt werden. Für die Position P1' wurde dies bereits erfolgreich in dieser Arbeit durchgeführt, die beobachteten Einflüsse der Aminosäuren in dieser Position weisen eine sehr gute Korrelation mit der Aminosäureverteilung in dieser Position, die man in natürlich präsentierten Liganden beobachtet, auf. Des Weiteren ist auch eine Untersuchung von Konstrukten möglich, welche für eine Peptidsequenz kodieren, die nur eine begrenzte Anzahl von C-terminal flankierenden Aminosäuren aufweist. Hierdurch kann ein möglicher Einfluss von zytosolischen Carboxypeptidasen untersucht werden.

Des Weiteren ist durch Stimulation der transfizierten Zelllinien mit IFN- γ , welche zur Expression von immuno-Proteasomen in dieser Zelllinie führt, auch eine getrennte Untersuchung der Prozessierungsregeln in IFN- γ stimulierten Zellen in einer mit der in vivo vorliegenden vergleichbaren Situation möglich. Dies ist insbesondere möglich, da die Expression des H2-K^b Moleküls nicht durch den endogenen Promotor, sondern durch einen CMV-Promotor gesteuert wird und damit die Expressionsrate des H2-K^b Moleküls nicht durch die IFN- γ Stimulation beeinflusst wird, was eine Interpretation der gewonnenen Ergebnisse erschweren würde.

6. Evolution von Algorithmen zur Vorhersage von proteasomalen Schnitten und die kombinierte Vorhersage der Einflüsse von Proteasom, TAP, und MHC

Für die meisten MHC Klasse-I Liganden ist die proteasomale Generierung des korrekten C-Terminus der erste Schritt im Prozess der Antigen-Prozessierung (Goldberg et al., 2002). Während für die darauf folgenden selektiven Schritte, namentlich TAP-Transport und Bindung der Peptide an die MHC-Moleküle, bereit sehr zuverlässige Algorithmen zur Verfügung stehen, sind bisher keine in der Vorhersagequalität vergleichbaren Algorithmen zur Vorhersage proteasomaler Schnitte publiziert. In dieser Arbeit wurde eine matrixbasierte Methode entwickelt, die eine Vorhersage von Schnitten durch konstitutive und immuno-20S Proteasomen ermöglicht.

Die Qualität der von dieser als ProteaSMM bezeichneten Methode getroffenen Vorhersagen wurde mit der Vorhersagequalität anderer publizierter Methoden (PaProC, NetChop und FragPredict) (Kuttler et al., 2000;Holzhutter and Kloetzel, 2000;Kesmir et al., 2002) verglichen. Um eine direkte Vergleichbarkeit der Methoden zu ermöglichen, wurden die Vorhersagematrizen zuerst nur mit bereits früher publizierten Schnittdaten aus Hefe-Enolase-1 (Toes *et al.*, 2001) und β -Casein (Emmerich *et al.*, 2000) trainiert. Als Testdatensatz wurde eine große Zahl von Peptidverdaus verwendet, die entweder in der Literatur (Kessler et al., 2001) (Lucchiari-Hartz et al., 2003) beschrieben, oder aber in dieser Arbeit durchgeführt wurden. Mit Hilfe dieses Datensatzes konnte gezeigt werden, dass die ProteaSMM-Methode im direkten Vergleich eine bessere Vorhersagequalität liefert als die restlichen untersuchten Vorhersagemethoden.

Um die Algorithmen weiter zu verfeinern und die Vorhersagequalität zu verbessern, wurden die Schnittdaten aus dem Verdau von PrP in den Trainingsdatensatz aufgenommen und zwei unabhängige Varianten des Algorithmus trainiert. Diese beiden Varianten, ProteaSMM-c und ProteaSMM-i erlauben eine differentielle Vorhersage von Schnitten konstitutiver und immuno-20S-Proteasomen. Sie bieten eine weitaus höhere Vorhersagequalität für *in vitro* Schnitte, wenn man sie anhand des o.g. Testdatensatzes mit anderen publizierten Methoden vergleicht. Außerdem werden auch die C-Termini von MHC-Klasse-I Liganden weitaus besser vorhergesagt, als andere Methoden bisher in der Lage waren. Dies ist besonders wichtig, da die nur sehr schlechte Korrelation zwischen bisherigen Vorhersagen proteasomaler Schnitte und beobachteten C-Termini von MHC-Klasse-I Liganden bereits

Zweifel aufkommen ließ, ob das Proteasom überhaupt eine selektive Rolle im MHC-Klasse-I Prozessierungsweg spielt (Peters et al., 2003). Diese Zweifel können mit der ProteaSMM Methode nun endgültig aus dem Weg geräumt werden, da sich aus den *in vitro* gewonnenen Daten über die Schnittspezifität des 20S-Proteasoms eine qualitativ hochwertige Vorhersagematrix generieren lässt, mit deren Hilfe sich mit guter Selektivität die C-Termini der meisten MHC Klasse-I Liganden vorhersagen lassen.

Den größten Einfluss auf die durch ProteaSMM gemachten Vorhersagen besitzt die Position P1 unmittelbar vor der Schnittstelle, gefolgt von den benachbarten Positionen P4 bis P1'. Andere Positionen in der Umgebung der Schnittstelle haben in diesem Modell nur einen geringen, oder sogar keinen Einfluss auf die Selektion einer Schnittstelle durch ProteaSMM. Dies stellt einen klaren Unterschied zu anderen publizierten Modellen dar, die auch weiter entfernte Positionen in die Vorhersage des proteasomalen Schnittverhaltens miteinbeziehen.

Durch eine Kombination der proteasomalen Schnittvorhersage mit einer Vorhersage des Transportes durch TAP wird im Prinzip der Pool an Peptiden vorhergesagt, die im ER für eine Bindung an MHC-Klasse-I Moleküle zur Verfügung steht. Durch die Kombination der beiden Vorhersagen lässt sich eine höhere Vorhersagequalität erreichen, als durch TAP- oder Proteasom-Vorhersage alleine. Dies ist insbesondere deswegen von großer Bedeutung, als die Kombination anderer Vorhersagemethoden für proteasomale Schnitte mit der TAP-Vorhersage keine Verbesserung der Vorhersagequalität mit sich brachte (Peters *et al.*, 2003).

Durch die kombinierte TAP- und Proteasom-Vorhersage ist es möglich, Proteinsequenzen auf mögliche MHC-Liganden zu screenen, ohne sich dabei auf ein bestimmtes Allel festlegen zu müssen. Dieses Screening kann entweder dazu benutzt werden, um Peptide auszuschließen, die mit sich mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht im ER befinden werden (die Top 50% der vorhergesagten Peptide beinhalten 97% aller Epitope), oder aber, um eine Liste von Peptiden zu generieren, die mit hoher Wahrscheinlichkeit das gesuchte T-Zell-Epitop enthält (es ist ca. zehnmal wahrscheinlicher, unter den Top 1% der vorhergesagten Peptide ein Epitop zu finden, als unter zufällig ausgewählten Peptiden)

Wenn man die Vorhersagen analysiert, die die ProteaSMM-Methode für die C-Termini von MHC-Klasse-I Liganden liefert, findet man eine starke Korrelation zwischen den kombinierten Vorhersagewerten (TAP + Proteasom) und der Verteilung der Aminosäuren in der Position P1 (die den C-Terminus eines Epitops darstellt). Diese hohe Korrelation ist besonders überraschend, da die Bindung an MHC Klasse-I Moleküle nochmals starke Restriktionen an die Beschaffenheit des C-Terminus eines Peptides stellt. Deswegen kann man schlussfolgern, dass die mittlere Präferenz von MHC-Molekülen für den C-Terminus

eines Liganden sich im Laufe der Evolution an den im ER verfügbaren Pool von Peptiden adaptiert hat, dessen Zusammensetzung durch die Spezifitäten von Proteasom und TAP in hohem Maße beeinflusst wird.

In der Literatur wurden mehrere, sogenannte nicht-klassische Wege zur Generierung von MHC-Klasse-I Liganden beschrieben (Gromme and Neefjes, 2002). Jedoch wird die Rolle dieser alternativen Wege limitiert durch die beobachtete sehr gute Übereinstimmung der ProteaSMM-Vorhersagen mit der tatsächlichen Verteilung von Aminosäuren an Position P1 von Epitopen. Ein möglicher alternativer Prozessierungsweg ist die Generierung des C-Terminus von CTL-Epitopen durch TPPII und nicht durch das Proteasom. Bisher wurde dieser Prozessierungsweg allerdings nur für ein CTL-Epitop aus HIV-nef gezeigt (Seifert et al., 2003). Das beschriebene HLA-A*03 und HLA-A*11 restringierte Epitop HIV-nef(73-82) (QVPLRPMTYK) trägt einen Lysinrest am C-Terminus, daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob es Anzeichen dafür gibt, dass auch andere dieser P1K-Epitope durch TPPII prozessiert werden. Dies ist vor allem durch zwei Beobachtungen wahrscheinlich: Zum einen ist die beobachtete Frequenz von P1K Epitopen wesentlich höher als durch kombinierte TAP- und Proteasom-Vorhersagen zu erwarten ist. Diese kombinierten Vorhersagen sagen nur eine geringe Anzahl dieser Liganden voraus, hauptsächlich, weil proteasomale Schnitte nach der Aminosäure Lysin nicht sehr wahrscheinlich sind. Zum zweiten zeigt eine Analyse der P1'-Position nach P1K Liganden eine hohe relative Häufigkeit der hydrophoben Aminosäuren F, L, V und I, die einen negativen Einfluss auf proteasomale Schnitte aufweisen. Diese Aminosäuren findet man in MHC-Liganden mit anderen C-Termini als Lysin in weitaus geringerer Häufigkeit. Untersucht man die Positionen P1' und P2' des HIV-Nef Epitops, findet man zwei Alaninreste, diese werden auch bei anderen P1K-Epitopen sehr häufig an diesen Positionen gefunden.

Ein Hauptziel dieser Arbeit war die Analyse des Einflusses der proteasomalen konstitutiven und immuno-Untereinheiten auf die Generierung von Epitopen. Wie in mehreren in vitro Verdaus von Peptiden und Proteinen bisher gezeigt werden konnte, bestehen beträchtliche Unterschiede in den Schnittmustern, die von konstitutiven und immuno-20S Proteasomen generiert werden. Andererseits besteht auch eine gewisse Überlappung der Schnittpräferenzen. Den Effekt dieser beiden Beobachtungen auf die Generierung von CTL-Epitopen zu analysieren wird durch die Tatsache erschwert, dass für fast alle Epitope und Liganden, die in öffentlich zugänglichen Datenbanken gelistet sind, nicht bekannt ist, ob ihr C-Terminus durch konstitutive oder Immunoproteasomen generiert wurde, oder ob sie sogar möglicherweise von einer Prozessierung durch andere Proteasen wie TPPII abhängig sind.

Aus diesem Grunde wurden in dieser Arbeit zwei große Datensätze von MHC Klasse-I Liganden kompiliert, für die eine definierte Proteasomenzusammensetzung (analysiert durch Gen-Chip-Analyse) in dem Gewebe, aus dem sie extrahiert wurden, bekannt ist. Diese MHC Klasse-I-Liganden entstammen sämtlich aus RCC-Tumoren, die in der Arbeitsgruppe Rammensee identifiziert wurden.

Erstaunlicherweise findet man, dass die Identifikation aller Epitope in beiden Datensätzen am besten mit der Vorhersagemethode (ProteaSMM-i) funktioniert, die auf Schnittdaten basiert, die mit Hilfe von immuno-20S Proteasomen generiert wurden. Der Grund hierfür wird deutlich, wenn man die proteasomalen Vorhersagen mit der Vorhersage des TAP-Transportes kombiniert, die viele der beobachteten Unterschiede im Vorhersageverhalten von ProteaSMM-i und ProteaSMM-c ausgleicht. Dies ist folgendermaßen interpretierbar: Das konstitutive Proteasom prozessiert viele Peptide, die aufgrund ihrer schlechten Affinität zu TAP nicht in das ER transportiert werden können, wie zum Beispiel Peptide, die die Aminosäuren Asp und Glu am C-Terminus tragen. Benutzt man nun eine kombinierte Vorhersage von TAP und Proteasom, so werden diese Peptide durch die TAP-Vorhersage herausgefiltert und erscheinen später nicht unter den Peptiden, die als mögliche Epitope vorhergesagt werden. Das Immunoproteasom erzeugt einen stärker limitierten Pool von Peptiden, deren C-Terminus in fast allen Fällen sehr gut mit der Spezifität von TAP harmoniert. Von dieser Perspektive betrachtet erfolgte die Evolution der immuno-Untereinheiten des Proteasoms nicht so sehr, um die Verteilung von Peptiden auf der Zelloberfläche zu verändern, sondern einfach, um mit höherer Effizienz Peptide zu generieren, die als mögliche MHC Klasse-I Liganden in Frage kommen.

Die kombinierte Vorhersage von MHC-Bindung, TAP und Proteasom liefert in fast allen Fällen eine signifikant höhere Vorhersagequalität als eine MHC-Bindungsvorhersage alleine, die für sich genommen schon eine sehr hohe Vorhersagequalität erreicht ($AUC > 0.94$) (Tab. 12). Für diese Analyse wurden humane MHC Klasse-I Liganden verwendet, die aus der Datenbank SYFPEITHI extrahiert wurden. Da diese Liganden zur Etablierung der SYFPEITHI-Vorhersagematrizen verwendet wurden, ist ein direkter Vergleich der Vorhersagequalität mit Hilfe dieses Datensatzes nicht möglich. Aus diesem Grund wurde für den Vergleich unterschiedlicher Vorhersagemethoden für MHC Klasse-I Liganden (SYFPEITHI, BIMAS und die kombinierte Vorhersage (ProteaSMM+TAP+MHC)) der Datensatz von RCC-assoziierten Epitopen verwendet. Dieser Datensatz konnte jedoch nicht vollständig für die Analyse verwendet werden, da die von RCC-68 exprimierten MHC-Allele überlappende Bindungsmotive aufweisen und daher die Liganden nicht eindeutig einem

bestimmten Allel zugeordnet werden können. Der Vergleich der unterschiedlichen Vorhersagemethoden ist daher auf die Allele HLA-A*01, HLA-A*03, HLA-B*18 und HLA-B*40 beschränkt. Weiter eingeschränkt werden die Vergleichsmöglichkeiten durch die Tatsache, dass weder SYFPEITHI, noch BIMAS eine Vorhersage für HLA-B*40 anbieten, eine Vorhersage für HLA-B*18 steht für SYFPEITHI ebenfalls nicht zur Verfügung.

HLA-A*01 besitzt ein äußerst stringentes Bindungsmotiv, durch die SYFPEITHI-Vorhersagematrix wird dieses nahezu perfekt wiedergegeben (AUC= 0.999). Für dieses Allel erreicht die kombinierte Vorhersage (AUC=0.997) zwar signifikant bessere Werte als die MHC-Bindungsvorhersage alleine, ist aber dennoch leicht schlechter als SYFPEITHI. Im Falle der Vorhersage von HLA-A*03 Liganden wird die beste Vorhersagequalität durch eine reine MHC-Bindungsvorhersage erreicht, in diesem Falle bringt die Hinzunahme von TAP- und Proteasom-Vorhersage sogar eine Verschlechterung der Vorhersagequalität mit sich. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den großen Anteil von P1K-Epitopen unter den HLA-A*03 Liganden zurückzuführen. Diese werden durch den Vorhersagealgorithmus ProteaSMM nur schlecht vorhergesagt.

Insgesamt betrachtet liefert die kombinierte Vorhersage durch den hier dargestellten Algorithmus eine vergleichbare oder höhere Vorhersagequalität als SYFPEITHI oder BIMAS, wenn man die getroffenen Vorhersagen mit Hilfe eines unabhängigen Testdatensatzes vergleicht. Aus der Literatur wurden Vorhersagematrizen für eine Vielzahl unterschiedlicher humaner MHC Klasse-I Allele extrahiert und für die Einbindung in eine kombinierte Vorhersage adaptiert: HLA-A*01, A*02, A*03, A*11, A*24, A*31, A*33, A*68, B*07, B*18, B*35, B*40, B*44, B*45, B*51, B*53, B*54. Diese Liste kann auf einfache Weise erweitert werden, sobald neue Bindungsmatrizen für weitere HLA-Allele bekannt werden.

Für alle diese Allele steht nun eine kombinierte Vorhersagemethode zur Verfügung, deren Ergebnis im Gegensatz zu anderen publizierten Methoden nicht nur eine eindimensionale Angabe ist, ob und mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Peptid wirklich ein Epitop darstellt, sondern vielmehr eine differenzierte Aussage über die einzelnen Prozessierungsschritte und ihren Einfluss auf die Präsentation des Epitops erlaubt. Zusätzlich kann noch die Aussage getroffen werden, ob eine Prozessierung bevorzugt durch konstitutive oder immuno-Proteasomen erfolgt.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die bestehende Datenbasis von proteasomalen Schnittdaten durch die Analyse des *in vitro* Verdau von PrP und durch eine große Zahl von Peptidverdau beträchtlich erweitert. Alle durchgeführten Verdauexperimente wurden quantitativ durch eine Kombination von Edman-Sequenzierung und Massenspektroskopie analysiert. Durch die quantitative Analyse des Verdau von PrP konnten die Unterschiede in den Schnittpräferenzen von konstitutiven und immuno-20S-Proteasomen, die bereits durch Verdau von Hefe Enolase-I erstmals charakterisiert wurden, weiter differenziert und verfeinert werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Unterschiede in der Pathogenität zweier unterschiedlicher PrP-Allele in Schafen mit der proteasomalen Abbaugeschwindigkeit der exprimierten PrP-Varianten korreliert, was den Schluss nahe liegt, dass der proteasomale Abbau von PrP eine wichtige Rolle in der Pathogenese von PrP spielt.

In mehreren Peptidverdau konnte für unterschiedliche CTL-Epitope nachgewiesen werden, ob diese präferentiell durch konstitutive oder immuno-20S-Proteasomen prozessiert werden. Diese Peptidverdau stellen neben der direkt daraus extrahierbaren Information über die Prozessierung eines speziellen Epitops auch eine wertvolle Datenquelle für die Evaluierung von proteasomalen Schnittvorhersagen dar.

Es konnte eine Methode etabliert werden, die den Verdau von weiteren Substraten durch 20S Proteasomen *in vitro* ermöglicht, damit ist der Grundstein für eine weitere Erweiterung der verfügbaren Daten über die proteasomale Schnittspezifität gelegt, die letztendlich zur Verfeinerung und Qualitätsverbesserung der Vorhersagealgorithmen für proteasomale Schnitte führen wird.

Aufgrund der nun vorliegenden Datenbasis von proteasomalen Schnittdaten war eine Entwicklung von Vorhersagealgorithmen möglich, die eine differenzierte Schnittvorhersage von konstitutiven und immuno-20S-Proteasomen erlauben, dies ist insbesondere für die Vorhersage von viralen Epitopen von nicht zu vernachlässigender Bedeutung. Die Vorhersagequalität der in dieser Arbeit entwickelten Methode zu proteasomalen Schnittvorhersage übersteigt die anderer publizierter Algorithmen.

Weiterhin konnte durch eine Kombination dieser Algorithmen mit der Vorhersage von TAP-Transport und MHC-Bindung eine kombinierte Vorhersagemethode etabliert werden, die es ermöglicht, den Einfluss der drei höchst-selektiven Prozesse auf die Antigenprozessierung zu modellieren. Die dabei erreichte Vorhersagequalität erreicht Werte von AUC >0.95, was der

Vorhersagequalität von SYFPEITHI in den untersuchten Testdatensätzen vergleichbar, in manchen Fällen auch leicht überlegen ist. Diese kombinierte Vorhersage steht für eine Vielzahl unterschiedlicher MHC-Klasse-I Allele zur Verfügung.

Mit dem Projekt "Reverse Analysis of Processing" konnte schließlich die Grundlage für eine Evaluierung des Einflusses flankierender Sequenzen auf die Antigenprozessierung innerhalb einer lebenden Zelle gelegt werden. Das etablierte System ermöglicht eine einfache Analyse des Einflusses sowohl einzelner Aminosäuren als auch der Gesamteinflusses der betrachteten flankierenden Positionen auf die Prozessierungseffizienz durch konstitutive und immuno-Proteasomen. Erste Ergebnisse aus diesem Projekt zeigen bereits eine sehr gute Korrelation des Einflusses der untersuchten flankierenden Sequenzen mit der in MHC Klasse-I-Liganden vorliegenden Aminosäureverteilung. Letztendlich können die aus diesem Projekt gewonnenen Ergebnisse über die Antigenprozessierung *in vivo* mit in die Entwicklung eines Vorhersagealgorithmus zur Prozessierung von MHC-Klasse-I Liganden miteinfließen und so zu einer weiteren Verbesserung der Vorhersagequalität führen.

VI. Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten:

Tenzer S, Stoltze L, Schonfisch B, Dengjel J, Muller M, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H. *Quantitative analysis of prion-protein degradation by constitutive and immuno-20S proteasomes indicates differences correlated with disease susceptibility.* J Immunol. 2004 Jan 15;172(2):1083-91.

Hebart H, Rauser G, Stevanovic S, Haenle C, Nussbaum AK, Meisner C, Bissinger AL, **Tenzer S**, Jahn G, Loeffler J, Rammensee HG, Schild H, Einsele H. *A CTL epitope from human cytomegalovirus IE1 defined by combining prediction of HLA binding and proteasomal processing is the target of dominant immune responses in patients after allogeneic stem cell transplantation.* Exp Hematol. 2003 Oct;31(10):966-73.

Probst J, Blumenthal SG, **Tenzer S**, Weinschenk T, Dittmer D, Schoor O, Six A, Rammensee HG, Pascolo S. *A conserved sequence motive in the mouse variable T cell receptor alpha recombination signal sequence 23 bp spacer can affect recombination.* Eur J Immunol. 2004 accepted for publication

Asemissen AM, Scheibenbogen C, **Tenzer S**, Müller M, Walter S, Stevanovic S, Schild H, Letsch A, Nagorsen D, Rammensee HG, Thiel E, Keilholz U. *Identification of an immunogenic HLA-A*01-binding T cell epitope of WT1 using ex vivo T cell screening and proteosomal digestion.* 2004 Submitted for publication

Tenzer S, Peters B, Bulik S, Rammensee HG, Holzhütter HG, Schild H. *The full picture - modeling the MHC class-I pathway by combining predictions of proteasomal cleavage, TAP-transport and MHC binding* 2004 Manuscript in preparation

Übersichtsartikel:

Nussbaum AK, Kuttler C, **Tenzer S**, Schild H. *Using the World Wide Web for predicting CTL epitopes.* Curr Opin Immunol. 2003 Feb;15(1):69-74.

Buchartikel:

Tenzer S and Schild H. *Assays of proteasome-dependent cleavage products* Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2004 accepted for publication

VII. Abkürzungsverzeichnis

Neben den SI-Einheiten, Präfixen für Größenordnungen und den "Single Letter Code" und dem „Three Letter Code" für Aminosäuren werden in dieser Arbeit die folgenden Abkürzungen verwendet:

AA	Amino Acid, Aminosäure(n), Aminosäurereste
AAA	ATPases associated with different cellular activities
ABC	ATP-binding Cassette
AcN	Acetonitril
AMC	7-Aminomethylcoumarin
Amp	Ampicillin
APC	Antigen Presenting Cell, Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosin Triphosphat
AUC	Area under the ROC curve
β 2m	β 2-Mikroglobulin
BGH	Bovine Growth Hormone, Bovines Wachstumshormon
BH	Bleomycin Hydrolase
BSA	Rinderserumalbumin
C-	Carboxy-
CD	Cluster of Differentiation
ROC	Receiver Operator Characteristic
CP	Core Particle
CDR	Complementarity Determining Region
CFTR	Cystic Fibrosis Conductance Regulator
CMK	Chloromethylketon
CMV	Cytomegalovirus
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
D	Diversity
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl-
DHAP	2,5-Dihydroxy-Acetophenon
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonucleic Acid
DRiPs	Defective Ribosomal Products
DTT	Dithiothreitol
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescence Protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER associated Degradation
ERAP1	ER aminopeptidase 1
ERAAP	ER aminopeptidase associated with antigen processing
FACS	Fluorescence Activated Cell Scanning/Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FN	False Negative(s)
FP	False Positive(s)
FRT	Flip Recombinase Target

FSC	Forward Scatter
FWHM	Full Width at Half Maximum
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
HABA	2'-(4-Hydroxyphenyl)-azo-benzoesäure
HBV	Hepatitis-B Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish-Peroxidase
Hyg	Hygromycin
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
IRES	Internal Ribosome Entry Site
J	Joining
Kan	Kanamycin
LAP	Leucin Aminopeptidase
LB	Lyria Broth
LC	Lactacystin
LCMV	Cytomegalovirus
LMP	Low Molecular Weight Protein
mAb	monoclonal Antibody, monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation
MCS	Multiple Cloning Site
MCMV	Murines Cytomegalovirus
MDR	Multidrug Resistance-P-Glycoprotein
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	messenger-RNA, Boten-RNA
MS	Massenspektrometer, Massenspektrometrie
N-	Amino
Neo	Neomycin
NK	Natural Killer
NMWL	Nominal Molecular Weight Limit
NP	Nukleoprotein
Ntn	N-terminal Nucleophil
ODC	Ornithin- Decarboxylase
Ova	Hühner-Ovalbumin
P1K	Ligand/Epitop mit einem Lysin am C-terminus
pA	Polyadenylierungssignalsequenz
PA28	Proteasom Activator 28 kDa, Synonym: 11S Regulator
PA700	Proteasom Aktivator 700 kDa, Synonym: 19S Cap
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAProC	Prediction Algorithm for Proteasomal Cleavages
PBS	Phosphat-buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion, Polymerase-Kettenreaktion
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PE	Phycoerythrin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PrP	Prion Protein

PSA	Puromycin sensitive Aminopeptidase
PTH	Phenylthioydanthoin
RAP	Reverse Analysis Projekt
RCC	Renal Cell Carcinoma (Nierenzellkarzinom)
RP	Regulatorisches Partikel, Synonym: PA700, 19S Cap
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg (Sedimentationskoeffizient)
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate, Natriumlaurylsulfat
siRNA	small inhibitory RNA
SMM	Stabilized Matrix Method
SSC	Sideward Scatter
suc	Succinyl-
TAP	Transporter Associated with Antigen Presentation
TCR	T-cell Receptor
TFA	Trifluoressigsäure
Tfb	Transfomationsbuffer
TN	True Negative(s)
TNF	Tumor Necrosis Factor
TOF	Time of Flight
TOP	Thimet Oligopeptidase
TP	True Positive(s)
TPPII	Tripeptidyl-Peptidase-II
Ub	Ubiquitin
UV	Ultraviolett
V	Variable
wt	Wildtyp

VIII. Referenzen

Aberle,H., Bauer,A., Stappert,J., Kispert,A., and Kemler,R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.*, **16**, 3797-3804.

Ahn,K., Erlander,M., Leturcq,D., Peterson,P.A., Fruh,K., and Yang,Y. (1996). In vivo characterization of the proteasome regulator PA28. *J. Biol. Chem.*, **271**, 18237-18242.

Altuvia,Y. and Margalit,H. (2000). Sequence signals for generation of antigenic peptides by the proteasome: implications for proteasomal cleavage mechanism. *J. Mol. Biol.*, **295**, 879-890.

Androlewicz,M.J., Anderson,K.S., and Cresswell,P. (1993). Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 9130-9134.

Baruchel,A., Cayuela,J.M., Ballerini,P., Landman-Parker,J., Cezard,V., Firat,H., Haddad,E., Auclerc,M.F., Valensi,F., Cayre,Y.E., Macintyre,E.A., and Sigaux,F. (1997). The majority of myeloid-antigen-positive (My+) childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemias express TEL-AML1 fusion transcripts. *Br. J. Haematol.*, **99**, 101-106.

Bellantuono,I., Gao,L., Parry,S., Marley,S., Dazzi,F., Apperley,J., Goldman,J.M., and Stauss,H.J. (2002). Two distinct HLA-A0201-presented epitopes of the Wilms tumor antigen 1 can function as targets for leukemia-reactive CTL. *Blood*, **100**, 3835-3837.

Belt,P.B., Muileman,I.H., Schreuder,B.E., Bos-de Ruijter,J., Gielkens,A.L., and Smits,M.A. (1995). Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J. Gen. Virol.*, **76** (Pt 3), 509-517.

Ben Shahar,S., Cassouto,B., Novak,L., Porgador,A., and Reiss,Y. (1997). Production of a specific major histocompatibility complex class I-restricted epitope by ubiquitin-dependent degradation of modified ovalbumin in lymphocyte lysate. *J. Biol. Chem.*, **272**, 21060-21066.

Ben Shahar,S., Komlosch,A., Nadav,E., Shaked,I., Ziv,T., Admon,A., DeMartino,G.N., and Reiss,Y. (1999). 26 S proteasome-mediated production of an authentic major histocompatibility class I-restricted epitope from an intact protein substrate. *J. Biol. Chem.*, **274**, 21963-21972.

Beninga,J., Rock,K.L., and Goldberg,A.L. (1998). Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 18734-18742.

Bercovich,B., Stancovski,I., Mayer,A., Blumenfeld,N., Laszlo,A., Schwartz,A.L., and Ciechanover,A. (1997). Ubiquitin-dependent degradation of certain protein substrates in vitro requires the molecular chaperone Hsc70. *J. Biol. Chem.*, **272**, 9002-9010.

Berke,G. (1995). PELs and the perforin and granzyme independent mechanism of CTL-mediated lysis. *Immunol. Rev.*, **146**, 21-31.

Bjorkman,P.J., Saper,M.A., Samraoui,B., Bennett,W.S., Strominger,J.L., and Wiley,D.C. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, **329**, 506-512.

Bocchia,M., Korontsvit,T., Xu,Q., Mackinnon,S., Yang,S.Y., Sette,A., and Scheinberg,D.A. (1996). Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides. *Blood*, **87**, 3587-3592.

Bocchia,M., Wentworth,P.A., Southwood,S., Sidney,J., McGraw,K., Scheinberg,D.A., and Sette,A. (1995). Specific binding of leukemia oncogene fusion protein peptides to HLA class I molecules. *Blood*, **85**, 2680-2684.

Bradley, A. P. The use of the area under the ROC curve in the evaluation of machine learning algorithms. *Pattern Recognition* , 1145. 1997.

- Brannigan, J.A., Dodson, G., Duggleby, H.J., Moody, P.C., Smith, J.L., Tomchick, D.R., and Murzin, A.G. (1995). A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature*, **378**, 416-419.
- Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.M., Finley, D., and Schmidt, M. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat. Cell Biol.*, **1**, 221-226.
- Brooks, P., Fuertes, G., Murray, R.Z., Bose, S., Knecht, E., Rechsteiner, M.C., Hendil, K.B., Tanaka, K., Dyson, J., and Rivett, J. (2000). Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem. J.*, **346 Pt 1**, 155-161.
- Brown, D.R., Qin, K., Herms, J.W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P.E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D., and Kretzschmar, H. (1997). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, **390**, 684-687.
- Brusic, V., van Endert, P., Zeleznikow, J., Daniel, S., Hammer, J., and Petrovsky, N. (1999). A neural network model approach to the study of human TAP transporter. *In Silico. Biol.*, **1**, 109-121.
- Buus, S. (1999). Description and prediction of peptide-MHC binding: the 'human MHC project'. *Current Opinion in Immunology*, **11**, 209-213.
- Cardozo, C. and Kohanski, R.A. (1998). Altered properties of the branched chain amino acid-preferring activity contribute to increased cleavages after branched chain residues by the "immunoproteasome". *J. Biol. Chem.*, **273**, 16764-16770.
- Cascio, P., Hilton, C., Kisselev, A.F., Rock, K.L., and Goldberg, A.L. (2001). 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *Embo Journal*, **20**, 2357-2366.
- Caughey, B., Neary, K., Buller, R., Ernst, D., Perry, L.L., Chesebro, B., and Race, R.E. (1990). Normal and scrapie-associated forms of prion protein differ in their sensitivities to phospholipase and proteases in intact neuroblastoma cells. *J. Virol.*, **64**, 1093-1101.
- Caughey, B.W., Dong, A., Bhat, K.S., Ernst, D., Hayes, S.F., and Caughey, W.S. (1991). Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry*, **30**, 7672-7680.
- Cayuela, J.M., Baruchel, A., Orange, C., Madani, A., Auclerc, M.F., Daniel, M.T., Schaison, G., and Sigaux, F. (1996). TEL-AML1 fusion RNA as a new target to detect minimal residual disease in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **88**, 302-308.
- Chen, P. and Hochstrasser, M. (1996). Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell*, **86**, 961-972.
- Choppin, J., Cohen, W., Bianco, A., Briand, J.P., Connan, F., Dalod, M., and Guillet, J.G. (2001). Characteristics of HIV-1 Nef regions containing multiple CD8+ T cell epitopes: wealth of HLA-binding motifs and sensitivity to proteasome degradation. *J. Immunol.*, **166**, 6164-6169.
- Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.*, **17**, 7151-7160.
- Clouscard, C., Beaudry, P., Elsen, J.M., Milan, D., Dussaucy, M., Bounneau, C., Schelcher, F., Chatelain, J., Launay, J.M., and Laplanche, J.L. (1995). Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. *J. Gen. Virol.*, **76 (Pt 8)**, 2097-2101.
- Coux, O., Tanaka, K., and Goldberg, A.L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 801-847.
- Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T., and Diedrich, G. (1999). The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol. Rev.*, **172**, 21-28.

- Daniel,S., Brusic,V., Caillat-Zucman,S., Petrovsky,N., Harrison,L., Riganelli,D., Sinigaglia,F., Gallazzi,F., Hammer,J., and van Endert,P.M. (1998). Relationship between peptide selectivities of human transporters associated with antigen processing and HLA class I molecules. *J. Immunol.*, **161**, 617-624.
- Deveraux,Q., Jensen,C., and Rechsteiner,M. (1995). Molecular cloning and expression of a 26 S protease subunit enriched in dileucine repeats. *J. Biol. Chem.*, **270**, 23726-23729.
- Deveraux,Q., Ustrell,V., Pickart,C., and Rechsteiner,M. (1994). A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J. Biol. Chem.*, **269**, 7059-7061.
- Dick,T.P., Ruppert,T., Groettrup,M., Kloetzel,P.M., Kuehn,L., Koszinowski,U.H., Stevanovic,S., Schild,H., and Rammensee,H.G. (1996). Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell*, **86**, 253-262.
- Dubiel,W., Pratt,G., Ferrell,K., and Rechsteiner,M. (1992). Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *J. Biol. Chem.*, **267**, 22369-22377.
- Durner,J. and Boger,P. (1995). Ubiquitin in the prokaryote *Anabaena variabilis*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 3720-3725.
- Eleuteri,A.M., Kohanski,R.A., Cardozo,C., and Orlowski,M. (1997). Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). Replacement of X, Y, and Z subunits by LMP7, LMP2, and MECL1 and changes in properties and specificity. *J. Biol. Chem.*, **272**, 11824-11831.
- Elliott,T., Willis,A., Cerundolo,V., and Townsend,A. (1995). Processing of major histocompatibility class I-restricted antigens in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.*, **181**, 1481-1491.
- Emmerich,N.P.N., Nussbaum,A.K., Stevanovic,S., Priemer,M., Toes,R.E.M., Rammensee,H.G., and Schild,H. (2000). The human 26 S and 20 S proteasomes generate overlapping but different sets of peptide fragments from a model protein substrate. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 21140-21148.
- Enenkel,C., Lehmann,A., and Kloetzel,P.M. (1999). GFP-labelling of 26S proteasomes in living yeast: insight into proteasomal functions at the nuclear envelope/rough ER. *Mol. Biol. Rep.*, **26**, 131-135.
- Falk,K., Rotzschke,O., Stevanovic,S., Jung,G., and Rammensee,H.G. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, **351**, 290-296.
- Fenton,W.A. and Horwich,A.L. (1997). GroEL-mediated protein folding. *Protein Sci.*, **6**, 743-760.
- Forster,A., Whitby,F.G., and Hill,C.P. (2003). The pore of activated 20S proteasomes has an ordered 7-fold symmetric conformation. *EMBO J.*, **22**, 4356-4364.
- Fremont,D.H., Stura,E.A., Matsumura,M., Peterson,P.A., and Wilson,I.A. (1995). Crystal structure of an H-2Kb-ovalbumin peptide complex reveals the interplay of primary and secondary anchor positions in the major histocompatibility complex binding groove. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**, 2479-2483.
- Fujimuro,M., Tanaka,K., Yokosawa,H., and Toh-e A (1998). Son1p is a component of the 26S proteasome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **423**, 149-154.
- Gaczynska,M., Rock,K.L., and Goldberg,A.L. (1993). Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature*, **365**, 264-267.
- Garboczi,D.N., Ghosh,P., Utz,U., Fan,Q.R., Biddison,W.E., and Wiley,D.C. (1996). Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature*, **384**, 134-141.
- Garcia,K.C., Degano,M., Stanfield,R.L., Brunmark,A., Jackson,M.R., Peterson,P.A., Teyton,L., and Wilson,I.A. (1996). An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science*, **274**, 209-219.
- Geier,E., Pfeifer,G., Wilm,M., Lucchiari-Hartz,M., Baumeister,W., Eichmann,K., and Niedermann,G. (1999). A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science*, **283**, 978-981.

- Glas,R., Bogoy,M., McMaster,J.S., Gaczynska,M., and Ploegh,H.L. (1998). A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function. *Nature*, **392**, 618-622.
- Glickman,M.H., Rubin,D.M., Coux,O., Wefes,I., Pfeifer,G., Cjeka,Z., Baumeister,W., Fried,V.A., and Finley,D. (1998a). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*, **94**, 615-623.
- Glickman,M.H., Rubin,D.M., Fried,V.A., and Finley,D. (1998b). The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 3149-3162.
- Goldberg,A.L., Cascio,P., Saric,T., and Rock,K.L. (2002). The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol. Immunol.* 2002. Oct. ;39. (3-4):147. -64., **39**, 147-164.
- Goldmann,W., Hunter,N., Foster,J.D., Salbaum,J.M., Beyreuther,K., and Hope,J. (1990). Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **87**, 2476-2480.
- Gorer, P. A. The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. *J.Pathol.Bacteriol.* 44, 691-697. 1937.
Ref Type: Generic
- Graff,R.J., Polinsky,S.L., and Snell,G.D. (1971). Histocompatibility genes of mice. *Transplantation*, **11**, 56-62.
- Griffin,T.A., Nandi,D., Cruz,M., Fehling,H.J., Kaer,L.V., Monaco,J.J., and Colbert,R.A. (1998). Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J. Exp. Med.*, **187**, 97-104.
- Groettrup,M., Ruppert,T., Kuehn,L., Seeger,M., Standera,S., Koszinowski,U., and Kloetzel,P.M. (1995). The interferon-gamma-inducible 11 S regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 subunits govern the peptide production by the 20 S proteasome in vitro. *J. Biol. Chem.*, **270**, 23808-23815.
- Groll,M., Bajorek,M., Kohler,A., Moroder,L., Rubin,D.M., Huber,R., Glickman,M.H., and Finley,D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 1062-1067.
- Groll,M., Ditzel,L., Lowe,J., Stock,D., Bochtler,M., Bartunik,H.D., and Huber,R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, **386**, 463-471.
- Gromme,M. and Neefjes,J. (2002). Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol. Immunol.*, **39**, 181-202.
- Gubler,B., Daniel,S., Armandola,E.A., Hammer,J., Caillat-Zucman,S., and van Endert,P.M. (1998). Substrate selection by transporters associated with antigen processing occurs during peptide binding to TAP. *Molecular Immunology*, **35**, 427-433.
- Harris,J.R. (1969). The isolation and purification of a macromolecular protein component from the human erythrocyte ghost. *Biochim. Biophys. Acta*, **188**, 31-42.
- Heath,W.R. and Carbone,F.R. (2001). Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, **19**, 47-64.
- Heemels,M.T. and Ploegh,H.L. (1994). Substrate specificity of allelic variants of the TAP peptide transporter. *Immunity*, **1**, 775-784.
- Holzhtuter,H.G., Frommel,C., and Kloetzel,P.M. (1999). A theoretical approach towards the identification of cleavage-determining amino acid motifs of the 20 S proteasome. *J. Mol Biol.*, **286**, 1251-1265.
- Holzhtuter,H.G. and Kloetzel,P.M. (2000). A kinetic model of vertebrate 20S proteasome accounting for the generation of major proteolytic fragments from oligomeric peptide substrates. *Biophys. J.*, **79**, 1196-1205.
- Hornemann,S., Korth,C., Oesch,B., Riek,R., Wider,G., Wuthrich,K., and Glockshuber,R. (1997). Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization. *FEBS Lett.*, **413**, 277-281.

- Hu,Z., Zhang,Z., Doo,E., Coux,O., Goldberg,A.L., and Liang,T.J. (1999). Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. *J. Virol.*, **73**, 7231-7240.
- Jariel-Encontre,I., Salvat,C., Steff,A.M., Pariat,M., Acquaviva,C., Furstoss,O., and Piechaczyk,M. (1997). Complex mechanisms for c-fos and c-jun degradation. *Mol. Biol. Rep.*, **24**, 51-56.
- Johnson,P.R., Swanson,R., Rakhilina,L., and Hochstrasser,M. (1998). Degradation signal masking by heterodimerization of MATalpha2 and MATa1 blocks their mutual destruction by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell*, **94**, 217-227.
- Jonuleit,H. and Schmitt,E. (2003). The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J. Immunol.*, **171**, 6323-6327.
- Kesmir,C., Nussbaum,A.K., Schild,H., Detours,V., and Brunak,S. (2002). Prediction of proteasome cleavage motifs by neural networks. *Protein Eng 2002. Apr;15. (4):287. -96.*, **15**, 287-296.
- Kessler,J.H., Beekman,N.J., Bres-Vloemans,S.A., Verdijk,P., van Veelen,P.A., Kloosterman-Joosten,A.M., Vissers,D.C., ten Bosch,G.J., Kester,M.G., Sijts,A., Wouter,D.J., Ossendorp,F., Offringa,R., and Melief,C.J. (2001). Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. *J. Exp. Med.* **2001. Jan. 1;193. (1):73. -88.**, **193**, 73-88.
- King,R.W., Deshaies,R.J., Peters,J.M., and Kirschner,M.W. (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science*, **274**, 1652-1659.
- Kisselev,A.F., Akopian,T.N., Woo,K.M., and Goldberg,A.L. (1999). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J. Biol. Chem.*, **274**, 3363-3371.
- Kloetzel,P.M. (2001). Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001. Mar. ;2(3):179. -87.**, **2**, 179-187.
- Knowlton,J.R., Johnston,S.C., Whitby,F.G., Realini,C., Zhang,Z., Rechsteiner,M., and Hill,C.P. (1997). Structure of the proteasome activator REGalpha (PA28alpha). *Nature*, **390**, 639-643.
- Kretschmar,H.A., Tings,T., Madlung,A., Giese,A., and Herms,J. (2000). Function of PrP(C) as a copper-binding protein at the synapse. *Arch. Virol. Suppl*, 239-249.
- Kuttler,C., Nussbaum,A.K., Dick,T.P., Rammensee,H.G., Schild,H., and Haderl,K.P. (2000). An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages. *J. Mol. Biol.*, **298**, 417-429.
- Lauvau,G., Kakimi,K., Niedermann,G., Ostankovitch,M., Yotnda,P., Firat,H., Chisari,F.V., and van Endert,P.M. (1999). Human transporters associated with antigen processing (TAPs) select epitope precursor peptides for processing in the endoplasmic reticulum and presentation to T cells. *Journal of Experimental Medicine*, **190**, 1227-1239.
- Lemmel,C. and Stevanovic,S. (2003). The use of HPLC-MS in T-cell epitope identification. *Methods*, **29**, 248-259.
- Levy,F., Burri,L., Morel,S., Peitrequin,A.L., Levy,N., Bachi,A., Hellman,U., Van den Eynde,B.J., and Servis,C. (2002). The final N-terminal trimming of a subaminoterminal proline-containing HLA class I-restricted antigenic peptide in the cytosol is mediated by two peptidases. *J. Immunol.*, **169**, 4161-4171.
- Lewicki,H., Tishon,A., Homann,D., Mazarguil,H., Laval,F., Asensio,V.C., Campbell,I.L., DeArmond,S., Coon,B., Teng,C., Gairin,J.E., and Oldstone,M.B. (2003). T cells infiltrate the brain in murine and human transmissible spongiform encephalopathies. *J. Virol.*, **77**, 3799-3808.
- Linsley,P.S., Brady,W., Grosmaire,L., Aruffo,A., Damle,N.K., and Ledbetter,J.A. (1991). Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.*, **173**, 721-730.

- Linsley,P.S. and Ledbetter,J.A. (1993). The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu. Rev. Immunol.*, **11**, 191-212.
- Liu,C.W., Corboy,M.J., DeMartino,G.N., and Thomas,P.J. (2003). Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science*, **299**, 408-411.
- Lobigs,M., Chelvanayagam,G., and Mullbacher,A. (2000). Proteolytic processing of peptides in the lumen of the endoplasmic reticulum for antigen presentation by major histocompatibility class I. *Eur. J. Immunol.*, **30**, 1496-1506.
- Lowe,J., Stock,D., Jap,B., Zwickl,P., Baumeister,W., and Huber,R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*, **268**, 533-539.
- Lucchiari-Hartz,M., Lindo,V., Hitziger,N., Gaedicke,S., Saveanu,L., van Endert,P.M., Greer,F., Eichmann,K., and Niedermann,G. (2003). Differential proteasomal processing of hydrophobic and hydrophilic protein regions: Contribution to cytotoxic T lymphocyte epitope clustering in HIV-1-Nef. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 7755-7760.
- Lupas,A., Zuhl,F., Tamura,T., Wolf,S., Nagy,I., De Mot,R., and Baumeister,W. (1997). Eubacterial proteasomes. *Mol. Biol. Rep.*, **24**, 125-131.
- Ma,C.P., Willy,P.J., Slaughter,C.A., and DeMartino,G.N. (1993). PA28, an activator of the 20 S proteasome, is inactivated by proteolytic modification at its carboxyl terminus. *J. Biol. Chem.*, **268**, 22514-22519.
- Ma,J. and Lindquist,S. (1999). De novo generation of a PrP^{Sc}-like conformation in living cells. *Nat. Cell Biol.*, **1**, 358-361.
- Ma,J. and Lindquist,S. (2001). Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 14955-14960.
- Ma,J. and Lindquist,S. (2002a). Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP^{Sc}-like conformation in the cytosol. *Science*, **298**, 1785-1788.
- Ma,J., Wollmann,R., and Lindquist,S. (2002b). Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science*, **298**, 1781-1785.
- Mailander,V., Scheibenbogen,C., Thiel,E., Letsch,A., Blau,I.W., and Keilholz,U. (2004). Complete remission in a patient with recurrent acute myeloid leukemia induced by vaccination with WT1 peptide in the absence of hematological or renal toxicity. *Leukemia*, **18**, 165-166.
- Minami,Y., Kono,T., Miyazaki,T., and Taniguchi,T. (1993). The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu. Rev. Immunol.*, **11**, 245-268.
- Mo,X.Y., Cascio,P., Lemerise,K., Goldberg,A.L., and Rock,K. (1999). Distinct proteolytic processes generate the C and N termini of MHC class I-binding peptides. *Journal of Immunology*, **163**, 5851-5859.
- Moore,M.W., Carbone,F.R., and Bevan,M.J. (1988). Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell*, **54**, 777-785.
- Morel,S., Levy,F., Burlet-Schiltz,O., Brasseur,F., Probst-Kepper,M., Peitrequin,A.L., Monsarrat,B., Van Velthoven,R., Cerottini,J.C., Boon,T., Gairin,J.E., and Van den Eynde,B.J. (2000). Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity*, **12**, 107-117.
- Mouillet-Richard,S., Ermonval,M., Chebassier,C., Laplanche,J.L., Lehmann,S., Launay,J.M., and Kellermann,O. (2000). Signal transduction through prion protein. *Science* 2000. Sep. 15. ;289. (5486.):1925. -8., **289**, 1925-1928.
- Murakami,Y., Matsufuji,S., Kameji,T., Hayashi,S., Igarashi,K., Tamura,T., Tanaka,K., and Ichihara,A. (1992). Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature*, **360**, 597-599.

- Neefjes,J., Gottfried,E., Roelse,J., Gromme,M., Obst,R., Hammerling,G.J., and Momburg,F. (1995). Analysis of the fine specificity of rat, mouse and human TAP peptide transporters. *Eur. J. Immunol.*, **25**, 1133-1136.
- Neefjes,J.J., Momburg,F., and Hammerling,G.J. (1993). Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science*, **261**, 769-771.
- Neumann,E., Engelsberg,A., Decker,J., Storkel,S., Jaeger,E., Huber,C., and Seliger,B. (1998). Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies? *Cancer Res.*, **58**, 4090-4095.
- Niedermann,G., Grimm,R., Geier,E., Maurer,M., Realini,C., Gartmann,C., Soll,J., Omura,S., Rechsteiner,M.C., Baumeister,W., and Eichmann,K. (1997). Potential immunocompetence of proteolytic fragments produced by proteasomes before evolution of the vertebrate immune system. *Journal of Experimental Medicine*, **186**, 209-220.
- Nussbaum,A.K., Dick,T.P., Keilholz,W., Schirle,M., Stevanovic,S., Dietz,K., Heinemeyer,W., Groll,M., Wolf,D.H., Huber,R., Rammensee,H.G., and Schild,H. (1998). Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **95**, 12504-12509.
- Nussbaum,A.K., Kuttler,C., Hadeler,K.P., Rammensee,H.G., and Schild,H. (2001). PAMProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW. *Immunogenetics*, **53**, 87-94.
- Oka,Y., Elisseeva,O.A., Tsuboi,A., Ogawa,H., Tamaki,H., Li,H., Oji,Y., Kim,E.H., Soma,T., Asada,M., Ueda,K., Maruya,E., Saji,H., Kishimoto,T., Udaka,K., and Sugiyama,H. (2000). Human cytotoxic T-lymphocyte responses specific for peptides of the wild-type Wilms' tumor gene (WT1) product. *Immunogenetics*, **51**, 99-107.
- Old,L.J., Boyse,E.A., and Stockert,E. (1965). The G (Gross) leukemia antigen. *Cancer Res.*, **25**, 813-819.
- Ott,D.E., Chertova,E.N., Busch,L.K., Coren,L.V., Gagliardi,T.D., and Johnson,D.G. (1999). Mutational analysis of the hydrophobic tail of the human immunodeficiency virus type 1 p6(Gag) protein produces a mutant that fails to package its envelope protein. *J. Virol.*, **73**, 19-28.
- Parchi,P., Zou,W., Wang,W., Brown,P., Capellari,S., Ghetti,B., Kopp,N., Schulz-Schaeffer,W.J., Kretschmar,H.A., Head,M.W., Ironside,J.W., Gambetti,P., and Chen,S.G. (2000). Genetic influence on the structural variations of the abnormal prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2000. Aug. 29. ;97. (18.):10168. -72., **97**, 10168-10172.
- Paz,P., Brouwenstijn,N., Perry,R., and Shastri,N. (1999). Discrete proteolytic intermediates in the MHC class I antigen processing pathway and MHC I-dependent peptide trimming in the ER. *Immunity.*, **11**, 241-251.
- Pellat-Deceunynck,C., Mellerin,M.P., Labarriere,N., Jego,G., Moreau-Aubry,A., Harousseau,J.L., Jotereau,F., and Bataille,R. (2000). The cancer germ-line genes MAGE-1, MAGE-3 and PRAME are commonly expressed by human myeloma cells. *Eur. J. Immunol.*, **30**, 803-809.
- Peters,B., Bulik,S., Tampe,R., van Endert,P.M., and Holzhtutter,H.G. (2003a). Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors. *Journal of Immunology*, **171**, 1741-1749.
- Peters,B., Tong,W.W., Sidney,J., Sette,A., and Weng,Z.P. (2003b). Examining the independent binding assumption for binding of peptide epitopes to MHC-I molecules. *Bioinformatics*, **19**, 1765-1772.
- Plempner,R.K. and Wolf,D.H. (1999). Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences*, **24**, 266-270.
- Podack,E.R., Hengartner,H., and Lichtenheld,M.G. (1991). A central role of perforin in cytolysis? *Annu. Rev. Immunol.*, **9**, 129-157.
- Porgador,A., Yewdell,J.W., Deng,Y., Bennink,J.R., and Germain,R.N. (1997). Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity.*, **6**, 715-726.

- Preckel,T., Fung-Leung,W.P., Cai,Z., Vitiello,A., Salter-Cid,L., Winqvist,O., Wolfe,T.G., Von Herrath,M., Angulo,A., Ghazal,P., Lee,J.D., Fourie,A.M., Wu,Y., Pang,J., Ngo,K., Peterson,P.A., Fruh,K., and Yang,Y. (1999). Impaired immunoproteasome assembly and immune responses in PA28^{-/-} mice. *Science*, **286**, 2162-2165.
- Princiotta,M.F., Schubert,U., Chen,W., Bennink,J.R., Myung,J., Crews,C.M., and Yewdell,J.W. (2001). Cells adapted to the proteasome inhibitor 4-hydroxy- 5-iodo-3-nitrophenylacetyl-Leu-Leu-leucinal-vinyl sulfone require enzymatically active proteasomes for continued survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **98**, 513-518.
- Prusiner,S.B., Scott,M.R., DeArmond,S.J., and Cohen,F.E. (1998). Prion protein biology. *Cell*, **93**, 337-348.
- Rammensee,H.G., Bachmann,J., Emmerich,N.P.N., Bachor,O.A., and Stevanovic,S. (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*, **50**, 213-219.
- Rammensee,H.G., Falk,K., and Rotzschke,O. (1993). MHC molecules as peptide receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, **5**, 35-44.
- Rammensee,H.G., Friede,T., and Stevanovic,S. (1995). MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*, **41**, 178-228.
- Raynaud,S.D., Baens,M., Grosgeorge,J., Rodgers,K., Reid,C.D., Dainton,M., Dyer,M., Fuzibet,J.G., Gratecos,N., Taillan,B., Ayraud,N., and Marynen,P. (1996). Fluorescence in situ hybridization analysis of t(3; 12)(q26; p13): a recurring chromosomal abnormality involving the TEL gene (ETV6) in myelodysplastic syndromes. *Blood*, **88**, 682-689.
- Realini,C., Dubiel,W., Pratt,G., Ferrell,K., and Rechsteiner,M. (1994). Molecular cloning and expression of a gamma-interferon-inducible activator of the multicatalytic protease. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20727-20732.
- Reits,E., Griekspoor,A., Neijssen,J., Groothuis,T., Jalink,K., van Veelen,P., Janssen,H., Calafat,J., Drijfhout,J.W., and Neefjes,J. (2003). Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity*, **18**, 97-108.
- Rezaei,H., Choiset,Y., Eghiaian,F., Treguer,E., Mentre,P., Debey,P., Grosclaude,J., and Haertle,T. (2002). Amyloidogenic unfolding intermediates differentiate sheep prion protein variants. *J. Mol. Biol.*, **322**, 799-814.
- Rivett,A.J. (1998). Intracellular distribution of proteasomes. *Curr. Opin. Immunol.*, **10**, 110-114.
- Robinson,J., Malik,A., Parham,P., Bodmer,J.G., and Marsh,S.G. (2000). IMGT/HLA database--a sequence database for the human major histocompatibility complex. *Tissue Antigens*, **55**, 280-287.
- Rock,K.L., Criau,A., Gaczynska,M., Akopian,T., Fenteany,G., Goldberg,A., and Farber,D. (1997). How peptides are generated for MHC class I antigen presentation. *Faseb Journal*, **11**, A860.
- Rock,K.L., York,I.A., Saric,T., and Goldberg,A.L. (2002). Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv. Immunol.* 2002. :80. :1-70., **80**, 1-70.
- Rosenfeld,C., Cheever,M.A., and Gaiger,A. (2003). WT1 in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of WT1 targeted therapies. *Leukemia*, **17**, 1301-1312.
- Rotzschke,O., Falk,K., Deres,K., Schild,H., Norda,M., Metzger,J., Jung,G., and Rammensee,H.G. (1990). Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature*, **348**, 252-254.
- Rubin,D.M., Glickman,M.H., Larsen,C.N., Dhruvakumar,S., and Finley,D. (1998). Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *EMBO J.*, **17**, 4909-4919.
- Russell,S.J., Steger,K.A., and Johnston,S.A. (1999). Subcellular localization, stoichiometry, and protein levels of 26 S proteasome subunits in yeast. *J. Biol. Chem.*, **274**, 21943-21952.
- Salter,R.D., Howell,D.N., and Cresswell,P. (1985). Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics*, **21**, 235-246.

- Santori, F.R., Kieper, W.C., Brown, S.M., Lu, Y., Neubert, T.A., Johnson, K.L., Naylor, S., Vukmanovic, S., Hogquist, K.A., and Jameson, S.C. (2002). Rare, structurally homologous self-peptides promote thymocyte positive selection. *Immunity*, **17**, 131-142.
- Saric, T., Beninga, J., Graef, C.I., Akopian, T.N., Rock, K.L., and Goldberg, A.L. (2001). Major histocompatibility complex class I-presented antigenic peptides are degraded in cytosolic extracts primarily by thimet oligopeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 36474-36481.
- Saric, T., Chang, S.C., Hattori, A., York, I.A., Markant, S., Rock, K.L., Tsujimoto, M., and Goldberg, A.L. (2002). An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nature Immunology*, **3**, 1169-1176.
- Schmidtke, G., Eggers, M., Ruppert, T., Groettrup, M., Koszinowski, U.H., and Kloetzel, P.M. (1998). Inactivation of a defined active site in the mouse 20S proteasome complex enhances major histocompatibility complex class I antigen presentation of a murine cytomegalovirus protein. *Journal of Experimental Medicine*, **187**, 1641-1646.
- Schmidtke, G., Kraft, R., Kostka, S., Henklein, P., Frommel, C., Lowe, J., Huber, R., Kloetzel, P.M., and Schmidt, M. (1996). Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. *EMBO J.*, **15**, 6887-6898.
- Schubert, U., Ott, D.E., Chertova, E.N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M.F., Bennink, J.R., Krausslich, H.G., and Yewdell, J.W. (2000). Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 13057-13062.
- Schumacher, T.N., Kantesaria, D.V., Heemels, M.T., Ashton-Rickardt, P.G., Shepherd, J.C., Fruh, K., Yang, Y., Peterson, P.A., Tonegawa, S., and Ploegh, H.L. (1994). Peptide length and sequence specificity of the mouse TAP1/TAP2 translocator. *J. Exp. Med.*, **179**, 533-540.
- Schwarz, K., Eggers, M., Soza, A., Koszinowski, U.H., Kloetzel, P.M., and Groettrup, M. (2000a). The proteasome regulator PA28alpha/beta can enhance antigen presentation without affecting 20S proteasome subunit composition. *Eur. J. Immunol.*, **30**, 3672-3679.
- Schwarz, K., van den, B.M., Kostka, S., Kraft, R., Soza, A., Schmidtke, G., Kloetzel, P.M., and Groettrup, M. (2000b). Overexpression of the proteasome subunits LMP2, LMP7, and MECL-1, but not PA28 alpha/beta, enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic choriomeningitis virus T cell epitope. *J. Immunol.*, **165**, 768-778.
- Seifert, U., Maranon, C., Shmueli, A., Desoutter, J.F., Wesoloski, L., Janek, K., Henklein, P., Diescher, S., Andrieu, M., de la, S.H., Weinschenk, T., Schild, H., Laderach, D., Galy, A., Haas, G., Kloetzel, P.M., Reiss, Y., and Hosmalin, A. (2003). An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat. Immunol.*, **4**, 375-379.
- Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R., and Shastri, N. (2002). ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 2002. Oct. 3;419. (6906.):480. -3., **419**, 480-483.
- Shurtleff, S.A., Buijs, A., Behm, F.G., Rubnitz, J.E., Raimondi, S.C., Hancock, M.L., Chan, G.C., Pui, C.H., Grosveld, G., and Downing, J.R. (1995). TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia*, **9**, 1985-1989.
- Sijts, A.J., Ruppert, T., Rehmann, B., Schmidt, M., Koszinowski, U., and Kloetzel, P.M. (2000a). Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J. Exp. Med.*, **191**, 503-514.
- Sijts, A.J., Standera, S., Toes, R.E., Ruppert, T., Beekman, N.J., van Veelen, P.A., Ossendorp, F.A., Melief, C.J., and Kloetzel, P.M. (2000b). MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells. *J. Immunol.*, **164**, 4500-4506.
- Snyder, H.L., Yewdell, J.W., and Bennink, J.R. (1994). Trimming of antigenic peptides in an early secretory compartment. *J. Exp. Med.*, **180**, 2389-2394.

- Stefanski,H.E., Mayerova,D., Jameson,S.C., and Hogquist,K.A. (2001). A low affinity TCR ligand restores positive selection of CD8+ T cells in vivo. *J. Immunol.*, **166**, 6602-6607.
- Stern,L.J., Brown,J.H., Jardetzky,T.S., Gorga,J.C., Urban,R.G., Strominger,J.L., and Wiley,D.C. (1994). Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*, **368**, 215-221.
- Stohwasser,R., Salzmann,U., Giesebrecht,J., Kloetzel,P.M., and Holzhutter,H.G. (2000). Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6221-6230.
- Stoltze,L., Rezaei,H., Jung,G., Grosclaude,J., Debey,P., Schild,H., and Rammensee,H.G. (2003). CD4(+) T cell-mediated immunity against prion proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **60**, 629-638.
- Stoltze,L., Schirle,M., Schwarz,G., Schroter,C., Thompson,M.W., Hersh,L.B., Kalbacher,H., Stevanovic,S., Rammensee,H.G., and Schild,H. (2000). Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat. Immunol.* 2000. Nov. ;1(5):413. -8., **1**, 413-418.
- Tanahashi,N., Murakami,Y., Minami,Y., Shimbara,N., Hendil,K.B., and Tanaka,K. (2000). Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.*, **275**, 14336-14345.
- Tanaka,K., Yoshimura,T., Kumatori,A., Ichihara,A., Ikai,A., Nishigai,M., Kameyama,K., and Takagi,T. (1988). Proteasomes (multi-protease complexes) as 20 S ring-shaped particles in a variety of eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.*, **263**, 16209-16217.
- Taraboulos,A., Raeber,A.J., Borchelt,D.R., Serban,D., and Prusiner,S.B. (1992). Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol. Biol. Cell*, **3**, 851-863.
- Taxis,C., Hitt,R., Park,S.H., Deak,P.M., Kostova,Z., and Wolf,D.H. (2003). Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 35903-35913.
- Toes,R.E.M., Nussbaum,A.K., Degermann,S., Schirle,M., Emmerich,N.P.N., Kraft,M., Laplace,C., Zwinderman,A., Dick,T.P., Muller,J., Schonfisch,B., Schmid,C., Fehling,H.J., Stevanovic,S., Rammensee,H.G., and Schild,H. (2001). Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *Journal of Experimental Medicine*, **194**, 1-12.
- Tomkinson,B., Wernstedt,C., Hellman,U., and Zetterqvist,O. (1987). Active site of tripeptidyl peptidase II from human erythrocytes is of the subtilisin type. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **84**, 7508-7512.
- Townsend,A.R., Rothbard,J., Gotch,F.M., Bahadur,G., Wraith,D., and McMichael,A.J. (1986). The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell*, **44**, 959-968.
- Turzynski,A. and Mentlein,R. (1990). Prolyl aminopeptidase from rat brain and kidney. Action on peptides and identification as leucyl aminopeptidase. *Eur. J. Biochem.*, **190**, 509-515.
- Uebel,S., Kraas,W., Kienle,S., Wiesmuller,K.H., Jung,G., and Tampe,R. (1997). Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **94**, 8976-8981.
- Uebel,S., Meyer,T.H., Kraas,W., Kienle,S., Jung,G., Wiesmuller,K.H., and Tampe,R. (1995). Requirements for peptide binding to the human transporter associated with antigen processing revealed by peptide scans and complex peptide libraries. *J. Biol. Chem.*, **270**, 18512-18516.
- Uebel,S. and Tampe,R. (1999). Specificity of the proteasome and the TAP transporter. *Curr. Opin. Immunol.*, **11**, 203-208.
- van Baren,N., Chambost,H., Ferrant,A., Michaux,L., Ikeda,H., Millard,I., Olive,D., Boon,T., and Coulie,P.G. (1998). PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukaemia cells. *Br. J. Haematol.*, **102**, 1376-1379.

- van Endert,P.M., Riganelli,D., Greco,G., Fleischhauer,K., Sidney,J., Sette,A., and Bach,J.F. (1995). The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. *J. Exp. Med.*, **182**, 1883-1895.
- van Endert,P.M., Tampe,R., Meyer,T.H., Tisch,R., Bach,J.F., and McDevitt,H.O. (1994). A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity.*, **1**, 491-500.
- van Hall,T., Sijts,A., Camps,M., Offringa,R., Melief,C., Kloetzel,P.M., and Ossendorp,F. (2000). Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. *J. Exp. Med.*, **192**, 483-494.
- Varshavsky,A. (1997). The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells*, **2**, 13-28.
- Vijay-Kumar,S., Bugg,C.E., Wilkinson,K.D., Vierstra,R.D., Hatfield,P.M., and Cook,W.J. (1987). Comparison of the three-dimensional structures of human, yeast, and oat ubiquitin. *J. Biol. Chem.*, **262**, 6396-6399.
- Wang,E.W., Kessler,B.M., Borodovsky,A., Cravatt,B.F., Bogoy,M., Ploegh,H.L., and Glas,R. (2000). Integration of the ubiquitin-proteasome pathway with a cytosolic oligopeptidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 9990-9995.
- Weissmann,C. (1999). Molecular genetics of transmissible spongiform encephalopathies. *J. Biol. Chem.*, **274**, 3-6.
- Whitby,F.G., Masters,E.I., Kramer,L., Knowlton,J.R., Yao,Y., Wang,C.C., and Hill,C.P. (2000). Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature*, **408**, 115-120.
- Wolf,S., Lottspeich,F., and Baumeister,W. (1993). Ubiquitin found in the archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS Lett.*, **326**, 42-44.
- Yang,Y., Fruh,K., Ahn,K., and Peterson,P.A. (1995). In vivo assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. *J. Biol. Chem.*, **270**, 27687-27694.
- Yedidia,Y., Horonchik,L., Tzaban,S., Yanai,A., and Taraboulos,A. (2001). Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. *EMBO J.*, **20**, 5383-5391.
- Yewdell,J.W. and Bennink,J.R. (2001). Cut and trim: generating MHC class I peptide ligands. *Current Opinion in Immunology*, **13**, 13-18.
- York,I.A., Chang,S.C., Saric,T., Keys,J.A., Favreau,J.M., Goldberg,A.L., and Rock,K.L. (2002). The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nature Immunology*, **3**, 1177-1184.
- York,I.A., Mo,A.X.Y., Lemerise,K., Zeng,W.Y., Shen,Y.L., Abraham,C.R., Saric,T., Goldberg,A.L., and Rock,K.L. (2003). The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity*, **18**, 429-440.
- Yotnda,P., Firat,H., Garcia-Pons,F., Garcia,Z., Gourru,G., Vernant,J.P., Lemonnier,F.A., Leblond,V., and Langlade-Demoyen,P. (1998a). Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Invest.*, **101**, 2290-2296.
- Yotnda,P., Garcia,F., Peuchmaur,M., Grandchamp,B., Duval,M., Lemonnier,F., Vilmer,E., and Langlade-Demoyen,P. (1998b). Cytotoxic T cell response against the chimeric ETV6-AML1 protein in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Invest.*, **102**, 455-462.
- Zinkernagel,R.M. and Doherty,P.C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, **248**, 701-702.

IX. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich in den letzten Jahren in vielseitiger Weise unterstützt und gefördert haben. Vor allem die außergewöhnlich gute Atmosphäre im Labor hat sehr viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen – vielen Dank an alle Mitglieder der AG Rammensee!

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee, für die Möglichkeit, in seiner Abteilung arbeiten zu dürfen, die vielen konstruktiven und stets scharfsinnigen Anregungen und Fragen, und sein unermüdliches Interesse an Proteasomen und Vorhersagen.

Prof. Dr. Hansjörg Schild, für das interessante Thema und Betreuung dieser Arbeit, die Hilfe beim Schreiben von Papern und die wissenschaftlichen Freiräume.

Beate Pömmerl, dafür, dass sie mein Chaos ertragen hat und stets bei allen molekularbiologischen Fragen hilfreich zur Seite stand – und natürlich für den besten Rhabarber-Bananenkuchen der Welt sowie das erfolgreiche Coaching der Running Elks

PD Dr. Stefan Stefanović, für viele interessante Diskussionen über Peptide, Proteasomen und die Einführung in die Welt der Peptidanalytik – von Massenspektroskopie bis Edman-Sequenzierung

Margret Müller, für die Hilfe bei der Analyse und Auswertung von Peptidverdaus – sowie viele (und leider immer zu wenige) Stunden im Schnee

Lynne Yakes, für die Unterstützung bei allem Papierkram und dem täglichen Kampf mit der Verwaltung

Claudia Falkenburger und Franziska Löwenstein, für die stetige Hilfe und wertvolle Arbeit im Hintergrund

Patricia Hristić, für die schnelle Bereitstellung von Peptiden

Dr. Norbert Hilf, für die Verwaltung der Schokobar und viel Spaß bei allen wichtigen „Besprechungen“

Christine Rentzsch, für viele schöne Stunden auf dem Tanzparkett und auf 8 Rollen – wohl mit die wichtigste Entspannung vom täglichen Laborstress.

Dr. Lars Stoltze, für die Zusammenarbeit auf dem Prion-Gebiet und viele interessante Fragen und Diskussionen

Dr. Harpreet Singh, für Schrabbel-Duelle und die hervorragende Zusammenarbeit – viel Erfolg mit Immatrics!

Dr. Niels Emmerich, für viele interessante Diskussionen über Proteasomen, Labor - und Lebensprobleme, und die unvergesslichen Tage in Livigno und anderswo auf der Piste – ich freu mich auf das nächste Schachspiel bei einem Glas Corvo!

Andreas Diepold und Marc Günder, für wertvolle technische Unterstützung bei Klonierungen und Zellkultur

Mark Schatz, für unendliche Diskussionen über Labor und Leben, Proteinreinigungen und andere Zeitvertreibe und den unendlichen Kampf um den Rechner

Sylvia Herter, für Spieleabende, kein Chaos, Hilfe im Labor, Unterhaltungen, Mäusebeobachtungen, Puffer und Freundschaft

Dr. Markus Radsak, Philipp Osterloh, Tobias Warger, Gerd Rechtsteiner, Julia Hoffmann für viele schöne Abende, Diskussionen und die Hilfe beim Einleben in Mainz

Dr. Björn Peters, für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Erstellung der neuen Vorhersagealgorithmen sowie die schöne Zeit in Berlin

Jochen Probst und Dr. Steve Pascolo, für die Zusammenarbeit bei der Charakterisierung eines RAG-assoziierten Proteinkomplexes

Allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Rammensee, die hier nicht namentlich erwähnt sind, ohne die die einmalige Atmosphäre im Labor aber niemals zustande gekommen wäre - ihr werdet mir alle in guter Erinnerung bleiben!

Außerhalb von Labor und Wissenschaft:

Meinen Eltern für die stetige und liebevolle Unterstützung in allen Höhen und Tiefen meines Lebens – ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Meinen Brüdern Andreas und Christoph für viele schöne gemeinsame Stunden.

X. Verzeichnis der Akademischen Lehrer

Prof. Dr. Bayer, Prof. Dr. Bisswanger, Prof. Dr. Bohley, Prof. Dr. Bock,
Prof. Dr. Breyer-Pfaff, Prof. Dr. Duszenko, Prof. Dr. Eisele,
Prof. Dr. Fröhlich, Prof. Dr. Gauglitz, Prof. Dr. Götz, Prof. Dr. Günzl, Prof. Dr. Hagenmaier,
Prof. Dr. Hamprecht, Prof. Dr. Dr. hc. Hanack, Prof. Dr. Hoffmann, Prof. Dr. Jung,
PD Dr. Kalbacher, Prof. Dr. Lindner, Prof. Dr. Maier, Prof. Dr. Mecke, Prof. Dr. Nakel,
Prof. Dr. Oerrath, Prof. Dr. Oberhammer, Prof. Dr. Oelkrug, Prof. Dr. Pfeiffer,
Prof. Dr. Pommer, Prof. Dr. Probst, Prof. Dr. Rammensee, Prof. Dr. Reutter,
Prof. Dr. Schild, Prof. Schwartz, Ph.D., PD Dr. Stevanović, PD Dr. Stoeva,
Prof. Dr. Dr. h.c. Strähle, Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Voelter, Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wegmann,
Prof. Dr. Weber, Prof. Dr. Weser

XI. Lebenslauf

Name, Vorname: Tenzer, Stefan
Straße: Adelongstr. 11
PLZ, Wohnort: 55131 Mainz
email: stefan.tenzer@web.de
Geburtsdatum: 08.01.1974
Geburtsort: Würzburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

1980 - 1984 Grundschule Würzburg-Lengfeld
1984 - 1993 Riemenschneider-Gymnasium, Würzburg
Abschluß: Abitur, Note: 1,0
1993 - 1994 Zivildienst als Rettungsdiensthelfer (Bayer. Rotes Kreuz)
1994 - 2000 Studium der Biochemie
an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
1995 Vordiplom (Teil 1): Botanik, Zoologie, Anatomie, Physik
1997 Vordiplom (Teil 2): Anorgan. Chemie, Organ. Chemie,
Physikal. Chemie, Physiolog. Chemie
Durchschnittsnote Vordiplom: 1,25
09/1997 - 05/1998 Auslandsstudium an der
University of Massachusetts, Amherst, USA;
Research Assistant im Labor von Prof. L.M. Schwartz, Ph.D.
1999 Diplom-Hauptprüfungen in den Fächern
Biochemie, Organ. Chemie, Immunologie
Durchschnittsnote Hauptdiplomprüfungen: 1,0
11/1999 - 06/2000 Diplomarbeit im Institut für Zellbiologie,
Abteilung Immunologie (Prof. Dr. H.-G. Rammensee)
07/2000 – 09/2000 Visiting Associate bei der Boston Consulting Group, Stuttgart
10/2000 – 06/2004 Promotion im Fach Biochemie im Institut für Zellbiologie,
Abteilung Immunologie (Prof. Dr. H.-G. Rammensee)