Aus dem Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle der Insulin-regulierten Aminopeptidase für die mTOR-Signalkaskade

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Von
Katharina Julia Huber
aus Berln

Datum der Promotion: 08.12.2017

Inhaltsverzeichnis

Abstract ..... **i**

Abstrakt ..... **iii**

1 Einleitung **1**

1.1 Die insulinregulierte Aminopeptidase 1

1.1.1 Die Aminopeptidase IRAP 1

1.1.2 Vorkommen und Regulierung 2

1.1.3 IRAP: Immunologische Funktion 4

1.1.4 IRAP: Enzymatische Funktion und klinische Bedeutung 6

1.2 Verbindung zwischen IRAP und der mTOR-Signalkaskade 7

1.3 Die mTOR-Signalkaskade 9

1.3.1 Molekulare Zusammensetzung von mTOR 10

1.3.2 mTOR: Substrate und Funktionen 11

1.3.3 Regulierung des mTOR-Pathways 12

1.3.4 mTOR und Klinik 13

1.4 Ausblick für die Arbeit 14

2 Methodik **15**

2.1 Material 15

2.1.1 Technische Laborausstattung 15

2.1.2 Verbrauchsmaterialien 16

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Medien 17

2.1.4 Puffer und Lösungen 19

2.1.5 Medien 20

2.1.6 Antikörper 21

2.1.7 Kits 21

2.1.8 Versuchstiere 21

2.1.9 Computerprogramme 22

2.2 Methoden 22

2.2.1 Arbeit mit Zellkulturen 22

2.2.2 Proteinanalyse per Western Blot 27

2.2.3 Reverse Transkription und quantitative Real-Time PCR (RT PCR) 30

3 Ergebnisse **40**

3.1 Einfluss von IRAP auf Wachstum und Proliferation 40

3.1.1 Wachstumsverhalten von MEF 40

3.1.2 Wachstumsverhalten von BMDC 41

3.1.3 Wachstumsverhalten von Makrophagen 43

3.2 Downstream-Effektoren von mTOR 45

3.3 Aktivierung von mTOR 46

3.3.1 LAT1/CD89 47

3.3.2 Glucosetransporter 48

4 Diskussion 53
4.1 Herabgesetzte mTOR-Aktivität 53
4.1.1 Verlangsamtes Wachstumsverhalten im IRAP-Knockout 53
4.1.2 mTOR Substrate 55
4.2 Kein detektierter Einfluss von IRAP auf die Regulatoren von mTOR 57
4.2.1 LAT1-Expression 57
4.2.2 Glucosetransporter 57
4.3 Reevaluation der Arbeitshypothesen 60
4.4 Klinischer Bezug der Arbeit 61
4.5 Ausblick 61
4.6 Fazit 62
Abkürzungsverzeichnis 65
Literaturverzeichnis 67
Abbildungsverzeichnis 76
Tabellenverzeichnis 77
Curriculum Vitae 79
Danksagung 80

Abstract

Background: The insulin-regulated aminopeptidase (IRAP) is a trimming enzyme located in intracellular vesicles of many different cell types. It can be redistributed to the cell surface in response to cell-specific stimuli, for example GluT4 in insulin-sensitive cells. In dendritic cells IRAP plays a pivotal role in the trimming of exogenous peptides for cross-presentation on MHC-I-Receptors. Only few data exist concerning the regulation of IRAP in dendritic cells. Preliminary data of the hostlab suggest spacial and functional links between IRAP and the mTOR-pathway. The spacial links are the endosomal colocalisation of IRAP with Rab14 and AS160 (substrates of mTOR) and IRAP's recruitment to the early phagosomes with LAT1 (upstream-protein of mTOR). The functional link is an increased autophagic activity found in IRAP-deficient dendritic cells. We have sought to investigate this relation between IRAP and the mTOR-pathway and to find out whether there is a regulatory link between IRAP's endosome and a glucose-receptor in dendritic cells.

Methods: Growth curves of different cell types have been established to compare proliferation between wildtype- and IRAP-deficient cells. The most important mTOR substrates have been analysed by Western Blot in wildtype- and IRAP-deficient dendritic cells. The expression of different glucose-receptors and LAT1 were measured with qPCR in wildtype- and IRAP-deficient dendritic cells.

Results: The proliferation of IRAP-deficient dendritic cells and fibroblasts (MEF) was found to be slower than that of their wildtype equivalents. Expression of certain mTOR-substrates (Akt, S6K) was found to be lower in IRAP-deficient dendritic cells. No significant difference concerning the expression of GluT1, GluT3 and LAT1 could be found between wildtype and IRAP-deficient dendritic cells, contrary to this, the expression of GluT4 was higher in IRAP-deficient dendritic cells.

Conclusion: Our data suggest a regulatory direct or indirect link between IRAP and the mTOR-pathway, which could be similar to a signaling platform. Contrary to insulin-responsive cells, there seems to be no regulatory link between IRAPs endosome and a glucose transporter in dendritic cells.

Abstrakt

Einleitung: Die insulinregulierte Aminopeptidase (IRAP) ist ein ubiquitär im Körper verbreitetes Enzym, das sich in intrazellulären Vesikeln befindet, die unter zellspezifischen Stimuli an die Zelloberflächen reguliert werden können. Als Oxytocinase spaltet IRAP Peptidbindungen, auch ihre Funktion scheint zellspezifisch zu sein. In dendritischen Zellen ist IRAP zusammen mit anderen Enzymen für das aminoterminale Trimming exogener Peptide zuständig, die folglich auf MHC-I an der Zelloberfläche präsentiert werden (Kreuzpräsentation). Es existieren wenige Informationen über die Regulation von IRAP in diesen Zellen. Die Vorarbeiten hierzu ließen eine Verbindung zur mTOR-Signalkaskade herstellen: IRAP befindet sich in dendritischen Zellen in endosomaler Nachbarschaft u.a. mit Rab14 und AS160 (Substrate von mTOR) und wird in das frühe Phagosom rekrutiert, wo auch LAT1, ein wichtiges Upstream-Protein von mTOR, identifiziert werden konnte. Zudem konnte in IRAP-defizienten Zellen eine höhere Autophagieaktivität nachgewiesen werden. Die mögliche Verbindung von IRAP zur mTOR-Signalkaskade sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob IRAP in DC genau wie in insulinsensitivem Gewebe eine Wechselwirkung mit einem Glucosetransporter eingeht.

Methoden: Es wurden Wachstumskurven verschiedener Zelltypen (IRAP-Knockout und Wildtyp) angefertigt und die wichtigsten Substrate von mTOR in dendritischen Zellen (IRAP-Knockout und Wildtyp) anhand von Western Blots gemessen. Darüber hinaus wurde anhand von qPCR die Expression von LAT1 und verschiedenen Glucosetransportern in dendritischen Zellen (IRAP-Knockout und Wildtyp) gemessen und verglichen.

Ergebnisse: Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass eine IRAP-Defizienz mit einer Aktivitätsminderung von mTOR einhergeht. IRAP-defiziente Zellen (DC und MEF) zeigten ein verlangsamtes Wachstumsverhalten im Vergleich zum Wildtyp. Darüber hinaus ließen sich bestimmte mTOR-Substrate (Akt, S6K) im IRAP-Knockout in geringerer Menge als im Wildtyp nachweisen. In der Expression der Glucosetransporter

GluT1 und GluT3 und des Proteins LAT1 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen IRAP-defizienten Zellen und Wildtyp-Zellen gefunden werden. Die Ergebnisse der Versuche zu GluT4 zeigten eine etwa sechsmal höhere Expression in IRAP-defizienten Zellen. Dieses Ergebnis muss durch weitere Untersuchungen bestätigt werden.

Zusammenfassung: IRAP scheint eine regulatorische Wirkung auf die mTOR-Signalkaskade zu haben, hierbei ist das Modell einer Signaling Platform oder aber ein direkter oder indirekter Regulationsmechanismus denkbar. Eine regulatorische Beziehung von IRAPs Endosom zu einem Glucose-Transporter ist nicht wahrscheinlich.

1 Einleitung

1.1 Die insulinregulierte Aminopeptidase

Die insulinregulierte Aminopeptidase (IRAP) ist ein ubiquitär im Körper verbreitetes Enzym, das sich in intrazellulären Vesikeln befindet, die unter zellspezifischen Stimuli an die Zelloberflächen reguliert werden können[1]. In der Schwangerschaft befindet sich IRAP auch in löslicher Form im Serum und auch die Funktion des Enzyms scheint zellspezifisch zu sein[1].

1.1.1 Die Aminopeptidase IRAP

Peptidasen sind Enzyme, die Peptidbindungen durch Hydrolyse zerstören. Die Untergruppe der Exopeptidasen spaltet nur endständige Peptidbindungen. Zu dieser Gruppe gehören auch die Aminopeptidasen, die einzelne Aminosäuren vom N-terminalen Ende von Proteinen trennen. IRAP ist der M1-Familie der zinkabhängigen Metalloproteasen zugehörig[2] und hat ein Molekulargewicht von 104,575 Da[3]. Als Typ-II-Transmembranprotein besteht IRAP aus drei Domänen: einem zytoplasmatischen N-Terminus (109 Aminosäuren), einem transmembranen Bereich (23 Aminosäuren) und einem intraluminalen bzw. extrazellulären Bereich (893 Aminosäuren)[2]. Im extrazellulären Teil sind die zwei typischen M1-Metalloproteasen-Motive lokalisiert: Das Zn-Bindungsmotif HEXXH(X)18E und das GAMEN-Motif[2]. In Abbildung 1 ist die Struktur von IRAP schematisch dargestellt.

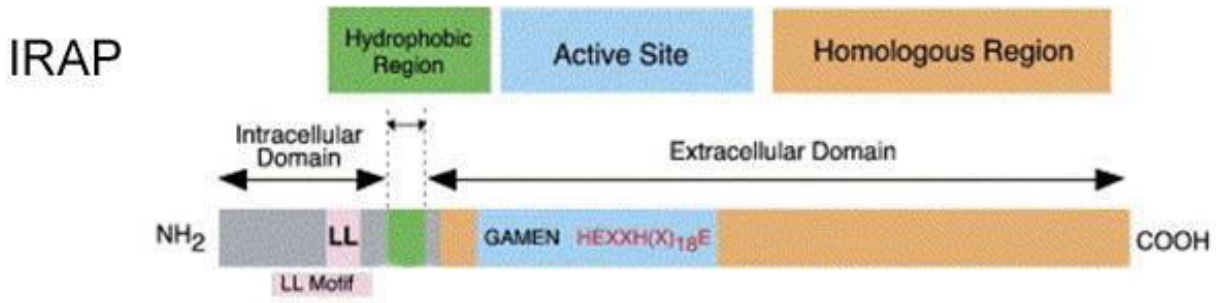

Abbildung 1: Die IRAP und ihre Struktur schematisch dargestellt (Übernommen aus Tsujimoto et al., Biochim Biophys Acta 2005)[2]

IRAP wurde erstmals im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Regulation des Glucosetransporter-4 (GluT4) entdeckt. Direkt nach der Identifikation von GluT4 bemühte man sich, die biochemische Zusammensetzung seines intrazellulären Kompartiments zu verstehen und wurde so auf das sich darin befindende Protein IRAP aufmerksam[4,5]. Es wurde zunächst aufgrund seiner Größe vp165 (vesicle protein 165kDa) oder gp160 (Glycoprotein 160kDa) genannt[6,7]. Etwa zeitgleich entdeckte man das humane Homolog des Enzyms, anfangs ohne zu verstehen, dass es sich um dasselbe Protein handelt. Als plazentare Leucin-Aminopeptidase (P-LAP) untersuchte man IRAP im Zusammenhang mit der Prozessierung verschiedener Peptidhormone wie Oxytocin, Vasopressin und Angiotensin[8,9].

1.1.2 Vorkommen und Regulierung

Die IRAP ist im humanen und murinen Organismus ubiquitär verbreitet: Sie ist in Zellen von Muskel- und Fettgewebe, ZNS, Niere, Nebenniere, Milz, Prostata, Thymus, Herz, Aorta und Plazenta identifiziert worden[10]. Beim Menschen kommt IRAP während der Schwangerschaft auch als lösliche Form im Serum vor[10,11]. Intrazellulär residiert das Enzym in einem endosomalen Vesikel und kann nach Einwirken zellspezifischer Stimuli an die Zelloberfläche rekrutiert werden. In insulinsensitivem Gewebe ist der Mechanismus dieser Rekrutierung bereits gut verstanden: IRAP kolokalisiert dort mit GluT4 in einem Endosom, das bei Insulinstimulus an die Zelloberfläche migriert[12]. Dieser Mechanismus wirkt über die PI3K-Akt-Signalkaskade. Es sind drei Akt-Proteine beschrieben, Akt1, Akt2 und Akt3, wovon Akt2 bei Insulinstimulus zur Membran rekrutiert wird, was erforderlich für die GluT4-Translokation ist[13]. Auch wurden das Protein AS160 und die GTPasen Rab10, Rab11 und Rab14 identifiziert, die an der Translokation des Vesikels beteiligt sind[14,15]. Das Protein AS160 geht ebenfalls eine Bindung mit IRAP ein[10]. In-vivo-Studien zeigten, dass der Insulinspiegel IRAP-defizienter Mäuse unauffällig ist. Eine IRAP-Defizienz geht jedoch in Adipozyten mit Defiziten in der basalen und insulinabhängigen Glukoseaufnahme und in Adipozyten und Muskelzellen mit einer erniedrigten GluT4-Expression einher[16]. GluT4-defiziente Mäuse

weisen außerdem eine Umverteilung von IRAP in Richtung der Zellmembran auf[17]. In-vitro-Daten bestätigten die Beziehung zwischen IRAP und GluT4 nur teilweise. An den Oberflächen von IRAP-defizienten Adipozyten wurde eine reduzierte GluT4-Expression nachgewiesen, an den Oberflächen von Glut4-defizienten Adipozyten jedoch keine reduzierte IRAP-Expression[17]. IRAP scheint somit die GluT4-Expression an der Zelloberfläche zu determinieren, während die IRAP-Expression GluT4-unabhängig ist[17]. Diese Ergebnisse sind von besonderem Interesse, da IRAP und GluT4 dadurch in Zusammenhang mit dem Diabetes Mellitus Typ II gestellt wurden. Diese Stoffwechselerkrankung beruht auf einer Insulinresistenz der Zellen und/oder einem Insulinmangel durch dysfunktionale Betazellen im Pankreas und resultiert in einem chronisch erhöhten Blutzuckerspiegel. In humanen Adipozyten dieser Patienten war die insulininduzierte Translokation der intrazellulären GluT4-Vesikel an die Zelloberfläche beeinträchtigt und somit auch die Glukoseaufnahme dieser Zellen[18]. Gleichermaßen war die insulininduzierte Translokation von IRAP in den Adipozyten der Diabetes-Typ-II-Patienten beeinträchtigt, auch wenn IRAP in diesen Zellen in höherer Konzentration an der Zellmembran vorgefunden wurde als in den gesunden Kontrollen[18]. So entstanden IRAP-involvierende Erklärungsmodelle für die Pathophysiologie des Diabetes Mellitus Typ II: Da die IRAP-Translokation an die Zellmembran bei der Krankheit nicht regelrecht abläuft, kann die Aminopeptidase ihre Zielhormone dort nicht ausreichend spalten[19]. Diese haben somit eine längere Wirkdauer im Organismus und könnten so für Komplikationen bei Typ-II-Diabetes verantwortlich sein[19]. Des Weiteren weisen IRAP-defiziente Mäuse eine verminderte GluT4-Expression in Herzmuskelzellen sowie eine kardiale Hypertrophie auf, die sich auch bei Typ-II-Diabetikern wiederfindet[19]. Da IRAP von zahlreichen Zelltypen exprimiert wird, GluT4 jedoch nur von wenigen, müssen andere zellspezifische Stimuli existieren, die eine Translokation des IRAP-Vesikel an die Zellmembran hervorrufen können. Folgende Stimuli konnten in verschiedenen Zelltypen bereits identifiziert werden: Endothelin-1 in Adipozyten (GluT4-Vesikel), Forskolin in neuroendokrinen Tumorzellen, Vasopressin in tubulären Epithelzellen der Niere, Oxytocin in humanem vaskulären Epithelgewebe, IgE in Mastzellen, LPS und IFN—γ in Makrophagen[20-24]. Das Gastlabor befasste sich mit der

Rolle von IRAP für den Prozess der Kreuzpräsentation in dendritischen Zellen[25], wobei der Fokus auch darauf lag, die Regulation von IRAP in diesen Zellen zu verstehen. Es konnte gezeigt werden, dass die Aminopeptidase in DC zu mehr als 50 % in einem Rab14-, Syntaxin-6- und Typ-1-Mannose-Rezeptor-positivem intrazellulären Kompartiment lokalisiert ist sowie zu 20-30 % mit dem Early Endosome Antigen 1 (EEA1) und MHC-I kolokalisiert und in frühe Phagosomen rekrutiert wird[1,10]. Warum IRAP sich mit diesen Proteinen in einem Vesikel befindet, ob noch weitere DC-spezifische Proteine in diesem Vesikel mittransportiert werden und ob und wenn ja durch welche Stimuli eine Translokation an die Zelloberfläche der DC stattfindet, ist bislang noch unklar.

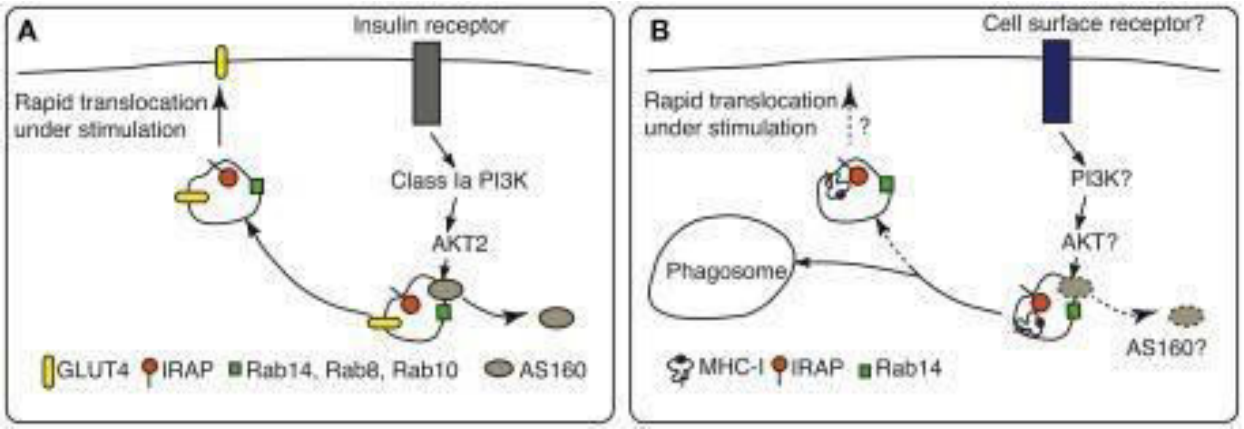

Abbildung 2: Modelle zur Regulierung der IRAP-Vesikel. (A) beschreibt die Situation in insulinsensitivem Gewebe: Ein Insulinstimulus bewirkt die Aktivierung von Akt2 über die PI3-Kinase und somit eine Mobilisierung des IRAP-Vesikels an die Zelloberfläche, wo IRAP exprimiert wird. GluT4, Rab14, Rab8, Rab10 und AS160 kolokalisieren mit IRAP im oder am Endosom. (B) zeigt das unvollständige Modell zur Regulierung des IRAP-Vesikels in einer dendritischen Zelle. Der zellspezifische Stimulus und Rezeptor ist unbekannt, ebenso wie die Signalkaskade, über welche die Aktivierung des Endosoms weitergeleitet wird. Fest steht, dass IRAP mit Rab14, MHC-I und AS160 kolokalisiert. (Entnommen aus Saveanu, Front Immunol 2012)[10]

1.1.3 IRAP: Immunologische Funktion

Im immunologischen Kontext ist IRAP für seine Rolle bei der Antigenprozessierung für die Kreuzpräsentation dendritischer Zellen bekannt. Dendritische Zellen können als einzige antigenpräsentierenden Zellen neben der Antigenerkennung und –aufnahme auch naive T-Zellen aktivieren[26]. Alle kernhaltigen Körperzellen sind in der Lage, Peptide von endogenen Proteinen auf MHC-Klasse-I-Molekülen zu laden und $CD\text{-}8^{+}$-T-

Lymphozyten (T-Zellen) zu präsentieren. Professionell antigenpräsentierende Zellen wie DC können zusätzlich Epitope exogener Proteine auf MHC-Klasse-II-Moleküle laden und CD4-T-Zellen präsentieren. DC haben darüber hinaus die Eigenschaft, T-Zellen auch extrazellulär aufgenommene Peptide auf MHC-I zu präsentieren: Dieser Vorgang wird Kreuzpräsentation genannt[27].

Für die Generierung der Antigen-Epitope, die auf MHC-I-Moleküle geladen werden, gibt es zwei verschiedene Wege:

Beim proteasomabhängigen Weg werden Proteine zunächst in einem Phagosom ins Zytosol befördert und dort durch das Proteasom, einer multikatalytischen Endopeptidase gespalten[28]. Dann werden sie durch den Membrantransporter TAP (transporter associated with antigen processing) ATP-abhängig ins endoplasmatische Retikulum befördert[29]. Die im endoplasmatischen Retikulum angekommenen antigenen Peptide, die häufig N-terminal verlängert sind, müssen aminoterminal getrimmt werden, um ausreichend affin und mit der entsprechenden Länge an MHC-I-Proteine zu binden. Diese Aufgabe übernehmen einerseits die im endoplasmatischen Retikulum residierenden Enzyme ERAP1 und ERAP2 (ER aminopeptidase associated with antigen processing, im murinen Organismus existiert nur ERAAP1)[30,31] und zum anderen die im Phagosom lokalisierte IRAP[1]. Die MHC-I-Beladung kann somit entweder im endoplasmatischen Retikulum oder im Phagosom stattfinden. ERAP1 präferiert als Substrat 9-16 Aminosäuren lange Peptidsequenzen, diese werden effizient auf die korrekte Epitoplänge (8-10 Aminosäuren) für die MHC-I-Präsentation gebracht oder zerstört, indem zu kurze Epitope erstellt werden[32]. Die Sequenzhomologie von IRAP und ERAP sowie seine Kolokalisation mit MHC-Klasse-I-Molekülen in Endosomen dendritischer Zellen waren entscheidende Hinweise für die wichtige Rolle von IRAP als weitere Trimming-Peptidase für die Kreuzpräsentation. Saveanu et al. konnten 2009 zeigen, dass eine IRAP-Defizienz in der Tat die Kreuzpräsentation beeinträchtigt[1]. IRAP ähnelt ERAP1 in seiner Trimming-Fähigkeit, die beiden Aminopeptidasen unterscheiden sich durch die spezifischen Substrate, die sie auf korrekte Epitoplänge für MHC-I oder auf noch kürzere Sequenzen bringen[33]. Für die direkte (endogene) MHC-I-Präsentation der DC ist IRAP nicht erforderlich[1].

Der sogenannte vakuoläre Weg der Kreuzpräsentation läuft unabhängig von TAP ab. Die Proteine verbleiben im Phagosom/Endosom und werden dort durch Proteasen degradiert[34] (s. Abbildung 3).

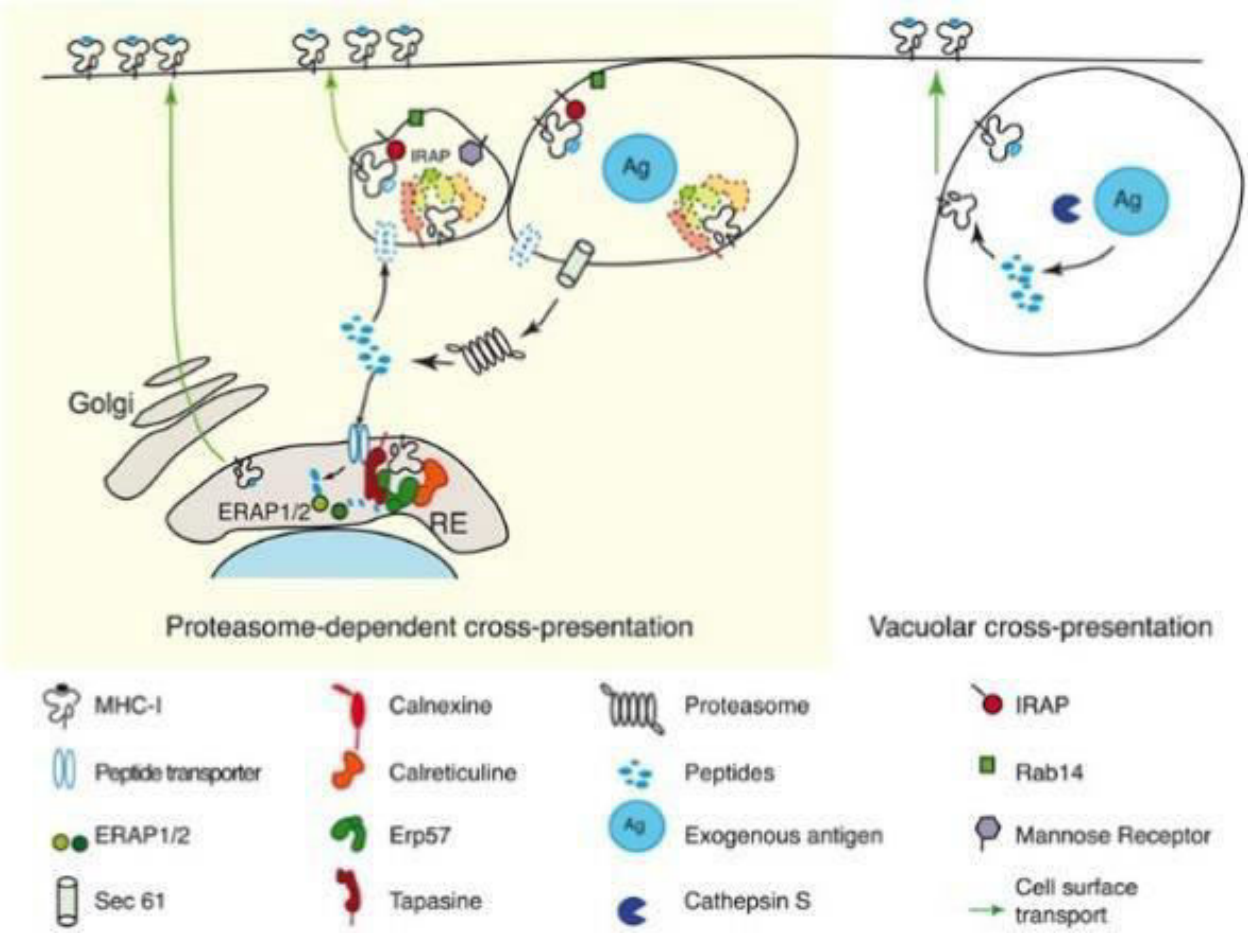

Abbildung 3: Proteasomabhängiger und vakuolärer Weg der Kreuzpräsentation. Proteasomabhängiger Weg auf der linken Seite der Abbildung: Die Trimming-Peptidasen ERAP1 und ERAP2 sind im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, IRAP befindet sich in einem Endosom oder dem frühen Phagosom (Entnommen aus Saveanu et al., Science 2009)[1]

1.1.4 IRAP: Enzymatische Funktion und klinische Bedeutung

IRAP trimmt Peptidhormone und hat somit auch abseits der Immunologie verschiedende wichtige Rollen. Die in der Schwangerschaft und Geburtsmedizin wichtigen Hormone Oxytocin und Vasopression gehören auch zu IRAP-Substraten[35,36]. Oxytocin wird vom humanen Feten produziert und besitzt eine uterotone Eigenschaft. Während IRAP in anderen Geweben als Transmembranprotein oder in intrazellulären Kompartimenten

bekannt ist, findet sich in der Schwangerschaft im Serum eine lösliche Form der Aminopeptidase, die von den Zellen der Plazenta gebildet wird und aus dem extramembranären Teil von IRAP besteht[11,37]. So wurde IRAP im Zusammengang mit gynäkologischen Erkrankungen gestellt: Das Enzym wurde beispielsweise im Serum von Präeklampsie-Patientinnen in erniedrigter Konzentration detektiert[8]. Darüber hinaus konnte eine erhöhte IRAP-Aktivität bei Patientinnen mit malignen Ovarial- und Zervixkarzinomen sowie im Tiermodell für Mammakarzinom festgestellt werden[38], sodass das Enzym teilweise als Tumormarker genutzt werden kann[39]. Es besteht der Verdacht, dass die IRAP-vermittelte Oxytocinaktivierung eine Auswirkung auf die Proliferation karzinoider Zellen haben könnte[40]. IRAP wird auch von Endometrium-Karzinomzellen exprimiert und seine Expression korreliert mit höherer Malignität und eingeschränkter Chemosensitivität[41].

ADH (antidiuretisches Hormon, auch Vasopressin) ist das einzige spezifische Substrat von IRAP und es konnte gezeigt werden, dass IRAP-defiziente Mäuse unphysiologische ADH-Plasmaspiegel aufweisen[42]. ADH bewirkt durch Aquaporineinbau in distalen Nierentubuli und im Sammelrohr eine Wasserrückresorption und ist somit essenziell für die Osmoregulation des Organismus. Zudem hat es eine vasokonstriktorische Wirkung, die man unter anderem auch medikamentös für Patienten im Schockzustand nutzen kann. Eine Studie zeigte eine erhöhte Mortalität bei Patienten mit septischem Schock bei Genvariationen in regulatorischer Region des IRAP-Gens[43]. Darüber hinaus ist IRAP ein Rezeptor für Angiotensin-4, welches mit hoher Affinität an IRAP bindet und die katalytische Aktivität der Aminopeptidase inhibiert[44,45]. Diesem Mechanismus wird der positive Effekt von Angiotensin-4 auf Lernvermögen und Konzentration zugeschrieben, weshalb beispielsweise auch an IRAP-Inhibitoren als neue Antidementiva geforscht wurde[46,47].

1.2 Verbindung zwischen IRAP und der mTOR-Signalkaskade

Die Regulierung von IRAP in insulinsensitivem Gewebe wurde bereits intensiv untersucht. IRAP kolokalisiert dort, wie oben beschrieben, mit GluT4 in einem endosomalen Kompartment und kann auf Insulinstimulus an die Zelloberfläche reguliert

werden[12]. In dendritischen Zellen ist der zellspezifische Stimulus, der IRAPs Vesikel dirigieren kann, noch unbekannt. In beiden Zelltypen befindet sich AS160 in IRAPs Endosom, ein direktes Substrat von Akt[1]. Insulin wirkt über eine Aktivierung der PI3-Kinase und Akt2. AS160 wird von Akt2 phosphoryliert, löst sich von seinem Vesikel und aktiviert Rab8, Rab10 und Rab14 und somit wird die Translokation des Vesikels hervorgerufen. Aber wie verhält sich IRAP zu anderen Signalkaskaden der Zelle? Akt ist als zentrales Element in eine der wichtigsten Signalkaskaden eukaryoter Zellen eingebunden, der mTOR-Signalkaskade, die für die Kontrolle des Energiemetabolismus verantwortlch ist. Es stellt sich daher die Frage, ob die mTOR-Signalkaskade auch an der Regulation des IRAP-Kompartiment involviert ist und Akt eine Verbindung darstellt. Der Signalweg von mTOR reguliert in allen eukaryoten Zellen wesentliche Prozesse, die Energie benötigen oder generieren, d.h. den zellulären Nährstoffhaushalt, Wachstum und Proliferation und die im Hungerzustand nötige Energiegewinnung mittels Autophagie.

Bezüglich genau dieser von mTOR regulierten Prozesse wurden im Gastlabor interessante Beobachtungen gesammelt: IRAP-defiziente Zellen schienen einen herabgesetzten Wachstumsimpuls haben, sie proliferierten langsamer als Widtyp-Zellen, jedoch wurden hierzu noch keine Daten erhoben. Zudem fand das Gastlabor heraus, dass IRAP-defiziente BMDC vermehrt autophagozytotisch aktiv sind, ein Prozess, der von der mTOR-Signalkaskade reguliert wird.

Die Regulation IRAP-positiver Vesikel in dendritischen Zellen ist von besonderem Interesse, da sie noch kaum verstanden ist, IRAP jedoch in diesem Zelltyp eine wichtige Aufgabe als Trimming-Peptidase für die Kreuzpräsentation hat.

Bekannt ist, dass die Aminopeptidase in dendritischen Zellen in einem Endosom mit Rab14 kolokalisiert, das zumindest in insulinsensitiven Zellen von AS160 aktiviert wird. Sind Akt und AS160 also auch in dendritischen Zellen in einen regulatorischen Mechanismus im Bezug auf IRAP-Vesikel involviert? Gibt es einen Zusammenhang zwischen der mTOR-Signalkaskade und der Regulation von IRAP in verschiedenen Zelltypen und könnte somit die vermehrte autophagozytotische Aktivität und die langsamere Proliferation von IPAP-defizienten Zellen erklärt werden?

Es sollte im Folgenden untersucht werden, ob es eine Verbindung zwischen IRAP und der mTOR-Signakaskade gibt und wenn ja, welcher Art diese ist und ob sich dadurch Hinweise für die Regulation von IRAPs Kompartiment in dendritischen Zellen ergeben.

1.3 Die mTOR-Signalkaskade

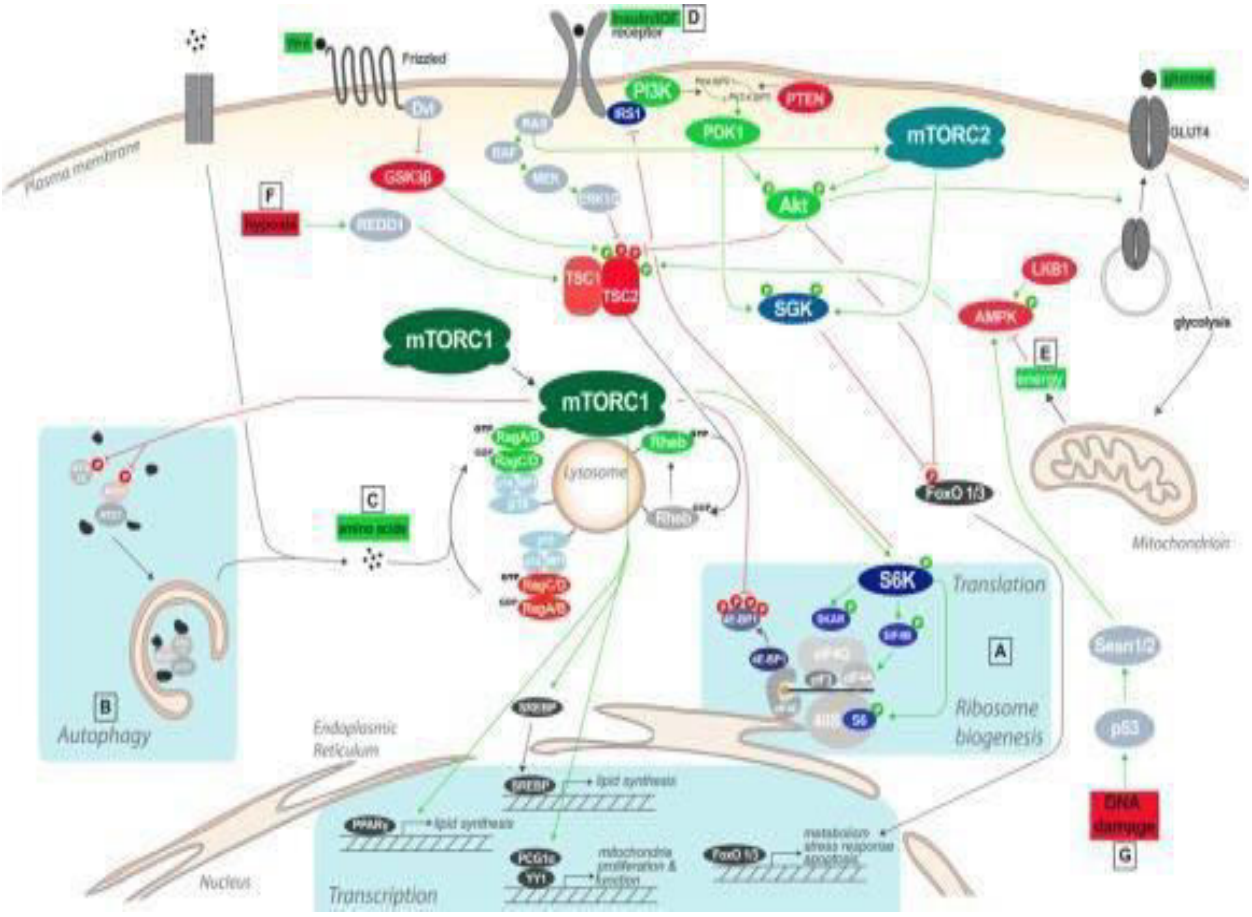

Abbildung 4: Die mTOR-Signalkaskade, ihre zwei Komplexe mTORC1 und mTORC2 mit den jeweiligen wichtigen Up- und Downstreamkaskaden (übernommen aus Zoncu, Nat Rev Mol Cell Biol 2011)[48]

Das mechanistic target of rapamycin mTOR (früher stand die Abkürzung für mammalian target of rapamycin bei Säugern) ist eine phylogenetisch hochkonservierte Serin/Threonin-Kinase, die eingebunden in einem Netzwerk verschiedener Signalkaskaden essenzielle zelluläre Prozesse wie Wachstum, Altern und Stoffwechsel in Eukaryoten reguliert (s. Abbildung 4*[48]*). Die TOR-Kinase wurde erstmals in Hefen als Angriffsort der Substanz Rapamycin identifiziert[49-51].

1.3.1 Molekulare Zusammensetzung von mTOR

mTOR ist ein 289kDa großes Protein und besteht aus 2549 Aminosäuren. Sein carboxyterminales Ende ist der katalytischen Domäne der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) homolog, weshalb es zur Familie der PIKK (Phosphoinositid-Kinase assoziierte Kinasenfamilie) gehört[52,53].

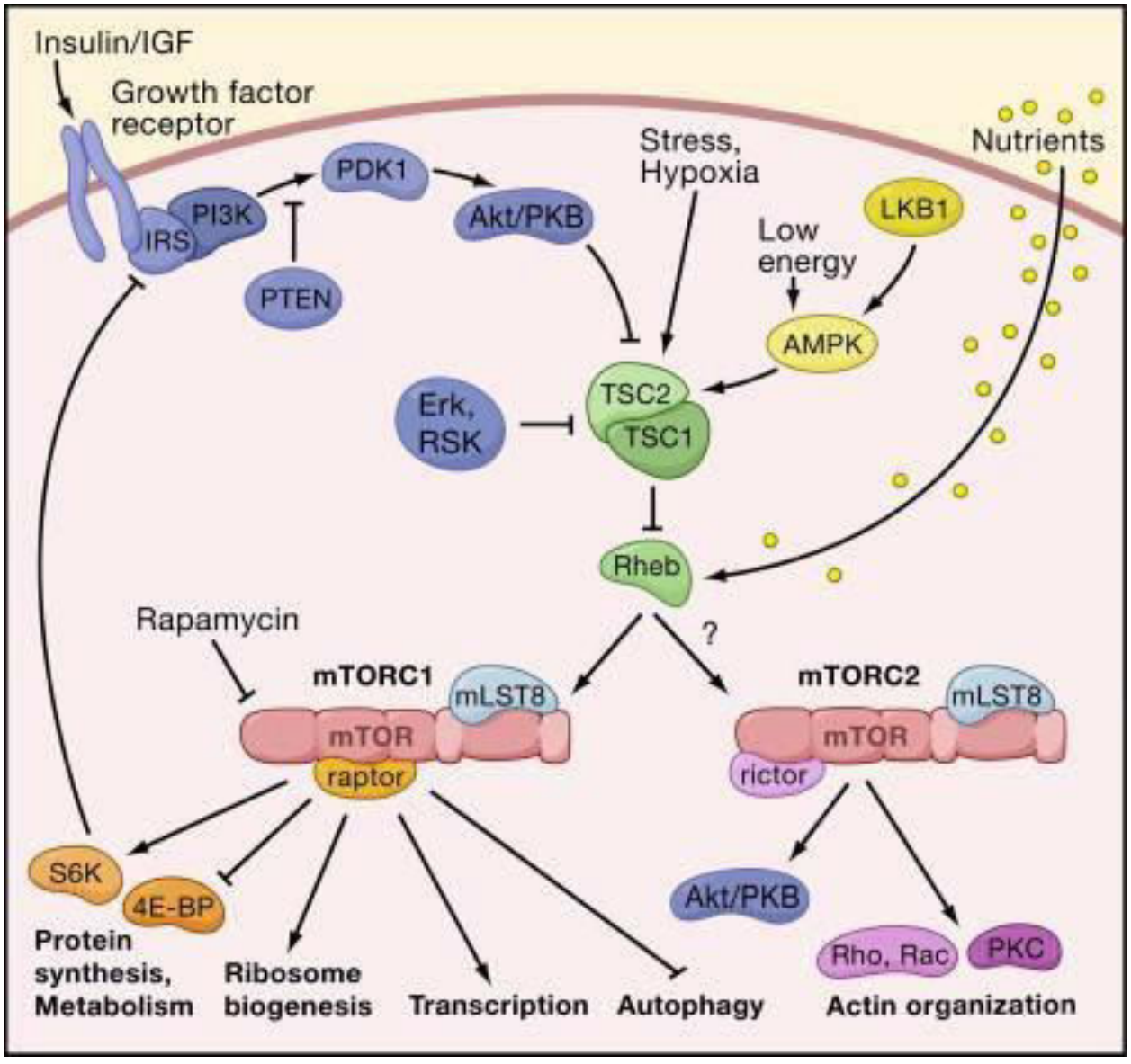

Abbildung 5: Die mTOR-Signalkaskade, Substrate und Funktionen von mTORC1 und mTORC2 (entnommen aus Wullschleger, Cell 2006)[54]

mTOR bildet die katalytische Untereinheit zweier Komplexe: dem TOR-Komplex-1 (mTORC1) und dem TOR-Komplex-2 (mTORC2) [51]. Diese unterscheiden sich durch ihre assoziierten regulatorischen Proteine, unter anderem Raptor (mTORC1) und Rictor (mTORC2), die als Andockstelle für Substrate und Regulatoren dienen. Z. B. formt Rapamycin einen Komplex mit FKBP12, der dann an das raptorassoziierte mTOR bindet[50]. Neue Ergebnisse zeigen, dass eine Langzeitbehandlung mit Rapamycin in bestimmten Zelllinien auch mTORC2 inhibiert[55]. Dies kann dadurch erklärt werden, dass Rapamycin-FKPB12 zwar nicht an den formierten mTORC2 binden kann, jedoch an ungebundenes mTOR und dieses dann von einer Bindung an Rictor abgehalten wird[55].

1.3.2 mTOR: Substrate und Funktionen

Wichtige Substrate des rapamycinsensiblen mTORC1 sind die S6-Kinase-1, ein Enzym, welches das ribosomale Protein S6 aktiviert, und eIF4E binding protein-1 (4EBP-1)[54]. Das Protein mTORC1 phosphoryliert sowohl S6K1 als auch 4EBP-1, was zu einer Aktivierung von S6K1 und einer Inhibition von 4-EBP-1 führt[48]. Diese Proteine und ihre Signalkaskaden kontrollieren die Proteinsynthese über Regulation von Translation, die Ribosomenbiogenese und die Autophagie[54]. Bei der Autophagie werden zelleigene Proteine in Autophagosomen abgebaut und so Nährstoffe zur Verfügung gestellt, ein wichtiger Mechanismus für den Energiehaushalt einer Zelle bei Stress. Dieser Prozess wird von mTORC1 unterdrückt und bei einer Inhibition von mTORC1 gefördert[56].

mTORC1 beeinflusst als zentrale Kontrollstation viele andere Signalkaskaden (s. Abbildung 4); unter anderem wird es über den ERK-Signalweg aktiviert: Phosphoryliertes ERK inhibiert TSC2, was zu einer Stimulierung von mTORC1 führt[57]. Auch wird mTORC1 über den PIK3-Kinase-Signalweg aktiviert, indem PIK3 über PDK1 und Akt/PKB TSC2 inhibiert[54]. Hierbei handelt es sich um einen Kreislauf, da die PIK3-Kaskade rückwirkend von S6K gehemmt wird[54]. Auch die AMP-Kinase ist in dem Netzwerk integriert und kann mTORC1 über Stimulierung von TSC2, das wiederum Rheb hemmt, inhibieren[54].

Über mTORC2 ist weitaus weniger bekannt als über mTORC1. Unumstritten ist, dass

mTOR2 für die Aktin-Zytoskelettorganisation verantwortlich ist[48]. MTORC2 phosphoryliert außerdem Akt an S473[54]. Dieses ist somit bereit für eine zweite Phosphorylierung an T308 durch die PDK1, wodurch es gänzlich aktiviert wird[58]. Aktiviertes Akt verhindert über Phosphorylierung von FOXO1 und FOXO3 deren Translokation in den Zellkern und die Aktivierung von Genexpressionsprogrammen, welche die Apoptose fördern. mTORC2 hat also vermutlich auch eine Funktion auf das Zellüberleben[48]. Akt hat außerdem eine komplexe Rückkopplungswirkung auf mTORC1, denn es phosphoryliert auch TSC2, welches im TSC1/TSC2-Komplex eigentlich als GAP für die GTP-ase Rheb dient[54]. Der Komplex aus TSC1 und von Akt phosphoryliertem TSC2 kann diese Funktion nicht mehr erfüllen und so sammelt sich GTP-Rheb an, welches wiederum mTORC1 aktiviert [59].

1.3.3 Regulierung des mTOR-Pathways

Da der mTOR-Signalweg ein essenzieller Regulator aller großen energieverbrauchenden und -generierenden zellulären Prozesse ist, ist es biologisch sinnvoll, dass er durch eine Vielzahl an Signalen gesteuert werden kann.

MTORC1 wird durch Aminosäuren aktiviert, bereits in frühen Studien wurde gezeigt, dass ihre Präsenz absolut erforderlich für die Aktivität von mTORC1 ist[60]. Ein Mangel resultiert in einer schnellen Dephosphorylierung von S6K und 4E-BP1[60]. Sobald die Aminosäuren wieder zur Verfügung gestellt werden, wird dieser Effekt aufgehoben[61].

Von allen Aminosäuren scheint Leucin besonders wichtig für die Aktivierung von mTORC1 zu sein[62]. Die Leucinaufnahme einer Zelle hängt wesentlich vom Glycoprotein CD89 oder LAT1 ab: Hierbei handelt es sich um einen heterodimeren Aminosäurenaustauscher bestehend aus den Proteinen SLC3A2 und SLC7A5, der Leucin im Austausch mit Glutamin in die Zelle importiert[63]. Nicklin et al. konnten zeigen, dass dieser Aminosäurenaustauscher unentbehrlich für Zellwachstum und die Funktionalität von mTORC1 ist[63].

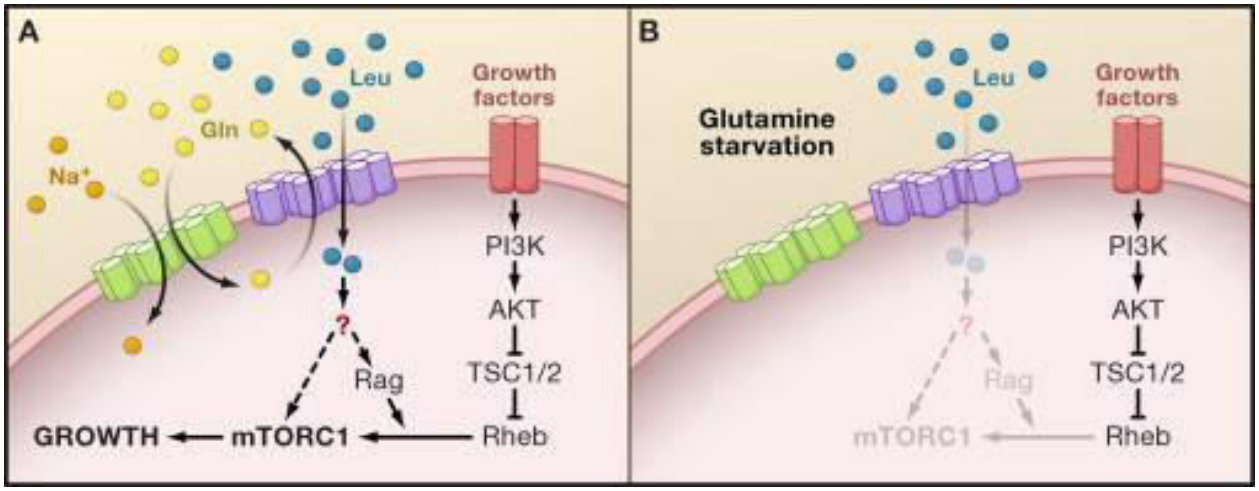

Abbildung 6: Glutaminabhängige Leucin-Aufnahme: (A) Glutamin wird via SLC1A5 (in grün) Na+-abhängig in die Zelle geschleust und via SLC7A5-SLC3A2 (in violett) gegen Leucin ausgetauscht. Der genaue Mechanismus, mit dem Leucin mTORC1 aktiviert, ist noch nicht gänzlich geklärt. (B) bildet die Situation ab, wenn Glutamin nicht zur Verfügung steht: Leucin kann dann nicht in die Zelle aufgenommen werden und somit auch nicht mTORC1 aktivieren. (Übernommen aus Cohen, Cell 2009) [64]

Darüber hinaus ist eine mTORC1-Aktivierung über Wachstumsfaktoren wie IGF (Insulin-like-growth-factor), Hormone (beispielsweise Insulin) und die AMP-aktivierte Proteinkinase AMPK möglich[54]. Über die Regulierung von mTORC2 ist bislang weniger bekannt, da der Akt-Signalweg allerdings im engen Zusammenhang mit mTORC2 steht, spielen wohl auch hier Aminosäuren und Wachstumsfaktoren sowie Insulin eine Rolle [58].

1.3.4 mTOR und Klinik

Die Funktionalität von mTOR und seinem Signalweg hat fundamentalen Einfluss auf den Gesundheitszustand eines Organismus. Obwohl in dieser Hinsicht noch weiterer Forschungsbedarf besteht, ist sicher, dass schwerwiegende Pathologien in verschiedenen Bereichen der Medizin auf Fehlfunktionen von mTOR zurückzuführen sind. In der Tumorpathogenese spielt mTOR eine wichtige Rolle: Eine mTORC-1-Hyperaktivität scheint karzinogene Wirkung zu haben[65]. So wirken verschiedene Tumorsuppressorgene über mTOR-Inhibierung[65]. Eine Dysregulierung dieser Gene führt zu schwerwiegenden Erkrankungen wie der Tuberösen Sklerose und dem Peutz-Jeghers-Syndrom[65]. Des Weiteren wird die mTOR-Inhibition als Immunsuppressivum in der Chemotherapie vieler Karzinome genutzt[66].

Auch Stoffwechselerkrankungen wie Adipositas und Diabetes werden vermehrt mit mTOR in Zusammenhang gebracht: Aktueller Kenntnisstand ist, dass mTOR im Prinzip auf alle in der Krankheitsentstehung involvierten Gewebe Einfluss nimmt, vom hypothalamischem Gewebe (neuronale Hormonproduktion, Leptin, Neuropeptid Y) über die Adipogenese zum muskulären, pankreatischen und hepatischen Gewebe[67,68].

Schlussendlich gibt es Anhaltspunkte, dass mTOR auch im physiologisch hochkomplexen Prozess des Alterns eine Rolle spielt: Untersuchungen zeigen, dass eine verminderte mTOR-Aktivität eine längere Lebensdauer zur Folge hat[69].

1.4 Ausblick für die Arbeit

In dieser Arbeit soll die Beziehung zwischen IRAP und der mTOR-Signalkaskade sowie die eventuellen Auswirkungen dieser Beziehung auf die Zellbiologie und Antigenpräsentation der DC untersucht werden.

Hierfür werden einerseits Daten über die Aktivität von mTOR im IRAP-Knockout-Zellmodell erhoben und andererseits spezielle Down- und Upstream-Proteine von mTOR analysiert.

Folgende Arbeitshypothesen wurden aufgestellt:

- **H1**: IRAP hat eine Bedeutung für den mTOR-Signalweg und eine IRAP-Defizienz geht mit einer verminderten mTOR-Aktivität einher.
- **H2**: IRAP steht in einer regulatorischen Beziehung mit LAT1, einem wichtigen Upstream-Protein von mTORC1.
- **H3**: IRAP geht auch in dendritischen Zellen eine regulatorische Wechselwirkung mit einem Glucosetransporter ein.

2 Methodik

2.1 Material

2.1.1 Technische Laborausstattung

Apparatur Gelanfertigung Western Blot	BioRad (Hercules, USA)
Elektrophorese Tank	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Dissektionsbesteck	Dominique Dutscher (Brumath, Frankreich)
Durchflusszytometer	FACSCalibur, Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Wasserbad	Labnet (Edison, USA)
Inkubator	Sanyo (MCO - 19AIC) (Moriguchi, Japan)
Kühlschrank	Thomson (Issy-les-Moulineaux, Frankreich)
Mikroskop	Olympus (CK2) (Shinjuku, Japan)
Neubauer Zählkammer	Dominique Dutscher (Brumath, Frankreich)
Odyssey Western Blot Scanner	Li-Cor Biotechnology (Lincoln, USA)
Pipettierhilfe	Integra Biosciences (Hudson, USA)
PCR Maschine	Life Technologies (Carlsbad, USA)

Schwämme Western Blotting	BioRad (Hercules, USA)
Sterilbank	Techgene Machinery (BSC-ZN 2-4) (Taichung, China)
Schüttelapparat	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Thermocycler	Biometra (Göttingen, Deutschland)
UV-Spektrometer	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Vortex	BioRad (Hercules, USA)
Zentrifuge	Eppendorf (5810R) (Hamburg, Deutschland)

Tabelle 1: Technische Laborausstattung

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Handschuhe EcoShield	Shield Scientific (Bennekom, Niederlande)
FACS tubes	Becton Dickinson Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Falcontubes 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Einmalspritzen 10 ml	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Membran Western Blotting	Life Technologies (Carlsbad, USA)
MicroAmp™ Optical Adhesive Film Kit	Life Technologies (Carlsbad, USA)
MicroAmp Optical 96-Well qPCR Reaktionsplatte	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Nadeln, 25g	Terumo (Tokio, Japan)

Nylonsieb 100µm	Corning (Corning, USA)
Petrischalen 100mm, 150mm	Nunc, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Pipetboy Acu 2	Dominique Dutscher (Brumath, Frankreich)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl	Dominique Dutscher (Brumath, Frankreich)
PVDF membrane	Amersham, GE Healthcare (Chalfont St. Giles, Großbritannien)
1,5ml-Reaktionsgefäße	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
6-Well-Platte	Nunc, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zellkulturflaschen T75	Nunc, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zellkulturschaber	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Medien

ACK Erythrozytenlyse	BioLegend (San Diego, USA)
Betamerkaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bradford-Reagenz	BioRad (Hercules, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO) ($(CH3)_2$ OS, MW = 78.13)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Dulbecco´s MEM (DMEM)	Invitrogen, Life Technologies (Carlsbad, USA)
Ethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Fetales Kalbserum (FCS)	Gibco, Life Technologies (Carlsbad, USA)
L-Glutamin	Invitrogen, Life Technologies (Carlsbad, USA)
GMCSF rekombinant, Maus	R&D Systems (Minneapolis, USA)
IMDM	Invitrogen, Life Technologies (Carlsbad, USA)
J558, GMCSF transfected	Großzügig zur Verfügung gestellt vom Institut Curie, Paris,
MCSF (Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) rekombinant, Maus	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Nicht essenzielle Aminosäuren (NEA)	Invitrogen, Life Technologies (Carlsbad, USA)
N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Odyssey Blocking Buffer	Li-Cor Biotechnology (Lincoln, USA)
Odyssey Molecular Weight Marker	Li-Cor Biotechnology (Lincoln, USA)
Odyssey Protein Marker	Li-Cor Biotechnology (Lincoln, USA)
Penicillin/ Streptomycin	Gibco, Life Technologies (Carlsbad, USA)
Phosphate buffered saline	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Phosphatase Inhibitor	Roche (Basel, Schweiz)

Precimat Proteingemisch	Roche (Basel, Schweiz)
Protease Inhibitor Cocktail tablet	Roche (Basel, Schweiz)
Rapamycin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
RPMI Medium	Invitrogen, Life Technologies (Carlsbad, USA)
Trypanblau, 0.4 %	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypsin/EDTA	Gibco, Life Technologies (Carlsbad, USA)
Tween 20	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien, Medien

2.1.4 Puffer und Lösungen

Lysepuffer	150mM NaCl, 50mM Tris(pH=7), 1 % Triton X100, 1X Protease Inhibitor, 1X Phosphatase Inhibitor, beides Roche)
PBS	Invitrogen, Life Technologies
Laufpuffer	25 mM Tris 190 mM Glycin 0,1 % SDS (pH 8.3)
TBS	5 % BSA (Sigma), 0.02 % Triton X-100
Transfer Puffer	20 % Methanol, 20 % 5X Transfer Lösung (enthält Tris, Glycine), 0,1 % SDS

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

2.1.5 Medien

2.1.5.1 Murine embryonale Fibroblasten (MEF)

Für die MEF-Kulturen wurden 500 ml DMEM ergänzt mit:

- 50 ml FCS (Endkonzentration 10 %)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration 100U/ml Penicillin; 10µg/ml Streptomycin)
- 5 ml L-Glutamin (Endkonzentration 2mmol/l)

2.1.5.2 Bone Marrow Derived Dendritic Cells (BMDC)

Für die BMDC-Kulturen wurden 500 ml IMDM ergänzt mit:

- 50 ml FCS (Endkonzentration 10 %)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration 100U/ml Penicillin; 10µg/ml Streptomycin)
- 5 ml L-Glutamin (Endkonzentration 2mmol/l)
- 0,5 ml Betamerkaptoethanol
- 16 ml J558 Überstand

2.1.5.3 Makrophagenkultur

Für die Makrophagenkulturen wurden 500 ml RPMI ergänzt mit:

- 50 ml FCS (Endkonzentration 10 %)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration 100U/ml Penicillin; 10µg/ml Streptomycin)
- 5 ml L-Glutamin (Endkonzentration 2mmol/l)
- 0,5 ml Betamerkaptoethanol (Endkonzentration 0,1 %)
- 2,5 µg rekombinantes M-CSF

2.1.6 Antikörper

Zielantigen	Verdünnung	Hersteller
Akt #9272	1:1000	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)
Phospho-Akt (Ser473) (736E11) #3787	1:1000	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)
S6K1 #5364	1:1000	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)
Phospho-S6K1 (Thr 389) #9205	1:1000	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)
Phospho-4EPB (Thr 37/46) (236B4) mAb #2855	1:1000	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)
Actin	1:5000	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Mouse	1:6000	Odyssey, Rockland Immunochemicals (Limerick, USA)
Rabbit	1:3000	Odyssey, Rockland Immunochemicals (Limerick, USA)

Tabelle 5: Antikörper

2.1.7 Kits

- GE Healthcare illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit
- Promega ImProm-II™ Reverse Transcription System

2.1.8 Versuchstiere

Für alle Experimente, die dieser Arbeit zugrundeliegen, wurden zwischen 8 und 16 Wochen alte Tiere der Inzucht-Mausstämme IRAP-Knockout und Wildtyp der Firma Janvier mit genetischem Background SV129xB6 in Frankreich verwendet, die den

Regeln der Université Paris Descartes entsprechend in den tierexperimentellen Einrichtungen des Labors gehalten wurden.

2.1.9 Computerprogramme

- PCR-Programm
- Prism 4, Graphpad Software Inc., San Diego CA USA

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeit mit Zellkulturen

2.2.1.1 Primärzellkulturen

2.2.1.1.1 Präparation muriner dendritischer Zellen aus dem Knochenmark

Die Kultivierung der aus dem Knochenmark stammenden dendritischen Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Weimerhaus & van Endert[70]: Wildtyp und IRAP-Knockout-Mäuse gleichen Alters und Geschlechts wurden euthanasiert und das Fell der Beine mit 70 % Ethanol desinfiziert. Mittels einer Dissektionsschere wurde ein Längsschnitt im Bereich der Innenseite der Beine ausgeübt und Fell und Haut von Muskel abgelöst. Die Beine wurden im Bereich des Hüftgelenks dislociert und die Füße entfernt. Femures und Tibiae wurden voneinander und vom Muskel getrennt und in 100mm Petrischalen mit sterilem PBS gelegt. Die nächsten Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt: Die Knochen wurden für 15 Sekunden in 70%iges Ethanol gelegt und somit desinfiziert. Dann wurden sie mit einer Schere an den Epiphysenenden eröffnet und mithilfe einer 25g-Nadel, die an einer PBS-gefüllten 10ml-Spritze befestigt war, ausgespült, bis sie vollständig von rotgefärbtem Knochenmark befreit waren. Das knochenmarkhaltige PBS wurde in einem sterilen 50ml-Falcon-Gefäß aufgenommen und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen anschließend in komplettem IMDM in einer Konzentration von $5x10^5$Zellen/ml in 150mm-Petrischalen ausgesät und inkubiert. Nach 3-4 Tagen Kulturzeit bei 37 °C und 5 % CO_2 im Inkubator wurden

die Zellen neu verpflanzt. Da es sich bei BMDC um semi-adhärente Zellen handelt, erfolgte das Ablösen in zwei Schritten: Zuerst wurde das Medium, das die schwimmenden Zellen enthielt, von den Petrischalen abgenommen und in 50ml-Falcons übertragen. Anschließend wurden je 10 ml kaltes PBS auf die Schalen aufgetragen und diese zehn Minuten bei 4 °C gekühlt, um die adhärenten Zellen zu aktivieren. Durch Hin- und Herpipettieren des PBS wurden diese abgelöst und mit in die Falcons übertragen. Die Gesamtflüssigkeit wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen wieder in gleicher Konzentration in frischem Medium auf 150 mm Petrischalen ausgesät und für zwei weitere Tage inkubiert. Am Tag 6 stand die Kultur zu Standardbedingungen zur Verfügung.

2.2.1.1.2 Makrophagenkultur

Die Makrophagenkultur wurde anhand einer Milzzellsuspension nach einem Protokoll von Alatery et al. hergestellt[71]. Die Wildtyp- und IRAP-Knockout-Mäuse wurden euthanasiert und das Fell mit 70%igem Ethanol abgespült. Unter Einsatz eines Skalpells wurde das Fell links seitlich der Wirbelsäule inzidiert, das Peritoneum geöffnet und die rotgefärbte, gut abgrenzbare Milz frei von Fettgewebe entnommen und in ein mit PBS gefülltes Well einer 6-Well-Platte gelegt. Unter sterilen Bedingungen wurde die Milz mit dem Ende einer 10ml-Spritze durch ein 100 µm Nylonsieb in PBS gedrückt und somit eine Zellösung hergestellt, die daraufhin zentrifugiert wurde. Anschließend wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt (s. u.) und die Zellen in Medium ausgesät. Am Inkubationstag 3 wurde das Medium vollständig abgenommen, jedes Well mit 5 ml PBS gespült und mit 2 ml frischem Medium gefüllt. Somit wurden alle nicht adhärenten Zellen eliminiert. Am Tag 7 wurde dieser Schritt wiederholt.

2.2.1.2 Kultivierung von Zelllinien

2.2.1.2.1 Fibroblastenkultur

Die Wildtyp- und IRAP-Knockout-Fibroblastenlinien waren als immortalisierte Zelllinien im Labor vorhanden, lebend in Kultur bzw. in Flüssigstickstoff gefroren.

Die Zellen wurden zur Expansion in T25-Flaschen in Medium in einer Konzentration von 3,5.10^4/ml ausplattiert. Da durch kontinuierliche Proliferation der Fibroblasten der Boden der Zellkulturflaschen nach etwa 4 Tagen dicht bedeckt war, mussten die Zellen nach dieser Zeit auf neue Flaschen verteilt werden.

2.2.1.2.2 Inkubation der Zellen

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. BMDC wurden in einer Konzentration von 5 x10^5 Zellen/ml in komplettem IMDM (s. o.) auf 150mm-PetriSchalen ausgesät, Makrophagen in 6-Well-Platten in einer Konzentration von 3 x10^6 Zellen/ml in komplettem RPMI Medium und MEF in einer Konzentration von 3,5 x10^5 Zellen/ml in komplettem DMEM in T25-Flaschen.

2.2.1.2.3 Ernten der Zellen

Das Ernten der Zellen wurde je nach Zelltyp unterschiedlich durchgeführt: BMDC sind semiadhärente Zellen, das Ernten erfolgte wie folgt: Das Medium mit den schwimmenden Zellen wurde in Falcons übertragen. Die adhärenten Zellen auf den Platten wurden durch 10 ml kaltes PBS und 15 Minuten Inkubation bei 4°C aktiviert und durch mehrmaliges Hin- und Herpipettieren abgelöst. Die PBS-Zelllösungen wurden ebenfalls in die Falcons übertragen und diese dann zentrifugiert.

Um die MEF zu ernten, wurde Trypsin benutzt, da es sich bei MEF um sehr adhärente Zellen handelt. Hierzu wurden die Flaschen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für fünf Minuten bei 37° C mit Trypsin-EDTA inkubiert. Danach wurden sie mit FCS-haltigem Medium gespült, die Zelllösungen in Falcons übertragen und zentrifugiert.

Die Makrophagen wurden mit PBS-EDTA 5mmol abgelöst.

Nach dem Zentrifugieren wurden alle Zellpellets vom Überstand befreit und in ihren jeweiligen Medien ausplattiert bzw. direkt für Experimente weiterverwendet.

2.2.1.2.4 Zählen der Zellen

Auf das trockene Zellpellet wurde nach Zentrifugation 1 ml Medium pipettiert und

die Zellen in der Lösung 1:1 mit Trypanblau vermischt (20 µl + 20 µl = 40 µl), um das Zählen zu ermöglichen. Mit Trypanblau kann die Vitalität von Zellen beurteilt werden. Der Farbstoff dringt in tote Zellen durch die geschädigte Membran leicht ein und färbt so die gesamte Zelle blau. Die lebenden Zellen sind als ungefärbt erkennbar. Auf diese Weise konnten die lebenden Zellen leicht unter dem Lichtmikroskop in einer Zählkammer gezählt werden. Jede Zählung wurde drei Mal wiederholt.

2.2.1.2.5 Zentrifugieren

Die Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, fünf Minuten bei 1500rpm zentrifugiert.

2.2.1.2.6 Erythrozytenlyse

Die Erythrozyten wurden in 50ml-Falcons mit 1 ml ACK bei 37 °C fünf Minuten lang lysiert. Danach wurde das Falcon mit PBS aufgefüllt, um den osmotischen Druck zu senken und bei 1500rpm fünf Minuten zentrifugiert; dieser Waschvorgang mit PBS wurde anschließend wiederholt.

2.2.1.2.7 Auftauen/Einfrieren der MEF

Das Auftauen der Zellen erfolgte folgendermaßen: Die Gefrierröhrchen wurden im 37°C-Wasserbad 30 Sekunden angewärmt, dann wurde die Zellsuspension in einen 15ml-Falcon mit warmem kompletten DMEM (s. o.) überführt und zentrifugiert, um die Zellen vom zellschädigenden DMSO des Gefriermediums zu befreien. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Zellen erneut mit kompletten DMEM gewaschen.

Eingefroren wurden die Zellen in purem FCS mit 10 % DMSO.

2.2.1.2.8 Zellstimulierung mit Rapamycin

Für einige Experimente wurden die BMDC mit Rapamycin 3h in einer Konzentration von 0,5 µl/ml inkubiert.

2.2.1.3 Wachstumskurven

2.2.1.3.1 BMDC

Die dendritischen Zellen wurden wie oben beschrieben gewonnen. Nach dem Spülen der Knochen mit PBS und der ersten Zentrifugation wurde die Erythrozytenlyse mit ACK durchgeführt. Danach wurden die Zellen gezählt und in 6-Well-Platten in einer Konzentration von $2{,}5x10^5$/ml in GMCSF-haltigem IMDM ausgesät und inkubiert, 2 ml pro Well, sodass eine Ausgangszellzahl von 5 $x10^5$ pro Well vorlag. Pro Typ der BMDC (Wildtyp und IRAP-Knockout) wurde eine 6-Well-Platte komplett bepflanzt.

Nach jeweils 24h wurden die Zellen eines Wells geerntet und anschließend wie oben beschrieben ausgezählt.

2.2.1.3.2 Makrophagen

Die Makrophagenkultur wurde nach oben beschriebenem Protokoll angefertigt und an drei Zeitpunkten gezählt: An Tag 0 wurde die gesamten Milzzellen nach Erythrozytenlysierung gezählt; an Tag 3 und an Tag 7 wurde jeweils die Häfte der Wells gezählt. An Tag 0 konnten die Zellen nicht gezählt werden konnten, weil gewartet werden musste, bis die Makrophagenpopulation sich am Boden absetzte und so von der nicht adhärenten Zellpopulation getrennt werden konnte.

2.2.1.3.3 MEF

Die immortalisierten MEF wurden in Petrischalen mit 35 mm Durchmesser in komplettem DMEM in einer Konzentration $2{,}0x10^5$/ml ausgesät, pro Schale also $4{,}0x10^5$ Zellen in 2 ml Nährmedium. Mindestens fünf Exemplare jeder Schale wurden angefertigt. Alle 24 Stunden wurde eine Petrischale aus dem Brutschrank genommen und die Zellen darin gezählt.

Bei allen Wachstumskurven wurden mit dem Programm PrismGraphpad Mittelwerte aus den angefertigten Experimenten und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) als Graphen dargestellt.

2.2.2 Proteinanalyse per Western Blot

2.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten

Die BMDC wurden in 6-Well-Platten ausgesät und teilweise mit Rapamycin behandelt.

Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und die Wells sehr vorsichtig mit PBS gespült. Die „trockenen“ Platten wurden unmittelbar bei -80 °C schockgefroren. Anschliessend wurde die Zellschicht in 20µl-Lyse-Puffer aufgenommen, mithilfe eines Zellschabers gelöst und in 1,5ml-Reaktionsgefäße transferiert.

2.2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung nach Bradford[72] wurden jeweils 5 und 2,5 µl der Zelllysate in Reaktionsgefäße überführt und 1 ml der Biorad Testlösung hinzugefügt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Lysate bei 595nm im Photometer gemessen. Zur Quantifizierung wurde parallel zur Messung der Proben eine Eichkurve mit einer Verdünnungsreihe eines Proteingemischs bekannter Konzentration (Precimat, Boehringer Mannheim) im Bereich von 0,3 bis 50 µg/µl erstellt sowie ein Leerwert ohne Protein gemessen. Anschließend wurde aus den beiden Proben eines jeden Zelllysates - unter Berücksichtigung der Eichkurve - der Mittelwert bestimmt und das Volumen errechnet, das später auf die Gele geladen werden sollte. Das Endvolumen der Lysate wurde mit 3X-SDS-Ladungspuffer verdünnt.

2.2.2.3 SDS-PAGE

Die Zelllysate wurden chromatrographisch mithilfe einer vertikalen, diskontinuierlichen SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach Laemmli aufgetrennt[73]. Die Gele bestehen aus zwei Teilen: einem Trenngel und einem Sammelgel. Je nach Größe der zu bestimmenden Proteine ist die Porengrösse des Trenngels über die Konzentration des Acrylamids angepasst worden.

Es erfolgte ein initialer Denaturierungsschritt der Proteinlösungen von fünf Minuten bei 95 °C. Danach wurden die zu untersuchenden Proben in die Geltaschen des Sammelgels gefüllt. Ein Größenmarker (Odyssey Molecular Weight Marker) wurde zur Größenbestimmung genutzt. Die Gele wurden in einer vertikalen Apparatur befestigt (MiniGel-System von Bio-Rad) und in Elektrophoresepuffer für circa 2,5 Stunden einer Spannung von 80 V ausgesetzt. Das elektrische Feld ermöglicht eine Auftrennung der Proteine, da diese in denaturierter Form in direkter Abhängigkeit zu ihrer Größe mit negativ geladenen SDS-Ionen umlagert werden und so unterschiedlich schnell zum Pluspol wandern. Wenn die Migrationsfront (sichtbar als blaue Linie durch das Bromphenolblau des Probenpuffers) die untere Gelkante passiert hatte, wurde die Elektrophorese beendet, das Sammelgel verworfen und das Trenngel für die weitere Analyse verwendet.

2.2.2.4 Western-Blot-Analyse

Für die spezifische Detektion eines bestimmten Proteins mittels Antikörpern müssen die Proteine zunächst fest auf eine Membran gebunden werden. Diese Technik nennt sich Western Blotting und wurde hier im Nassblotverfahren in einer Konstruktion aus Plastikklammer, Schwämmen und Zellstoffpapier wie in Abbildung 7 abgebildet in Transfer-Puffer gefüllten Elektrophorese-Tanks bei 4°C durchgeführt. Auf die untere Platte der Klammerapparatur (Anode wurde ein Schwamm und ein in Transfer-Buffer getränktes Zellstoffpapier gelegt. Darauf wurde die zuvor mit Methanol aktivierte Membran platziert und zuletzt auf diese das Gel. Auf das Gel wurden erneut ein getränktes Papier und ein Schwamm gelegt und das Schichtwerk schließlich mit der oberen Platte der Klammer (Kathode) fixiert. Für den Transfer wurde das Gel nun zehn Minuten einer Spannung von 80 V und 50 Minuten einer Spannung von 130 V ausgesetzt. Der Transfer wurde beendet, sobald die Bande des Bromophenolblau das untere Ende des Gels erreichte.

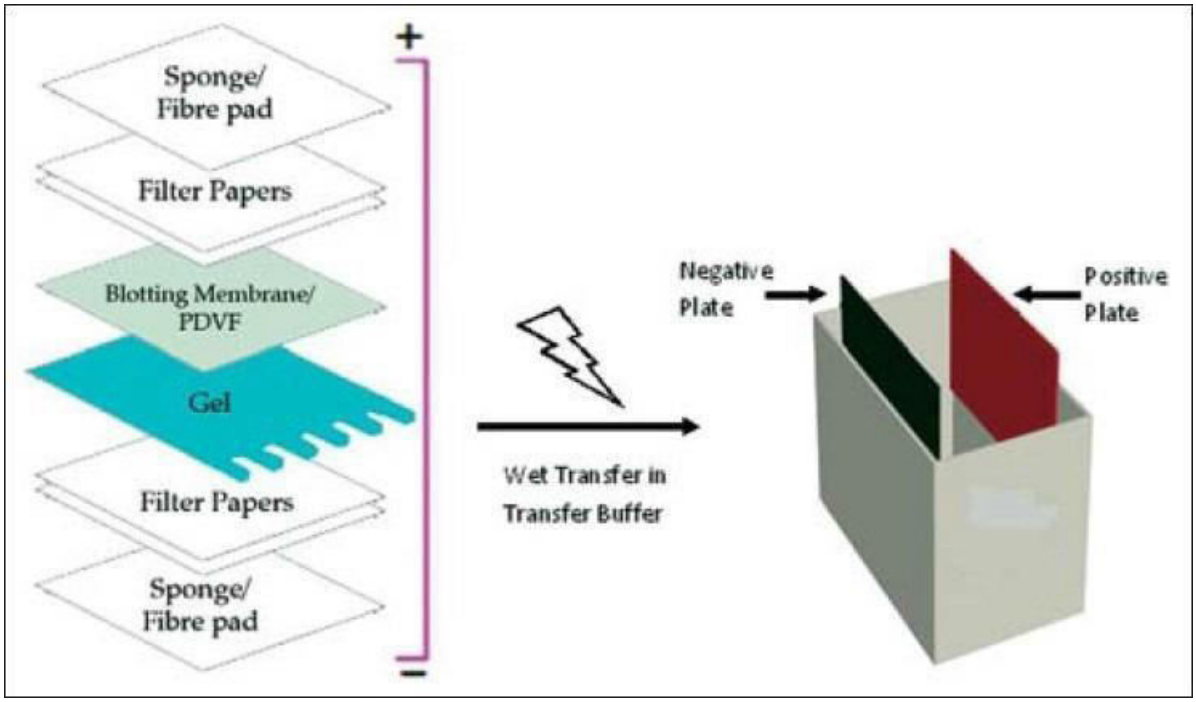

Abbildung 7: Western-Blot-Apparatur (entnommen aus Mahmood, N Am J Med Sci, 2012)

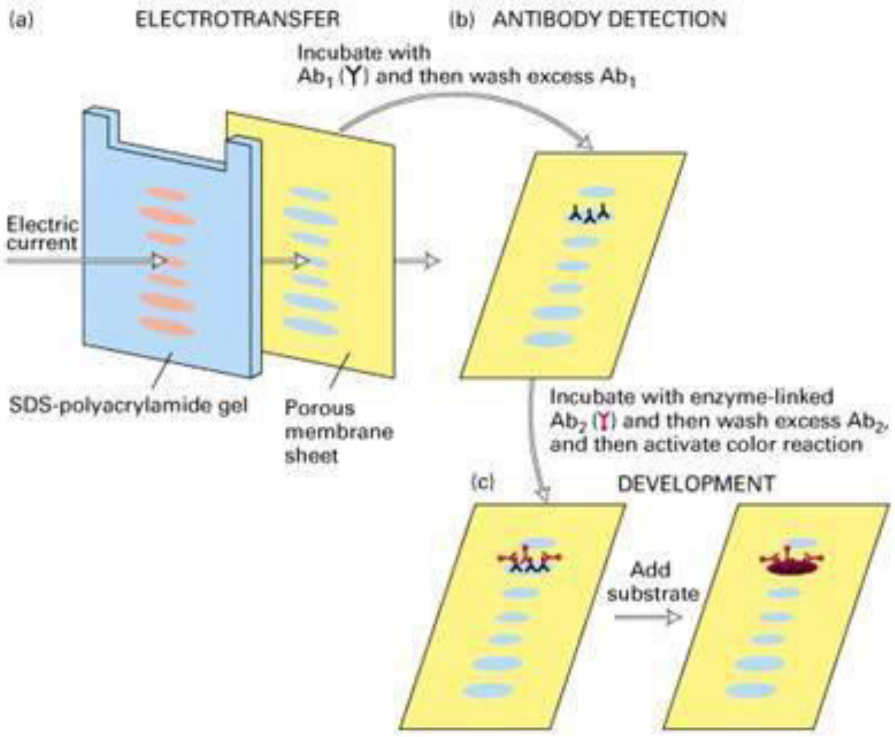

Abbildung 8: Mechanismus eines Western Blot (übernommen von UCSF Molecular Methods)

2.2.2.5 *Immundetektion*

Um die freien Bindungsstellen an der Membran abzusättigen, wurde diese in einer proteinhaltigen Lösung (hier kommerzieller Odyssey Blocking Buffer) inkubiert. Dies geschah in einer geschlossenen Plastikdose auf einem Schüttelapparat entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C.

Die Inkubation mit dem in Odyssey Blocking Buffer verdünnten Primärantikörper erfolgte danach auch unter Schütteln entweder über Nacht bei 4 °C oder für 2-3 Stunden bei Raumtemperatur.

Dann wurde die Membran für jeweils fünf Minuten viermal mit PBST (PBS-Tween) gewaschen und mit dem fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörper für eine Stunde vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur auf dem Schüttelapparat inkubiert. Nach diesem Schritt erfolgten erneut vier Waschungen mit PBST für jeweils fünf Minuten und eine mit PBS bevor am Odyssey-Scanner die Signale des sekundären Antikörpers detektiert werden konnten.

2.2.3 Reverse Transkription und quantitative Real-Time PCR (RT PCR)

2.2.3.1 *mRNA-Isolierung*

Die RNA-Isolierung erfolgte mit den RNASpinMini-Kits von GE Healthcare. Dieser Prozess erfordert sehr sauberes Arbeiten, da unbedingt verhindert werden muss, dass omnipräsente RNasen das Produkt abbauen. Insofern wurden Arbeitsbank und alle benötigten Materialien vorher gründlich desinfiziert und Einmalhandschuhe benutzt. Das 12-schrittige Protokoll des Kit-Herstellers wurde mit einer Zellzahl von $5x10^6$ Zellen als Pellets in Eppendorf-Tubes begonnen. Die Aufreinigungstechnik in diesem Kit beruht auf einer Affinitätsbindung der vorher lysierten Nukleinsäuren an eine Silica-Membran. Nach spezifischem Verdau genomischer DNA durch DNase I sowie mehrfachen Waschschritten werden die Nukleinsäuren in hoher Reinheit eluiert. Die im Eluat gewonnene RNA wurde bei -80 °C oder bei sofortiger Weiterverwendung auf Eis gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgt an einem UV-Spektrometer. RNA weist bei 260 nm ihr Absorptionsmaximum auf,

während es bei verunreinigten Proben höher liegt. War die Probe verunreinigt, so wurde sie verworfen und das Experiment wiederholt.

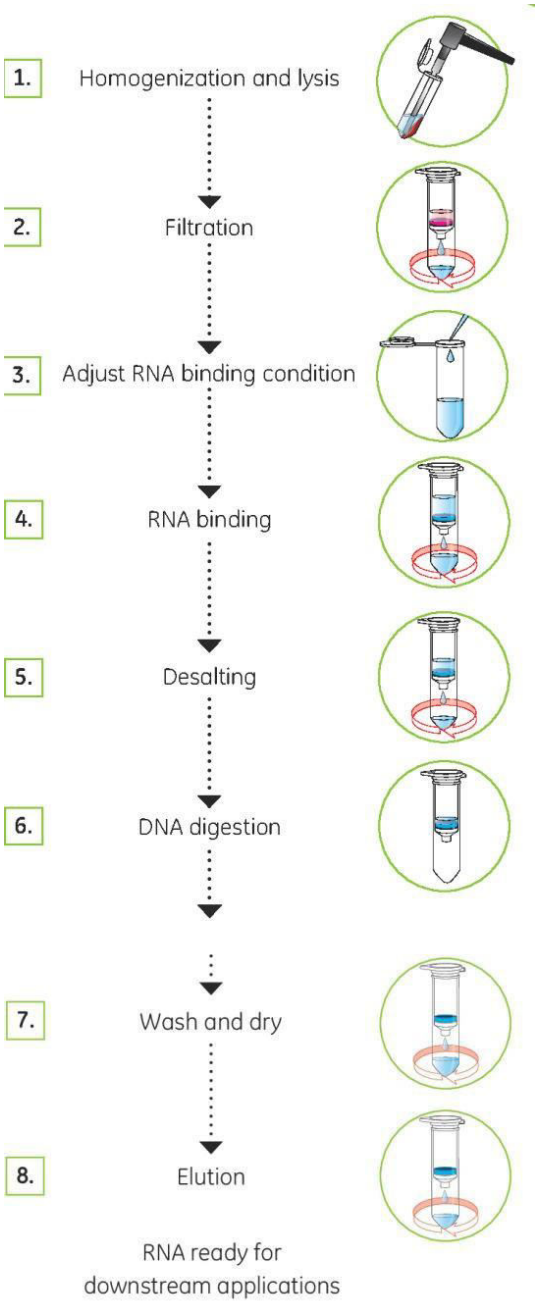

Abbildung 9: Arbeitsschritte der mRNA-Isolierung mit dem mRNASpinMini-Kit von GE Healthcare

2.2.3.2 cDNA-Synthese-Reverse Transkription

Die gewonnene mRNA wurde mittels des Promega ImProm-II Reverse Transcription System in cDNA umgeschrieben. Bei der reversen Transkription kopiert die Reverse Transkriptase (RT) zunächst die RNA-Einzelstränge in Form eines RNA-DNA-Hybridstranges. Die jeweiligen RNA-Anteile werden infolge abgebaut und die DNA-Einzelstränge kopiert, sodass Doppelstränge entstehen. Es wurden 4 µl der gewonnenen RNA mit 1 µl Oligo(dT) zunächst auf 70 °C erhitzt und dann langsam in einem Temperaturgradienten von -0,5 °C/min auf 4 °C abgekühlt. Der Reverse-Transkriptions-Mix wurde in einem sterilen 1,5ml-Eppendorf-Tube auf Eis zubereitet.

Substanz	**Menge**
Nukleasefreies Wasser	5,5 µl
ImProm-II 5X Reaktionspuffer	4,0 µl
MgCl2, 25mM	3,0 µl
dNTP Mix, 10mM	1,0 µl
Rekombinantes RNAsin Ribonuklease Inhibitor	0,5 µl
ImProm-II Reverse Transkriptase	1,0 µl
Endvolumen	15 µl

Tabelle 6. Reverse-Transkription-Mix

15 µl Reverse-Transkription-Reaktions-Mix wurden mit 5 µl RNA in einem Eppendorf vermischt und die Umschreibung der RNA in DNA nach folgendem dreischrittigem Temperaturprogramm vollzogen:

Schritt	Temperatur	Dauer
Annealing	25 °C	5 min
Extension	42 °C	1 h
Inaktivierung der RT	70 °C	15 min

Tabelle 7: Dreischrittiges Temperaturprogramm

Das gewonnene Eluat wurde wieder bei -80 °C oder bei sofortiger Weiterverwendung auf Eis gelagert und die DNA-Konzentration an einem UV-Spektrometer gemessen, wie oben analog für die RNA beschrieben.

2.2.3.3 Primerdesign

Für die PCR waren Primer erforderlich, die eine Hydroxygruppe als Ansatzpunkt für die DNA-Polymerasen darstellen. Folgende drei Kriterien wurden bei allen Primerpaaren berücksichtigt:

- Die Primerpaare sollten sich in zwei verschiedenen Exons des zu amplifizierenden Gens befinden.
- Die Primerpaare sollten in einem optimalen Längenintervall sein, um sequenzspezifisch zu wirken (150-200 bp).
- Die Annealingtemperatur sollte zwischen 52 und 60 °C liegen und die Differenz innerhalb eines Primerpaars unter 4 °C.
- Die Primer sollten eine Länge von 18-30 Nukleotiden besitzen.
- Die Primer sollten einen Guanosin/Cytosin-Gehalt von 40-60 % haben.
- Das Risiko zur Bildung von Primerdimeren oder sogenannten Hairpins sollte gering sein.

In Vorversuchen wurden die optimalen Annealingtemperaturen evaluiert.

Name	Sequenz	Länge	Fragment-größe (bp)	Annealing-Temperatur (°C)
GluT1_forward	TTCTTTGAAGTAGGCCCTG	17	180	52
GluT1_reverse	TGAAGATGATGAAGACGTAGG	21	180	52
GluT3_forward	AGGAGGAAGACCAAGCTAC	19	112	52
GluT3_reverse	CTGCTTCTCCTGTGACATC	19	112	52
GluT4_forward	CATGTATGTGGGAGAAATCG	20	160	52
GluT4_reverse	GTACTGTGAGAGCCAGAAG	19	160	52
CD98_forward	GGACTCCTCGCAGACTTTATA CC	23	190	57
CD98_reverse	CAGGTCTTGGGATGTGAAAGA TG	23	190	57

Tabelle 8: Primer

2.2.3.4 Primertesting mit PCR

Zur Untersuchung der Genexpression wurde anschließend die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) eingesetzt. Mit dieser Technik kann DNA enzymatisch vervielfältigt und somit detektiert werden. In einer PCR wurden cDNA der zu untersuchenden Zellen, Primer der zu untersuchenden Gene und DNA-Polymerase zusammengebracht. Die Reagenzien durchliefen daraufhin verschiedene Temperaturschritte, die unten weiter beschrieben werden. Hier wurden zunächst die optimalen Bedingungen für die Primer in Tests mit Wildtyp-BMDC-cDNA herausgefunden. Diese sollten später dann in der RT-qPCR eingesetzt werden und

einen Vergleich zwischen verschiedenen Zelltypen ermöglichen.

Die Reaktionsmischung für die PCR wurde in Eppendorf-Tubes nach Tabelle 10 hergestellt. Als Negativkontrolle wurde eine Wasserprobe ohne cDNA angefertigt.

Substanz	**Menge**
dNTP	1 µl
Green Buffer	10 µl
H_2O	35,7 µl
Taq	3 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
cDNA	1 µl
Endvolumen	50 µl

Tabelle 9: Reaktionsmischung PCR in einem Eppendorf

Die Eppendorf-Tubes wurden in die PCR-Maschine überführt und das mehrschrittige Thermocycling begonnen. Der initiale Denaturierungsschritt bei 95 °C führt zum Zerfall der DNA-Doppelhelix. Die Primeranlagerung, auch Annealing genannt, ist der darauffolgende Schritt. Dieser findet bei primerspezifischer Temperatur statt. Er ist dadurch gekennzeichnet, dass sich die Primer an den jeweiligen komplementären DNA-Strang anlagern. Daraufhin folgt die Extension bei 72°C für 0,5 Minuten. Dabei produzieren die Primer die passende Kopie des DNA-Strangs mithilfe von DNA-Polymerasen als mRNA. Die Abfolge aus Denaturierung, Annealing und Extension wird 30 Mal wiederholt. So kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation der vorhandenen DNA.

Thermocycling-Schritt	Wiederholung	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	1x	95 °C	2 min
Denaturierung Annealing Extension	} 30x	95 °C 57 °C 72 °C	30 s 30 s 30 s
Finale Extension	1x	72 °C	30 s
Finishing		4 °C	∞

Tabelle 10: Phasen des Thermocycling

2.2.3.5 Elektrophorese auf Agarosegel

Die PCR-Produkte wurden mittels Elektrophorese auf Agarocsegel durch ein elektrisches Spannungsfeld getrennt. Je größer das Reaktionsprodukt, desto langsamer durchwandert es das Agarosegel. Unter Zuhilfenahme von Ethidiumbromid lässt sich die Fluoreszenz der unterschiedlichen Produkte als Banden im Gel darstellen.

Hier wurde das PCR-Produkt mit Blaupuffer vermischt und in die Taschen eines 3%igen Agarosegels pipettiert. Das Gel wurde in einer mit Pufferlösung gefüllten Apparatur für etwa eine Stunde einer Spannung von 100 mV ausgesetzt, was die Trennung der Produkte ermöglicht. Anschließend konnte man das Gel unter UV-Licht fotografieren und Banden unterschiedlicher Größe erkennen. Eine Größenbestimmung der gewonnenen Produkte war anhand eines Standardisierungsmarkers, der auch auf das Gel aufgetragen wurde, möglich.

2.2.3.5.1 Herstellung des Agarosegels

Das 3%ige Agarosegel wurde folgendermaßen hergestellt: Die Agarose wurde in einem TBE-Puffer zum Sieden gebracht und nach Abkühlen in eine Form gegossen. Ein Plastikkamm wurde am oberen Ende der Form in die Flüssigkeit gedrückt, um die nötigen Taschen im Gel zu formen. Die Agarose ist ein Algen-Polysaccharid, welches

mit den anderen Bestandteilen ein Netz bildet und somit die Proteine in ihrer Wanderung durch das elektrische Feld auffängt.

Die PCR und Gel-Elektrophoresen waren als Testung für die Primer gedacht und die Versuche wurden nur mit Wildtyp-BMDC durchgeführt. Sie dienten als Ermittlung der idealen Primer-Bedingungen für die nachfolgende RT-qPCR, bei der dann Unterschiede zwischen Wildtyp-BMDC und IRAP-defizienten BMDC ermittelt werden sollten.

2.2.3.6 Real-Time qPCR

Die Real-Time qPCR ermöglicht im Gegensatz zur PCR eine Aussage über die Menge der untersuchten DNA. Das Prinzip ist genau gleich, nur dass endogene Quantifizierungskontrollen in Form von „Housekeeping Genes“ genutzt wurden. Bei diesen Versuchen wurden folgende drei Housekeeping Genes benutzt: Aktin-B, GADPH und HRPT. Diese werden in murinen BMDC exprimiert und dienen so als interne Kontrolle.

Für die qPCR wurde ein Mastermix hergestellt, der in Tabelle 11 gezeigt wird.

Es wurden Negativkontrollen ohne cDNA mit der gleichen Menge Wasser durchgeführt.

Substanz	**Menge**
SybrGreen	10 µl
Primer forward	0,4 µl
Primer reverse	0,4 µl
RNase-freies Wasser	4,2µl

Tabelle 11: Zusammensetzung Mastermix

Der Mastermix wurde in die Wells einer 96-Well-Platte pipettiert, in der die cDNA bzw. RNAse-freies Wasser bei den Negativkontrollen schon vorgelegt worden waren. Die Platte wurde anschließend mit einem Film verschlossen und in das qPCR-Gerät überführt. Die verschiedenen Schritte des Thermocycling der qPCR sind in Tabelle 10 beschrieben.

2.2.3.6.1 Auswertung der Real-Time qPCR

Für jede Probe ermittelt die Software den sogenannten Ct-Wert (Threshold-Cycle). Hierbei handelt es sich um den Umkehrpunkt des Wertes, bei dem die Amplifikation in die exponentielle Phase übergeht und somit eine höhere Fluoreszenz als der Hintergrund messbar wird. Je mehr DNA in der Probe enthalten war, desto schneller ist dieser Wert erreicht, desto niedriger ist also der Ct-Wert einer Probe. Jedoch misst man den Ct-Wert immer anhand der Housekeeping-Gene, um einen Vergleich verschiedener Proben möglich zu machen. Dafür wird der ΔCt-Wert errechnet.

ΔCt = Ct des untersuchten Gens - Ct des Housekeeping Genes

Je höher das ΔCT, desto niedriger ist demnach die Expression des untersuchten Gens einzuschätzen. Um den Vergleich zwischen verschiedenen Genen zu ermöglichen, errechnet man als Nächstes den ΔΔCt-Wert: Dies ist die Differenz aus den ΔCt-Werten der verschiedenen Gruppen (z. B. zwischen WT und IRAPko). Für den ΔΔCt der ersten Gruppe (z. B. WT) erhält man 0, denn man substrahiert ΔCtWT von seinem eigenen Wert. Für den ΔΔCt der nächsten Gruppe erhält man einen Wert X, der in diesem Beispiel aus ΔCtIRAP-Knockout-ΔCtWT entsteht. Diese ΔΔCt-Werte werden dann in folgende Gleichung eingesetzt:

Sei E = n-fache Expression (IRAP-Knockout im Vergleich zum Wildtyp) $E = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

Die E-Werte wurden anschließend unter Nutzung von Prism als Graphiken dargestellt.

2.2.3.7 Statistische Auswertung der qPCR-Ergebnisse

Die aus den qPCR gewonnenen Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism statistisch analysiert. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Fehlerbalken dargestellt. Die Signifikanz wurde anhand von 1-Stichproben t-Tests analysiert, wenn es sich um Vergleiche zwischen den Stichproben (IRAP-Knockout) und der Kontrolle (Baseline = Wildtyp) handelte. Die Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit zwei Stichproben-t-tests (t-test für unabhängige Stichproben) ermittelt. Es wurde mit folgenden Signifikanzgrenzen gearbeitet:

$p < 0,001$ = hoch signifikant (***), $p < 0,01$ = sehr signifikant (**), $p < 0,05$ = signifikant (*), $p > 0,05$ = nicht signifikant (ns)

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von IRAP auf Wachstum und Proliferation

Die mTOR-Signalkaskade fungiert in allen Zellen von Säugetieren als ein zentrales Regelwerk von Wachstum und Energiestoffwechsel. Um ihren Zusammenhang mit IRAP zu analysieren, wurde in den folgenden Experimenten das Wachstumsverhalten von Mauszellen untersucht. Es wurden Wachstumskurven verschiedener Zelltypen (Murine embryonale Fibroblasten, dendritische Zellen und Makrophagen) von Wildtyp- und IRAP-Knockout-Mäusen angefertigt und verglichen. Es sollte herausgefunden werden, ob das Fehlen von IRAP einen Einfluss auf das Wachstum von Mauszellen hat und wenn ja, ob dieser Effekt zellspezifisch oder in verschiedenen Zelltypen identisch ist.

3.1.1 Wachstumsverhalten von MEF

Es wurden in drei Experimenten jeweils zwei unabhängige Fibroblastenlinien von Wildtyp- und von IRAP-Knockout-Mäusen kultiviert. Wie im Methodenteil (§II.2.1.4) beschrieben wurden die Zellen in einer Konzentration von $4x10^4$Zellen/Schale ausgesät und täglich gezählt. Um zellliniennenspezifische Effekte auszuschließen, wurden jeweils zwei verschiedene Zelllinien pro Zelltyp untersucht. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurden die Experimente drei Mal wiederholt.

Abbildung 10 zeigt die Wachstumskurven der MEF-Linien. Alle MEF-Linien zeigen ein stetiges Wachstum zwischen Tag 0 und Tag 5. Die Zelllinien der IRAP-Knockout-Mäuse wuchsen langsamer als die beiden Zelllinien der Wildtyp-Mäuse. Ausgehend von einer Anfangszahl von $4x10^4$ Zellen, stiegen die Wildtyp-Zellen nach 120 Stunden Kulturzeit auf Mittelwerte von $7,3x10^5$ und $7,8x10^5$, während die Zellzahlen der IRAP-Knockout-Linien zur gleichen Zeit bei $1,8x10^5$ und $2,3x10^5$ lagen.

Diese Experimente zeigen, dass sich das Fehlen von IRAP in MEF negativ auf die Zellteilung auswirkt.

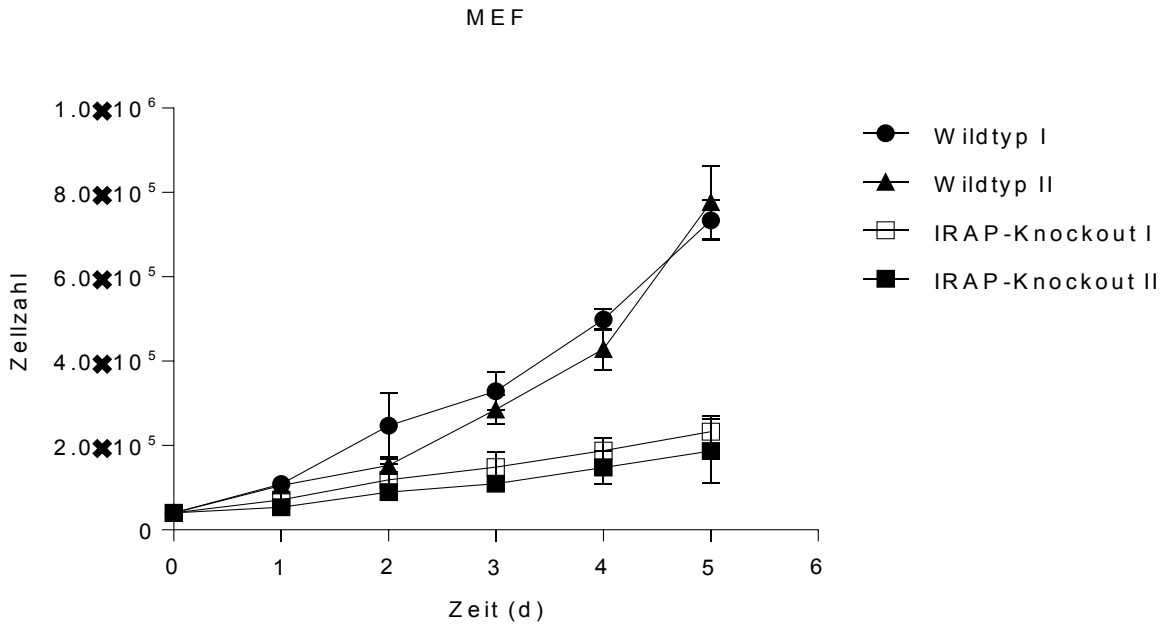

Abbildung 10: Wachstumskurven der MEF (zwei unabhängige Wildtyp- und IRAP-Knockout-Zelllinien); Zur quantitativen Messung des Wachstums wurden immortalisierte MEF-Linien gleichen Passagealters vom Wildtyp und IRAP-defizienten Typ über sechs Tage kultiviert. Jeweils fünf Petrischalen mit 4x10^4 Zellen/Schale wurden ausgesät und täglich wurden die Zellen in einer Schale gezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

3.1.2 Wachstumsverhalten von BMDC

In den nächsten Experimenten wurden Wachstumskurven aus drei Versuchen mit BMDC-Kulturen von Wildtyp- und IRAP-Knockout-Mäusen angefertigt. BMDC waren von besonderem Interesse, da die Regulation von IRAP in diesen Zellen noch unerforscht ist, das Enzym in DC jedoch eine wichtige Rolle für die Kreuzpräsentation hat. Die Kultivierung dieser Zellen wurde im Methodenteil (§II.2.1.4) beschrieben, eine Anfangskonzentration von 2,5x10^{5}Zellen/ml ermöglichte den BMDC maximalen Platz zur Expansion.

Drei voneinander unabhängige Experimente (Abbildung 11) zeigen das Wachstum der BMDC-Kulturen von IRAP-Knockout-Mäusen und von Wildtyp-Mäusen in fünf Tagen. Die Anfangszahl an Zellen pro Well an Tag 0 betrug 5x10^5. Am ersten Kulturtag fiel die Zellzahl in beiden Linien im Vergleich zum Anfangswert ab. Bei den Wildtyp-BMDC konnten an Tag 1 4,3x10^5 Zellen gezählt werden und bei den IRAP-defizienten BMDC 4,1x10^5. Dieser Abfall ist dadurch zu erklären, dass dendritische Zellen ein adhäsives

Verhalten zeigen und trotz Ablösemanöver mit kaltem PBS einige Zellen am Well-Boden verankert bleiben und somit der Zählung entgehen. Ab Tag 1 zeigten alle Zelllinien ein stetiges Wachstumsverhalten: Die Wildtyp-BMDC proliferierten jedoch schneller und erreichten an Tag 5 eine Anzahl von 1,8x106, währen die Anzahl der IRAP-defizienten BMDC an diesem Tag bei 1,1x106 lag.

Diese Experimente zeigen, dass sich auch in BMDC ein Fehlen von IRAP negativ auf die Zellteilung auswirkt, jedoch ist der Unterschied weniger stark ausgeprägt als in den MEF.

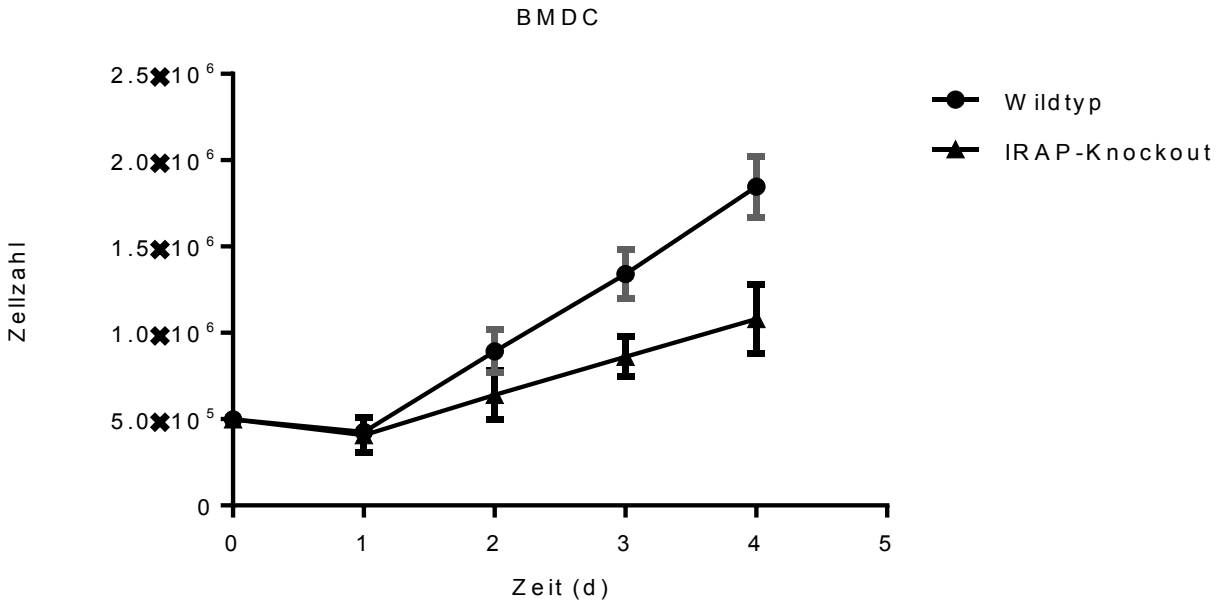

Abbildung 11: Wachstumskurven der BMDC-Linien (Wildtyp und IRAP-Knockout); Die BMDC wurden in einer Konzentration von 2,5x10^5/ml in 6-Well-Plättchen mit GMCSF-haltigem Medium ausgesät und täglich wurden die Zellen eines Wells gezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

3.1.3 Wachstumsverhalten von Makrophagen

Um zu untersuchen, ob sich das gefundene Ergebnis auch in einem anderen Zelltyp zeigt, wurde nun das Wachstumsverhalten von Makrophagenkulturen analysiert. Hierfür wurden Milzzellsuspensionen aus Wildtyp- und IRAP-Knockout-Mäusen hergestellt und auf 6-Well-Platten ausgesät. Die Kultur wurde mit MCSF stimuliert und jeden Tag mit PBS gewaschen, um die nicht adhärenten Zellen zu eliminieren. Da sich am Anfang noch viele andere Zelltypen in der Makrophagenkultur befanden, wurde keine Zellzahlbestimmung an Tag 0 durchgeführt. Erst an Tag 3 wurden die Zellen zum ersten Mal gezählt, da sie ab diesem Tag als Makrophagen klassifiziert werden konnten. Für jede Zählung wurden jeweils drei Wells pro Zelltyp genutzt. An Tag 7 wurden jeweils die restlichen drei Wells für die zweite Zählung genutzt. Abbildung 12 zeigt ein stetiges Wachstum in beiden Linien zwischen Tag 3 und Tag 7. Signifikante Unterschiede zwischen den Wildtyp- und den IRAP-defizienten Makrophagen sind nicht erkennbar. Der Mittelwert der Makrophagen der Wildtyp-Mäuse betrug an Tag 3 $9{,}95 \times 10^4$ und an Tag 7 $1{,}8 \times 10^5$. Der Mittelwert der Makrophagen der IRAP-Knockout-Mäuse betrug an Tag 3 $6{,}0 \times 10^4$ und an Tag 7 $1{,}4 \times 10^5$.

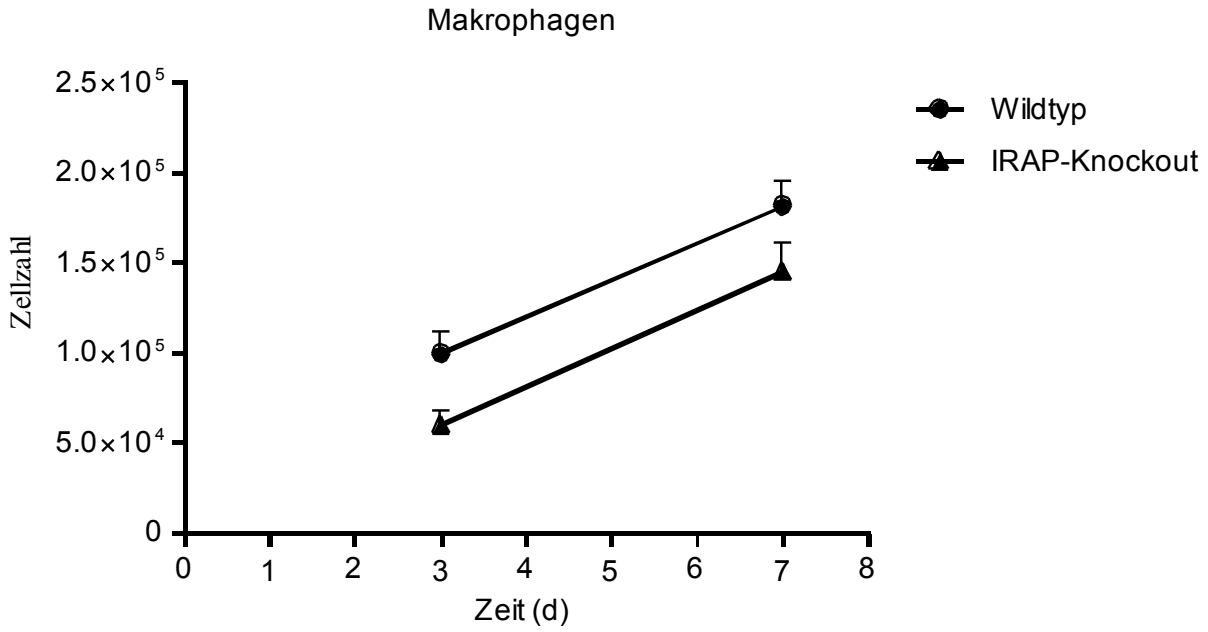

Abbildung 12: Wachstumskurven der Makrophagenkultur (Wildtyp und IRAP-Knockout). Die Makrophagen wurden aus einer Milzzellsuspension von Wildtyp- und IRAP-defizienten Mäusen hergestellt und in 6-Well-Platten angezüchtet. Die Zellanzahl in jeweils drei Wells wurde zu zwei Zeitpunkten bestimmt (Tag 3 und Tag 7). Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für MEF und BMDC ein verlangsamtes Wachstumsverhalten in IRAP-defizienten Zellen vorzuliegen scheint. Da Wachstums- und Proliferationsverhalten unter anderem der Regulation des mTOR-Komplex-1 und seinen Substraten 4EBP und S6-Kinase unterliegen61, wurden diese Substrate im Folgenden in Wildtyp-Zellen und in IRAP-defizienten Zellen untersucht.

3.2 Downstream-Effektoren von mTOR

In einer Kollaboration mit der Arbeitsgruppe Pende (INSERM U810) wurden direkte Substrate von mTOR mittels SDS-Page aufgetrennt und per Western Blot analysiert. Hierzu wurden Zelllysate aus BMDC von Wildtyp- und IRAP-defizienten Mäusen mit und ohne Behandlung mit Rapamycin genutzt. Wie in der Einleitung erläutert, werden die drei untersuchten Substratproteine Akt, S6K und 4EBP entweder von mTORC1 oder von mTORC2 an bestimmten Stellen phosphoryliert. Der Nachweis ihrer phosphorylierten Form ist in diesem Experiment demnach als mTOR-Aktivität auszuwerten.

Der oberste Blot der Abbildung 13 detektiert das Protein Akt. Akt ist ein Substrat von mTORC2. Die komplexe Rolle von Akt wurde bereits in der Einleitung erläutert: Akt wird durch eine zweifache Phosphorylierung aktiv, die erste an S473 von mTORC2, die dann die zweite an T308 durch die PDK1 ermöglicht. In diesem Experiment wurden deshalb Akt und Phospho-473-Akt analysiert, da hier die Aktivität von mTORC2 von Interesse war. In Abbildung 13 ist kein Unterschied in der Akt-Expression der BMDC von Wildtyp-Zellen und der der IRAP-defizienten Zellen zu sehen. Es fällt auf, dass Akt in Wildtyp-BMDC stärker an Position 473 phosphoryliert wird als in den BMDC der IRAP-defizienten Mäuse. Nach einer Rapamycin-Behandlung der BMDC ist ein gegenteiliger Effekt zu erkennen: In den mit Rapamycin behandelten IRAP-defizienten BMDC wird Akt stärker phosphoryliert als in den mit Rapamycin behandelten Wildtyp-Kontrollen.

Im nächsten Blot wurden die S6-Kinase-1 und ihre phosphorylierte Form detektiert (Abbildung 13), hierbei handelt es sich um Substrate von mTORC1. Das Signal für Phospho-S6K ist in den Wildtyp-Zellen sehr viel stärker als in den IRAP-defizienten Zellen. Nach der Rapamycin-Behandlung ist in keinem der Zelltypen eine Bande für Phospho-S6K zu sehen. Rapamycin inhibiert mTORC1, welches also nicht mehr S6K phosphorylieren kann. Diese Ergebnisse sind demnach auch ein Zeichen dafür, dass die Rapamycin-Behandlung der BMDC effektiv war. S6K1 ist in den Wildtyp-Zellen sowie in den IRAP-defizienten Zellen detektierbar mit einem leichten Unterschied in der Signalstärke. Nach der Rapamycin-Behandlung ist in den Wildtyp-BMDC sowie in den

IRAP-defizienten BMDC das Signal gleich stark wie in den IRAP-defizienten BMDC ohne Rapamycin-Behandlung. Die Banden für Phospho-4EBP weisen keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp-BMDC und IRAP-defizienten BMDC mit oder ohne Rapamycin-Behandlung auf.

Aus diesem Experiment ist festzuhalten, dass sowohl die phosphorylierte Form von Akt als auch die phosphorylierte Form von S6K1 in den IRAP-defizienten BMDC reduziert ist, was einem Phänotyp mit verminderter mTORC-Aktivität entspricht.

Abbildung 13: Repräsentative Western Blots von Akt, Phospho-Akt, S6K, Phospho-S6K und Phospho-4EBP in Zelllysaten von BMDC mit und ohne Behandlung mit Rapamycin. WT = Wildtyp; KO = IRAP-Knockout

3.3 Aktivierung von mTOR

In den vorhergehenden Experimenten wurden Effekte und Substrate von mTOR untersucht und Hinweise für einen mTOR-Aktivitätsunterschied zwischen Wildtyp-Zellen und IRAP-defizienten Zellen gefunden. Im Folgenden sollten einige der vorgeschalteten Signalkaskaden und Proteine, die mTOR aktivieren, untersucht werden, um genauer verstehen zu können, wie es zu diesem Aktivitätsunterschied kommt.

3.3.1 LAT1/CD89

Der heterodimere Aminosäurenaustauscher LAT1/CD89 ist ein wesentlicher Aktivator von mTOR. Aus den Proteinen SLC3A2 und SLC7A5 bestehend importiert er Leucin im Austausch mit Glutamin. In präliminären Experimenten des Gastlabors konnte LAT1 mittels Massenspektometrie zusammen mit IRAP in frühen DC-Phagosomen identifiziert werden. Im nachfolgenden Experiment sollte mithilfe einer quantitativen PCR untersucht werden, ob IRAP einen Einfluss auf die LAT1-Expression in BMDC hat.

Die Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der qPCR-Versuche bezüglich LAT1. Bei dieser Methode wurden die relativen mRNA-Expressionen von LAT1 in IRAP-defizienten BMDC im Vergleich zu BMDC von Wildtyp-Mäusen berechnet. Bei dieser Rechnung kann man bei einer fünffach höheren mRNA-Expression von einem nennenswerten Unterschied ausgehen, der dann statistisch überprüft werden kann. Im hier beschriebenen Experiment waren die Werte der RNA-Expression von LAT1 der IRAP-defiziente BMDC annähernd gleich 1, demnach geht eine IRAP-Defizienz nicht mit einer veränderten LAT1-Expression einher und ist insofern nicht die Erklärung für die verminderte mTOR-Aktivität in den IRAP-defizienten Zellen.

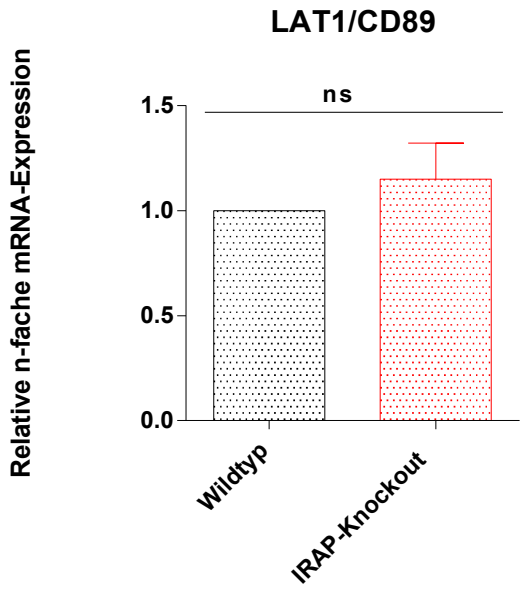

Abbildung 14: Relative CD89/LAT1-mRNA-Expression von IRAP-defizienten BMDC im Vergleich zu Wildtyp-BMDC (=1). Dargestellt ist der Mittelwert von fünf Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. ns = nicht signifikant; p = 0,06

3.3.2 Glucosetransporter

Da IRAP in insulinsensitivem Gewebe mit GluT4 kolokalisiert und auch eine regulatorische Rolle auf die GluT4-Translokation an die Zellmembran ausübt, wurden in den nächsten Experimenten Glucosetransporter in dendritischen Zellen auf einen Zusammenhang mit IRAP überprüft. Mithilfe quantitativer PCR-Experimente wurden die mRNA-Expressionen der Glucosetransporter GluT1, GluT3 und GluT4 in IRAP-defizienten BMDC und Wildtyp-BMDC miteinander verglichen.

In Vorversuchen wurden PCR-Experimente mit den Primern für GluT1, GluT3 und GluT4 in Wildtyp-BMDC angefertigt. Die Experimente zeigen

(Abbildung 15), dass Aktin und GluT1 in BMDC stark exprimiert werden, während für GluT4 mit zwei verschiedenen Primern kein Signal erreicht werden konnte. Auch für GluT3 ergab die PCR keine Bande. Die mittelstarke Bande, die in der GluT3-Reihe zu sehen ist, befindet sich nicht auf der erwarteten Höhe für GluT3.

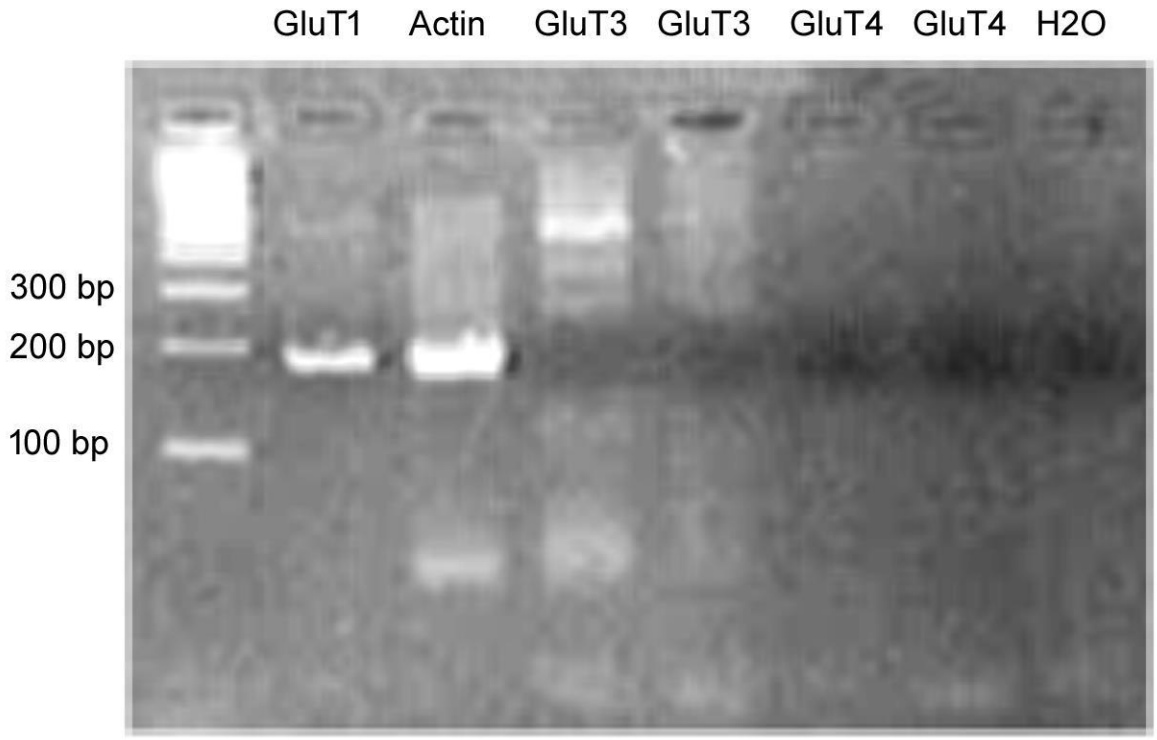

Abbildung 15: PCR, Primer Testing für GluT1,3,4, repräsentatives Ergebnis

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Glucosetransporter GluT3 und GluT4 in nur sehr geringer Menge oder gar nicht in BMDC exprimiert werden. Deshalb wurde eine Positivkontrolle mit Muskel-cDNA angefertigt werden. Ein repräsentatives Ergebnis dieser Kontrolle ist in Abbildung 16 zu sehen. Beide Primer für GluT4 geben ein starkes Signal in der DNA der Muskelzellen. Auch für GluT1 und GluT3 sind kräftige Banden zu sehen.

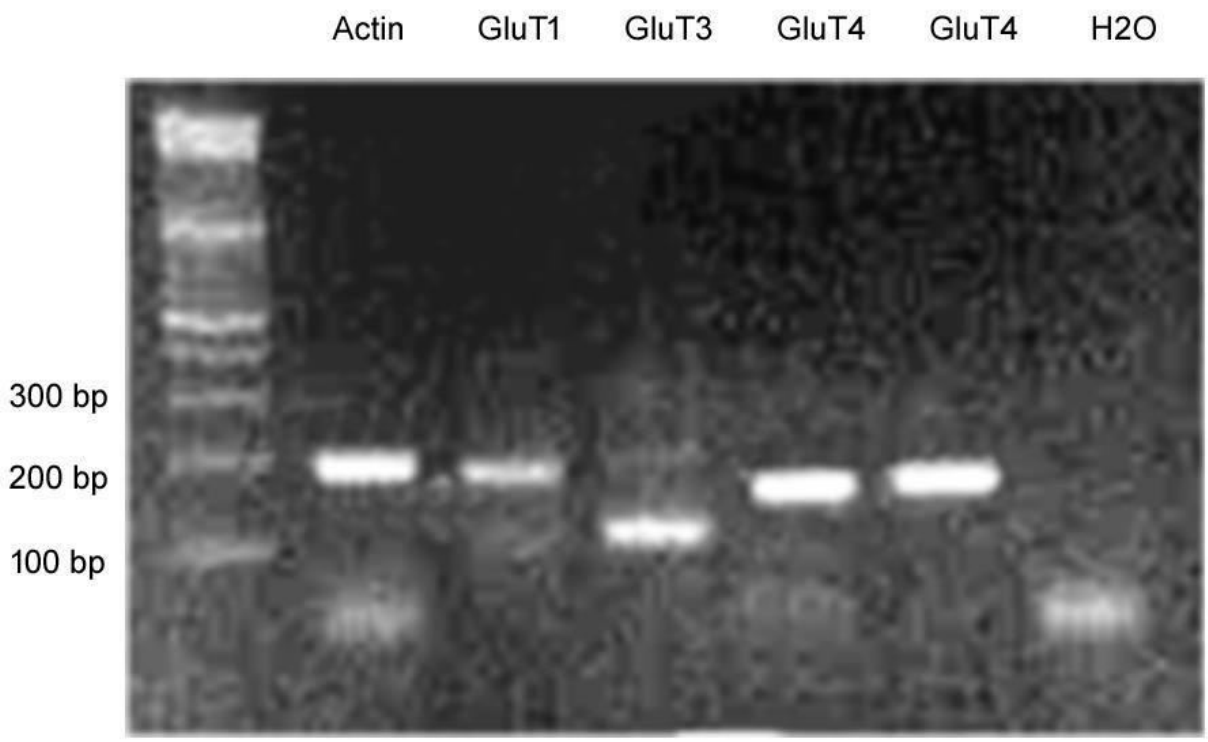

Abbildung 16: PCR Testing mit Muskelzell-DNA

Die PCR-Bedingungen sind demnach sehr wohl geeignet, um eine GluT3- und GluT4-Expression zu detektieren. Das führte zu der Hypothese, dass diese beiden Glucosetransporter tatsächlich kaum oder gar nicht von murinen unstimulierten BMDC exprimiert werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde deshalb die Expression von GluT3 und GluT4 mittels RT-qPCR überprüft, da diese sehr viel genauer und sensitiver ist und auch eine quantitative Aussage über eine mRNA-Expression geben kann.

Daher wurden in einem nächsten Schritt qPCR-Experimente durchgeführt. Dabei sollte die Frage geklärt werden, ob die Glucosetransporter 1,3 und 4 in gleicher Menge in Wildtyp-BMDC wie in IRAP-defizienten BMDC vorhanden sind. Es wurden jeweils mindestens fünf Experimente durchgeführt. In Abbildung 17 sind die Mittelwerte der RNA-Expression der jeweiligen Glucosetransporter in den IRAP-defiziente BMDC dargestellt. Als gestrichelte Linie ist die Expression der jeweiligen Glucosetransporter in den Wildtyp-BMDC repräsentiert.

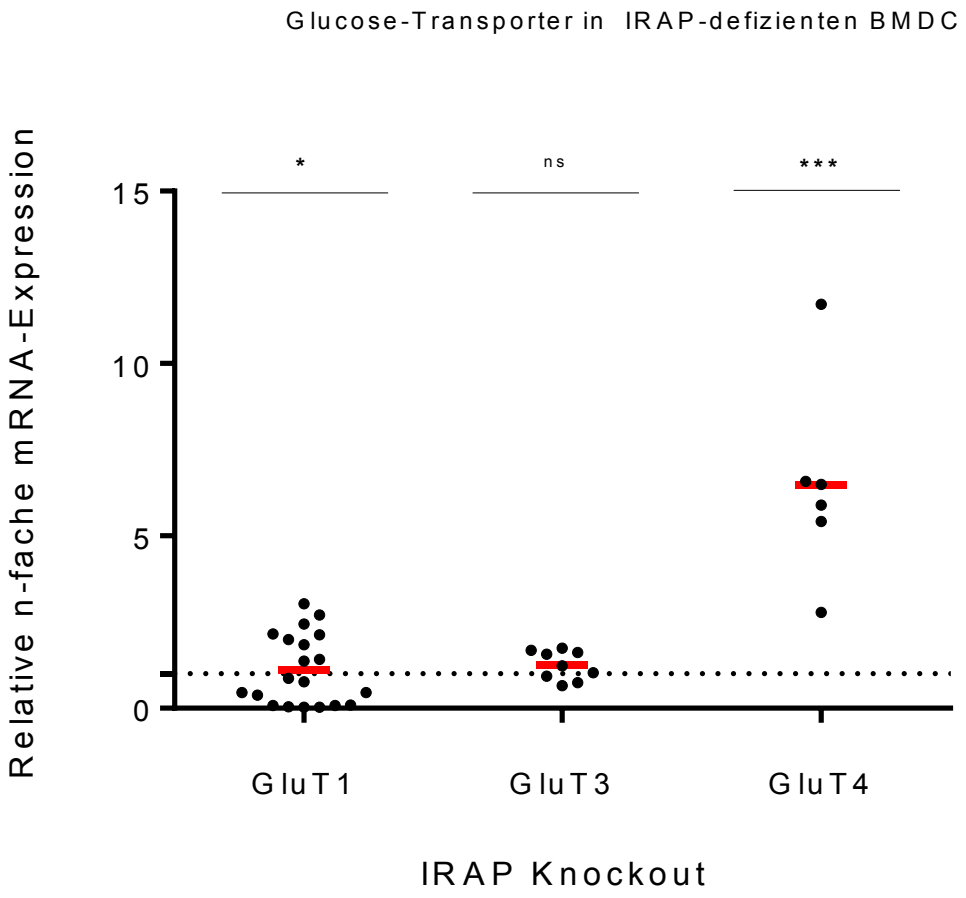

Abbildung 17: Dargestellt sind die relativen n-fachen Werte der mRNA-Expression für GluT1, GluT3 und GluT4 in IRAP-defizienten BMDC im Vergleich zu Willdtyp-BMDC. Jeder Punkt stellt ein Experiment dar. Es wurden mindestens fünf Experimente pro Glucosetransporter angefertigt. In rot sind die Mittelwerte dargestellt. An der gestrichelten Linie ist der Vergleich mit dem Wildtyp zu erkennen. ns: nicht signifikant; *p < 0,05; ***p < 0,001

In Abbildung 17 ist zu sehen, dass zwischen der Expression von GluT1 und GluT3 in BMDC im IRAP-Knockout und der des Wildtyps keine signifikanten Unterschiede bestehen. Dagegen wies GluT4 in IRAP-Knockout-Zellen eine etwa sechsmal höhere Expression als in den Wildtyp-Zellen auf. Dieses Ergebnis war signifikant (p<0,001).

Es wurde eine Kontroll-qPCR mit cDNA aus Wildtyp-Muskelzellen angefertigt und die GluT4-Expression in diesem Gewebe mit der in BMDC von Wildtyp-Mäusen und IRAP-defizienten Mäusen verglichen.

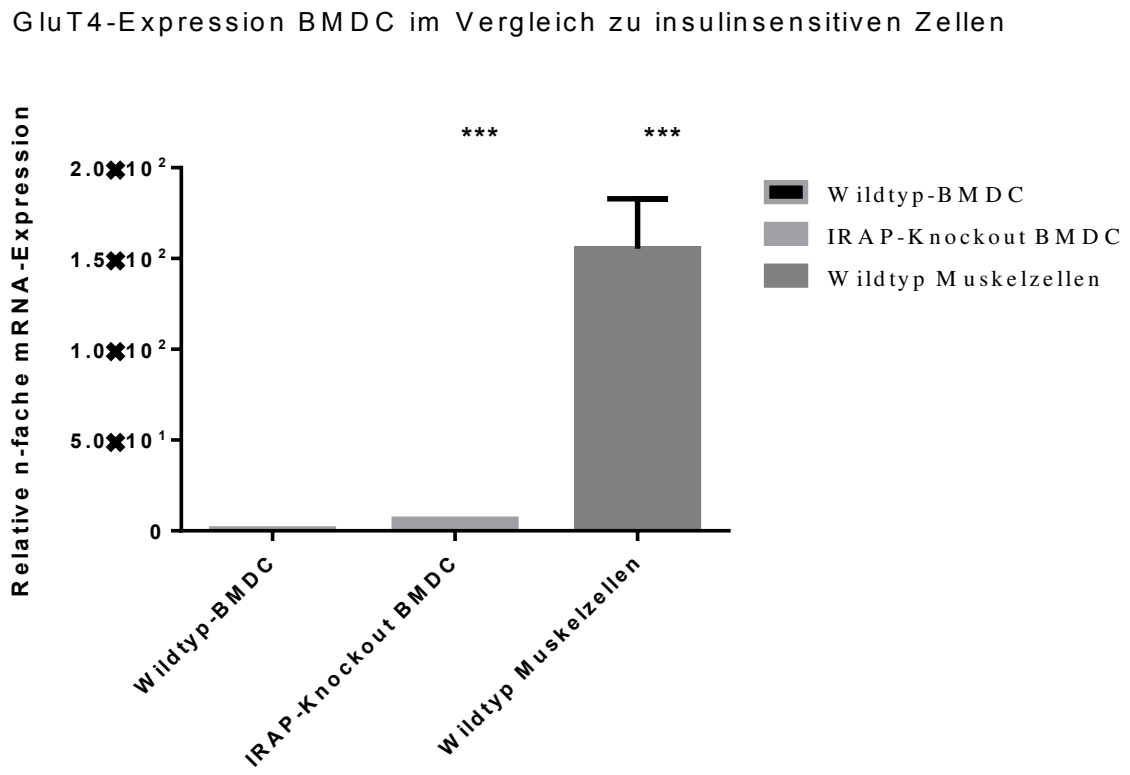

Abbildung 18: Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen GluT4-Expression von IRAP-KO-BMDC und Wildtyp-Muskelzellen im Vergleich zu Wildtyp-BMDC mit Fehlerbalken und Standardabweichung. ***p < 0,001

Abbildung 18 zeigt die Mittelwerte der GluT4-Expression von IRAP-defizienten BMDC und Wildtyp-Muskelzellen im Vergleich zu IRAP-Wildtyp-BMDC. Es fällt auf, wie viel größer der Unterschied in der GluT4-Expression zwischen Wildtyp-Muskelzellen und Wildtyp-BMDC ist als der Unterschied zwischen den beiden BMDC-Gruppen. Die Muskelzellen weisen eine 150-mal höhere GluT-Expression auf als die Wildtyp-BMDC. Im Vergleich zu den IRAP-defizienten BMDC ist es eine 24-mal höhere GluT4-Expression. Alle auf Abbildung 18 repräsentierten Unterschiede sind signifikant.

4 Diskussion

In dieser Studie wurde die Aktivität des mTOR-Komplex im Zusammenhang mit IRAP untersucht. Hierfür wurden das Wachstums- und Proliferationsverhalten unterschiedlicher Zellen, direkte mTOR-Substrate in BMDC und Aktivatorproteine von mTOR im IRAP-Knockout-Mausmodell und im Wildtyp-Mausmodell zum Vergleich untersucht.

Im Gastlabor existierten Hinweise dafür, dass die Funktion von mTOR in IRAP-defizienten Zellen reduziert ist: IRAP-defiziente BMDC wiesen deutlich mehr Autophagie-Aktivität auf, ein Prozess, der durch mTOR inhibiert wird. Dass IRAP in einer Form in der höchst komplexen mTOR-Signalkaskade eingebunden sein könnte, war eine vorstellbare Hypothese: In den intensiv studierten insulinsensitiven Zellen wie Fett- und Muskelzellen wird IRAP bekanntermaßen über den PI3K/Akt-Signalweg aktiviert. Akt ist gleichzeitig Regulator und Effektor von mTOR. Auch in dendritischen Zellen ist das Modell einer Wechselwirkung von IRAP und mTOR denkbar: Das Gastlabor fand heraus, dass IRAP eventuell mit AS160 und sicher mit Rab14 in einem Endosom kolokalisiert. AS160 ist ein direktes Substrat von Akt und Rab14 wird vermutlich über AS160 reguliert, ist also ein sekundäres Target von Akt.

Im folgenden Abschnitt werden nacheinander die Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert.

4.1 Herabgesetzte mTOR-Aktivität

4.1.1 Verlangsamtes Wachstumsverhalten im IRAP-Knockout

In dieser Arbeit konnte anhand von Wachstumskurven festgestellt werden, dass einige IRAP-defiziente Zelllinien (MEF und BMDC) deutlich langsamer wachsen als der Wildtyp-Vergleich. Das Proliferationsverhalten verschiedener IRAP-defizienter Zellinien im Vergleich zum Wildtyp wurde noch nie anhand von Wachstumskurven überprüft. Keller und ihre Arbeitsgruppe untersuchten Größe und Entwicklung der IRAP-

Knockout-Mäuse: Sie wogen die Mäuse alle 30 Tage zwischen den Lebenstagen 30 und 150 und nach einem Lebensjahr und konnten keine signifikanten Unterschiede feststellen[16]. Dies ist ein interessantes Resultat, da es eine wichtige Funktion von mTOR abbildet. Verschiedene mTOR- oder S6K-Funktionseinschränkungen können in Fliege und Maus zu verminderter Zellgröße, Körpergröße und/oder Letalität führen, je nachdem wie schwerwiegend die Funktionseinschränkung ist[74]. Die S6K scheint im Wesentlichen für die Regulation der Zellgröße verantwortlich zu sein[74]. Die in dieser Studie gemessenen Proliferationsunterschiede zwischen Wildtyp- und IRAP-defizienten Mauszellen könnten also eventuell dadurch erklärt werden, dass nur ein bestimmtes mTOR-Substrat für die Proliferation verantwortlich ist und nur dieses im IRAP-Knockout verändert ist. Dowling et al. untersuchten die Funktion der 4-EBP und konnten zeigen, dass diese hauptächlich für Proliferation und nicht für Zellgröße verantwortlich sind[75].

Insgesamt lässt sich vermuten, dass die mit der IRAP-Defizienz einhergehende mTOR-Funktionseinschränkung sich lediglich unter kontrollierten Zellkulturbedingungen zeigt, nicht aber im größeren Maßstab des Gesamtorganismus. Dafür spricht, dass IRAP-Knockout-Mäuse ohne große gesundheitliche Einschränkungen lebensfähig sind, was bei einem massiven mTOR-Defizit nicht zu erwarten wäre.

Bei der Beurteilung von Wachstumskurven muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass sie durch das manuelle Auszählen der Zellen vergleichweise stark fehlerbehaftet sein können. In dieser Arbeit wurden die Wachstumskurven für MEF und BMDC jeweils drei Mal angefertigt, um Fehlerquellen zu minimieren. Ein weiteres Fehlerrisiko ergibt sich durch die Verwendung von Zelllinien, da kulturbedingt eine ständige Selektion auf die Zellpopulation ausgeübt wird, die zu linienspezifischen Unterschieden führen kann. Durch die Verwendung zweier unabhängiger Zelllinienpaare sowie niedrigen Passagezahlen wurde in dieser Arbeit versucht, den Einfluss dieser Faktoren möglichst gering zu halten.

Weitergehend ließe sich diskutieren, inwiefern zelltypspezifische Unterschiede in der mTOR-Signalkaskade zu den beobachteten Effekten beitragen. Gewebespezifische

Unterschiede in der IRAP-Expression könnten ebenfalls eine Rolle spielen. Schlussendlich kann mit den durchgeführten Experimenten nicht ausgeschlossen werden, dass es noch einen anderen Mechanismus gibt, der die Proliferationsverlangsamung erklärt.

4.1.2 mTOR Substrate

Akt und S6K lagen in unseren Experimenten in IRAP-defizienten BMDC weniger stark phosphoryliert vor als im Wildtyp. Dies weist auf eine verminderte Aktivität von mTORC1 und mTORC2 hin. Die Akt-Analysen der unbehandelten Zellen zeigen eine vermehrte Phosphorylierung von Akt im Wildtyp im Vergleich zum IRAP-Knockout. Nach der Rapamycin-Behandlung wurde bei gleicher Menge an Gesamt-Akt in den IRAP-defizienten Zellen mehr Akt phosphoryliert. Rapamycin inhibiert mTORC1, Akt ist ein Substrat von mTORC2. Es ist also zu erwarten, dass die Akt-Phosphorylierung durch eine Rapamycin-Behandlung nicht beeinträchtigt wird. Unklar ist, warum sich das Verhältnis ändert und die IRAP-defizienten Zellen nach Rapamycin-Behandlung vermehrt Akt phosphorylieren.

In den S6K-Analysen sehen wir einen deutlichen Mengenunterschied zwischen Wildtyp und IRAP-Knockout, dies weist auf eine verminderte mTORC1-Aktivität im IRAP-Knockout hin. Die Rapamycin-Behandlung war demnach erfolgreich, sie führt zu kompletter Inhibition der Phosphorylierung von S6K. Dies ist also ein weiterer Hinweis auf eine mTORC1-Aktivitätsminderung bei IRAP-Defizienz und insofern kompatibel mit den Ergebnissen der Wachstumskurven. Allerdings gibt es in der Literatur Hinweise, dass die S6K eher mit der Regulation der Zellgröße als der Proliferation in Zusammenhang steht, was wir mit unseren Ergebnissen nicht bestätigen konnten[74].

Für die Mengen an Phospho-4EBP sehen wir keinerlei Unterschied zwischen Wildtyp und IRAP-Knockout, auch nicht nach Rapamycin-Behandlung. Dieses Ergebnis ist überraschend. Rapamycin inhibiert mTORC1 und müsste somit einen Effekt auf die Phosphorylierungslevels von 4EBP haben vergleichbar mit dem Effekt auf S6K. In der

Literatur finden wir allerdings Hinweise, dass nach Langzeitbehandlungen mit dem Wirkstoff eine rapamycinresistente Phosphorylierung von 4EBP beginnt. Choo et al. zeigen, dass Rapamycin in einer Konzentration von 20 nM in den ersten drei Stunden eine Inhibition der Phosphorylierung von 4EBP erreicht, diese allerdings ab dann abnimmt und schon sechs Stunden nach Beginn der Behandlung die 4EBP-Phosphorylierung rapamycinresistent stattfindet[76]. Unsere Zellen waren zwar nur drei Stunden in Rapamycin inkubiert, dafür aber in einer deutlich höheren Konzentration (0,5 µM). Außerdem zeigt die Studie von Choo et al. keine Messung zwischen drei und sechs Stunden und demnach ist es schwer, die Phosphorylierungskinetik in dieser Zeit einzuschätzen. Demnach könnte beispielsweise bereits nach vier Studen ein großer rapamycinresistenter Effekt stattfinden, der sich in dem hier durchgeführten Experiment nach vorn verschoben hat. Gingras et al. finden auch eine rapamycinresistente Phosphorylierung von 4EPB[77]. Überraschend ist darüber hinaus, dass die Phosphorylierung der 4-EBP in unbehandelten IRAP-defizienten Zellen keinen Unterschied zum Wildtyp zeigt. Wie oben diskutiert, regulieren diese Proteine hauptsächlich die Proliferation einer Zelle und nach den Ergebnissen der Wachstumskurven wäre eine verminderte 4-EBP-Phosphorylierung denkbar gewesen. Da der Antikörper für 4-EBP nicht vorhanden war, konnte in dieser Arbeit lediglich Phospho-4-EBP gemessen werden. Wir haben also kein Ergebnis für 4-EBP in Wildtyp und IRAP-Knockout. Insofern sollte man mit der Interpretation dieses Ergebnisses vorsichtig sein.

Die Phosphorylierung von Akt ist ebenfalls in IRAP-defizienten Zellen vermindert. Akt wird von mTORC2 an S473 phosphoryliert, dieses wird von der PI3K aktiviert – die PI3K ist also im IRAP-Knockout weniger aktiv.

Es existiert bisher keinerlei Literatur, die IRAP mit der mTOR-Signalkaskade in Zusammenhang stellt und es ist das erste Mal, dass mTOR-Substrate in IRAP-defizienten Zellen per Western Blot untersucht wurden. Die Ergebnisse passen sehr gut zu den Vorversuchen des Gastlabors, in denen vermehrte Autophagieaktivität im

IRAP-Knockout gemessen werden konnte. Die autophagiebezogenen Ergebnisse weisen genau wie die verminderte S6K-Phosphorylierung auf eine mTORC1-Defizienz hin. Zusammen mit den Akt-Western-Blots ergibt sich eher das Bild einer kombinierten Funktionseinschränkung. Dies ist nicht verwunderlich, da Akt als simultaner Regulator und Effektor von mTOR eine sehr spezielle Rolle hat und damit zur Komplexität der regulatorischen Schaltkreise beiträgt.

4.2 Kein detektierter Einfluss von IRAP auf die Regulatoren von mTOR

4.2.1 LAT1-Expression

Der Aminosäurentransporter CD89 oder LAT1 ist ein wichtiger Aktivator von mTOR, da er Aminosäuren zur Verfügung stellt. Die Expression dieses Transporters war nicht sigifikant unterschiedlich in Wildtyp- und IRAP-defizienten BMDC. Es existiert keine Literatur, die LAT1 mit IRAP in Zusammenhang stellt. Die Hypothese, dass LAT1 eventuell ein Effektorprotein sein könnte, an dem IRAP wirkt, wurde vom Gastlabor aufgestellt, da dieser Transporter in einer Massenspektometrie zusammen mit IRAP in frühen Phagosomen identifiziert wurde. Eine Kolokalisation von IRAP mit dem Transporter ist demnach nicht unwahrscheinlich, jedoch führt diese nicht zu einem Expressionsdefizit von LAT1 in IRAP-defizienten Zellen, dies ist somit auch keine Erklärung für die herabgesetzte mTOR-Aktivität.

4.2.2 Glucosetransporter

4.2.2.1 Glucosetransporterexpression in dendritischen Zellen

In dieser Arbeit konnten die Glucosetransporter GluT1, GluT3 und GluT4 in dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich eher um eine vergleichsweise schwache Expression. Der qPCR-Vergleich mit den Muskelzellen zeigte, dass diese GluT4 in 155-mal höherer Menge exprimieren als die Wildtyp-BMDC. Literatur zur Expression von Glucosetransportern in dendritischen Zellen gibt es keine. Maratou et al. forschten an der Expression von GluT1, GluT3 und GluT4 in humanen

Leukozyten[78]. Mithife von Durchflusszytometrieversuchen fanden sie heraus, dass GluT1, GluT3 und GluT4 an den Zelloberflächen von B-Zellen, T-Zellen, Monozyten, Granulozyten und NK-Zellen exprimiert werden. Unterschiede fanden sie in der Expression nach Insulinstimulus zwischen ruhenden und aktivierten Zellen. Im Ruhezustand reagierten Monozyten und B-Zellen auf Insulinstimulus mit erhöhter GluT3- und GluT4-Expression. Alle anderen Zellen reagierten im Ruhezustand nicht auf den Insulinstimulus. Im aktivierten Zustand waren die Expressionen der drei Glucosetransporter sowie die Reaktivität auf Insulin erhöht. Die Autoren unterscheiden so insulinsensitive Leukozyten wie Monozyten und B-Zellen und insulininsensitive Zellen wie T-Zellen und Granulozyten. Dendritische Zellen wurden in dieser Arbeit leider nicht untersucht. Bezüglich der Daten dieser Dissertation wurde mit den Autoren Maratou und Dimitriadis Rücksprache gehalten: In deren Publikation wurde mit Durchflusszytometrie gearbeitet, diese Methode lässt leider keine Aussage über die Quantität der Glukosetransporter zu. Allerdings berichteten uns die Kollegen, dass sich die Identifikation der GluT in Vorversuchen mit Western Blots als sehr schwierig herausstellte, wie oben erwähnt versuchten die Autoren es in Monozyten, Granulozyten, B- und T-Zellen. Die Gruppe schaffte es nur mit extrem hohen Zelllysatmengen, die Glucosetransporter in Western Blots darzustellen. Unser Ergebnis zur Expression von GluT3 und GluT4 in dendritischen Zellen passt hierzu, auch in diesen Zellen ist sie vergleichsweise niedrig.

4.2.2.2 IRAP Wechselwirkung mit Glucosetransportern

Die Expression von GluT1,3 und GluT4 wurde in der mRNA von IRAP-defizienten BMDC gemessen und mit denen des Wildtyps verglichen. Wir fanden keinen signifikanten Unterschied für GluT1 und GluT3. Demnach scheint es eher unwahrscheinlich, dass IRAP eine Wechselwirkung mit einem dieser Transporter eingeht, die funktionelle Unterschiede im Energiestoffwechsel in IRAP-defizienten Zellen begründen könnte. Für GluT4 wurde ein signifikanter Unterscheid gefunden: Die IRAP-defizienten Zellen exprimierten in dieser Studie etwa sechsmal mehr GluT4 als die

Wildtyp-Zellen. Dies passt nicht zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die allerdings alle aus anderen Zelltypen stammen und mit anderen Methoden angefertigt wurden. In Adipozyten und Muskelzellen fanden Keller et al., dass IRAP mit GluT4 kolokalisiert[3]. Kellers Arbeitsgruppe konnte in Fett- und Muskelgewebe von Mäusen eine erniedrigte GluT4-Expression messen[16]. Die Kollegen wiesen diese Resultate mit Gelelektrophorese und Immunoblotting nach.

Auch in anderen Zellen versuchten Autoren bereits, eine Wechselwirkung von IRAP mit Glucosetransportern zu untersuchen: Fernando et al. fanden eine GluT4-IRAP-Kolokalisation in pyramidalen Neuronen des Hippocampus, die eine hohe GluT4-Expressivität haben, jedoch nicht in den Zellen des Cerebellums[79]. Diese Arbeitsgruppe untersuchte auch eine mögliche Kolokalisation von IRAP mit GluT3 und GluT8, die nicht bestätigt werden konnte[79]. Albiston et al. zeigten, dass IRAP und GluT4 auch in Zellen der Niere nicht kolokalisieren[80].

In dieser Arbeit wurde ein Unterschied in der GluT4-Expression zwischen Wildtyp-BMDC und IRAP-defizienten BMDC gefunden, dahingehend dass die IRAP-defizienten Zellen relativ etwa sechsmal mehr GluT4 exprimierten als die Wildtyp-Kontrollen. Dies widerspricht den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die finden, dass eine IRAP-Defizienz mit einer erniedrigten GluT4-Expression einhergeht[12]. Es gibt also in der GluT-4-Expression in IRAP-defizienten Zellen einen manifesten Unterschied zwischen dendritischen Zellen und insulinsensitiven Zellen. Mögicherweise hat eine IRAP-Defizienz durch einen noch unbekannten Mechanismus eine Auswirkung auf ein anderes Protein, das dann in dendritischen Zellen zu einer GluT4-Expressionserhöhung führt.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse dieser Dissertation mit der Literatur müssen die methodischen Unterschiede der jeweiligen Arbeiten berücksichtigt werden: In dieser Dissertation wurde die Expression der GluT in mRNA untersucht, während die anderen hier zitierten Autoren die Expression auf Zelloberflächen (per FACS) oder die Kolokalisationen der Proteine (mit Fluoreszenzmikroskopen) messen. Die qPCR misst die Ableseaktivität eines Gens über dessen mRNA-Aktivität. Zu beachten ist dabei, dass

sich nicht unmittelbar die Stärke der Proteinsynthese ableiten lässt und grundsätzlich auch keine Aussage über die Lokalisation des Proteins getroffen werden kann. Dieses kann intrazellulär oder an der Zelloberfläche situiert sein. Ergebnisse aus qPCR-Versuchen sind aufgrund ihrer Abhängigkeit von den „Housekeeping Genes“ unter Vorbehalt zu interpretieren. Hier wurden zwei „Housekeeping Genes“ benutzt, trotzdem kann es zu Fehlern kommen, wenn diese von der zu untersuchenden Zielstruktur beeinflusst werden. Ferner muss bei den Versuchen dieser Arbeit berücksichtigt werden, dass es sich nur um Ex-vivo-Daten handelt. Kulturbedingungen in vitro geben bekanntermaßen die komplexe physiologische Umgebung nur begrenzt wieder, so kann es zu von der In-vivo-Situation abweichenden Aussagen kommen. Ein Vorteil unserer Versuche gegenüber anderen ist, dass qPCR auch kleine Mengen Protein detektieren können und dass diese Methode eine Aussage über Quantitäten erlaubt. Das ist auch die wichtige Einschränkung unseres Ergebnisses, die im oberen Abschnitt bereits diskutiert wurde: GluT4 scheint in dendritischen Zellen nur in sehr geringer Menge vorhanden zu sein, sowohl in den Wildtyp-BMDC als auch in den IRAP-defizienten BMDC.

4.3 Reevaluation der Arbeitshypothesen

H1: IRAP hat eine Bedeutung für den mTOR-Signalweg und eine IRAP-Defizienz geht mit einer verminderten mTOR-Aktivität einher.

Diese Hypothese wurde bestätigt.

H2: IRAP steht in einer regulatorischen Beziehung mit LAT1, einem wichtigen Upstream-Faktor von mTORC1.

Diese Hypothese kann abgelehnt werden.

H3: IRAP geht auch in dendritischen Zellen eine regulatorische Wechselwirkung mit einem Glucosetransporter ein.

Diese Hypothese kann nicht abschließend beantwortet werden.

4.4 Klinischer Bezug der Arbeit

Im klinischen Kontext sind die Ergebnisse dieser Arbeit äußerst interessant. Die Arbeitsgruppen, die IRAP im onkologischen Zusammenhang untersucht haben, assoziierten IRAP mit einem maligneren Verhalten des Tumors: Ino et al. bewiesen eine positive Korrelation zwischen der IRAP-Expression von Endometrium-CA-Zellen und einen Fortschritt des histologischen Grades, Staging, myometrialer Invasion des Tumors und vaskulärer Infiltration[81]. Die Autoren schlugen als Erklärung dafür den aufgehobenen protektiven Effekt von Oxytocin vor. Auf Grundlage der Ergebnisse und Überlegungen dieser Dissertation lässt sich spekulieren, ob jene Effekte nicht auch über eine veränderte mTOR-Funktion zu erklären sind. In zahlreichen onkologischen Erkrankungen ist der Effekt von mTOR bereits gut untersucht; die Signalkaskade ist im Zusammenhang mit Tumorgenese und –zellproliferation, auch über Neoangiogenese bedeutsam[82]. In diesem Kontext wäre es hochinteressant, die mTOR-Funktion in IRAP-positiven Karzinomzellen zu untersuchen und mit IRAP-negativen Karzinomzellen zu vergleichen. Sollten sich die Resultate für das Endometrium- und Zervix-CA bestätigen, könnten IRAP-Inhibitoren eine additive Therapiemöglichkeit für diese onkologischen Erkrankungen darstellen.

Nicht nur im onkologischen Zusammenhang könnte eine IRAP-Inhibition therapeutisch genutzt werden. IRAP-Inhibitoren haben aufgrund ihrer antidementiven Wirkung bereits Einzug in die Forschung gefunden[83].

4.5 Ausblick

Die mTOR-Aktivität im Zusammenhang mit IRAP erfordert weitere Studien. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, mit neuen Methoden wie z. B. der Genexpressionsanalyse mit Microarray oder Next Generation Sequencing den mTOR-Pathway zu untersuchen. Die Arbeitsgruppe von Ikenoue hat verschiedene Methoden publiziert, mit denen die mTOR-Aktivität überprüft werden kann: Außer direkter mTOR-Substratmessung per Western Blot, was in dieser Dissertation erfolgt ist, stellt die

Arbeitsgruppe einen In-vitro-Assay vor, das die mTOR-Aktivität misst, und zeigt, wie die mTOR-Aktivität im Gewebe mit Immunhistochemie untersucht werden kann[84].

Wenn das mTOR-Defizit in IRAP-defizienten BMDC mit weiteren Untersuchungen bestätigt werden kann, sollte man sich der Frage widmen, ob es auch in insulinsensitivem Gewebe zu finden ist. Mit den gleichen Methoden wäre eine Untersuchung der mTOR-Aktivität in Muskelzellen interessant. Da dort die Regulierung besser verstanden ist, könnte dies unter Umständen Aufschluss auf analoge Signalwege in anderen Zelltypen geben.

Zudem könnte untersucht werden, ob die Beziehung zwischen IRAP und mTOR wechselseitig ist. Wie verhält sich die Expression von IRAP in einem mTOR-defizienten Zellmodell? Kann IRAP in einem mTOR-defizienten DC-Modell weiterhin eine einwandfreie Kreuzpräsentation garantieren?

4.6 Fazit

Zusammenfassend ergeben sich aus dieser Dissertation zwei wichtige Hauptergebnisse: Erstens ist die Expression der Glucosetransporter GluT1 und GluT3 in dendritischen Zellen mit IRAP-Knockout nicht verändert. Die Glucosetransporter-4 werden vermehrt in IRAP-defizienten BMDC exprimiert. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die jedoch andere Methoden benutzt haben.

Zweitens liegen Hinweise vor, dass eine IRAP-Defizienz mit einer eingeschränkten mTOR-Funktion einhergeht. Dass die Ergebnisse nicht kongruent sind, ist bei der Komplexität der mTOR-Signalkaskade nicht verwunderlich. Dadurch, dass der IRAP-defiziente Phänotyp keine massiven mTOR-Fehlfunktionen aufweist, muss man auch die Möglichkeit in Erwägung ziehen, dass IRAP nicht essenziell für eine physiologische mTOR Funktion ist, jedoch mTOR auf bisher unbekannte Weise aktivieren kann. Diese Aktivierung fiele dann im IRAP-Knockout weg, was sich anhand der vermindert phosphorylierten mTOR-Substrate und der eingeschränkten Zellproliferation zeigt. Als Erklärung für den Einfluss von IRAP auf den mTOR-Signalweg käme ein

Rückkopplungsmechanismus auf Akt infrage. In dem Modell in insulinsensitiven Zellen wird IRAP durch Akt aktiviert. Man könnte sich vorstellen, dass IRAP einen positiven Rükkopplungsmechanismus auf Akt oder einen anderen Mitspieler der mTOR-Signalkaskade ausübt. Dieser führt im Wildtyp zu einer vermehrten Aktivität und fällt im IRAP-Knockout weg, sodass die TOR-Funktion abnimmt. Es gibt mehrere Modelle, welche die eingeschränkte mTOR-Aktivität, die mit einer IRAP-Defizienz einherzugehen scheint, erklären könnten: IRAP könnte einen direkten regulatorischen Einfluss auf mTOR oder auf ein Substrat der mTOR-Signalkaskade haben. Auch könnte die Wirkung über eine Komplexbildung zwischen IRAP und einem anderen Protein zu erklären sein. Vorstellbar ist auch, dass das IRAP-Vesikel die entscheidende Rolle für die Funktionalität der mTOR-Signalkaskade spielt. Es könnte sich um eine sogenannte „Signaling Platform“ handeln, ob mit direkter Wirkung von IRAP auf mTOR oder nicht. Ein solches Modell ist z. B. von Schenck et al. in Zusammenhang mit Rab5 und der Akt-Signalkaskade präsentiert worden: Das APPL1-Endosom ist hier eine sogenannte „Signaling Platform“, in der internalisierte Rezeptoren an die Membran reguliert werden, um dort in Präsenz von Rab5 die Akt-Signalkaskade zu leiten[85]. Das APPL1-Endosom ist als Signaling Platform interessanterweise auch für die Funktionalität anderer Signalkaskaden notwendig, wie z. B. der von TLR[86]. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Dissertation wäre es also vorstellbar, dass das IRAP-Endosom eine solche Signalplattform darstellt, eventuell andere internalisierte Rezeptoren im IRAP-Vesikel an der Oberfläche mit anderen Proteinen interagieren und so einen Effekt auf die Funktionalität der mTOR-Signalkaskade haben.

Ein anderer Erklärungsansatz für das aus dieser Studie resultierende Gesamtbild könnte auch an folgendes Modell anknüpfen: Die Arbeitsgruppe von Kraniou zeigte, dass eine erhöhte AMPK-Aktivität (z. B. bei physischer Belastung) in Muskelzellen zu einer vermehrten GluT4-Genexpression (per PCR gemessen) führt[87]. Eine ausgeprägte AMPK-Aktivität in DC würde auch zu eingeschränkter mTOR1-Funktion führen und wäre somit eine mögliche Erklärung für beide Hauptergebnisse dieser Studie, wenn GluT4

auch in BMDC über AMPK reguliert wird. Die Beantwortung dieser Frage würde helfen, weitere Einsicht über den regulatorischen Zusammenhang zwischen der mTOR-Signalkaskade und IRAP zu gewinnen.

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Antidiuretisches Hormon
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
BMDC	Bone Marrow derived Dendritic Cell
DC	Dendritische Zelle
4EBP1	Eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) Binding Protein-1
EEA1	Early Endosome Antigen 1
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAP	Endoplasmatic Reticulum Aminopeptidase
FCS	Fetales Kalbserum
GLUT	Glucosetransporter
GMCSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
IFN—Û	Interferon-gamma
IGF	Insulin-like Growth Factor
IgE	Immunglobulin E
IRAP	Insulinregulierte Aminopeptidase
KO	Knockout
LPS	Lipopolysaccharide

MEF	Murine Embryonale Fibroblasten
MHC	Major Histocompatibility Complex
MTOR	Mechanistic Target of Rapamycine
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIK3	Phosphoinositid-3-Kinasen
P-LAP	Plazentare Leucin-Aminopeptidase
RT	Reverse Transkriptase
SDS PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
STX6	Syntaxin-6
TAP	Transporter associated with Antigen Processing
TCR	T-Zell-Rezeptor
TREG	Regulatorische T-Zelle
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Literaturverzeichnis

1. Saveanu L, Carroll O, Weimershaus M, Guermonprez P, Firat E, Lindo V, Greer F, Davoust J, Kratzer R, Keller SR, Niedermann G, van Endert P. IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. Science 2009;325:213-7.
2. Tsujimoto M, Hattori A. The oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases. Biochim Biophys Acta 2005;1751:9-18.
3. Keller SR, Scott HM, Mastick CC, Aebersold R, Lienhard GE. Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut4 vesicles. J Biol Chem 1995;270:23612-8.
4. Birnbaum MJ. Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. Cell 1989;57:305-15.
5. James DE, Strube M, Mueckler M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. Nature 1989;338:83-7.
6. Kandror KV, Pilch PF. Gp160, a tissue-specific marker for insulin-activated glucose transport. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91(17): 8017-21.
7. Mastick CC, Aebersold R, Lienhard GE. Characterization of a major protein in GLUT4 vesicles. Concentration in the vesicles and insulin-stimulated translocation to the plasma membrane. J Biol Chem 1994;269:6089-92.
8. Mizutani S, Tomoda Y. Effects of placental proteases on maternal and fetal blood pressure in normal pregnancy and preeclampsia. Am J Hypertens 1996;9:591-7.
9. Tsujimoto M, Mizutani S, Adachi H, Kimura M, Nakazato H, Tomoda Y. Identification of human placental leucine aminopeptidase as oxytocinase. Arch Biochem Biophys 1992;292:388-92.

10. Saveanu L, Van Endert P. The Role of Insulin-Regulated Aminopeptidase in MHC Class I Antigen Presentation. Front Immunol 2012;3.
11. Mizutani S, Tomoda Y. Oxytocinase: Placental Cystine Aminopeptidase or Placental Leucine Aminopeptidase (P-LAP). Semin Reprod Med 1992;10:146-53.
12. Keller SR. The insulin-regulated aminopeptidase: a companion and regulator of GLUT4. Front Biosci 2003;8:410-20.
13. Gonzalez E, McGraw TE. Insulin-modulated Akt subcellular localization determines Akt isoform-specific signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:7004-9.
14. Reed SE, Hodgson L, Song S, May MT, Kelly EE, McCaffrey MW, Mastick CC, Verkade P, Tavare JM. A role for Rab14 in the endocytic trafficking of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. Journal of Cell Science 2013;126:1931-41.
15. Larance M, Ramm G, Stöckli J, van Dam EM, Winata S, Wasinger V, Simpson F, Graham M, Junutula JR, Guilhaus M, James DE. Characterization of the role of the Rab GTPase-activating protein AS160 in insulin-regulated GLUT4 trafficking. J Biol Chem 2005;280:37803–13.
16. Keller SR, Davis AC, Clairmont KB. Mice deficient in the insulin-regulated membrane aminopeptidase show substantial decreases in glucose transporter GLUT4 levels but maintain normal glucose homeostasis. J Biol Chem 2002;277:17677-86.
17. Jiang H, Li J, Katz EB, Charron MJ. GLUT4 ablation in mice results in redistribution of IRAP to the plasma membrane. Biochem Biophys Res Commun 2001;284:519-25.
18. Maianu L, Keller SR, Garvey WT. Adipocytes exhibit abnormal subcellular distribution and translocation of vesicles containing glucose transporter 4 and insulinregulated aminopeptidase in type 2 diabetes mellitus: implications regarding defects in vesicle trafficking. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:5450-6.
19. Keller SR. Role of the insulin-regulated aminopeptidase IRAP in insulin action and diabetes. Biol Pharm Bull 2004;27:761-4.
20. Wu-Wong JR, Berg CE, Wang J, Chiou WJ, Fissel B. Endothelin Stimulates Glucose Uptake and GLUT4 Translocation via Activation of Endothelin ETA Receptor in 3T3-L1 Adipocytes. The Journal of Biological Chemistry 1999;274:8103-10.

21. Thoidis G, Kandror KV. A Glut4-vesicle marker protein, insulin-responsive aminopeptidase, is localized in a novel vesicular compartment in PC12 cells. Traffic 2001;2: 577-87.

22. Liao H, Keller SR, Castle JD. Insulin-regulated aminopeptidase marks an antigenstimulated recycling compartment in mast cells. Traffic 2006;7:155-67.

23. Nakamura H, Itakuara A, Okamura M, Ito M, Iwase A, Nakanishi Y, Okada M, Nagasaka T, Mizutani S. Oxytocin stimulates the translocation of oxytocinase of human vascular endothelial cells via activation of oxytocin receptors. Endocrinology 2000;141:4481-5.

24. Masuda S, Hattori A, Matsumoto H, Miyazawa S, Natori Y, Mizutani S, Tsujimoto M. Involvement of the V2 receptor in vasopressin-stimulated translocation of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in renal cells. European Journal of Biochemistry 2003;270:1988-94.

25. Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. Oncogene 2004;23:3151–71.

26. Heath WR, Belz GT, Behrens GMN, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, Davey GM, Wilson NS, Carbone FR, Villadangos JA. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. Immunological Reviews 2004;199:9-26.

27. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. Cell 2001;106:255-8.

28. Hershko A, Chiechanover A. The ubiquitin system. Annu Rev Biochem 1998;67:425-279.

29. Abele R, Tampe R. The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing. Physiology (Bethesda) 2004;19:216-24.

30. Fruci D, Niedermann G, Butler RH, Van Endert PM. Efficient MHC Class I-Independent Amino-Terminal Trimming of Epitope Precursor Peptides in the Endoplasmic Reticulum. Immunity 2001;15:467-76.

31. Saric T Chang SC, Hattori A, York IA, Markant S, Rock KL, Tsujimoto M, Goldberg AL. An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. Nat Immunol 2002;12:1169-76.

32. Chang SC, Momburg F, Bhutani N, Goldberg AL. The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a “molecular ruler” mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:17107-12.

33. Georgiadou D, Hearn A, Evnouchidou I, Chroni A, Leondiadis L, York I, Rock K, Stratikos E. Placental leucine aminopeptidase efficiently generates mature antigenic peptides in vitro but in patterns distinct from endoplasmic reticulum aminopeptidase 1. J Immunol 2010;185:1584-92.

34. Amigorena S, Savina A. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. Current opinion in immunology 2010;22:109-17.

35. Wallis MG, Lankford M, Keller SR. Vasopressin is a physiological substrate for the insulin-regulated aminopeptidase IRAP. Am J Physiol Endocrinol Metab 2007;293:E1092-E110.

36. Rogi T, Tsujimoto M, Nakazato H, Mizutani S, Tomoda Y. Human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase. A new member of type II membrane-spanning zinc metallopeptidase family. J Biol Chem 1996;271:56-61.

37. Yamahara N, Nomura S, Suzuki T, Itakura A, Ito M, Okamoto T, Tsujimoto M, Nakazato H, Mizutani S. Placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in maternal serum and placenta during normal pregnancy. Life Sci 2000;66:1401-10.

38. Pilar Carrera M. Insulin-regulated aminopeptidase/placental leucil Aminopeptidase (IRAP/P-lAP) and angiotensin IV-forming activities are modified in serum of rats with breast cancer induced by N-methyl-nitrosourea. Anticancer Res 2006;26:1011-4. .

39. Kobayashi H. The significance of serum leucine aminopeptidase (P-LAP) determination in the gynecological malignancies. Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi 1985;37:696-702.

40. Strunecká A, Hynie S, Klenerová V. Role of oxytocin/oxytocin receptor system in regulation of cell growth and neoplastic processes. Folia Biol 2009;55:159-65.

41. Shibata K, Kikkawa F, Kondo C, Mizokami Y, Kajiyama H, Ino K, Nomura S, Mizutani S. Placental leucine aminopeptidase (P-LAP) expression is associated with chemosensitivity in human endometrial carcinoma. Gynecol Oncol 2004 2004;95:307-13.

42. Pham V, Burns P, Albiston AL, Yeatman HR, Ng L, Diwakarla S, Chai SY. Reproduction and maternal behavior in insulin-regulated aminopeptidase (IRAP) knockout mice. Peptides 2009;30:1861-5.

43. Nakada TA, Russell JA, Wellman H, Boyd JH, Nakada E, Thain KR, Thair SA, Hirasawa H, Oda S, Walley KR. Leucyl/cystinyl aminopeptidase gene variants in septic shock. Chest 2011;139:1042-9.

44. Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, Lee J, Mendelsohn FA, Simpson RJ, Connolly LM, Chai SY. Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. J Biol Chem 2001;76:48623-6.

45. Lew RA, Mustafa T, Ye S, McDowall SG, Chai SY, Albiston AL. Angiotensin AT4 ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP). J Neurochem 2003;86:344-50.

46. Albiston AL, Morton CJ, Ng HL, Pham V, Yeatman HR, Ye S, Fernando RN, De Bundel D, Ascher DB, Mendelsohn FA, Parker MW, Chai SY. Identification and characterization of a new cognitive enhancer based on inhibition of insulin-regulated aminopeptidase. FASEB J 2008;22:4209-17.

47. Ye S, Chai SY, Lew RA, Albiston AL. Insulin-regulated aminopeptidase: analysis of peptide substrate and inhibitor binding to the catalytic domain. Biological Chemistry 2007;388:399-403.

48. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. Nat Rev Mol Cell Biol 2011;12(1):21-35.

49. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, Schreiber SL. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. Nature 1994;369(6483):756-8.

50. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. Cell 1994;78(1):35-43.

51. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. Science 1991; 253(5022):905-9.

52. Keith CT, Schreiber SL. PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. Science 1995;270(5233):50-1.

53. Bjornsti MA, Houghton PJ. The tor pathway: a target for cancer therapy. Nature Reviews Cancer 2004;4:335-48.

54. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR Signaling in Growth and Metabolism. Cell 2006;124:471–84.

55. Sarbassov DD Ali AM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. Molecular Cell 2006;22:159-68.

56. White EJ, Martin V, Liu JL, Klein SR, Piya S, Gomez-Manzano C, Fueyo J, Jiang H. Autophagy regulation in cancer development and therapy. Am J Cancer Res 2011;1:362-72.

57. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. Cell 2005;121:179-93.

58. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. Science 2005;307:1098–101.

59. Huang J, Manning BD. A complex interplay between Akt, TSC2, and the two mTOR complexes. Biochem Soc Trans 2009;37:217-22.

60. Hara K, Yonezawa K, Weng QP, Kozlowski MT, Belham C, Avruch J. Amino Acid Sufficiency and mTOR Regulate p70 S6 Kinase and eIF-4E BP1 through a Common Effector Mechanism. The Journal of Biological Chemistry 1998;273:14484-94.

61. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. Genes & Dev 2004;18:1926-45

62. Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. Science 2008;320:1496-501.

63. Nicklin P, Bergman P, Zhang B,Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, Yang H, Hild M, Kung C, Wilson C, Myer VE, MacKeigan JP, Porter JA, Wang YK, Cantley LC, Finan PM, Murphy LO. Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates mTOR and Autophagy. Cell 2009;136:521-34.

64. Cohen A, Hall MN. An Amino Acid Shuffle Activates mTORC1. Cell 2009;136:399-400.

65. Inoki K, Corradetti MN, Guan K-L. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. Nature Genetics 2004;37:19-24.

66. Huang S, Houghton PJ. Targeting mTOR signaling for cancer therapy. Current Opinion in Pharmacology 2003;3:371-7.

67. Khamzina L, Veilleux A, Bergeron S, Marette A. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. Endocrinology 2005 146:1473-81. .

68. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J, Thomas G. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. Nature 2004;431:200-5.

69. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, Pahor M, Javors MA, Fernandez E, Miller RA. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. Nature 2009;460:392-5.

70. Weimershaus M, Van Endert P. Preparation of dendritic cells by in vitro cultures. Methods Mol Biol 2013.

71. Alatery A, Basta S. An efficient culture method for generating large quantities of mature mouse splenic macrophages. Journal of Immunological Methods 338 2008.

72. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976:248-54.

73. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature Reviews Molecular Cell Biology 1970;227:680 -5.

74. Murakami M, Ichisaka T, Maeda M, Oshiro N, Hara K, Edenhofer F, Kiyama H, Yonezawa K, Yamanaka S. mTOR Is Essential for Growth and Proliferation in Early Mouse Embryos and Embryonic Stem Cells. Mol Cell Biol 2004 24:6710-8.

75. Dowling RJ, Topisirovic I, Alain T, Bidinosti M, Fonseca BD, Petroulakis E, Wang X, Larsson O, Selvaraj A, Liu Y, Kozma SC, Thomas G, Sonenberg N. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. Science 2010;328:1172-6. .

76. Choo AY, Yoon SO, Kim SG, Roux PP, Blenis J. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:17414-9.

77. Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, Polakiewicz RD, Wyslouch-Cieszynska A, Aebersold R, Sonenberg N. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. Genes Dev 2001;15:2852-64.

78. Maratou E, Dimitriadis G, Kollias A, Boutati E, Lambadiari V, Mitrou P, Raptis SA. Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells. Eur J Clin Invest 2007;37:282-90.

79. Fernando RN, Albiston AL, Chai SY. The insulin-regulated aminopeptidase IRAP is colocalised with GLUT4 in the mouse hippocampus--potential role in modulation of glucose uptake in neurones? Eur J Neurosci 2008;28:588-98.

80. Albiston AL, Yeatman HR, Pham V, Fuller SJ, Diwakarla S, Fernando RN, Chai SY. Distinct distribution of GLUT4 and insulin regulated aminopeptidase in the mouse kidney. Regulatory Peptides 2011;166:83–9.

81. Ino K, Shibata K, Kajiyama H, Kikkawa F, Mizutani S. Regulatory role of membrane-bound peptidases in the progression of gynecologic malignancies. Biological Chemistry 2005; 385:683-90.

82. Cornu M, Albert V, Hall MN. mTOR in aging, metabolism, and cancer. Curr Opin Genet Dev 2013;23(1):53-62.

83. Albiston A, Diwakarla S, Fernando RN, Mountford SJ, Yeatman HR, Morgan B, Pham V, Holien JK, Parker MW, Thompson PE, Chai SY. Identification and development of specific inhibitors for insulin-regulated aminopeptidase as a new class of cognitive enhancers. Br J Pharmacol 2011 164:37-47.

84. Ikenoue T, Hong S, Inoki K. Monitoring mammalian target of rapamycin (mTOR) activity. Methods Enzymol 2009;452:165-80.

85. Schenck A, Goto-Silva L, Collinet C, Rhinn M, Giner A, Habermann B, Brand M, Zerial M. The Endosomal Protein Appl1 Mediates Akt Substrate Specificity and Cell Survival in Vertebrate Development. Cell 2008;133:486-97.

86. Chau T-L, Göktuna SI, Rammal A,Casanova T, Duong H-Q, Gatot J-S, Close P, Dejardin E, Desmecht D, Shostak K, Chariot A A Role for APPL1 in TLR3/4-Dependent TBK1 and IKK« Activation in Macrophages. J Immunol 2015;194:3970-83.

87. Kraniou Y, Cameron-Smith D, Misso M, Collier G, Hargreaves M. Effects of exercise on GLUT-4 and glycogenin gene expression in human skeletal muscle. J Appl Physiol 2000;88:794 -6.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die IRAP und ihre Struktur schematisch dargestellt 1
Abbildung 2: Modelle zur Regulierung der IRAP-Vesikel. 4
Abbildung 3: Proteasomabhängiger und vakuolärer Weg der Kreuzpräsentation 6
Abbildung 4: Die mTOR-Signalkaskade, ihre zwei Komplexe mTORC1 und mTORC2 mit den jeweiligen wichtigen Up- und Downstreamkaskaden 9
Abbildung 5: Die mTOR-Sgnalkaskade, Substrate und Funktionen von mTORC1 und mTORC2 10
Abbildung 6: Glutaminabhängige Leucin-Aufnahme 14
Abbildung 7: Western-Blot-Apparatur 30
Abbildung 8: Mechanismus eines Western Blot 30
Abbildung 9: Arbeitsschritte der mRNA-Isolierung mit dem mRNASpinMini-Kit von GE Healthcare 32
Abbildung 10: Wachstumskurven der MEF. 42
Abbildung 11: Wachstumskurven der BMDC. 43
Abbildung 12: Wachstumskurven der Makrophagenkultur 45
Abbildung 13: Western Blots von Akt, Phospho-Akt, S6K, Phospho-S6K und Phospho-4EBP in Zelllysaten von BMDC mit und ohne Behandlung mit Rapamycin 47
Abbildung 14: Relative CD89/LAT1-mRNA-Expression von IRAP-defizienten BMDC im Vergleich zu Wildtyp-BMDC 47
Abbildung 15: PCR, Primer Testing für GluT1,3,4 48
Abbildung 16: PCR Testing mit Muskelzell-DNA 49
Abbildung 17: Glucose-Transporter in IRAP-defizienten BMDC 50
Abbildung 18: GluT4-Expression BMDC im Vergleich zu Muskelzellen 52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Technische Laborausstattung	17
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	18
Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien, Medien	20
Tabelle 4: Puffer und Lösungen	20
Tabelle 5: Antikörper	22
Tabelle 6. Reverse-Transkription-Mix	33
Tabelle 7: Dreischrittiges Temperaturprogramm	34
Tabelle 8: Primer	35
Tabelle 9: Reaktionsmischung PCR in einem Eppendorf	36
Tabelle 10: Phasen des Thermocycling	37
Tabelle 11: Zusammensetzung Mastermix	38

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Katharina Julia Huber, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Die Rolle der Insulin-regulierten Aminopeptidase für die mTOR-Signalkaskade

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum Unterschrift

Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Die Danksagung wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.