

**Expression von humanem Procathepsin D in Insektenzellen  
mit Hilfe des Baculovirussystems  
(Produktion · Reinigung · Charakterisierung)**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich Chemie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von  
**Hans-Wilhelm Grosch**  
aus Schwelm

Marburg/Lahn 1998

Vom Fachbereich Chemie  
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 30.04.1998 angenommen.  
Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Kadenbaach  
Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Hasilik  
Tag der mündlichen Prüfung am 06.05.1998

**0. INHALTSVERZEICHENIS**

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	1
1.1	Die Aspartyl-Proteinase-Familie.....	1
1.2	Cathepsin D.....	3
1.2.1	Vorkommen und biologische Funktion von Cathepsin D.....	3
1.2.2	Biosynthese und lysosomaler Transport von Cathepsin D.....	5
1.3	Asparagin-gebundene Oligosaccharide, ko- und posttranslationale Modifikation..	8
1.4	Das Baculovirus-Expressionssystem.....	12
1.4.1	Die Baculoviren: Struktur und Infektion.....	12
1.4.2	Anwendung und Vorteile des Baculovirus-Expressionssystems.....	15
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	17
<b>2.</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN</b> .....	19
<b>2.1</b>	<b>MATERIALIEN</b> .....	19
2.1.1	Geräte.....	19
2.1.2	Computer, Drucker und Software.....	20
2.1.3	Chemikalien.....	21
2.1.4	DNA.....	23
2.1.5	Enzyme.....	24
2.1.6	Radiochemikalien.....	25
2.1.7	Antikörper.....	25
2.1.8	Biologisches Material und Kulturmedien.....	26
2.1.8.1	Eukaryotische Zellen.....	26
2.1.8.2	Bakterien (Prokaryonten).....	26
2.1.8.3	Medien und Zusätze für die Zellkultur.....	27
2.1.8.4	Medium für die Bakterienkultur.....	28
2.1.9	Sonstige Materialien.....	29
<b>2.2</b>	<b>METHODEN</b> .....	29
<b>2.2.1.</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGIE</b> .....	29
2.2.1.1	Isolierung von analytischen Mengen Plasmid-DNA (Mini-Präparation).....	29
2.2.1.2	Isolierung von präparativen Mengen Plasmid-DNA (Midi-Präparation).....	30
2.2.1.3	Isolierung von AcMNPV-DNA.....	31
2.2.1.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	32

2.2.1.5	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	33
2.2.1.6	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	33
2.2.1.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	34
2.2.1.8	Ligation von Fragmenten mit überstehenden Enden.....	36
2.2.1.9	Präparation kompetenter Bakterien und Transformation.....	36
2.2.1.10	Präparation von Glycerinkulturen zur Langzeitlagerung von Bakterien.....	37
2.2.1.11	Radioaktive Markierung von DNA durch „Random Priming“.....	38
2.2.1.12	Reinigung der radioaktiv markierten DNA über eine NENSORB <sup>®</sup> - Säule.....	39
<b>2.2.2</b>	<b>ZELLKULTUR.....</b>	<b>40</b>
2.2.2.1	Zellzählung.....	40
2.2.2.2	Kultivierung von humanen Promonozyten (U937).....	40
2.2.2.3	Kultivierung von Insektenzellen (Sf21).....	41
2.2.2.3.1	Kultivierung in 75 cm <sup>2</sup> -Flaschen.....	41
2.2.2.3.2	Kultivierung in Rollerflaschen.....	41
2.2.2.3.3	Langzeitlagerung von Sf21-Zellen.....	42
2.2.2.4	Herstellung des rekombinanten Virus durch Kotransfektion des rekombinanten Plasmids mit der AcMNPV-DNA.....	43
2.2.2.5	Identifizierung und Reinigung des rekombinanten Virus durch Plaque- Hybridisierung.....	44
2.2.2.5.1	Plaque-Assay und Abklatsch auf NC-Filter.....	45
2.2.2.5.2	Hybridisierung der NC-Filter nach Abklatsch.....	46
2.2.2.5.3	Elution des rekombinanten Virus.....	46
2.2.2.6	Herstellung der Virus-Stocklösung (HINK's/CD).....	47
2.2.2.7	Infektion von Sf21-Zellen zur Produktion von rekombinanten Procathepsin D in Rollerflaschen.....	47
2.2.2.8	Metabolische Markierung von humanem Procathepsin D.....	48
2.2.2.8.1	Markierung von U937 mit <sup>35</sup> S-Cys/Met.....	49
2.2.2.8.2	Markierung von Sf21-Zellen mit <sup>35</sup> S-Cys/Met.....	49

<b>2.2.3</b>	<b>PROTEINBIOCHEMIE</b> .....	51
2.2.3.1	Immunpräzipitation radioaktiv markierter Proteine.....	51
2.2.3.2	Reinigung von Procathepsin D aus dem Medium inifizierter Sf21-Zellen.....	52
2.2.3.2.1	Präparative isoelektrische Fokussierung (Rotofor).....	52
2.2.3.2.2	Gelfiltration (HPLC).....	53
2.2.3.2.3	Affinitätschromatographie an Pepstatin A-Agarose.....	54
2.2.3.2.4	Ionenaustauschchromatographie (MonoQ-FPLC).....	55
2.2.3.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	56
2.2.3.4	Bestimmung der Cathepsin D-Aktivität (CD-Assay).....	57
2.2.3.5	Behandlung von Proteinen mit Glykosidasen.....	58
2.2.3.5.1	Glykopeptidase F (GPF)-Spaltung.....	58
2.2.3.5.2	<i>Endo</i> - $\beta$ -N-acetylglucosaminidase H ( <i>Endo</i> H)-Spaltung.....	59
2.2.3.6	Protein-Gelelektrophorese.....	60
2.2.3.6.1	Präparative SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	60
2.2.3.6.2	Analytische SDS-PAGE.....	61
2.2.3.7	Visualisierung radioaktiver Proteine auf PAA-Gelen.....	63
2.2.3.7.1	Fluorographie.....	63
2.2.3.7.2	Mit Hilfe des PhosphoImagers <sup>TM</sup> .....	64
2.2.3.8	Färbung von PAA-Gelen.....	64
2.2.3.8.1	Coomassie <sup>®</sup> Blue-Färbung.....	64
2.2.3.8.2	Silberfärbung.....	65
2.2.3.9	Western-, Dot-Blot und Immunofärbung.....	66
2.2.3.9.1	„Semidry“-Blotverfahren.....	66
2.2.3.9.2	Immunofärbung auf PVDF-Membran geblotteter Proteine (Trockenfärbemethode).....	67
2.2.3.9.3	Dot-Blot auf Nitrocellulose mit nachfolgender Immunofärbung.....	68
2.2.3.10	N-terminale Aminosäuresequenzanalyse.....	69
2.2.3.11	Autoaktivierung von Procathepsin D.....	69
2.2.3.12	Titration der Cathepsin D-Aktivität.....	71
2.2.3.12.1	Mit Hilfe eines monoklonalen M $\alpha$ CD-Antikörpers (3F4).....	71
2.2.3.12.2	Mit Hilfe des Inhibitors Pepstatin A.....	72

<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	73
3.1	Klonierung der humanen Cathepsin D-cDNA in die Baculovirus-Vektoren pVL 1392 / pVI 1393.....	73
3.2	Herstellung und Reinigung des rekombinanten AcMNP-Virus.....	75
3.3	Biosynthese und Sekretion von humanem Procathepsin D in rekombinant-infizierten Sf21-Zellen.....	79
3.4	Spaltung des rekombinanten Procathepsin D mit Glykopeptidase F.....	80
3.5	Synthese von Procathepsin D mit mannosereichen Oligosacchariden in Sf21-Zellen.....	81
3.6	Expression von Procathepsin D bei Kultivierung der Sf21-Zellen in serumfreiem bzw. -haltigem Medium.....	83
3.7	Einsatz von Proteinase-Inhibitoren bei der Produktion von rekombinantem Procathepsin D in serumfreiem Medium.....	85
3.8	Reinigung des Procathepsin D aus dem SF900II-Medium rekombinant-infizierter Sf21-Zellen (SF900II/CD).....	88
3.8.1	Präparative, isoelektrische Fokussierung (Rotofor).....	88
3.8.2	Reinigung des Rotofor-gereinigten Procathepsin D mittels Gelfiltrations-HPLC...92	
3.9	Affinitätschromatographische Reinigung des Procathepsin D aus dem HINK's-Medium rekombinant-infizierter Sf21-Zellen (HINK's/CD).....	96
3.10	Isolierung des Procathepsin D-Polypeptides mittels präparativer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	97
3.11	Bestimmung der N-terminalen Sequenz des rekombinanten Procathepsin D aus Sf21-Zellen.....	99
3.12	Reinigung des affinitätschromatographisch isolierten Procathepsin D mittels MonoQ-FPLC.....	99
3.13	Analyse der Heterogenität des gereinigten, rekombinanten Procathepsin D aus Sf21-Zellen.....	102
3.14	Autoaktivierung des gereinigten, rekombinanten Procathepsin D.....	103
3.15	Kinetik der Autoaktivierung von Procathepsin D.....	105
3.16	Vergleich der spezifischen Aktivität von Pseudo- und reifem Cathepsin D durch Titration.....	110

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	114
4.1	Expression von humanem Cathepsin D in rekombinant-infizierten Insektenzellen.....	114
4.2	Glykosylierung des rekombinanten, humanen Procathepsin D in <i>Spodoptera frugiperda</i> -Zellen .....	117
4.3	Autoaktivierung von rekombinantem, humanem Procathepsin D <i>in vitro</i> .....	121
4.4	Ausblick.....	128
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	130
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	131
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	148
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	148
7.2	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	150

## 1. Einleitung

### 1.1 Die Aspartyl-Proteinase-Familie

Aspartyl-Proteinasen sind aus tierischen Zellen, sowie aus Pilzen/Hefen bekannt (zur Übersicht siehe Tang u. Wong, 1987). Auch in Retroviren wurden Aspartyl-Proteinasen gefunden (zur Übersicht siehe Rao *et al.*, 1991). In der Datenbank Swiss-Prot (Stand April 1998, Zugang über die Datenbank Expasy; Appel *et al.*, 1994) sind mittlerweile 210 Aspartyl-Proteinasen aus verschiedenen Spezies eingetragen, wobei sich seit letztem Jahr darunter auch 12 Einträge für eine bakterielle Aspartyl-Proteinase (LSPA, "leading signal peptidase") aus verschiedenen Bakterien befinden.

Während in tierischen Zellen einige Proteinase dieser Familie wie z. B. Renin, Pepsin A oder Gastricsin (Pepsin C) sekretorische Proteine darstellen und ihren Wirkungsbereich außerhalb der Zelle haben, verbleibt Cathepsin D größtenteils intrazellulär und wird in die Lysosomen transportiert. Cathepsin E ist ebenfalls eine intrazelluläre, jedoch nicht lysosomale Aspartyl-Proteinase (Ueno *et al.*, 1989; Ichimaru *et al.*, 1990).

Die Aspartyl-Proteinasen werden als inaktive Vorläuferproteine synthetisiert und durch Abspaltung einer Prosequenz aktiviert. Sie haben in ihrem aktiven Zentrum zwei Aspartyl-Reste. Dadurch, daß der eine Aspartyl-Rest protoniert, der andere deprotoniert vorliegen muß, ergibt sich ein pH-Optimum im sauren Bereich. Dieses gilt jedoch erwiesenermaßen nicht für Renin bzw. für die virale Aspartyl-Proteinase des AIDS-Virus, die beide bei neutralem pH aktiv sind. Bei diesen Enzymen wurde gezeigt, daß Aminosäuren des Enzyms, sowie des Substrates zur Erhöhung der pK-Werte der Aspartyl-Reste beitragen (Hyland *et al.*, 1991; Green *et al.*, 1990). Die genaue katalytische Rolle der Aspartyl-Reste ist nach wie vor ungeklärt. Es ist jedoch gezeigt worden, daß sich ein Wassermolekül äquidistant zu den beiden Carboxylresten der Aspartate befindet. Dadurch wird möglicherweise die Nukleophilie beim Angriff auf das Carbonyl-Kohlenstoff-Atom der zu spaltenden Peptidbindung erhöht (Dunn, 1989). Die Ähnlichkeit des aktiven Zentrums der verschiedenen Aspartyl-Proteinasen zeigt sich ebenfalls durch ein vergleichbares Verhalten der Enzyme gegenüber Pepstatin A, einem spezifischen Inhibitor, der schon in sehr geringen Konzentrationen (im sub- $\mu$ M-Bereich) die Aktivität der Aspartyl-Proteinase vollständig hemmt (Marciniszyn *et al.*, 1976; 1977).

Die Verwandtschaft der Aspartyl-Proteinasen läßt sich sowohl auf der Nukleinsäure-, als auch auf der Aminosäureebene zeigen. Nachdem die Genstrukturen einiger humaner Aspartyl-Proteinasen, wie z. B. von Renin (Hobart *et al.*, 1984; Miyazaki *et al.*, 1984), Pepsin A (Sogawa *et al.*, 1982), Gastricsin (Hayano *et al.*, 1988) und Cathepsin D (Redecker *et al.*, 1991),

veröffentlicht worden sind, konnte gezeigt werden, daß sich bei den oben genannten Enzymen der codierende Bereich auf 9 Exons mit vergleichbaren Größen verteilt. Durch Röntgenstrukturanalysen z. B. des humanen Pepsin (Fujinaga *et al.*, 1995) sowie des humanen Cathepsin D (Baldwin *et al.*, 1993) konnte die Ähnlichkeit der dreidimensionalen Struktur gezeigt werden. Die nachfolgende Abb.1 zeigt schematisch die entsprechenden Sekundärstrukturmerkmale für humanes Pepsin und für humanes Cathepsin D. Aus der sehr vergleichbaren Abfolge der Sekundärstrukturelemente ist die Homologie - beispielhaft für die beiden Enzyme - ersichtlich.

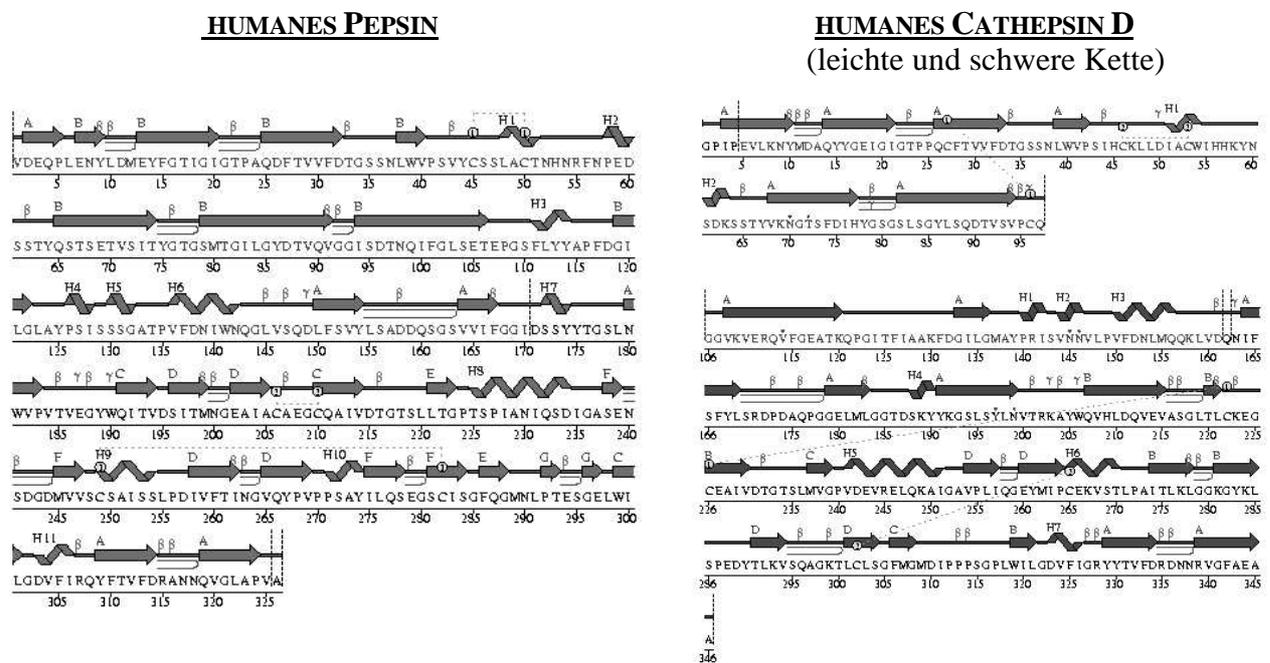


Abb. 1: Skizzierte Darstellung der Sekundärstrukturmerkmale von humanem Pepsin und humanem Cathepsin D. Dargestellt sind die Primärstrukturen der reifen Enzyme. Über den Aminosäuresequenzen sind die entsprechenden Sekundärstrukturmerkmale skizziert. Dabei stellen die Pfeile Bereiche mit  $\beta$ -Faltblatt- und die verdrillten Stränge Bereiche mit helikaler Struktur dar. Mit „ $\triangleright$ “ markierte Bereiche kennzeichnen „ $\beta$ -Hairpin“-Strukturen, während Beta- und Gamma-Schleifen durch kleine, griechische Bustaben angegeben sind. Zusätzlich sind Disulfidbrücken durch gepunktete Linien dargestellt. (Entnommen aus der Datenbank PDBsum; Laskowski *et al.*, 1997)

## 1.2 Cathepsin D

### 1.2.1 Vorkommen und biologische Funktion von Cathepsin D

Cathepsin D (EC 3.4.23.5) ist eine glykosylierte, lösliche, saure, lysosomale Endopeptidase (zur Übersicht siehe Barrett, 1977; 1979) und gehört - wie schon erwähnt - zur Familie der Aspartyl-Proteinasen. Das humane Cathepsin D-Gen wurde auf Chromosom 11 (Hasilik *et al.*, 1982; Augereau *et al.*, 1988), das Mäuse-Cathepsin D auf Chromosom 4 lokalisiert (Hetman *et al.*, 1994). Es wird in nahezu allen Geweben exprimiert (Dorn *et al.*, 1986, Reid *et al.*, 1986) und kann daher als „housekeeping“-Gen klassifiziert werden. Dieses wird durch die aus dem 5'-untranslatierten Bereich abgeleitete Promotorstruktur von Cathepsin D - verglichen mit anderen „housekeeping“-Genen - untermauert (Bird, 1986; Redecker *et al.*, 1991; Cavaillès *et al.*, 1993). Es ist gezeigt worden, daß die Expression von Cathepsin D in humanen Brustkrebs-Zellen durch Östrogen (Cavaillès *et al.*, 1989) und in humanen Promonozyten durch Vitamin D<sub>3</sub> (Stein *et al.*, 1987; Redecker *et al.*, 1989) gesteigert wird.

Cathepsin D nimmt am Katabolismus intrazellulärer bzw. endozytierter Proteine teil. Dabei spaltet es Proteine bzw. Polypeptide vornehmlich nach hydrophoben Aminosäuren. Van der Westhuyzen *et al.* (1980) zeigten, daß Cathepsin D den Abbau von Apolipoprotein B durch eine endoproteolytische Spaltung einleitet, während der weitere Abbau des Apolipoproteins gemeinsam mit anderen Enzymen abläuft. Desweiteren ist Cathepsin D an der selektiven Freisetzung von Hormonen durch Prozessierung von Prohormonen beteiligt (Dunn u. Dunn, 1982; Pillai *et al.*, 1983; Yoshinari u. Taurog, 1985 und Dunn *et al.*, 1991). Nachdem van Noort u. van der Drift (1989) auf Grund der Spaltungsspezifität von Cathepsin D spekulierten, daß Cathepsin D bei der Antigenprozessierung für die Präsentation durch Klasse II MHC-Moleküle beteiligt sein könnte, wurde dies durch Diment (1990) am Beispiel von Ovalbumin gezeigt (siehe auch Rodriguez u. Diment, 1992). Lenarcic *et al.* (1988) beobachteten, daß Cathepsin D den Cysteinproteinase-Inhibitor Cystatin inaktiviert. Dadurch - so wird vermutet - spielt Cathepsin D eine sekundäre Rolle bei der Erhöhung der Cysteinproteinase-Aktivität bei menschlichen Erkrankungen, wie z. B. der progressiven Muskeldystrophie. Aus medizinischer Sicht sind zwei weitere Aspekte interessant, zum einen der Zusammenhang zwischen der Cathepsin D-Expression/Sekretion und Brustkrebs und zum anderen zwischen Cathepsin D und der Alzheimerschen Krankheit.

Morisset *et al.* (1986) stellten fest, daß Östrogen-behandelte, humane Brustkrebszellen ein 52 kDa Glykoprotein sezernieren, das dem Procathepsin D sehr ähnlich ist und von Rochefort *et al.* (1988) als solches indentifiziert wurde. Procathepsin D ist nach Autoaktivierung

in saurer Mikroumgebung in der Lage, extrazelluläre Matrix und Proteoglykane zu degradieren. Zwischen hoher zytosolischer Cathepsin D-Konzentration bei primärem Brustkrebs und der Entstehung von Metastasen besteht eine signifikante Korrelation (zur Übersicht siehe Rochefort, 1990). Es wurde gezeigt, daß Patientinnen mit primärem Brustkrebs und hoher zytosolischer Cathepsin D-Konzentration eine wesentlich geringere Heilungschance und eine kürzere Lebenserwartung haben, als Patientinnen mit niedrigerer Cathepsin D-Konzentration (Duffy *et al.*, 1992; Kute *et al.*, 1992). Auch wenn der kausale Zusammenhang zwischen Cathepsin D und der Entwicklung von Brustkrebs bzw. der Metastasierung noch nicht aufgeklärt worden ist, so ist Cathepsin D als diagnostischer Marker für die Prognose des Krankheitsverlaufes interessant (Johnson *et al.*, 1993; Ardavanis *et al.*, 1997).

Bei verstorbenen Alzheimer-Patienten wurde von Cataldo *et al.* (1990) immunhistologisch Cathepsin D in hohen Konzentrationen extrazellulär in senilen Plaques im Hirngewebe nachgewiesen. Sie spekulierten, daß die unregulierte Aktivität des extrazellulären Cathepsin D, das von degenerierten Neuronen freigesetzt wurde, zur abnormalen Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins und somit zur Bildung von Amyloid-Ablagerungen in senilen Plaques bei Alzheimer-Patienten führt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß Cathepsin D intrazellulär in Lysosomen in der Lage ist, das  $\beta$ -Amyloid-Vorläuferprotein so zu spalten, daß das amyloidogene  $\beta$ /A4-Protein entsteht, welches jedoch in den Lysosomen mit Hilfe von Cystein-Proteinasen vollständig gespalten wird (Siman *et al.*, 1993). Schwagerl *et al.* (1995) fanden erhöhte Cathepsin D-Konzentrationen und -Aktivitäten im Liquor von Alzheimer-Patienten und schlagen daher Cathepsin D als frühzeitigen, biologischen Marker für die Alzheimersche Krankheit vor.

Von Saftig *et al.* (1995) wurde an Cathepsin D-defizienten „Knock out“-Mäusen gezeigt, daß es sich bei Cathepsin D offensichtlich um eine essentielle Proteinase handelt, die nicht durch andere Proteinasen substituiert werden kann. Die defizienten Mäuse sterben ca. 26 Tage nach der Geburt. Saftig *et al.* beschreiben umfassend den Phenotyp der defizienten Mäuse und postulieren, daß Cathepsin D vermutlich eine vitale Funktion bei der limitierten Proteolyse von Proteinen, die an der Regulierung des Zellwachstums und/oder der Homöostase von Geweben beteiligt sind, hat.

### 1.2.2 Biosynthese und lysosomaler Transport von Cathepsin D

Die Biosynthese und Reifung von Cathepsin D ist in mehreren Publikationen (Hasilik u. Neufeld, 1980; Faust *et al.*, 1985; zur Übersicht siehe Erickson, 1989 und Hasilik, 1992)

beschrieben worden, ohne daß bisher der genaue Mechanismus der Reifung aufgeklärt, bzw. die an der Reifung beteiligten Proteine identifiziert wurden.

Cathepsin D wird als Präproenzym am rauhen endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, wobei die 20 Aminosäuren umfassende, hydrophobe, N-terminale Signalsequenz kotranslational im Lumen des ER abgespalten wird. Mit Hilfe der Oligosaccharidtransferase wird kotranslational je ein aktiviertes Oligosaccharid (Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Diphospho-Dolichol) von der Lipidkomponente auf die Asparaginreste Asn<sup>70</sup> und Asn<sup>199</sup> der wachsenden Polypeptidkette übertragen. Nach korrekter Faltung des Proenzym beginnt im ER die Modifizierung der Oligosaccharidseitenketten durch Entfernung der terminalen Glukosen mittels Glukosidasen (näheres dazu siehe im Kapitel 1.3). Es folgt der vesikuläre Transport des Proenzym vom ER zum cis-Golgi. Bei der „Reise“ des Proenzym durch die Golgi-Kompartimente findet die weitere Modifizierung der Oligosaccharidseitenketten statt. Dabei werden durch Phosphorylierung der mannosereichen Zuckerseitenketten die Mannose-6-Phosphat-Erkennungssignale gebildet. Am Asn<sup>70</sup> wird allerdings ein beträchtlicher Teil der Oligosaccharidseitenkette nicht phosphoryliert und zum komplexen Typ modifiziert (Cantor u. Kornfeld, 1992; näheres zur Modifikation Asn-gebundener Oligosaccharide siehe Kapitel 1.3). Die Mannose-6-Phosphat-Reste werden von spezifischen Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren erkannt. Diese Rezeptoren determinieren den Transport in die Lysosomen (siehe Abb. 2 und zur Übersicht: von Figura u. Hasilik, 1988; Dahms *et al.*, 1989).

Es wurden zwei verschiedene Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren gefunden, die sich in ihrer Größe und in ihrer Abhängigkeit von Kationen unterscheiden (der 215 kDa-kationenunabhängige Rezeptor, Sahagian *et al.* (1981) und der 46 kDa-kationenabhängige Rezeptor, Hoflack u. Kornfeld, 1985). Dabei hat der große (215 kDa) Rezeptor zwei Bindungsstellen für Phosphomannosyl-Reste und zusätzlich eine Bindungsstelle für den insulinähnlichen Wachstumsfaktor II (IGF-II), während der kleine (46 kDa) Rezeptor nur eine Bindungsstelle für Phosphomannosyl-Reste hat, jedoch als Dimer auftritt. Es ist nach wie vor unbekannt, warum die meisten Zellen von Säugetieren zwei Mannose-6-Phosphat Rezeptoren haben. Die intrazelluläre Lokalisation beider Rezeptoren ähnelt sich sehr (Trans-Golgi-Netzwerk, Endosomen bzw. frühe Lysosomen und Plasmamembran). Beide Rezeptoren sind am zielgerichteten Transport lysosomaler Hydrolasen beteiligt. Zusätzlich erfolgt jedoch die Endozytose Mannose 6-Phosphat-tragender Proteine nur über den großen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor. Er trägt somit unter anderem zur Reutilisierung sezernierter, lysosomaler Hydrolasen bei, sofern sie den Erkennungsmarker tragen. Sleat u. Lobel (1997) fanden in einem *in vitro*-Bindungsassay heraus, daß beide Rezeptoren anscheinend die gleichen Glykoproteine binden, jedoch mit deutlich unterschiedlichen Affinitäten. Dieses geht mit dem Befund einher, daß bei

Maus-Mutanten der Verlust eines der Rezeptoren durch den jeweils anderen partiell kompensiert werden kann (Köster *et al.*, 1993), während der Verlust beider Rezeptoren zu einem frühen Tod führt (Ludwig *et al.*, 1996).

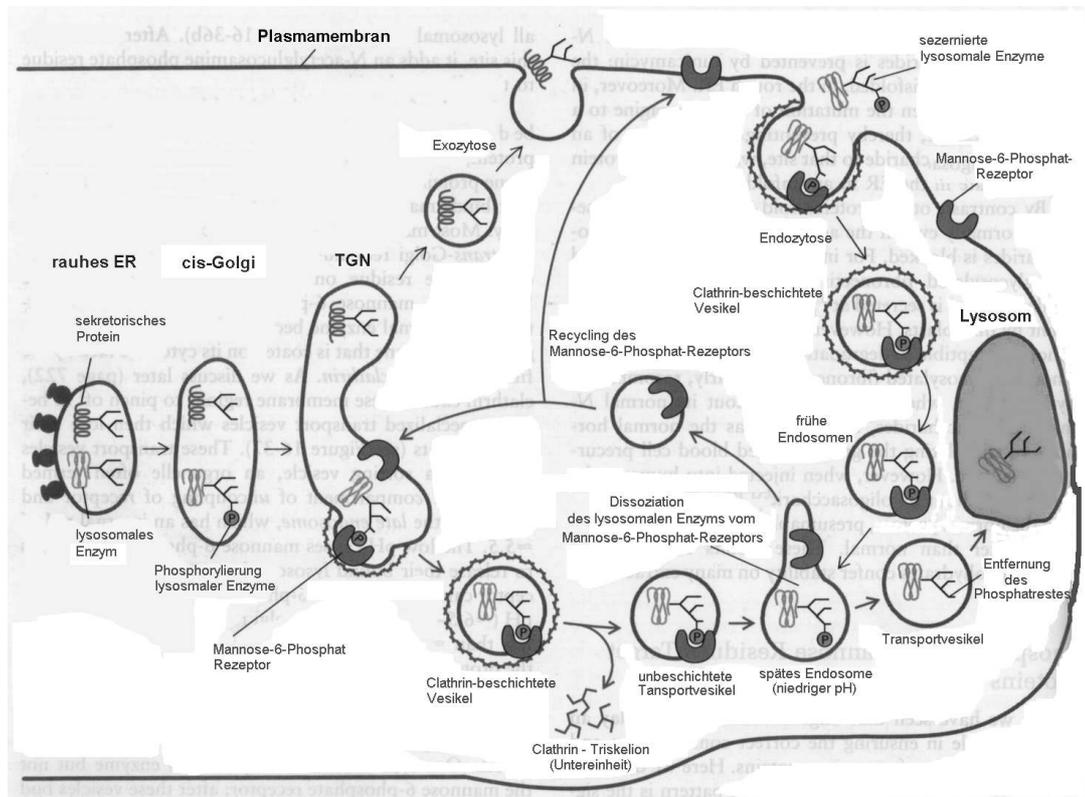
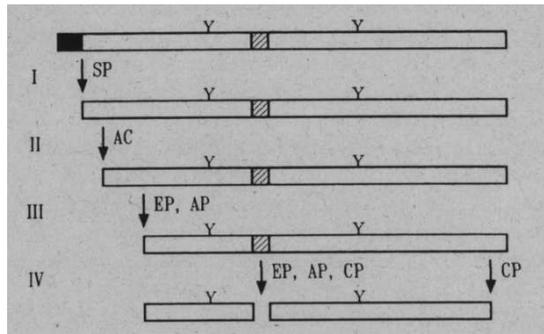


Abb. 2: Schematische Darstellung des Transportes sekretorischer Proteine und lysosomaler Enzyme zu ihren Zielorten. (Verändert aus *Molecular Cell Biology*, ed: Lodish *et al.*, 1995).

Durch Abknospung Clathrin-beschichteter Vesikel findet die Trennung der sekretorischen Proteine von den, an Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren gebunden, lysosomalen Enzymen statt (Marquardt *et al.*, 1987; Griffiths *et al.*, 1988; Payne u. Schekman, 1989 und zur Übersicht: Schmid, 1997). Der vesikuläre Transport vom Trans-Golgi-Netzwerk zu den Lysosomen verläuft nach Depolymerisation des Clathrins über Endosomen (frühe Lysosomen), in denen durch pH-Erniedrigung die Trennung von Rezeptor und Ligand stattfindet.

In diesem Kompartiment der Zelle beginnt ebenso die Reifung des Cathepsin D, die in den Lysosomen vollendet wird und in Abb. 3 schematisch dargestellt ist.



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Reifung von humanem Cathepsin D.** Die Glykosylierungsstellen sind durch „Y“ dargestellt. Die Signalsequenz ist durch eine schwarze und die Spaltstelle zwischen leichter und schwerer Kette durch eine schraffierte Box markiert. Die verwendeten Abkürzungen bedeuten: SP: Signalpeptidase, AC: Autokatalyse, EP: Endopeptidase, AP: Amino-peptidase, CP: Carboxypeptidase. (verändert nach Hasilik, 1992)

Die Abspaltung der 20 Aminosäure-langen Signalsequenz des Präprocathepsin D erfolgt - wie schon erwähnt - kotranslational im ER. Das dabei erhaltene Procathepsin D (53 kDa) wird in den Lysosomen autokatalytisch durch N-terminale Entfernung von 26 Aminosäuren zu Pseudocathepsin D (51,5 kDa) gespalten (Hasilik et al., 1982a; Richo u. Conner, 1991). Die anschließende N-terminale Prozessierung zum Intermediat (47 kDa, Entfernung weiterer 18 Aminosäuren) findet durch Endo- bzw. Amino-peptidasen statt. Die asymmetrische Spaltung zum reifen Cathepsin D, bestehend aus leichter (14 kDa) und schwerer (31 kDa) Kette findet ebenfalls in den Lysosomen unter Beteiligung verschiedener Proteinasen und Entfernung von sieben Aminosäuren (Sequenz des abgespalteten Peptids SASSASA, entspricht Aminosäure 98 bis 104 des reifen Cathepsin D, siehe Nomenklatur von Faust *et al.*, 1985) statt. Gieselmann *et al.* (1985) zeigten an gereinigten Lysosomen aus humanen Fibroblasten, daß die Reifung des Cathepsin D von der Einketten- in die Zweikettenform durch Verwendung von Cystein-Proteinase-Inhibitoren unterdrückt werden kann. Beim humanen Cathepsin D wird letztendlich die Reifung des Enzyms durch Abspaltung von zwei Aminosäuren vom C-Terminus der schweren Kette abgeschlossen (Erickson u. Blobel, 1983; Faust *et al.*, 1985). Bezüglich des Auftretens des reifen Cathepsin D in der Zweikettenform ist im Vergleich der Spezies untereinander zu bemerken, daß bei aller erwarteten Homologie deutliche Unterschiede gerade in der Spaltungsregion zwischen leichter und schwerer Kette auftreten (Yonezawa et al., 1988). So bilden sich beim Cathepsin D verschiedener Säugetiere in der Spaltungsregion unterschiedlich große Schleifen aus, die dann dazu führen, daß bei Ratten hauptsächlich die Einkettenform (Yonezawa *et al.*, 1988), bei Rindern gleiche Mengen der Ein- und Zweikettenform (Huang *et al.*, 1980) und sowohl bei Schweinen (Shewale u. Tang, 1984) als auch beim Menschen (Hasilik u. Neufeld, 1980) vornehmlich die Zweikettenform auftritt.

Beide Formen des Cathepsin D (Ein- und Zweikettenform) sind biologisch aktiv. So konnte gezeigt werden, daß durch Einsatz von Cystein-Proteinase-Inhibitoren zwar die Reifung des Cathepsin D, nicht aber die Aktivierung unterbunden wird (Hentze *et al.*, 1984; Samarel *et al.*, 1989).

### 1.3 Asparagin-gebundene Oligosaccharide, ko- und posttranslationale Modifikationen

Da Cathepsin D zwei Asparagin-gebundene Oligosaccharidseitenketten trägt (siehe oben), soll in diesem Kapitel kurz und allgemein auf die Struktur und die Modifikation der Oligosaccharidseitenketten eingegangen werden.

Die Struktur und die biologische Funktion von Asparagin-gebundenen Oligosacchariden sind mannigfaltig. Besonders bezüglich der biologischen Funktion dieser Oligosaccharidseitenketten gibt es umfangreiche Einzelbefunde, die sich jedoch nicht zu einem einheitlichen Bild zusammenfügen lassen (zur Übersicht siehe Rademacher *et al.*, 1988; Paulson, 1989; Lis u. Sharon, 1993 und Varki, 1993). Bezüglich der Struktur der Zuckerseitenketten werden hauptsächlich drei Typen unterschieden: den komplexen, den hybriden und den mannosereichen Typ. Alle drei Typen haben die gleiche Kernstruktur mit  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (Trimannosylstruktur), die am innersten, am Asparagin-gebundenen GlcNAc-Rest fukosyliert sein kann.

*Abb. 4: Schematische Darstellung der Trimannosylstruktur Asparagin-gebundener Oligosaccharide. (verändert nach Kornfeld u. Kornfeld, 1985).*

Glykoproteine mit mannosereichen Zuckerseitenketten tragen lediglich zwei bis sechs weitere Mannosereste als Verlängerung der Kernstruktur und stellen damit relativ unprozessierte Formen dar. Diese Zuckerseitenketten werden häufig phosphoryliert und bilden das Erkennungssignal für den Mannose 6-Phosphat-Rezeptor (siehe oben und im folgenden dieses Kapitels). Glykoproteine mit komplexen Oligosaccharidseitenketten besitzen Verästelungen (Antennen) hervorgerufen durch Anhängung von GlcNAc-Resten an die Kernstruktur. Meist schließt sich daran eine zusätzliche Verlängerung mit Galaktose- und Sialinsäureresten an. Diese Strukturen stellen die am umfangreichsten prozessierten N-glykosylierten Formen dar. N-Glykosylierte Proteine mit hybriden Strukturen nehmen bezüglich des Prozessierungsumfanges eine

Zwischenstellung zwischen mannosereichen und komplexen Zuckerseitenketten ein. Sie besitzen als Erweiterung des Trimannosylkerns sowohl oligomannosidische (am  $\alpha$ -1,6 gebundenen Mannoseast) als auch komplexartige (am  $\alpha$ -1,3 gebundenen Mannoseast) Strukturen. Auch die hybriden Oligosaccharide können wie die mannosereichen am oligomannosidischen Ast Mannose-6-Phosphat-Reste enthalten.

Im folgenden dieses Kapitels soll kurz die kaskadenartige Abfolge der Glykosylierungsreaktionen dargestellt werden, da auch die in dieser Arbeit verwendeten, mit rekombinantem Baculovirus infizierten Insektenzellen (siehe nächstes Kapitel) in der Lage sind, rekombinante Proteine zu glykosylieren. Auf Grund Zelltyp-spezifischer Unterschiede ist der in Abb. 5 dargestellte Ablauf als ein Hauptweg zu verstehen (zur Übersicht siehe Kornfeld u. Kornfeld, 1985).

Die Glykosylierung von Proteinen beginnt - wie schon erwähnt - im Lumen des ER mit der kotranslationalen Übertragung eines Vorläufer-Oligosaccharids ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) von Dolicholpyrophosphat auf einen Asparaginrest der entstehenden Polypeptidkette. Dabei werden Asparaginreste als Akzeptor erkannt, wenn sie Teil der Sequenz Asn-X-Ser/Thr sind, wobei X für eine beliebige Aminosäure mit Ausnahme von Prolin steht. Polypeptidketten, die an der dritten Stelle des Sequons Threonin anstatt Serin enthalten, werden dabei stärker glykosyliert (Bause u. Legler, 1981; Kasturi *et al.*, 1995). Ebenso scheint die Sekundärstruktur einen Einfluß auf die Glykosylierung zu haben. Die Übertragung von Oligosacchariden wird bei Proteinen begünstigt, die in der Umgebung der Erkennungssequenz  $\beta$ -Faltblattstrukturen ausbilden (zur Übersicht siehe Verbert, 1995).

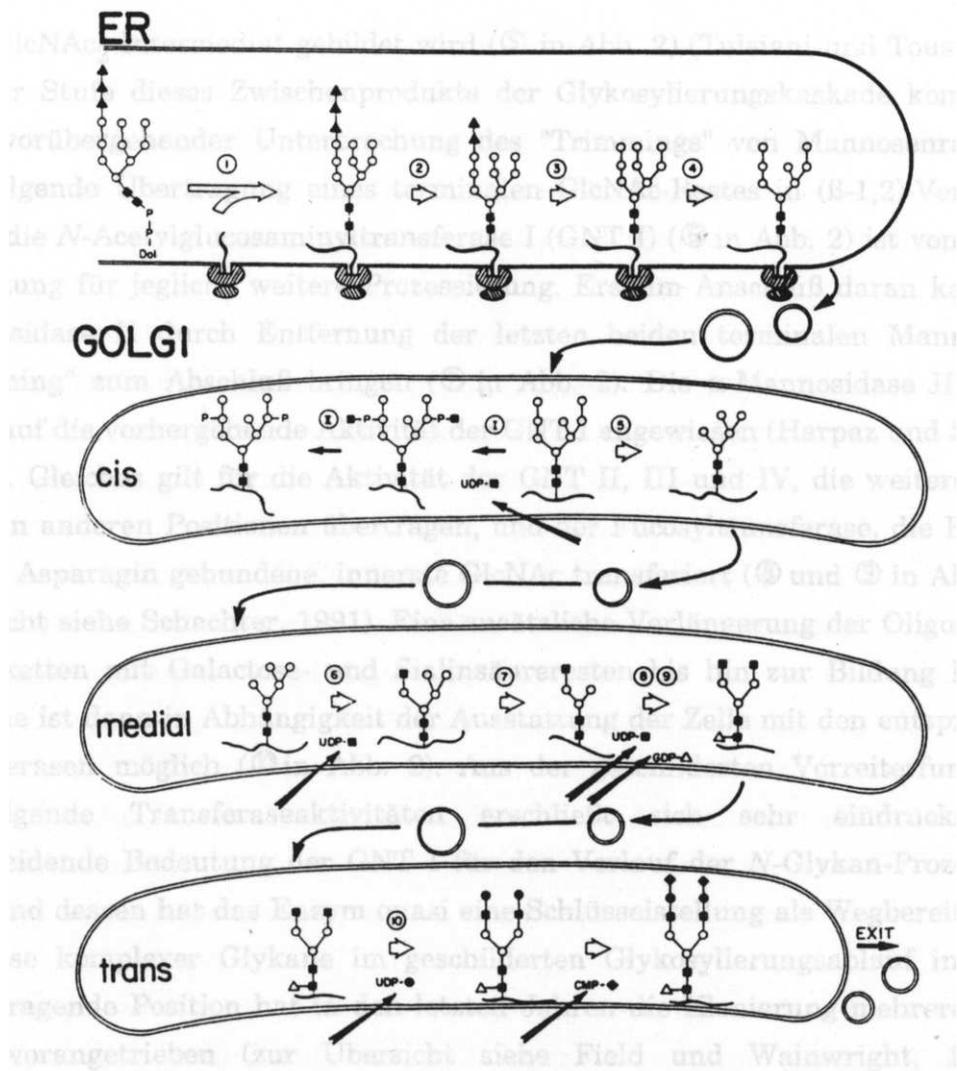


Abb. 5: Schematische Darstellung der Prozessierung N-glykosidisch gebundener Oligosaccharide. ■: N-Acetylglukosamin; ○: Mannose; ▲: Glukose; △: Fukose; ●: Galaktose; ◆: Sialinsäure. Nähere Beschreibung siehe Text. (entnommen aus Kornfeld u. Kornfeld, 1985).

Nach erfolgtem Transfer (① in Abb. 5) wird das Vorläuferglykoprotein zunächst schrittweise abgebaut („getrimmt“). Der Abbau beginnt noch im ER mit der sukzessiven Entfernung der drei terminalen Glukosereste durch die Glukosidasen I und II (② und ③ in Abb. 5), wobei dieser Deglukosylierung eine Kontrollfunktion zugeordnet werden konnte. Nach Entfernung der ersten beiden Glukosereste bindet das Chaperon Calnexin bzw. das calciumbindende Protein Calreticulin, das ebenfalls Chaperon-Aktivität besitzt, an das monoglukosylierte Glykoprotein (Hammond *et al.*, 1994; zur Übersicht siehe Krause u. Michalak, 1997). Die beiden Proteine Calnexin und Calreticulin haben eine hochkonservierte, sogenannte P-Domäne, die die Chaperon-Aktivität trägt. Während Calnexin jedoch über eine Transmembran-Domäne in der ER-Membran verankert ist, ist das lösliche Calreticulin auf Grund des C-terminalen KDEL-Signals im Lumen des ER lokalisiert. Beide Chaperone können sich in ihrer Funktion bezüglich

der Unterstützung der Faltung von Proteinen vollständig ersetzen. Nach richtiger Faltung des Glykoproteins wird dieses vom Calnexin bzw. Calreticulin durch Entfernung des dritten Glukoserestes freigesetzt. Wird ein nicht richtig gefaltetes Protein vollständig deglukosyliert, so kann es durch eine luminaire UDP-Glukose:Glykoprotein-Glukosyltransferase reglukosyliert werden, um erneut an Calnexin/Calreticulin zu binden und sich richtig zu falten (Trombetta *et al.*, 1989; 1991; Hebert *et al.*, 1995). Die Abspaltung des ersten Mannoserestes (④ in Abb. 5) findet ebenfalls noch im ER statt, bevor das richtig gefaltete Glykoprotein vesikulär zum cis-Golgi transportiert wird.

Lubas u. Spiro (1987) isolierten eine *endo*- $\alpha$ -D-Mannosidase, die sich im Golgi befindet und  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$  zu  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}$  unter Freisetzung von  $\text{Glc-}\alpha 1,3\text{-Man}$  spaltet. Damit zeigten sie einen Weg auf, der die Prozessierung von Oligosacchariden im Golgi ermöglicht, auch wenn die Glykoproteine im ER nicht vollständig deglukosyliert worden sind. Unter Verwendung von Castanospermin, einem Inhibitor der Glukosidase I, und Deoxymannojirimycin, einem Inhibitor der  $\alpha$ -Mannosidase I, fanden Moore u. Spiro (1990) in Hepatomazellen (HepG2) einen beträchtlichen Teil der Oligosaccharide mit komplexen Zuckerseitenketten. Desweiteren konnten sie im Medium glukosylierte Mannose-Saccharide ( $\text{Glc}_3\text{Man}$ ,  $\text{Glc}_2\text{Man}$  und  $\text{Glc}_1\text{Man}$ ) nachweisen, die nur durch die Aktivität der *endo*- $\alpha$ -D-Mannosidase zu erklären ist.

An der Stufe des  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  scheidet sich der Modifizierungsweg. Wird durch die N-Acetylglukosamin-1-Phosphotransferase die Übertragung von N-Acetylglukosamin-Phosphat vom aktivierten Donor UDP-N-Acetylglukosamin auf die Hydroxyl-Gruppe am  $\text{C}_6$  eines oder zweier Mannosreste übertragen (① in Abb. 4), dann wird das weitere „Trimming“ verhindert. Es entsteht ein Mannoserest, der über eine Phosphodiester-Bindung mit N-Acetylglukosamin verknüpft ist, wobei anschließend die Phosphodiester-Bindung durch eine N-Acetylglukosamin-1-phosphodiester- $\alpha$ -N-Acetylglucoaminidase („Uncovering enzyme“) hydrolysiert wird (② in Abb. 5). Dabei werden die Mannose-6-Phosphat-Reste freigelegt, die die Erkennungssignale für den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor darstellen (siehe oben). Findet keine Phosphorylierung der Mannosereste statt, so erfolgt das weitere „Trimming“ durch Entfernung dreier Mannosereste mittels  $\alpha$ -Mannosidase I zum  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -Intermediat (⑤ in Abb. 5). Bevor weitere Mannosereste abgespalten werden, kommt es zunächst zu einer Übertragung eines terminalen GlcNAc-Restes in  $\beta$ -1,2-Verknüpfung durch die N-Acetylglukosaminyltransferase I (GNT I) (⑥ in Abb. 5). Anschließend werden von der  $\alpha$ -Mannosidase II zwei weitere Mannosereste entfernt (⑦ in Abb. 5). Ist das Enzym defekt oder fehlt dieses, so ist es nicht möglich, komplexe Oligosaccharidseitenketten zu bilden. Dieses wurde an Erythrozyten von transgenen Mäusen,

denen das  $\alpha$ -Mannosidase II-Gen fehlt, gezeigt (Chui *et al.*, 1997). Die Mäuse bilden einen ähnlichen Phenotyp aus wie humane Patienten mit congenitaler, dyserythropoetischer Anämie (CDA Typ II). In demselben Mausmodell konnte jedoch gezeigt werden, daß in „Nichterythrozyten“ komplexe Oligosaccharide zu finden sind. Um dieses zu erklären, zeigten Chui *et al.* einen alternativen Biosyntheseweg auf, der bei Fehlen der  $\alpha$ -Mannosidase II in Gang gesetzt werden kann. Dazu werden von dem  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -Intermediat durch die  $\alpha$ -Mannosidase III zwei Mannosereste entfernt. Es entsteht ein Oligosaccharid mit der Struktur  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ . Auf dieses Oligosaccharid wird mittels GNT I ein GlcNAc-Rest übertragen. Die weitere Bildung komplexer Oligosaccharide erfolgt in den defizienten Zellen ebenso wie in „normalen“ Zellen durch Übertragung von GlcNAc-Resten mittels GNT II, III und IV, sowie durch Fukosylierung des innersten, am Asparagin-gebundenen GlcNAc-Restes mittels der Fukosyltransferase (⑧ und ⑨ in Abb. 5). Eine zusätzliche Verlängerung der Oligosaccharidseitenketten mit Galaktose- und Sialinsäureresten bis hin zur Bildung komplexer Zucker ist dann in Abhängigkeit der Ausstattung der Zelle mit den entsprechenden Transferasen möglich (⑩ in Abb. 5).

## 1.4 Das Baculovirus-Expressionssystem

Das Baculovirus-Expressionssystem wurde 1983 von Smith *et al.* (1983b) mit der Produktion des humanen  $\beta$ -Interferon eingeführt und hat seither mehr und mehr an Bedeutung gewonnen (zur Übersicht siehe Summers u. Smith, 1987; Miller, 1988, 1989; Vaughn u. Weiss, 1990).

Bevor nun auf die Verwendung des Baculovirussystems für die Expression rekombinanter Proteine eingegangen wird, soll im folgenden Kapitel kurz das Baculovirus näher charakterisiert werden.

### 1.4.1 Die Baculoviren: Struktur und Infektion

Die Baculoviren bilden eine äußerst heterogene Familie. Bisher sind über 400 verschiedene Virusisolate - hauptsächlich aus den Insekten der Ordnungen Lepidoptera, Hymenoptera und Diptera - dieser Virusfamilie zugeordnet worden. Auf Grund der Variabilität innerhalb der Virusfamilie soll im Rahmen dieser Arbeit nur das verwendete „*Autographa californica* nuclear polyhydrosis virus“ (AcMNPV) näher beschrieben werden.

In verschiedenen Infektionsphasen werden in infizierten Zellen zwei morphologisch unterscheidbare, infektiöse Formen des Virus gebildet (Frederici, 1986; Rohrmann, 1992; zur Übersicht siehe O'Reilly *et al.*, 1994). Diese beiden Virusformen manifestieren eindrucksvoll

den biphasischen Replikationszyklus (siehe Abb. 6). Die Vermehrung der Baculoviren *in vivo* ist ein sehr komplexer, hochgradig geordneter Prozeß, der mit der oralen Aufnahme eines Einschlußkörperchens (der ersten, morphologisch unterscheidbaren Virusform) durch eine fressende Insektenraupe beginnt. Dieses Einschlußkörperchen (Polyeder) enthält in einer parakristallinen Proteinmatrix mehrere Gruppen von Nukleokapsiden, die mit einer Hüllmembran umfaßt sind. Die Hauptkomponente dieser Einschlußkörpermatrix bildet das Polyhedrin, ein 29 kDa großes Protein, das auf Grund von Koordinationsstellen mit Nachbarmolekülen in Wechselwirkung treten kann und so ein stabiles, hochgeordnetes Proteingitter ausbildet (zur Übersicht siehe Rohrmann, 1986). Die Polyeder wiederum sind von einer elektronendichten Membran, der sogenannten Calix umgeben (Whitt u. Manning, 1988). Nach oraler Aufnahme durch eine Insektenraupe erfolgt durch den basischen pH im Mitteldarm die Auflösung des Polyhedrinkristalls und die damit verbundene Freisetzung der enthaltenen, umhüllten Nukleokapside. Diese gelangen unter Vermittlung des viralen Glykoproteins gp64 durch adsorptive Endozytose unter Verlust ihrer Hüllmembran in das Zytoplasma der Mitteldarmzelle (Volkman u. Goldsmith, 1985) und vermutlich über die Kernporen in den Zellkern. Anschließend kommt es zur Transkription der frühen viralen Gene durch die Wirtszell-RNA-Polymerase II (Huh u. Weaver, 1990), wobei mRNAs zur Bildung von Proteinfaktoren entstehen, die bei der anschließenden Replikation der viralen DNA benötigt werden. Die nachfolgende DNA-Replikation ist begleitet von der Transkription der späten viralen Gene, die letztendlich in die Synthese viraler Strukturproteine mündet. Während dieser Phase erscheint im Kern der infizierten Zelle sogenanntes virogenes Stroma, ein Bereich, in dem neue Nukleokapside gebildet werden. Dieses besteht aus der auf einem basischen Protein (p6.9, Wilson *et al.*, 1987) aufgewickelten, zirkulären, viralen DNA mit einer Länge von 130 kBp und den beiden Kapsidproteinen p39 (Thiem u. Miller, 1989) und p87 (Müller *et al.*, 1990). Die Nukleokapside verlassen den Kern und interagieren mit Bereichen der Zellmembran, die peplomerartige Strukturen (spikeartige Ausstülpungen) auf Grund von eingelagertem, viralem Glykoprotein gp64 aufweisen. Bei dem nun folgenden Knospungsvorgang erhalten die extrazellulären Viren (die zweite, der oben erwähnten, morphologisch unterscheidbaren Virusform) ihre Umhüllung, die nur an einem Ende Peplomere aufweisen, wodurch die extrazellulären Viren ihre Polarität erhalten. Desweiteren hat diese Virusform eine stabförmige Gestalt, wodurch der Baculovirus seinen Namen erhalten hat (lat. Baculum = Stab). Diese extrazellulären Viruspartikel sorgen über den Weg der Hämolymphe für die Ausbreitung der Infektion in andere Zellen bzw. Gewebe des infizierten Tieres. Die Bildung der extrazellulären Viruspartikel ist ca. 20 bis 24 Stunden nach Beginn der Infektion (p. i.) abgeschlossen.



### 1.4.2 Anwendung und Vorteile des Baculovirus-Expressionssystems

Auf Grund der zwei, morphologisch verschiedenen, infektiösen Virusformen (siehe oben) bot es sich an, ein Expressionssystem auf Basis Baculovirus-infizierter Insektenzellen zu entwickeln. Die Einschlußkörper, als eine Form des infektiösen Virus, sind für die Vermehrung in der Zellkultur nicht erforderlich, so daß recht früh gezeigt werden konnte, daß Deletionen im Polyhedringen keinerlei Auswirkung auf die Produktion infektiöser Viren in der Zellkultur hat (Smith *et al.*, 1983a). Die gebildeten extrazellulären Viruspartikel sind zur produktiven Infektion von Insektenzell-Kulturen ausreichend. In Fortführung ihrer Arbeiten ersetzten Smith *et al.* (1983b) das Polyhedringen gänzlich durch die für das humane  $\beta$ -Interferon kodierende cDNA, welche unter der Polyhedrin-Promotor-Kontrolle in rekombinant-infizierten Insektenzellen exprimiert wurde.

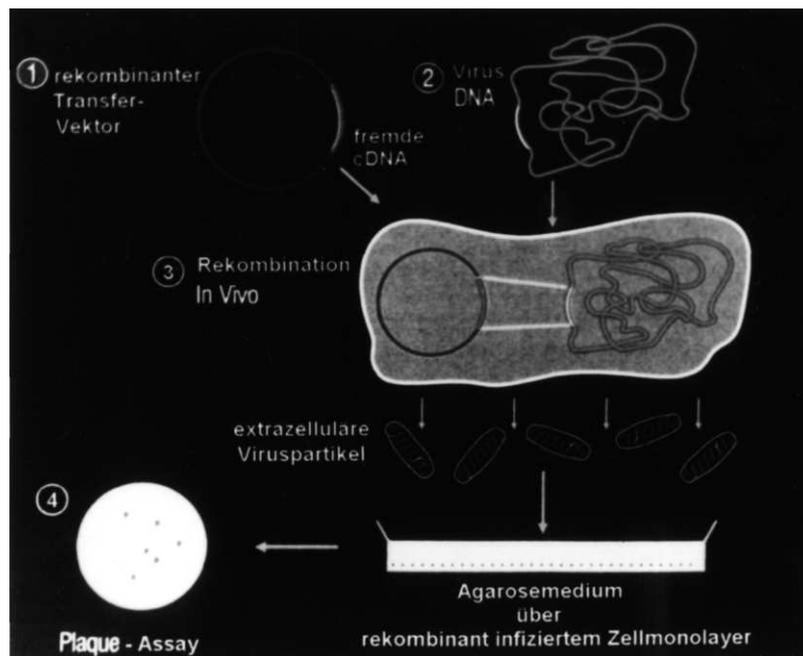
Ein herausragendes Merkmal dieses Systems ist die hohe Expressionsrate rekombinanter Proteine. In günstigen Fällen kann die Ausbeute an rekombinantem Protein bis zu 25 % des Gesamtzellproteins ausmachen. Dies entspricht ungefähr dem Anteil des in der sehr späten Phase einer natürlichen Infektion in einer Raupe gebildeten Polyhedrins (Pennock *et al.*, 1984) und ist Ausdruck der außergewöhnlichen Stärke des Polyhedrin-Promotors. Das 130 kBp umfassende AcMNPV-Genom ist in der Lage, sehr umfangreiche Fremdgensequenzen aufzunehmen. Daher können selbst sehr große Proteine in diesem System exprimiert werden. Das größte bisher in das Baculovirusgenom integrierte Fragment weist eine Länge von 10 kBp auf (Carbonell *et al.*, 1985). Aus Sicht der biologischen Sicherheit und für die praktische Anwendung dieses Systems ist es wichtig, daß Baculoviren ausschließlich für Arthropoden pathogen sind. Da eine produktive Infektion von Säugerzellen bisher nicht gezeigt werden konnte (Tija *et al.*, 1983; Carbonell u. Miller, 1987 und zur Übersicht siehe Gröner, 1986), werden Arbeiten mit diesem System in die unterste Sicherheitsstufe (S1) eingestuft.

Auch die Befähigung der für dieses System verwendeten Insektenzellen (vornehmlich *Spodoptera frugiperda* aus der Ordnung der Lepidoptera) zur Durchführung ko- und posttranslationaler Modifikationen macht dieses System interessant, da solche Modifikationen signifikant den strukturellen und funktionellen Zustand eines Proteins beeinflussen können und somit in größerem Ausmaß zur Authentizität des rekombinant exprimierten Proteins beitragen. In diesem Zusammenhang soll allerdings nur auf die für diese Arbeit relevanten ko- und posttranslationalen Prozesse eingegangen werden. So verfügt ein breites Spektrum eukaryontischer Proteine (auch Cathepsin D, siehe oben) über eine N-terminale, hydrophobe Signalsequenz, die deren Einschleusung in das ER dirigiert. Insektenzellen sind in der Lage,

Signalsequenzen aus Säugern, Pflanzen und Hefen zu erkennen, die entsprechenden Proteine ins ER zu lenken und dort die Signalsequenz luminal zu entfernen (Rapoport, 1992).

Eine sehr wichtige kotranslationale Modifikation stellt die N-Glykosylierung vieler im ER synthetisierter Proteine dar. Die kotranslationale Übertragung von Oligosaccharidseitenketten auf definierte Akzeptorsequenzen (siehe auch Kapitel 1.3) findet in Insektenzellen ebenso statt. Es gibt bisher nur sehr wenige Fälle, in denen ein normalerweise glykosyliertes Protein bei Expression in Insektenzellen in einem unglykosylierten Zustand erhalten wurde (Germann *et al.*, 1990; Vissavajjhala u. Ross, 1990). Der weitaus größte Teil der exprimierten rekombinanten Proteine wird entsprechend glykosyliert, wobei sich die im Golgi anschließende Prozessierung der Oligosaccharidseitenketten in Insektenzellen deutlich von der in anderen Eukaryonten unterscheidet (zur Übersicht siehe März *et al.*, 1995; es sei in diesem Zusammenhang auch auf das Kapitel 4.2 verwiesen).

Zum besseren Verständnis soll hier kurz die praktische Vorgehensweise zur Herstellung und Isolierung eines rekombinanten Baculovirus skizziert werde (siehe Abb. 7).



**Abb. 7:** Schematische Darstellung der Herstellung und Identifizierung eines rekombinanten Baculovirus. Erläuterungen siehe Text. (verändert aus der Produktinformation der Firma LifeTechnologies, Eggenstein, 1994)

Da das Virusgenom mit 130 kBp für molekularbiologische Methoden zu unhandlich ist, bedient man sich eines kleineren Vektors, der homologe Sequenzen flankierend zum Polyhedrin-Promotor des Baculovirus besitzt. In diesen Vektor wird die rekombinante cDNA kloniert. Durch Kotransfektion des rekombinanten Vektors mit der Virus-DNA findet in den Insektenzellen eine homologe Rekombination statt, durch die die rekombinante cDNA gegen das Polyhedringem ausgetauscht und in das Virusgenom eingebaut wird. Die Insektenzelle wird nun

veranlaßt, rekombinante Viren herzustellen, die als extrazelluläre Viruspartikel im Medium erscheinen. Wenn die homologe Rekombination erfolgreich war, ist die infizierte Insektenzelle - auf Grund des fehlenden Polyhedringens - nicht mehr in der Lage, Viren in der Form von Einschlußkörperchen zu bilden. Dieses kann zur Differenzierung von rekombinant- bzw. Wildtyp-infizierten Zellen genutzt werden (siehe Kapitel 3.2, Abb. 9). Die Isolierung der rekombinanten Viren erfolgt, indem infizierte Zellen zur Immobilisierung der Viren mit Agarosemedium überschichtet werden. Mittels Plaque-Assay (siehe Kapitel 2.2.2.6) werden die rekombinanten Viren durch Hybridisierung mit spezifischen Sonden identifiziert, anschließend eluiert und zur Infektion weiterer Zellen verwendet.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Auf Grund der Sonderrolle (einzige lysosomale Aspartyl-Proteinase, die speziesabhängig sowohl als Einketten-, als auch als Zweikettenenzym vorkommt) und der medizinischen Bedeutung des Cathepsin D unterliegt dieses Protein besonderem Interesse.

Wie in der Einleitung dargelegt, ist die Aktivierung und Reifung des Cathepsin D phänomenologisch mehrfach beschrieben worden, ohne, daß die daran beteiligten Enzyme identifiziert werden konnten. Um nähere Informationen darüber zu erhalten bzw. die Aktivierung und Reifung des Cathepsin D *in vitro* unter Verwendung definierter Enzyme nachvollziehen zu können, galt es, ein Expressionssystem zu entwickeln, welches es erlaubt, größere Mengen des Procathepsin D unter milden, nativen Bedingungen zu isolieren. Conner u. Richo (1992) haben humanes Procathepsin D in *E. coli* exprimiert und konnten es unter denaturierenden Bedingungen isolieren. Nach Faltung *in vitro* war es in der Lage, sich selbst autokatalytisch zu aktivieren. Nichtsdestotrotz war das Proenzym unglykosyliert und ein *in vitro*-gefaltetes Protein läßt immer Fragen bezüglich der richtigen Struktur des Enzyms offen. Horst u. Hasilik (1991) haben humanes Cathepsin D im heterologen eukaryontischen System (BHK-Zellen) exprimiert. Doch auch dieses System wies Nachteile bezüglich der Ausbeute auf, wobei gravierender die zu beobachtende Prozessierung und Reifung des Proteins war, welches die Isolierung des Vorläuferenzym erschwerte. Aus diesem Grund soll im Rahmen dieser Arbeit die Produktion von humanem Procathepsin D mit Hilfe des Baculovirussystems etabliert werden. Dazu gehört die Herstellung und Reinigung eines rekombinanten Baculovirus, die Optimierung der Produktion des humanen Procathepsin D in infizierten Insektenzellen und die Entwicklung einer Reinigungsstrategie zur Isolierung des Vorläuferenzym. Das isolierte, rekombinante Procathepsin D soll durch N-terminale Sequenzierung auf seine Vollständigkeit

untersucht, der Grad der Glykosylierung analysiert, sowie die biologische Aktivität im Aktivitätstest mit Hämoglobin als Substrat bzw. hinsichtlich der Autoaktivierung überprüft werden.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller, Ort
Agarosegelkammer		Biometra, Göttingen
Aminosäuresequenator	Modell 477 A	Applied Biosystems, Weiterstadt
Autoklav	VST 40/60 S	Zirbus, Osterode
Bakterienschüttler	Unimax 2010	Heidolph, Kehlheim
Brutschrank, CO <sub>2</sub> -	Function Line	Heraeus, Hanau
Brutschrank, 27°C mit Rollertablett	Memmert, Schwabach	/Inst.werkstatt Münster
Drehrad	Eigenbau der Institutswerkstatt	WWU Münster
Durchflußwasserstrahlpumpe	Thom <sup>®</sup> Jet 1	Genser Scientific, Rothenburg o. T.
Entgasungskammern	Eigenbau der Institutswerkstatt	WWU Münster
ELISA-Reader	MRX	Dynatech Laboratories, Denkendorf
Feinwaage	SBA 33	Scaltec, Heiligenstadt
Filmentwicklungsautomant	Curix HT-530	Agfa, Köln
Flüssigkeitsszintillationszähler	1600 TR	Canberra Packard, Dreieich
Folienschweißgerät	Vacupack 2 Plus	Krupps, Essen
FPLC-Anlage	Controller LCC-501 Plus Pumpe P-500 Conductivity Monitor Fraktionssammler Frac-100 UV-Detektor $\lambda$ -Max 481	Pharmacia, Freiburg    Waters, Eschborn
Gefrierschrank -70°C	Herafreeze	Heraeus, Hanau
Hand-Gamma-Monitor	LB 122	Berthold, Wildbach
Hand-UV-Lampe	VL6LM 312/365 nm	Stratagene, Heidelberg
Heißluftsterilisator	UT 12	Heraeus, Hanau
Heizblöcke	Eigenbau der Institutswerkstatt	WWU Münster
Heizmagnetrührer	MR 2002	Heidolph, Kelkheim
HPLC-Anlage	System Controller 600E PDA Detektor 996 Fraktionssammler	Waters, Eschborn
Hybridisierungsöfen		Amersham Life Science, Braunschweig
Kühlzentrifuge	RC 5B+	Sorvall, Bad Homburg
Mikroskop	Telaval 31	Zeiss, Oberkochen
Mikrowelle	MG 810	Bosch, Hannover
Netzgeräte	Minicell Power Pack P 20 ECPS 3000/150 EPS 500/400 Modell 3000 Xi	Biometra, Göttingen Pharmacia, Freiburg Pharmacia, Freiburg BioRad, München
PAGE-Kammern	Eigenbau der Institutswerkstatt	WWU Münster
Peristaltikpumpe	Peristaltic Pump	Pharmacia, Freiburg
pH-Meter	Delta 350	Mettler-Toledo, Gießen
PhosphorImager <sup>TM</sup>		Molecular Dynamics, Krefeld
Photometer	Novaspec II	Pharmacia, Freiburg
Präparative IEF-Kammer	Rotofor	BioRad, München



**Drucker:**

- HP DeskJet 550 C (Hewlett Packard)
- HP Laserjet 5P, (Hewlett Packard)
- CLC 10 / IPU, (Canon), Farbdrucker, Scanner und Kopierer

**Software:**

Canon	ImageIn	Scannersteuerung und Bildbearbeitung
Molecular Dynamics	ImageQuant	Steuerung des PhosporImagers <sup>TM</sup> und Auswertung digitalisierter Bilder
Pharmacia	FPLCdirector 1.1	Steuerung und Auswertung der FPLC
Waters	Millenium <sup>TM</sup> 2010	Steuerung und Auswertung der HPLC
Dynatech	Biolinx 2.2	Steuerung und Auswertung des ELISA
Microsoft	Exel 5.0	Kalkulations- und Diagrammprogramm
Microsoft	Word 6.0	Textverarbeitung
Jandel Scientific	SigmaPlot 2.01	Kalkulations- und Diagrammprogramm
Corel	CorelDraw 4.0	Bildbearbeitungsprogramm
Trumpet Software	TCPman 2.1 Revision F	Protokoll für Netzwerkanbindung
Netscape	Navigator Gold 3.0	Internet-Browser

### 2.1.3 Chemikalien

Die im folgenden aufgelisteten Chemikalien wurden mindestens in p. a. Qualität beschafft.

Acrylamid	Serva,	Heidelberg
Agarose:	SeaKem (niedrige EEO)	Biozym, Hess. Oldendorf
	SeaPlaque (niedrig schmelzend)	Biozym, Hess. Oldendorf
AgNO <sub>3</sub> (Silbernitrat)	Roth,	Karlsruhe
Ameisensäure	Merck,	Darmstadt
ε-Aminocapronsäure	Sigma,	Deisenhofen
Ampholyte (Servalyt 3 -10)	Serva,	Heidelberg
Ampicillin	Boehringer,	Mannheim
Antifoam A	Sigma,	Deisenhofen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Serva,	Heidelberg
ATP (Adenosintriphosphat)	Boehringer,	Mannheim
N,N'-Methylen-bis-acrylamid	Serva,	Heidelberg
Bromphenolblau	Serva,	Heidelberg
BSA (Rinderserumalbumin, Fraktion V)	Serva,	Heidelberg
CaCl <sub>2</sub> (Kalziumchlorid)	Merck,	Darmstadt
Calcitriol (1,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> )	freundliche Gabe von Dr. M. R.Uskovic, Hoffman La Roche, Nutley, N. J. (USA)	
Casein	Sigma,	Deisenhofen
Castanospermin	Boehringer,	Mannheim
CHCl <sub>3</sub> (Chloroform)	Roth	Karlsruhe
Coomassie <sup>®</sup> Blue (Brilliant Blue G 250)	Serva,	Heidelberg
Cytochrom C	Sigma,	Deisenhofen
dCTP (Desoxycytosintriphosphat)	Boehringer,	Mannheim
dGTP (Desoxyguanosintriphosphat)	Boehringer,	Mannheim
dTTP (Desoxythymidintriphosphat)	Boehringer,	Mannheim
Deoxymannojirimycin	Boehringer,	Mannheim
Deoxynojirimycin	Sigma,	Deisenhofen
3,3'-Diaminobenzidin	Sigma,	Deisenhofen

DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth,	Karlsruhe
DPO (2,5-Diphenyloxazol)	Roth,	Karlsruhe
DTE (Dithioerytriol)	Serva,	Heidelberg
DTT (Dithiothreitol)	Biomol,	Ilvesheim
E-64	Sigma,	Deisenhofen
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck,	Darmstadt
Essigsäure	Roth,	Karlsruhe
Ethanol	Merck,	Darmstadt
Ethidiumbromid	Boehringer,	Mannheim
Ficoll 400	Sigma,	Deisenhofen
Formaldehyd (37%)	Merck,	Darmstadt
Formamid	Merck,	Darmstadt
D(+)-Glukose	Merck,	Darmstadt
Glycerin	ICN	Meckenheim
Glycin	ICN	Meckenheim
Hämoglobin (H-2500)	Sigma	Deisenhofen
HCl (Salzsäure, 32 %)	Merck,	Darmstadt
Hefeextrakt	Roth,	Karlsruhe
HEPES	Biomol,	Ilvesheim
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (Phosphorsäure)	Merck,	Darmstadt
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid, 30%)	Serva,	Heidelberg
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyrannosid)	Biomol	Ilvesheim
Isoamylalkohol	Merck,	Darmstadt
Isopropanol	Roth,	Karlsruhe
JAA (Jodacetamid)	Serva,	Heidelberg
KCl (Kaliumchlorid)	Roth,	Karlsruhe
Laktalbumin	Roth,	Karlsruhe
Laurylsarcosin	Sigma,	Deisenhofen
Leupeptin	Boehringer,	Mannheim
Magermilchpulver	Fluka	Neu-Ulm
α <sub>2</sub> -Makroglobulin (Rind)	Boehringer,	Mannheim
β-Mercaptoethanol	Sigma,	Deisenhofen
Methanol	Baker,	Groß-Gerau
MgCl <sub>2</sub> (Magnesiumchlorid)	Merck,	Darmstadt
Molekulargewichtsstandard (Protein, „low mol. weight“)	BioRad,	München
NaCl (Natriumchlorid)	Roth,	Karlsruhe
NaF (Natriumfluorid)	Merck,	Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck,	Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Natriumdihydrogenphosphat)	Merck,	Darmstadt
NaOH (Natriumhydroxid)	Merck,	Darmstadt
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (Natriumthiosulfat)	Roth,	Karlsruhe
Natriumthioglycolat	Sigma,	Deisenhofen
Natriumdeoxycholot	Merck,	Darmstadt
NH <sub>4</sub> Cl (Ammoniumchlorid)	Merck,	Darmstadt
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> (Ammoniumhydrogencarbonat)	Riedel-De Haën	Hannover
Nonidet P-40 (10 % (w/v)-Lösung)	Boehringer,	Mannheim
Ovalbumin	Sigma,	Deisenhofen
Pefablock <sup>®</sup> SC	Boehringer,	Mannheim
PEG 8000 (Polyethylenglykol)	Serva,	Heidelberg
Pepstatin A	Sigma,	Deisenhofen
Pepstatin A-Agarose	Sigma	Deisenhofen
Phenol	Merck,	Darmstadt

PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Serva,	Heidelberg
Polyvinylpyrrolidon (MW 40.000)	Sigma,	Deisenhofen
Protein Assay Reagenz	BioRad,	München
Saccharose	Roth,	Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat, 100 % C-12)	Serva,	Heidelberg
Szintillationscocktail (Rotiszint eco plus)	Roth,	Karlsruhe
TCA (Trichloressigsäure)	Riedel-De Haën	Hannover
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma,	Deisenhofen
Triethylamin	Sigma,	Deisenhofen
Tris (Trishydroxymethan)	ICN,	Meckenheim
Triton X-100	Serva,	Heidelberg
Trypton-Wasser	Merck,	Darmstadt
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-indolyl- $\beta$ -D-galaktose)	Biomol	Ilvesheim
ZFF (Z-Phe-Phe-diazomethylketon)	Bachem	Heidelberg
Zitronensäure	Roth,	Karlsruhe

Das verwendete H<sub>2</sub>O entstammte in jedem Fall der Milli Q UF-Anlage (Fa. Millipore, Erkrath) und wurde bei Einsatz in der Molekularbiologie bzw. der Zellkultur zusätzlich autklaviert.

#### **2.1.4 DNA**

**Vektoren:** **pVL1392** und **pVL1393** Invitrogen, Leek  
(Niederlande)

Diese Vektoren sind geeignet für die Erstellung eines rekombinanten AcMNP-Virus. Sie besitzen eine multiple Klonierungsstelle in zueinander inverser Orientierung. Die clonierten cDNAs werden unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promotors exprimiert. Die Rekombination mit der AcMNPV-DNA führt zum Austausch des Polyhedringens mit dem rekombinanten Gen in der Virus-DNA.

**pBR 322** Boehringer, Mannheim

Dieser Vektor dient in dieser Arbeit ausschließlich zur Erstellung eines niedermolekularen Standards durch Restriktionsspaltung mit *Hinfl*.

**$\lambda$ -DNA** MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Die DNA dient zur Erstellung eines Molgewichtstandards durch Spaltung mit *HindIII* bzw. *EcoRI*.

**cDNA:** **hCD-cDNA**

Die cDNA des humanen Cathepsin D wurde in unserem Arbeitskreis von M. Horst (1990) isoliert. Sie steht dem Arbeitskreis als pUC19-Klon zur Verfügung. Mit *EcoRI* kann die hCD-cDNA herausgeschnitten und in die oben angegebenen Vektoren kloniert werden.

Kalbsthymus-DNA (ultraschallbehandelt)  
Freiburg

Pharmacia,

Herringssperma-DNA (ultraschallbehandelt)  
Freiburg

Pharmacia,

### **2.1.5 Enzyme**

Die mit „**①**“ markierten Enzyme sind von der Firma Boehringer, Mannheim, die mit „**②**“ markierten von Sigma, Deisenhofen und die mit „**③**“, markierten von MBI Fermentas, St. Leon-Roth bezogen worden.

Carboanhydrase (aus humanen Erythrozyten, EC 4.2.1.1)<sup>②</sup>

DNA-Polymerase (Klenow großes Fragment)<sup>①</sup>

DNase I (EC 3.1.21.1)<sup>①</sup>

*Endo*-β-N-acetylglukosaminidase H (*Endo* H, EC 3.2.1.96)<sup>①</sup>

Glykopeptidase F (GPF, EC 3.5.1.52)<sup>①</sup>

Lysozym (aus Hühnereiweiß, EC 3.2.1.17)<sup>②</sup>

Phosphorylase B (aus Kaninchen-Muskel, EC 2.4.1.1)<sup>②</sup>

Proteinase K (EC 3.4.21.14)<sup>①</sup>

T<sub>4</sub>-DNA-Ligase<sup>①</sup>

Restriktionsendonukleasen<sup>①</sup>: *Bgl*III            A↓GATCT

*Eco*RI            G↓AATTC

*Hind*III A↓AGCTT

*Hin*fI            G↓ANTC

*Kpn*I            GGTAC↓C

### **2.1.6 Radiochemikalien**

$\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (110 TBq/mmol) Amersham Life Science, Braunschweig  
 $^{14}\text{C}$ -KCNO (1,48 - 2,22 GBq/mmol) DuPont NEN<sup>®</sup>, Bad Homburg  
Tran<sup>35</sup>Slabel<sup>TM</sup> (L-Met. (70%), L-Cys. (30%), 40 TBq/mmol) ICN,  
Meckenheim

### **2.1.7 Antikörper**

**Antiseren:** - **Kaninchen-anti-Maus (K $\alpha$ M)**

Arbeitskreiseigene Präparation gegen Maus IgG (H + L)

- **Kaninchen-anti-CDA (R $\alpha$ CDA)**

Antiserum gegen synthetisches Peptid der Prosequenz von Procathepsin D (His<sup>-38</sup>-Gly<sup>-24</sup> der Prosequenz). Hergestellt in unserem Auftrag von der Firma Genosys, Cambridge (England). Der Antikörper erkennt nur Procathepsin D

- **Kaninchen-anti-CDB (R $\alpha$ CDB)**

Antiserum gegen synthetisches Peptid der Prosequenz von Procathepsin D (Ser<sup>-12</sup>-Pro<sup>2</sup> der Prosequenz, C-terminal um einen Glycin-Rest verlängert). Hergestellt in unserem Auftrag von der Firma Genosys, Cambridge (England). Der Antikörper erkennt sowohl Pro- als auch Pseudocathepsin D.

**monoklonale Antikörper:**

- **Maus-anti-Cathepsin D (M $\alpha$ CD)** 3F4, 3G8, 5C11

Die monoklonalen Antikörper sind affinitätsgereinigt und wurden uns von Dr. S. Weitz (Triton Diagnostics, Alameda, CA, USA) zur Verfügung gestellt.

**Peroxidase-gekoppelte Antikörper:**

- **Ziege-anti-Maus IgG (H+L),** BioRad, München  
gekoppelt mit der Meerrettichperoxidase (G $\alpha$ M-POD)

- **Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L),** BioRad, München  
gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (G $\alpha$ K-POD)

## 2.1.8 Biologisches Material und Kultur-Medien

### 2.1.8.1 Eukaryontische Zellen

**U937-Zellen** (ATCC CRL 6465)

Prof. Sorg, WWU Münster, Kinderklinik

(Sundstöm und Nilsson (1976))

Die Promonozytenzelllinie U937 entstammt malignen Zellen eines 37jährigen Kaukasiers mit diffusem histiozytischen Lymphom, die mittels pleuraler Effusion gewonnen wurden. Diese Zellen exprimieren noch viele charakteristische Merkmale von Monozyten (u. a. Fc- und C3-Rezeptoren). Sie werden als Suspensionszellen in RPMI 1640-Medium kultiviert.

**Sf21-Zellen** (IPLB-SF21 AE)

(Vaughn *et al.* (1977))

Die Sf21-Zellen stammen aus dem Ovar-Gewebe von *Spodoptera frugiperda* (Gattung der Lepidoptera) und werden in HINK's- oder SF900II-Medium kultiviert. Dabei wachsen die Zellen semiadhärent, d. h. sie heften sich am Kulturflaschenboden an, lassen sich jedoch mechanisch leicht ablösen.

### 2.1.8.2 Bakterien (Prokaryonten)

***E.coli* CMK 603**

ZMBL

Heidelberg

Genotyp: *thr, leu, thi, supE, T<sup>R</sup>, T5<sup>R</sup>, recBC, R<sup>-</sup>, M<sup>+</sup>, lacYZΔM15, F', Iq, 100x lac-Repressor ZΔM15pro<sup>+</sup>*

### 2.1.8.3 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Pen/Strep-Lösung	10.000 Einheiten/ml	Penicillin
(Life Technologies, Eggenstein)	10.000 µg/ml	Streptomycin

gelöst in physiologischer Kochsalzlösung

#### RPMI 1640-Medium

(Moore *et al.*, 1967)

Das Medium wurde als Pulver von der Firma Life Technologies, Eggenstein bezogen, nach Angaben des Herstellers angesetzt und mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS und 1/100 Volumen Pen/Strep-Lösung komplettiert.

#### RPMI 1640-Markierungsmedium

Hierbei handelt es sich um ein defizientes RPMI 1640-Medium, dem L-Methionin und L-Cystein fehlen. Es wird mit 4 % hitzeinaktiviertem, dialysiertem FKS und 1/100 Volumen Pen/Strep-Lösung komplettiert.

#### Grace-Medium / HINK's-Medium

(Grace, 1962; Hink, 1970)

Das Grace-Medium wird als Pulver von der Firma Sigma, Deisenhofen bzw. Life Technologies, Eggenstein bezogen und nach Angaben der Hersteller angesetzt. Es wird mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS, 1/200 Volumen Pen/Strep-Lösung, 3,34 g/l Yestolate und 3,34 g/l Lactalbumin komplettiert. Das so komplettierte Medium wird HINK's-Medium genannt.

#### Grace/HINK's-Markierungsmedium

Hierbei handelt es sich um ein defizientes Medium, dem L-Methionin und L-Cystein fehlen. Es wird mit 4 % hitzeinaktiviertem, dialysiertem FKS, 1/200 Volumen Pen/Strep-Lösung, 3,34 g/l Yestolate und 3,34 g/l Lactalbumin komplettiert.

#### SF900II-Medium

Das Medium wird in firmeneigener Formulierung (Firma Life Technologies, Eggenstein) geliefert und mit 1/200 Volumen Pen/Strep-Lösung komplettiert.

### 2.1.8.4 Medium für die Bakterienkultur

dYT-Medium:	16 g/l Trypton-Wasser
	10 g/l Hefeextrakt
	5 g/l NaCl

Die hierfür verwendeten Komponenten wurden von den Firmen Merck, Darmstadt und Roth, Karlsruhe (siehe Unterkapitel 2.1.3 „Chemikalien“) bezogen.

### 2.1.9 Sonstige Materialien

#### Kunststoffartikel:

Einmalpipetten (1ml, steril)	Falcon, Heidelberg
Einmalspritzen (1ml, 5ml, 10ml, 50ml, steril)	Falcon, Heidelberg
GSA-Becher (Polypropylen)	Sorvall, Bad Homburg
Kryoampullen (2 ml)	Nunc, Wiesbaden-Biebrich
Kunststoffröhrchen (10ml, 12ml, 50ml, steril)	Greiner, Nürtingen
Mikrotiterplatten (96 Wells)	Nunc, Wiesbaden-Biebrich
Mini- (Ø 35mm) und Midi- (Ø 60mm) Schalen	Greiner, Nürtingen
Reaktionsgefäße (1,5ml und 2,0 ml)	Greiner, Nürtingen
SM 24-Röhrchen (Polypropylen)	Greiner, Nürtingen
SS 34-Röhrchen (Polyallomer, Polysulfon)	Neolab, Heidelberg
SW 41-Röhrchen (ultra clear)	Kobe, Marburg
Szintillationsgefäße (5ml)	Canberra Packard, Dreieich
Ti 70-Röhrchen	Beckman, München
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , Rollerflaschen)	Greiner, Nürtingen

#### Filter, Membranen und Papiere

Blottingpapier (GB 002, entspr. Whatman 3 MM)	Schleicher & Schuell, Dassen
Cellophanfolie	Pütz Folien, Taunusstein-Wehen
Centriprep-30	Amicon, Witten
Dialyseschlauch (Ausschlußgrenze 12 - 14 kDa)	Serva, Heidelberg
Gel-Blotting-Papier (GB 004)	Schleicher & Schuell, Dassen
Microcon-30	Amicon, Witten
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell, Dassel

PM 10-Membran	Amicon, Witten
PVDF-Membran	Applied Biosystems, Weiterstadt
Spritzenvorsatzfilter (0,45µm und 0,2 µm)	Sartorius, Göttingen
Sterilfilter (Medicap-10, Medicap-5)	Integra, Fernwald

**Sonstiges**

FPLC-MonoQ-Säule	Pharmacia, Freiburg
HPLC-Gelfiltrationssäule (GF 450)	DuPont, Bad Homburg
Quarzküvette (5 µl)	Pharmacia, Freiburg
Röntgenfilm (X-OMAT AR)	Kodak, Heidelberg
Midi-Plasmid-Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep-spin Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

**2.2 Methoden**

**2.2.1 Molekularbiologie**

**2.2.1.1 Isolierung von analytischen Mengen Plasmid-DNA ( Mini-Präparation)**

(nach Protokoll der Firma Quiagen, Hilden, 1993)

Zur Anwendung kommt der QIAprep-spin Kit der Firma Qiagen, Hilden mit den darin befindlichen Puffern und Säulen.

5 ml dYT-Medium werden mit einem Einzelklon (rekombinanter *E.coli* CMK 603) oder aus der Glycerinkultur angeimpft, mit 5µl Ampicillin-Lösung (100 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 37° C auf dem Drehrad inkubiert. 1,5 ml dieser Übernachtskultur werden in ein Reaktionsgefäß überführt und die Bakterien mittels Zentrifugation (5 Minuten, 10.000 rpm, 4° C, Sorvall RMC 14) pelletiert. Das Pellet wird in 250 µl P1-Puffer resuspendiert und anschließend mit 250 µl P2-Puffer versetzt. Nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur gibt man 350 µl eiskalten N3-Puffer hinzu, mischt sorgfältig, durch Invertieren des Reaktionsgefäßes und inkubiert 5 Minuten auf Eis. Anschließend wird für 10 Minuten bei 14.000 rpm bei 4° C (Sorvall RMC 14) zentrifugiert. Den klaren Überstand gibt man auf eine QIAprep-spin-Säule, die sich in einem 2 ml-Reaktionsgefäß befindet. Nach einminütiger

Zentrifugation (14.000 rpm, Raumtemperatur, Sorvall RMC 14) wird der Durchbruch verworfen und man gibt 0,5 ml PB-Puffer auf die Säule. Es wird erneut zentrifugiert, der Durchbruch verworfen und auf die Säule 0,75 ml PE-Puffer gegeben. Nach Zentrifugation und Verwerfung des Durchbruchs wird zur Entfernung restlichen PE-Puffers nochmals zentrifugiert. Die QIAprep-spin-Säule wird in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und die DNA durch Zugabe von 50 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5, 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation eluiert.

Die DNA-Konzentration des Eluats wird mit Hilfe des GeneQuant-Photometers gemessen und die DNA mit Hilfe geeigneter Restriktionsspaltungen auf dem Agarosegel kontrolliert.

Die Ausbeuten bei dieser Prozedur betragen bis zu 2 µg DNA.

### **2.2.1.2 Isolierung von präparativen Mengen Plasmid-DNA (Midi-Präparation)**

(nach Protokoll der Firma Qiagen, Hilden, 1995)

Es wird der Midi-Plasmid-Kit der Firma Qiagen, Hilden mit den darin befindlichen Puffern und Säulen verwendet.

Zu 100 ml dYT-Medium werden 0,5 ml einer rekombinanten *E. coli*-Übernachtkultur und 100 µl Ampicillin-Lösung (100 mg/ml) gegeben und über Nacht bei 37° C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wird die Kultur in GSA-Röhrchen überführt und die Bakterien durch 10minütige Zentrifugation bei 4000 x g und 4° C (5000 rpm, GSA-Rotor, Sorvall RC 5B+) pelletiert. Das Pellet wird in 4 ml P1-Puffer resuspendiert und in SS 34-Röhrchen überführt. Man gibt 4 ml P2-Puffer hinzu, mischt sorgfältig und inkubiert 5 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 4 ml eiskaltem P3-Puffer wird 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es schließt sich eine 30minütige Zentrifugation bei 20.000 x g und 4° C (13.000 rpm, SS 34-Rotor, Sorvall RC 5B+) an. Während dieser Zeit wird eine QIAGEN-tip 100-Säule mit 4 ml QBT-Puffer äquilibriert. Nach Beendigung der Zentrifugation gibt man den klaren Überstand auf die Säule. Anschließend wird die Säule zweimal mit je 10 ml QC-Puffer gewaschen. Die Elution wird mit 5 ml QF-Puffer durchgeführt. Dabei läßt man das Eluat in SM 24-Röhrchen tropfen. Zu dem Eluat werden 3,5 ml Isopropanol gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird 30 Minuten bei 18.000 x g und 4° C (12.000 rpm, SM 24-Rotor, Sorvall RC 5B+) zentrifugiert. Das Pellet wird mit 10 ml eiskaltem 70 %igen (v/v) Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und über Nacht in 50 bis 100 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA bei 4° C gelöst. Die DNA-Konzentration wird mit Hilfe des GeneQuant-Photometers

bestimmt und die DNA mit Hilfe geeigneter Restriktionsspaltungen auf dem Agarosegel kontrolliert. Die Ausbeute beträgt bis zu 100 µg DNA.

### 2.2.1.3 Isolierung von AcMNPV-DNA

(nach Summers u. Smith, 1988)

Benötigte Lösungen:	1/10-TE-Puffer	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
		0,1 mM	EDTA
	Extraktions-Puffer	100 mM	Tris/HCl pH 7,5
		100 mM	EDTA
		200 mM	KCl
	Proteinase K-Lösung	10 mg/ml	Proteinase K in H <sub>2</sub> O
	Sarcosin-Lösung	10 % (w/v)	Laurylsarcosin

Das Medium von infizierten Zellen wird 5 Tage nach der Infektion geerntet. Dazu werden die Zellen bei 2500 rpm (Heraeus Labofuge 400e) abzentrifugiert und der Mediumüberstand (60 ml aus vier 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen) in zwei 70 Ti-Röhrchen überführt. Anschließend wird 30 Minuten bei 100.000 x g (50.000 rpm, Ti 70-Rotor, Beckman) bei 4° C zentrifugiert. Je 70 Ti-Röhrchen resuspendiert man das Virus-Pellet in 250 µl 1/10-TE-Puffer und gibt die Suspension auf einen zweistufigen Saccharose-Gradienten. Dazu werden in zwei SW 41-Röhrchen („ultra clear“) 5,5 ml einer 56 %igen (w/v) Saccharose-Lösung in 1/10-TE-Puffer mit 5,5 ml einer 25 %igen (w/v) Saccharose-Lösung in 1/10-TE-Puffer überschichtet. Der Gradient wird nun 90 Minuten bei 100.000 x g (37.000 rpm, SW 41 Ti-Rotor, Sorvall Combi Plus) bei 4° C zentrifugiert. Die breite virale Bande zwischen den beiden Saccharose-Lösungen wird mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen. Man erhält dabei je Gradient ca 1,2 ml, die mit dem zweifachen Volumen 1/10-TE-Puffer verdünnt werden. Die verdünnte Suspension gibt man in SW 41-Röhrchen und zentrifugiert anschließend für 60 Minuten bei 100.000 x g (37.000 rpm, SW 41 Ti-Rotor, Sorvall Combi Plus). Das Viruspellet wird in 450µl Extraktionspuffer aufgenommen und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 5 µl Proteinase K-Lösung wird ein bis zwei Stunden bei 50° C inkubiert. Dann gibt man 50 µl Sarcosin-Lösung hinzu und inkubiert bei 50° C über Nacht. Es schließt sich eine zweimalige Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Volumen-Verhältnis 25:24:1) an. Nach Zugabe von 0,8 ml

eiskaltem Ethanol (entspricht zweifachem Volumen), inkubiert man 30 Minuten bei  $-80^{\circ}\text{C}$  und zentrifugiert anschließend 30 Minuten bei 14.000 rpm (Sorvall RMC 14) bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Das Virus-DNA-Pellet wird in 10  $\mu\text{l}$  1/10-TE-Puffer je Reaktionsgefäß über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelöst.

Die Ausbeute der oben beschriebenen Isolierung beträgt ca. 30  $\mu\text{g}$  Virus-DNA. Diese DNA wurde für die Kotransfektion zur Erlangung von rekombinantem Virus verwendet.

#### **2.2.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

(nach Protokoll der Firma Qiagen, Hilden, 1994)

Zur Anwendung kommt der QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen, Hilden mit den darin befindlichen Puffern und Säulen.

Das gewünschte DNA-Fragment wird auf dem UV-Tisch mit Hilfe eines sterilen Skalpells aus dem Agarosegel herausgeschnitten und anschließend gewogen (um Schädigungen der DNA zu vermeiden, wird sie so kurz wie möglich dem UV-Licht ausgesetzt).

Je 100 mg Gel werden mit 300  $\mu\text{l}$  QX1-Puffer versetzt und anschließend für 10 Minuten bei  $50^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die QIAquick-spin-Säule wird in ein 2 ml Reaktionsgefäß gesetzt und die erhaltene Gel-Lösung aufgetragen. Nach Zentrifugation bei 14.000 rpm (Sorvall RMC 14) für eine Minute bei Raumtemperatur wird der Durchbruch verworfen und auf die Säule 0,75 ml PE-Puffer gegeben. Es wird für eine Minute bei 14.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Durchbruch verworfen und zur Entfernung restlichen PE-Puffers nochmals zentrifugiert. Anschließend wird die Säule in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und das DNA-Fragment mit 30 bis 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  eluiert. Dazu läßt man die Säule zunächst 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen, bevor sie für eine Minute bei 14.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert wird. Das Eluat wird auf einem Agarosegel kontrolliert und mit Hilfe des GeneQuant-Photometers die DNA-Konzentration bestimmt. Ist die Konzentration zu niedrig, so wird das DNA-Fragment in der SpeedVac getrocknet und in entsprechend geringerem Volumen wieder gelöst.

#### **2.2.1.5 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration**

(nach Maniatis *et al.*, 1982; GeneQuant user manual, Pharmacia, Freiburg, 1993)

Zur spektrometrischen Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration kommt das speziell hierfür entwickelte GeneQuant-Photometer der Firma Pharmacia unter Einsatz einer 5  $\mu\text{l}$  Quarzküvette zur Anwendung.

5 µl der in TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O gelösten DNA werden hierfür luftblasenfrei in die Küvette pipettiert und simultan bei 260 bzw. 280 nm gemessen. Bei entsprechender Programmierung liefert das Gerät automatisch folgende Ergebnisse: die OD<sub>260</sub>, die OD<sub>280</sub>, die Konzentration und den Reinheitsfaktor.

Dabei entspricht eine OD<sub>260</sub> von 1 ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA und 37 µg/ml einzelsträngiger DNA. Aus dem Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> ergibt sich die Reinheit der DNA bzw. RNA. Bei reiner DNA-Lösung liegt der Faktor bei 1,8. Liegt der gemessene Wert darüber, so ist es ein Hinweis auf eine mögliche Verunreinigung durch RNA. Liegt der gemessene Wert darunter, so ist dies ein Indiz für eine mögliche Proteinkontamination und/oder für das Vorhandensein von organischen Lösungsmitteln. Eine reine RNA-Lösung weist einen Reinheitsfaktor von 2,0 auf.

### **2.2.1.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Bei allen Restriktionspaltungen wurde den Angaben im Katalog der Firma Boehringer, Mannheim (1993) gefolgt.

Benötigte Lösungen:	10xPuffer B	100 mM	Tris/HCl pH 8,0
		50 mM	MgCl <sub>2</sub>
		1 M	NaCl
		10 mM	β-Mercaptoethanol
	10xPuffer L	100 mM	Tris/HCl pH 7,5
		100 mM	MgCl <sub>2</sub>
		10 mM	Dithioerythritol
		100 µg/ml	BSA
	10xPuffer M	100 mM	Tris/HCl pH 7,5
		100 mM	MgCl <sub>2</sub>
		500 mM	NaCl
		10 mM	Dithioerythritol
	Auftragspuffer	siehe 2.2.1.4	

Die Aktivität der Restriktionsendonukleasen ist wie folgt definiert: 1 Unit Enzym spaltet 1 µg λ-DNA in einer Stunde bei 37° C. Dieses dient zur Berechnung des Versuchsansatzes.

Eine analytische Spaltung wird im 10 µl Volumen 1 Stunde bei 37°C durchgeführt. Dabei enthält der Versuchsansatz 1µl 10xPuffer, 100 bis 500 ng DNA (50 - 100 ng je zu erwartender Bande) und 0,5 µl Enzym (entspricht ca. 2 Units, das ist in den meisten Fällen zuviel Enzym, gewährleistet jedoch einen vollständigen Verdau). Der Spaltansatz wird anschließend mit 2 µl Auftragspuffer versetzt und mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Präparative Spaltungen werden in größeren Volumina (bis zu 200 µl), mit größerer DNA-Menge (bis zu 40 µg) und entsprechend mehr Enzym durchgeführt, wobei die Inkubationsdauer auf über Nacht ausgedehnt wird. Präparative Spaltungen dienen in aller Regel der Isolierung von DNA-Fragmenten. Dazu wird der Spaltansatz auf einem Agarosegel aufgetrennt, die interessierende Bande anschließend ausgeschnitten und mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kits“ der Firma Qiagen, Hilden (siehe 2.2.1.4) isoliert.

### 2.2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

(nach Perbal, 1988)

Benötigte Lösungen:	TAE-Puffer	40 mM	Tris/Acetat pH 8,5
		1 mM	EDTA

Auftragspuffer	0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
	40 % (w/v)	Saccharose

Agarose-Lösung	0,7 % (w/v)	SeaKem-Agarose („low EEO“) in TAE-Puffer
----------------	-------------	--

	0,5 µg/ml	Ethidiumbromid
--	-----------	----------------

0,7 g Agarose werden in 100 ml TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst, bis keine Schlieren mehr zu erkennen sind. Anschließend wird das verdunstete Wasser ersetzt. Das Ethidiumbromid wird erst nach Abkühlen der Agarose-Lösung auf ca. 55° C hinzugegeben.

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente werden ausschließlich nichtdenaturierende Agarosegele eingesetzt. Die Fragmente werden dabei nach Größe, Ladung und Konformation getrennt. Die Agarosekonzentration richtet sich nach der Größe der zu trennenden Fragmente. Bei den

Versuchen, die in dieser Arbeit beschrieben werden, kommt nur 0,7 %ige Agarose-Lösung (Trennbereich 0,5 bis 10 kB) zur Anwendung.

Für die Agarose-Gelelektrophorese werden horizontale Gelapparaturen eingesetzt. Die Gel-Lösung wird dabei in einen, an den Kopfenden abgedichteten, Flachbettschlitten gegossen, wobei die Dicke des Gels 3 bis 5 mm betragen soll. Daraufhin setzt man den Kamm ein. Nach Erkalten der Gel-Lösung werden die Dichtungen an den Kopfenden, sowie der Kamm entfernt und das Gel in die Kammer eingesetzt. Die Kammer wird mit soviel TAE-Puffer gefüllt, daß das Gel knapp bedeckt ist.

Die Proben werden nun mit 1/5 Volumen Auftragspuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Anschließend wird die Elektrophorese bei 40 - 100 V für 1 bis 4 Stunden durchgeführt. Der Fortgang der Elektrophorese läßt sich anhand des Farbmarkers (Bromphenolblau), der dem Auftragspuffer zugesetzt ist, verfolgen. Nach Beendigung der Elektrophorese läßt sich die DNA aufgrund des dem Gel zugesetzten Ethidiumbromids auf einem UV-Tisch bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar machen. Die Dokumentation der Gele erfolgt mit Hilfe des Videodokumentationssystems der Firma INTAS, Göttingen .

### 2.2.1.8 Ligation von Fragmenten mit überstehenden Enden

(nach Maniatis *et al.*, 1982)

Benötigte Lösung:	10xLigations-Puffer	660 mM	Tris/HCl pH 7,5
		50 mM	MgCl <sub>2</sub>
		50 mM	DTT
		10 mM	ATP

Wird für die Ligation auf die Dephosphorylierung verzichtet, so wird das Insert in fünffach molarem Überschuß eingesetzt (bei dephosphoryliertem Vektor setzt man Vektor und Insert in äquimolaren Mengen ein).

Zu 20 fmol Vektor-DNA werden 100 fmol Insert, 1 µl 10 x Ligations-Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) zugegeben. Mit H<sub>2</sub>O bringt man das Reaktionsvolumen auf 10 µl. Die Ligation wird über Nacht bei 16° C durchgeführt und ein Aliquot am nächsten Tag in kompetente Bakterien transformiert. Den Rest der Ligation lagert man bei - 20° C.

### 2.2.1.9 Präparation kompetenter Bakterien und Transformation

(nach Ausubel *et al.*, 1987)

Benötigte Lösungen:	TSS-Puffer	10 % (w/v)	PEG 8000
		5 % (w/v)	DMSO
		20 mM	MgCl <sub>2</sub>

Die Lösung wird in dYT-Medium unter sterilen Bedingungen hergestellt.

dYT-Medium            siehe 2.1.8.4

Die hier beschriebene Methode empfiehlt sich durch ihre Einfachheit und ihre hohe Effizienz.

Man impft 3 ml dYT-Medium mit einer Einzelkolonie *E.coli* CMK 603 an und inkubiert über Nacht bei 37° C auf dem Drehrad. Diese Übernachtskultur wird am nächsten Tag im Amplifizierungskolben hundertfach verdünnt und bis zur Erreichung einer OD<sub>578</sub> von 0,35 (logarithmische Wachstumsphase der Bakterien) bei 37° C auf dem Schüttler inkubiert.

Die 100 ml-Bakterienkultur gibt man in SS 34-Röhrchen und zentrifugiert die Bakterien bei 3000 x g 10 Minuten bei 4° C ab. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 1/10 des Ausgangsvolumens in eiskaltem TSS-Puffer resuspendiert. Anschließend aliquotiert man die kompetenten Bakterien zu je 300 µl pro Reaktionsgefäß.

Es schließen sich nun folgende Optionen an:

- Lagerung: Die Reaktionsgefäße mit den kompetenten Bakterien werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und können bei  $-70^{\circ}\text{C}$  für ca. 4 Wochen ohne Verlust der Kompetenz gelagert werden. Zum Gebrauch werden sie langsam auf Eis aufgetaut und wie folgt weiterverarbeitet.
- Weiterverarbeitung: Zu den 300  $\mu\text{l}$ -Aliquots gibt man bis zu 10 ng Plasmid-DNA eines Ligationsansatzes für die folgende Transformation hinzu.

-Transformation

und Ausstreichung: Die Transformation wird 60 Minuten lang auf Eis durchgeführt. Es schließt sich ein dreiminütiger Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  an. Anschließend werden 700  $\mu\text{l}$  dYT-Medium hinzugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  auf dem Drehrad inkubiert. Es werden 1/10 bzw. 9/10 auf antibiotikahaltige dYT-Platten (das zu verwendende Antibiotikum richtet sich dabei nach dem im Plasmid enthaltenen Resistenzgen, in diesem Fall Ampicillin) ausgestrichen. Die Platten läßt man über Nacht, auf dem Kopf (Deckel nach unten) liegend, bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubieren.

Die Effizienz dieser Methode liegt bei  $10^6$  bis  $10^7$  Kolonien pro  $\mu\text{g}$  transformierter DNA.

### **2.2.1.10 Präparation von Glycerinkulturen zur Langzeitlagerung von Bakterien**

(nach Maniatis *et al.*, 1982)

Man impft 4,5 ml dYT-Medium mit 0,5 ml einer Übernachtskultur rekombinanter Bakterien an und inkubiert für weitere 4 bis 6 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  auf dem Drehrad. In dieser Zeit gelangen die Bakterien in die logarithmische Wachstumsphase. In eine Kryoampulle werden 172  $\mu\text{l}$  87 %iges (v/v) Glycerin vorgelegt. Man gibt 828  $\mu\text{l}$  der oben genannten Kultur hinzu und mischt die Lösung rasch durch Auf- und Abpipettieren. Die so erhaltene Glycerinkultur wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und kann anschließend bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Wenn man ein Aliquot dieser Glycerinkultur zur Amplifizierung entnimmt, sollte man darauf achten, daß die Kultur nicht ganz auftaut, d. h. sie wird erst unmittelbar vor Gebrauch aus dem  $-70^{\circ}\text{C}$ -Gefrierschrank entnommen, auf Eis gehalten und direkt nach Gebrauch wieder eingefroren. Mehrere Frier-Tau-Schritte zerstören die Glycerinkultur.

### 2.2.1.11 Radioaktive Markierung von DNA durch „Random Priming“

(nach Feinberg u. Vogelstein, 1983)

Benötigte Lösungen:	TM	250 mM	Tris/HCl pH 8,0
		25 mM	MgCl <sub>2</sub>
		50 mM	β-Mercaptoethanol
	DTM	100 μM	dCTP in TM
		100 μM	dGTP in TM
		100 μM	dTTP in TM
	OL	1,8 μg/μl	Random-Primer (N <sub>6</sub> ) in 1 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA
	LS	1 M HEPES pH 6,6:DTM:OL im Volumen-Verhältnis 25:25:7	

10 bis 100 ng DNA in 1 bis 5 μl Lösung werden unmittelbar vor der Reaktion 5 Minuten auf 100° C erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt.

Auf Eis wird folgender Reaktionsmix pipettiert:	1 - 5 μl	DNA (10 bis 100 ng)
	11 μl	LS
	0,5 μl	BSA (20 mg/ml)
	1 μl	Klenow-Fragment (2,5U/μl)
	5-10 μl	α <sup>32</sup> P-dATP (10 μCi/μl, 3000 Ci/mmol)
	x μl	H <sub>2</sub> O
	Σ	25 μl

Die Komponenten werden an den Rand des Reaktionsgefäßes pipettiert und durch kurzes Zentrifugieren gemischt. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur wird die Reaktion entweder durch Zugabe von 1 μl 0,5 M EDTA gestoppt oder direkt mittels einer NENSORB<sup>®</sup>-Säule gereinigt.

Die Einbauraten betragen in der Regel bei „Random Priming“-markierter DNA 10<sup>8</sup> bis 10<sup>9</sup> cpm/μg DNA.

### 2.2.1.12 Reinigung der radioaktiv markierten DNA über eine NENSORB<sup>®</sup>-Säule

(nach Angaben des Herstellers DuPont, 1992)

Benötigte Lösung:	Puffer A	100 mM	Tris/HCl pH 7,5
		1 mM	EDTA
		10 mM	Triethylamin

Die NENSORB<sup>®</sup>-Säule wird zweimal mit je 1 ml Methanol gewaschen und anschließend mit zweimal je 1 ml Puffer A äquilibriert.

Die radioaktiv markierte DNA wird mit Puffer A auf 250 µl (mindestens 1 : 1) aufgefüllt und auf die Säule gegeben. Die Säule wird dreimal mit 1 ml Puffer A und einmal mit 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Eluiert wird zweimal mit je 200 µl 50 %igem (v/v) Ethanol.

Die Waschlösungen werden vereinigt, ebenso die beiden Eluate. Jeweils 0,01 Volumen der Pools werden in ein Reaktionsgefäß überführt und zwecks Bestimmung der Einbaurate im Szintillationszähler ohne weitere Zusätze gezählt (Cerenkov-Zählung, Kellogg (1978)).

Bei endmarkiertem DNA-Standard schließt sich der NENSORB<sup>®</sup>-Säulen-Reinigung zwecks Konzentrierung eine Ethanol-fällung an. Dazu werden die Eluate vereinigt und mit 70 µl 3 M NaAc pH 5,2, 1 µl unmarkiertem DNA-Standard (400 ng als Präzipitationshilfe) und 300 µl Ethanol versetzt. Nach Inkubation über Nacht bei -20° C wird 30 Minuten bei 14.000 rpm bei 4° C (Sorvall RMC 14) zentrifugiert. Das Pellet wird mit eiskaltem, 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und in 20 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA aufgenommen.

## 2.2.2 Zellkultur

### 2.2.2.2 Zellzählung

(nach Angaben des Herstellers Firma Schärfe, 1995)

Hierfür wird das Zellzählgerät CASY<sup>®</sup>1 der Firma Schärfe, den Angaben des Herstellers folgend, verwendet.

Benötigte Lösung:	isotonische Kochsalzlösung	7,94 g/l	NaCl
		0,38 g/l	EDTA
		0,40 g/l	KCl
		0,19 g/l	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		1,95 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		0,30 g/l	NaF

Zur Zählung der U937-Zellen (Suspensionszellen) werden 100µl Zellsuspension auf 10 ml mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnt und in einem Größenbereich von 3 bis 20 µm gezählt.

Zur Zählung der Sf21-Zellen (semiadhärente Zellen) werden die Zellen mit Hilfe einer Pipette vom Kulturflaschenboden abgespült (in Rollerflaschen kultivierte Zellen wachsen in Suspension). 20 µl der so erhaltenen Suspension werden mit isotonischer Kochsalzlösung auf 10 ml aufgefüllt und in einem Größenbereich von 3,2 bis 22 µm gezählt.

### 2.2.2.2 Kultivierung von humanen Promonozyten (U937)

(nach Gupta *et al.*, 1984; Stein *et al.*, 1987; Redecker *et al.*, 1989)

Die humanen Promonozyten U937 werden in sterilen 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen in einer 5 %igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37° C in 5 bis 10 ml RPMI 1640-Medium kultiviert. Dabei wachsen die Zellen in Suspension. Anfangs werden die Zellen mit einer Dichte von 1×10<sup>5</sup> Zellen pro ml Medium ausgesät. Diese Kultur wächst innerhalb von drei Tagen auf eine Dichte von 1 bis 1,5×10<sup>6</sup> Zellen/ml an und muß dann wieder verdünnt werden. Dazu wird das Medium mit den Zellen entnommen. Die Zellen werden gezählt und bei 800 rpm (Heraeus Labofuge 400e) abzentrifugiert. Entsprechend der Zellzahl werden die Zellen auf neue 25 cm<sup>2</sup>-Flaschen verteilt, so daß die Dichte 1×10<sup>5</sup> Zellen/ml beträgt.

Sollen die Zellen mit Calcitriol stimuliert werden, so sät man sie mit einer Dichte von 2×10<sup>5</sup> Zellen/ml in, mit 10<sup>-7</sup> M Calcitriol versetztem, RPMI 1640-Medium inkl. 10 %

hitzeinaktiviertem FKS, aus. Dabei wird lyophilisiertes Calcitriol zunächst in Ethanol (1 mM) gelöst. Von dieser ethanolischen Lösung wird eine  $10^{-5}$  M Zwischenverdünnung in RPMI 1640-Medium inkl. 10 % hitzeinaktiviertem FKS angesetzt. Beide Lösungen werden bei  $-20^{\circ}$  C gelagert.

Calcitriolbehandelte U937-Zellen können nach drei Tagen Kultivierung für weitere Versuche eingesetzt werden (metabolische Markierung, Proteinassays usw.).

### **2.2.2.3 Kultivierung von Insektenzellen (Sf21)**

(nach Summers u. Smith, 1988)

#### **2.2.2.3.1 Kultivierung in 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen**

Die Zellen einer Kryoampulle (ca.  $10^6$  Sf21-Zellen) werden mit 20 ml HINK's-Medium in einer 75 cm<sup>2</sup>-Flasche ausgesät und bei  $27^{\circ}$  C kultiviert.

Zum Zeitpunkt der Konfluenz wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml frischem Medium mit Hilfe einer Pipette abgespült. Die so erhaltene Zellsuspension wird auf drei 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen aufgeteilt, mit HINK's-Medium auf 20 ml aufgefüllt und weiter bei  $27^{\circ}$  C kultiviert.

Erfahrungsgemäß werden diese Kulturen innerhalb von drei bis vier Tagen wieder Konfluenz erreichen und müssen wie oben beschrieben versorgt werden.

#### **2.2.2.3.2 Kultivierung in Rollerflaschen**

Die Kultivierung von Sf21-Zellen in Rollerflaschen erfolgt in serumfreiem Medium (SF900II), da die Zellen in serumhaltigem Medium (HINK's) zum einen sehr stark aggregieren und zum anderen wesentlich empfindlicher gegen mechanischen Streß sind. Bei ständiger Bewegung (rollende Flaschen) wachsen die Zellen, sowohl im serumhaltigen (HINK's) als auch im serumfreien Medium (SF900II), nicht mehr semiadhärent, sondern in Suspension.

Die Zellen aus drei konfluenten 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen (ca.  $60 \times 10^6$  Sf21-Zellen) werden mit je 10 ml SF900II-Medium abgespült und in eine Rollerflasche überführt. Danach wird die Mediummenge auf 100 ml serumfreies Medium aufgefüllt. Die Kultur wird bei  $27^{\circ}$  C auf einem Rollertablett bei 8 Umdrehungen pro Minute inkubiert.

Jeweils nach zwei bis drei Tagen werden zu dieser Kultur 100 ml SF900II-Medium zugefügt. Beträgt das Medium-Volumen 300 ml, so wird die Kultur nach zwei weiteren Tagen halbiert und mit SF900II-Medium auf je 300 ml aufgefüllt. Sind auf diese Weise drei

Rollerflaschen angewachsen, so werden sie für die Infektion bzw. für die Produktion von rekombinatem Protein eingesetzt (siehe 2.2.2.7).

### 2.2.2.3.3 Langzeitlagerung von Sf21-Zellen

Benötigte Lösungen:	Einfriermedium	50 % (v/v)	kond. HINK's
		40 % (v/v)	HINK's
		10 % (v/v)	DMSO

Zur Langzeitlagerung werden die Zellen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  (Gasphase von flüssigem Stickstoff) eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) verbracht. Dazu empfiehlt es sich, die Zellen (logarithmische Wachstumsphase) aus der Rollerflasche zu verwenden, da diese nicht - wie bei Zellen in Kulturflaschen notwendig - mechanisch abgespült werden müssen und somit die Zellen deutlich vitaler sind.

Die Zellen werden aus der Rollerflasche entnommen und bei 800 rpm (Heraeus Labofuge 400e) abzentrifugiert. Es wird soviel Einfriermedium zu dem Zellpellet gegeben, daß die resultierende Dichte  $10^6$  Zellen pro ml beträgt. Aliquots von 1 ml überführt man in Kryogefäße, wobei diese mit Hilfe eines entsprechenden Einfrierstutzens für 2 bis 12 Stunden in die Gasphase von flüssigem Stickstoff gehängt und anschließend in entsprechenden Aufbewahrungsbehältern in flüssigem Stickstoff versenkt werden.

### 2.2.2.4 Herstellung des rekombinanten Virus durch Kotransfektion des rekombinanten Plasmids und der AcMNPV-DNA

(nach Summers u. Smith, 1988)

Benötigte Lösungen: <b>HEBS/CT-Lösung:</b>	<b>10xStamm:</b>	1,37 M	NaCl
		60 mM	D(+)-Glukose
		5 mM	KCl
		0,7mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		20mM	HEPES

Die Lösung wird mit 5 M NaOH auf pH 7,1 eingestellt, sterilfiltriert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

#### 1xGebrauchslösung:

10 ml der 10xHEBS/CT-Lösung werden mit 1,5 ml ultraschall-behandelter Kalbthymus DNA (1 mg/ml) und 88,5 ml H<sub>2</sub>O versetzt. Nach Kontrolle des pH und gegebenenfalls erneuter Einstellung auf pH 7,05 - 7,1 wird die Lösung bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

<b>CaCl<sub>2</sub>-Lösung:</b>	2,5 M	CaCl <sub>2</sub>
---------------------------------	-------	-------------------

In einer 25 cm<sup>2</sup>-Flasche werden 2,5×10<sup>6</sup> Sf21-Zellen in 5 ml HINK's-Medium ausgesät. Während des Anheftens der Zellen an den Flaschenboden (ca. eine Stunde bei 27° C) werden die benötigten Puffer (HEBS/CT und CaCl<sub>2</sub>) auf Raumtemperatur vorgewärmt.

Das Medium wird von den Zellen abgenommen und gegen 2 ml frisches HINK's-Medium ausgetauscht. Die Kultur verbleibt nun bis zur Transfektion bei Raumtemperatur.

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß werden 1µg AcMNPV-DNA und 2 µg des rekombinanten Plasmids (pVL1393/CD) gemischt. Zu der DNA gibt man 950 µl der vorgewärmten HEBS/CT-Lösung und mischt sorgfältig mit Hilfe eines Vortexers. Nach Zugabe von 50 µl der vorgewärmten CaCl<sub>2</sub>-Lösung wird erneut sorgfältig gemischt. Diese Mischung wird 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor man sie tropfenweise zu der vorbereiteten Kultur (siehe oben) gibt.

Die Zellen werden in dieser Transfektionslösung 4 Stunden bei 27° C inkubiert. Anschließend wird das Medium abgenommen, die „schwimmenden“ Zellen abzentrifugiert, in 5 ml frischem HINK's-Medium resuspendiert und in eine neue 25 cm<sup>2</sup>-Flasche ausgesät. Zu den adhären Zellen werden ebenfalls 5 ml frisches HINK's-Medium zugegeben. Die beiden Kulturen werden weitere 4 bis 6 Tage bei 27° C kultiviert.

Den Erfolg der Transfektion kontrolliert man nach 5 Tagen durch Bestimmung der Cathepsin D-Aktivität im Medium (siehe 2.2.3.4). Ist dieser Test positiv, so wird das viruspartikelhaltige Medium abgenommen, die „schwimmenden“ Zellen abzentrifugiert (2500 rpm, Heraeus Labofuge 400e) und der Mediumüberstand bis zur weiteren Verwendung bei 4° C gelagert. Medium, welches rekombinante Viruspartikel enthält wird im folgenden mit **HINK's/CD**-Medium bezeichnet, da mit diesem Medium infizierte Zellen rekombinantes, humanes Procathepsin D produzieren.

## 2.2.2.5 Identifizierung und Reinigung des rekombinaten Virus durch Plaque-Hybridisierung

(nach Villareal u. Berg, 1977)

### 2.2.2.5.1 Plaque-Assay und Abklatsch auf NC-Filter

Benötigte Lösungen: 1,5 % (w/v) SeaPlaque-Agarose in HINK's-Medium

HINK's-Medium wird in doppelkonzentrierter Form hergestellt, sterilfiltriert und im Wasserbad auf 37° C warmgehalten. Pro Miniplatte werden 45 mg SeaPlaque-Agarose in 1,5 ml H<sub>2</sub>O durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und danach im Wasserbad bei 37° C flüssiggehalten. Direkt vor Gebrauch wird pro Miniplatte zu der 1,5 ml SeaPlaque-Lösung 1,5 ml warmes, doppelkonzentriertes HINK's-Medium zugegeben und direkt auf die infizierten Zellen in die Miniplatte gegossen.

X-Gal-Lösung	0,2% (w/v) X-Gal in HINK's-Medium (4%ige (w/v) Stammlösung in DMF 1:20 verdünnt in HINK's-Medium)
Lösung B	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Puffer C	1,0 M Tris/HCl pH 7,4 1,5 M NaCl
Puffer D	0,3 M NaCl 0,03 M Na-Citrat pH 7,0

Von dem unter 2.2.2.4 erhaltenen virushaltigem HINK's/CD-Medium werden je 500 µl einer 10<sup>-3</sup>-, 10<sup>-4</sup>-, 10<sup>-5</sup>- und 10<sup>-6</sup>fachen Verdünnung hergestellt. Desweiteren werden 5 Miniplatten (Ø

35 mm) dergestalt vorbereitet, daß pro Miniplatte  $2 \times 10^6$  Sf21-Zellen in 2 ml HINK's-Medium ausgesät werden. Innerhalb von 2 Stunden bei Raumtemperatur heften sich die Zellen am Boden der Miniplatte an. Anschließend wird das Medium abgenommen und gegen die oben beschriebenen, verdünnten Virus-Medien ausgetauscht. Als Kontrolle dient eine Miniplatte mit 500 µl Medium ohne Virus. Die Miniplatten werden 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, wobei sie alle 15 Minuten leicht geschwenkt werden. Danach wird das Medium gegen 3 ml 1,5 %iges, 37° C warmes SeaPlaque-Agarose-Medium ausgetauscht. Nach ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur ist die Agarose ausgehärtet.

Die Schalen werden für 3 Tage auf dem Kopf liegend (mit dem Deckel nach unten) in feuchter Atmosphäre bei 27° C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl X-Gal-Lösung pro Miniplatte werden die Kulturen weitere 2 Tage in trockener Atmosphäre bei 27° C inkubiert.

Die „trockene“ Agarose wird nun jeweils aus der Miniplatte in eine Midischale (Ø 60 mm) gestürzt, so daß die Zellseite nach oben liegt. Auf die Zellseite wird luftblasenfrei eine passende Nitrocellulose-Membran aufgelegt. Anschließend werden durch Durchstechen durch die Membran und die Agarose die Positionen 12<sup>00</sup>, 3<sup>00</sup> und 7<sup>00</sup> Uhr markiert. Die Membran verbleibt für ca. 1 Minute auf der Agarose und wird danach mit der Zellseite nach oben auf ein mit Lösung B getränktes Blottingpapier luftblasenfrei aufgelegt. Nach 2 Minuten wird die Membran für weitere 2 Minuten auf ein mit Puffer C getränktes Blottingpapier gelegt, bevor sie in Puffer D gespült und auf Blottingpapier getrocknet wird. Nachdem der Abklatsch von allen Miniplatten erfolgt ist, und alle Membranen trocken sind, werden diese 2 Stunden bei 80° C „gebacken“. Die Filter sind nun fertig für die Hybridisierung.

### 2.2.2.5.2 Hybridisierung der NC-Filter nach Abklatsch

Benötigte Lösungen:	20xSSC-Lösung	3 M	NaCl
		0,3 M	NaCitrat pH 7,0
50xDenhardts-Lösung		1% (w/v)	BSA
		1% (w/v)	Ficoll
		1% (w/v)	Polyvinylpyrrolidon
Hybridisierungslösung		50% (v/v)	Formamid
		5 x	Denhardts-Lösung
		6 x	SSC
		0,1% (w/v)	SDS
		100 µg/ml	Heringssperma-DNA

Jeweils 4 NC-Filter (siehe 2.2.2.5.1) werden zwecks Prähybridisierung in einer Midischale (Ø 60 mm) mit 7,5 ml Hybridisierungslösung für 4 Stunden bei 42° C auf einer Wippe inkubiert. Anschließend werden zu jeder Midischale  $1,2 \times 10^6$  cpm einer mit  $^{32}\text{P}$ -markierten humanen Cathepsin D-cDNA-Sonde (siehe 2.2.1.8.1) gegeben und die NC-Filter über Nacht bei 42° C auf einer Wippe hybridisiert..

Am nächsten Tag werden die Filter zweimal mit je 7,5 ml pro Midischale mit 2xSSC; 0,1% SDS für 15 Minuten bei Raumtemperatur, dann mit 50 ml 2xSSC; 0,1% SDS für 30 Minuten bei 65° C und letztlich mit 50 ml 0,2xSSC; 0,1% SDS für 60 Minuten bei 65° C gewaschen. Nach Einschweißen der feuchten NC-Filter in Folie und Nachzeichnen der Positionsmarkierungen mit  $^{14}\text{C}$ -Tinte wird ein Röntgenfilm aufgelegt und bei -70° C exponiert. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgt mit Hilfe eines Entwicklungsautomaten.

### 2.2.2.5.3 Elution des rekombinanten Virus

(nach Summers u. Smith, 1988)

Nach der Hybridisierung (siehe 2.2.2.5.2) werden die erhaltenen Röntgenfilme an Hand der Markierungen mit der entsprechenden Miniplatte in Deckung gebracht und die Agarose - an der Stelle eines positiven Signals - mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen. Ein solches Agarosestück gibt man in ein Reaktionsgefäß mit 0,5 ml HINK's-Medium und eluiert den Virus über Nacht bei 4° C auf dem Drehrad. Mit 100 µl dieses Virus-Eluates (HINK's/CD) werden

$2 \times 10^6$  Sf21-Zellen in 4,9 ml HINK's-Medium in einer 25 cm<sup>2</sup>-Flasche infiziert. Nach 10 Tagen Inkubation bei 27° C wird mit Hilfe des CD-Assays (siehe 2.2.3.4) die Expressionsleistung überprüft.

Um wildtypfreien rekombinanten Virus zu erhalten, wird die Prozedur der Plaque-Hybridisierung dreimal in Folge mit den entsprechenden Virus-Eluaten (jeweils 10<sup>-5</sup>- bis 10<sup>-7</sup>fache Verdünnungen) durchgeführt.

Das so letztendlich erhaltene Virus-Eluat (HINK's/CD) dient zur Amplifizierung bzw. Herstellung der Virus-Stammlösungen für die Produktion von rekombinantem Protein.

### **2.2.2.6 Herstellung der Virus-Stammlösung (HINK's/CD)**

(nach Summers u. Smith, 1988)

Von einer konfluenten 25 cm<sup>2</sup>-Flasche wird das Medium von den Zellen abgesaugt und durch 4,9 ml HINK's-Medium ersetzt. Zusätzlich gibt man 100 µl des unter 2.2.2.5.3 erhaltenen Virus-Eluates hinzu. Es wird für 4 bis 5 Tage bei 27° C inkubiert. Anschließend wird das Medium geerntet und die Zellen bei 2500 rpm (Heraeus Labofuge 400e) pelletiert. Der Virustiter eines solchen HINK's/CD-Mediums wird mit Hilfe der Plaque-Hybridisierung bestimmt und beträgt in der Regel 10<sup>8</sup> pfu pro ml. Dieses Medium kann nun für weitere Virusamplifikationen bzw. zur Produktion von rekombinantem Procathepsin D genutzt werden. Die Lagerung des HINK's/CD-Mediums erfolgt bei 4° C und ist über Jahre stabil.

Die Virusamplifikation kann auch in einer konfluenten 75 cm<sup>2</sup>-Flasche erfolgen. Dazu wird das Medium von den Sf21-Zellen abgesaugt und gegen 14 ml HINK's-Medium ausgetauscht. Die Infektion erfolgt durch Zugabe von 1 ml, rekombinanten Virus enthaltendem, HINK's/CD-Medium. Nach 4 bis 5 Tagen kann das Virusmedium geerntet werden.

### **2.2.2.7 Infektion von Sf21-Zellen zur Produktion von rekombinantem Procathepsin D in Rollerflaschen**

Aus drei Rollerflaschen (siehe 2.2.2.3.2, je 300 ml mit 1 -  $2 \times 10^6$  SF21/ml) werden die Zellen abzentrifugiert (800 rpm, Heraeus Labofuge 400e). Das Zellpellet wird in 90 ml HINK's-Medium resuspendiert (die Zelldichte soll ca.  $10 \times 10^6$  SF21/ml betragen) und in eine Rollerflasche überführt. Durch Zugabe von 10 ml HINK's/CD-Medium (entspricht einer MOI von 10) werden die Zellen eine Stunde bei 27° C auf dem Rollertablett infiziert. Anschließend werden 200 ml HINK's-Medium zugegeben, so daß die Zelldichte  $3 \times 10^6$ /ml beträgt. (Anstelle

des HINK's-Mediums kann auch SF900II-Medium verwendet werden, dann sollten allerdings Proteinase-Inhibitoren zugesetzt werden, siehe Ergebnisse, Kapitel 3.7)

Nach 5 Tagen Kultivierung wird das Medium geerntet. Dazu werden die Zellen bei 2500 rpm (Heraeus Labofuge 400e) abzentrifugiert, der Mediumüberstand mit 1/1000 Volumen 0,5 M JAA zur Inhibierung von SH-Proteinasen versetzt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20° C eingefroren.

### 2.2.2.8 Metabolische Markierung von humanem Procahtepsin D

(nach Hasilik u. Neufeld, 1980)

Benötigte Lösungen:	5xIMMIX	50 mM	NaP <sub>i</sub> pH 7,4
		770 mM	NaCl
		2,5% (w/v)	Na-Deoxycholat
		2,5% (w/v)	BSA
		5% (v/v)	Triton X-100
		unmittelbar vor Gebrauch gibt man zu je 1 ml 5xIMMIX 25µl der PMSF-, 50 µl der JAA-, 50 µl der MgCl <sub>2</sub> - und 10 µl der DNase-Lösung	
	1xIMMIX	1:5 Verdünnung des 5xIMMIX mit H <sub>2</sub> O	
		unmittelbar vor Gebrauch gibt man zu je 1 ml 1xIMMIX 5 µl der PMSF-, 10 µl der JAA-, 10 µl der MgCl <sub>2</sub> - und 2 µl der DNase-Lösung	
	PMSF-Lösung	0,2 M	PMSF in DMSO
	JAA-Lösung	0,5 M	JAA in H <sub>2</sub> O
	MgCl <sub>2</sub> -Lösung	1 M	MgCl <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O
	DNase-Lösung	10 mg/ml	DNase I in H <sub>2</sub> O

### 2.2.2.8.1 Markierung von U937 mit <sup>35</sup>S-Cys/Met

(nach Gupta *et al.*, 1984; Isidoro *et al.*, 1990; Hasilik u. Neufeld, 1980)

Es werden  $10^6$  calcitriolbehandelte U937-Zellen (siehe 2.2.2.2) eingesetzt. Dazu werden die Zellen bei 800 rpm (Heraeus Labofuge 400e) abzentrifugiert, zweimal in RPMI 1640-Markierungsmedium (siehe 2.1.8.3) gewaschen, anschließend in 1 ml RPMI 1640-Markierungsmedium resuspendiert und in ein 12 ml-Röhrchen überführt. Man gibt 2  $\mu$ l <sup>35</sup>S-Cys/Met (entspricht 25  $\mu$ Ci Tran<sup>35</sup>Slabel™) und 5  $\mu$ l einer 2 M NH<sub>4</sub>Cl-Lösung hinzu. Die Markierung wird über Nacht bei 37° C in einer 5 %igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre durchgeführt. Dabei dient der Zusatz von NH<sub>4</sub>Cl der Stimulierung der Sekretion des Procathepsin D.

Am nächsten Tag werden die Zellen bei 800 rpm (Heraeus Labofuge 400e) abzentrifugiert. Das Medium wird abgenommen und mit 250  $\mu$ l 5xIMMIX inkl. Inhibitoren versetzt. Die Zellen werden in 1,2 ml 1xIMMIX inkl. Inhibitoren resuspendiert. Nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (DNase-Spaltung) werden von den Zell- und Medium-Proben je 2  $\mu$ l entnommen, mit 2 ml Szintillationscocktail versetzt und im Szintillationszähler im <sup>35</sup>S- bzw. <sup>14</sup>C-Kanal gezählt.

Bei der Markierung von U937-Zellen sollten sich 50 % der eingesetzten Radioaktivität in der Zell- und 50 % in der Medium-Probe befinden.

### 2.2.2.8.2 Markierung rekombinant-infizierter Sf21-Zellen mit <sup>35</sup>S-Cys/Met

(nach Summers u. Smith, 1988)

Alle nachfolgenden Angaben beziehen sich jeweils auf eine zur Markierung eingesetzte Miniplatte. Die Anzahl der Miniplatten richtet sich dabei nach der entsprechenden Versuchsplanung.

Es werden  $5 \times 10^5$  Sf21-Zellen mit 2 ml HINK's-Medium ausgesät. Nach ca. 2 Stunden, wenn die Zellen sich angeheftet haben, wird das Medium abgesaugt. Die Zellen werden durch Zugabe von 400  $\mu$ l HINK's-Medium und 100  $\mu$ l HINK's/CD-Medium (siehe 2.2.2.6.3) für 2 Stunden bei 27° C infiziert. Nach Zugabe von 0,5 ml HINK's-Medium werden die Zellen für zwei weitere Tage bei 27° C inkubiert.

Das Medium wird abgenommen, die adhärennten Zellen in der Miniplatte zweimal mit je 500  $\mu$ l Markierungsmedium (siehe 2.1.8.3) gewaschen und anschließend mit 500  $\mu$ l Markierungsmedium versorgt. Die „schwimmenden“ Zellen in den abgenommenen Medien (insgesamt jeweils 1,5 ml, je 0,5 ml Infektions- und 1,0 ml Markierungsmedium) werden

abzentrifugiert (800 rpm, Heraeus Labofuge 400e), ebenfalls zweimal mit 500 µl Markierungsmedium gewaschen und anschließend mit 500 µl Markierungsmedium wieder zu den adhären Zellen gegeben. Man läßt die Zellen für 60 Minuten bei 27° C hungern. Anschließend wird das Medium abgenommen, die „schwimmenden“ Zellen abzentrifugiert, in 500 µl Markierungsmedium resuspendiert und wieder zu den adhären Zellen gegeben. Zusätzlich gibt man 500 µl Markierungsmedium inklusive 2 µl <sup>35</sup>S-Cys/Met (entspricht 25 µCi Tran<sup>35</sup>Slabel™) zu den Zellen. Die Markierung wird über Nacht bei 27° C durchgeführt. Am nächsten Tag wird das Medium abgenommen, die „schwimmenden“ Zellen abzentrifugiert und der Mediumüberstand mit 250 µl 5xIMMIX inkl. Inhibitoren versetzt. Die auf der Platte verbliebenen Zellen werden zweimal mit 600 µl 1xIMMIX inkl. Inhibitoren abgespült und zu dem bei der Mediumernnte erhaltenen Zellpellet gegeben. Den Zell- und Medium-Proben werden nach 20minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (DNase-Spaltung) jeweils 2 µl zur Bestimmung der Einbaurrate entnommen. Diese 2 µl-Proben werden mit 2 ml Szintillationscocktail versetzt und im <sup>35</sup>S- bzw. <sup>14</sup>C-Kanal des Szintillationszählers gemessen. Nach Bestimmung der Einbaurrate werden die Zell- und Medium-Proben zunächst bei -20° C eingefroren.

Die Einbaurrate bei den Insektenzellen liegt erfahrungsgemäß sehr niedrig. Es befinden sich nur etwa 5 % der eingesetzten Radioaktivität in der Zell-Probe.

Für ein **Puls/Chase-Experiment**, wird die Markierung wie oben beschrieben für eine Stunde (Puls) durchgeführt. Durch Zugabe von nichtradioaktivem L-Methionin (Endkonzentration 50 mg/l) zum Medium, wird der Chase initiiert. Nach den gewünschten Chase-Zeiten (siehe Ergebnisse, Kapitel 3.3) werden Zellen und Medien geerntet und aus den Proben das gewünschte Protein immunpräzipitiert (siehe 2.2.3.1)

Für die **Expression von Procathepsin D mit mannosereichen Oligosacchariden** wird bei der Markierung dem Medium jeweils folgender Hemmstoff zugegeben, 5 mM DNM, 5 mM DMM, 100 bis 200 µg/ml Castanospermin. Die Hemmstoffe werden dazu 1000fach konzentriert in HINK's-Markierungsmedium gelöst und anschließend steriltfiltriert.

## 2.2.3 Proteinbiochemie

### 2.2.3.1 Immunpräzipitation von Procathepsin D aus radioaktiv markierten Zellen

(nach Hasilik u. Neufeld, 1980; Lorkowsky *et al.*, 1987)

Benötigte Lösungen:	1xIMMIX	10 mM	NaP <sub>i</sub> pH 7,4
		154 mM	NaCl
		0,5% (w/v)	Na-Deoxycholat
		0,5% (w/v)	BSA
		1% (v/v)	Triton X-100
	Neufeld-Puffer	10 mM	Tris/HCl pH 8,5
		0,6 M	NaCl
		0,1 % (w/v)	SDS
		0,05 % (w/v)	Nonidet P-40
	Sol/2(+SH)	0,125 M	Tris/HCl pH 6,8
		10 % (v/v)	Glycerin
		1 % (w/v)	SDS
		10 mM	DTT

Die eingefrorenen Zell- und Medium-Proben (siehe 2.2.2.8.) werden aufgetaut und zwei weiteren Frier-Tau-Schritten unterzogen. Es schließt sich eine einstündige Zentrifugation bei 20.0000 rpm (Sorvall ST 21) an. Die Überstände werden abgenommen, mit je 10 µl K $\alpha$ M-Antiserum versetzt. Nach Inkubation über Nacht (auf dem Drehrad bei 4° C) wird eine Stunde bei 20.000 rpm (Sorvall ST 21) zentrifugiert. Zu den Überständen gibt man je 2 µl eines monoklonalen Antikörpers (hier: M $\alpha$ CD 3G8 (0,5 mg/ml) bzw. 3F4 (0,8 mg/ml)) und inkubiert leicht wippend über Nacht bei 4° C.

Der gebildete Immunkomplex wird 8 Minuten bei 14.000 rpm, 4° C (Sorvall RMC 14) abzentrifugiert. Das Immunpräzipitat wäscht man einmal mit 800 µl 1xIMMIX; 0,2 % (w/v) SDS, einmal mit 800 µl 1xIMMIX; 2 M KCl, einmal mit 800 µl Neufeld-Puffer und letztlich zweimal mit je 400 µl 100 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,02 % (w/v) SDS. Nach jedem Waschschrift wird jeweils 2 Minuten zentrifugiert (für bestimmte, sich anschließende enzymatische

Reaktionen empfiehlt es sich, den letzten Waschschrift mit 100 mM Tris/HCl pH 7,4 ohne SDS durchzuführen).

Die so erhaltenen Immunpräzipitate werden in 60 µl Sol/2(+SH) resuspendiert, 5 Minuten auf 95° C erhitzt und anschließend der SDS-PAGE unterzogen.

**2.2.3.2 Reinigung von Procathepsin D aus dem Medium infizierter Sf21-Zellen**

Benötigte Lösung:	Sol(+SH)	0,25 M	Tris/HCl pH 6,8
		20 % (v/v)	Glycerin
		2 % (w/v)	SDS
		20mM	DTT

**2.2.3.2.1 Präparative isoelektrische Fokussierung (Rotofor)**

Benötigte Lösungen	Kathodenpuffer	0,1 M	NaOH
	Anodenpuffer	0,1 M	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
	Inhibitor-Cocktail	10 mM	Pepstatin A
		2 mM	Leupeptin
		10 mM	E-64
		1 M	Pefablock®SC
		10 mM	Z-Phe-Phe-diazomethylketon
		10 mg/ml	α <sub>2</sub> -Makroglobulin

Die Rotofor-Apparatur wird nach Angaben des Herstellers zusammengesetzt. Anschließend werden die Anoden- und die Kathodenkammer mit den entsprechenden Puffern befüllt.

200 ml SF900II/CD-Medium werden mit Hilfe einer Rührzelle, einer PM 10-Membran und 3 bar Stickstoff bei 4° C auf 40 ml konzentriert und anschließend viermal 12 Stunden bei 4° C gegen 1 l H<sub>2</sub>O dialysiert. Das auf diese Weise entionisierte Medium wird 10 min bei 3500 rpm (Heraeus Labofuge 400e) bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand wird mit 40 µl Inhibitor-Cocktail und 800 µl Ampholyten (Servalyt 3-10) versetzt und in die Rotofor-Kammer eingefüllt. Die isoelektrische Fokussierung erfolgt in 5 Stunden bei konstant 12 Watt und 4° C (Anfangsspannung 700 V, Stromstärke 17 mA; Endspannung 1390 V, Stromstärke 9mA). Anschließend werden mit Hilfe der Fraktioniervorrichtung 20 Fraktionen aufgefangen. In den

Fraktionen wird der pH-Wert und die Proteinkonzentration bestimmt. 10 µl jeder Fraktion werden mit 10 µl Sol(+SH) versetzt, 5 Minuten auf 95° C erhitzt, anschließend 5 µl 0,5 M JAA-Lösung zugegeben, bei 37° C für 10 Minuten inkubiert und in einem SDS-Polyacrylamidgel, mit nachfolgender Silberfärbung, getrennt. Procathepsin D-haltige Fraktionen werden vereinigt.

Die vereinigten Proben werden mit H<sub>2</sub>O auf 40 ml aufgefüllt und nach Zugabe von 40 µl Inhibitor-Cocktail, ohne weitere Zusätze in die Rotoforkammer eingefüllt. Es schließt sich eine weitere isoelektrische Fokussierung an (siehe oben, Anfangsspannung 1522V, Stromstärke 8 mA, Endspannung 2626 V, Stromstärke 5 mA). Wieder werden in den Fraktionen pH-Wert und Proteinkonzentration bestimmt. Auf Grund der SDS-PAGE-Analyse werden die Procathepsin D-haltigen Fraktionen vereinigt, mit 1/1000 Vol. Inhibitor-Cocktail versetzt und mit Hilfe von Ultrafiltrationseinheiten (Centriprep-30 auf 600 µl, anschließend Microcon-30 auf bis zu 100µl) angereichert.

### 2.2.3.2.2 Gelfiltration (HPLC)

(nach Angaben des Herstellers Waters, Eschborn, 1993)

Benötigte Lösung:                      Laufmittel                      0,1 M                      NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

Verwendet wird eine HPLC-Anlage der Firma Waters, Eschborn mit der dazugehörigen Millennium Steuerung- und Auswertesoftware.

Es wird ein isokratischer Lauf an einer Gelfiltrationssäule (GF-450, DuPont, Bad Homburg) durchgeführt. Die Flußrate des Laufmittels beträgt 0,5 ml/min, wobei 50 µl des unter 2.2.3.2.1 erhaltenen Procathepsin D-Konzentrats eingespritzt werden. Der Fraktions-sammler wird auf eine Fraktion pro Minute, mit einer Verzögerung von 15 Sekunden (Zeit, die die Probe für den Weg vom Detektor zum Fraktionssammler benötigt), eingestellt. Der Lauf wird am PC-Monitor bei einer Wellenlänge von 280 nm simultan verfolgt.

Von den Fraktionen, die den Peak flankieren, werden je 10 µl mit 10 µl Sol(+SH) versetzt, 5 Minuten auf 95° C erhitzt, 5 µl 0,5 M JAA-Lösung zugegeben, bei 37° C für 10 Minuten inkubiert und anschließend einer SDS-PAGE mit nachfolgender Silberfärbung unterzogen.

### 2.2.3.2.3 Affinitätschromatographie an Pepstatin A-Agarose

(nach Conner, 1989)

Benötigte Lösungen:	Bindungspuffer	0,2 M	Na-Formiat pH 3,5
		0,7 M	NaCl
	Waschpuffer	0,1 M	Na-Formiat pH 3,5
		0,4 M	NaCl
	Elutionspuffer	10 mM	Tris/HCl pH 8,3
		0,4 M	NaCl

Pepstatin A-Agarose ist als Suspension in 20% (v/v) Ethanol erhältlich. Ca. 2 ml dieser Suspension werden entnommen. Nachdem die Agarose sedimentiert ist, wird der Überstand verworfen und das Sediment in Elutionspuffer suspendiert. Nach wiederholtem Sedimentieren und Aufschlännen wird die Pepstatin A-Agarose/Elutionspuffer-Suspension mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast und luftblasenfrei in eine Säule gefüllt. Mit dieser Prozedur erhält man eine Säule mit einem Volumen von 1 ml.

Mit dem 20fachen Säulenvolumen Waschpuffers wird die Säule auf die Bindungsbedingungen äquilibriert.

Das eingefrorene HINK's/CD-Medium (siehe 2.2.2.7) wird aufgetaut und bei 3500 rpm (Heraeus Labofuge 400e) bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand wird in 5 ml-Schritten mit gleichem Volumen Bindungspuffer versetzt und direkt auf die äquilibrierte Säule aufgetragen. Diesen Schritt wiederholt man 10 mal. Dabei ist darauf zu achten, daß das Medium nur sehr kurzzeitig dem pH 3,5 ausgesetzt ist, da ansonsten Proteinaseaktivitäten auftreten!

Anschließend wird zweimal mit je 10 ml Waschpuffer gewaschen. Durch Spülen der Säule mit einem Säulenvolumen Elutionspuffer wird der Rest Waschpuffer verdrängt. Die Elution erfolgt mit 10 ml Elutionspuffer. Ein weiterer Elutionsschritt mit 10 ml Elutionspuffer dient der Regenerierung der Säule. Procathepsin D ist in der zweiten Elutionsfraktion in der Regel nicht zu finden.

Das erhaltene, eluierte Procathepsin D ist von weniger Proteinen begleitet, wenn man dem Bindungs- und dem Waschpuffer Triton X-100 mit einer Endkonzentration von 0,1% (v/v) zufügt. Allerdings ist dann die Bestimmung der Cathepsin D-Aktivität im Durchbruch bzw. in der Waschlösung nicht mehr möglich.

### 2.2.3.2.4 Ionenaustauschchromatographie (MonoQ-FPLC)

(nach Barrett, 1970; Angaben des Herst. Pharmacia, Freiburg, 1995)

Verwendung findet eine FPLC-Anlage mit der dazugehörigen Steuerungs- und Auswertesoftware der Firma Pharmacia, Freiburg.

Benötigte Lösungen:	Puffer A	2 mM	Tris/HCl pH 8,3
	Puffer B	2 mM	Tris/HCl pH 8,3
		150 mM	NaCl

50 ml der Procathepsin D enthaltenden Elutionen aus der Affinitätschromatographie werden mit Hilfe einer Ultrafiltrationseinheit (Centriprep-30) auf 1 ml aufkonzentriert und viermal für 12 Stunden bei 4° C gegen 2 mM Tris/HCl pH 8,3 dialysiert, wobei die gesamte dialysierte Probe für die Trennung mittels FPLC eingesetzt wird.

Mit Hilfe der Steuerungssoftware (FPLC-Director Version 1.1) wird folgender Lauf programmiert:

Method base	: ml	
0,00	Flow	0,50
0,00	Injection_Valve	Load
0,00	Fraction_Collector	Start
0,50	Injection_Valve	Inject
2,00	Injection_Valve	Load
2,50	conc_B	0,0
2,50	conc_B	13,3
3,50	conc_B	13,3
23,50	conc_B	100
27,00	conc_B	100
27,00	Fraction_Collector	Stop
27,00	End_Method	

Die Daten werden mit einem Durchflußleitfähigkeitsmonitor und einem UV-Durchflußphotometer erfaßt und an einen Computer weitergeleitet. Dabei wird die Trennung der Proteine auf der Säule simultan bei 280 nm auf dem PC-Monitor verfolgt. Nach Beendigung des Lauf-Programms werden von den Fraktionen, die den Peak umspannen, 10µl Aliquots entnommen, mit 10 µl Sol(+SH) versetzt, für 5 Minuten auf 95° C erhitzt, 5 µl 0,5 M JAA-Lösung zugegeben und für 10 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Proben werden einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung unterzogen. Procathepsin D-haltige Proben werden vereinigt.

### 2.2.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

(nach Bradford, 1976)

Zur Anwendung kommt hier die Bestimmung nach Bradford mit Hilfe des BioRad Protein Assay Reagenzes. Die Bestimmung wird in einer Mikrotiterplatte durchgeführt.

Benötigte Lösung:                    BSA-Standard                    140 µg/ml                    BSA

Zunächst wird folgende Standardreihe pipettiert:

BSA-Standard (µl]	H <sub>2</sub> O (µl)	resultierende Proteinmenge (ng)	resultierende Proteinkonzentration (µg/ml)
0,0	20,0	0	0
2,9	17,1	400	20
5,7	14,3	800	40
8,6	11,4	1200	60
11,4	8,6	1600	80
14,3	5,7	2000	100
17,1	2,9	2400	120
20,0	0,0	2800	140

Der Standard wird parallel in zwei Spalten nebeneinander pipettiert (Doppelwerte). Anschließend werden je 20 µl Proben in zwei nebeneinanderliegende Wells (Doppelwert) pipettiert. Zu allen Proben werden 300 µl des 1:5 in H<sub>2</sub>O verdünnten Biorad-Reagenzes gegeben. Die Mikrotiterplatte wird 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Hilfe des ELISA-Readers bei 630 nm gemessen. Die Steuerung des ELISA-Readers (Dynatech MRX) und die Auswertung der Daten erfolgt über die Software BioLinx 2.20.

Sind die Proteinkonzentrationen der Proben so hoch, daß sie außerhalb des Standardbereichs liegen, so werden sie entsprechend mit H<sub>2</sub>O verdünnt.

#### **2.2.3.4 Bestimmung der Cathepsin D-Aktivität (CD-Assay)**

(nach Hasilik et al., 1982; Horst u. Hasilik; 1991)

Als Substrat für Cathepsin D wird radioaktiv markiertes Hämoglobin verwendet, das folgendermaßen hergestellt wird:

37 MBq (1mCi) <sup>14</sup>C-KCNO (2,2 GBq/mmol) werden in 430 µl Tris/HCl pH 8,5 gelöst und zu 10 mg Hämoglobin gegeben. Anschließend inkubiert man diese Mischung 24 bis 48 Stunden bei 37°C. Das so präparierte radioaktive Substrat wird anschließend viermal für 12 Stunden gegen 10 mM Tris/HCl pH 7,4 bei 4° C dialysiert. Nach Szintillationszählung wird die Radioaktivitätskonzentration auf 50.000 cpm/µl eingestellt. Die Lösung erhält die Bezeichnung S1 und wird bei -20° C gelagert..

Zur Herstellung einer S2-Substratlösung wird das oben hergestellte Substrat weiter verdünnt. Dazu gibt man zu 8 mg Hämoglobin 8 µl 1 M Tris/HCl pH 7,4 und 40 µl der oben beschriebenen S1-Lösung. Die so erhaltene Mischung wird mit H<sub>2</sub>O auf 800 µl aufgefüllt (Radioaktivitäts-konzentration: 2500 cpm/µl) und bei -20° C gelagert.

Für den Assay wird je nach Zahl der Proben eine zehnfache Verdünnung der S2-Lösung in 0,2 M NaAc pH 3,65 angesetzt.

Der Reaktionsansatz setzt sich aus 100µl Probe (mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt) und 100 µl der verdünnten S2-Lösung zusammen. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C (die Zeit kann entsprechend den Anforderungen variiert werden) wird die Reaktion durch Zugabe von 500 µl einer 1 %igen (w/v) Casein- und 500 µl einer 25 %igen (w/v) TCA-Lösung gestoppt. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis werden die Proben 10 Minuten bei 10.000 rpm (Sorvall RMC 14) bei 4° C zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wird abgenommen und mit 2 ml Szintillationscocktail versetzt. Die Radioaktivität wird im <sup>14</sup>C-Kanal des Szintillationszählers bestimmt. Die Linearität des Assays ist bis ca. 1000 cpm (abzüglich Leerwert) gegeben.

Als Leerwert werden 100 µl H<sub>2</sub>O mit 100 µl verdünnter S2-Lösung (siehe oben) gemischt (weitere Behandlung siehe oben).

Zur Überprüfung auf Anwesenheit anderer Proteinase als Cathepsin D („Fremd“-Proteinase), kann die Cathepsin D-Aktivität durch Zusatz von 1 µl 2,5 mM Pepstatin A inhibiert werden. Aus der Differenz ± Pepstatin A kann die „Fremd“-Proteinase-Aktivität ermittelt werden.

### 2.2.3.5 Behandlung von Proteinen mit Glykosidasen

Benötigte Lösungen:	1,43xSol(+SH)	0,36 M	Tris/HCl pH 6,8
		28,6 % (v/v)	Glycerin
		2,86 % (w/v)	SDS
		28,6 mM	DTT
	1,43xSol(-SH)	wie 1,43xSol100(+SH) jedoch ohne DTT	

#### 2.2.3.5.1 Glykopeptidase F (GPF)-Spaltung

Benötigte Lösung:	GPF-Puffer	0,1 M	NaP <sub>i</sub> pH 8,6
		1,2 %	Nonidet P-40
		0,2 %	SDS
		10 mM	EDTA pH 8,0

Bei Bedarf werden Aliquots des GPF-Puffers unmittelbar vor Gebrauch mit PMSF (1:200 aus 0,2 M Stammlösung in DMSO) und  $\beta$ -Mercaptoethanol (1:100) versetzt.

#### *an Immunpräzipitaten:*

Die gewaschenen Immunpräzipitate (siehe 2.2.3.1) werden in 20  $\mu$ l GPF-Puffer (inkl. PMSF und  $\beta$ -Mercaptoethanol) resuspendiert und 5 Minuten auf 95° C erhitzt. Anschließend werden die Proben mit 40  $\mu$ l H<sub>2</sub>O versetzt, kurz zentrifugiert und halbiert. Die eine Hälfte wird mit 1  $\mu$ l Glycopeptidase F (0,2 U/ $\mu$ l) versetzt, während die zweite Hälfte kein Enzym erhält (Kontroll-Ansatz). Nach Inkubation im Wasserbad bei 37° C für 8 bis 24 Stunden wird zu den Proben 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O und 20  $\mu$ l 1,43xSol(+SH) gegeben. Die Proben werden 5 Minuten auf 95° C erhitzt und anschließend einer SDS-PAGE unterzogen.

**an Proteinen in Lösung:**

Hierzu dürfen maximal 5 µl Probe, die mindestens 50 ng je Protein enthält, verwendet werden (werden größere Volumina eingesetzt, so muß man darauf achten, daß die Proben-Lösung den GPF-Bedingungen entspricht, siehe auch 2.2.3.11).

Zu der Probe in Lösung werden 10 µl GPF-Puffer gegeben und 5 Minuten auf 95° C erhitzt. Anschließend wird das Volumen mit H<sub>2</sub>O auf 30 µl aufgefüllt. Zu den Proben gibt man 0,25 bis 0,5 µl Glycopeptidase F (0,2 U/µl) und inkubiert über Nacht bei 37° C. (Wenn es vorgesehen ist, die Proben ± GPF zu inkubieren, müssen die oben angegebenen Mengen verdoppelt werden).

Anschließend gibt man zu den Proben je 10 µl H<sub>2</sub>O und 10 µl 1,43xSol(-SH) und erhitzt sie für 5 Minuten auf 95° C. Nach Trennung der Proben mittels SDS-PAGE wird das Gel einer Silberfärbung unterzogen.

**2.2.3.5.2 Endo-β-N-acetylglukosaminidase H (Endo H)-Spaltung**

Benötigte Lösung:	Endo H-Puffer	2 %	SDS
		10 mM	DTT
		0,1 M	NaP <sub>i</sub> pH 5,4

Dieser Puffer wird unmittelbar vor Gebrauch mit dreifachem Volumen H<sub>2</sub>O verdünnt.

**an Immunpräzipitaten:**

Die gewaschenen Immunpräzipitate werden mit 20 µl des verdünnten Endo H-Puffers versetzt und 5 Minuten auf 95° C erhitzt. Nach Zugabe von je 5 µl 0,5 M NaP<sub>i</sub> pH 5,35 und 85 µl H<sub>2</sub>O werden die Proben kurz an zentrifugiert und anschließend halbiert. Die eine Hälfte wird mit 1 µl Endo H (1 mU/µl) versetzt, während die zweite Hälfte als Kontrolle dient und somit ohne Enzym bleibt. Nach 6 bis 12stündiger Inkubation aller Proben bei 37° C wird zu den Endo H-haltigen Proben nochmals 1 µl Endo H hinzugefügt und weiter bei 37° C inkubiert. Nach insgesamt 20- bis 24stündiger Inkubation werden alle Proben mit je 20 µl 1,43xSol(+SH) versetzt, für 5 Minuten auf 95° C erhitzt und anschließend einer SDS-PAGE unterzogen.

## 2.2.3.6 Protein-Gelelektrophorese

### 2.2.3.6.1 Präparative SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

(nach Protokoll der Firma BioRad, 1995)

Die präparative SDS-PAGE findet in einer „Mini Prep Cell“ der Firma BioRad, München statt.

Nach Angabe des Herstellers wird folgendes 10 %ige SDS-PAA-Gel gegossen:

	Trenngel 10 % (ml)	Sammelgel 4 % (ml)
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	3,33	1,33
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,5	-----
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	-----	2,5
10 % APS	0,025	0,0025
TEMED	0,05	0,01
H <sub>2</sub> O	4,17	6,15
10 % SDS	0,05	0,05

Benötigte Lösungen:	Kathodenpuffer	384 mM	Glycin
		23 mM	Tris
		0,05 % (w/v)	SDS
		10 mM	Na-Thioglycolat pH 7,0
	Anodenpuffer	384 mM	Glycin
	23 mM	Tris	
	Elutionspuffer	1:10 verdünnter Anodenpuffer	
	1,43xSol(+SH)	siehe 2.2.3.5	
	Sol(+SH)	siehe 2.2.3.2	

Die präparative SDS-PAA-Gelsäule wird nach Angaben der Hersteller gegossen und, nach erfolgter Polymerisation des Gels, die Kammer zusammengebaut.

Pepstatin A-Agarose gereinigtes Procathepsin (30 µg in 100 µl Elutionspuffer, siehe 2.2.3.2.3) werden mit 100 µl Sol(+SH) gemischt und für 5 Minuten auf 95° C erhitzt. Anschließend gibt man 20 µl 0,1 %ige Bromphenolblau-Lösung und 2 µl 1 M Na-Thioglycolat-Lösung pH 7,0 hinzu. Die so vorbereitete Probe wird auf die Gel-Säule aufgetragen und

vorsichtig mit Kathodenpuffer überschichtet. Die Elektrophorese wird bei konstant 1 W (Anfangsbedingung 300 V; 3,3 mA, Endbedingung 220 V; 4,5 mA) im Kühllabor (4° C) durchgeführt. Man beginnt die Fraktionierung kurz bevor die Bromphenolblaubande aus dem Gel wandert (nach ca. 225 Minuten). Dabei wird mit Hilfe einer Peristaltikpumpe Elutionspuffer mit einer Geschwindigkeit von 100 µl/min am unteren Gelrand vorbeigepumpt. Die, das Gel verlassenden, Proteine werden von diesem Puffer weggeschwemmt und zu einem Fraktionssammler geführt. Der Fraktionssammler wird auf 2,5 min/Fraktion eingestellt. Es werden insgesamt 110 Fraktionen gesammelt (Gesamtdauer der Elektrophorese 500 Minuten). Von jeder fünften Fraktion werden 20 µl entnommen, mit 8 µl 1,43xSol (+SH) versetzt, für 5 Minuten auf 95° C erhitzt, mit 5 µl 0,5 M JAA-Lösung versetzt und für 10 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Proben können nun durch ein analytisches SDS-PAGE, mit anschließender Silberfärbung, analysiert werden.

Procathepsin D-haltige Fraktionen werden vereinigt, mit Hilfe der Ultrafiltration (Centriprep-30) auf 100 µl konzentriert und anschließend gegen 10 mM NaP<sub>i</sub> pH 7,0 dialysiert und. Ein Aliquot dieser Präparation wird für die N-terminale Aminosäurebestimmung (siehe 2.2.3.10) eingesetzt.

### **2.2.3.6.2 Analytische SDS-PAGE**

(nach Lämmli, 1970; Hasilik u. Neufeld, 1980)

Es kommen 14 %ige Polyacrylamidgele (PAA-Gele) folgender Zusammensetzung zur Anwendung (dabei bezieht sich das Pipettierschema auf ein 1,5 mm dickes Gel, das für die Trennung von radioaktiven Proben zur Anwendung kommt. Für die Trennung von nichtradioaktiven Proben werden 0,75 mm dicke Gele verwendet, die anschließend silbergefärbt werden. Dazu werden die angegebenen Volumina halbiert.):



Proben enthalten, werden zur Vermeidung von „smiling“-Effekten mit den entsprechenden Sol-Lösungen, in denen auch die Proben aufgeköcht worden sind, gefüllt. Die Proben werden vorsichtig mit Kathodenpuffer überschichtet und die Kathodenkammer - unter Vermeidung von Wirbeln - mit diesem Puffer aufgefüllt

Die Elektrophorese wird mit 20 mA ( $10 \text{ mA/cm}^2$ ) pro Gel gestartet. Nach Einlaufen der Bromphenolblau-Bande in das Trenngel, wird die Stromstärke auf 30 mA ( $15 \text{ mA/cm}^2$ ) pro Gel erhöht. Der Elektrophoresevorgang wird kurz vor Auslaufen der Bromphenolblau-Bande beendet.

Als Molekulargewichtsstandard wird bei radioaktiv-markierten Proben folgendes  $^{14}\text{C}$ -markiertes Proteingemisch verwendet: Phosphorylase B (97,4 kDa), BSA (69 kDa), Ovalbumin (46 kDa), Carboanhydrase (30 kDa) und Cytochrom C (12,5 kDa). Die Proteine wurden von der Firma Sigma bezogen und sind einzeln in unserem Labor durch Carbamylierung (mit  $^{14}\text{C}$ -KCNO) radioaktiv markiert worden. Sie wurden entsprechend ihrer spezifischen Aktivität gemischt, so daß sich auf dem Röntgenfilm Banden mit gleicher Schwärzungsintensität ergeben.

Bei Verwendung von Gelen, die anschließend Coomassie<sup>®</sup>Blue- bzw. silbergefärbt werden sollen, kommt der Molekulargewichtsstandard der Firma BioRad, München zum Einsatz („low molecular weight“, bestehend aus folgendem Proteingemisch: Phosphorylase B (97,4 kDa), BSA (69 kDa), Ovalbumin (46 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor (21 kDa), Lysozym (14,4 kDa)). Dieser wird 1:100 in Sol/2(+SH) verdünnt und für 5 Minuten auf 95° C erhitzt. Für Coomassie<sup>®</sup>Blue zu färbende Gele werden 60 µl des verdünnten Standards eingesetzt, für Silber zu färbende Gele 6 µl.

### **2.2.3.7 Visualisierung radioaktiver Proteine auf PAA-Gelen**

#### **2.2.3.7.1 Fluorographie**

(nach Laskey u. Mills, 1975)

Ein PAA-Gel mit radioaktiven Proben wird zur Verstärkung der Proteinbanden nach Beendigung der Elektrophorese dreimal für je 20 Minuten in DMSO entwässert und anschließend für mindestens 3 Stunden, meistens jedoch über Nacht in 16,8 % (w/v) DPO in DMSO inkubiert. Bevor das Gel zwischen Cellophanfolie unter Vakuum getrocknet wird, wird es für 45 Minuten, mit einem Wechsel, gewässert. Dabei fällt das DPO aus und das vorher transparente Gel wird undurchsichtig weiß.

Zur Visualisierung der Proteinbanden legt man das Gel mit einem vorgeblitzten Röntgenfilm in eine entsprechende Kassette und inkubiert je nach Bandenintensität mehrere

Stunden bis Tage bei  $-70^{\circ}\text{C}$ . Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgt anschließend mit Hilfe eines Entwicklungsautomaten.

### 2.2.3.7.2 Mit Hilfe des PhosphoImagers<sup>TM</sup>

Will man auf die Behandlung der Gele mit DPO verzichten, so kann man die radioaktiven Proteine auch mit Hilfe des PhosphoImagers<sup>TM</sup> (Molecular Dynamics, Krefeld) sichtbar machen.

Dazu wird das PAA-Gel nach der Elektrophorese 30 Minuten lang in Anodenpuffer geschwenkt. Da das Gel dabei etwas aufquillt, läßt man es für 5 bis 10 Minuten in Ethanol wieder schrumpfen. Nach kurzem wässern (1 bis 2 Minuten) wird das Gel zwischen Cellophanfolie unter Vakuum getrocknet. Die Proteinbanden werden durch Exposition des trockenen PAA-Gels auf einem Phosphor Screen für mehrere Stunden bis Tage bei Raumtemperatur und anschließendem Laserscan mit Hilfe des PhosphorImager<sup>TM</sup> und der Auswertesoftware ImageQuant<sup>TM</sup> (Molecular Dynamics, Krefeld) sichtbar gemacht. Die Auswertesoftware kann dabei u. a. zur Größenbestimmung und zur Quantifizierung genutzt werden.

Der Vorteil bei dieser Methode liegt im geringeren Zeitaufwand und der direkten Digitalisierung der Daten, welches zu einer Signallinearität über 4 bis 5 Größenordnungen führt, sowie ein Erfassen der Banden über ihre gesamte Fläche ermöglicht.

## 2.2.3.8 Färbung von PAA-Gelelen

### 2.2.3.8.1 Coomassie<sup>®</sup> Blue-Färbung

Benötigte Lösungen:	Färbelösung	0,14 % (w/v) Coomassie <sup>®</sup> Blue
		50 % (v/v) Methanol
		10 % (v/v) Essigsäure
	Entfärbelösung	50 % (v/v) Methanol
		10 % (v/v) Essigsäure

Das PAA-Gel wird nach der Elektrophorese direkt in die Färbelösung gegeben und verbleibt dort für 3 Stunden bis über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Anschließend wird die Färbelösung gegen die Entfärbelösung ausgewechselt. Immer wenn sich die Entfärbelösung

durch herausgelöstes Coomassie<sup>®</sup>Blue stark blau verfärbt hat, wird sie gewechselt. Diese Prozedur wird solange durchgeführt, bis die Proteinbanden gut zu sehen sind und der Hintergrund klar ist. Nach Wässern des Gels für 5 Minuten wird es zwischen Cellophanfolie unter Vakuum getrocknet.

### 2.2.3.8.2 Silberfärbung

(verändert nach Heukeshoven u. Dernick, 1988)

Benötigte Lösungen:	Fixierlösung	30 % (v/v)	Ethanol
		10 % (v/v)	Essigsäure
	Thiosulfatlösung	0,1 M	NaAc pH 6,0
		30 % (v/v)	Ethanol
		0,1 % (w/v)	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
	Silberlösung	0,1 % (w/v)	AgNO <sub>3</sub>
		0,01% (w/v)	Formaldehyd
	Entwickler	2,5 % (w/v)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
		0,02 % (w/v)	Formaldehyd

Alle Inkubationen werden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler durchgeführt.

Das Gel wird direkt nach der Elektrophorese in die Fixierlösung gegeben und verbleibt dort für 30 Minuten. Es schließt sich eine 30minütige Inkubation in Thiosulfatlösung an, bevor das Gel dreimal für je 10 Minuten gewässert wird. Nach halbstündiger Inkubation in Silberlösung wird das Gel sehr kurz (maximal eine Minute) gewässert und anschließend in Entwickler gegeben. Der Entwickler verfärbt sich nach kurzer Zeit grau (Reste von ungebundenem Silber), so daß er gegen frischen Entwickler ausgetauscht wird. Die Entwicklung führt man solange durch, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar sind. Das Abstoppen des Entwicklungsprozesses erfolgt durch Zugabe von Essigsäure (ca. 0,1 Volumen des Entwicklers). Das Gel bleibt in dieser Lösung für ca. 5 Minuten und wird anschließend für 5 Minuten gewässert. Zur Aufbewahrung wird das Gel zwischen Cellophanfolie unter Vakuum getrocknet.

## 2.2.3.9 Western-, Dot-Blot und Immunofärbung

### 2.2.3.9.1 „Semidry“-Blotverfahren

Benötigte Lösungen:	10xKathoden-Puffer	0,25 M	Tris
		0,4 M	$\epsilon$ -Aminocaprinsäure
		Es stellt sich ein pH von 8,7 ein.	
	10xAnoden-Puffer	0,25 M	Tris
		1,92 M	Glycin
		Es stellt sich ein pH von 8,3 ein.	
	Gelwasch-Puffer	384 mM	Glycin
		23 mM	Tris
	Coomassie <sup>®</sup> Blue-Lösung	siehe 2.2.3.8.1 (Färbelösung)	

Zunächst werden je 20 ml 10xKathoden- und 10xAnoden-Puffer mit je 140 ml H<sub>2</sub>O gemischt und in je eine Entgasungskammer gefüllt. Zusätzlich gibt man ein dem PAA-Gel entsprechend großes Gel-Blotting-Papier (Dicke 0,8 mm) in jede Kammer. Die Puffer und das Blotting-Papier werden nun für 30 Minuten bei Raumtemperatur an einer Wasserstrahlpumpe entgast. Während dieser Zeit inkubiert man das PAA-Gel - nach erfolgter Elektrophorese - in Gelwasch-Puffer. Zu den entgasten Puffern wird je 40 ml Methanol zugegeben.

Die Anode der Blotkammer wird mit dem entgasten Anoden-Puffer befeuchtet und das in diesem Puffer entgaste Gel-Blotting-Papier luftblasenfrei aufgelegt. Auf dieses Papier legt man eine, dem PAA-Gel entsprechend große, mit Methanol befeuchtete, PVDF-Membran. Nachdem das PAA-Gel luftblasenfrei auf die Membran gelegt, mit entgastem Kathoden-Puffer überschichtet und dem im Kathoden-Puffer entgasten Gel-Blotting-Papier bedeckt worden ist, wird die Kathode aufgelegt. Der Blot wird bei 4° C und einer Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup> Membran für 2 bis 4 Stunden (2 Stunden bei einer Geldicke von 0,75 mm, 4 Stunden bei einer Geldicke von 1,5 mm) durchgeführt.

Nach Beendigung des Blotvorgangs wird das PAA-Gel zwecks Kontrolle in Coomassie<sup>®</sup>Blue-Lösung gelegt. Die Membran wird neben der Standard-Bahn durchgeschnitten, wobei die Standard-Bahn mit Coomassie<sup>®</sup>Blue gefärbt, die restliche Membran kurz mit Methanol gespült und anschließend an der Luft getrocknet wird.

Die getrocknete Membran wird anschließend der Immundetektionsprozedur unterzogen. Das Trocknen der Membran bietet dabei den Vorteil, daß bei der nachfolgenden Immunofärbung auf eine Absättigung der noch freien Bindungsstellen auf der Membran verzichtet werden kann, da die Membran nur an den Stellen hydrophil ist, wo sich durch das Blotten Proteine befinden und alle weiteren Schritte mit wässrigen Lösungen stattfinden.

Die Färbung der Standard-Bahn erfolgt über Nacht in Coomassie<sup>®</sup>Blue-Lösung. Am nächsten Tag wird sie solange mit Methanol aus der Spritzflasche abgespült, bis die Standardbanden gut zu erkennen und der Hintergrund nahezu weiß ist. Anschließend läßt man sie an der Luft trocknen.

### 2.2.3.9.2 Immunofärbung auf PVDF-Membran geblotteter Proteine (Trockenfärbemethode)

(nach Johnson *et al.*, 1984; Application Note der Fa. Millipore, Erkrath, 1996)

benötigte Lösungen	TBS	10 mM	Tris/HCl pH 7,4
		154 mM	NaCl
	DAB-Lösung	10 mM	Tris/HCl pH 7,4
		1,2 mM	3,3'-Diaminobenzidin
		0,0075 %	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
		Diese Lösung darf erst unmittelbar vor Gebrauch hergestellt werden.	
	Blotto	50 mM	Tris/HCl pH 7,8
		2 mM	CaCl <sub>2</sub>
		0,05% (v/v)	Triton X-100
		0,01% (v/v)	Antifoam
		5 % (w/v)	Magermilchpulver bzw. Laktalbumin

Für die Inkubation der getrockneten PVDF-Membran nach dem Western-Blot wird der 1. Antikörper (spezifischer Antikörper gegen das gesuchte Protein, hier: M $\alpha$ CD 5C11 (0,84 mg/ml)) 1:2000 in Blotto verdünnt. Man inkubiert die Membran mit 0,1 ml des antikörperhaltigen Blottos pro cm<sup>2</sup> Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wäscht man die Membran dreimal mit je 0,5 ml/cm<sup>2</sup> TBS für 1 Minute (wobei die Waschlösung jeweils vollständig abgesaugt werden muß) und inkubiert die Membran mit 0,1

ml/cm<sup>2</sup> Blotto, der den 2. Antikörper enthält (hier GαM-POD 1:2000 verdünnt) für eine Stunde. Nach dreimaligem Waschen mit TBS für 1 Minute (siehe oben) wird die Färbereaktion durchgeführt. Dazu gibt man 0,05 ml/cm<sup>2</sup> DAB-Lösung auf die Membran. Die Lösung läßt man solange auf der Membran, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar sind. Anschließend saugt man die DAB-Lösung ab, wäscht die Membran mit H<sub>2</sub>O und läßt sie an der Luft trocknen, wobei sich der Kontrast zu den gefärbten Proteinen durch Aufhellen des Hintergrundes erhöht.

Wird als 1. Antikörper ein KαCD-Antiserum eingesetzt, so verwendet man als 2. Antikörper entsprechend einen GαK-POD-Antikörper. Dabei werden die Antikörper wie oben beschrieben in Blotto verdünnt.

### **2.2.3.9.3 Dot-Blot auf Nitrocellulose und nachfolgender Immunofärbung**

benötigte Lösungen: Es werden die gleichen Lösungen wie in Kapitel 2.2.3.9.2 gebraucht.

Nitrocellulose-Membran-Streifen werden in 1 cm<sup>2</sup>-Kästchen eingeteilt. In diese Kästchen pipettiert man 2 µl Probe (entspricht 10 bis 100 ng Protein) und läßt sie an der Luft eintrocknen. Anschließend werden die Nitrocellulose-Streifen mit 0,5 ml/cm<sup>2</sup> Blotto überschichtet. Durch 4stündige Inkubation bei Raumtemperatur werden noch freie Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt. Danach wird die Lösung gegen 0,1 ml/cm<sup>2</sup>, den 1. Antikörper enthaltenden, Blotto (hier: monoklonaler Antikörper gegen humanes Cathepsin D, 5C11, 0,84 mg/ml, 1:2000 verdünnt) ausgetauscht. Es wird für 4 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° C inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 0,5 ml/cm<sup>2</sup> TBS für je 10 Minuten bei Raumtemperatur (die Waschlösung muß jeweils vollständig abgesaugt werden) gibt man 0,1 ml/cm<sup>2</sup>, den 2. Antikörper enthaltenden, Blotto (hier GαM-POD, 1: 4000 verdünnt) hinzu und inkubiert wiederum für 4 Stunden bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4° C. Anschließend wird die Membran erneut viermal mit 0,5 ml/cm<sup>2</sup> für je 10 Minuten bei Raumtemperatur mit TBS gewaschen. Die Färbung der Immunkomplexe erfolgt wie in Kapitel 2.2.3.9.2 beschrieben mit Hilfe der DAB-Lösung.

### 2.2.3.10 N-terminale Aminosäuresequenzanalyse

(nach Edman u. Begg, 1967)

Nach Reinigung des Procathepsin D mit Hilfe der Pepstatin-Affinitätschromatographie und anschließender präparativer SDS-PAGE werden ca. 5 µg Protein gelöst in 50 µl 10 mM NaP<sub>i</sub> pH 7,0 zur Sequenzierung eingesetzt. Dazu werden in einem Flüssigkeitsphasenaminosäuresequenator (Firma Applied Biosystems, Weiterstadt) dem Edman-Abbau entsprechend zehn Mikrosequenzierungszyklen durchgeführt. Die Phenylthio-hydantionderivate der Aminosäuren werden mit einem „On-Line“-Analysator (Firma Applied Biosystems, Weiterstadt) identifiziert und ausgewertet. Man erhält je Zyklus ein Chromatogramm zur Identifizierung der Aminosäure. Nach Abschluß der Sequenzierung erhält man eine Tabelle, in der die Zyklen und die entsprechenden Aminosäuren (in pmol) verzeichnet sind.

### 2.2.3.11 Autoaktivierung von Procathepsin D

Benötigte Lösung: 1,43xSol(+SH) siehe 2.2.3.5

Die Autoaktivierung erfolgt durch Ansäuern der Procathepsin D-haltigen Proben auf pH 3,5 ; pH 3,65 bzw. pH 5,0.

Für die Western-Blots werden 90 ng Pepstatin A-gereinigtes Procathepsin D in 10 µl Elutionspuffer mit 10 µl 0,2 M NaAc pH 3,5 bzw. 0,2 M NaAc pH 5,0 versetzt. Die Proben werden für 0, 2 und 16 Stunden bei 37° C inkubiert. Abgestoppt werden die Reaktionen nach den entsprechenden Zeiten durch Zugabe von 1 µl 1 mM Pepstatin A-Lösung (gelöst in Ethanol) und bis zum vollständigen Versuchsablauf bei -20° C eingefroren. Anschließend werden die Proben mit 8 µl 1,43xSol(+SH) versetzt, 5 Minuten auf 95° C erhitzt und einer SDS-PAGE mit nachfolgendem Western-Blot bzw. mit nachfolgender Coomassie<sup>®</sup>Blue-Färbung unterzogen.

Für die Autoaktivierungskinetik werden 125 µl 0,2 M NaAc pH 3,65 mit 83 µl H<sub>2</sub>O gemischt und auf 37° C vorgewärmt. Anschließend gibt man 42 µl MonoQ-FPLC-gereinigtes Procathepsin D (entspricht 2,35 µg) hinzu und inkubiert bei 37° C. Zu verschiedenen Zeiten (siehe Ergebnisse, Kapitel, 3.14 Abb. 32) werden 20 µl-Aliquots entnommen, die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 2,5 mM Pepstatin A (gelöst in Ethanol) abgestoppt und bis zur Entnahme der letzten Probe auf Eis gelagert. Nach Ablauf der Versuchsreihe werden alle Proben mit je 10 µl GPF-Puffer und 2 µl 1 M NaOH versetzt. Es schließt sich die GPF-Spaltung an

(siehe 2.2.3.5.1). Die Analyse der deglykosylierten Proteine erfolgt mit Hilfe der SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung.

Die getrockneten, silbergefärbten Gele werden mit Hilfe des Canon CLC 10 gescannt (200 dpi, 256 Graustufen) und digitalisiert. Mit dem Programm ImageQuant<sup>TM</sup> werden die Banden anschließend quantifiziert und die erhalten Resultate mit dem Programm SigmaPlot graphisch dargestellt.

Die Autoaktivierungskinetik wird ebenso mit Hilfe des CD-Assays (siehe 2.2.3.4) verfolgt. Es wird die oben angegebene Reaktionsmischung angesetzt. Zu verschiedenen Zeiten (siehe Ergebnisse, Kapitel 3.14) werden 10 µl-Aliquots entnommen und zu 190 µl 0,1 M NaAc pH 3,65 inkl. 10 µl S2-Substrat (25.000 cpm <sup>14</sup>C-Hämoglobin, siehe CD-Assay, Kapitel 2.2.3.4) gegeben. Es schließt sich eine 10minütige Inkubation bei 37° C an. Die Reaktionen werden jeweils durch Zugabe von 1 µl 2,5 mM Pepstatin A-Lösung abgestoppt und bis zur Beendigung der Versuchsreihe auf Eis gelagert. Die Proben werden anschließend, wie im Kapitel CD-Assay (Kapitel 2.2.3.4) beschrieben, weiter verarbeitet.

### 2.2.3.12 Titration der Cathepsin D-Aktivität

#### 2.2.3.12.1 Mit Hilfe eines monoklonalen M $\alpha$ CD-Antikörpers (3F4)

Benötigte Lösung: TBS siehe 2.2.3.9.2

Für den Versuch wird MonoQ-FPLC gereinigtes Procathepsin D (420  $\mu$ g) mit gleichem Volumen 0,2 M NaAc pH 3,65 versetzt und für 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Das so erhaltene Pseudocathepsin D (15,8 ng/ $\mu$ l) wird für die Titration eingesetzt.

Zum Vergleich wird (nach vorheriger Pepstatin A-Affinitäts-Reinigung) MonoQ-FPLC-gereinigtes, reifes Cathepsin D aus humaner Plazenta eingesetzt (420  $\mu$ g; 14,3 ng/ $\mu$ l).

Die Inhibierung der CD-Aktivität erfolgt durch partielle Präzipitation des Cathepsin D mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 3F4 (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l) und Vernetzung durch ein K $\alpha$ M-Antiserum.

Nach folgendem Pipettierschema werden die Versuchsansätze gemischt:

Proben- Nummer	Pseudo- cathepsin D (15,8 ng/ $\mu$ l) ( $\mu$ l)	reifes Cathepsin D (14,3 ng/ $\mu$ l) ( $\mu$ l)	3F4 (0,1 $\mu$ g/ $\mu$ l) ( $\mu$ l)	K $\alpha$ M ( $\mu$ l)	TBS ( $\mu$ l)
1	3,8	----	0,0	0	106,2
2	3,8	----	0,0	4	102,2
3	3,8	----	0,5	4	101,7
4	3,8	----	1,0	4	101,2
5	3,8	----	2,0	4	100,2
6	3,8	----	4,0	4	98,2
7	3,8	----	8,0	4	94,2
8	----	4,2	0,0	0	105,8
9	----	4,2	0,0	4	101,8
10	----	4,2	0,5	4	101,3
11	----	4,2	1,0	4	100,8
12	----	4,2	2,0	4	99,8
13	----	4,2	4,0	4	97,8
14	----	4,2	8,0	4	93,8

Die Reaktionen werden über Nacht bei 4°C wippend inkubiert. Am nächsten Tag werden die gebildeten Immunkomplexe abzentrifugiert (14.000 rpm bei 4° C, Sorvall RMC 14) und jeweils 100  $\mu$ l des Überstandes für einen 30minütigen CD-Assay (siehe Kapitel 2.2.3.4) eingesetzt.

### 2.2.3.12.2 Mit Hilfe des Inhibitors Pepstatin A

benötigte Lösungen            TBS            siehe 2.2.3.9.2

Es werden die gleichen Cathepsin D-Proben (Pseudo- und reifes Cathepsin D) verwendet, wie im vorherigen Kapitel beschrieben.

Die partielle Inhibierung der Cathepsin D-Aktivität erfolgt durch Zusatz steigender Mengen des Inhibitors Pepstatin A.

Nach folgendem Schema werden die Reaktionsansätze pipettiert:

Proben- Nummer	Pseudo- cathepsin D (15,8 ng/μl) (μl)	reifes Cathepsin D (14,3 ng/μl) (μl)	TBS  (μl)	Pepstatin A (200 nM in EtOH) (μl)	0,2 M NaAc pH 3,65 (μl)
1	3,8	----	48,10	0,00	48,1
2	3,8	----	46,85	1,25	48,1
3	3,8	----	45,60	2,50	48,1
4	3,8	----	43,10	5,00	48,1
5	3,8	----	38,10	10,00	48,1
6	3,8	----	28,10	20,00	48,1
7	----	4,2	45,80	0,00	50,0
8	----	4,2	44,55	1,25	50,0
9	----	4,2	43,30	2,50	50,0
10	----	4,2	40,80	5,00	50,0
11	----	4,2	35,80	10,00	50,0
12	----	4,2	25,80	20,00	50,0

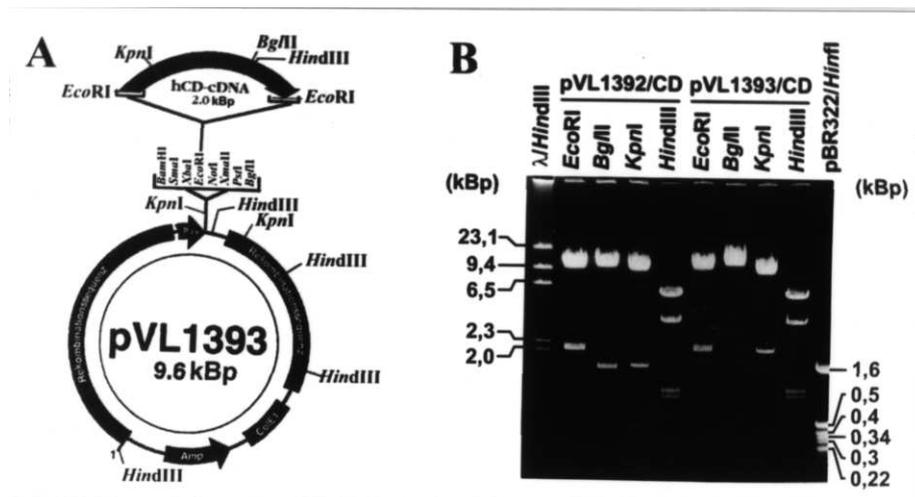
Die Proben werden für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in einem 30minütigen CD-Assay eingesetzt (siehe Kapitel 2.2.3.4)

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Klonierung der humanen Cathepsin D-cDNA in die Baculovirus-Vektoren pVL1392 / pVL1393

Die - in unserem Arbeitskreis von Martin Horst (1990) isolierte und in den pUC19-Vektor klonierte - humane Cathepsin D-cDNA wurde mit Hilfe von *EcoRI* herausgeschnitten und das 1991 Bp-große Fragment isoliert. Die cDNA umfaßt 6 Bp des 5'-nichttranslatierten, den codierenden und den 3'-nichttranslatierten Bereich (bis 22 Bp hinter der poly-A-Stelle, Faust *et al.* (1985)).

Das isolierte cDNA-Fragment wurde in den *EcoRI*-linearisierten pVL1392- bzw. pVL1393-Vektor kloniert. Die daraus resultierenden Klone werden pVL1392/CD bzw. pVL1393/CD genannt. Die nachfolgende Abb. 8 und Tabelle 1 gibt die Klonierungsstrategie und -effizienz beider Vektoren wieder:



**Abb. 8: Strategie und Verifikation der Klonierung der humanen Cathepsin D-cDNA in Baculovirus-Vektoren.** Die Abbildung A gibt schematisch den Vektor, das Insert und die benutzte Klonierungsstelle im Vektor wieder. Desweiteren enthält das Schema die Restriktionsendonukleasen, die verwendet wurden, um die Orientierung des Inserts zu ermitteln. Der Unterschied zwischen den Vektoren pVL 1393 (in der Abbildung gezeigt) und pVL 1392 (nicht gezeigt) liegt darin, daß die multiple Klonierungsstelle in inverser Orientierung vorliegt. (Abkürzungen: Amp: Ampicillin-Resistenzgen, ColE1: Replikationsursprung, P<sub>PH</sub>: Polyhedrin-Promoter, hCD-cDNA: humane Cathepsin D-cDNA)

Die Abbildung B zeigt die Aufnahme eines Agarosegels zur Demonstration der „richtigen“ Orientieren des Inserts in den Vektor (pVL 1392/CD, pVL 1393/CD). Es wurden jeweils 200 ng DNA mit 2 Units des entsprechenden Enzyms gespalten und auf dem Agarosegel getrennt. Die Visualisierung erfolgte auf dem Transilluminator mit Hilfe des im Gel enthaltenen Ethidiumbromids und eines Videodokumentationssystems. Als molekularer Gewichtsstandard wurde λ/HindIII und pBR322/HinfI verwendet.

Plasmid	Anzahl Klone pro Platte	$\times 10^5$ cfu pro $\mu\text{g}$ DNA	Anzahl untersuchter Klone	Anzahl positiver Klone	Anzahl Klone mit „falscher“ Orientierung	Anzahl Klone mit „richtiger“ Orientierung
pVL 1392/CD	22	1,9	9	7	1	6
pVL 1393/CD	34	2,9	9	7	1	6

**Tabelle 1.: Darstellung der Klonierungseffizienz** (Abkürzung cfu: Kolonie-bildende Einheit („colony forming unit“)).

Zum Beweis der erfolgreichen Klonierung der humanen CD-cDNA in die pVL-Vektoren wurden die Plasmide mit *EcoRI* gespalten. Sowohl bei pVL1392/CD als auch bei pVL1393/CD erhält man dabei zwei Fragmente (Vektor: 9,6 kBp, Insert: 2,0 kBp). Die Orientierung lässt sich mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen, die das Insert asymmetrisch spalten, ermitteln. Zu diesem Zweck wurden die Enzyme *BglIII*, *KpnI* und *HindIII* gewählt.

Wie in Abb. 8 ersichtlich, liefert die Spaltung mit ***BglIII*** bei der richtigen Orientierung **zwei Fragmente**:

**pVL1392/CD:** 10,1 kBp (9,6 kBp Vektor + 0,5 kBp Insert) und 1,5 kBp (Insert);

**pVL1393/CD:** 11,1 kBp (9,6 kBp Vektor + 1,5 kBp Insert) und 0,52 kBp (0,02 kBp Vektor + 0,5 kBp Insert).

Die Spaltung mit ***KpnI*** liefert bei richtiger Orientierung **drei Fragmente**:

**pVL1392/CD:** 9,61 kBp (9,15 kBp Vektor + 0,46 kBp Insert), 1,55 kbp (0,02 kBp Vektor + 1,53 kBp Insert) und 0,47 kBp (Vektor);

**pVL1393/CD:** 9,13 kBp (Vektor), 2,03 kBp (0,49 kBp Vektor + 1,54 kBp Insert) und 0,47 kBp (0,01 kBp Vektor + 0,46 kBp Insert)

Die Spaltung mit ***HindIII*** liefert bei richtiger Orientierung in beiden Vektoren das gleiche Bandenmuster mit **5 Fragmenten**:

**pVL1392/CD und pVL1393/CD:** 5,72 kBp (4,15 kBp Vektor + 1,57 kBp Insert), 3,41 kBp (Vektor), 1,04 kBp (Vektor), 0,093 kBp (Vektor) und 0,58 kBp (0,11 kBp Vektor + 0,47 kBp Insert).

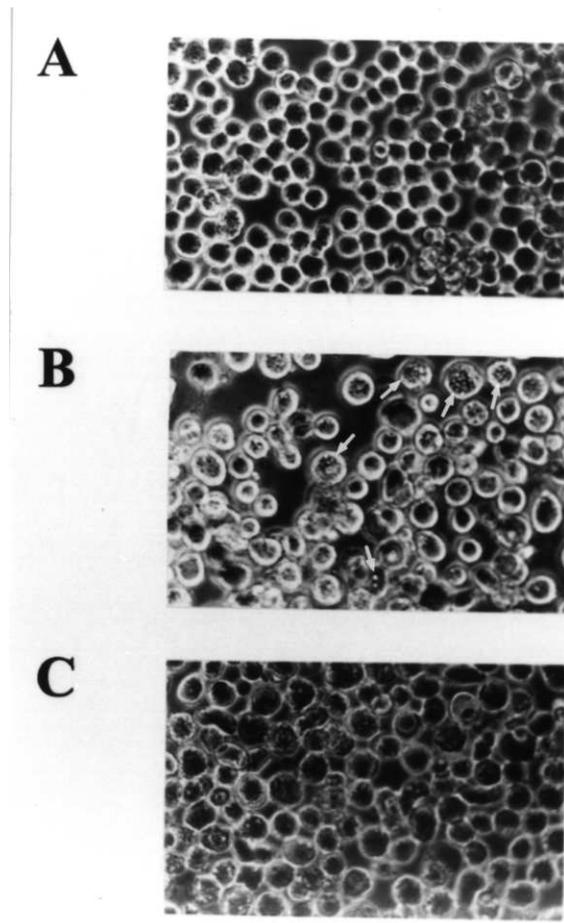
Da beide Vektoren dieselben Eigenschaften haben und sich nur in der Orientierung der multiplen Klonierungsstelle unterscheiden, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit nur mit dem pVL1393/CD-Plasmid weitergearbeitet und zur Herstellung des rekombinanten AcMNP-Virus verwendet.

### **3.2 Herstellung und Reinigung des rekombinanten AcMNP-Virus**

Sf21-Zellen wurden zusammen mit pVL1393/CD- und AcMNPV-Wildtyp-DNA transfiziert. Dabei findet innerhalb der Zellen eine homologe Rekombination statt, bei der das Polyhedringen des Wildtyp-Virus gegen die rekombinante cDNA (in diesem Fall die, des humanen Cathepsin D) ausgetauscht wird, so daß rekombinante Viruspartikel hergestellt werden, die keinen Polyhedrinmantel mehr haben. Diese Viruspartikel werden ins Medium sezerniert und infizieren weitere Zellen (ebenso gelangen die Viruspartikel durch Lyse der Zellen ins Medium). Die rekombinanten Viren induzieren bei infizierten Zellen die Produktion des rekombinanten Proteins, welches durch Messung der Cathepsin D-Aktivität im Medium überprüft wurde (siehe Tabelle 2).

Während Sf21-Zellen sich alle 24 Stunden teilen, treten sie nach Infektion zunächst in die stationäre Phase ein (kein Zellwachstum mehr), bevor sie letztendlich lysiert werden.

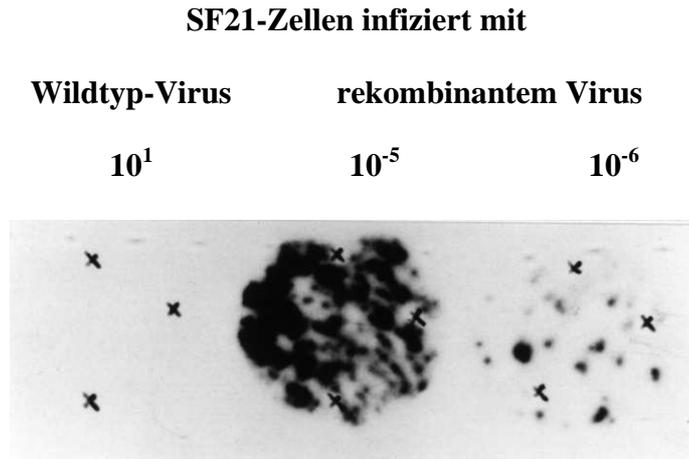
Da bei der homologen Rekombination eine Mischpopulation an Viren gebildet wird, muß sich eine Reinigung der Cathepsin D produzierenden Viren anschließen. Die nachfolgende Abb. 9 zeigt die Schwierigkeit, rekombinant-infizierte von nichtinfizierten Zellen zu unterscheiden, während man wildtyp-infizierte Zellen deutlich an den Einschlußkörperchen innerhalb der Zelle erkennen kann. Ein Merkmal, in dem sich infizierte Zellen von nichtinfizierten Zellen unterscheiden, ist, daß sich infizierte Zellen vom Boden der Kulturflasche ablösen und im Medium schwimmen. Dieses kann man sich jedoch bei der Reinigung nicht zunutze machen, da es, zwecks Isolierung der sezernierten, rekombinanten Viruspartikel, darauf ankommt, diese örtlich - durch Überschichtung der Zellen mit Agarosemedium - zu fixieren.



**Abb. 9: Vergleich nicht-, wildtyp- und rekombinant-infizierter Sf21 Zellen.** Die Photographien zeigen **A** nichtinfizierte, **B** mit Wildtypvirus-infizierte und **C** mit rekombinantem Virus infizierte Zellen. Deutlich zu erkennen sind die Einschlusskörperchen bei den wildtyp-infizierten Zellen (einige sind beispielhaft mit „→“ markiert), während sich die rekombinant-infizierten von den nicht-infizierten kaum unterscheiden. Es hat allerdings den Anschein, als ob die rekombinant-infizierten Zellen im Durchschnitt etwas größer seien, als die nicht infizierten. Die Aufnahmen wurden unter dem Mikroskop bei 100facher Vergrößerung gemacht.

Das Medium von kotransfizierten (HINK's/CD) bzw. wildtyp-infizierten Zellen (HINK's/WT) wurde zur Infektion von Sf21-Zellen genutzt, die anschließend mit Agarosemedium überschichtet wurden.

Zur Identifizierung rekombinanter Viren wurde ein Plaque-Assay mit anschließendem Abklatsch auf Nitrocellulose und Hybridisierung mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten hCD-cDNA-Sonde durchgeführt. Die Abb. 10 zeigt die hybridisierten NC-Filter nach Autoradiographie.



**Abb. 10: Autoradiographie hybridisierter NC-Filter.** Es wurden Minischalen mit  $2 \times 10^6$  Sf21-Zellen ausgesät und mit jeweils 100  $\mu$ l unverdünntem HINK's/WT (Wildtypvirus) bzw. mit  $10^{-5}$ - und  $10^{-6}$  fach-verdünntem HINK's/CD (rekombinantem Virus) infiziert. Nach der Infektion wurden die Zellen mit Agarosemedium überschichtet und für 5 Tage inkubiert. Anschließend folgte der Abklatsch auf Nitrocellulosefilter und die Hybridisierung mit einer  $^{32}$ P-markierten hCD-cDNA-Sonde. Rekombinanter Virus ist auf den Filtern der rekombinant-infizierten Zellen an den schwarzen Punkten zu erkennen, während die wildtyp-infizierten Zellen wie erwartet kein Signal zeigen. (x) gibt die Markierung der Position auf dem NC-filter und der Agaroseplatte wieder.

Die bei der Autoradiographie erhaltenen Röntgenfilme wurden mit den dazugehörigen Agaroseplatten - an Hand der Markierungen - zur Deckung gebracht und die Agarose an den Stellen, die ein positives Signal zeigten, ausgestochen. Die in dem Agarosestückchen enthaltenen rekombinanten Viren wurden mit HINK's-Medium eluiert. Mit dem so erhaltenen HINK's/CD-Medium wurden erneut Zellen infiziert und nach ca. 10 Tagen Kultivierung die Cathepsin D-Aktivität im Medium bestimmt. Da dieses HINK's/CD-Medium weiterhin Wildtypviren enthielt (siehe Tabelle 2), schloß sich eine erneute Reinigung mit Hilfe der Plaque-Hybridisierung an. Die Reinigung wurde so oft wiederholt, bis unter dem Mikroskop keine Wildtypviren mehr zu erkennen waren. Zur Sicherheit führte man die Reinigung noch ein weiteres Mal durch.

Nach der letzten Reinigung und nach Amplifikationen wurde der Virustiter mittels Plaque-Hybridisierung bestimmt. Durch Auszählung der positiven Signale und Berücksichtigung der Verdünnung des HINK's/CD-Mediums, welches zur Infektion benutzt wurde, konnte der Virustiter auf  $10^8$  Viren pro ml bestimmt werden, wobei sich dieser Wert bei wiederholten Amplifikationen bestätigte.

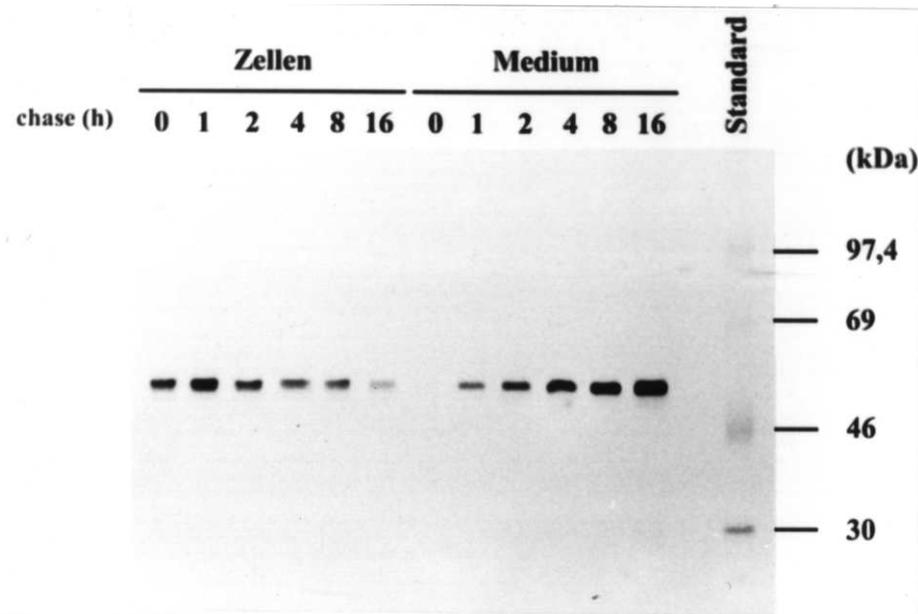
	Transfektion (8 Tage p.i.)	1. Reinigung (10 Tage p.i.)	2. Reinigung (11 Tage p.i.)	3. Reinigung (10 Tage p.i.)
Proteinaseaktivität im Medium wildtyp-infizierter Zellen ( $\mu\text{g Hb}\times\text{ml}^{-1}\times\text{h}^{-1}$ )	10	12	9	14
Proteinaseaktivität im Medium rekombinant-infizierter Zellen ( $\mu\text{g Hb}\times\text{ml}^{-1}\times\text{h}^{-1}$ )	53	85	75	102
Virustiter der Infektionslösung (rekombinante Viren) ( $\times 10^6$ pfu/ml)	1	5,8	71	100
Anwesenheit von Wildtypviren in rekombinant-infizierten Zellen	++	+	-	-

**Tabelle 2: Nachweis von Proteinaseaktivität im Medium wildtyp- und rekombinant-infizierter Sf21-Zellen nach den angegebenen Reinigungsstufen.** Die Aktivität wurde in jeweils 100  $\mu\text{l}$  Medium mit Hilfe des CD-Assays mit  $^{14}\text{C}$ -Hämoglobin als Substrat bestimmt. Die in der Tabelle angegebenen Werte sind um den Leerwert ( $0,9 \pm 0,2 \mu\text{g Hb}\times\text{ml}^{-1}\times\text{h}^{-1}$ , gemessen mit 100  $\mu\text{l}$  virusfreiem Medium) normiert worden. Die Cathepsin D-Aktivität ergibt sich aus der Differenz rekombinant- zu wildtyp-infizierten Zellen. Die Zeitangaben beziehen sich darauf, nach wieviel Tagen nach der Infektion das Medium auf Proteinase-Aktivität getestet wurde. Die Anwesenheit von Wildtypviren in den Viruseluaten wurde optisch durchgeführt, indem die Zellen, die mit dem entsprechenden Viruseluat infiziert worden waren, unter dem Mikroskop auf Vorhandensein von Einschlußkörperchen untersucht wurden. Dabei bedeutet „++“ viele, „+“ wenige, „-“ keine Wildtypviren. (Abkürzungen: p.i.: nach Infektion („post infection“), Hb: Hämoglobin, pfu: Plaque-bildende Einheit („plaque forming unit“))

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, nimmt mit der Reinigung die Anwesenheit von Wildtypviren erwartungsgemäß ab. Hingegen steigt der rekombinante Virustiter von  $1\times 10^6$  auf  $1\times 10^8$  pfu/ml an. Desweiteren zeigt sich im Medium wildtyp-infizierter Zellen eine geringe Proteinaseaktivität, im Durchschnitt - über die drei Reinigungsstufen gemittelt - von  $11 \pm 2 \mu\text{g Hb}\times\text{ml}^{-1}\times\text{h}^{-1}$ , während die Aktivität im Medium rekombinant-infizierter Zellen deutlich höher ist (ca. 5- bis 8fache Steigerung). Infiziert man dieselbe Zellzahl mit den verschiedenen Virustypen mit einer MOI von 10, so beträgt die Proteinaseaktivität nach 5 Tagen im Medium wildtyp-infizierter Zellen  $6,0 \pm 0,8 \mu\text{g Hb}\times\text{ml}^{-1}\times\text{h}^{-1}$ , die Proteinaseaktivität bei rekombinant-infizierten Zellen  $171 \pm 2 \mu\text{g Hb}\times\text{ml}^{-1}\times\text{h}^{-1}$ . Daraus errechnet sich eine 29mal höhere Proteinaseaktivität im Medium rekombinant infizierter Zellen.

### 3.3 Biosynthese und Sekretion von humanem Procathepsin D in rekombinant-infizierten Sf21-Zellen

Die erfolgreiche Klonierung des rekombinanten Baculovirus wurde zwar - wie im vorherigen Kapitel beschrieben - mit Hilfe der Proteinaseaktivität im Medium infizierter Zellen nachgewiesen. Da Cathepsin D jedoch eine lysosomale Proteinase und somit normalerweise intrazellulär lokalisiert ist, bot sich ein „Pulse/Chase“-Experiment an, um die Biosynthese und Lokalisation zu überprüfen (Abb. 11).

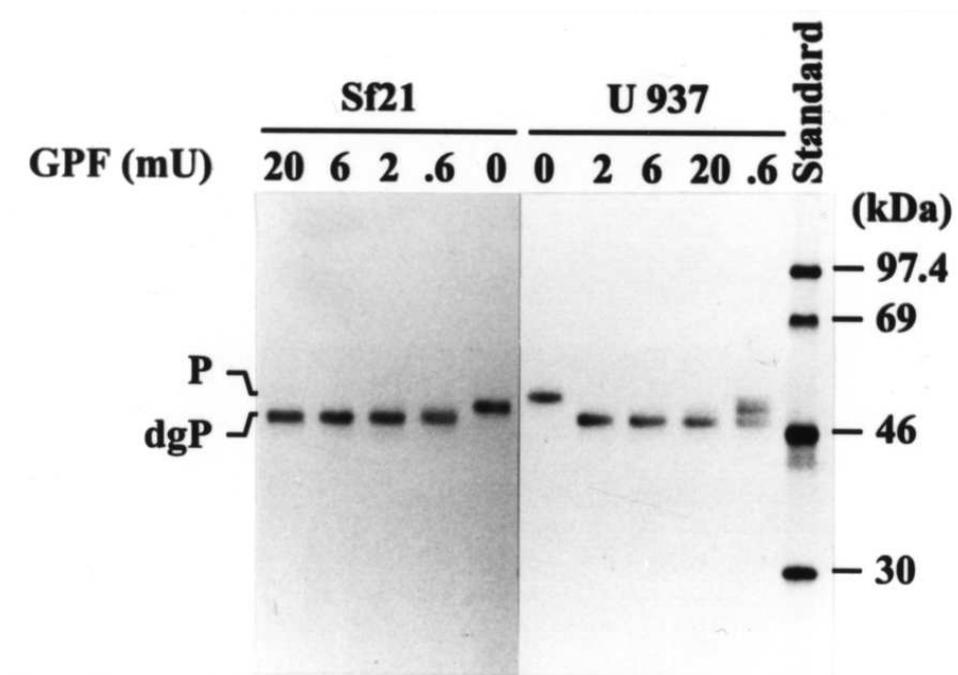


**Abb. 11: Biosynthese und Sekretion von Procathepsin D.** Je Minischale wurden  $5 \times 10^6$  Sf21-Zellen zwei Tage nach der Infektion metabolisch mit je  $50 \mu\text{Ci } ^{35}\text{S-Cys/Met}$  für eine Stunde („Pulse“) markiert. Durch Zugabe einer Mischung von nichtradioaktivem Cys/Met zum Medium wurde der „Chase“ gestartet und nach den oben angegebenen Chase-Zeiten die Zellen und das Medium geerntet. Die Visualisierung des Procathepsin D erfolgte durch Immunpräzipitation, Trennung mittels reduzierender SDS-PAGE und anschließender Fluorographie.

Im „Pulse/Chase“-Experiment zeigt sich, daß das Procathepsin D keiner Prozessierung unterliegt, d. h. es findet keine Reifung statt. Die densitometrische Auswertung ergibt, daß sich nach 16stündigem Chase 98 % des Procathepsin D im Medium befinden, und nur 2 % in der Zellfraktion. Durch dieses Ergebnis wurde die Vorgehensweise in den vorangegangenen Versuchen als richtig bestätigt (Nachweis des Cathepsin D, induziert durch Infektion mit rekombinantem Virus, durch Messung der Cathepsin D-Aktivität im Medium infizierter Zellen) und eröffnete die Möglichkeit, eine Strategie zur Reinigung des Procathepsin D aus dem Medium von rekombinant infizierten Zellen zu entwickeln (weiteres dazu siehe 3.8).

### 3.4 Spaltung des rekombinanten Procathepsin D mit Glykopeptidase F (GPF)

Ein Grund für die Entscheidung, das Baculovirussystem zur Produktion von Procathepsin D zu benutzen, war die Fähigkeit der Sf21-Zellen, Proteine zu glykosylieren und sie mit hoher Ausbeute zu sezernieren. Um zu überprüfen, ob und in welcher Form das rekombinante Procathepsin D glykosyliert ist, wurde eine Spaltung mit Glykopeptidase F (GPF) durchgeführt, wobei GPF Asparagin-gebundene Oligosaccharide jeden Typs abspaltet. Es wurden Sf21-Zellen zwei Tage nach der Infektion metabolisch mit  $^{35}\text{S}$ -Cys/Met markiert. Zur Kontrolle wurden calcitriolbehandelte (Steigerung der Expression) Promonozytenzellen (U937) in Anwesenheit von 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Sekretion des Procathepsin D ins Medium) metabolisch markiert. Aus den Medien wurde das Procathepsin D immunpräzipitiert, die Immunpräzipitate in fünf gleiche Teile geteilt und mit steigenden Mengen GPF (0 bis 20 mU) behandelt (siehe Abb. 12).



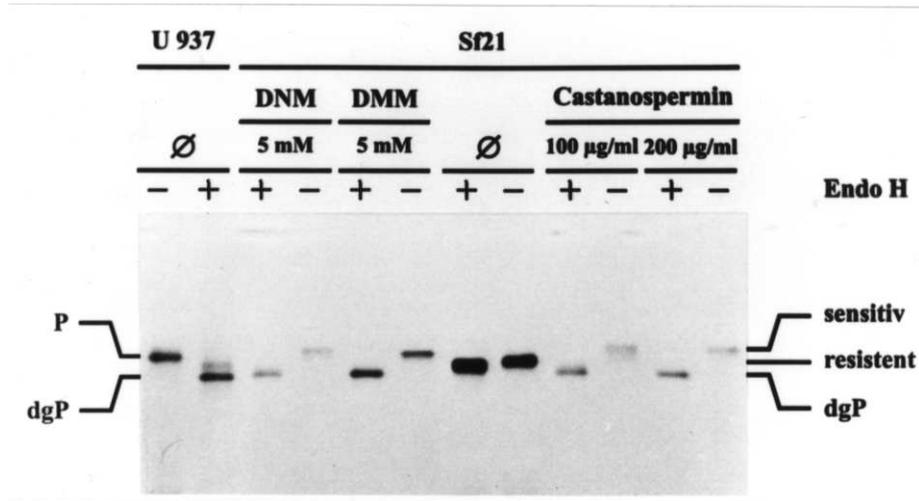
**Abb. 12: Glykopeptidase F-Spaltung.**  $0,5 \times 10^6$  Sf21-Zellen wurden 2 Tage nach der Infektion mit  $50 \mu\text{Ci } ^{35}\text{S}$ -Cys/Met metabolisch, über Nacht markiert. Zur Kontrolle wurden  $10^6$  calcitriolbehandelte U937-Zellen in Anwesenheit von 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  mit  $50 \mu\text{Ci}$ -Cys/Met metabolisch, über Nacht markiert. Das Procathepsin D wurde mit Hilfe des monoklonalen anti-Cathepsin D-Antikörpers (3G8) aus den Medien immunpräzipitiert. Nach Solubilisierung der Proben in GPF-Puffer und Aufteilung in fünf Aliquots gab man die in der Abbildung angegebene Menge an GPF zu den Proben und inkubierte über Nacht bei  $37^\circ \text{C}$ . Es folgte die Trennung der Proben mit Hilfe der SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen und Visualisierung durch Fluorographie.

Die Abb. 12 zeigt, daß das in rekombinant-infizierten Sf21-Zellen synthetisierte Procathepsin D glykosyliert ist und sich die Oligosaccharidseitenketten schon mit der geringsten Menge an GPF (0,6 mU) vollständig abspalten ließen. Das dabei erhaltene, deglykosylierte Protein weist die gleiche scheinbare Größe auf wie deglykosyliertes Procathepsin D aus U937-Zellen (47 kDa),

während das glykosylierte Procathepsin D aus U937-Zellen (scheinbare Größe 52 kDa) größer ist, als das aus Sf21-Zellen (scheinbare Größe 51 kDa). Beim Procathepsin D aus U937-Zellen erhalten wir bei Verwendung von 0,6 mU GPF zwei Banden, die durch eine partielle Spaltung zu erklären sind. Da Procathepsin D zwei Glykosylierungsstellen besitzt, gibt die obere Bande das einfach glykosylierte (scheinbare Größe 50 kDa), die untere Bande das vollständig deglykosylierte Protein (47 kDa) wieder. Dieses wird dadurch bestätigt, daß die obere Bande bei Verwendung größerer Mengen GPF verschwindet und nur noch die untere zu erkennen ist.

### **3.5 Synthese von Procathepsin D mit mannosereichen Oligosacchariden in Sf21-Zellen**

Nachdem festgestellt wurde, daß das rekombinante Procathepsin D glykosyliert, jedoch kleiner als Procathepsin D aus U937-Zellen war, wurde die Zuckerstruktur bezüglich der Sensitivität gegenüber *Endo*- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase H (*Endo* H) untersucht. Der Größenunterschied, der sich im Vergleich von Procathepsin D aus Sf21- und U937-Zellen zeigte, könnte bedeuten, daß entweder nur eine Glykosylierungsstelle genutzt wird, und diese mannosereiche Zucker enthält (*Endo* H-sensitiv), oder beide Glykosylierungsstellen mit „getrimmten“ Oligosacchariden versehen sind (*Endo* H-resistent). In der Abb. 13 ist zu sehen, daß das Procathepsin D aus Sf21-Zellen *Endo* H-resistent ist. Es wurde untersucht, ob man, durch Einsatz von Hemmstoffen des Prozessierungsweges der Oligosaccharidseitenketten, Procathepsin D mit mannosereichen Oligosacchariden erhält. Dazu wurden Sf21-Zellen metabolisch mit  $^{35}\text{S}$ -Cys/Met in Anwesenheit von 5 mM Deoxynojirimycin (DNM), 5 mM Deoxymannojirimycin (DMM) bzw. bis zu 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Castanospermin markiert. Nach Immunpräzipitation des Procathepsin D wurden die Proben  $\pm$  *Endo* H behandelt, mittels SDS-PAGE getrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht.



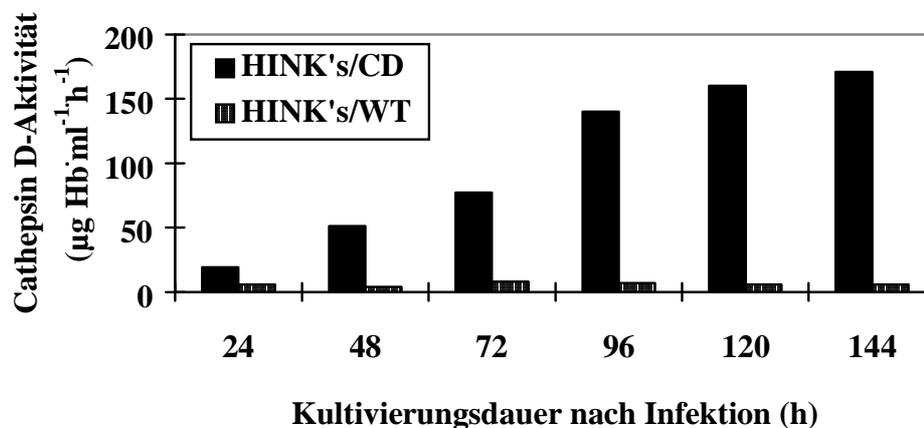
**Abb. 13: Synthese von Procathepsin D mit mannosereichen Oligosaccharidseitenketten in Sf21-Zellen.** Je Minischale wurden  $5 \times 10^5$  Sf21-Zellen mit je  $50 \mu\text{Ci } ^{35}\text{S-Cys/Met}$  über Nacht metabolisch markiert. Während der Markierung wurde jeweils ein Ansatz mit  $5 \text{ mM Deoxynojirimycin (DNM)}$ , mit  $5 \text{ mM Dexymannojirimycin (DMM)}$ , mit  $100 \mu\text{g/ml}$  und mit  $200 \mu\text{g/ml Castanospermin}$  versetzt. Als Kontrolle wurden Zellen in Abwesenheit der Inhibitoren markiert. Zum Vergleich markierte man zusätzlich  $10^6$  calcitriolbehandelte U937-Zellen in Anwesenheit von  $10 \text{ mM NH}_4\text{Cl}$ . Das Procathepsin D wurde aus den Medien immunpräzipitiert, halbiert und die eine Hälfte mit insgesamt  $2 \text{ mU Endo-}\beta\text{-N-Acetylglukosaminidase H (Endo H)}$  versetzt. Nach 18stündiger Inkubation bei  $37^\circ \text{C}$  wurden die Proben auf einem SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen getrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht. (weitere Abkürzungen und Symbole: P: Procathepsin D, dgP: deglykosyliertes Procathepsin D. Ø: ohne Zusatz von Inhibitoren)

Die Abb. 13 zeigt, daß Procathepsin D aus Sf21-Zellen Endo H-resistent ist. Dieses läßt - zusammen mit dem vorhandenen Befund der geringeren scheinbaren Größe des Procathepsin D aus Sf21-Zellen - vermuten, daß wahrscheinlich beide Glykosylierungsstellen genutzt, jedoch mit „getrimmten“ Oligosacchariden versehen werden. Unter Verwendung der Inhibitoren des Prozessierungsweges der Oligosaccharidseitenketten erhalten wir Endo H-sensitives Procathepsin D. Dabei inhibiert Deoxynojirimycin und Castanospermin die Glukosidase I des ER, so daß Oligosaccharidseitenketten der Struktur  $(\text{Glc})_3(\text{Man})_9(\text{GlcNAc})_2$  erhalten, während Deoxymannojirimycin die  $\alpha$ -Mannosidase I des Golgi-Apparates hemmt, welches zu der Zuckerstruktur  $(\text{Man})_8(\text{GlcNAc})_2$  führt. Dies drückt sich auch in der scheinbaren Größe des Procathepsin D im SDS-Gel aus. Unter Einfluß von DNМ bzw. Castanospermin erhalten wir vor Endo H-Spaltung ein Protein von  $53 \text{ kDa}$ , nach Endo H-Spaltung eines von  $49 \text{ kDa}$ . Bei Verwendung von DMM liegt die Größe des Proteins vor Endo H-Spaltung bei  $52 \text{ kDa}$ , nach Endo H-Spaltung bei  $49 \text{ kDa}$ . Das Endo H-resistente Procathepsin D aus Sf21-Zellen zeigt ein scheinbares Gewicht von  $51 \text{ kDa}$ . Zum Vergleich hat das Procathepsin D aus U937-Zellen ein scheinbares Gewicht von  $52 \text{ kDa}$  vor Endo H-Behandlung, während sich nach Endo H-Spaltung zwei Banden zeigen, die schwächere, obere von  $51 \text{ kDa}$  (partielle Spaltung, einfach glykosyliertes Pro-CD) und die stärkere, untere von  $49 \text{ kDa}$  (vollständige Spaltung, deglykosyliertes Pro-CD).

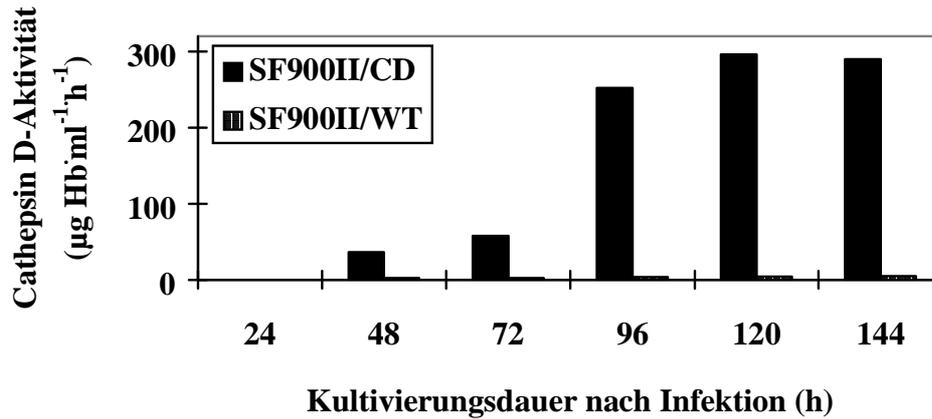
Desweiteren erkennt man in Abb. 13, daß die Intensität der Banden (bei Markierung gleicher Zellzahlen) bei Verwendung der Inhibitoren deutlich schwächer sind, als ohne Inhibitoren, wobei DMM die Expression bzw. Sekretion weniger stark vermindert, als DNM oder Castanospermin (Erläuterung siehe Diskussion).

### 3.6 Expression von Procathepsin D bei Kultivierung der Sf21-Zellen in serumfreiem bzw. -haltigem Medium

Die bisher beschriebenen Versuche wurden in serumhaltigem Medium (HINK's) durchgeführt. Seit einiger Zeit sind serumfreie Medien kommerziell erhältlich, die dadurch, daß sie proteinfrei sind, einen erheblichen Vorteil bei der Reinigung rekombinanter Proteine bieten. Um diesen Vorteil zu nutzen, wurde das serumfreie SF900II-Medium der Firma Life Technologies, Eggenstein getestet. In beiden Medien (serumhaltig und -frei) wurde die Zeitabhängigkeit der Expressions bzw. Sekretion von rekombinantem, humanem Procathepsin D bei infizierten Sf21-Zellen überprüft. Zur Kontrolle wurde jeweils eine zweite Kultur mit Wildtypvirus infiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 und Abb. 15 dargestellt.



**Abb. 14:** Nachweis der Cathepsin D-Aktivität im Medium infizierten Sf21-Zellen (bei Verwendung von serumhaltigem (HINK's) Medium).  $300 \times 10^6$  Sf21-Zellen wurden mit einer Dichte von  $10 \times 10^6$  Zellen/ml in einer Rollerflasche ausgesät und mit einer MOI von 10 für eine Stunde bei  $27^\circ \text{C}$  infiziert (je eine Kultur mit rekombinantem Virus bzw. mit Wildtypvirus). Anschließend wurden die Kulturen auf eine Dichte von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml verdünnt und weiter bei  $27^\circ \text{C}$  inkubiert. Jeden Tag wurde den Kulturen zur Bestimmung der Cathepsin D-Aktivität eine Probe entnommen. Zur Aktivitätsbestimmung (CD-Assay) wurden  $100 \mu\text{l}$  Medium (bei HINK's/CD-Proben nach 72 bis 144 Stunden  $30 \mu\text{l}$  Medium mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf  $100 \mu\text{l}$  aufgefüllt) eingesetzt. Eine vorherige Inkubation des Mediums bei niedrigem pH (pH 3,65) ohne Substrat wurde nicht durchgeführt. Der CD-Assay wurde  $\pm$  Pepstatin A durchgeführt und die Cathepsin D-Aktivität als Pepstatin A-sensitive Hydrolyse von  $^{14}\text{C}$ -Hämoglobin berechnet. (Abkürzungen: HINK's/CD: Medium der, mit Procathepsin D-produzierendem Virus infizierten Kultur, HINK's/WT: Medium der, mit Wildtypvirus infizierten Kultur, Hb: Hämoglobin)



**Abb. 15:** Nachweis der Cathepsin D-Aktivität im Medium infizierten Sf21-Zellen (bei Verwendung von serumfreiem (SF900II) Medium). Die Kultivierungs- und Infektionsbedingungen waren identisch mit denen in Abb. 14, bis auf die Tatsache, daß die infizierten Zellen in Anwesenheit von  $2 \mu\text{M}$  Leupeptin,  $1 \text{ mM}$  Pefablock,  $10 \mu\text{g/ml}$   $\alpha_2$ -Makroglobulin,  $10 \mu\text{M}$  E-64 und  $10 \mu\text{M}$  Z-Phe-Phe-diazomethylketon kultiviert wurden (Erläuterung siehe nächstes Kapitel!). Zur Aktivitätsbestimmung wurden bei wildtyp-infizierten Zellen  $100 \mu\text{l}$  Medium und bei rekombinant-infizierten Zellen  $15 \mu\text{l}$  Medium (mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf  $100 \mu\text{l}$  aufgefüllt) eingesetzt. Der CD-Assay wurde wie in Abb. 14 beschrieben durchgeführt und die Cathepsin D-Aktivität als Pepstatin A-sensitive Hydrolyse von  $^{14}\text{C}$ -Hämoglobin berechnet. (Abkürzungen: SF900II/CD: Medium der, mit Procathepsin D-produzierendem Virus infizierten Kultur, SF900II/WT: Medium der, mit Wildtypvirus infizierten Kultur, Hb: Hämoglobin)

Sowohl im serumfreien, als auch im serumhaltigen Medium ist die Cathepsin D-Aktivität bei rekombinant-infizierten Zellen deutlich höher als bei wildtyp-infizierten Zellen und erreicht nach 5 bis 6 Tagen ihr Maximum. Dabei ist die Aktivität im serumhaltigen Medium bei rekombinant-infizierten Zellen nach 6 Tagen um Faktor 29 höher als bei wildtyp-infizierten Zellen ( $171 \pm 2 \mu\text{g Hb} \times \text{ml}^{-1} \times \text{h}^{-1}$  gegenüber  $6 \pm 1 \mu\text{g Hb} \times \text{ml}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ ). Im serumfreien Medium ist der Unterschied zwischen rekombinant- und wildtyp-infizierten Zellen noch größer (Faktor 59;  $296 \pm 6 \mu\text{g Hb} \times \text{ml}^{-1} \times \text{h}^{-1}$  gegenüber  $5 \pm 1 \mu\text{g Hb} \times \text{ml}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ ). Aus den Zahlen und den Abb. 14 und Abb. 15 läßt sich vermuten, daß die Expressionsleistung der rekombinant-infizierten Sf21-Zellen in serumfreiem Medium höher ist, als in serumhaltigem Medium. Diese Aussage gilt hier jedoch unter Vorbehalt, da spätere Versuche gezeigt haben, daß das Procathepsin D durch Inkubation bei pH 3,65 und  $37^\circ \text{C}$  autokatalytisch (Entstehung von Pseudocathepsin D) aktiviert wird und die in Abb. 14 und Abb. 15 gezeigten Aktivitätstest ohne Vorinkubation durchgeführt worden sind (für weitere Ausführungen sei auf die Diskussion verwiesen).

### 3.7 Einsatz von Proteinase-Inhibitoren bei der Produktion von rekombinantem Procathepsin D in serumfreiem Medium

Nachdem größere Mengen an rekombinantem Procathepsin D aus Sf21-Zellen (sowohl in serumfreien, als auch in serumhaltigen Medium) zur Verfügung standen, wurde dieses mit Hilfe eines Western-Blots überprüft. Dabei zeigte sich, daß das Procathepsin D in serumfreiem Medium kleiner war, als das in serumhaltigen Medium (siehe die beiden linken Bahnen der Abb. 17). Es ist zu vermuten, daß das Procathepsin D im serumfreien Medium einer proteolytischen Spaltung unterliegt. Dazu wurde - mit Hilfe des CD-Assays - die Proteinaseaktivität in An- und Abwesenheit verschiedener Inhibitoren und deren Kombinationen, untersucht. Da der pH-Wert des Mediums während der Kultivierung infizierter Sf21-Zellen von pH 6,8 auf ca. pH 5,5 sinkt, wurde der CD-Assay bei pH 5,2 durchgeführt, um die Proteinaseaktivität möglichst bei den Bedingungen zu testen, die während der Kultivierung auftreten. Tabelle 3 faßt die erhaltenen Ergebnisse zusammen.

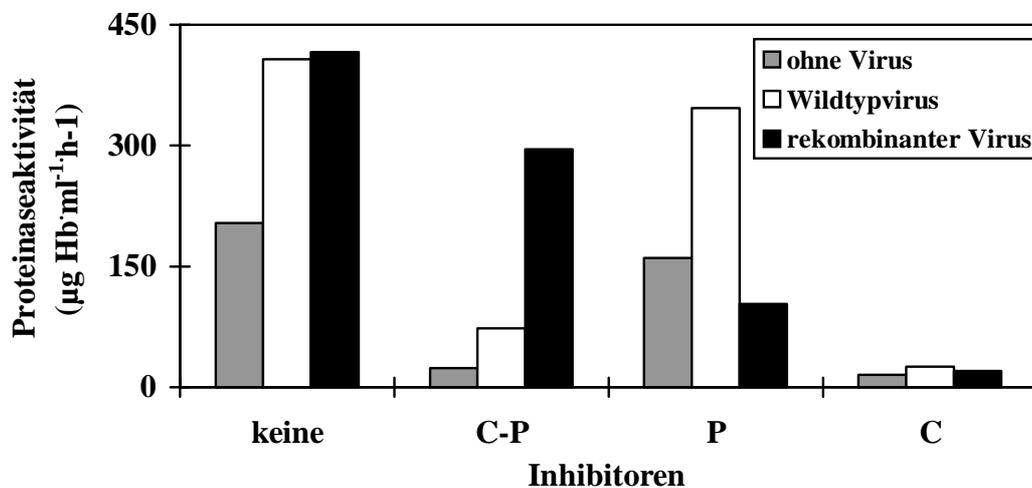
Ansatz -Nr.	Zugabe an Inhibitoren, zusätzlich zu 10 µM Pepstatin A	Hydrolyse von <sup>14</sup> C-Hämoglobin (µg Hb×ml <sup>-1</sup> ×h <sup>-1</sup> )	Relative Aktivität (%)
1	keine	42 ± 4	100 ± 8
2	Leupeptin (2 µM)	11 ± 2	25 ± 5
3	Jodacetamid (10 mM)	21 ± 3	50 ± 8
4	E-64 (10 µM)	10 ± 2	23 ± 5
5	Phenylmethylsulfonylfluorid (10 mM)	31 ± 1	74 ± 3
6	Pefablock <sup>®</sup> SC (1 mM)	35 ± 2	82 ± 5
7	Z-Phe-Phe-diazomethylketon (10 µM)	28 ± 4	65 ± 9
8	α <sub>2</sub> -Makroglobulin (10 µg/ml)	35 ± 3	83 ± 8
9	2+3+5	5 ± 1	12 ± 3
10	2+6+8	8 ± 1	18 ± 2
11	2+3+4+5+7	6 ± 1	13 ± 2
12	2+4+6+7+8	9 ± 1	22 ± 3

**Tabelle 3: Einfluß verschiedener Inhibitoren auf die Proteinaseaktivität im Medium infizierter SF 21-Zellen.** Mit einer MOI von 10 infizierte Sf21-Zellen wurden 5 Tage in serumfreiem Medium (SF900II) bei 27° C inkubiert. Anschließend wurde das Medium geerntet und jeweils 25 µl (mit H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt) für den CD-Assay bei pH 5,2 eingesetzt. Die Inhibitoren wurden dem Assay, der Tabelle entsprechend, mit den in Klammern angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt, wobei bei den Ansätzen 9 bis 12 Kombinationen der Inhibitoren verwendet wurden. Die Proteinaseaktivität ist als Hydrolyse von <sup>14</sup>C-Hämoglobin berechnet und die relative Aktivität auf die Pepstatin A-resistente Aktivität (100 %), die mehr als die Hälfte der Gesamtproteinaseaktivität im Medium (75 ± 0,5 µg Hb×ml<sup>-1</sup>×h<sup>-1</sup>) ausmachte, bezogen worden. Die Daten wurden aus drei voneinander unabhängigen Versuchen erhalten und gemittelt.

Die Tabelle 3 zeigt, daß alle verwendeten Inhibitoren Einfluß auf die Proteinaseaktivität haben. Dabei sind die potentesten Inhibitoren diejenigen, die Cystein-Proteinasen hemmen (Leupeptin

bzw. E-64: Restaktivitäten von  $25 \pm 5$  % bzw.  $23 \pm 5$  %, Jodacetamid: Restaktivität  $50 \pm 8$  %). Die Serin-Proteinaseinhibitoren (PMSF: Restaktivität  $74 \pm 3$  %, Pefablock<sup>®</sup>SC: Restaktivität  $82 \pm 5$  %, Z-Phe-Phe-diazomethylketon: Restaktivität  $65 \pm 9$  %) sind weniger potent, aber dennoch wirksam. Auch  $\alpha_2$ -Makroglobulin, als Inhibitor mit breitem Wirkungsspektrum, zeigt eine, wenn auch geringe Hemmung (Restaktivität  $83 \pm 8$  %). Die inhibitorische Wirkung der Hemmstoffe steigert sich in ihrer Kombination, so daß damit 80 bis 90 % der Pepstatin A-resistenten Proteinaseaktivität gehemmt werden kann.

Erst bei Kultivierung von wildtyp-, rekombinant- und nichtinfizierten Zellen in serumfreien Medium zeigte sich, daß die Sf21-Zellen Proteinase sezernieren. Der hohe Proteingehalt im serumhaltigen Medium bewirkt demnach einen deutlichen, inhibitorischen Effekt. Es stellte sich die Fragen, ob sich das Sekretionsverhalten von Proteinase bei Sf21-Zellen durch die Infektion veränderte. Dazu wurde das Medium von wildtyp-, rekombinant- und nichtinfizierten Zellen nach 5 Tagen mittels CD-Assay bei pH 3,65 auf Proteinaseaktivität und deren Inhibierbarkeit getestet. Wie in Abb. 16 zu erkennen ist, sezernieren Sf21-Zellen Proteinase, unabhängig ob infiziert oder nicht. Allerdings ist die Sekretion von Proteinase nach Infektion ungefähr doppelt so hoch, verglichen mit nicht infizierten Zellen.

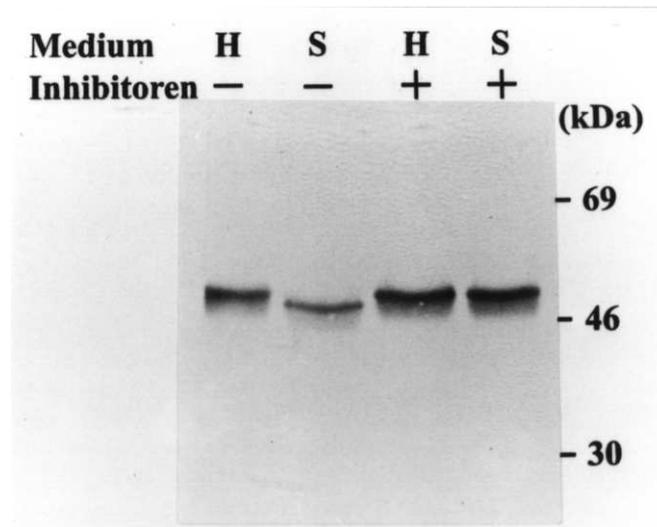


**Abb. 16: Einfluß von Proteinaseinhibitoren auf das Medium von wildtyp-, rekombinant- und nichtinfizierten Sf21-Zellen.** Konfluente Sf21-Kulturen wurden in einer 25 cm<sup>2</sup>-Flasche mit einer MOI von 10 mit Wildtyp- bzw. rekombinantem Virus infiziert, während man für den virusfreien Ansatz eine Kultur mit  $2 \times 10^5$  Sf21-Zellen aussäte. Nach 5 Tagen Kultivierung wurde das Medium geerntet und jeweils 12,5 µl (auf 100 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt) in An- und Abwesenheit der Inhibitoren, ohne Vorkubation bei pH 3,65 und 37° C für den CD-Assay eingesetzt. Der CD-Assay wurde 1 Stunde bei pH 3,65 und 37° C durchgeführt und die Aktivität als Hydrolyse von <sup>14</sup>C-Hämoglobin berechnet. (Abkürzungen: C: Inhibitor-Cocktail (siehe Tabelle 3, Ansatz 12), P: 10 µM Pepstatin A, C-P: Inhibitor-Cocktail ohne Pepstatin A))

In der Abb. 16 ist zu erkennen, daß sich wildtyp- und nichtinfizierte Sf21-Zellen deutlich von rekombinant-infizierten Zellen bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber der eingesetzten Inhibitoren unterscheiden. Während die sezernierte Proteinaseaktivität von nicht- bzw. wildtyp-

infizierten Zellen sehr empfindlich gegenüber dem Inhibitoren-Cocktail ohne Pepstatin A (hauptsächlich Ser-/Cys-Proteinase-Inhibitoren, Hemmung um ca. 85 %) reagiert, zeigt Pepstatin A als Inhibitor von Aspartyl-proteinasen einen geringen Einfluß (Hemmung um ca. 20 %). Bei rekombinant-infizierten Zellen macht man die inverse Beobachtung (Hemmung durch Inhibitor-Cocktail um 29 %, durch Pepstatin A um 75 %), welches logischerweise damit zusammenhängt, das sie mit einem Virus infiziert worden sind, der sie veranlasst, eine Aspartyl-Proteinase (Procathepsin D) zu synthetisieren. Die Kombination des Cocktails mit Pepstatin A zeigt in allen drei Fällen eine nahezu vollständige Hemmung der Proteinaseaktivität (Hemmung um ca. 95 %).

Die Inhibitoren wurden daraufhin auf ihre Tauglichkeit bei der Verwendung in der Zellkultur getestet, wobei sich wie erwartet herausstellte, daß PMSF und Jodacetamid toxisch für die Zellen sind, während die anderen Inhibitoren keinen Einfluß auf die Vitalität der Zellen hatten. Aus diesem Grund kam bei der Produktion von Procathepsin D in serumfreiem Medium der Proteinase-Inhibitoren-Cocktail zum Einsatz, der in Tabelle 3, Ansatz 12 beschrieben ist und im Folgenden der Arbeit als *Inhibitoren-Cocktail* bezeichnet wird. Mit Hilfe des Western-Blots wurde nun untersucht, ob sich durch Einsatz der Inhibitoren die Prozessierung des Procathepsin D während der Kultivierung unterbinden läßt. Dieses wird durch die Abb. 17 (die beiden rechten Bahnen) bestätigt:



**Abb. 17:** Western-Blot zum Nachweis der Wirksamkeit des Zusatzes von Proteinaseinhibitoren bei der Produktion von Procathepsin D in serumfreiem Medium. Das Medium von rekombinant-infizierten Sf21-Zellen wurde nach 5 Tagen geerntet und 10  $\mu$ l SF900II/CD bzw. 20  $\mu$ l HINK's/CD-Medium unter reduzierenden Bedingungen auf einem SDS-Gel getrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde das Cathepsin D mit Hilfe eines monoklonalen Maus-anti-Cathepsin D-Antikörpers (3G8) und eines Peroxidasegekoppelten polyklonalen Ziege-anti-Maus-Antikörpers detektiert. Die Angabe +/- Inhibitoren bezeichnet die An- bzw. Abwesenheit des Inhibitoren-Cocktails (siehe Tabelle 3, Ansatz 12). (Abkürzungen: S: SF900II/CD-Medium, H: HINK's/CD-Medium)

Nachdem gezeigt worden ist, daß intaktes Procathepsin D in größeren Mengen produziert werden kann, schloß sich die Entwicklung einer Strategie zur Reinigung des Procathepsin D aus dem serumfreien Medium (SF900II/CD) an.

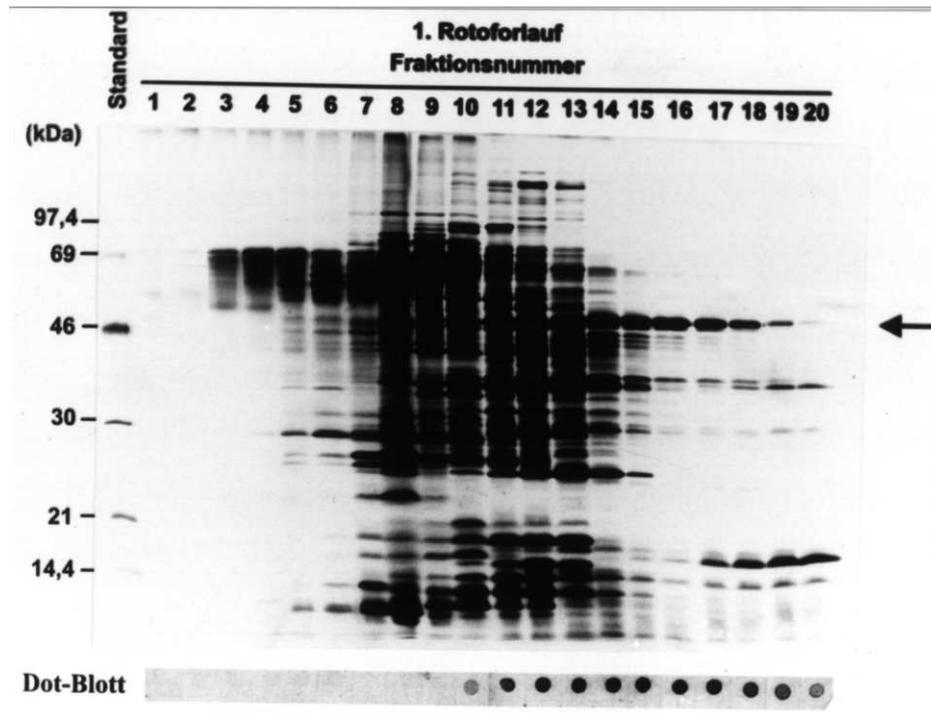
### 3.8 Reinigung des Procathepsin D aus dem SF900II-Medium rekombinant-infizierter Sf21-Zellen (SF900II/CD)

#### 3.8.1 Präparative, isoelektrische Fokussierung (Rotofor)

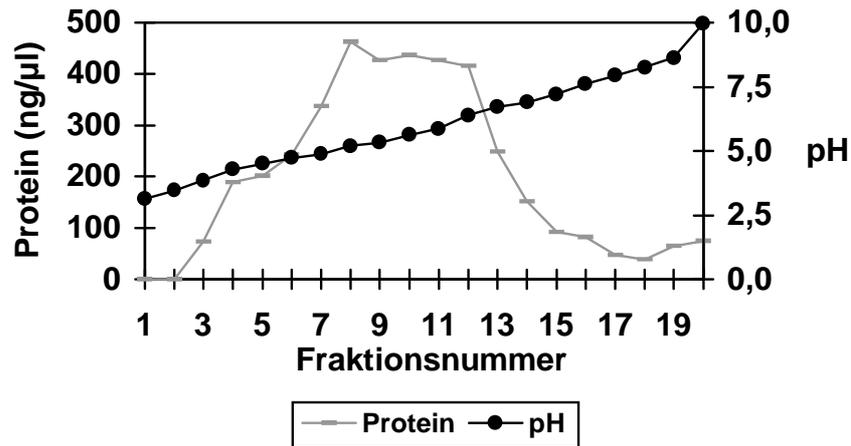
Nach Vorversuchen zeigte sich, daß die Reinigung des Procathepsin D aus dem SF900II/CD-Medium durch chromatographischen Methoden (Ionenaustauschchromatographie, Trennung über Hydroxylapatit) mit einem akzeptablen Aufwand nicht zu erreichen war. Auf Grund des, bei der Kultivierung zugesetzten, Pepstatin A konnte nicht mit Hilfe von immobilisiertem Pepstatin A gereinigt werden.

Aus diesem Grund wurde zunächst eine präparative, isoelektrische Fokussierung mit Hilfe des Rotoforgerätes (Fa. Biorad, München) durchgeführt. Nachdem das SF900II/CD-

Medium ca. 4fach konzentriert und durch Dialyse gegen  $H_2O$  entionisiert worden war, wurden die, bei der Dialyse ausgefallenen, Proteine abzentrifugiert, der Überstand mit dem Inhibitoren-Cocktail, sowie mit Ampholyten versetzt und die Fokussierung durchgeführt. Die Abb. 18 zeigt ein silbergefärbtes SDS-Gel, auf dem die Proteine der erhaltenen Fraktionen aufgetrennt worden sind. Die Verteilung der Proteinkonzentration in den jeweiligen Fraktionen und der sich bei der Fokussierung eingestellte pH-Gradient sind in Abb. 19 dargestellt.

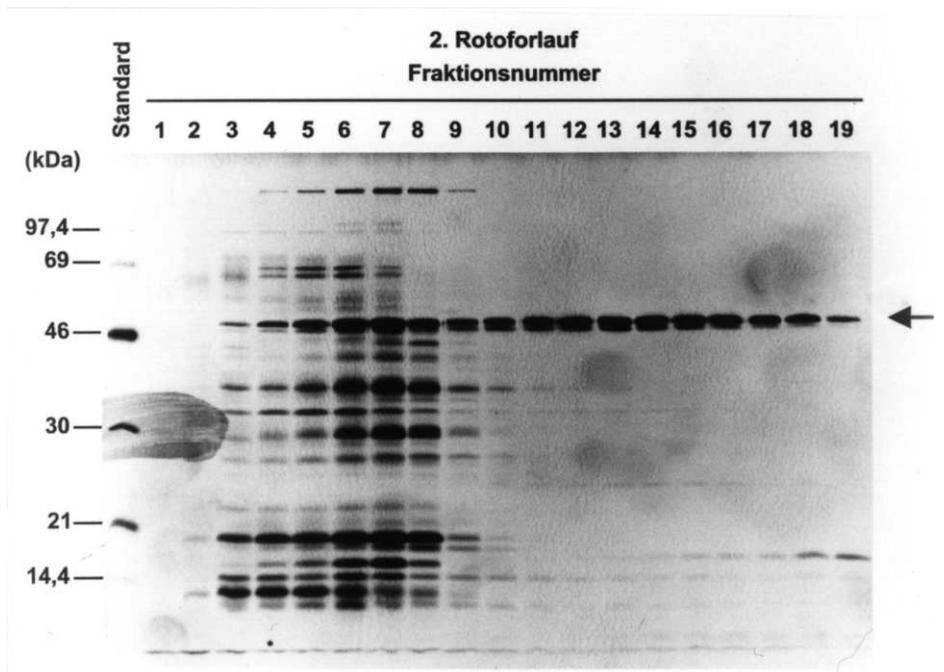


**Abb. 18: Reinigung des Procathepsin D aus SF900II/CD-Medium mittels Rotorfor.** 150 ml SF900II/CD-Medium wurden auf 40 ml konzentriert und durch Dialyse gegen  $H_2O$  entionisiert. Nach Zugabe des Inhibitoren-Cocktails und der Ampholyte (Servalyt 3-10) wurde die präparative isoelektrische Fokussierung durchgeführt. Nach Beendigung der Fokussierung erhielt man 20 Fraktionen, von denen 7,5  $\mu$ l auf einem SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen, mit anschließender Silberfärbung, getrennt wurden. Der Pfeil ( $\rightarrow$ ) bezeichnet die Position des rekombinanten Procathepsin D, wobei Procathepsin D-haltige Fraktionen mit Hilfe des Dot-Blotts identifiziert wurden. Dazu wurden 2  $\mu$ l jeder Fraktion auf eine Nitrocellulosemembran gedotet. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen Maus-anti-Cathepsin D (3G8)-, eines polyklonalen, Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Antikörpers und des DAB-Farbreagens.

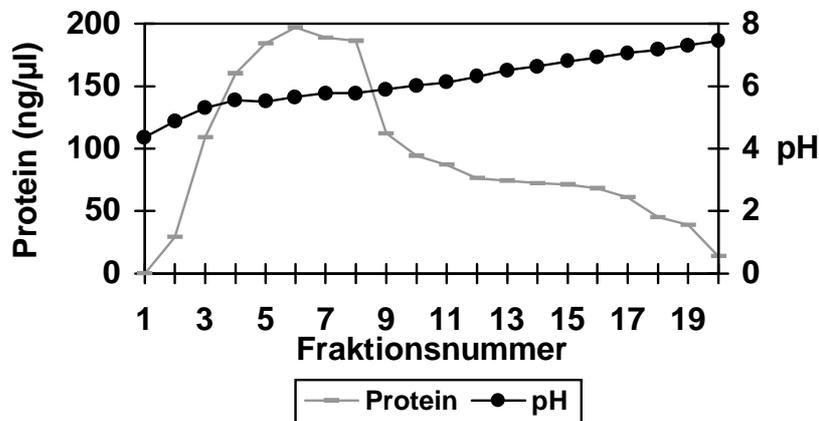


**Abb. 19:** Graphische Darstellung des pH-Gradienten und der Proteinkonzentration in den, bei der 1. Trennung im Rotofor erhaltenen, Fraktionen. Dazu wurde in den Fraktionen der pH-Wert und die Proteinkonzentration (Bradford-Test mit je 5 µl Probe) bestimmt.

Bei der Fokussierung stellte sich ein Gradient von pH 3,1 bis pH 10,0 ein, wobei das Procathepsin D in einem Bereich von pH 5,9 bis pH 8,6 (Fraktion 11 bis 19, Abb. 18) fokussierte. Die graphische Darstellung der Proteinkonzentration (Abb. 19) zeigt, daß dabei ein großer Teil der Fremdproteine abgetrennt worden ist. Zur besseren Trennung wurden die Procathepsin D-haltigen Proben (Fraktion 11 bis 19) vereinigt ( $\Sigma = 18$  ml), mit H<sub>2</sub>O auf 40 ml aufgefüllt, erneut mit dem Inhibitoren-Cocktail versetzt und ohne weitere Zugabe von Ampholyten in die Rotoforkammer, zwecks Refokussierung, eingefüllt. Die Ergebnisse der Refokussierung sind in Abb. 20 und Abb. 21 dargestellt.



**Abb. 20: Refokussierung zur Reinigung von Procathepsin D aus SF900II/CD-Medium.** Die vereinigte Fraktionen (Fraktion 11 bis 19,  $\Sigma=18$  ml) der 1. Fokussierung wurden, nach Zusatz von Proteinase-Inhibitoren (siehe Tabelle 3, Ansatz 12), mit  $H_2O$  auf 40 ml aufgefüllt und ohne weitere Zusätze einer erneuten präparativen, isoelektrischen Fokussierung unterzogen. Proben der erhaltenen Fraktionen (je 12,5  $\mu$ l) wurden auf einem SDS-Gel, unter reduzierenden Bedingungen, getrennt. Der Pfeil ( $\rightarrow$ ) bezeichnet die Position von rekombinantem Procathepsin D. Die Identifizierung des Procathepsin D wurde an Hand der Größe vorgenommen.



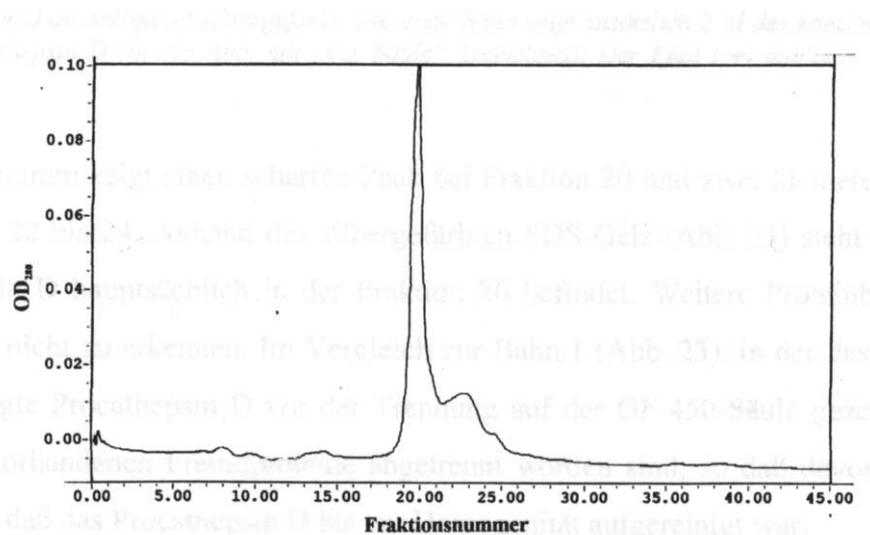
**Abb. 21: Graphische Darstellung des pH-Gradienten und der Proteinfraction in den bei der 2. Trennung im Rotofor erhaltenen Fraktionen.** Dazu wurde in den Fraktionen der pH-Wert und die Proteinkonzentration (Bradford-Test mit je 10  $\mu$ l Probe) bestimmt.

Der, bei der Refokussierung erhaltene, pH-Gradient verläuft erwartungsgemäß flacher (pH 4,35 bis pH 7,44) als bei der 1. Fokussierung. Dabei befindet sich das Procathepsin D hauptsächlich in den Fraktionen 10 bis 18 (pH 6,01 bis pH 7,16). An Hand der Abb. 21 erkennt man, daß sich bei der Refokussierung der größte Teil der Fremdproteine in den Fraktionen 3 bis 8 befand und

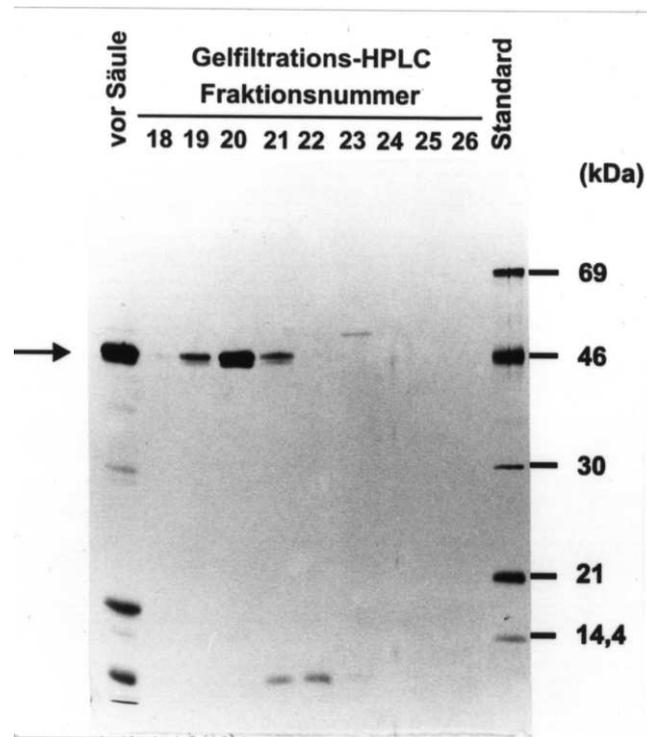
somit abgetrennt wurden. Da aber auf dem SDS-Gel (Abb. 20) immer noch Begleitproteine zu erkennen sind, schloß sich eine Trennung über eine Gelfiltrationssäule mit Hilfe der HPLC an.

### 3.8.2 Reinigung des Rotofor-gereinigten Procathepsin D mittels Gelfiltrations-HPLC

Die Procathepsin D-haltigen Fraktionen (2. Trennung im Rotofor, Fraktion 10 bis 18,  $\Sigma=18$  ml) wurden vereinigt, mit dem Inhibitoren-Cocktail versetzt und mit Hilfe von Ultrafiltrationseinheiten auf 0,375 ml konzentriert. Davon wurden 50  $\mu$ l in die HPLC-Anlage (Fa. Waters, Eschborn) eingespritzt, wobei die Trennung isokratisch über eine GF-450-Säule (Fa. DuPont, Bad Homburg) erfolgte. Als mobile Phase diente eine 0,1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung. Die Flußrate betrug 0,5 ml/min und es wurde pro Minute eine Fraktion gesammelt. Die Abb. 22 zeigt das erhaltene Chromatogramm (aufgenommen bei 280 nm) und die Abb. 23 ein silbergefärbtes SDS-Gel mit Proben der Fraktionen, welche die erhaltenen Peaks umspannen (Fraktion 18 bis 26).



**Abb. 22:** Chromatogramm der Trennung von Rotofor-gereinigtem Procathepsin D mit Hilfe der Gelfiltrations-HPLC. 50  $\mu$ l des konzentrierten, Rotofor-gereinigten Procathepsin D wurden über eine GF-450-Säule (DuPont) mittels HPLC (Anlage der Fa. Waters) weiter gereinigt. Als mobile Phase diente eine 0,1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung (Flußrate 0,5 ml/min). Das Chromatogramm wurde bei 280 nm mit Hilfe des zu der HPLC-Anlage gehörenden Photodioden-Array-Detektors aufgenommen. Dabei wurden die Daten zur Auswertung an einen Computer weitergeleitet.



**Abb. 23:** Silbergefärbtes SDS-Gel der, die erhaltenen Peaks umspannenden, Fraktionen. Zeitgleich mit dem HPLC-Lauf wurde der Fraktionssammler gestartet und pro Minute eine Fraktion (0,5 ml) gesammelt. Jeweils 3  $\mu$ l der, die erhaltenen Peaks umspannenden, Fraktionen wurden unter nichtreduzierenden Bedingungen auf einem SDS-Gel getrennt und anschließend silbergefärbt. Die erste Bahn zeigt zusätzlich 2  $\mu$ l des konzentrierten, Rotofor-gereinigten Procathepsin D (in der Abb. mit „vor Säule“ bezeichnet). Der Pfeil ( $\rightarrow$ ) markiert die Position des Procathepsin D

Das Chromatogramm zeigt einen scharfen Peak bei Fraktion 20 und zwei kleinere Schultern bei den Fraktionen 22 bis 24. Anhand des silbergefärbten SDS-Gels (Abb. 23) sieht man, daß sich das Procathepsin D hauptsächlich in der Fraktion 20 befindet. Weitere Proteinbanden sind in dieser Fraktion nicht zu erkennen. Im Vergleich zur Bahn 1 (Abb. 23), in der das konzentrierte, Rotofor-gereinigte Procathepsin D vor der Trennung auf der GF-450-Säule gezeigt wird, sieht man, daß die vorhandenen Fremdproteine abgetrennt worden sind, so daß davon ausgegangen werden konnte, daß das Procathepsin D bis zur Homogenität aufgereinigt war.

Die in diesem Kapitel beschriebene Reinigung des Procathepsin D aus SF900II/CD-Medium ist zur Übersicht in folgender Reinigungstabelle zusammengefaßt:

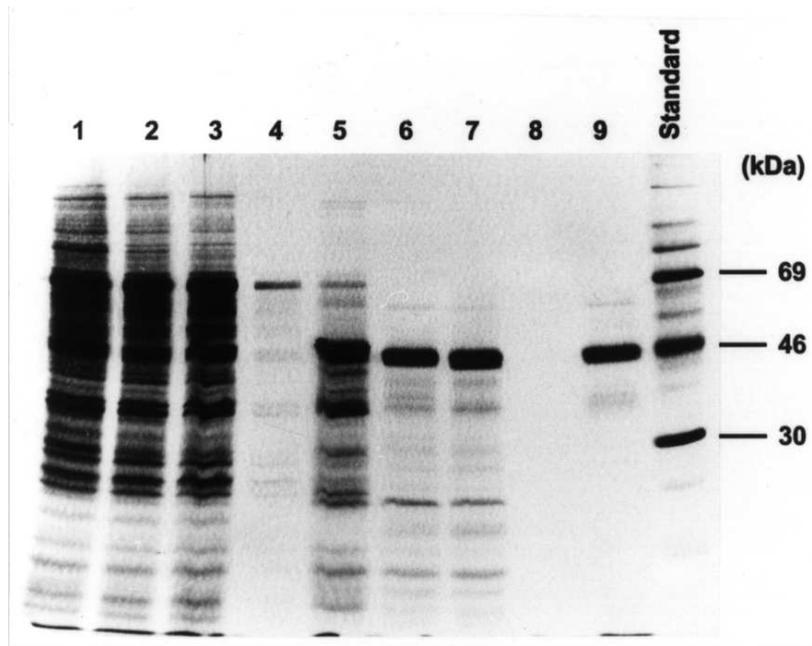
Reinigungsstufe	Protein Gesamtmenge (mg)	spezifische Aktivität ( $\mu\text{g Hb} \times \mu\text{g Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ )	Reinigungs- faktor
SF900II/CD-Medium	56,4	0,79	1
Dialyse-Konzentrat	35,4	nicht bestimmbar	---
1. Rotofor-Pool (Fraktionen 11 bis 19)	3,1	nicht bestimmbar	---
2. Rotofor-Pool (Fraktionen 10 bis 18)	1,3	nicht bestimmbar	---
GF-450-HPLC (Fraktion 20)	0,38	168,2	213

**Tabelle 4: Reinigungstabelle zur Isolierung des Procathepsin D aus SF900II/CD-Medium.** Die Reinigung des rekombinanten Cathepsin D erfolgte aus 150 ml SF900II/CD-Medium. Durch den zugesetzten Inhibitoren-Cocktail konnte im Dialyse-Konzentrat und in den Rotofor-Fraktionen keine Cathepsin D-Aktivität gemessen werden. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität (CD-Assay) im SF900II/CD-Medium erfolgte mit Medium aus einem anderen Versuch, in dem rekombinant-infizierte Zellen in SF900II-Medium in Anwesenheit der Proteinase-Inhibitoren, jedoch ohne Pepstatin A kultiviert worden waren. Die vereinigten Fraktionen nach der 2. Rotofor-Reinigung wurden mit Hilfe der Ultrafiltration auf 375  $\mu\text{l}$  konzentriert, von denen - aus Kapazitätsgründen - nur 50  $\mu\text{l}$  für die Gelfiltrations-HPLC (GF-450) eingesetzt worden sind. Die dabei erhaltene Proteinmenge wurde für die Reinigungstabelle entsprechend hochgerechnet. Obwohl vor der Gelfiltration Proteinase-Inhibitoren (incl. Pepstatin A) zugegeben worden war, ließ sich in der Procathepsin D-haltigen Fraktion die Aktivität bestimmen (Erläuterung siehe Text). (Abkürzung: SF900II/CD: serumfreies Medium von rekombinant-infizierten Sf21-Zellen)

Der Tabelle 4 ist zu entnehmen, daß aus 150 ml SF900II/CD-Medium 0,38 mg rekombinantes Procathepsin D gewonnen werden kann. Das entspricht einer Ausbeute von 2,5 mg/l.

Es hat sich allerdings herausgestellt, daß das Procathepsin D während dieser Reinigungsprozedur nicht stabil bleibt. Obwohl bei allen Reinigungsschritten versucht wurde, durch erneute Zugabe des Inhibitoren-Cocktails, Proteinase-Aktivitäten zu unterbinden, verringert sich zwischen der 1. und 2. Rotofor-Reinigung das Molekulargewicht des Procathepsin D (vgl. Bahn 5 und 6 der Abb. 24).

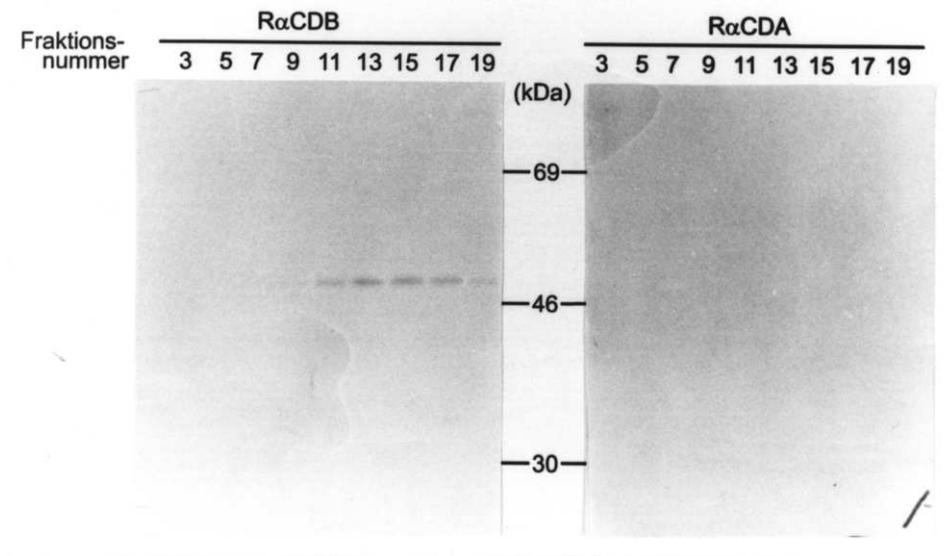
Desweiteren konnte, obwohl bei allen Reinigungsschritten der Inhibitoren-Cocktail zugesetzt worden war, in der Cathepsin D-haltigen Fraktion nach der Gelfiltration eine Pepstatin A-sensitive Proteinase-Aktivität (mit Hilfe des CD-Assays) bestimmt werden. Es ist bekannt, daß bei pH 7,5, bei dem die Gelfiltration durchgeführt wurde, das Pepstatin A nicht an Cathepsin D bindet. Es wird somit offensichtlich bei der Gelfiltration abgetrennt. Berechnet man die spezifische Aktivität des gereinigten Cathepsin D und vergleicht sie mit der, des Ausgangsmediums (siehe Kapitel 3.6) so ergibt sich eine ca. 213fache Steigerung (SF900II/CD  $0,79 \mu\text{g Hb} \times \mu\text{g Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ , gereinigtes Cathepsin D  $168,2 \mu\text{g Hb} \times \mu\text{g Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ ).



**Abb. 24: Synoptische Darstellung der Reinigung des Procathesin D aus SF900II/CD-Medium mittels SDS-PAGE.** Es zeigt **1:** 20  $\mu$ l des SF900II/CD-Mediums; **2:** 20  $\mu$ l des, gegen  $H_2O$  dialysierten, Mediums; **3:** 5  $\mu$ l des, bei der Ultrafiltration erhaltenen, konzentrierten Mediums; **4:** 20  $\mu$ l des Filtrates (diese Bahn ist offensichtlich durch Überlauf aus der Bahn 3 kontaminiert worden); **5:** 10  $\mu$ l des, bei der 1. Rotofor-Reinigung erhaltenen, Cathepsin D-haltigen Pools; **6:** 10  $\mu$ l des, bei der 2. Rotofor-Reinigung erhaltenen, Cathepsin D-haltigen Pools; **7:** 2  $\mu$ l des, bei der nachfolgenden Ultrafiltration erhaltenen, Konzentrats (1:20 verdünnt); **8:** 10  $\mu$ l des Filtrates; **9:** 2  $\mu$ l des GF-450-HPLC-gereinigten Cathepsin D. Die Proben wurden unter nichtreduzierenden Bedingungen erhitzt und der SDS-PAGE, mit nachfolgender Silberfärbung, unterzogen. Dabei wurden die Probenvolumina auf Grund ihrer Proteinkonzentration (siehe Tabelle 4) gewählt.

Es konnte gezeigt, daß mit der gewählten Strategie biologisch aktives Cathepsin D aus dem SF900II/CD-Medium mit wenigen Reinigungsschritten und in größeren Mengen zu isolieren war.

Obwohl die Strategie zur Isolierung des Cathepsin D aus dem SF900II/CD-Medium zunächst erfolgreich schien (Homogenität des gereinigten Cathepsin D), wurde sie, auf Grund der reproduzierbar bei der Reinigung auftretenden Verringerung des Molekulargewichtes, verworfen. Die Molekulargewichtsänderung war auch nach GPF-Spaltung noch vorhanden, so daß sie nicht mit einem Abbau der Oligosaccharidseitenketten, sondern durch Veränderung der Peptidkette zu erklären ist (nicht gezeigt). Um dieses näher zu charakterisieren, wurden zwei Western-Blots von Fraktionen der 2. Rotofor-Reinigung (siehe Abb. 20) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit zwei verschiedenen Antiseren, die zum einen nur Procathesin D (R $\alpha$ CDA: Antiserum gegen das Peptid His<sup>-38</sup>-Gly<sup>-24</sup> der Prosequenz), zum anderen sowohl Pro- als auch N-terminal prozessiertes Cathepsin D (R $\alpha$ CDB: Antiserum gegen das Peptid Ser<sup>-12</sup>-Pro<sup>2</sup> der Prosequenz, C-terminal um einen Glycin-Rest verlängert) erkennen (nähere Erläuterungen zu den Antiseren siehe Abb. 31). Die Abb. 25 zeigt das Ergebnis.

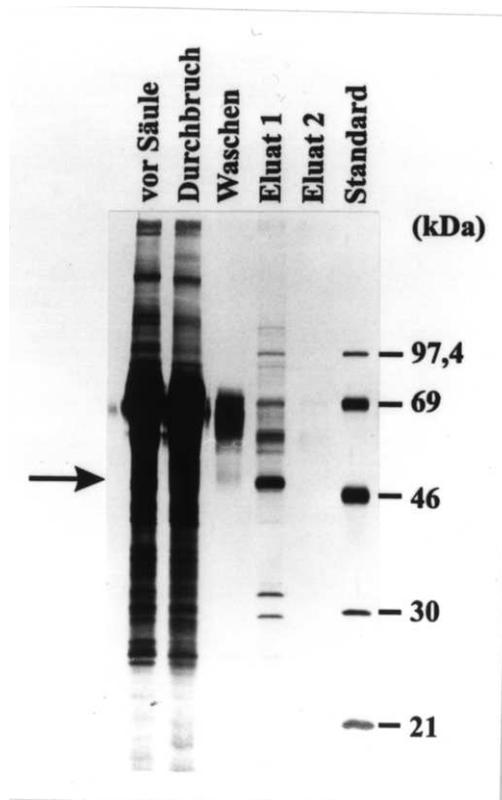


**Abb. 25: Western-Blot der Fraktionen der 2. Rotofor-Trennung.** Von den in der Abbildung angegebenen Fraktionen wurden je 20  $\mu$ l unter reduzierenden Bedingungen erhitzt und nach SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran transferiert („semi dry“-Blot). Die Markierung des Cathepsin D erfolgte zum einen mit dem R $\alpha$ CDA- (erkennt nur Procathepsin D), zum anderen mit dem R $\alpha$ CDB-Antiserum (erkennt sowohl Pro-, als auch N-terminal prozessiertes Cathepsin D). Nach anschließender Behandlung der Western-Blots mit einem polyklonalen, Peroxidase-gekoppelten G $\alpha$ K-Antikörpers wurden die Immunkomplexe mit dem DAB-Reagenz gefärbt.

Die Cathepsin D-haltigen Fraktionen der 2. Rotofor-Trennung (Fraktion 9 bis 19) waren nur mit dem R $\alpha$ CDB-, nicht jedoch mit dem R $\alpha$ CDA-Antiserum zu markieren. Dieses führte zwangsläufig zu dem Schluß, daß das erhaltene Procathepsin D-Präparat N-terminal verkürzt war.

### 3.9 Affinitätschromatographische Reinigung des Procathepsin D aus dem HINK's-Medium rekombinant-infizierter Sf21-Zellen (HINK's/CD)

Nachdem die Reinigung des rekombinanten Procathepsin D aus serumfreiem Medium gescheitert war, versuchten wir zu Lasten der Ausbeute (siehe Kapitel 3.6) eine Reinigungsstrategie aus serumhaltigen Medium zu entwickeln. Da das rekombinante Procathepsin D in diesem Medium auch ohne Zusatz von Inhibitoren stabil war (siehe Abb. 17), versuchten wir eine Affinitätschromatographie mit Hilfe von immobilisiertem Pepstatin A (Pepstatin A-Agarose). Dabei erfolgt die Anbindung des rekombinanten Procathepsin D aus dem Medium bei pH 3,5 und die Elution bei pH 8,3 (siehe Kapitel 2.2.3.2.3). Die Abb. 26 zeigt mit Hilfe eines silbergefärbten SDS-Gels das Ergebnis dieses Reinigungsschrittes.



**Abb. 26:** *Reinigung des rekombinanten Procathesin D aus serumhaltigem (HINK's) Medium durch Affinitätschromatographie an Pepstatin A-Agarose. Insgesamt 100 ml HINK's/CD-Medium wurden mit gleichem Volumen 0,2 M Na-Formiat pH 3,5/0,7 M NaCl versetzt und über eine Pepstatin A-Agarose-Säule (Säulenvolumen 1 ml) getrennt. Nach Waschen mit 0,1 M Natriumformiat pH 3,5/0,4 M NaCl wurde zweimal mit Tris/HCl pH 8,3/ 0,4 M NaCl eluiert. Proben von jeder Fraktion sind unter nichtreduzierenden Bedingungen erhitzt und über ein SDS-Gel, mit anschließender Silberfärbung, getrennt worden. Dazu wurden von der Fraktion vor der Säule 1  $\mu$ l, vom Durchbruch 2  $\mu$ l, von der Waschfraktion 20  $\mu$ l und von den Eluaten jeweils 10  $\mu$ l aufgetragen. Der Pfeil ( $\rightarrow$ ) gibt die Position des Procathesin D an.*

In der Abb. 26 sieht man im Eluat der Pepstatin A-Agarose-Säule das Procathesin D als eine dominante Bande. Der größte Teil der Begleitproteine wurde durch diesen Reinigungsschritt abgetrennt. Dennoch zeigt das SDS-Gel in dieser Fraktion (Eluat 1) ein Proteingemisch aus mehreren, mehr oder weniger stark vertretenen, Proteinen.

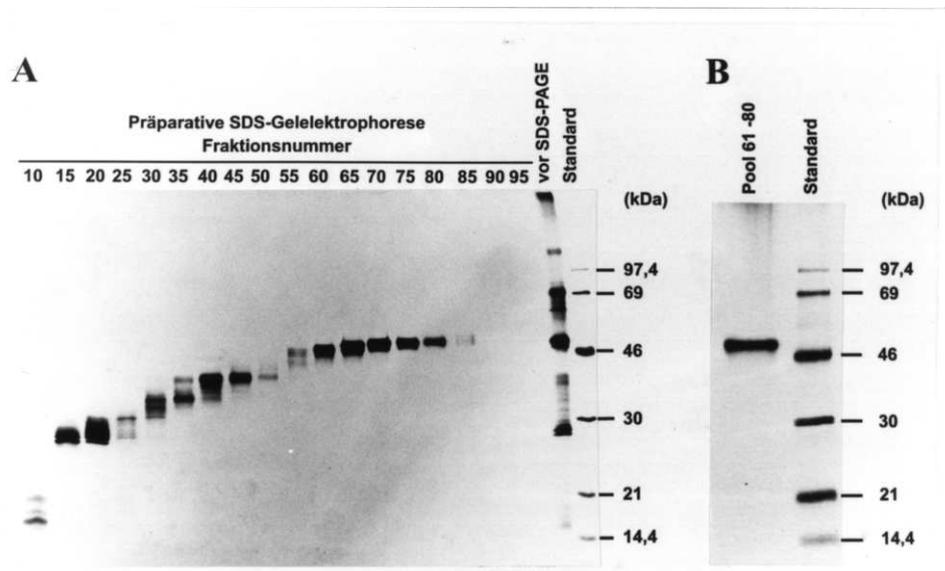
### 3.10 Isolierung des Procathesin D-Polypeptides mittels präparativer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Bestimmung der N-terminalen Sequenz des Procathesin D-Polypeptides haben wir Pepstatin A-affinitäts-chromatographisch gereinigtes Procathesin D einer präparativen SDS-PAGE in Anwesenheit von Natriumthioglycolat unterzogen. Es wurden 30  $\mu$ g Procathesin D unter reduzierenden Bedingungen erhitzt und über eine SDS-Gelsäule („Mini Prep Cell“, Fa. BioRad, München) getrennt (siehe Kapitel 2.2.3.6.1). Die Abb. 27 zeigt, mittels silbergefärbtem, analytischem SDS-Gel, die erhaltenen Fraktionen (Abb. 27A), sowie das vereinigte, gereinigte und konzentrierte Procathesin D (Abb. 27B).

Es zeigt sich, daß die präparative SDS-PAGE sehr gut geeignet ist, unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen, Proteingemische zu trennen. Es ist gelungen, daß Procathesin D-Polypeptid so zu reinigen, daß bei der analytischen SDS-Gel-Kontrolle, nach Silberfärbung, keine weiteren Proteinbanden mehr zu erkennen sind. Nach Konzentrierung der

vereinigten, Procathepsin D-haltigen Fraktionen (Fraktion 61 bis 80,  $\Sigma=5$  ml, siehe Abb. 27B) auf 100  $\mu$ l wurde die Konzentration auf 100 ng/ $\mu$ l (Bradford-Test) bestimmt. Dieses entspricht einer Gesamtmenge an Procathepsin D von 10  $\mu$ g (entspricht, bezüglich der eingesetzten Proteinmenge, einer Ausbeute von 33 %). Zur Entfernung des im Elutionspuffer enthaltenen Glycins (siehe Kapitel 2.2.3.6.1) wurde das Konzentrat gegen 10 mM NaP<sub>i</sub> pH 7,0 dialysiert.

In den Fraktionen 15 bis 45 (Abb. 27A) sind sehr stark vertretene Proteinbanden in einem Größenbereich von 30 bis 46 kDa zu erkennen, die in dem Ausgangsmaterial nur schwach sichtbar sind. Es läßt sich vermuten, daß diese Proteine in den erhaltenen Fraktionen neben der Trennung zusätzlich konzentriert worden sind. Da das Ziel dieses Experimentes mit der Isolierung des Procathepsin D-Polypeptides erreicht worden ist, wurde das Phänomen der Konzentrierung von Proteinen nicht weiter untersucht.



**Abb. 27: Isolierung des Procathepsin D-Polypeptides mittels präparativer SDS-PAGE.** 30  $\mu$ g Procathepsin D wurden unter reduzierenden Bedingungen erhitzt und über eine SDS-Gelsäule getrennt. Dabei wurde die Elektrophorese bei konstant 1 W und 4° C durchgeführt. Die Fraktionierung begann, kurz bevor die Bromphenolblaubande aus dem Gel wanderte, mit einer Flußrate von 100  $\mu$ l/min, wobei Fraktionen von 250  $\mu$ l gesammelt wurden (2,5 min/Fraktion). Nach 275 min wurde die Fraktionierung abgebrochen. A zeigt ein silbergefärbtes, analytisches SDS-Gel der erhaltenen Fraktionen (je 20  $\mu$ l). Ebenso ist das Pepstatin A-affinitätsgereinigte Procathepsin D (in der Abb. mit „vor SDS-PAGE“ bezeichnet) gezeigt. Procathepsin D-haltige Fraktionen (Fraktion 61 bis 80) wurden vereinigt und mit Hilfe von Ultrafiltrationseinheiten auf 100  $\mu$ l konzentriert. 2  $\mu$ l dieses Konzentrates sind in B gezeigt.

Ein Aliquot des bei der präparativen SDS-PAGE erhaltenen, reduzierten und denaturierten Procathepsin D wurde anschließend zur Bestimmung der N-terminalen Sequenz verwendet.

### **3.11 Bestimmung der N-terminalen Sequenz des rekombinanten Procathepsin D aus Sf21-Zellen**

Aufgrund der Befunde bei der Reinigung des Procathepsin D aus dem SF900II/CD-Medium (Verringerung des Molekulargewichtes) wurde die Korrektheit der N-terminalen Sequenz des Procathepsin D aus dem HINK's/CD-Medium, durch Sequenzierung bestätigt.

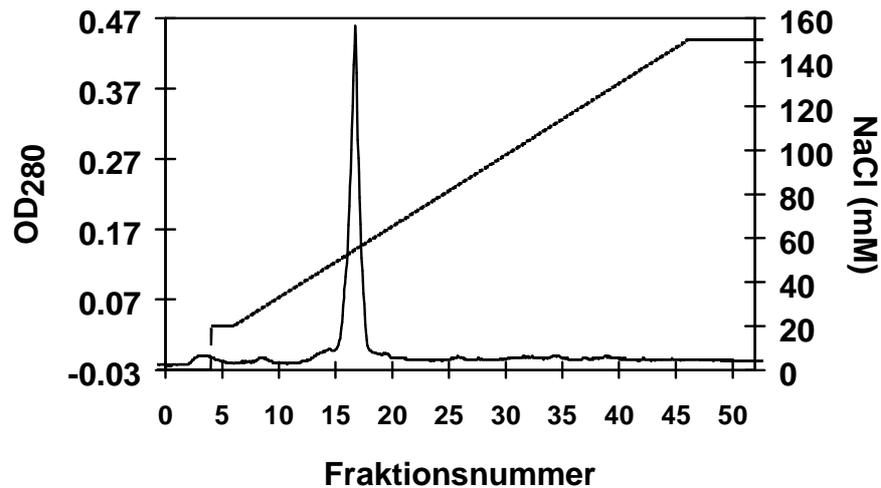
Dazu wurden 5 µg des, mittels präparativer SDS-PAGE gereinigten, rekombinanten Procathepsin D (gelöst in 50 µl 10 mM NaP<sub>i</sub> pH 7,0) zur Sequenzierung ins Institut für Physiologische Chemie der WWU Münster geschickt. Die dort durchgeführte automatische Sequenzierung der ersten 10 Aminosäuren lieferte folgende Sequenz:

**LEU - VAL - ARG - ILE - PRO - LEU - HIS - LYS - PHE - THR -**

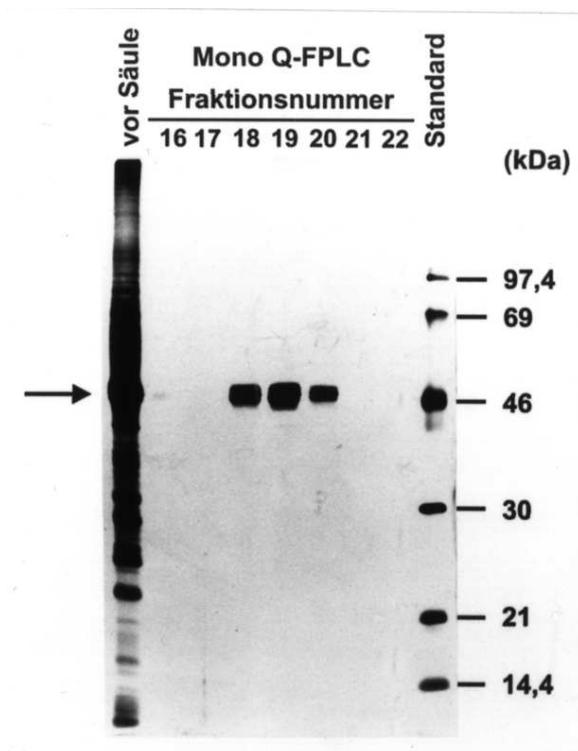
Die ermittelte Sequenz stimmt exakt mit dem von Faust *et al.* (1985) publiziertem N-Terminus des Procathepsin D überein (Aminosäure -44 bis -35).

### **3.12 Reinigung des affinitätschromatographisch isolierten Procathepsin D mittels MonoQ-FPLC**

Um natives, homogen-gereinigtes Procathepsin D zu erhalten, reichte die Affinitätschromatographie mittels Pepstatin A nicht aus (siehe Eluat 1 in Abb. 26), so daß sich aus diesem Grund eine weitere Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie anschloß. Dazu wurde das Eluat nach der Pepstatin A-Säule mittels Ultrafiltration (Centriprep-30) auf 0,7 ml konzentriert und über Nacht bei 4° C mit mehreren Wechseln gegen 2 mM Tris/HCl pH 8,3 dialysiert. Die Trennung von 0,5 ml des dialysierten Konzentrates erfolgte mittels FPLC an einer Anionenaustauschersäule (MonoQ), wobei die Elution mit Hilfe eines NaCl-Gradienten (0 bis 150 mM) durchgeführt wurde. Die Abb. 28 zeigt das erhaltene Chromatogramm, die Abb. 29 ein silbergefärbtes SDS-Gel von den Fraktionen, die den Peak umspannen.



**Abb. 28:** Chromatogramm der MonoQ-FPLC zur Reinigung des Procathepsin D aus dem HINK's/CD-Medium nach Affinitätschromatographie. Das bei der Affinitätschromatographie an Pepstatin A-Agarose erhaltene Eluat wurde auf 0,7 ml konzentriert und über Nacht bei 4° C mit mehreren Wechseln gegen 2 mM Tris/HCl pH 8,3 dialysiert. Die Trennung von 0,5 ml des dialysierten Konzentrates wurde über eine Anionenaustauschersäule (MonoQ) mittels FPLC durchgeführt, wobei die Elution mit einem NaCl-Gradienten (0 - 150 mM), bei einer Flußrate von 0,5 ml/min, erfolgte. Dabei wurde je eine Fraktionen pro Minute gesammelt. Das Chromatogramm wurde bei  $\lambda=280$  nm mittels Durchflußphotometer aufgenommen und zur Auswertung an einen Computer weitergeleitet.



**Abb. 29:** Silbergefärbtes SDS-Gel des MonoQ-FPLC-gereinigten Procathepsin D aus dem HINK's/CD-Medium. Von den bei der FPLC erhaltenen, den Peak umspannenden, Fraktionen wurden je 10  $\mu$ l unter nichtreduzierenden Bedingungen erhitzt und auf einem SDS-Gel, mit nachfolgender Silberfärbung, getrennt. Zusätzlich wurden 2  $\mu$ l des Procathepsin D-Konzentrates (nach Pepstatin A-Affinitätschromatographie, in der Abbildung mit „vor Säule“ bezeichnet), aufgetragen. Der Pfeil ( $\rightarrow$ ) markiert die Position des Procathepsin D.

Die Bahn 1 der Abb. 29 zeigt das Procathepsin D-haltige Konzentrat nach Pepstatin A-Affinitätschromatographie. Durch die Konzentrierung ist zu erkennen, daß das Procathepsin D zwar eine dominante Proteinbande darstellt, das Proteingemisch jedoch deutlich heterogener ist, als das verdünnte Eluat (Abb. 26) vermuten ließ. Anhand des Chromatogramms der MonoQ-FPLC (Abb. 28) erkennt man einen Peak bei ca. 54 mM NaCl. Proben der Fraktionen, die diesen Peak flankieren sind auf dem silbergefärbten SDS-Gel zu sehen. Man erkennt, daß dieser Peak mit der Elution des Procathepsin D korreliert. Desweiteren ist zu erkennen, daß die Verunreinigungen abgetrennt worden sind. Da die Fraktionierung zeitgleich mit dem FPLC-Lauf gestartet wurde und in den ersten Fraktionen nahezu kein Peak zu erkennen ist, ist daraus zu schließen, daß bei den gewählten Bedingungen (2 mM Tris/HCl pH 8,3) das gesamte Proteingemisch an die Säule gebunden hat. In dem gewählten Gradientenbereich (0 bis 150 mM NaCl) eluiert nur das Procathepsin D, die unerwünschten Begleitproteine sind weiterhin an der Säule gebunden. Diese eluieren erst bei höheren Salzkonzentrationen und wurden bei der Regenerierung der Säule mit 2 M NaCl von dieser gelöst (nicht gezeigt).

Es ist somit gelungen, das rekombinante Procathepsin D aus dem serumhaltigen HINK's/CD-Medium mit zwei Reinigungsschritten bis zur Homogenität zu reinigen. Die folgende Reinigungstabelle faßt die Resultate zusammen:

Reinigungsstufe	Protein Gesamtmenge (mg)	spezifische Aktivität ( $\mu\text{g Hb} \times \mu\text{g Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ )	Reinigungs- faktor
HINK's/CD	360	0,048	1
Pep.A-Säule/Eluat 1	0,60	1,52	32
MonoQ-FPLC/Pool Fr.18-20	0,15	5,5	115

**Tabelle 5: Reinigungstabelle der Isolierung des Procathepsin D aus dem HINK's/CD-Medium.** Die Isolierung des rekombinanten Procathepsin D erfolgte aus 100 ml HINK's/CD-Medium. Die Aktivität wurde mit Hilfe des CD-Assays, die Proteinkonzentration mit Hilfe des Bradford-Tests bestimmt. Das nach der Pepstatin A-Säule erhaltene Eluat wurde durch Ultrafiltration auf 0,7 ml konzentriert, von denen 0,5 ml für die MonoQ-FPLC eingesetzt worden sind. Die nach MonoQ-FPLC erhaltene Proteinmenge wurde für die Reinigungstabelle entsprechend hochgerechnet. (Abkürzungen: HINK's/CD: serumhaltiges Medium von rekombinant-infizierten Sf21-Zellen, Pep.A-Säule: Pepstatin A-Agarose-Säule).

Aus 100 ml HINK's/CD-Medium wurden 0,15 mg rekombinantes Procathepsin D isoliert. Daraus errechnet sich eine Ausbeute von 1,5 mg/l.

Die höhere Ausbeute aus dem SF900II/CD-Medium im Vergleich zu der aus dem HINK's/CD-Medium (2,5 mg/l gegenüber 1,5 mg/l) korreliert mit der höheren Expression von rekombinantem Procathepsin D in Sf21-Zellen bei Verwendung von serumfreien Medium (siehe Kapitel 3.6).

Bei der Isolierung des Procathepsin D aus dem HINK's/CD-Medium ist bei jeder Reinigungsstufe eine Bestimmung der Cathepsin D-Aktivität möglich, da auf die Verwendung von Proteinase-Inhibitoren verzichtet werden konnte. Es zeigt sich, daß die spezifische Aktivität während der Reinigung deutlich zunimmt, von  $0,048 \mu\text{g Hb} \times \mu\text{g Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$  im HINK's/CD-Medium,  $1,52 \mu\text{g Hb} \times \mu\text{g Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$  im Eluat nach Pepstatin A-Chromatographie und  $5,5 \mu\text{g Hb} \times \mu\text{g Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$  im Eluat nach MonoQ-FPLC.

Wir haben demnach auch für die Reinigung des rekombinanten Procathepsin D aus serumhaltigem Medium (HINK's/CD) eine erfolgreiche Strategie entwickelt, die es ermöglicht, intaktes, biologisch aktives Procathepsin D in wenigen Schritten und ausreichenden Mengen zu isolieren.

Alle weiteren Versuche wurden mit dem in diesem Kapitel beschriebenen, gereinigten Procathepsin D durchgeführt.

### 3.13 Analyse der Heterogenität des gereinigten, rekombinanten Procathepsin D aus Sf21-Zellen

An Hand der silbergefärbten SDS-Gele war zu beobachten, daß das gereinigte, rekombinante Procathepsin D aus dem HINK's/CD-Medium eine gewisse Heterogenität aufweist. Da der inkakte N-Terminus durch Sequenzierung nachgewiesen worden war (siehe Kapitel 3.10), wurde das Protein unter denaturierenden, nichtreduzierenden Bedingungen einer GPF-Spaltung unterzogen. Die Analyse des glykosylierten und des deglykosylierten Procathepsin D erfolgte mittels SDS-PAGE. Dabei ist zu sehen, daß die zwei Banden des glykosylierten Procathepsin D nach der Deglykosylierung auf eine Bande fokussieren.

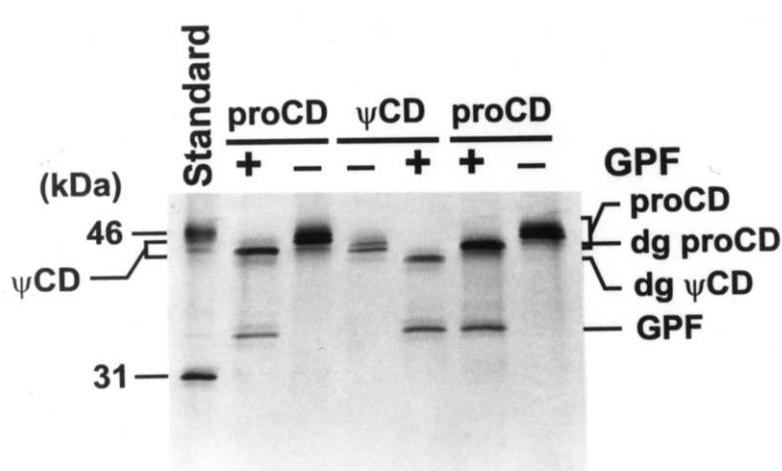


Abb. 30: Analyse der Heterogenität des gereinigten, rekombinanten Procathepsin D und des Pseudocathepsin D durch Deglykosylierung. Es wurden jeweils 200 ng Procathepsin D unter nichtreduzierenden Bedingungen erhitzt,

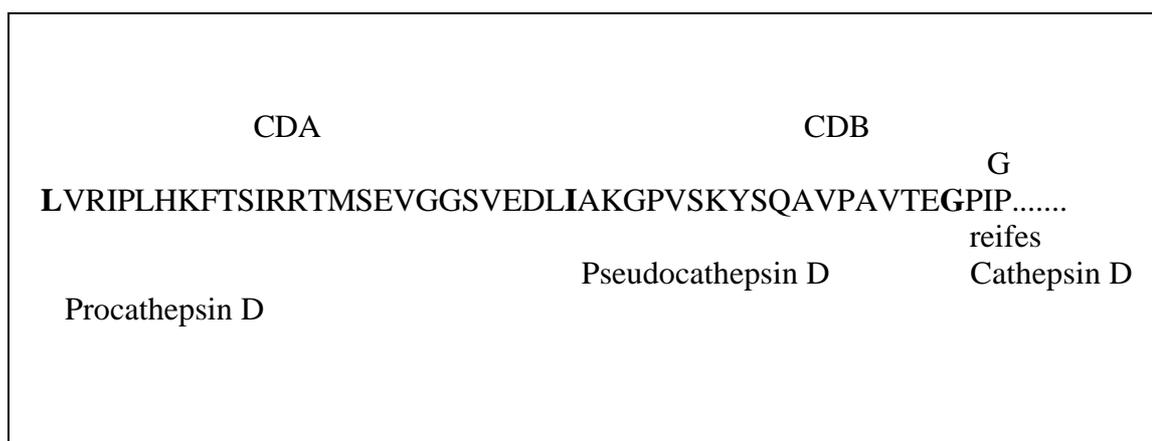
anschließend halbiert und die eine Hälfte mit 0,2 U GPF versetzt. Nach Inkubation über Nacht bei 37° C wurden die Proben auf dem SDS-Gel getrennt und nachfolgend silbergefärbt. Das Pseudocathepsin D wurde durch Ansäuern von 200 ng Procathepsin D auf pH 3,65 und zweistündiger Inkubation bei 37° C erhalten (näheres siehe nächstes Kapitel). Die Deglykosylierung des Pseudocathepsin D (je 100 ng) wurde parallel, unter gleichen Bedingungen wie die, des Procathepsin D durchgeführt. (Abkürzungen: proCD: rekombinantes Procathepsin D,  $\psi$ CD: Pseudocathepsin D, dg: deglykosyliert, GPF: Glykopeptidase F)

Da sowohl bei Pro- als auch bei Pseudocathepsin D, die, im silbergefärbtem SDS-Gel sichtbare, Heterogenität durch Deglykosylierung aufgehoben wird, kommt man zu dem Schluß, daß die zwei Banden auf unterschiedlichen Kohlenhydratgehalt zurückzuführen sind. Dabei wird hier die Deglykosylierung des Pseudocathepsin D im Vorgriff auf die, im nachfolgenden Kapitel beschriebene, Autoaktivierung gezeigt.

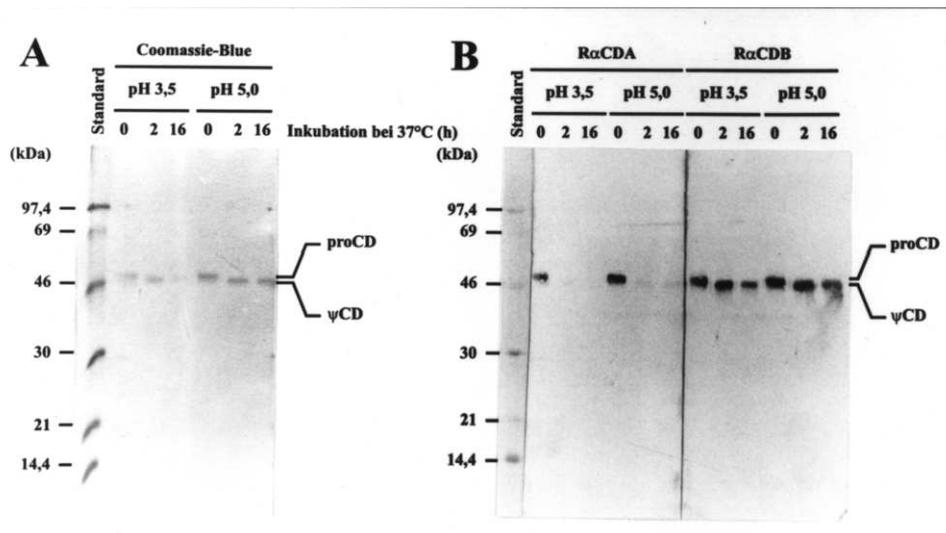
### 3.14 Autoaktivierung des gereinigten, rekombinanten Procathepsin D

Es wurde versucht, die von Hasilik *et al.* (1982) bzw. von Conner u. Richo (1992) beschriebene Autoaktivierung des Procathepsin D bei saurem pH, mit dem gereinigten, rekombinanten Protein aus HINK's/CD-Medium nachzuvollziehen.

Dazu wurden jeweils 330 ng rekombinantes Procathepsin D bei pH 3,65 bzw. pH 5,0 für 2 bzw. 16 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Pepstatin A gestoppt. Als Kontrolle versetzte man jeweils eine Probe direkt nach dem Ansäuern auf den entsprechenden pH mit Pepstatin A. Aliquots dieser Proben wurden für die Trennung auf SDS-Gelen verwendet, die entweder mit Coomassie<sup>®</sup>Blue gefärbt oder der Western-Blot-Prozedur unterzogen wurden (siehe Abb. 32A und B).



**Abb. 31: Prozessierung der Prosequenz von humanem Procathepsin D.** Das Schema zeigt die 44 Aminosäuren der Prosequenz (Leu bis Glu) und die ersten vier Aminosäuren des reifen Cathepsin D (Gly-Pro-Ile-Pro). Die Spaltung zwischen Leu<sup>-19</sup> und Ile<sup>-18</sup> führt zu Pseudocathepsin D (Conner u. Richo, 1992). Die Peptide CDA (His<sup>-38</sup> bis Gly<sup>-24</sup>) und CDB (Ser<sup>-12</sup> bis Pro<sup>-2</sup>, C-terminal um einen Glycin-Rest verlängert) sind synthetisch hergestellt und zur Immunisierung von Kaninchen (gekoppelt an KLH) verwendet worden, wobei das erhaltene R $\alpha$ CDA-Antiserum nur Procathepsin D, das R $\alpha$ CDB-Antiserum sowohl Pro, als auch Pseudocathepsin D erkennt.



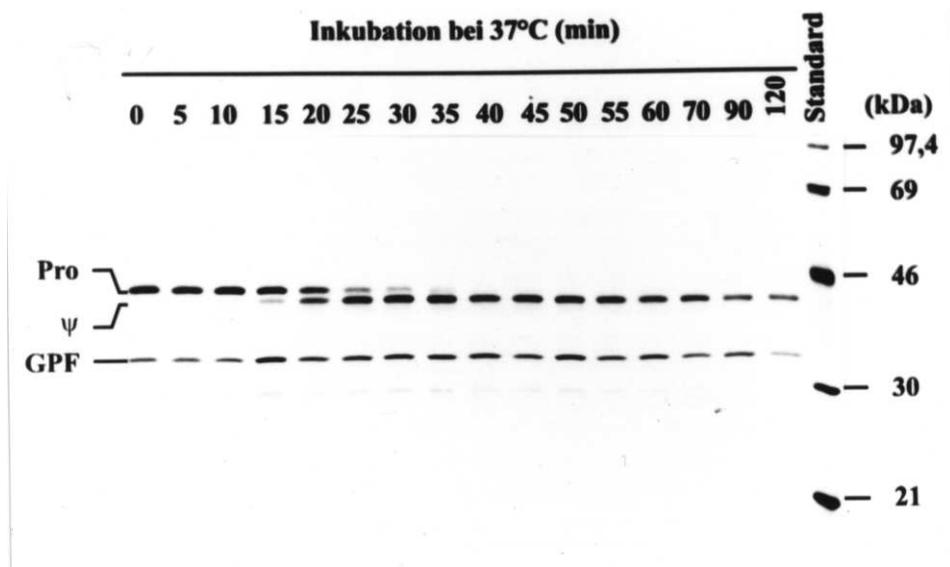
**Abb. 32:** Analyse der Autoaktivierung von Procathepsin D durch SDS-PAGE und nachfolgender Coomassie®Blue-Färbung (A) bzw. Western-Blot (B). Jeweils 330 ng gereinigtes, rekombinantes Procathepsin D wurden in 0,1 M NaAc pH 3,65 bzw. pH 5,0 für 2 bzw. 16 Stunden bei 37° C inkubiert und anschließend durch Zugabe von Pepstatin A gestoppt. Als Kontrolle wurden jeweils 330 ng Procathepsin D direkt nach Zugabe des entsprechenden NaAc-Puffers mit Pepstatin A versetzt („0“-Probe). Von den Ansätzen wurde die Hälfte für ein SDS-Gel mit anschließender Coomassie®Blue-Färbung und jeweils ¼ für ein SDS-Gel, mit nachfolgendem Transfer auf eine PVDF-Membran (Western-Blot), eingesetzt. Die Detektion der Proteine auf der PVDF-Membran erfolgte durch zwei verschiedene, polyklonale Antiseren, die entweder nur Pro- (RαCDA) oder sowohl Pro-, als auch Pseudocathepsin D (RαCDB) erkennen (siehe Abb. 31). Durch anschließende Inkubation mit einem polyklonalen, Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper und nachfolgender Färbung mit dem DAB-Reagenz wurden die Banden sichtbar gemacht. (Abkürzungen: proCD: Procathepsin D, ψCD: Pseudocathepsin D).

Durch Ansäuern der Procathepsin D-haltigen Lösung und anschließender Inkubation bei 37° C findet eine Molekulargewichtsänderung statt (siehe Abb. 32A). Das resultierende Protein ist kleiner als Procathepsin D und wird durch Verwendung der Antiseren R $\alpha$ CDA und R $\alpha$ CDB näher charakterisiert. Conner u. Richo (1992) haben die Autoaktivierung an rekombinantem Procathepsin D aus *E.coli* beschrieben und festgestellt, daß die Spaltung zwischen den Aminosäuren Leu<sup>-19</sup> und Ile<sup>-18</sup> in der Prosequenz erfolgt. Wir haben zwei Peptide synthetisieren lassen, die diese Spaltstelle flankieren (Peptid CDA: His<sup>-38</sup> bis Gly<sup>-24</sup>, Peptid CDB: Ser<sup>-12</sup> bis Pro<sup>2</sup>, C-terminal um einen Glycin-Rest verlängert). Mit diesen Peptiden (gekoppelt an KLH = Hämocyanin der Lochschnecke, „Keyhole Limpet Hemocyanin“) wurden Kaninchen immunisiert und die erhaltenen Antiseren zur Detektion des Procathepsin D vor und nach der Autoaktivierung verwendet. Es zeigte sich wie erwartet, daß mit dem R $\alpha$ CDA-Antiserum nur das Procathepsin D vor der Autoaktivierung zu detektieren war (Abb. 32B linke Seite), wobei das R $\alpha$ CDB-Antiserum beide Cathepsin D-Formen erkennt (Pro- und Pseudocathepsin D, Abb. 32B rechte Seite). Die Autoaktivierung findet sowohl bei pH 3,5, als auch bei pH 5,0 statt. Längere Inkubationszeiten bei pH 3,5 ( $\geq$  16 Stunden) zeigen, daß die Pseudocathepsin D-Bande schwächer wird. Es sind jedoch keine Spaltprodukte zu sehen, so daß daraus geschlossen werden muß, daß bei längerer Inkubation eine Degradation des Cathepsin D stattfindet. Dieses ist bei pH 5,0 nicht zu beobachten.

### 3.15 Kinetik der Autoaktivierung von Procathepsin D

Nachdem gezeigt worden ist, daß das gereinigte, rekombinante Procathepsin D in der Lage war, sich selbst zu aktivieren und die Spaltstelle offensichtlich mit der von Conner u. Richo (1992) beschriebenen übereinstimmt, wurde die Zeitabhängigkeit der Autoaktivierung untersucht.

Dazu wurden 2,35  $\mu$ g rekombinantes Procathepsin D in 250  $\mu$ l 0,1 M NaAc pH 3,65 (entspricht einer Procathepsin D-Konzentration von 0,2  $\mu$ M) bei 37° C inkubiert. Zu den in Abb. 33 angegebenen Zeiten wurden 20  $\mu$ l Aliquots entnommen und die Reaktion durch Zugabe von Pepstatin A abgestoppt. Nach Deglykosylierung wurden die Proben auf einem SDS-Gel getrennt und nachfolgend silbergefärbt (siehe 2.2.3.11 und Abb. 33).

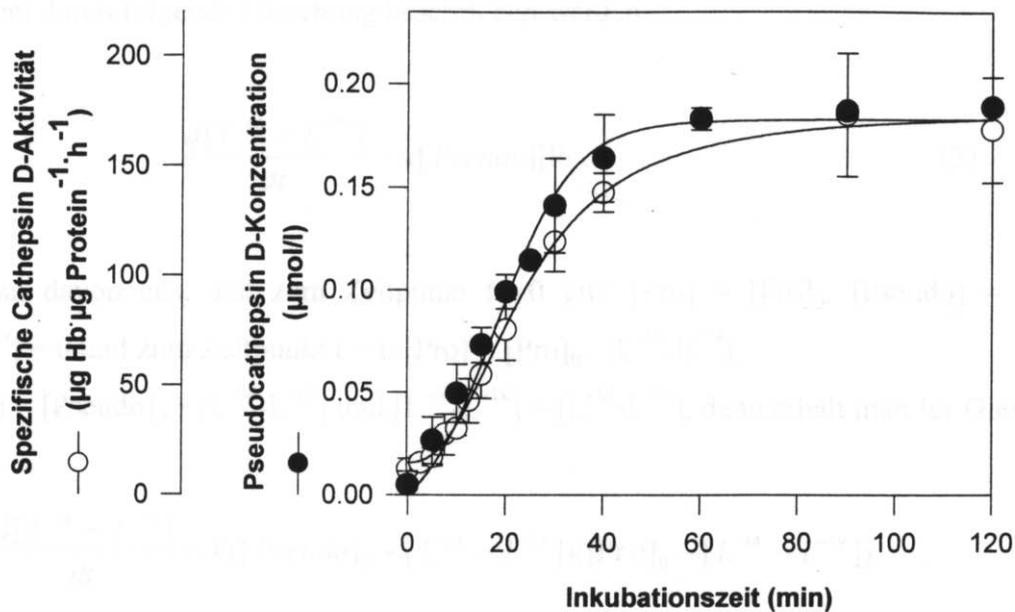


**Abb. 33: Zeitabhängigkeit der Autoaktivierung von Procathepsin D.** 2,35  $\mu\text{g}$  Procathepsin D wurden in 250  $\mu\text{l}$  0,1 M NaAc pH 3,65 (entspricht einer Procathepsin D-Konzentration von 0,2  $\mu\text{M}$ ) bei 37° C inkubiert. Zu den in der Abbildung angegebenen Zeiten wurden 20  $\mu\text{l}$  Aliquots entnommen, durch Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  2,5 mM Pepstatin A abgestoppt und bis zur Beendigung der Versuchsreihe auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben einer GPF-Behandlung unterzogen (siehe 2.2.3.11), um die Heterogenitäten bezüglich der Zuckerseitenketten zu eliminieren und dadurch das Pro- besser vom Pseudocathepsin D (im nichtreduzierenden SDS-Gel) zu trennen. (Abkürzungen: Pro: Procathepsin D,  $\psi$ : Pseudocathepsin D, GPF: Glykopeptidase F)

Nach einer 5minütigen Verzögerungsphase beginnt die Autoaktivierung des Procathepsin D, wobei nach 20 Minuten ca. die Hälfte des Procathepsin D zu Pseudocathepsin D umgesetzt ist. Die vollständige Umsetzung zu Pseudocathepsin D ist nach ca. 40 Minuten abgeschlossen.

Das in Abb. 33 gezeigte, silbergefärbte SDS-Gel ist mit einem Scanner digitalisiert und mit Hilfe des Programms ImageQuant<sup>TM</sup> ausgewertet worden. Die Auftragung der Pseudocathepsin D-Konzentration gegen die Inkubationszeit zeigt einen sigmoiden Kurvenverlauf (siehe Abb. 34).

Ein ähnlicher Kurvenverlauf zeigt sich, wenn man den oben beschriebenen Versuchsablauf wiederholt, zu den in Abb. 33 angegebenen Zeiten 10  $\mu\text{l}$  Aliquots entnimmt und in diesen die Cathepsin D-Aktivität mit Hilfe eines 10minütigen CD-Assays mißt (siehe 2.2.3.11). Es zeigt sich jedoch, daß diese Kurve nicht durch den Nullpunkt geht. Dabei hat das eingesetzte Procathepsin D eine spezifische Aktivität von  $11,8 \pm 4,9 \mu\text{g Hb} \times \mu\text{g Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ , während das Pseudocathepsin D eine spezifische Aktivität von  $169,8 \pm 24,1 \mu\text{g Hb} \times \mu\text{g Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$  hat. Dabei sind die Daten aus drei unabhängigen Experimenten gemittelt worden.

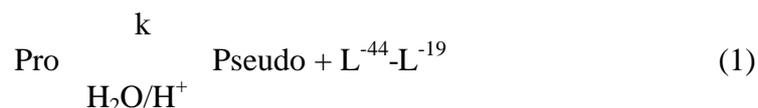


**Abb. 34: Graphische Darstellung der Autoaktivierung.** Das in Abb. 33 gezeigte, silbergefärbte SDS-Gel wurde gescannt und mit Hilfe des Programms ImageQuant<sup>TM</sup> quantifiziert. Dabei wurde die Summe der Intensitäten der Pro- und Pseudocathepsin D-Banden je Bahn gleich 100 % gesetzt und daraus die Verhältnisse für Pro- bzw. Pseudocathepsin D berechnet. Aus dem prozentualen Verhältnis und der eingesetzten Procathepsin D-Konzentration errechnete sich die Molaritäten für Pro- und Pseudocathepsin D.

Bei einem äquivalenten Versuchsablauf, wie in Abb. 33 beschrieben, wurden zu den angegebenen Zeiten 10 µl Aliquots entnommen (entspricht 95 ng Cathepsin D) und darin, durch Zugabe von 190 µl <sup>14</sup>C-Hb in 0,1 M NaAc pH 3,65, mit Hilfe eines 10minütigen CD-Assays die Aktivität bestimmt (siehe 2.2.3.11).

Die Daten wurden jeweils aus drei, voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen gemittelt und sind im Diagramm als „○“ für die Aktivität bzw. als „●“ für die Pseudocathepsin D-Konzentration dargestellt.

Der mathematische Zusammenhang zwischen den erhaltenen Werten läßt sich sowohl bezüglich der spezifischen Aktivität, als auch der Pseudocathepsin D-Konzentration mit Hilfe einer sigmoiden Kurvengleichung beschreiben. Dieses läßt eindeutig den Schluß zu, daß es sich bei der Spaltung des Pro- zum Pseudocathepsin D im sauren Milieu um einen autokatalytischen Prozeß handelt, der näherungsweise durch folgende Reaktionsgleichung beschrieben werden kann:



mit Pro = Procathepsin D, Pseudo = Pseudocathepsin D, k = Geschwindigkeitskonstante, L<sup>-44</sup>-L<sup>-19</sup> = N-terminales Peptid (Leu<sup>-44</sup> bis Leu<sup>-19</sup>).

Die Geschwindigkeit der durch Pseudocathepsin D katalysierten Spaltung des Procathepsin D kann dabei durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{d[L^{-44} - L^{-19}]}{dt} = k[Pseudo][Pro] \quad (2)$$

Geht man davon aus, daß zum Zeitpunkt  $t = 0$  gilt:  $[Pro] = [Pro]_0$ ,  $[Pseudo] = [Pseudo]_0$ ,  $[L^{-44} - L^{-19}] = 0$  und zum Zeitpunkt  $t = t$ :  $[Pro] = [Pro]_0 - [L^{-44} - L^{-19}]$ ,  $[Pseudo] = [Pseudo]_0 + [L^{-44} - L^{-19}]$  und  $[L^{-44} - L^{-19}] = [L^{-44} - L^{-19}]$ , dann erhält man für Gleichung (2):

$$\frac{d[L^{-44} - L^{-19}]}{dt} = k([Pseudo]_0 + [L^{-44} - L^{-19}])([Pro]_0 - [L^{-44} - L^{-19}]) \quad (3)$$

Nach der Methode der Partialbruchzerlegung liefert die Integration aufgelöst nach  $[L^{-44} - L^{-19}]$ :

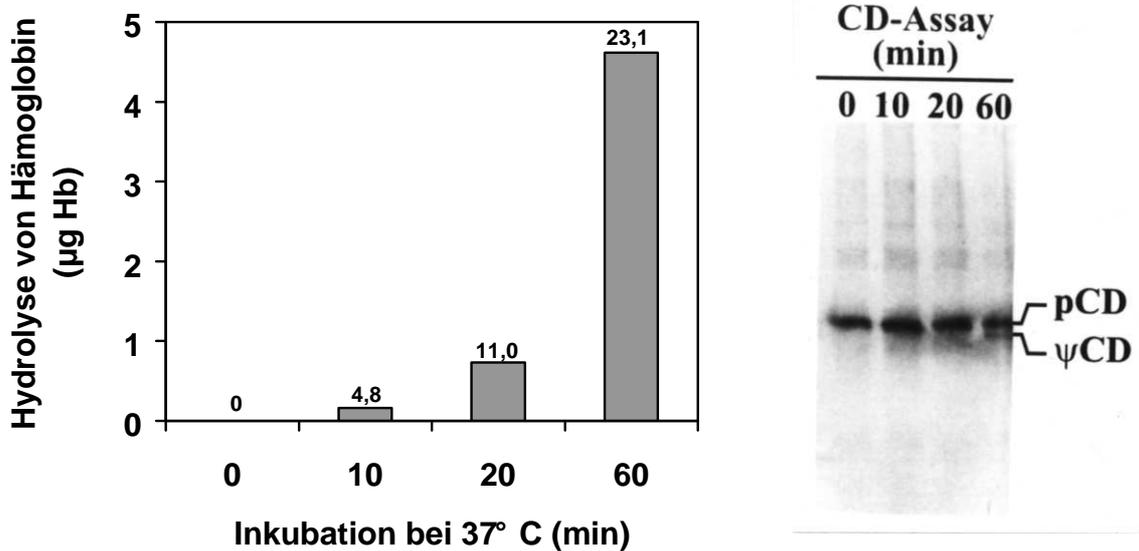
$$[L^{-44} - L^{-19}] = \frac{[Pro]_0 [Pseudo]_0 (1 - e^{-([Pro]_0 + [Pseudo]_0)kt})}{[Pseudo]_0 + ([Pro]_0 e^{-([Pro]_0 + [Pseudo]_0)kt})} \quad (4)$$

Setzt man die Konzentrationen  $[L^{-44} - L^{-19}]$  und  $[Pseudo]$  zum Zeitpunkt  $t$  gleich, so läßt sich mit der Gleichung (4) die Pseudocathepsin D-Konzentration zum Zeitpunkt  $t$  berechnen. Diese Berechnung wurde mit dem Programm SigmaPlot durchgeführt. Die berechnete Kurve bezüglich der Pseudocathepsin D-Konzentration wurde im Diagramm (siehe Abb. 34) als durchgehende Linie durch die Meßpunkte eingezeichnet. Bei gegebener Anfangskonzentration  $[Pro]_0 = 0,2 \mu\text{M}$  liefert das Programm für  $[Pseudo]_0 = 0,02 \mu\text{M}$  und als Geschwindigkeitskonstante  $k = 1,1 \times 10^4 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ .

Experimentell finden wir also eine Anfangsaktivität ( $t = 0$ ) von  $11,8 \pm 4,9 \mu\text{g Hb} \times \mu\text{g Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$  (entspricht ca. 7 %) und eine Anfangskonzentration des Katalysators von  $0,02 \mu\text{M}$  (entspricht 10 %). Ein detaillierteres Model der Autoaktivierung wird im Kapitel 4.3 (Diskussion) entwickelt.

Da der CD-Assay ebenso wie die Autoaktivierung bei pH 3,65 durchgeführt wurde, mußte gezeigt werden, daß bei der Bestimmung der Cathepsin D-Aktivität der Autoaktivierungsprozess nicht fortgesetzt wird. Es wurden vier CD-Assays mit je 200 ng Procathepsin D in 200  $\mu\text{l}$

Volumen (entspricht einer Procathepsin D-Konzentration von 0,02  $\mu\text{mol/l}$ ) durchgeführt. Zu den in Abb. 35 angegebenen Zeiten wurden die Reaktionen durch Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  2,5 mM Pepstatin A gestoppt. 20  $\mu\text{l}$  wurden unter reduzierenden Bedingungen erhitzt und für einen Western-Blot (siehe 2.2.3.9.1) eingesetzt. In den restlichen 180  $\mu\text{l}$  wurde durch Szintillationszählung das während der Inkubation hydrolysierte  $^{14}\text{C}$ -Hämoglobin bestimmt und daraus die Cathepsin D-Aktivität (Mischaktivität von Pro- und Pseudocathepsin D) errechnet. Die Bedingungen für die Überprüfung der Autoaktivierung während des CD-Assays wurden so gewählt, daß sie äquivalent zu den Bedingungen der Aktivitätsbestimmung nach Autokatalyse sind.



**Abb. 35: Überprüfung der Autoaktivierung von Procathepsin D während des CD-Assays mittels Western-Blot und Aktivitätsbestimmung.** Es wurden vier CD-Assays mit je 200 ng Procathepsin D in 200  $\mu\text{l}$  Volumen (entspricht einer Procathepsin D-Konzentration von 0,02  $\mu\text{mol/l}$ ) durchgeführt. Zu den in der Abbildung angegebenen Zeiten wurden die Reaktionen durch Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  2,5 mM Pepstatin A gestoppt. Jeweils eine Probe von 20  $\mu\text{l}$  wurden unter reduzierenden Bedingungen erhitzt und für den Western-Blot (Foto) eingesetzt. Die Detektion des Cathepsin D erfolgte mit dem monoklonalen M $\alpha$ CD-Antikörper 5C11, anschließend mit einem polyklonalen, Peroxidase-gekoppelten G $\alpha$ M-Antikörper und durch Färbung der Immunkomplexe mit dem DAB-Reagenz. In den restlichen 180  $\mu\text{l}$  wurde mittels Szintillationszählung die Cathepsin D-Aktivität bestimmt und als Hydrolyse von Hämoglobin zum Zeitpunkt der Probennahme berechnet (Diagramm), wobei die für die "0"-Probe bestimmte Aktivität als Leerwert von allen Proben abgezogen worden ist. Die Werte über den Säulen gibt die spezifische Aktivität des Cathepsin D in den Proben (normiert auf einen 60-Minuten-Assay) mit der Einheit  $\mu\text{g Hb} \times \mu\text{g CD}^{-1} \times \text{h}^{-1}$  an.

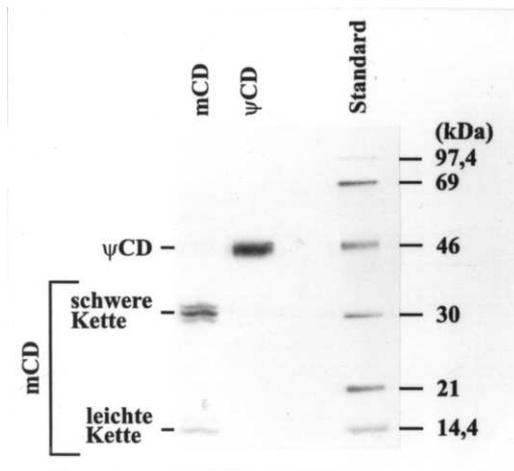
Während bei der Autoaktivierung die Umsetzung von Pro- zu Pseudocathepsin D bei einer Molarität von 0,2  $\mu\text{M}$  nach 20 Minuten zu 50 % erfolgt ist (siehe Abb.33), erkennt man eine Spaltung des Procathepsin D in Anwesenheit von Hämoglobin und 10fach niedrigerer Procathepsin D-Konzentration (0,02  $\mu\text{M}$ ) in signifikantem Ausmaß erst nach 60 Minuten (siehe Abb. 35/Foto). Normiert man die im Diagramm der Abb. 35 dargestellte Cathepsin D-Aktivität um die Inkubationsdauer des CD-Assays, so erhält man für den 10-Minuten-Assay eine spezifische Cathepsin D-Aktivität von  $4,8 \mu\text{g Hb} \times \mu\text{g Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ , für den 20-Minuten-Assay von  $11,0 \mu\text{g Hb} \times \mu\text{g Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$  und für den 60-Minuten-Assay von  $23,1 \mu\text{g Hb} \times \mu\text{g Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ . Wobei die Zunahme der spezifischen Cathepsin D-Aktivität mit der Zunahme der Pseudocathepsin D-Konzentration korreliert. Vergleicht man jedoch die spezifische Aktivität des Cathepsin D mit der früher beschriebenen spezifischen Aktivität Pseudocathepsin D von  $169,8 \pm 24,1 \mu\text{g Hb} \times \mu\text{g Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$  (nach vollständiger Autoaktivierung, siehe Abb. 34), so kann man daran - zusätzlich zu dem Western-Blot - den geringen Anteil an Pseudocathepsin D in den Proben des in Abb. 35 beschriebenen CD-Assays erkennen.

Auf Grund der identischen Versuchsdurchführung müßten die Werte für die spezifische Aktivität des 10-Minuten-Assays (Abb. 35) mit der spezifischen Anfangsaktivität der Autoaktivierungskinetik (Abb. 34) direkt vergleichbar sein. Mit  $4,8 \mu\text{g Hb} \times \mu\text{g Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$  liegt die spezifische Aktivität am unteren Rand des Fehlerbereiches ( $11,8 \pm 4,9 \mu\text{g Hb} \times \mu\text{g Protein}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ ) des in Abb. 34 beschriebenen Versuches.

Obwohl der in Abb. 35 dargestellte Versuch nur einmal durchgeführt worden ist, kann demnach aus den erhaltenen Daten der Schluß gezogen werden, daß ein 10minütiger CD-Assay tatsächlich den Status quo des Verhältnisses von Pro- und Pseudocathepsin D bezüglich ihrer Aktivität zum Zeitpunkt der Probennahme wiedergibt.

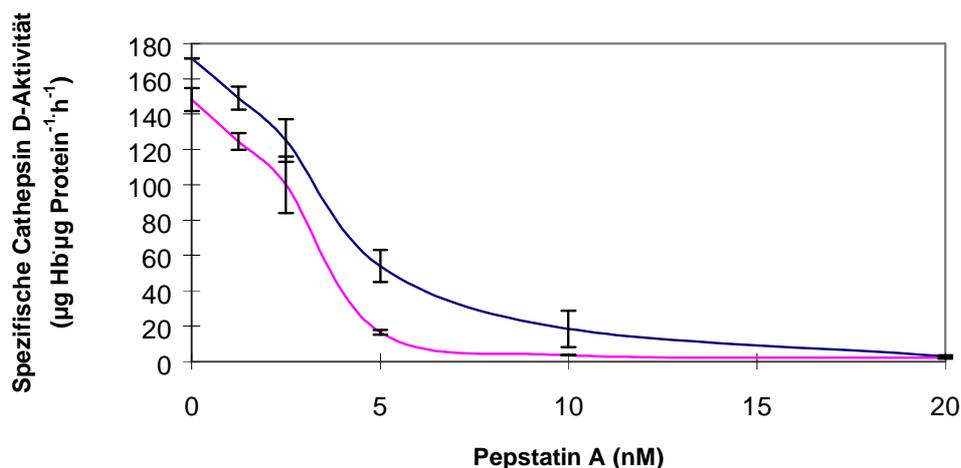
### **3.16 Vergleich der spezifischen Aktivität von Pseudo- und reifem Cathepsin D durch Titration**

Durch Autoaktivierung erhaltenes Pseudocathepsin D wurde, bezüglich der spezifischen Aktivität, mit reifem Cathepsin D aus humaner Plazenta (laboreigene Isolierung) verglichen. Die nachfolgende Abbildung zeigt zunächst ein silbergefärbtes SDS-Gel mit jeweils 100 ng der beiden gereinigten Cathepsin D-Formen.

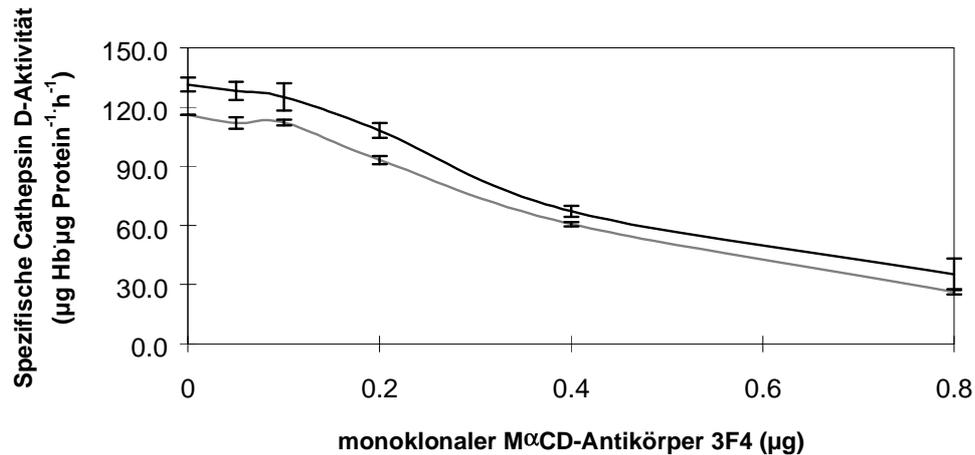


**Abb. 36:** Silbergefärbtes SDS-Gel von gereinigtem Pseudo- bzw. reifen Cathepsin D. Jeweils 100 ng Cathepsin D wurden unter reduzierenden Bedingungen erhitzt und auf einem SDS-Gel getrennt. Mit Hilfe der Silberfärbung wurden die Proteine sichtbar gemacht. (Abkürzungen: mCD: reifes Cathepsin D,  $\psi$ CD: Pseudocathepsin D).

Es wurden jeweils 60 ng Pseudo- bzw. reifes Cathepsin D in einem Volumen von 100  $\mu$ l mit steigenden Mengen Pepstatin A (0 bis 20 nM) versetzt, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in einem 30minütigen CD-Assay eingesetzt (Titration der Aktivität mit Pepstatin A, siehe 2.2.3.12.2). Parallel wurden jeweils 60 ng Pseudo- bzw. reifes Cathepsin D in einem Volumen von 110  $\mu$ l mit steigenden Mengen des monoklonalen M $\alpha$ CD-Antikörpers 3F4 (0 bis 800 ng) inkubiert. Zur Vernetzung der Immunkomplexe wurde den Ansätzen 4  $\mu$ l eines polyklonalen K $\alpha$ M-Antiserums zugegeben. Die Immunkomplexe wurden anschließend abzentrifugiert und jeweils 100  $\mu$ l des Überstandes für einen 30minütigen CD-Assay eingesetzt (siehe 2.2.3.12.1).



**Abb. 37:** Titration der Aktivität von Pseudo- bzw. reifem Cathepsin D mit Hilfe von Pepstatin A. Jeweils 60 ng Cathepsin D wurden in einem Volumen von 100  $\mu$ l mit steigenden Mengen Pepstatin A (0 bis 20 nM) versetzt. Nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde in einem 30minütigen CD-Assay die Aktivität bestimmt. Im Diagramm sind jeweils die Pepstatin A-Konzentrationen markiert, die zur 50%igen Inhibition der Aktivität benötigt werden. Die Daten wurden aus drei, voneinander unabhängigen Experimenten gemittelt.



**Abb. 38: Titration der Aktivität von Pseudo- bzw. reifem Cathepsin D mit Hilfe des monoklonalen M $\alpha$ CD-Antikörpers 3F4.** Es wurden jeweils 60 ng Cathepsin D in einem Volumen von 110  $\mu\text{l}$  mit steigenden Mengen des monoklonalen Antikörpers 3F4 (0 bis 0,8  $\mu\text{g}$ ) versetzt. Die Immunkomplexe wurden, nach Vernetzung mittels eines polyklonalen K $\alpha$ M-Antiserums, abzentrifugiert. Die Cathepsin D-Aktivität wurde in 100  $\mu\text{l}$  des Überstandes mit Hilfe eines 30minütigen CD-Assays gemessen. Die Menge des monoklonalen Antikörpers, die notwendig war, um 50 % der Aktivität zu inhibieren ist im Diagramm per Pfeil mit den dazugehörigen Werten markiert. Die Daten wurden aus drei, voneinander unabhängigen Experimenten gemittelt.

Die Abb. 37 und Abb. 38 zeigen für Pseudo- und reifes Cathepsin D ein äquivalentes Verhalten bei der Titration der Aktivität mit Hilfe des Inhibitors Pepstatin A bzw. des monoklonalen Antikörpers 3F4. Aufgrund einer Proteinbestimmung wurde versucht, gleiche Mengen Pseudo- bzw. reifes Cathepsin D einzusetzen. Dies scheint im Hinblick auf die spezifischen Anfangsaktivitäten (ohne Zusatz von Pepstatin A bzw. des Antikörpers 3F4) nicht ganz gelungen zu sein. Vergleicht man jedoch den Verbrauch an Pepstatin A, zur Inhibierung der Aktivität um 50 %, so korreliert der Mehrverbrauch für die Pseudocathepsin D-Versuchsreihe mit der höheren Anfangsaktivität (15,7 % höhere Anfangsaktivität gegenüber 15,6 % höherem Pepstatin A-Verbrauch). Ähnlich, jedoch nicht so eindeutig, verhält es sich bei der Titration mit dem monoklonalen Antikörper. Einer 13 % höheren Anfangsaktivität steht ein 3 %iger Mehrverbrauch an Antikörper (bis zur 50 %-Inhibierung) gegenüber. Im Vergleich der in Abb. 37 und Abb. 38 dargestellten Versuche fallen die unterschiedlichen spezifischen Anfangsaktivitäten bei Abwesenheit der Inhibitoren auf, wobei die spezifische Anfangsaktivität bei dem Versuch der Aktivitätsinhibierung mit Hilfe von Pepstatin A ca. 25 % höher ist, als bei dem Versuch der Inhibierung der Aktivität durch Antikörper. Im letzteren Versuch wurde durch Zusatz von K $\alpha$ M-Antiserum zu allen Proben, die Proteinkonzentration während des CD-Assays (0,63  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  statt 0,5  $\mu\text{g Protein}/\mu\text{l}$ ) erhöht, so daß auf Grund dessen eine verminderte Hydrolyse des  $^{14}\text{C}$ -Hämoglobins nicht auszuschließen ist.

Nichtsdestotrotz kann man auf Grund dieser Daten zu dem Schluß kommen, daß sich die spezifischen Aktivitäten von Pseudo- und reifem Cathepsin D in dem hier verwendeten System (Reaktion bei pH 3,65 mit Hämoglobin als Substrat) nicht unterscheiden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Expression von humanem Cathepsin D in rekombinant-infizierten Insektenzellen

Es sind mittlerweile mehrere rekombinante, eukaryontische Proteine mit dem Baculovirus-Expressiossystem in Insektenzellen exprimiert worden. Um einen kurzen Überblick zu geben, seien als Beispiele Vitronectin (Zhao u. Sane, 1993; 33,9 mg/l), humane Pankreas-Lipase (Thirstrup *et al.*, 1993; 40 mg/l), humanes PLA2 (Kawauchi *et al.*, 1994; 3 mg/l), humane N-Acetylgalaktosamine-6-Sulfatase (Bielicki *et al.*, 1995; 3 mg/l) und humanes Proapolipoprotein A-I (Pyle *et al.*, 1995; 80 mg/l) genannt. Aus der keinesfalls vollständigen Aufzählung ist abzulesen, daß die Ausbeute von 3 - 80 mg/l offensichtlich sehr stark vom zu exprimierenden, rekombinanten Protein abhängt.

In dieser Arbeit ist gezeigt worden, daß humanes Procathepsin D aus dem Medium rekombinant-infizierter Insektenzellen zu isolieren ist. Die Ausbeute ist dabei abhängig davon, ob die Zellen in serumhaltigem oder -freiem Medium kultiviert wurden. Es konnten aus serumhaltigem Medium 1,5 mg/l, aus serumfreiem Medium 2,5 mg/l rekombinantes, humanes Procathepsin D isoliert werden. Damit bewegt sich allerdings die Ausbeute am unteren Rand dessen, was für andere rekombinante Enzyme erreicht worden ist (siehe oben). Mit ähnlicher Ausbeute (ca. 1 mg/l) exprimierten Beyer u. Dunn (1996) humanes Procathepsin D bzw. Procathepsin D-Mutanten in rekombinant-infizierten Sf9-Zellen in serumhaltigem Medium.

Obwohl Cathepsin D normalerweise lysosomal lokalisiert ist, zeigten wir mit Hilfe von Puls/Chase-Experimenten bzw. durch Bestimmung steigender Cathepsin D-Aktivität im Laufe der Kultivierung im Medium rekombinant-infizierter Zellen, daß es von den Sf21-Zellen sezerniert wird. Dennoch war auch intrazellulär eine hohe Pepstatin A-sensitive Proteinase-Aktivität festzustellen (Daten nicht gezeigt). Da sich diese Aktivität jedoch bei rekombinant-infizierten nicht von der wildtyp- oder nichtinfizierter Zellen unterschied, mußte davon ausgegangen werden, daß es sich dabei um eine endogene Aspartyl-Proteinase handelt. Daß auch Insekten eine lysosomale Aspartyl-Proteinase besitzen, zeigten Cho *et al.* (1991), indem sie ein solches Enzym aus Moskitos (*Aedes aegypti*) reinigten. Durch Vergleich der N-terminalen Sequenzen konnten sie eine hohe Homologie zu Cathepsin D aus Menschen und Schweinen zeigen (74 % Identität). Nachdem Cho u. Raikhel (1992) die Klonierung der cDNA für mLAP (Moskito, lysosomale Aspartyl-Proteinase) gelungen war, zeigten sie auf Aminosäureebene - unter Berücksichtigung identischer und chemisch verwandter Aminosäuren - eine Ähnlichkeit

mit humanem Cathepsin D von 92 %. Während humanes, reifes Cathepsin D jedoch vornehmlich in der Zweikettenform vorliegt, fehlt dem mLAP die Spaltstellensequenz zwischen leichter und schwerer Kette. Dabei hat mLAP ein Molekulargewicht von 40 kDa und liegt in den Lysosomen als Homodimer vor.

Bei der Produktion von rekombinantem Procathepsin D in serumfreiem Medium tauchte das Problem von sezernierten Proteinase auf, die die Polypeptidkette des Procathepsin D veränderten. Während dieses Phänomen bei Verwendung von serumhaltigem Medium nicht zu beobachten war, konnte es im serumfreien Medium durch Einsatz eines Proteinase-Inhibitor-Cocktails unterdrückt werden. Dabei bestand der Cocktail aus einer Mischung von Inhibitoren für Cys-, Ser- und Asp-Proteinase, sowie  $\alpha_2$ -Makroglobulin als Inhibitor mit breitem Wirkungsspektrum. Die größte inhibitorische Wirkung zeigten die Hemmstoffe für Cys- bzw. Asp-Proteinase, wobei sich die Sensitivität gegenüber Cys- und Asp-Proteinase-Inhibitoren bei wildtyp- und rekombinant-infizierten Zellen deutlich unterschied. Die wildtyp-infizierten Zellen sezernierten in erster Linie Cys-Proteinase, während im Medium rekombinant-infizierter Zellen auf Grund der Produktion von Procathepsin D vornehmlich Asp-Proteinase-Aktivität festzustellen waren.

Seit zwei Jahren ist bekannt, daß das AcMNP-Virus auch für Cys-Proteinase codiert (Cathepsin B- bzw. Cathepsin L-ähnliche Aktivitäten; Slack *et al.*, 1995; Bröhme u. Okamoto, 1995), so daß Monsma u. Scott (1997) seit neuestem einen Baculovirus entwickelten, bei dem die virale Chitinase- und Cathepsin-Proteinase-Aktivität fehlt. Wir konnten jedoch zeigen, daß die Sezernierung von Proteinase nicht nur infektionsbedingt ist, sondern daß auch nichtinfizierte Sf21-Zellen Proteinase sezernieren, die in starkem Maße sensitiv gegenüber Cys-Proteinase-Inhibitoren sind. Demnach reicht die Verwendung eines proteinasefreien Baculovirus nicht aus und der Einsatz von Proteinase-Inhibitoren bei Verwendung von serumfreiem Medium wird unerlässlich.

Heterogenität auf Grund limitierter Proteolyse ist schon bei anderen rekombinanten Proteinen, die in infizierten *Spodoptera frugiperda*-Zellen produziert worden sind, gezeigt worden (Sugiyama *et al.*, 1993; Ramabhadran, *et al.*, 1993; Heitz *et al.*, 1997). Pyle *et al.* (1995) konnten bei der Produktion von humanem Proapolipoprotein A-I in Sf21-Zellen in serumfreiem Medium durch Einsatz von Leupeptin und Pepstatin A (Inhibitoren für Cys- bzw. Asp-Proteinase) eine extensive Degradierung verhindern. Die potente inhibitorische Wirkung von Leupeptin und Pepstatin A wird durch unsere Ergebnisse bestätigt. Wir zeigen jedoch darüber hinaus, daß die sezernierte Proteinase-Aktivität bei infizierten Zellen nicht vollständig durch Cys- bzw. Asp-Proteinase-Inhibitoren zu eliminieren ist. Auch Inhibitoren für Ser-

Proteinasen bzw.  $\alpha_2$ -Makroglobulin zeigen eine hemmende Wirkung. Mit Hilfe der Western-Blot-Technologie haben wir im Vergleich zum Procathepsin D aus serumhaltigem Medium gezeigt, daß durch Einsatz des komplexen Proteinase-Inhibitoren-Cocktails im serumfreien Medium ein rekombinantes Protein mit gleicher Größe produziert wurde.

Wir entwickelten Strategien für die native Reinigung des rekombinanten Procathepsin D sowohl aus serumfreiem, als auch aus serumhaltigem Medium. Während die Reinigung aus serumhaltigem Medium auf publizierte Methoden aufgebaut werden konnte, die eine Affinitätschromatographie an Pepstatin A-Agarose (Conner, 1989) und eine Anionen-austauschchromatographie über eine MonoQ-Säule (Barrett, 1970) beinhaltete, mußte die Reinigung aus serumfreiem Medium - auf Grund des bei der Produktion zugesetzten Inhibitoren-Cocktails, der auch Pepstatin A enthielt - neu entwickelt werden. Wir nutzten dazu die präparative, isoelektrische Fokussierung (IEF) mit anschließender Gelfiltration. Sowohl die Reinigung aus serumfreiem, als auch aus serumhaltigem Medium gelang bis zur Homogenität. Bei der Reinigung des rekombinanten Procathepsin D aus serumfreiem Medium stellte sich jedoch heraus, daß es zwischen der 1. und 2. IEF N-terminal prozessiert wurde, wie wir mit Hilfe der Western-Blot-Technologie und spezifischer Antiseren gegen Pro- bzw. Pro- und Pseudocathepsin D zeigen konnten. Diese Prozessierung war durch wiederholten Zusatz des Inhibitoren-Cocktails während der Reinigung nicht zu unterbinden. Es ist nicht auszuschließen, daß durch die IEF eine Proteinase mit angereichert, die durch den Cocktail nicht erfaßt wurde und das rekombinante Procathepsin D N-terminal spaltete. Trotz der etwas höheren Ausbeute an rekombinantem Procathepsin D bei der Produktion in serumfreiem Medium wurde - auf Grund der bei der Reinigung auftretenden N-terminalen Spaltung des Procathepsin D - darauf verzichtet. Es wurde daraufhin eine routinemäßige Produktion und Reinigung von rekombinantem, humanem Procathepsin D in serumhaltigem Medium etabliert (siehe oben). Dabei wurde die Intaktheit des gereinigten, rekombinanten Proteins durch N-terminale Sequenzierung nachgewiesen. Die Sequenzierung der ersten zehn Aminosäuren lieferte exakt die von Faust *et al.* (1985) publizierte N-terminale Sequenz des humanen Procathepsin D. Desweiteren wurde - wie schon mehrfach erwähnt - die biologische Aktivität des rekombinanten Procathepsin D bei der Entwicklung der Expression und der Reinigung mit Hilfe von radioaktiv-markiertem Hämoglobin als Substrat im Aktivitätstest nachgewiesen.

## 4.2 Analyse der Glykosylierung des rekombinanten, humanen Procathepsin D aus Insektenzellen

Zur Charakterisierung des rekombinanten, humanen Procathepsin D aus *Spodoptera frugiperda*-Zellen gehörte neben der oben beschriebenen Bestimmung der N-terminalen Sequenz und der biologischen Aktivität auch die Analyse der Glykosylierung.

An metabolisch-markiertem und immunpräzipitiertem, rekombinantem Procathepsin D konnten wir die Sensitivität gegenüber Glykopeptidase F (GPF) und die Resistenz gegenüber *Endo*- $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase H (Endo H) zeigen. Dieses führt zu dem Schluß, daß das rekombinante Procathepsin D glykosyliert ist (GPF-sensitiv) und die Struktur der Oligosaccharidseitenketten nicht dem mannosereichen bzw. hybriden Typ entspricht (Endo H-resistent). Komplexe Oligosaccharide, die ebenfalls GPF-sensitiv und Endo H-resistent wären, konnten auf Grund der Größe des glykosylierten, rekombinanten Proteins (51 kDa gegenüber 47 kDa für das unglykosylierte Protein bei zwei Glykosylierungsstellen) und der für andere rekombinante, in Insektenzellen exprimierte Proteine beschriebenen Modifizierung der Oligosaccharidseitenkette ausgeschlossen werden. Auf Grund der Befunde liegt die Schlußfolgerung nahe, daß die Zuckerseitenketten des rekombinanten Procathepsin D stark „getrimmt“ sind und wahrscheinlich der Struktur  $\text{Man}_{2-3}\text{GlcNAc}_2$  entspricht. Eine Fukosylierung des proximalen GlcNAc-Restes wurde nicht untersucht und kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Zur Modifizierung von Asn-gebundenen Oligosacchariden in *Spodoptera frugiperda*-Zellen sind mittlerweile zahlreiche, zum Teil sehr widersprüchliche Publikationen erschienen. Davidson *et al.* (1990) fanden am Beispiel von rekombinantem, humanem Plasminogen aus Sf21-Zellen sowohl mannosereiche ( $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ), „getrimmte“ mannosereiche ( $\text{Man}_{3-5}\text{GlcNAc}_2$ ) als auch komplexe (bisialo-biantennäre) Zuckerseitenketten. Nach weiteren Untersuchungen am rekombinanten Plasminogen publizierten Davidson u. Castellino (1991) eine Abhängigkeit zwischen der Struktur der Zuckerseitenketten und der Dauer der Infektion. Während sie innerhalb der ersten 20 Stunden nach der Infektion (p. i.) vornehmlich mannosereiche Oligosaccharide ( $\text{Man}_{3-9}\text{GlcNAc}_2$ ) nachweisen konnten, fanden sie 60 bis 96 Stunden p. i. in erster Linie komplexe Zucker. Komplexe Oligosaccharide sind jedoch von anderen Arbeitsgruppen an anderen rekombinanten Glykoproteinen aus *Spodoptera frugiperda*-Zellen nicht gefunden worden. Selbst mannosereiche Strukturen wurden nur von Luckow u. Summers (1988) und von Yeh *et al.* (1993) beschrieben. Bei dem überwiegenden Teil der untersuchten, rekombinanten Glykoproteine aus *Spodoptera frugiperda*-Zellen identifizierte

man hauptsächlich Tri- bzw. Dimannosyl-Kernstrukturen ( $\text{Man}_{2-3}\text{GlcNAc}_2$ ), die teilweise am proximalen GlcNAc-Rest fukosyliert sein können (Kuroda *et al.*, 1990; Grabenhorst *et al.*, 1992; Voss *et al.*, 1993; Kubelka *et al.*, 1994; Jarvis u. Finn, 1995; Wagner *et al.*, 1996; zur Übersicht siehe März *et al.*, 1995).

Die nachfolgende Abb. 39 gibt schematisch den bisher bekannten und konsensfähigen Ablauf der Prozessierung Asn-gebundener Oligosaccharide in Insektenzellen wieder, der auch mit den von uns gemachten Beobachtungen am rekombinanten, humanen Procathepsin D aus Sf21-Zellen übereinzustimmen scheint.

Die N-Glykosylierung erfolgt gemäß dem in der Einleitung dieser Arbeit beschriebenen Mechanismus für Vertebraten. Dabei wird im ER das an Dolicholpyrophosphat gebundene Vorläufer-Oligosaccharid ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) kotranslational auf das entstehende Polypeptid übertragen. Die drei terminalen Glukosen werden noch im ER durch die Glukosidase I und II entfernt (Jarvis u. Summers, 1989; Jarvis u. Garcia, 1994). Auch ist in Insektenzellen eine entsprechende UDP-Glukose:Glykoprotein-Glukosyltransferase isoliert, kloniert und charakterisiert worden (Parker *et al.*, 1995), so daß davon ausgegangen werden kann, daß auch die Insektenzellen über die Möglichkeit verfügen, die richtige Faltung von neusynthetisierten Proteinen zu überprüfen bzw. zu korrigieren.

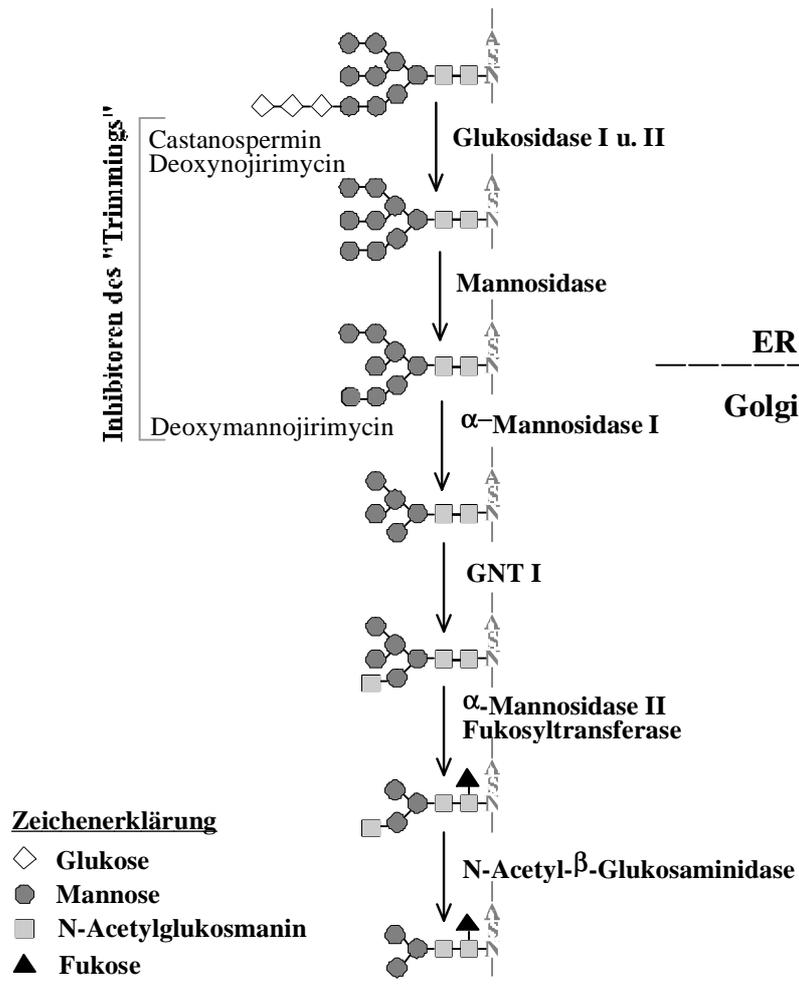


Abb. 39: Schematische Darstellung der Prozessierung von N-gebundenen Oligosaccharidseitenketten in *Spodoptera frugiperda*-Zellen. (Abkürzung: GNT I: UDP-N-Acetylglucosamine: $\alpha$ -3-D-Mannoside- $\beta$ 1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase I, weitere Erläuterungen siehe Text).

Nach Entfernung der Glukosereste unterliegt das  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Oligosaccharid im ER der Abspaltung eines Mannoserestes, bevor das Glykoprotein zum Golgi transportiert wird. Dort folgt die Abspaltung dreier Mannosereste zum  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  durch die  $\alpha$ -Mannosidase I. Diese Struktur ist auch in Insektenzellen zunächst das Produkt der ersten Phase des „Trimmings“ von Mannoseresten (Ren *et al.*, 1995). Die Abspaltung weiterer Mannosereste ist wie in Vertebraten abhängig von der Übertragung eines GlcNAc-Restes durch die UDP-N-Acetylglucosamine: $\alpha$ -3-D-Mannoside- $\beta$ 1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase I (GNT I, Velardo *et al.*, 1993). Das erhaltene  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ -Oligosaccharid ist Substrat für die  $\alpha$ -Mannosidase II, die die Abspaltung zweier Mannosen zum  $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$  katalysiert, welches durch Übertragung eines Fukose-Restes auf den proximalen GlcNAc-Rest fukosyliert werden kann. Während in Vertebratenzellen nun der Aufbau von komplexen Oligosacchariden folgt, wird in

Insektenzellen der durch die GNT I übertragene GlcNAc-Rest durch eine  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase wieder abgespalten (Altmann *et al.*, 1995), so das daraus ein Oligosaccharid der Struktur  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}[\alpha 1,6\text{-Fuc}]\text{GlcNAc}$  resultiert, das nicht weiter prozessiert wird.

Mit Hemmstoffen haben wir am Beispiel des rekombinanten Procathepsin D in Sf21-Zellen versucht, die Prozessierung der Oligosaccharidseitenketten zu unterbinden. Sowohl durch Einsatz von Castanospermin bzw. Deoxynojirimycin (DNM) als Inhibitoren der Glukosidase I des ER (Hori *et al.*, 1984, Saul *et al.*, 1984; Hettkamp *et al.*, 1982; Saunier *et al.*, 1982), als auch durch Deoxymannojirimycin (DMM) als Inhibitor der  $\alpha$ -Mannosidase I des Golgi (Fuhrmann *et al.*, 1984) erhielten wir Endo H-sensitive, d. h. mannosereiche Oligosaccharide. Dabei war das glykosylierte, rekombinante Procathepsin D bei Kultivierung der Zellen in Anwesenheit von DNM bzw. Castanospermin ca. 1 kDa größer, als bei Kultivierung in Anwesenheit von DMM. Dieses korreliert mit den Oligosaccharid-Strukturen, die durch Hemmung der Glukosidase I ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) bzw. durch Hemmung der  $\alpha$ -Mannosidase I ( $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ ) zu erwarten waren. Da auf dem Röntgenfilm nur Banden in der Höhe des Procathepsin D mit unprozessierten Oligosacchariden zu entdecken sind, muß man zu dem Schluß kommen, daß die *Spodoptera frugiperda*-Zellen die von Lubas u. Spiro (1987) in Vertebratenzellen gefundene *endo*- $\alpha$ -D-Mannosidase nicht besitzen und ihnen somit die Möglichkeit fehlt, noch glukosylierte Oligosaccharide weiter zu „trimmen“.

Einhergehend mit der Hemmung der Oligosaccharidprozessierung und der Synthese mannosereicher Zuckerseitenketten war jedoch eine Verringerung der Expressionsleistung der rekombinant-infizierten Sf21-Zellen zu beobachten. Diese geringere Expression scheint bei Hemmung der Glukosidase I stärker ausgeprägt zu sein, als bei Hemmung der  $\alpha$ -Mannosidase I. Es ist publiziert worden, daß in humanen Fibroblasten in Anwesenheit von DNM Procathepsin D im ER akkumuliert und die Reifung des Cathepsin D stark verlangsamt wird (Lemansky *et al.*, 1984). Es ist bekannt, daß die Deglukosylierung normalerweise notwendig für den Transport von Glykoproteinen vom ER zum Golgi ist. Da wir jedoch metabolisch-markiertes, mannosereiches Procathepsin D nur aus den Medien von rekombinant-infizierten Sf21-Zellen untersucht haben, ist es wahrscheinlich, daß die scheinbar geringere Expression unter Einfluß von DNM bzw. Castanospermin gegenüber DMM auf eine teilweise intrazelluläre Retention des Procathepsin D im ER zurückzuführen ist.

### 4.3 Autoaktivierung von rekombinantem, humanem Procathepsin D *in vitro*

Cathepsin D wird, wie die anderen Mitglieder der Aspartyl-Proteinasefamilie, als inaktives Vorläuferprotein (Procathepsin D) synthetisiert und erst an seinem Zielort aktiviert. Wie in der Einleitung dieser Arbeit dargelegt, existieren zwei/drei aktive Formen des Cathepsin D, zum einen die Einkettenformen (Pseudocathepsin D und Intermediat), zum anderen die Zweikettenform (reifes Cathepsin D), welche durch Spaltung des Einketten-Enzyms in eine schwere und eine leichte Kette entsteht.

Betrachtet man die Bildung des aktiven Einketten-Cathepsin D, so zeigten Hasilik *et al.* (1982) an metabolisch-markiertem, immunpräzipitiertem, humanem Procathepsin D aus Fibroblasten, daß in saurem Milieu (pH 3,8 bis 4,2) eine autokatalytische Spaltung des Procathepsin D stattfindet, die durch Zugabe von Pepstatin A verhindert werden kann. Dabei war die Spaltung zum sogenannten Pseudocathepsin D bei pH 3,8 nach 2 Minuten detektierbar und nach 8 Minuten abgeschlossen. Diese Zeitverzögerung zeigte sich auch bezüglich der Aktivität von immunpräzipitiertem Procathepsin D im Aktivitätstest bei pH 3,8 mit radioaktiv-markiertem Hämoglobin als Substrat, so daß die Autoren zu dem Schluß kamen, daß Procathepsin D inaktiv ist und erst durch Ansäuerung aktiviert wird. Die autokatalytische Spaltung des Pro- zum Pseudocathepsin D wurde auch von Conner (1989) an Procathepsin D aus Schweinenierenzellen, von Conner u. Udey (1990) bzw. Conner u. Richo (1992) an *in vitro* gefaltetem, rekombinantem, humanem Procathepsin D aus *E. coli* und von Beyer u. Dunn (1996) an rekombinantem, humanem Procathepsin D aus Sf9-Zellen beschrieben. Durch N-terminale Sequenzierung des Pseudocathepsin D konnten Conner u. Richo (1992) die Spaltstelle zwischen den Aminosäuren Leu<sup>-19</sup> und Ile<sup>-18</sup> der Prosequenz bestimmen. Die Abspaltung weiterer 18 N-terminaler Aminosäuren unter Bildung des Intermediates erfolgt hingegen nicht autokatalytisch (Larsen *et al.*, 1993), sondern unter Einfluß von Cys-Proteinasen (Hentze *et al.*, 1984; Gieselmann *et al.*, 1985; Samarel *et al.*, 1989).

Vergleicht man die Umwandlung von Procathepsin D zum aktiven Einkettenenzym mit der Aktivierung der Aspartyl-Proteinasen Pepsinogen und Prorenin, so scheint Cathepsin D eine Sonder- bzw. Zwischenstellung einzunehmen. Während sich Pepsinogen autokatalytisch bzw. unterhalb von pH 3 intramolekular aktiviert (Herriott, 1938; Bustin u. Conway-Jacobs, 1971), benötigt Prorenin ein zusätzliches Enzym (Yokosawa *et al.*, 1979; Neves *et al.*, 1996). Procathepsin D hingegen wird sowohl autokatalytisch, als auch durch Spaltung mit Cys-Proteinasen aktiviert. Beide Wege führen auch unabhängig voneinander zu aktivem Einketten-Cathepsin D. So exprimierten Richo u. Conner (1994) eine Procathepsin D-Mutante in Maus-

Ltk<sup>-</sup>-Zellen, die sich nicht mehr autokatalytisch spalten konnte, trotzdem reifte das Procathepsin D zum Intermediat bzw. zur Zweikettenform. Durch Einsatz von Inhibitoren für Cys-Proteinasen wurde *in vivo* die Spaltung des Procathepsin D zum Intermediat bzw. reifen Zweiketten-Enzym unterdrückt. Dennoch läßt sich auch bei Einsatz von Cys-Proteinase-Inhibitoren die Bildung von Pseudocathepsin D nachweisen.

Diese Sonderrolle von Cathepsin D macht es sehr interessant, den Mechanismus der Aktivierung und der Reifung genauer zu verstehen und unter Umständen die daran beteiligten Enzyme zu identifizieren. Bisher standen dazu jedoch nicht genügende Mengen an unprozessiertem Procathepsin D zur Verfügung. Die Versuche Anfang der 90er Jahre von Conner u. Udey (1990) rekombinantes, humanes Procathepsin D in *E. coli* (BL21DE3) zu exprimieren, führten zwar zu höheren Ausbeuten (bis zu 45 % des Gesamtproteins), es wurde jedoch ein nichtnatives, unglykosyliertes Procathepsin D erhalten, dessen Faltung *in vitro* versucht wurde. Die proteolytische Aktivität war erst nach Auflösen der Einschlusskörper in 8 M Harnstoff, anschließender 100facher Verdünnung und 48stündiger Inkubation bei pH 3,1 bis 3,9 in Spuren nachweisbar. Die Autoren schätzten, daß die Faltungsprozedur nur zu etwa 5 % aktivem Cathepsin D geführt hat.

Um möglichst natives, glykosyliertes Procathepsin D zu erhalten haben wir uns entschlossen, das Baculovirussystem zu verwenden. Wie im ersten Kapitel der Diskussion schon erwähnt, ist es uns gelungen, mit diesem System rekombinantes, humanes Procathepsin D zu produzieren, das biologisch aktiv und mit „getrimmten“ Oligosacchariden versehen ist. Wir konnten es aus serumhaltigem Medium unter nativen Bedingungen mit einer Ausbeute von 1,5 mg/l isolieren. Die bisherigen, oben beschriebenen Versuche zur Autoaktivierung von Procathepsin D wurden größtenteils an immunpräzipitiertem Material durchgeführt. Wir haben nun gereinigtes Procathepsin D ohne Begleitproteine wie Antikörper zur Verfügung.

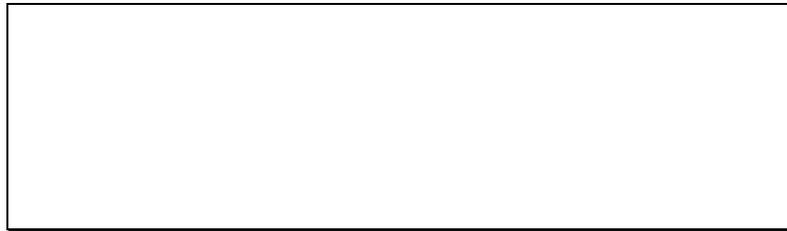
Die biologische Aktivität des rekombinanten Cathepsin D haben wir schon während der Entwicklung der Expression in Insektenzellen mit Hilfe von radioaktiv-markiertem Hämoglobin als Substrat bei pH 3,65 nachgewiesen. An gereinigtem, rekombinantem Procathepsin D konnten wir auch die autokatalytische Spaltung zum Pseudocathepsin D zeigen. Mit Hilfe von spezifischen Antiseren, die mit Hilfe synthetischer Polypeptide der Prosequenz hergestellt worden sind, wurde demonstriert, daß die Spaltstelle mit der von Conner u. Richo (1992) publizierten übereinstimmt (Spaltung zwischen der Aminosäure Leu<sup>-19</sup> und Ile<sup>-18</sup> der Prosequenz). Wir haben durch Titrationsversuche mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern bzw. mit Pepstatin A die spezifische Aktivität des durch Ansäuerung erhaltenen, rekombinanten Pseudocathepsin D mit der von gereinigtem, reifem Cathepsin D aus humaner Plazenta

verglichen. Unsere Ergebnisse deuten daraufhin, daß sich die spezifischen Aktivitäten von Pseudo- und reifem Cathepsin D in dem von uns eingesetzten Assay (radioaktiv-markiertes Hämoglobin als Substrat, bei pH 3,65) nicht unterscheiden. Dieser Befund steht im Widerspruch zu Beyer u. Dunn (1996), die Pseudocathepsin D - erhalten durch Ansäuern von rekombinantem, humanem Procathepsin D aus Sf9-Zellen -, sowie ein N-terminal um 12 Aminosäuren verkürztes Pseudocathepsin D - erhalten durch Ansäuerung einer Procathepsin D-Mutante, die eine zusätzliche Spaltstellen enthielt, ebenfalls aus Sf9-Zellen - mit reifem Cathepsin D aus humaner Leber verglichen. Sie verwendeten für ihren Aktivitätstest synthetische Peptide, wobei der Test bei pH 3,7 durchgeführt wurde. Aufgrund dieses Aktivitätstestes fanden sie für Pseudocathepsin D 33 - 64 % geringere  $k_{cat}/K_m$ -Werte als für das reife Cathepsin D. Für diese geringere Aktivität des Pseudocathepsin D postulieren sie eine Wechselwirkung von Aminosäuren der Prosequenz (Lys<sup>-9</sup>-Tyr<sup>-8</sup>) mit dem aktiven Zentrum des Enzyms. Diese Hypothese beruht auf einem Vergleich der Röntgenstrukturdaten für Pepsinogen aus Schweinen (James u. Sielecki, 1986) bzw. für humanes Progastricsin (James *et al.*, 1995). Demnach existiert in den Prosequenzen ein hoch konserviertes Dipeptid an der Position -9 bzw. -8. Entsprechende Wechselwirkungsmöglichkeiten gibt es für die verkürzte Pseudocathepsin D-Mutante nicht mehr und folgerichtig zeigt diese Mutante und das reife Cathepsin D im Aktivitätstest die gleichen  $k_{cat}/K_m$ -Werte. Wie oben erwähnt zeigt sich diese Differenz zwischen der spezifischen Aktivität von Pseudo- und reifem Cathepsin D in unserem Assay mit Hämoglobin als „natürlicherem“ Substrat nicht.

Uns ist es zudem gelungen, mit Hilfe des gereinigten, rekombinanten Procathepsin D eine Zeitabhängigkeit der Autoaktivierung von der Pro- zur Pseudoform zu zeigen. Damit ist zum erstenmal die Möglichkeit gegeben, einen besseren Einblick in den Mechanismus der Autoaktivierung zu erhalten. In einem Ansatz mit 0,2  $\mu$ M Procathepsin D zeigt sich bei pH 3,65 eine Zeitabhängigkeit für die Autoaktivierung, für die sich mathematisch ein sigmoider Kurvenverlauf errechnen läßt. Dieses deutet sehr stark auf einen bimolekularen Reaktionsablauf hin.

Für Pepsinogen, die bisher am besten untersuchte Aspartyl-Proteinase, die sich auch selbst aktiviert, fanden Bustin u. Conway-Jacobs (1971) - im Konzentrationsbereich von 12,5 bis 125 nM - eine von der Pepsinogenkonzentration unabhängige Autoaktivierung bei pH 2, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit auch durch Zugabe von Pepsin nicht erhöht werden konnte (200 nM Pepsinogen und 50 nM Pepsin). Sie zeigten, daß die Autoaktivierung nach einer Kinetik 1. Ordnung abläuft, welches einem mono- bzw. intramolekularem Mechanismus entspricht. Al-Janabi *et al.* (1972) publizierten, daß der Autoaktivierungsmechanismus bei

Pepsinogen pH-abhängig verläuft. Bei pH 4 läuft die Autoaktivierung vornehmlich intermolekular (bimolekular) ab, während sich unterhalb von pH 3 zunehmend eine intramolekulare Aktivierung (monomolekular) zeigt. Dabei führten sie die Untersuchungen bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  durch. Marciniszyn *et al.* (1976) analysierten die Autoaktivierung von Pepsinogen bei pH 2 und einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Pepsinogen in Anwesenheit verschiedener Mengen an Globin (10 bis 284  $\mu\text{M}$ ), welches normalerweise ein gutes Substrat für Pepsin darstellt. Dabei stellten sie fest, daß Globin von Pepsinogen nicht gespalten, die Autoaktivierung jedoch kompetitiv gehemmt wird. Auf Grund dieser Ergebnisse entwickelten sie ein Modell für den Mechanismus der intramolekularen Autoaktivierung, den sie mit folgender Reaktionsgleichung beschreiben:



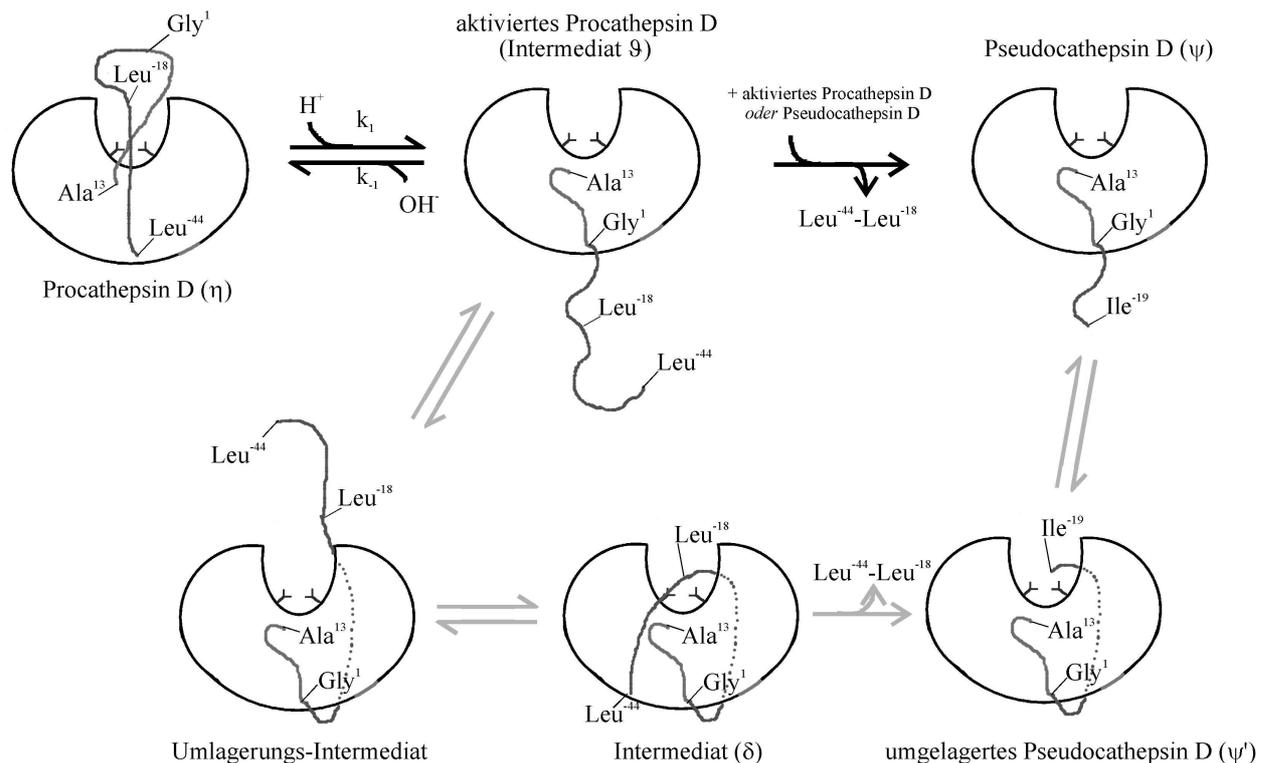
**Abb. 40: Schema der Abfolge der monomolekularen, autokatalytischen Reaktionen von Pepsinogen zu Pepsin.** (nach Marciniszyn *et al.* (1976), wobei die Symbole folgende Pepsinformen repräsentieren:  $\eta$ : Pepsinogen,  $\delta$ : Intermediat mit freiem aktivem Zentrum,  $\vartheta$ : Intermediat mit der Prosequenz in spaltbarer Orientierung im aktiven Zentrum,  $\Psi$ : Intermediat mit abgespaltener Prosequenz, die noch mit dem aktiven Zentrum assoziiert ist,  $\alpha$ : Pepsin, G: Globin,  $\delta\bullet G$ : Komplex zwischen Globin und dem Intermediat  $\delta$ ).

Demnach findet durch Erniedrigung des pH zunächst eine intramolekulare Umlagerung der Prosequenz statt und es bildet sich ein Intermediat ( $\delta$ ) mit freiem aktivem Zentrum. Dieses Intermediat kann reversibel mit Globin komplexieren. In diesem Komplex ist Pepsinogen nicht in der Lage, sich selbst zu spalten, noch spaltet es das Globin. In freiem/unkomplexiertem Zustand bildet sich aus dem Intermediat ( $\delta$ ) reversibel das Intermediat ( $\vartheta$ ), bei dem die Prosequenz in spaltbarer Orientierung im aktiven Zentrum liegt. Es folgt die Spaltung der Prosequenz unter Bildung des Intermediates ( $\Psi$ ), wobei das abgespaltene Peptid noch mit dem aktiven Zentrum assoziiert bleibt. Unter Freisetzung der abgespaltenen Prosequenz entsteht das aktive Pepsin.

Die für Aspartyl-Proteinase auf Grund der Homologie auf Aminosäureebene und bezüglich der katalytischen Aktivität vorhergesagte Ähnlichkeit der dreidimensionalen Struktur konnte nach röntgenkristallographischen Untersuchungen an Pepsin (Cooper *et al.*, 1990), Sielecki *et al.*, 1990) und Cathepsin D (Metcalf u. Fusek, 1993; Baldwin *et al.*, 1993) auch tatsächlich gezeigt werden. Da für Pepsinogen ebenfalls Röntgenstrukturdaten vorliegen (Sielecki *et al.*, 1991; Hartsuck *et al.*, 1992), wurden diese für die Modellierung von

Procathepsin D genutzt. Die Modellierung wurde in unserem Arbeitskreis von Herrn Dr. Löffler mit Hilfe des Programms What If (Version 4.99, G. Vriend - EMBL Heidelberg) durchgeführt. Dabei wurde die bei Pepsinogen gefundene Verschiebung der Position des Ile<sup>1</sup> um 44 Å im Vergleich zum aktiven Enzym auch für das Gly<sup>1</sup> des reifen Cathepsin D angenommen, da die Positionen des Pepsin Ile<sup>1</sup> und des Cathepsin D Gly<sup>1</sup> ebenfalls konserviert zu sein scheinen. Desweiteren wurde die Spaltsequenz (Ser<sup>98</sup>-Ala<sup>104</sup>) zwischen schwerer und leichter Kette des reifen Cathepsin D, modelliert und in die Struktur eingefügt. Bei der Modellierung des Procathepsin D ergab sich, daß sich ab Ala<sup>13</sup> die Positionen der Aminosäuren des reifen Cathepsin D mit denen des Procathepsin D decken. Der Vergleich zwischen dem modellierten Procathepsin D und dem reifen Cathepsin D zeigt, daß im Procathepsin D die Position, an der sich im reifen Cathepsin D Gly<sup>1</sup> befindet, von Leu<sup>-44</sup> besetzt wird.

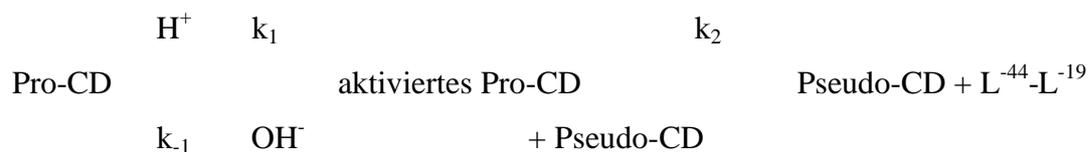
Auf Grund der Modellierung des Procathepsin D und an Hand der experimentellen Daten für die Zeitabhängigkeit der Autoaktivierung haben wir das in der nachfolgenden Abb. 41 dargestellte Modell entwickelt:



**Abb. 41: Schematische Darstellung des Modells für die Autoaktivierung von Procathepsin D.** Die obere Hälfte der Abbildung gibt die postulierte bimolekulare, die untere Hälfte die hypothetische monomolekulare Aktivierung wieder. Als Orientierungspunkte wurden folgende Aminosäuren markiert: Leu<sup>-44</sup>: N-Terminus der Prosequenz; Leu<sup>19</sup>/Ile<sup>-18</sup>: Spaltstelle zwischen Pro- und Pseudocathepsin D; Gly<sup>1</sup>: N-Terminus des reifen Cathepsin D (leichte Kette); Ala<sup>13</sup>: erste konservierte Aminosäure von Pro- bzw. reifem Cathepsin D; Y: Asp-Reste des aktiven Zentrums. Die Zuordnung der griechischen Buchstaben zu den verschiedenen Cathepsin D-Formen bzw. Intermediaten wurde in Analogie der von Marcinişzyn et al. (1976) für die Autoaktivierung von Pepsinogen verwendeten Symbole vorgenommen.

Procathepsin D ist bei neutralem bzw. alkalischem pH bedingt durch Abschottung des aktiven Zentrums durch eine Teilsequenz des reifen Cathepsin D (Gly<sup>1</sup>-Asp<sup>12</sup>) und die Prosequenz (Leu<sup>-44</sup>-Glu<sup>-1</sup>) inaktiv (siehe Abb. 41). Die Untersuchung der Autoaktivierungskinetik bei pH 3,65 zeigte, daß Procathepsin D (zum Zeitpunkt t = 0) ca. 10 % der Aktivität des vollständig autoaktivierten Pseudocathepsin D hat, wobei im Aktivitätstest mit 10minütiger Inkubation keine Umwandlung von Pro- zum Pseudocathepsin D stattfand. Demgemäß kann die gemessene Aktivität nur von einer pH-bedingten Konformationsänderung des Procathepsin D herrühren. Diese pH-abhängige Konformationsänderung wird vermutlich von einem Positionswechsel des Gly<sup>1</sup> begleitet. Unter der Annahme, daß die Prosequenz bei saurem pH keine definierte Orientierung/Position einnimmt, kann man postulieren, daß ein bestimmter Anteil des Procathepsin D als aktiviertes Procathepsin D (Intermediat  $\delta$ ) vorliegt, bei dem das aktive Zentrum völlig frei und damit vollständig aktiv ist (10 % Anfangsaktivität bei pH 3,65). Dieses spaltet nun in einer bimolekularen Reaktion ein weiteres aktiviertes Procathepsin D zum Pseudocathepsin D ( $\psi$ ) (Anfangsbedingungen der Autoaktivierung). Das entstandene Pseudocathepsin D ist weiterhin in der Lage, selbst Procathepsin D zu Pseudocathepsin D zu spalten (autokatalytische Spaltung), bis das gesamte Procathepsin D zu Pseudocathepsin D umgesetzt worden ist.

Unter Berücksichtigung dieses Modells, muß die im Ergebnisteil dieser Arbeit angegebene, stark vereinfachte Reaktionsgleichung modifiziert werden:



Auch diese Gleichung gibt den Reaktionsverlauf vereinfacht wieder, steht aber im Einklang mit den von uns erhaltenen Ergebnissen. Denn die im Ergebnisteil berechneten Werte behalten dabei ihre Gültigkeit, auch wenn man sie etwas anders interpretiert. Unter der Annahme, daß die Spaltung des Procathepsin D zum Pseudocathepsin D wesentlich langsamer abläuft als die pH-bedingte Konformationsänderung ( $k_2 \ll k_1$ ), so kann man sie bei der kinetischen Berechnung vernachlässigen. Bei der Berechnung der kinetischen Daten für die klassische Autoaktivierung (siehe Gleichung (4) im Ergebnisteil dieser Arbeit) errechnete sich eine Anfangskonzentration für Pseudocathepsin D zum Zeitpunkt t = 0 von 0,02  $\mu\text{M}$  (entspricht 10 % der Konzentration von Procathepsin D). Diese Menge an Pseudocathepsin D hätte auf dem silbergefärbten SDS-Gel sichtbar sein müssen, da dieses nicht der Fall war und unter der Berücksichtigung des oben

dargestellten Modells der Autoaktivierung, läßt sich postulieren, daß die Konzentration von 0,02  $\mu\text{M}$  dem Anteil an aktiviertem Procathepsin D entspricht, das volle Aktivität besitzt (dieses würde ebenfalls in Übereinstimmung mit der beobachteten Anfangsaktivität von Procathepsin D bei pH 3,65 in Anwesenheit von Hämoglobin stehen). Am Computer läßt sich an Hand der Strukturdaten auch eine mono-/intramolekulare Autoaktivierung modellieren (siehe unteren Teil der Abb. 41). Die sigmoidale Zeitabhängigkeit der Spaltung spricht jedoch gegen eine intramolekulare Reaktion. Bezugnehmend auf die geschilderte Autoaktivierung von Pepsinogen (bimolekular bei pH 4, monomolekular unterhalb von pH 3) könnte man spekulieren, daß der Mechanismus der Autoaktivierung von Procathepsin D ebenfalls pH-abhängig ist und bei niedrigerem pH ein monomolekularer Autoaktivierungsmechanismus bevorzugt wird. Dieses ist jedoch bisher von uns nicht untersucht worden, da wir zunächst die Autoaktivierung am pH-Optimum des Enzyms studiert haben.

#### 4.4 Ausblick

Mit der Möglichkeit, unprozessiertes Procathepsin D in größeren Mengen zu isolieren, eröffnet sich die Option, die Kristallisierung des Procathepsin D zu versuchen, um daran röntgenkristallographische Untersuchungen zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur durchzuführen und mit den erhaltenen Daten die modellierte Struktur des Procathepsin D gegebenenfalls zu verifizieren. Wir sind im Moment dabei, die dafür benötigten Mengen zu isolieren. In diesem Zusammenhang wäre es auch interessant Procathepsin D zu aktivieren und anschließend das erhaltene Pseudocathepsin D zu kristallisieren. Durch Röntgenstrukturanalysen könnte überprüft werden, ob die von Beyer u. Dunn (1996) postulierte Inhibierung des Pseudocathepsin D durch Wechselwirkung der Aminosäuren Lys<sup>-9</sup>-Tyr<sup>-8</sup> oder eher unsere Beobachtung des nichtgehemmten Pseudocathepsin D bestätigt. Desweiteren gilt es die Analyse der Autoaktivierung fortzusetzen. Zur Absicherung des postulierten Autoaktivierungsmechanismus sollte die konzentrationsabhängigkeit der Autokatalyse überprüft werden und, um die Analogie oder die Verschiedenheit zur Autoaktivierung von Pepsinogen aufzuzeigen, wäre eine Untersuchung der pH-Abhängigkeit notwendig.

Nachdem wir gezeigt haben, daß wir bei Verwendung von Inhibitoren der Oligosaccharidprozessierung Procathepsin D mit mannosereichen Zucker erhalten können, sind wir dabei, dieses - auf Grund des Preises der Inhibitoren - in µg-Mengen zu isolieren. Damit stünde ein natürliches Substrat für die Phosphotransferase (UDP-N-Acetylglukosamin: lysosomales Enzym N-Acetylglukosamin-1-phosphotransferase) bzw. nach *in vitro*-Phosphorylierung für die Phosphodiesterase (N-Acetylglukosamin-1-phosphodiester-a-N-Acetylglukosaminidase) zur Verfügung. Dieses Substrat könnte für ein anderes Projekt unserer Arbeitsgruppe von Interesse sein, das sich mit der Isolierung der Phosphodiesterase beschäftigt.

Wir haben mit dem gereinigten, rekombinanten Procathepsin D Mäuse immunisiert und eine Zellfusion zur Herstellung monoklonaler Antikörper durchgeführt. Auf diese Weise haben wir einige Klone erhalten, die Antikörper gegen das humane Cathepsin D herstellen. Die subklonierten Zellen müssen noch bezüglich der Spezifität gegenüber Procathepsin D durchgemustert werden, so daß wir bald in der Lage sein sollten spezifische Antikörper gegen Procathepsin D in größeren Mengen zu isolieren.

In der Einleitung dieser Arbeit wurde der Mannose-6-Phosphat-abhängige Transport lysosomaler Enzyme zu den Lysosomen beschrieben. Dieses beschreibt den Hauptweg des lysosomalen Transportes. Es jedoch bekannt, daß Cathepsin D auch Mannose-6-Phosphat-unabhängig in die Lysosomen transportiert werden kann. Der Mechanismus dieses Weges ist

bisher jedoch noch völlig unklar. Bisher wurde von Rijnbout *et al.* (1991) gezeigt, daß unter Einfluß von Tunicamycin nur teilweise glykosyliertes Cathepsin D in humanen Hepatoma-Zellen (HepG2) membranassoziiert jedoch Mannose-6-Phosphat-unabhängig in die Lysosomen transportiert wird. Grässel u. Hasilik (1992) demonstrierten, daß sich Procathepsin D in humanen Promonozyten (U937) mit einem 60 kDa-Glykoprotein vernetzen läßt. Dieses 60 kDa-Glykoprotein wurde von Zhu und Conner (1994) immunologisch als Prosaposin identifiziert. Es läßt sich spekulieren, daß unter Umständen Procathepsin D und Prosaposin als Komplex Mannose-6-Phosphat-unabhängig transportiert wird. Aus Vernetzungsexperimenten *in vivo* lassen sich jedoch keine ausreichenden Mengen des Komplexes zur genaueren Analyse isolieren. Wir beabsichtigen, Procathepsin D-Prosaposin-Komplexe *in vitro* herzustellen, um deren Zusammensetzung und deren Assoziierungsstellen und somit unter Umständen die Bedeutung des Komplexes für den Mannose-6-Phosphat-unabhängigen Transport zu untersuchen. Nachdem gereinigtes, rekombinantes Procathepsin D zur Verfügung stand, wurde von Frau Künzel rekombinantes, humanes Prosaposin mit Hilfe des Vaccinia-Virus-Expressionssystems exprimiert (Dissertation Künzel (in Arbeit)). Versuche, in denen in Mikrotiterplatten immobilisiertes, gereinigtes, rekombinantes Procathepsin D mit Medium von rekombinant-infizierten Zellen, die Prosaposin sezernieren, inkubiert worden sind, ließ sich mit Hilfe von Antikörpern die Bildung von Procathepsin D-Prosaposin D-Komplexen nachweisen (Grosch *et al.*, 1997).

Aus der Fülle der oben dargestellten, geplanten Experimente erkennt man, daß wir mit dem rekombinanten Procathepsin D ein wertvolles Hilfsmittel in der Hand haben, um die Reifung und den lysosomalen Transport eines lysosomalen Enzyms besser verstehen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein rekombinanter, die cDNA für humanes Procathepsin D enthaltender Baculovirus hergestellt und gereinigt. Mit diesem Baculovirus infizierte Insektenzellen (Sf21) exprimierten und sezernierten biologisch aktives, glykosyliertes, humanes Procathepsin D. Es wurde beobachtet, daß Procathepsin D während der Produktion in serumfreiem Medium von Proteinasen der Wirtszellen und/oder des Virus angegriffen wird. Bedingungen zur Isolierung von Procathepsin D mit intaktem N-Terminus wurde erarbeitet.

In serumhaltigem Medium konnte mit rekombinant-infizierten Sf21-Zellen bis zu 1,5 mg/l humanes Procathepsin D, in serumfreiem Medium bis zu 2,5 mg/l produziert werden. Allerdings mußte dem serumfreien Medium - auf Grund von sezernierter, heterogener Proteinase-Aktivität - ein Proteinase-Inhibitor-Cocktail, der Pepstatin A, Leupeptin, E-64, Pefablock®SC, Z-Phe-Phe-diazomethylketon und  $\alpha_2$ -Makroglobulin enthielt, zugesetzt werden. Wegen einer höheren Stabilität während der Reinigung wurde die Produktion des rekombinanten Proteins in serumhaltigem Medium etabliert. Die anschließende Reinigung erfolgte in zwei Schritten. Wobei im ersten Schritt eine affinitätschromatographische Reinigung über eine Pepstatin A-Agarose-Säule durchgeführt wurde und die im zweiten Schritt erfolgte Ionen-austauschchromatographie über MonoQ-FPLC zur Isolierung eines gelelektrophoretisch homogenen Präparates des Procathepsin D führte.

Die Befunde, daß die Asn-gebundenen Zuckerseitenketten des rekombinanten Procathepsin D Glykopeptidase F-sensitiv, jedoch *Endo*- $\beta$ -N-Acetylglukosaminidase H-resistent waren, führte zusammen mit den bisher publizierten Beobachtungen bezüglich Glykosylierung in Insektenzellen zu dem Schluß, daß es sich um getrimmte Oligosaccharide mit wenigen Mannoseresidenen handelt. Unter Verwendung der ER-Glukosidase-Inhibitoren Castanospermin bzw. Deoxynojirimycin und des Golgi-a-Mannosidase-Inhibitors Deoxymannojirimycin konnten wir im Medium rekombinant-infizierter Sf21-Zellen Procathepsin D mit mannosereichen Oligosacchariden nachweisen.

Mit dem gereinigten, rekombinanten Procathepsin D wurde die Kinetik der Autoaktivierung zu Pseudocathepsin D bei pH 3,65 untersucht. Mit Hilfe spezifischer Antiseren wurde die Spaltung innerhalb der Prosequenz bestätigt. Vergleiche der spezifischen Aktivität zwischen rekombinantem Pseudocathepsin D und reifem Cathepsin D aus humaner Plazenta ergaben - im Gegensatz zu den von Beyer u. Dunn (1996) publizierten Ergebnisse - keine Unterschiede. Die Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Autoaktivierung zeigte, daß bei pH 3,65 die Autoaktivierung überwiegend als eine bimolekulare Reaktion abläuft.

## 6. Literaturverzeichnis

- ALTMANN, F., SCHWIHLA, H., STAUDACHER, E., GLÖSSL, J. AND L. MÄRZ (1995), Insect cells contain an unusual, membrane-bound  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase probably involved in the processing of protein N-glycans, *J. Biol. Chem.* **270**:17344-17349
- APPEL, R. D., BAIROCH, A. AND D. F. HOCHSTRASSER (1994), A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server, *Trends Biochem. Sci.* **19**:258-260  
Internet-Adresse: <http://expasy.hcuge.ch>
- ARDAVANIS, A., SCORILAS, A., AMANATIDOU, A., GERAKINI, F., MISSITZIS, I., GAROUFALI, A., PISSAKAS, G., PATERAS, C., APÜOSTOLIKAS, N., RIGATOS, G. AND I. YIOTIS (1997), Cathepsin D concentration in tumor cytosols improves the accuracy of prognostic evaluation of primary breast cancer, *Anticancer Res.* **17**:1405-1409
- AUGEREAU, P., GARCIA, M., MATTEI, M. G., CAVAILLÈS, V. DEPA DOVA, F., DEROCQ, D., CAPONY, F., FERRARA, P. AND H. ROCHEFORT (1988), Cloning and sequencing of the 52K cathepsin D complementary deoxyribonucleic acid of MCF7 breast cancer cells and mapping an chromosome 11, *Mol. Endocrinol.* **188**,186-192
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D. SMITH, J. A., SEIDMAN J. G. AND K. STRUHL (ed) (1987), Current protocols in molecular biology, Wiley & Sons, New York
- BALDWIN, E. T., BHAT, T. N., GULNIK, S., HOSUR, M. V., SOWDER, R. C. 2D, CACHAU, R. E., COLLINS, J., SILVA, A. M. AND J. W. ERICKSON (1993), Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D implications for lysosomal targeting and drug design, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:6796-6800
- BARRETT, A. J. (1970), Purification of isoenzymes from human and chicken liver, *Biochem. J.* **117**: 601-607
- BARRETT, A. J. (ed.) (1977), Cathepsin D and other carboxyl proteinases, in *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*, pp. 209-248, Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam,
- BARRETT, A.J. (1979), Cathepsin D: the lysosomal aspartic proteinase, *Ciba Found Symp.* **75**:37-50
- BAUSE, E. AND G. LEGLER (1981), The role of the hydroxy amino acid in the triplet sequence Asn-Xaa-Thr(Ser) for the N-glycosylation step during glycoprotein biosynthesis, *Biochem. J.* **195**:639-644
- BEYER, B. M. AND B. M. DUNN (1996), Self-activation of rekombinant human lysosomal procathepsin D at a new engineered cleavage junction, „short“ pseudocathepsin D, *J. Biol. Chem.* **271**:15590-15596

- BIELICKI, J., FULLER, M., GUO, X.-H., MORRIS, P., HOPWOOD, J. J. AND D. S. ANSON** (1995), Expression, purification and characterization of recombinant human N-acetylgalactosamine-6-sulphatase, *Biochem J.* **311**, 333-339
- BIO RAD LABORATORIES GMBH**, München (1995), Mini Prep Cell - Instruction Manual
- BIRD, A. P.** (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation, *Nature* **321**:209-213
- BRADFORD, M. M.** (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- BRÖHME, D. AND K. OKAMOTO** (1995), The baculovirus cysteine protease has a cathepsin B-like S2-subsite specificity, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **376**:611-615
- BUSTIN, M. AND A. CONWAY-JACOBS** (1971), Intramolecular activation of porcine pepsinogen, *J. Biol. Chem.* **246**:615-620
- CANTOR, A. B. AND S. KORNFELD** (1992), Phosphorylation of Asn-linked oligosaccharides located at novel sites on the lysosomal enzyme cathepsin D, *J. Biol. Chem.* **267**:23357-23363
- CAPONY, F. MORISSET, M., BARRETT, A. J., CAPONY, J. P., BROQUET, P., VIGNON, F., CHAMBON, M., LOUISOT, P. AND H. ROCHEFORT** (1987), Phosphorylation, glycosylation, and proteolytic activity of the 52-kDa estrogen-induced protein secreted by MCF7 cells, *J. Cell. Biol.* **104**:253-262
- CARBONELL, L. F., KLOWDEN, M. R. AND L. K. MILLER** (1985), Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells, *J. Virol.* **56**:153-160
- CARBONELL, L. F. AND L. K. MILLER** (1987), Baculovirus interaction with nontarget organisms: a virus-borne reporter gene is not expressed in two mammalian cell lines. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1412-1417
- CATALDO, A. M., THAYER, C. Y., BIRD, E. D., WHEELOCK, T. R. AND R. A. NIXON** (1990), Lysosomal proteinase antigens are predominantly localized within senile plaques of Alzheimer's disease: evidence for a neuronal origin, *Brain Res.* **513**:181-192
- CAVAILLÈS, V., GARCIA, M. AND H. ROCHEFORT** (1989), Regulation of cathepsin-D and pS2 gene expression by growth factors in MCF<sub>7</sub> human breast cancer cells, *Mol. Endocrinol.* **3**:552-558
- CAVAILLÈS, V., AUGEREAU, P. AND H. ROCHEFORT** (1993), Cathepsin D gene is controlled by a mixed promoter, and estrogens stimulate only TATA-dependent transcription in breast cancer cells, *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* **90**:203-207
- CHO, W.-L., DHADIALLA, T. S. AND A. S. RAIKHEL** (1991), Purification and characterization of a lysosomal aspartic protease with cathepsin D activity from the mosquitos, *Insect Biochem.* **21**:165-176

- CHO, W.-L. AND A. S. RAIKHEL** (1992); Cloning of cDNA for mosquito lysosomal aspartic protease. Sequence analysis of an insect lysosomal enzyme similar to cathepsin D and E, *J. Biol. Chem.* **267**:21823-21829
- CHUI, D., OH-EDA, M., LIAO, Y.-F., PANNEERSELVAM, K., LAL, A., MAREK, K. W., FREEZE, H. H., MOREMEN, K. W., FUKUDA, M. N. AND J. D. MARTH** (1997), Alpha-Mannosidase-II deficiency results in dyserythropoiesis and unveils an alternate pathway in oligosaccharide biosynthesis, *Cell* **90**:157-167
- CONNER, G. E.** (1989), Isolation of procathepsin D from mature cathepsin D by pepstatin affinity chromatography, *Biochem. J.* **263**: 601-604
- CONNER, G. E. AND G. RICHIO** (1992), Isolation and characterization of a stable activation intermediate of the lysosomal aspartyl protease cathepsin D, *Biochemistry* **31**:1142-1147
- COOPER, J. B., KHAN, G., TAYLOR, G., TICKLE, I. J. AND T. L. BLUNDELL** (1990), X-ray analyses of aspartic proteinases. II. Three-dimensional structure of the hexagonal crystal form of porcine pepsin at 2.3 Å resolution, *J. Mol. Biol.* **214**:199-222
- DAHMS, N. M., LOBEL, P. AND S. KORNFELD** (1989), Mannos 6-Phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting, *J. Biol. Chem.* **264**:12115-12118
- DAVIDSON, D. H., FRASER, M. J. AND F. J. CASTELLINO** (1990), Oligosaccharide processing in the expression of human plasminogen cDNA by lepidopteran insect (*Spodoptera frugiperda*) cells, *Biochemistry* **29**:5584-5590
- DAVIDSON, D. H. AND F. J. CASTELLINO** (1991), Asparagine-linked oligosaccharide processing in lepidopteran insect cells. Temporal dependence of the nature of the oligosaccharides assembled on asparagine-289 of recombinant human plasminogen produced in baculovirus vector infected *Spodoptera frugiperda* (IPLB-SF-21AE) cells, *Biochemistry* **30**:6155-6174
- DIMENT, S.** (1990), Different roles for thiol and aspartyl proteases in antigen presentation of ovalbumin, *J. Immunol.* **145**:417-422
- DORN, A., MÜLLER, A., KIRSCHKE, H. WIEDERANDERS, B. AND H.-G. BERNSTEIN** (1986), Immunohistochemical analysis of the distribution of cathepsin D throughout human nervous system with reference to developmental aspects. *Biomed. Biochim. Acta* **45**:1457-1460
- DUFFY, M. J., REILLY, D., BROUILLET, J. P., MCDERMOTT, E. W., FAUL, C., O'HIGGINS, N., FENNELLY, J. J., MAUDELONDE, T. AND H. ROCHEFORT** (1992), Cathepsin D concentration in breast cancer cytosols: correlation with disease-free interval and overall survival, *Clin. Chem.* **38**:2114-2116
- DUNN, A. D. AND J. T. DUNN** (1982), Thyroglobulin degradation by thyroidal proteases: action of purified cathepsin D, *Endocrinology* **111**:280-289

- DUNN, A. D., CRUTCHFIELD, H. E. AND J. T. DUNN (1991), Thyroglobulin processing by hyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsin B, D and L, *J. Biol. Chem.* **66**:20198-20204
- DUNN, B. M. (1989), Determination of protease mechanism, in *Proteolytic enzymes, a practical approach* (eds. Beynon, R. J. and J. S. Bond), pp. 57-81, IRL Press, Oxford (GB)
- DUPONT DE NEMOURS (DEUTSCHLAND) GMBH, Diagnostika und biotechnologische Systeme, Bad Homburg (1992), NENSORB<sup>®</sup> 20 Nucleic Adic Purification Cartridge
- EDMAN, P. AND G. BEGG (1967), A protein sequenator, *Eur. J. Bichem* **1**: 80-91
- ERICKSON, A. H. AND G. BLOBEL (1983), Carboxyl-terminal proteolytic processing during biosynthesis of the lysosomal enzymes beta-glucoronidase and cathepsin D, *Biochemistry* **22**:5201-5205
- ERICKSON, A. H. (1989), Biosynthesis of lysosomal endopeptidases, *J. Cell. Biochem.* **40**:31-41
- FAUST, P. L., KORNFELD, S. AND J. M. CHIRGWIN (1985), Cloning and sequence analysis of cDNA for human cathepsin D, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:4910-4914
- FEINBERG, A. P. AND B. VOGELSTEIN (1983), A technique for radiolabeling DNA restrictionsendonuclease fragments to high specific acitivity, *Anal. Biochem.* **132**: 6-13
- FUHRMANN, U., BAUSE, E., LEGLER, G. AND H. PLOEGH (1984), Novel mannosidase inhibitor blocking conversion of high mannose to complex oligosaccharides, *Nature* **307**:755-758
- FUJINAGA, M., CHERNAIA, M. M., TARASOVA, N. I., MOSIMANN S. C. AND M. N. JAMES (1995), Crystal structure of human pepsin and its complex with pepstatin, *Protein Sci.* **4**:960-972
- FREDERICI, B. A. (1986), Ultrasturcture of baculoviruses, in *The biology of baculoviruses* (eds. Granados, R. R. and B. A. Frederici), vol. I., pp 61-88, CRC Press Inc., Boca Raton (USA)
- GERMANN, U. A., WILLINGHAM, M. C., PASTAN, I. AND M. M. GOTTESMAN (1990), Expression of the human multidrug transproter in insect cells by a recombinant baculovirus, *Biochemistry* **29**:2295-2303
- GIESELMANN, V., HASILIK, A. AND K. VON FIGURA (1985), Processing of human cathepsin D in lysosomes in vitro, *J. Biol. Chem.* **260**:3215-3220
- GRABENHORST, E., HOFER, B., NIMTZ, M., JÄGER, V. AND H. S. CONRADT (1993), Biosynthesis and secretion of human interleukin 2 glykoprotein variants from baculovirus-infected Sf21-cells. Characterzation of polypeptides and posttranslational modifications, *Eur. J. Biochem.* **215**:189-197

- GRACE, T. D. C.** (1962), Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro, *Nature* **195**: 788-789
- GRÄSSEL, S AND A. HASILIK** (1992), Human cathepsin D precursor is associated with a 60 kDa glycosylated polypeptide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**:276-282
- GREEN, D. W., AYKENT, S., GIERSE, J. K. AND M. E. ZUPEC** (1990), Substrate specificity of recombinant human renal renin: effect of histidine in the P2 subsite on pH dependence, *Biochemistry* **29**:3126-3133
- GRIFFITH, G, HOFLACK, B., SIMONS, K., MELLMANN, I. AND S. KORNFELD** (1988), The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes, *Cell* **52**:329-341
- GRÖNER, A.** (1986), Specificity and safety of baculoviruses, in *The biology of baculoviruses* (eds. Granados, R. R. and B. A. Frederici), vol. **I.**, pp 177-202, CRC Press Inc., Boca Raton (USA)
- GROSCH, H.-W., KÜNZEL, U., HUMMEL, M., HENSELER, M., SANDHOFF, K. AND A. HASILIK** (1997), Trafficking and processing of cathepsin D, in *Proteolysis in cell function* (eds. Hopsu-Havu, V. K., Järvinen, M. and H. Kirschke), pp. 229-233, IOS Press, Amsterdam (NL)
- GUPTA, D. K., SCHMIDT, A., VON FIGURA, K. AND A. HASILIK** (1984), Processing and transport of lysosomal enzymes in human monocyte line U937, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **365**: 867-876
- HAMMOND, C., BRAAKMAN, I. AND A. HELENIUS** (1994), Role of N-linked oligosaccharides, glucose trimming and calnexin during glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **91**:913-917
- HARTSUCK, J. A., KOELSCH, G. AND S. J. REMNINGTON** (1992), The high-resolution crystal structure of porcine pepsinogen, *Proteins* **13**:1-25
- HASILIK, A. AND E. F. NEUFELD** (1980), Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts, *J. Biol. Chem.* **255**: 4937-4945 und 4945-4950
- HASILIK, A., VON FIGURA, K., CONZELMANN, E., NEHRKORN, H. AND K. SANDHOFF** (1982a), Lysosomal enzyme precursors in human fibroblasts. Activation of cathepsin D precursor in vitro and activity of  $\beta$ -hexosaminidase A precursor towards ganglioside GM<sub>2</sub>, *Eur. J. Biochem.* **125**: 317-321
- HASILIK, A., VON FIGURA, K. AND K. H. GRZESCHIK** (1982b), Assignment of a gene for human cathepsin D to chromosome 11, *Cytogenet. Cell. Genet.* **32**:284
- HASILIK, A.** (1992), The early and late processing of lysosomal enzymes: Proteolysis and compartmentation, *Experientia* **48**:130-150
- HAYANO, T., SOGAWA, K. ICHIHARA, Y. FUJII-KURI-YAMA, Y. AND K. TAKAHASHI** (1988), Primary structure of human pepsinogen C gene, *J. Biol. Chem.* **263**:1382-1385

- HEBERT, D. N., FOELLNER, B. AND A. HELENIUS** (1995), Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum, *Cell* **81**:425-433
- HETMAN, M., PERSCHL, A., SAFTIG, P., VON FIGURA, K. AND C. PETERS** (1994), Mouse cathepsin D gene: molecular organization, characterization of the promoter, and chromosomal localization, *DNA Cell Biol.* **13**:419-427
- HEITZ, F., NAY, C. AND C. GUENET** (1997), Expression of functional human muscarinic M2 receptor in different insect cell lines, *J. Recept. Signal Transduct.* **17**:305-317
- HENTZE, M., HASILIK, A. AND K. VON FIGURA** (1984), Enhanced degradation of cathepsin D in the presence of the threonine analog  $\beta$ -hydroxynorvaline, *Arch. Biochem. Biophys.* **230**:275-382
- HERRIOTT, R. M.** (1938), *J. Gen. Physiol* **22**:65
- HETTKAMP, H., BAUSE, E. AND G. LEGLER** (1982), Inhibition by nojirimycin and 1-deoxynojirimycin of microsomal glucosidases from calf liver acting on the glycoprotein oligosaccharides Glc1-3Man9GlcNAc2, *Biosci. Rep.* **2**:899-906
- HEUKESHOVEN, J. AND R. DERNICK** (1988), Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem development unit. I. Staining of sodium dodecylsulfate gels, *Elektrophoresis* **9**:28-32
- HINK, W. F.** (1970), Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni.*, *Nature* **226**: 466-467
- HOBART, P. M., FOGLIANO, M., O'CONNOR, B. A., SCHAEFER, I. M. AND J. M. CHIRGWIN** (1984), Human renin gene: Structure and sequence analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:5026-5030
- HOFLACK, B. AND S. KORNFELD** (1985), Purification and characterization of a cation-dependent mannose-6-phosphate receptor from murine P388D1 macrophages and bovine liver, *J. Biol. Chem.* **260**:12008-12014
- HORI, H., PAN, Y. T., MOLYNEUX, R. J. AND A. D. ELBEIN** (1984), Inhibition of processing of plant N-linked oligosaccharides by castanospermine, *Arch. Biochem. Biophys.* **228**:525-533
- HORST, M.** (1990), Einfluß der Proteinstruktur auf die Reifung von Oligosaccharidseitenketten, Dissertation WWU Münster
- HORST, M. AND A. HASILIK** (1991), Expression and maturation of human cathepsin D in baby-hamster-kidney cells, *Biochem. J.* **273**: 355-361
- HUANG, J. S., HUANG, S. S. AND J. TANG** (1980), in *Enzyme Regulation and Mechanism of Action* (eds. Mildner, P. and B. Ries) pp. 289-306, Pergamon Press, Oxford (GB)

- HUH, N. E. AND R. F. WEAVER (1990), Identifying the RNA polymerase that synthesizes specific transcripts of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, *J. Gen. Virol.* **71**:195-201
- HYLAND, L. J., TOMASZEK, T. A. JR. AND T. D. MEEK (1991), Human immunodeficiency virus-1 protease. 2. Use of pH rate studies and solvent kinetic isotope effects to elucidate details of chemical mechanism, *Biochemistry* **30**:8454-8463
- ICHIMARU, E., SAKAI, H., SAKU, T., KUNIMATSU, K., KATO, Y., KATO, I. AND K. YAMAMOTO (1990), Characterization of hemoglobin-hydrolyzing acidic proteinases in human and rat neutrophils, *J. Biochem (Tokyo)* **108**:1009-1015
- ISIDORO, C., RADONS, J., BACCINO, R. M. AND A. HASILIK (1990), Suppression of the „uncovering“ of mannose-6-phosphate residues in lysosomal enzymes in the presence of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , *Eur. J. Biochem.* **191**: 591-597
- JAMES, M. N. AND A. R. SIELECKI (1986), Molecular structure of an aspartic proteinase zymogen, porcine pepsinogen, at 1,8 Å resolution, *Nature* **319**:33-38
- JAMES, M. N., MOORE, S., SIELECKI, A. R., CHERNAIA, M. AND N. TARASOVA (1995), in *Aspartic proteinases: Structure, function, biology and biomedical implications* (ed. K. Takahashi), Vol. **362**, pp 11-18, Plenum Press, New York (USA)
- JARVIS, D. L. AND M. D. SUMMERS (1989), Glycosylation and secretion of human tissue plasminogen activator in recombinant baculovirus-infected insect cells, *Mol. Cell. Biol.* **9**:214-223
- JARVIS, D. L. AND A. GARCIA (1994), Biosynthesis and processing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus gp64 protein, *Virology* **205**:300-313
- JARVIS, D. L. AND E. E. FINN (1995), Biochemical analysis of the N-glycosylation pathway in baculovirus-infected lepidopteran insect cells, *Virology* **212**:500-511
- JOHNSON, D. A., GAUTSCH, J. W., SPORTSMAN, J. R. AND J. H. ELDER (1984), Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose, *Gene Anal. Techn.* **1**: 3-8
- JOHNSON, M. D., TORRI, J. A., LIPPMAN, M. E. AND R. B. DICKSON (1993), The role of cathepsin D in the invasiveness of human breast cancer cells, *Cancer Res.* **53**:873-877
- KASTURI, L., ESHLEMAN, J. R., WUNNER W. H. AND S. H. SHAKIN-ESHLEMAN (1995), The hydroxy amino acid in an Asn-X-Ser/Thr sequon can influence N-linked core glycosylation efficiency and the level of expression of a cell surface glycoprotein, *J. Biol. Chem.* **270**:14756-14761
- KAWAUCHI, Y., TAKASAKI, J., MASUURA, Y. AND Y. MASUHO (1994), Preparation and characterization of human rheumatoid arthritic synovial fluid phospholipase A2 produced by recombinant baculovirus-infected insect cells, *J. Biochem. Tokyo* **116**:81-87
- KELLOGG, T. F. (1978), The effect of sample composition and vial type on Cerenkov counting in an liquid scintillation counter, *Anal. Biochem.* **134**: 137-143

- KÖSTER, A., SAFTIG, P., MATZNER, U., VON FIGURA, K., PETERS, C. AND R. POHLMANN** (1993), Targeting disruption of the M(r) 46,000 mannose 6-phosphate receptor gene in mice results in misrouting of lysosomal proteins, *EMBO J.* **12**:5219-5223
- KORNFELD, R. AND S. KORNFELD** (1985), Assembly of asparagine-linked oligosaccharide, *Annu. Rev. Biochem.* **54**:631-664
- KRAUSE, K.-H. AND M. MICHALAK** (1997), Calreticulin, *Cell* **88**:439-443
- KUBELKA, V., ALTMANN, F., KORNFELD, G. AND L. MÄRZ** (1994), Structures of the N-linked oligosaccharides of the membrane glycoproteins from three lepidopteran cell lines (Sf-21, IZD-Mb-0503, Bm-N), *Arch. Biochem. Biophys.* **308**:148-157
- KURODA, K., GEYER, H., GEYER, R., DOERFLER, W. AND H. D. KLENK** (1990), The oligosaccharides of influenza hemagglutinin expressed in insect cells by a baculovirus vector, *Virology* **171**:418-429
- KUTE, T. E., SHAO, Z. M., SUGG, N. K., LONG, R. T., RUSSEL, G. B. AND L. D. CASE** (1992), Cathepsin D as a prognostic indicator for node-negative breast cancer patients using both immunoassays and enzymatic assays, *Cancer Res.* **52**:5198-5203
- LÄMMLI, U. K.** (1970), Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>, *Nature* **227**: 680-685
- LARSEN, L. B., BOISEN, A. AND T. E. PETERSEN** (1993), Procathepsin D cannot autoactivate to cathepsin D at acid pH, *FEBS Lett.* **319**:54-58
- LASKEY, R. A. AND A. D. MILLS** (1975), Quantitative film detection of <sup>3</sup>H and <sup>14</sup>C in polyacrylamide gels by fluorography, *Eur. J. Biochem.* **56**: 335-341
- LASKOWSKI, R. A., HUTCHINSON, E. G., MICHIE, A. D., WALLACE, A. C., JONES, M. L. AND J. M. THORNTON** (1997), PDBsum: A Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures, *Trends Biochem. Sci.* **22**:488-490  
**Internet-Adresse:** <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum>
- LEMANSKY, P., GIESELMANN, V., HASILIK, A. AND K. VON FIGURA** (1984), Cathepsin D and β-hexosaminidase synthesized in the presence of 1-deoxynojirimycin accumulate in the endoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* **259**:10129-10135
- LENARCIC, B., KOS, J., DOLENC, L., LUCOVIK, P., KRIZAJ, I. AND V. TURK** (1988), Cathepsin D inactivates cysteine proteinase inhibitor cystatin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**:765-772
- LIFE TECHNOLOGIES GMBH**, Eggenstein (1994), Baculovirus Expression Vector System Accessory Products User Guide
- LIS, H. AND N. SHARON** (1993), Protein glycosylation. Structural and functional aspects, *Eur. J. Biochem.* **218**:1-27

- LODISH, H., BALTIMORE, D., BERK, A., ZIPURSKY S. L., MATSUDAIRA, P. AND J. DARNELL** (eds.) (1995), *Molecular Cell Biology*, 3rd edition, Scientific American Books, New York (USA)
- LORKOWSKY, G., ZIJDERHAND-BLEEKEMOLEN, J. E., ERDÖS, E. G., VON FIGURA, K. AND A. HASILIK** (1987), Neutral endopeptidase-24.11 (enkephalinase): biosynthesis and localisation in human fibroblasts, *Biochem.* **248**: 345-350
- LUBAS, W. A. AND R. G. SPIRO** (1987), Golgi endo-alpha-D-mannosidase from rat liver, a novel N-linked carbohydrate unit processing enzyme, *J. Biol. Chem.* **262**:3775-3781
- LUCKOW, V. A. AND M. D. SUMMERS** (1988), Trends in the development of baculovirus expression vectors, *Bio/Technology* **6**:47-55
- LUDWIG, T., EGGENSCHWILRER, J., FISHER, P., DÈRCOLE, A. J., DAVENPORT, M. L. AND A. EFSTRATIADIS** (1996), Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in Igf2 and Igf1r null backgrounds, *Dev. Biol.* **117**:517-535
- MÄRZ, L., ALTMANN, F., STAUDACHER, E. AND V. KUBELKA** (1995), Protein glycosylation in insects, in *Glycoproteins* (eds. Monteuil, J., Schachter, H. and J. F. G. Vliegenthart), pp 543-563, Elsevier Science B. V.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E. F. AND J. SAMBROOK** (eds.) (1982), *Molecular cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (USA)
- MARCINISZYN, J., HUNAG, J. S. JR., HARTSUCK, J. A. AND J. TANG** (1976a), Mechanism of intramolekular activation of pepsinogen, *J. Biol. Chem.* **251**:4628-4632
- MARCINISZYN, J. JR., HARTSUCK, J. A. AND J. TANG** (1976b), Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin, *J. Biol. Chem.* **251**:7088-7094
- MARCINISZYN, J. JR., HARTSUCK, J. A. AND J. TANG** (1977), Pepstatin inhibition mechanism, *Adv. Exp. Med. Biol.* **95**:199-210
- MARQUARDT, T., BRAULKE, T., HASILIK, A. AND K. VON FIGURA** (1987), Association of the precursor of cathepsin D with coated membranes. Kinetics and carbohydrate processing, *Eur. J. Biochem.* **168**:37-42
- METCALF, P. AND M. FUSEK** (1993a), Two crystal structures for cathepsin D: the lysosomal targeting signal and active site, *EMBO J.* **12**:1293-1302
- METCALF, P. AND M. FUSEK** (1993b), Cathepsin D crystal structures and lysosomal sorting, *Adv. Exp. Med. Biol.* **362**:193-200

- MILLER, L. K.** (1988), Baculovirus for foreign gene expression in insect cells, *Biotechnology* **10**:457-465
- MILLER, L. K.** (1989), Insect baculoviruses: powerful gene expression vectors, *Bioessays* **11**(4):91-95
- MILLIPORE GMBH, Erkrath** (1996), Rapid immunodetection of blotted proteins without blocking, *Application Note*
- MIYAZAKI, H., FUKAMIZU, A., HIROSE, S., HAYASHI, T. HORI, H., OHKUBO, H., NAKANISHI, S. AND K. MURAKAMI** (1984), Structure of the human renin gene, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **81**:5999-6003
- MOORE, G. E., GERNER, R. E. AND H. A. FRANKLIN** (1967), Culture of normal human leukocytes., *J. Am. Med. Assoc.* **199**: 519-524
- MOORE, S. E. AND R. G. SPIRO** (1990), Demonstration that Golgi endo-alpha-D-mannosidase provides a glucosidase-independent pathway for the formation of complex N-linked oligosaccharides of glycoproteins, *J. Biol. Chem.* **265**:12104-13112
- MORISSET, M., CAPONY, F. AND H. ROCHEFORT** (1986), The 52 k-Da estrogen-induced protein secreted by MCF7 cells is a lysosomal acidic protease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **138**:102-109
- MÜLLER, R., PEARSON, M. N., RUSSELL, R. L. Q. AND G. F. ROHRMANN** (1990), A capsid-associated protein of the multicapsid nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia pseudotsugata*: Genetic location, sequence, transcriptional mapping and immunocytochemical characterization, *Virology* **176**:133-144
- MONSA, S. A. AND M. SCOTT** (1997), Bacvector-3000: An engineered baculovirus for foreign protein expression, lacking viral chitinase and cathepsin protease activities, *FASEB J.* **11**:A1399 only
- NEVES, F. A., DUNCAN, K. G. AND J. D. BAXTER** (1996), Cathepsin B is a prorenin processing enzyme, *Hypertension* **27**:514-517
- O'REILLY, D. R., MILLER, L. K. AND V. A. LUCKOW** (eds.) (1994), Baculovirus vectors: A laboratory manual, Oxford University Press, New York (USA)
- PARKER, C. G., FESSLER, L. I., NELSON, R. E. AND J. H. FESSLER** (1995), Drosophila UDP-glucose:glycoprotein-glucosyltransferase: sequence and characterization of an enzyme that distinguishes between denatured and native proteins, *EMBO J.* **14**:1294-1303
- PAULSON, J. C.** (1989), Glycoproteins: What are the sugar chains for?, *Trends Biochem. Sci.* **14**:272-276
- PAYNE, G. S. AND R. SCHEKMAN** (1989), Clathrin: A role in the intracellular retention of a golgi membrane protein, *Science* **245**:1358-1365

- PENNOCK, G. D., SHOEMAKER, C. AND L. K. MILLER** (1984), Strong and regulated expression of *E. coli* beta-galactosidase in insect cells using a baculovirus vector, *Mol. Cell. Biol.* **4**:399-406
- PERBAL, B.** (ed) (1988), A practical guide to molecular cloning, Wiley & Sons, New York (USA)
- PHARMACIA BIOTECH EUROPE GMBH**, Freiburg  
(1993), GeneQuant DNA/RNA Calculator User Manual  
(1995), FPLCdirector<sup>TM</sup> User Manual
- PILLAI, S., BOTTI, R. AND J. E. ZULL** (1983), ATP activation of parathyroid hormone cleavage catalyzed by cathepsin D from bovine kidney, *J. Biol. Chem.* **258**:9724-9728
- PYLE, L. E., BARTON, P., FUJIWARA, Y., MITCHELL, A. AND N. FIDGE** (1995), Secretion of biologically active human proapolipoprotein A-I in a baculovirus-insect cell system: protection from degradation by protease inhibitors, *J. Lipid Res.* **36**:2355-2361
- QIAGEN GMBH**, Hilden (1994), QIAquick Gel Extraction Kit Protokoll (1994)  
(1993), QIAprep-spin Handbook for Plasmid Mini Preparations  
(1995), QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid Handbook
- RADEMACHER, T. W., PAREKH, R. B. AND R. A. DWEK** (1988), Glycobiology, *Annu. Rev. Biochem.* **57**:785-838
- RAMABHADRAN, T. V., GANDY, S. E., GHISO, J., CZERNIK, A. J., FERRIS, D., BHASIN, R., GOLDGABER, D., FRANGIONE, B. AND P. GREENGARD** (1993), Proteolytic processing of human amyloid beta protein precursor in insect cells. Major carboxyl-terminal fragment is identical to its human counterpart, *J. Biol. Chem.* **268**:2009-2012
- RAO, J. K., ERICKSON, J. W. AND A. WLODAWER** (1991), Structural and evolutionary relationships between retroviral and eucaryotic aspartic proteinases, *Biochemistry* **30**:4663-4671
- RAPOPRT, T. A.** (1992), Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane, *Science* **258**:931-936
- REDECKER, B., HORST, M. AND A. HASILIK** (1989), Calcitriol enhances transcriptional activity of lysozyme and cathepsin D genes in U937 promonocytes, *Biochem J.* **262**:843-847
- REDECKER, B., HECKENDORF, B., GROSCH, H.-W., MERSMANN, G. AND A. HASILIK** (1991), Molecular organization of the human cathepsin D gene, *DNA Cell Biol.* **10**:423-431
- REID, W. A., VALLER, M. J. AND J. KAY** (1986), Immunolocalisation of cathepsin D in normal and neoplastic human tissues, *J. Clin. Pathol.* **39**:1323-1330

- REN, J., BRETTHAUER, P. K. AND F. J. CASTELLINO** (1995), Purification and properties of a golgi-derived ( $\alpha$ 1,2)-mannosidase-I from baculovirus-infected lepidopteran insect cells (IPLB-SF21-AE) with preferential activity toward mannose<sub>6</sub>-N-acetylglucosamine<sub>2</sub>, *Biochemistry* **34**:2489-2495
- RICHO, G. AND G. E. CONNER** (1991), Proteolytic activation of human procathepsin D, *Adv. Exp. Med. Biol.* **306**:289-296
- RICHO, G. R. AND G. E. CONNER** (1994), Structural requirements of procathepsin D activation and maturation, *J. Biol. Chem.* **269**:14806-14812
- RIJNBOUTT, S., KAL, A. H., GEUZE, H. J., AERTS, H. AND G. J. STROUS** (1991), Mannose-6-phosphate-independent targeting of cathepsin D to lysosomes in HepG2 cells, *J. Biol. Chem.* **266**:23586-23592
- ROCHFORT, H., AUGEREAU, P., BRIOZZO, P., CAPONY, F., CAVAILLES, V., FREISS, G., GARCIA, M., MAUDELONDE, T., MORISSET, M. AND VIGNON, F.** (1988), Structure, function, regulation and clinical significance of the 52 K procathepsin D secreted by breast cancer cells, *Biochimie* **70**:943-949
- ROCHFORT, H.** (1990), Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer, *Semin. Cancer. Biol.* **1**:153-160
- RODRIGUEZ, G. M AND S. DIMENT** (1992), Role of cathepsin D in antigen presentation of ovalbumin, *J. Immunol.* **149**:2894-2898
- ROHRMANN, G. F.** (1986), Polyhedrin structure, *J. Gen. Virol.* **67**:1499-1513
- ROHRMANN, G. F.** (1992), Baculovirus structural proteins, *J. Gen. Virol.* **73**:749-761
- SAFTIG, P., HETMAN, M., SCHMAHL, W., WEBER, K., HEINE, L., MOSSMANN, H., KÖSTER, A., HESS, B., EVERS, M., VON FIGURA, K. AND C. PETERS** (1995), Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells, *EMBO J.* **14**:3599-3608
- SAHAGIAN, G. G., DISTLER, J. AND G. W. JOURDIAN** (1981), Characterization of a membrane-associated receptor from bovine liver that binds phosphomannosyl residues of bovine testicular  $\beta$ -galactosidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:4289-4293
- SAMAREL, A. M., FERGUSON, A. G., DECKER, R. S. AND M. LESCH** (1989), Effects of cysteine protease inhibitors on rabbit cathepsin D maturation, *Am. J. Physiol.* **257**:C1069-C1079
- SAUL, R., MOLYNEUX, R. J. AND A. D. ELBEIN** (1984), Studies on the mechanism of castanospermine inhibition of alpha- and beta-glucosidases, *Arch. Biochem. Biophys.* **230**:668-675
- SAUNIER, B., KILKER, R. D. JR., TKACZ, J. S., QUARONI, A. AND A. HERSCOVICS** (1982), Inhibition of N-linked complex oligosaccharide formation by 1-deoxynojirimycin, an inhibitor of processing glucosidases, *J. Biol. Chem.* **257**:14155-14161

- SCARBOROUGH, P. E., GURUPRASAD, K., TOPHAM, C. RICO, G. R., CONNER, G. E., BLUNDELL, T. L. AND B. M. DUNN** (1993), Exploration of subsite binding specificity of human cathepsin D through kinetics and rule-based molecular modeling, *Protein Sci.* **2**:264-276
- SCHÄRFE SYSTEM GMBH**, Reutlingen (1995), Casy<sup>®</sup>1 Cell Counter + Analyser System Model DT: Bedienungsanleitung
- SCHMID, S. L.** (1997), Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting, an integrated process, *Annu. Rev. Biochem.* **66**:511-548
- SCHWAGERL, A. L., MOHAN, P. S., CATALDO, A. M., VONSATTEL, J. P., KOWALL, N. W. AND R. A. NIXON** (1995), Elevated levels of the endosomal-lysosomal proteinase cathepsin D in cerebrospinal fluid in Alzheimer disease, *J. Neurochem.* **64**:443-446
- SHEWALE, J. G. AND J. TANG** (1984), Amino acid sequence of porcine spleen cathepsin D, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:3703-3707
- SIELECKI, A. R., FEDOROV, A. A., BOODHOO, A., ANDREEVA, N. S. AND M. N. JAMES** (1990), Molecular and crystal structures of monoclinic porcine pepsin refined at 1,8 Å resolution, *J. Mol. Biol.* **214**:143-170
- SIELECKI, A. R., FUJINAGA, M., READ, R. J. AND M. N. JAMES** (1991), Refined structure of porcine pepsinogen at 1,8 Å resolution, *J. Mol. Biol.* **219**:671-692
- SIMAN, R., MISTRETTA, S., DURKIN, J. T., SAVAGE, M. J., LOH, T., TRUSKO, S. AND R. W. SCOTT** (1993), Processing of the beta-amyloid precursor. Multiple proteases generate and degrade potentially amyloidogenic fragments, *J. Biol. Chem.* **268**:16602-16609
- SLACK, J. M., KUZIO, J. AND P. FAULKNER** (1995), Characterization of v-cath, a cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus, *J. Gen. Virol.* **76**:1091-1098
- SLEAT, D. E. AND P. LOBEL** (1997), Ligand binding specificities of the two mannose 6-phosphate receptors, *J. Biol. Chem.* **272**:731-738
- SMITH, G. E., FRASER, M. J. AND M. D. SUMMERS** (1983a), Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: Deletion mutations within the polyhedrin gene, *J. Virol.* **46**:584-593
- SMITH, G. E., SUMMERS, M. D. & M. F. FRASER** (1983b), Produktion of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* **3**:2156-2165
- SOGAWA, K., FUJII-KURIYAMA, Y., MIZUKAMI, Y., ICHIHARA, Y. AND K. TAKAHASHI** (1982), Primary structure of human pepsinogen gene. *J. Biol. Chem.* **258**:5306-5311

- STEIN, M., BRAULKE, T., VON FIGURA, K. AND A. HASILIK** (1987), Effects of differentiation-inducing agents on synthesis, maturation and secretion of cathepsin D in U937 and HL-60 cells, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **368**:413-418
- SUGIYAMA, K., AHORN, H., MAURER-FOGY, I. AND T. VOSS** (1993), Expression of human interferon-alpha 2 in Sf9 cells. Characterization of O-linked glycosylation and protein heterogeneities, *Eur. J. Biochem.* **217**:921-927
- SUMMERS, M. D. AND G. E. SMITH** (1987), A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures, *Texas Agric. Expt. Station Bull.* N<sup>o</sup> **1555**
- SUNDSTRÖM, C. AND K. NILSSON** (1976), Establishment and characterization of a human histiocytic hepatoma cell line U937., *Int. J. Cancer* **17**: 565-577
- TANG, J. AND R. N. S. WONG** (1987), Evolution in the structure and function of aspartic proteases, *J. Cell. Biochem.* **33**:53-63
- THEAN, E. T. AND B. H. TOB** (1989), Western immunoblotting: temperature-dependent reduction in background staining, *Anal. Biochem.* **177**: 256-258
- THIEM, S. M. AND L. K. MILLER** (1989), Identification, sequence and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, *J. Virol.* **63**:2008-2018
- THIRSTRUP, K., CARRIERE, F. HJORTH, S., RASMUÖSSEN, P. B., WOLDIKE, H., NIELSEN, P. F. AND L. THIM** (1993), One-step purification and characterization of human pancreatic lipase expressed in insect cells, *FEBS-Lett.* **327**:79-84
- TIJA, S. T., MEYER ZU ALTENSCHILDESCH, G. AND W. DOERFLER** (1983), *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA does not persist in mass cultures of mammalian cells, *Virology* **125**:107-117
- TROMBETTA, S. E., BOSCH, M. AND A. J. PARODI** (1989), Glycosylation of glycoproteins by mammalian, plant, fungus and trypanosomatid protozoa microsomal proteins, *Biochemistry* **28**:8108-8116
- TROMBETTA, S. E., GANAU, S. AND A. J. PARODI** (1991), The UDP-Glc:Glycoprotein Glucosyltransferase is a soluble protein of the endoplasmic reticulum, *Glycobiology* **1**:155-161
- UENO, E., SAKAI, H., KATO, Y. AND K. YAMAMOTO** (1989), Activation mechanism of erythrocyte cathepsin E. evidence for the occurrence of the membrane-associated active enzyme, *J. Biochem. (Tokyo)* **105**:878-882
- VAN DER WESTHUYZEN, D. R., GEVERS, W. AND G. COETZEE** (1980), Cathepsin D-dependent initiation of the hydrolysis by lysosomal enzymes of apoprotein B from low-density lipoproteins, *Eur. J. Biochem.* **112**:153-160

- VAN NOORT, J. M. AND A. C. VON DER DRIFT (1989), The selectivity of cathepsin D suggests an involvement of the enzyme in the generation of T-cell epitopes, *J. Biol. Chem.* **264**:14159-14164
- VARKI, A. (1993), Biological roles of oligosaccharides: All of the theories are correct, *Glycobiology* **3**:87-130
- VAUGHN, J. L., GOODWIN, R. H., TOMPKINS, G. J. AND P. MACCAWLEY (1977), The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera Noctuidae), *In Vitro* **13**: 213-217
- VAUGHN, J. L. AND S. A. WEISS (1990), Large-scale propagation of insect cells, *Bioprocess Technol.* **11**:597-618
- VELARDO, M. A., BRETTHAUER, R. K., BOUTAUD, A., REINHOLD, B., REINHOLD, V. N. AND F. J. CASTELLINO (1993), The presence of UDP-N-acetylglucosamine:α-3-D-mannoside-β1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I activity in *Spodoptera frugiperda* cells (IPLB-SF21-AE) and its enhancement as a result of baculovirus infection, *J. Biol. Chem.* **268**:17902-17907
- VERBERT, A. (1995), Biosynthesis: From Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-protein to Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>- protein: Transfer 'en bloc' and processing, in *Glycoproteins* (eds: Montreuil, J., Schachter, H. and J. F. G. Vliegenthart), pp 145-152, Elsevier Science B. V.
- VILLAREAL, L. P. AND P. BERG (1977), Hybridization in situ of SV 40 plaques: detection of recombinant SV 40 virus carrying specific sequences of nonviral DNA, *Science* **196**: 183-185
- VISSAVAJHALA, P. AND A. H. ROSS (1990), Purification and characterization of the recombinant extracellular domain of human nerve growth factor receptor expressed in an baculovirus system, *J. Biol. Chem.* **265**:4746-4752
- VOLKMANN, L. E. AND P. A. GOLDSMITH (1985), Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: Inhibition of entry by adsorptive endocytosis, *Virology* **143**:185-195
- VON FIGURA, K. AND A. HASILIK (1986), Lysosomal enzymes and their receptors, *Annu. Rev. Biochem.* **55**:167-193
- VOSS, T., ERGÜLEN, E., AHORN, H., KUBELKA, V., SUGIYAMA, K., MAURER-FOGY, I. AND J. GLÖSSL (1993), Expression of human interferon ω1 in Sf9 cells. No evidence for complex-type N-linked glycosylation or sialylation, *Eur. J. Biochem.* **217**:913-919
- WAGNER, R., GEYER, H., GEYER, R. AND H. D. KLENK (1996), N-acetyl-beta-glucosaminidase accounts for differences in glycosylation of influenza virus hemagglutinin expressed in insect cells from a baculovirus vector, *J. Virol.* **70**:4103-4109

- WATERS GMBH**, Eschborn (1993),  
Waters 625 LC System Operator's Manual  
Waters 996 Photodiode Array Detector Operator's Manual  
Millennium<sup>TM</sup> 2010 Chromatography Manager User's Guide
- WHITT, M. A. AND J. S. MANNING** (1988), A phosphorylated 34-kDa protein and a subpopulation of polyhedrin are thiol linked to the carbohydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body, *Virology* **163**:33-42
- WILSON, M. E., MAINPRIZE, T. H., FRIESEN, P. D. AND L. K. MILLER** (1987), Location, transcription and sequence of a baculovirus gene encoding a small arginine-rich polypeptide, *J. Virol.* **61**:661-666
- YEH, J.-C., SEALS, J. R., MURPHY, C. I., VON HALBECK, H. AND R. D. CUMMINGS** (1993), Site-specific N-glycosylation and oligosaccharid structures of recombinant HIV 1 gp120 derived from a baculovirus expression system, *Biochemistry* **32**:11087-11099
- YOKOSAWA, N., TAKAHASHI, N., INAGAMI, T. AND D. L. PAGE** (1979), Isolation of completely inactive plasma prorenin and its activation by kallikreins. A possible new link between renin and kallikrein, *Biochim. Biophys. Acta* **569**:211-219
- YONEZAWA, S., TAKAHASHI, T., WANG, X.-J., WONG, R. N. S., HARTSUCK, J. A. AND J. TANG** (1988), Structures at the Proteolytic Processing Region of Cathepsin D, *J. Biol. Chem.* **263**:16504-16511
- YOSHINARI, M. AND A. TAUROG** (1985), Lysosomal digestion of thyroglobulin: role of cathepsin D and thiol proteases, *Endocrinology* **117**:1621-1631
- ZHAO, Y. AND D. C. SANE** (1993), Expression of a recombinant baculovirus for vitronectin in insect cells: purification, characterization of post-translational modifications and functional studies of the recombinant protein, *Arch. Biochem. Biophys.* **304**:434-442
- ZHU, Y. AND G. E. CONNER** (1994), Intermolecular association of lysosomal protein precursors during biosynthesis, *J. Biol. Chem.* **269**:3846-3851

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

AcMNPV	<i>Autographa californica</i> nuclear polyhedrin virus
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BHK	Hamsternierenzellen („ <b>B</b> aby <b>H</b> amster <b>K</b> idney“)
Blotto	„ <b>b</b> ovine <b>l</b> acto <b>t</b> ransfer <b>t</b> echnique <b>o</b> ptimizer“
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	zirka
CD	Cathepsin D
cDNA	„copy“ Desoxyribonukleinsäure
cfu	Kolonie-bildende Einheit („ <b>c</b> olony <b>f</b> orming <b>u</b> nit“)
cpm	Impulse pro Minute („ <b>c</b> ounts <b>p</b> er <b>m</b> inute“)
Cys	Cystein
DAB	Diaminobenzidin
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMM	Deoxymannojirimycin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNM	Deoxynojirimycin
DPO	2,5-Diphenyloxazol
DTE	Dithioerytriol
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E-64	<i>trans</i> -Epoxy succinyl-leucylamido-(4-guanidino)butan
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Endo H	<i>Endo</i> - $\beta$ -N-acetylglukosaminidase H
ER	endoplasmatisches <b>R</b> etikulum
<i>et al.</i>	und andere („ <b>e</b> t <b>a</b> l <i>iter</i> “)
FPLC	„ <b>F</b> ast <b>P</b> rotein <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography“
Fuc	Fukose
G $\alpha$ K-POD	Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper, gekoppelt an Meerrettichperoxidase
G $\alpha$ M-POD	Ziege-anti-Maus-Antikörper, gekoppelt an Meerrettichperoxidase
Glc	Glukose
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
Glu	Glutamin
GNT	N-Acetylglukosaminyltransferase
GPF	Glykopeptidase F
Hb	Hämoglobin
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2, ethansulfonsäure])
His	Histidin
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie („ <b>H</b> igh <b>P</b> erformance <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography“)
IEF	isoelektrische <b>F</b> okussierung

Ile	Isoleucin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyrannosid
JAA	Jodacetamid
K $\alpha$ CD	Kaninchen-anti-Cathepsin D
K $\alpha$ M	Kaninchen-anti-Maus
KLH	Hämocyanin der Lochschnecke („ <b>K</b> eyhole <b>L</b> impet <b>H</b> emocyanin“)
kond.	konditioniert
LDL	Lipoprotein geringer Dichte („ <b>l</b> ow <b>d</b> ensity lipoprotein“)
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M $\alpha$ CD	monoklonaler <b>M</b> aus-anti- <b>C</b> athepsin <b>D</b> Antikörper
Man	Mannose
Met	Methionin
mLAP	lysosomale Aspartyl-Proteinase aus Mosquito
MOI	Multiplizität der Infektion („ <b>M</b> ultiplicity <b>O</b> f <b>I</b> nfection“)
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
NC	<b>N</b> itrocellulose
PAA	Polyacrylamid
PAGE	<b>P</b> olyacrylamidgelelektrophorese
Pen	Penicillin
pfu	Plaque-bildende Einheit („ <b>p</b> laque <b>f</b> orming <b>u</b> nit“)
Phe	Phenylalanin
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
p. i.	nach Infektion („ <b>p</b> ost <b>i</b> nfection“)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R $\alpha$ CDA	Kaninchen-anti-Procathepsin D (Peptid A)
R $\alpha$ CDB	Kaninchen-anti-Procathepsin D (Peptid B)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute („ <b>r</b> ounds <b>p</b> er <b>m</b> inute“)
SDS	Natriumdodecylsulfat („ <b>s</b> odium <b>d</b> odecyl <b>s</b> ulfate“)
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Ser	Serin
Strep	Streptomycin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
UDP	Uridindiphosphat
v	Volumen
Val	Valin
w	Gewicht („ <b>w</b> eight“)
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-indolyl- $\beta$ -D-galaktose

## 7.2 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Darstellung der Klonierungseffizienz.....	74
Tabelle 2: Nachweis von Proteinaseaktivität im Medium wildtyp- und rekombinant- infizierter Sf21-Zellen nach den angegebenen Reinigungsstufen.....	78
Tabelle 3: Einfluß verschiedener Inhibitoren auf die Proteinaseaktivität im Medium infizierter Sf21-Zellen.....	85
Tabelle 4: Reinigungstabelle zur Isolierung des Procathepsin D aus SF900II/CD-Medium.....	94
Tabelle 5: Reinigungstabelle zur Isolierung des Procathepsin D aus HINK's/CD-Medium.....	101
Abb. 1: Skizzierte Darstellung der Sekundärstrukturmerkmale von humanem Pepsin und humanem Cathepsin D.....	2
Abb. 2: Schematische Darstellung des Transportes sekretorischer Proteine und lysosomaler Enzyme zu ihren Zielorten.....	6
Abb. 3: Schematische Darstellung der Reifung von humanem Cathepsin D.....	7
Abb. 4: Schematische Darstellung der Trimannosylstruktur Asparagin-gebundener Oligosaccharide.....	8
Abb. 5: Schematische Darstellung der Prozessierung N-glykosidisch-gebundener Oligosaccharide.....	10
Abb. 6: Darstellung des Replikationszyklus des Baculovirus auf zellulärer Ebene.....	14
Abb. 7: Schematische Darstellung der Herstellung und Identifizierung eines rekombinanten Baculovirus.....	16
Abb. 8: Strategie und Verifikation der Klonierung der humanen Cathepsin D-cDNA in Baculovirus-Vektoren.....	73
Abb. 9: Vergleich nicht-, wildtyp- und rekombinant-infizierter Sf21-Zellen.....	76
Abb. 10: Autoradiographie hybridisierter NC-Filter zur Identifizierung potentiell- Cathepsin D-produzierender Baculoviren.....	77
Abb. 11: Biosynthese und Sekretion von rekombinantem Procathepsin D in Sf21-Zellen....	79
Abb. 12: Glykopeptidase F-Spaltung.....	80
Abb. 13: Synthese von Procathepsin D mit mannosereichen Oligosacchariden in Sf21-Zellen.....	82
Abb. 14: Nachweis der Cathepsin D-Aktivität im Medium infizierter Sf21-Zellen (bei Verwendung von serumhaltigem (HINK's) Medium).....	83
Abb. 15: Nachweis der Cathepsin D-Aktivität im Medium infizierter Sf21-Zellen (bei Verwendung von serumfreiem (SF900II) Medium).....	84
Abb. 16: Einfluß von Proteinaseinhibitoren auf das Medium von wildtyp-, rekombinant- und nichtinfizierter Sf21-Zellen.....	86
Abb. 17: Western-Blot zum Nachweis der Wirksamkeit des Zusatzes von Proteinase- inhibitoren bei der Produktion von Procathepsin D in serumfreiem Medium.....	88
Abb. 18: Reinigung des Procathepsin D aus SF900II/CD-Medium mittels Rotofor.....	89
Abb. 19: Graphische Darstellung des pH-Gradienten und der Proteinkonzentration in den bei der 1. Trennung im Rotofor erhaltenen Fraktionen.....	90
Abb. 20: Refokussierung zur Reinigung von Procathepsin D aus SF900II/CD-Medium.....	91

Abb. 21:	Graphische Darstellung des pH-Gradienten und der Proteinkonzentration in den bei der Refokussierung erhaltenen Fraktionen.....	91
Abb. 22:	Chromatogramm der Trennung von Rotofor-gereinigtem Procathepsin D mit Hilfe der Gelfiltrations-HPLC.....	92
Abb. 23:	Silbergefärbtes SDS-Gel der Fraktionen, die die erhaltenen Peaks umspannen.....	93
Abb. 24:	Synoptische Darstellung der Reinigung des Procathepsin D aus SF900II/CD-Medium mittels SDS-PAGE.....	95
Abb. 25:	Western-Blot der Fraktionen der Refokussierung.....	96
Abb. 26:	Reinigung des rekombinanten Procathepsin D aus serumhaltigem (HINK's/CD) Medium durch Affinitätschromatographie an Pepstatin A-Agarose.....	97
Abb. 27:	Isolierung des Procathepsin D-Polypeptides mittels präparativer SDS-PAGE.....	98
Abb. 28:	Chromatogramm der MonoQ-FPLC zur Reinigung des Procathepsin D aus dem HINK's/CD-Medium nach Affinitätschromatographie.....	100
Abb. 29:	Silbergefärbtes SDS-Gel des MonoQ-FPLC-gereinigten Procathepsin D aus dem HINK's/CD-Medium.....	100
Abb. 30:	Analyse der Heterogenität des gereinigten, rekombinanten Procathepsin D und des Pseudocathepsin D durch Deglykosylierung.....	103
Abb. 31:	Prozessierung der Prosequenz von humanem Procathepsin D.....	104
Abb. 32:	Analyse der Autoaktivierung von Procathepsin D durch SDS-PAGE und nachfolgender Coomassie® Blue-Färbung (A) bzw. Western-Blot (B).....	104
Abb. 33:	Zeitabhängigkeit der Autoaktivierung von Procathepsin D.....	106
Abb. 34:	Graphische Darstellung der Autoaktivierung.....	107
Abb. 35:	Überprüfung der Autoaktivierung von Procathepsin D während des CD-Assays mittels Western-Blot und Aktivitätsbestimmung.....	109
Abb. 36:	Silbergefärbtes SDS-Gel von gereinigtem Pseudo- bzw. reifem Cathepsin D.....	111
Abb. 37:	Titration der Aktivität von Pseudo- bzw. reifem Cathepsin D mit Hilfe von Pepstatin A.....	111
Abb. 38:	Titration der Aktivität von Pseudo- bzw. reifem Cathepsin D mit Hilfe des monoklonalen M $\alpha$ CD-Antikörpers 3F4.....	112
Abb. 39:	Schematische Darstellung der Prozessierung von N-gebundenen Oligosaccharidseitenketten in <i>Spodoptera frugiperda</i> -Zellen.....	119
Abb. 40:	Schema der Abfolge der monomolekularen, autokatalytischen Reaktionen von Pepsinogen zu Pepsin.....	124
Abb. 41:	Schematische Darstellung des Modells für die Autoaktivierung von Procathepsin D.....	126

# Curriculum Vitae

## Persönliche Daten

Name Hans-Wilhelm Grosch  
Geburtsdatum 16.12.1964  
Geburtsort Schwelm (NRW)  
Adresse Rentmeister Straße 35, 35043 Marburg  
Familienstand ledig

## Schulbildung

1971-1973 Grundschule am Büttenberg (Ennepetal)  
1973-1975 Mengeder Grundschule (Dortmund-Mengede)  
1975-1984 Heinrich-Heine-Gymnasium (Dortmund-Nette)  
1984 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

## Hochschulausbildung

Oktober 1984 - Juni 1990 Studium der Chemie an der Westfälischen Wilhelms Universität Münster  
August 1989 - Juni 1990 Diplomarbeit am Institut für Physiologische Chemie der Westfälischen Wilhelms Universität Münster unter der Leitung von Prof. Dr. Hasilik und Prof. Dr. Lezius  
Titel: „Sequenzierung und Analyse des 5’-“upstream“-Bereichs sowie der Exon/Intron-Übergänge innerhalb eines 10 kb-Fragmentes des humanen Cathepsin D-Gens“.  
Juni 1990 Diplom im Studiengang Chemie

## Berufliche Tätigkeit

Juli 1990 - Juni 1991 Wehrdienst bei der Bundeswehr  
Juli ‘90 - September ‘90 Grundausbildung beim LwAusRg in Essen  
Oktober ‘90 - Juni ‘91 Betriebsschutz beim LwVersRg 2 in Diepholz  
Juli 1991 - März 1992 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologische Chemie an der Westfälischen Wilhelms Universität  
Münster  
April 1992 - Juni 1994 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physiologische Chemie an der Westfälischen Wilhelms Universität Münster  
seit Juli 1994 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physiologische Chemie der Philipps Universität Marburg  
Juli 1991 Beginn der Promotionsarbeit:  
„Expression von humanem Procathepsin D in Insektenzellen mit Hilfe des Baculovirussystems (Produktion · Reinigung · Charakterisierung)“  
am Institut für Physiologische Chemie der WWU Münster, seit Juli 1994 am Institut für Physiologische Chemie der Philipps Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Hasilik (Fachbereich Medizin) und Prof. Dr. Kadenbach (Fachbereich Chemie).

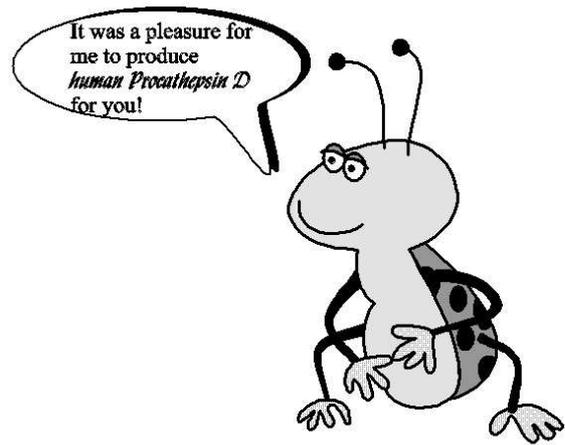
## Publikationen

1. **GROSCH, H.-W., KÜNZEL, U., HUMMEL, M. HENSELER, M., SANDHOFF, K. AND A. HASILIK** (1997), Trafficking and processing of cathepsin D in *Proteolysis in cell function* (eds. Hopsu-Havu, V. K., Järvinen, M. and H. Kirschke), pp. 229-233, IOS Press, Amsterdam (NL)
2. **GROSCH, H.-W. AND A. HASILIK** (1998), Protection of proteolysis-prone recombinant proteins in baculovirus expression systems, *BioTechniques* (in press)
3. **GROSCH, H.-W. AND A. HASILIK** (1996), Carbohydrate in human cathepsin D from *Spodoptera frugiperda*, 8<sup>th</sup> Joint Meeting of the Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van Glycoconjugaten, the Groupe Lillois de Glycobiologie & the Studiengruppe Glykokonjugate der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Schloß Rauischholzhausen, 09.-10.12.1996, P18
4. **GROSCH, H.-W. AND A. HASILIK** (1997), Expression of mannose-rich oligosaccharides containing human procathepsin D in *Spodoptera frugiperda*, Glyco XIV, Zürich, 07.-12.09.1997, *Glycoconj. J.* **14**, Suppl. 1, 101
5. **GROSCH, H.-W., LÖFFLER, H.-G. AND A. HASILIK** (1997), Human procathepsin D, Vth International Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control, Brdo, Slovenia, 04.-08.08.1997
6. **REDECKER, B., HECKENDORF, B., GROSCH H.-W., MERSMANN, G. AND A. HASILIK** (1991), Molecular organization of the human cathepsin D gene, *DNA Cell Biol.* **10**:423-431
7. **UHLÄNDER, C., GROSCH, H.-W. AND A. HASILIK** (1997), An alternative itinerary to lysosomes, 11th ESGLD Workshop, Bad Deutsch-Altenburg, 18.-21.09.1997
8. **MELCHER, R., GROSCH, H.-W., GROSSE, O. AND A. HASILIK** (1998), Increased elongation of N-acetyllactosamine repeats in doubly glycosylated lysozyme with a particular spacing of the glycosylation sites, (zur Veröffentlichung eingereicht)

(Nr. 1 ist nicht begutachtet und Nr. 3, 4, 5 und 7 sind Abstrakte)



*Danke*



*Der DFG möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken, die mein Projekt im Rahmen des SFB 310 „Intra- und interzelluläre Erkennungssysteme“ in Münster und im Rahmen des SFB 286 „Intrazellulärer Transport und Reifung von Proteinen“ in Marburg unterstützt hat.*

*Der erste Teil dieser Arbeit ist in **Münster**, im Institut für Physiologische Chemie der Westfälischen Wilhelms Universität entstanden. Dort gilt mein herzlichster Dank an erster Stelle Frau **Heidi Bracht**, mit der ich mir ein Labor teilen durfte und die mir in allen Belangen eine außerordentlich große Hilfe war. Ein herzliches Dankeschön auch an Herrn **Reiner Schulz**, der mich in die Geheimnisse der HPLC eingeweiht hat. Sowohl zu Heidi als auch zu Reiner verbindet mich auch heute noch eine tiefe Freundschaft. In der Gewebekultur habe ich große Unterstützung durch Frau **Hannelore Antemann** und Frau **Ingrid Klein** erhalten. Bei der mühevollen Arbeit im Zusammenhang mit den Gelektrophoresen hat mir Frau **Erika Rohden** tatkräftig geholfen.*

*Der zweite und abschließende Teil dieser Arbeit entstand in **Marburg**, im Insitut für Physiologische Chemie der Philipps-Universität. Von dem dortigen Personal wurde ich sehr freundschaftlich aufgenommen und fand im Bereich der Gewebekultur wertvolle Unterstützung durch Frau **Renate Sauer** und Frau **Renate Grundrum**, mit denen zusammen ich mich an die Herstellung monoklonaler Antikörper getraut habe. Für den Bereich der Gelektrophorese war mir Herr **Thomas Stein** eine große Hilfe, sowie für den Bereich der Chromatographie und der Fotoarbeiten Frau **Traudel Jarosch**. Herr **Heinrich Kaiser** ist seit Ende letzten Jahres mit großem Einsatz dabei, für uns größere Mengen rekombinantes Procathepsin D zu isolieren.*

*Für beide Standorte gilt, daß die Kollegen des gesamten Arbeitskreises durch das angenehme Arbeitsklima und die anregenden Diskussionen zum motivierten Arbeiten beigetragen haben.*

*Für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens dieser Arbeit und für ihre wertvollen Tips und Anregungen möchte ich mich recht herzlich bei meinen Kollegen **Bernd Köster** und **Hans-Christian Hedrich** bedanken.*

*Herrn **Prof. Dr. Kadenbach** möchte ich recht herzlich danken, der sich ohne Zögern bereit erklärt hat, als Erstgutachter und Hauptfachprüfer tätig zu werden.*

*Meinen Respekt und meine Dankbarkeit möchte ich Herrn **Prof. Dr. Hasilik** aussprechen, für die interessante Themenstellung und die kritische aber wohlwollende Unterstützung meiner Arbeit. Durch seinen Ruf nach Marburg, hatte ich die Gelegenheit, am Neuaufbau eines Labors maßgeblich beteiligt zu sein.*

*Der abschließende Dank gilt **meinen Eltern**, da für mich ohne deren Unterstützung eine wissenschaftliche Laufbahn unmöglich gewesen wäre.*