

**Rolle von Dipeptidylpeptidase 4 und Fibroblastenaktivierungsprotein alpha
sowie deren Proteinaseinhibitoren in der Tumorprogression**

Dissertation

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

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(Fachbereich Biochemie/Biotechnologie)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Diplom Biochemiker Jörg Stork

Gutachter /in

1. PD Dr. A. Kehlen
2. Prof. Dr. K. Giehl
3. Prof. Dr. R. Rudolph

Halle (Saale), den 30.06.2009

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung	1
1.1. Zell-Zell-Interaktionen	4
1.2. Zell-Matrix-Interaktionen.....	6
1.3. Tumor-Stroma-Interaktionen	8
1.4. Rolle von Proteasen in der Karzinogenese.....	9
1.4.1 Dipeptidylpeptidase 4.....	13
1.4.2 Fibroblastenaktivierungsprotein alpha	16
2. Aufgabenstellung.....	18
3. Material und Methoden	19
3.1. Materialien	19
3.1.1. Verwendete Chemikalien	19
3.1.2. Verwendete Geräte	20
3.1.3. Verwendete Antikörper	21
3.1.4. Verwendete Plasmid-Vektoren.....	22
3.1.5. Verwendete Zelllinien	22
3.1.6. Verwendete Inhibitoren	23
3.1.7. Verwendete Puffer.....	23
3.2. Methoden.....	25
3.2.1. Proteinchemische Methoden	25
3.2.1.1. Untersuchung der Interaktion von DP4 mit Fibronectin und Kollagen mittels Oberflächenplasmonresonanz.....	25
3.2.1.2. Bestimmung der Interaktion von DP4 mit Fibronectin und Kollagen mittels ELISA	27
3.2.1.3. Bestimmung der enzymatischen Aktivität	28
3.1.2.4. Extraktion der Gesamtproteine	28
3.1.2.5. Bestimmung der Proteinkonzentration	28
3.1.2.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
3.1.2.7. Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen	29
3.1.2.8. Immundetektion von immobilisierten Proteinen	29
3.2.2. Zellbiologische Methoden	30
3.2.2.1. Zellzucht	30
3.2.2.2. Einfrieren von Zellen	31
3.2.2.3. Transfektion von Zellen.....	32
3.2.2.4. Selektion transfizierter Zellen.....	32
3.2.2.5. Durchflusszytometrie.....	32
3.2.2.6. Bestimmung von DP4- und FAP-Aktivität auf Zellen	33
3.2.2.7. RNA-Gewinnung aus Zellen	33
3.2.2.8. Herstellung mikroskopischer Proben.....	34
3.2.2.9. Proliferationstest	34
3.2.2.10. Zelladhäsionsassay mittels fluorometrischer Messung.....	35
3.2.2.11. Zelladhäsionsassay mittels Zellzählung.....	35
3.2.2.12. Herstellung konditionierten Mediums	36
3.2.2.13. Migrationsassay	36
3.2.2.14. Invasionsassay	36
3.2.2.15. Kollagenabbau durch Zellen.....	37
3.2.2.16. Soft-Agar-Test.....	37
3.2.2.17. Bestimmung der Apoptoseinduktion	39
3.2.2.18. Zellzyklus-Bestimmung.....	39
3.2.2.19. Kokultivierung von Zelllinien	40
3.2.2.20. Stimulation von Fibroblasten.....	40
3.2.2.21. Bildung von Tumoren in NOD/SCID Mäusen nach Injektion der HEK-293-Klone	40

4. Ergebnisse	42
4.1. Etablierung stabil transfizierter Zelllinien.....	42
4.1.1. Herstellung von Fusionsproteinen aus DP4 bzw. FAP und dem EGF-Protein.....	42
4.1.2. Herstellung stabil transfizierter Zelllinien.....	43
4.2. Charakterisierung der stabil transfizierten Zelllinien.....	44
4.2.1 Nachweis der DP4- und FAP-Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie	45
HEK-C3FAPmut	46
4.2.2. Nachweis der DP4- und FAP-Expression mittels Quantitativer-PCR.....	48
4.2.3. Nachweis der DP4- und FAP-Oberflächenexpression mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	50
4.2.4. Nachweis der enzymatischen Aktivität nach Überexpression von DP4 und FAP auf der Zelloberfläche der stabilen Transfektanten	51
4.2.5. Einfluss der Expression von DP4- und FAP-Varianten auf die Proliferation.....	53
4.3. Untersuchungen zur Adhäsion von Tumorzellen.....	54
4.3.1. Einfluss der Überexpression von DP4 und FAP auf die Adhäsion transfizierter Zelllinien an Fibronektin und Kollagen.....	54
4.3.2. Einfluss der Expression von DP4 auf die Adhäsion von wildtyp Zelllinien an Fibronektin und Kollagen	56
4.3.3. Bestimmung der Interaktion von rekombinanter DP4 mit Fibronektin und Kollagen.....	58
4.3.4. Einfluss von Inhibitoren der DP4 auf die Zelladhäsion.....	61
4.4. Untersuchungen zur Zellmigration.....	63
4.4.1. Einfluss von Inhibitoren der DP4 auf die durch konditioniertes Medium induzierte Immunzell- Migration.....	63
4.4.2. Einfluss der Expression von DP4- und FAP-Varianten auf die Immunzell-Migration	65
4.4.3. Einfluss von DP4-Inhibitoren auf die durch konditioniertes Medium vermittelte Immunzell- Migration.....	66
4.4.4. Einfluss der Überexpression von DP4- und FAP-Varianten auf die Zellmigration.....	67
4.4.5. Einfluss der Überexpression von DP4- und FAP-Varianten auf die Zellinvasion	68
4.4.6. Einfluss der Überexpression von DP4- und FAP-Varianten auf die Kollagendegradation	69
4.5. Untersuchungen zu Zellwachstum und Morphologie	70
4.5.1. Einfluss der Überexpression von DP4- und FAP-Varianten auf Kontakt-unabhängiges Wachstum	70
4.5.2. Einfluss der Expression von DP4- und FAP-Varianten auf die Morphologie von HEK-293-Klonen.....	72
4.5.3. Einfluss der Expression von DP4 auf die Morphologie von Tumorzellen	73
4.6. Untersuchung zum Phosphorylierungsstatus von Kinasen und NF- κ B sowie zur differentiellen Genexpression	75
4.6.1. Einfluss der Überexpression von DP4- und FAP-Varianten auf die Phosphorylierung von ERK1/2, p38, JNK und NF- κ B	75
4.6.2. Einfluss der Überexpression von DP4- und FAP-Varianten auf die differentielle Genexpression	81
4.6.3. Einfluss von DP4 und FAP auf die Expression von Oberflächenantigenen	88
4.6.4. Einfluss der Expression von DP4 und FAP auf Apoptose und Zellzyklus.....	90
4.6.5. Einfluss der Expression von DP4 und FAP auf die Tumor-Stroma-Interaktion.....	92
4.7. Einfluss der Expression von DP4 und FAP auf die Tumorbildung von transfizierten Zellen im xenograft Tiermodell	95
5. Diskussion	98
5.1. Etablierung und Charakterisierung stabil transfizierter Zelllinien.....	99
5.2. Untersuchungen zur Zelladhäsion.....	100
5.3. Untersuchungen zur Anlockung von Immunzellen.....	104
5.4. Untersuchungen des Zellwachstums und der Morphologie	106
5.5. Untersuchung zur Phosphorylierung und differentiellen Genexpression	107
6. Zusammenfassung	116
7. Literaturverzeichnis	119

Anhang

Aligment von humaner und Ratten-DP4

Aligment von humaner DP4 und humanem FAP

Abkürzungsverzeichnis

AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfofluorid
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
BD	Becton Dickinson
CD	<i>cluster of differentiation</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle`s medium</i>
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindol
DMSO	Di-Methylsulfoxid
DP4	Dipeptidylpeptidase 4
ECM	extrazelluläre Matrix (<i>extracellular matrix</i>)
EDC	1-Ethyl-3(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFP	im Spektrum nach Rot verschobenes grün-fluoreszierendes Protein
ELISA	enzymgekoppelter Antikörperbindungstest (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
EMT	epithelialer-mesenchymaler-Übergang (<i>epithelial-mesenchymal-transition</i>)
ERK	<i>extracellulare stimulus regulated kinase</i>
FAP	Fibroblastenaktivierungsprotein alpha (<i>fibroblast activation protein alpha</i>)
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
HBS	<i>hepes buffered saline</i>
HBSS	<i>hanks balanced salt solution</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HRP	Meerrettich Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>

NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
ORF	<i>open reading frame</i>
p38	Kinase p38, (Protein 38, MW 38 kDa)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PFA	para-Formaldehyd
pNA	p-Nitroanilin
pNPP	p-Nitrophenyl-Phosphat
Q-PCR	quantitative PCR
rhDP4	rekombinante humane Dipeptidylpeptidase 4
RT	Raumtemperatur
RU	<i>response unit</i>
SD	Standarddifferenz
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyle sulfate</i>)
SPR	Oberflächenplasmonresonanz (<i>surface plasmon resonance</i>)
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
Z-	Benzyloxycarbonyl-

1. Einleitung

Der Begriff „Tumor“ beschreibt in der Medizin jede abnorme Vergrößerung eines Gewebes, welche durch autonome, progressive und überschießende Proliferation von körpereigenen Zellen entsteht. Auf Grund des biologischen Verhaltens der Geschwulst (Neoplasie), welches sich durch den klinischen Verlauf beurteilen lässt, unterscheidet man gutartige und bösartige Tumoren. Gutartige (benigne) Tumoren sind dadurch gekennzeichnet, dass sie langsam und verdrängend wachsen, in vielen Fällen kommt es kaum zur Beeinträchtigung des Gesamtorganismus. Histologisch bestehen sie meistens aus differenziertem Gewebe, das sich kaum vom Ursprungsgewebe unterscheidet (z.B. Muttermale, Lipome). Bösartige (maligne) Tumoren, auch als Krebs bezeichnet, hingegen zeichnen sich durch infiltrierendes Wachstum und Destruktion des umgebenden Gewebes sowie durch die Fähigkeit zur Metastasenbildung aus. Histologisch bestehen bösartige Tumoren aus unterschiedlich stark dedifferenziertem Gewebe. Die Zellen und ihre Zellkerne weisen dabei die für Malignome typischen Veränderungen auf wie Zell- und Kernpolymorphie, Kernpolychromasie und Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Zellkerns.

Die Entwicklung von Tumoren, deren Invasion und Metastasenbildung ist auf eine Reihe genetischer Veränderungen zurückzuführen. Neben einer genetischen Prädisposition sind verschiedenste Noxen bekannt, wie chemische Verbindungen (z. B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Nitrosamine, Aflatoxine), ionisierende Strahlung, Sauerstoffradikale und Viren, die eine krebserzeugende oder krebefördernde Wirkung zeigen. Die grundlegende Gemeinsamkeit aller Tumoren ist eine durch ein initiales transformierendes Ereignis hervorgerufene, strukturelle Veränderung der DNA, wie Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen. Zu beobachten sind Variationen in der Proteinmenge durch eine Modifikation der Transkription beispielsweise von Wachstumsfaktorrezeptoren wie HER-2 (erbB-2), ein Tyrosinkinasetyp-Zelloberflächenrezeptor der EGF-Rezeptorfamilie. Dieser ist in 10 – 34 % der invasiven Brustkarzinome überexprimiert¹. Ebenso kann die Tumorentstehung mit Mutationen in Genen verschiedener Proteine assoziiert sein, unter anderem in Proteinen der Zellzykluskontrolle wie p53. Mutationen im Gen TP53 führen mittelbar zur Entwicklung neoplastischer Zellen, da ein Funktionsverlust von p53 eine Akkumulation weiterer genetischer Schäden zur Folge hat, die anschließend zu unkontrollierter Zellproliferation führen².

Der anerkannten Beschreibung der Tumorprogression als zunehmende Dedifferenzierung ehemals spezialisierter Körperzellen wurde in den letzten 10 Jahren die Theorie der Entstehung von neoplastischen Zellen aus Stammzellen hinzugefügt. Diese beschreibt die Wandlung somatischer undifferenzierter Stamm- und Vorläuferzellen der verschiedenen Organe in Tumorstammzellen hervorgerufen durch Mutationen, welche die Differenzierung der Stammzellen unterbindet³.

Krebs ist nach Erkrankungen des kardiovaskulären Systems die zweithäufigste Todesursache

in den entwickelten Industriestaaten. Im Jahre 2004 starben in Deutschland 112.066 Männer und 99.330 Frauen an den Folgen einer bösartigen Gewebsneubildung. Wie in Tabelle 1 dargestellt, ist eine geschlechtsspezifische Verteilung der Tumorneuerkrankungen in den verschiedenen Organen zu beobachten, welche über die Geschlechtsorgane hinausgeht. So zum Beispiel bildeten sich bei Männer 19,6 % der nicht die Geschlechtsorgane befallenden Tumoren in der Lunge und 12,8 % in der Harnblase, während bei Frauen in 7,4 % der Neubildungen die Lunge und in 4,1 % die Harnblase betroffen war.

Männer		Frauen	
gesamt	230.500	gesamt	206.000
Prostata	25,4 %	Brust	27,8 %
Darm	16,2 %	Darm	17,5 %
Lunge	14,3 %	Gebärmutter	8,7 %
Harnblase	9,3 %	Lunge	6,4 %
Magen	4,8 %	Ovarien	4,7 %
Niere	4,7 %	Haut	4,1 %
Rachen	3,3 %	Magen	3,8 %
Non-Hodgkinlymphom	2,9 %	Harnblase	3,6 %
Haut	2,8 %	Pankreas	3,2 %
Pankreas	2,7 %	Niere	3,2 %

Tabelle 1: Anzahl der Krebsneuerkrankungen 2004 bei Männern und Frauen in Deutschland und die 10 am häufigsten befallenen Organe (nach Daten der Deutsche Krebsgesellschaft)

Ein weiterer Unterschied ist in der Verteilung des Tumorbefalls bei Neuerkrankung und den aus einem Fortschreiten der Erkrankung resultierenden Ableben der Patienten bezüglich der verschiedenen Organe zu beobachten. Der Vergleich von Tabelle 1 und 2 zeigt, dass bei Männern in 14,3 % Fälle von Tumorneubildung die Lunge betroffen ist, dagegen mit 27,3 % aller Krebstoten annähernd doppelt so häufig zum Tode führt. Bei Frauen ist die Lunge in 6,4 % der Neuerkrankungen beteiligt aber an 11,8 % der Todesfälle durch bösartige Gewebsneubildung.

Männer		Frauen	
gesamt	112.066	gesamt	99.330
Lunge	27,3 %	Brust	17,6 %
Darm	12,1 %	Darm	13,4 %
Prostata	9,9 %	Lunge	11,8 %
Pankreas	5,8 %	Pankreas	7,1 %
Magen	5,5 %	Ovarien	5,6 %
Leber	3,5 %	Magen	5,1 %
Rachen	3,3 %	Uterus	4,1 %
Speiseröhre	3,3 %	Leukämie	2,9 %
Harnblase	3,2 %	Leber	2,2 %
Leukämie	2,9 %	Niere	2,1 %

Tabelle 2: Anzahl der Sterbefälle 2004 durch bösartige Gewebsneubildung bei Männern und Frauen in Deutschland und die 10 am häufigsten davon betroffenen Organe (nach Daten des Statistischen Bundesamtes, Fachserie 12, Reihe 4)

Die Diskrepanz in der Organverteilung des Tumorbefalls bei Neuerkrankungen und den Sterbefällen ergibt sich aus den Möglichkeiten einer frühen Diagnose, der unterschiedlichen Proteinausstattung der Tumorzellen und der ungleichen Neigung der Tumoren in den verschiedenen Organen zur Metastasenbildung.

Neben dem unregulierten Wachstum neoplastischen Gewebes und der damit verbundenen Verdrängung und Beeinträchtigung der Funktionstüchtigkeit der befallenen Organe stellt vor allem die Bildung von Tochtertumoren, den Metastasen, einen gravierenden Eingriff in die Körperfunktionen dar. Dies zeigt sich daran, dass das Auftreten metastasierender Tumoren mit einer deutlichen Verschlechterung der Prognose für den betroffenen Patienten einhergeht und die Ursache von 90 % aller durch solide Tumoren verursachten Sterbefälle ist. Die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen stellt einen komplexen Vorgang dar, der mit der Ablösung einzelner Tumorzellen vom Primärtumor eingeleitet wird (Abb. 4). Diese Tumorzellen müssen im weiteren Verlauf in der Lage sein, verschiedene zelluläre und strukturelle Barrieren zu durchdringen, bevor sie in Gefäße des Lymph- und Blutsystems eindringen und letztlich in tumorfernen Organen Metastasen bilden können. Zu diesen Barrieren zählen die Basalmembran sowie die extrazelluläre Matrix (ECM) der Zellzwischenräume. Während des invasiven Wachstums des Tumors spielen zwei Prozesse eine entscheidende Rolle: die kontrollierte lokale Proteolyse der ECM und die Interaktion von Tumorzellen mit Matrix-Komponenten⁴⁻⁶.

1.1. Zell-Zell-Interaktionen

Zelladhäsion ist in allen Aspekten des Zellwachstums, der Zellmigration und der Zelldifferenzierung in Vertebraten essentiell. Zelluläre Adhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecule*, CAM) sind die Mittler der Zell-Zell-Interaktionen und der Interaktionen zwischen Zellen und Bestandteilen der ECM. Diese Moleküle sind in einer Vielzahl zellulärer Funktionen einschließlich Signaltransduktion, zellulärer Kommunikation und Erkennung, Embryonalentwicklung, Entzündungsprozessen und Immunantwort sowie Apoptose involviert.

Mehr als 50 verschiedene Arten von Zelladhäsionsmolekülen sind bisher beschrieben worden, dazu gehören Immunoglobulin (Ig)-artige CAM (NCAM, ICAM, VCAM), Cadherine (E-, N-, P-Cadherin), Selektine (P-, L-, E-Selektin), Integrine und Mucin-ähnliche Moleküle (GlyCAM, MadCAM).

Die Ig-Superfamilie (Abb. 1), die größte Familie der CAM, sind Kalzium-unabhängige CAM bestehend aus einer aus 4 - 6 von Ig gleichenden Abschnitten zusammengesetzten Ligandenbindenden Domäne und einer aus bis zu fünf dem Fibronektin gleichenden Abschnitten zusammengesetzten extrazellulären Domäne. Das Molekül ist über einen Membrananker, dem sich ein kurzer zytoplasmatischer Rest anschließt, in der Zelle verankert.

Integrine (Abb. 1) sind lang gestreckte, heterodimere Adhäsionsmoleküle, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen, welche nicht kovalent mit einander verbunden sind. Strukturell werden die Integrine entsprechend ihrer β -Untereinheit in acht verschiedene Gruppen eingeteilt. Sie stellen die wichtigste Klasse der mit der ECM interagierenden Proteine dar.

Selektine (Abb. 1) sind lang gestreckte, membrangebundene Glykoproteine und weisen homologe Grundstrukturen aus fünf unterschiedlichen Domänen auf. An den C-terminalen zytoplasmatischen Rest schließt sich eine einzelne transmembrane Domäne an. Die Ausdehnung des extrazellulären Bereiches wird hauptsächlich durch eine, bei den einzelnen Selektinen unterschiedliche Anzahl so genannter *short consensus repeats* (SCR) bestimmt. Einer dem epidermalen Wachstumsfaktor gleichende Domäne folgt im N-terminalen Bereich die Lektin-Bindungsdomäne^{7,8}. Entsprechend ihres Ursprungs werden die Selektine in L- (Leukozyten), E- (Endothel) und P- (Plättchen und Endothel) Selektin eingeteilt. Während die CAM der Ig-Superfamilie, Selektine und Integrine in erster Linie kurzfristige Zell-Zell-Wechselwirkungen (z.B. Leukozyten-Rollen und Extravasation) vermitteln, sind Cadherine an der Ausbildung dauerhafter Verbindungen (z.B. *Adherens junctions*) beteiligt.

Die Nomenklatur der Cadherine orientiert sich an dem Gewebe, aus dem es zum ersten Mal isoliert wurde, daher unterscheidet man E-(epithelial), N-(neural) und P-(placental) Cadherine⁹. Cadherine spielen eine kritische Rolle im Aufbau komplexer Strukturen wie zum Beispiel *adherence junctions*¹⁰. Während E-Cadherin wichtige Funktionen im Aufbau und Erhaltung epithelialer Strukturen hat, wird N-Cadherin in erster Linie auf mesenchymalen

Zellen, wie den Zellen des Bindegewebes und migrierenden Zellen exprimiert¹¹. Während der extrazelluläre Bereich, bestehend aus fünf Domänen, die homophile Kalzium-abhängige Protein-Protein-Adhäsion vermittelt, ist der intrazelluläre Teil über einen Komplex aus α -, β - und γ -Catenin mit dem Aktinzytoskelett der Zelle verbunden. In der klassischen Beschreibung dieses Komplexes interagiert die zytoplasmatische Domäne des Cadherins direkt mit β - und γ -Catenin, während α -Catenin, das an das Zytoskelett gebunden ist, mit den β - und γ -Cateninen in Verbindung tritt. Andere Publikationen beschreiben diesen Komplex nicht als ein Gebilde aus starren Protein-Protein-Wechselwirkungen, sondern als Produkt dynamischer Vorgänge, bei denen Zytoskelettbestandteile bevorzugt im Bereich lokal erhöhter α -Catenin-Konzentrationen polymerisieren^{12,13}.

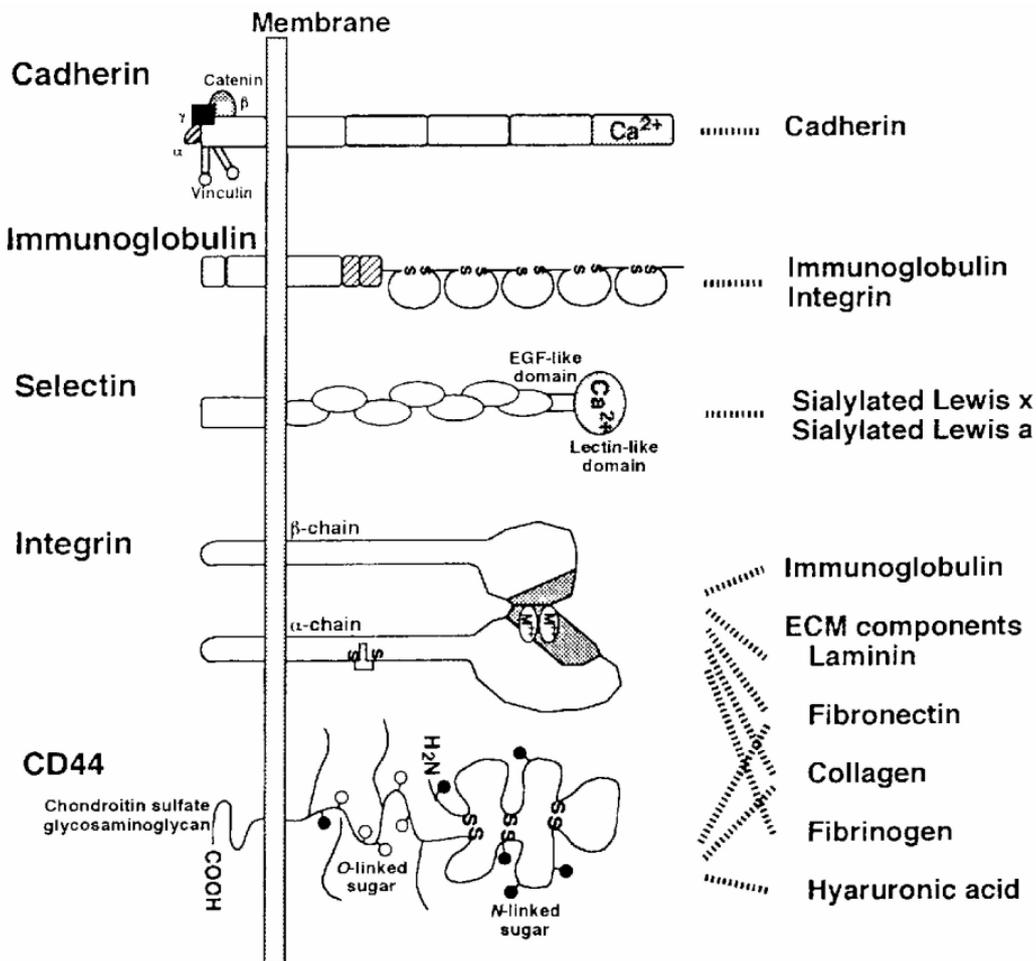


Abbildung 1: Zelladhäsionsmoleküle (CAM) und deren Interaktionspartner
Darstellung von Mitgliedern der Cadherin-, Immunoglobulin-, Selektin- und Integrinfamilie und deren Interaktionspartnern. Saiki²⁰

Bei zirka 80 % aller malignen Tumoren handelt es sich um Karzinome, von Epithelzellen ausgehende Neoplasien. Da eine der grundlegenden Voraussetzung der Bildung von Metastasen durch epitheliale Zellen der Verlust der interzellulären Adhäsion ist, kommt den Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen eine eminente Bedeutung in Tumorzellmigration und

-invasion zu und macht sie zu einem interessanten Ziel der Tumorthherapie. Durch Verlust und Fehlregulation von Zelladhäsionsmolekülen geht die geordnete Gewebsstruktur verloren, wodurch sich Zellen aus dem Gewebsverband lösen können. Bei verschiedenen Karzinomarten konnte bisher eine verminderte E-Cadherin Expression nachgewiesen werden, die teilweise durch eine erhöhte N-Cadherin Expression abgelöst wird¹⁴. Dieser während der malignen Transformation von Epithelzellen auftretende Mechanismus wird als epithelialer-mesenchymaler Übergang (*epithelial-mesenchymal-transition*, EMT) bezeichnet. Der Prozess der EMT führt zu einem verminderten Kontakt der epithelialen Zellen untereinander und fördert die Interaktion mit mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten und Endothelzellen¹⁵. Da die N-Cadherin vermittelte Interaktion zwischen Tumorzellen und stromalen Zellen zu einer vermehrten proMMP-Synthese und -Aktivierung führt, wurde eine potentielle Rolle von Cadherinen in der Regulation proteolytischer Enzyme während der Tumordinvasion postuliert^{16,17}.

Der EMT ist eine phänotypische Umwandlung welche zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung eines metazoischen Embryos zu beobachten ist. Der EMT, welche durch eine Reihe komplexer und koordinierter molekularer Veränderungen gekennzeichnet ist, kann ebenso zur Beschreibung metastasenbildender Veränderungen von Tumorzellen herangezogen werden¹⁸. Bei einem Epithel handelt es sich um eine Ansammlung von Zellen, welche sich durch eine Polarisierung in eine apicale und basolaterale Seite auszeichnen. Dazu kommt ein durch eine Vielzahl verschiedener Zelladhäsionsmoleküle (z.B. E-Cadherin, Selektine, VCAM) vermittelter intensiver Zell-Zell-Kontakt. Eine Adhäsion zur ECM findet auf Grund der ungleichmäßigen Verteilung der entsprechenden Adhäsionsmoleküle (z.B. Integrine) in erster Linie basal-seitig statt. Der Zell-Zell-Kontakt sowie die enge Verknüpfung zwischen den Oberflächenmolekülen und dem Zytoskelett führen zur Ausbildung einer definierten Kopfsteinpflaster-artigen Zellmorphologie. Mesenchymale Zellen dagegen bilden ein relativ diffuses Netzwerk, bei dem keine komplette Zellschicht gebildet und die Zellen nur punktweise Verbindung zu ihrem Nachbarn besitzen. Die Interaktion mit der ECM dagegen verteilt sich über die gesamte Zelloberfläche. Mesenchyme zeigen einen geringeren Organisationsgrad. Dies schlägt sich in einer höheren Flexibilität, Individualismus und einer gesteigerten Motilitätsneigung nieder¹⁹.

1.2. Zell-Matrix-Interaktionen

Die Rolle der ECM im Tumor-Mikromilieu ist nicht nur auf die Funktion als eine Sperre gegen Tumordinvasion begrenzt. Ebenso ist die Matrix ein Reservoir für Zellbindungsproteine und Wachstumsfaktoren, welche das Verhalten der Tumorzellen beeinflussen. Resultierend aus der Aktivität von Proteasen, produziert durch Tumor- oder Stromazellen, werden durch den Umbau der ECM Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen verändert, neue biologisch aktive ECM-Moleküle erzeugt und die Verfügbarkeit und Aktivität vieler Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren und Zytokine modifiziert.

Die ECM besteht aus einer Vielzahl von Proteinen und Glukosaminoglykanen, welche die interzellulären Zwischenräume des Bindegewebes ausfüllen oder die Basalmembran bilden²¹. Die wichtigsten strukturgebenden Bestandteile der Matrix sind neben den verschiedenen Kollagentypen, vor allem Fibronectin, Laminin, Perlecan und Nidogen. In erster Linie sind Fibroblasten und mikrovaskuläre Endothelzellen für die Produktion dieser Proteine verantwortlich. Insgesamt befinden sich in der ECM weit über 100 verschiedene Typen von Makromolekülen, die eine sehr große funktionelle Varianz ermöglichen. Dazu gehören neben den strukturgebenden Aufgaben unter anderem Speicherung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren z.B. latentem TGF- β , TNF- α und Wnt-Proteinen²². Die Bindung von Tumorzellen an die Komponenten der ECM, hauptsächlich Integrin-vermittelte Interaktionen, aktiviert intrazelluläre Signaltransduktionsketten, welche dann einen direkten Einfluss auf die Expression proteolytischer Enzyme haben.

Die Interaktionen zwischen Tumorzellen und der ECM beeinflusst nachhaltig die Tumorentwicklung, steuert Zellproliferation und Überleben sowie die Fähigkeit von der ursprünglichen Lokalisierung aus, in andere Gewebe zu migrieren und Metastasen zu bilden. Viele dieser Interaktionen werden von Integrinen vermittelt, eine ubiquitär exprimierte Familie von Adhäsionsmolekülen. Integrine sind essentiell für die Zellanheftung und Kontrolle der Zellmigration, Zellzykluskontrolle und den programmierten Zelltod. Diese Antworten werden in Synergie mit anderen Signaltransduktionswegen reguliert. Die Integrine als große Gruppe von Transmembranproteinen wird von 18 α - und 8 β - Untereinheiten gebildet, welche sich zu mindestens 24 unterschiedlichen Integrin-Heterodimeren zusammenlagern können. Jedes der Heterodimere bindet spezifisch an unterschiedliche Liganden. Mit ihren extrazellulären Domänen können Integrine an unterschiedliche ECM-Moleküle binden, wie zum Beispiel Kollagen und Laminin oder an zelluläre Rezeptoren wie VCAM-1. Das häufigste Integrinbindemotiv ist die Tripeptidsequenz Arg-Gly-Asp (RGD), die auf extrazellulären Liganden wie Fibronectin, Vitronectin und denaturiertem Kollagen präsent ist²³. Synthetische Peptide, die diese RGD-Sequenz enthalten, inhibieren kompetitiv die Adhäsion von Zellen an Bestandteile der ECM^{20,24}. Die Bindungsstelle für die Kollagenrezeptoren $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$, beide nicht RGD-abhängig, befindet sich in den tripelhelikalen Bereichen des Kollagenmoleküls, was eine native Konformation des Kollagens für die Integrinbindung voraussetzt²⁵. Die intrazellulären Domänen der Integrinrezeptoren interagieren direkt oder indirekt mit dem Aktinzytoskelett und verbinden auf diese Weise das Zytoskelett mit der ECM. Die Integrin-vermittelte Zelladhäsion ist nicht nur von der Oberflächenexpression der Rezeptoren abhängig, sondern auch von deren Affinität gegenüber den verschiedenen Liganden und der lateralen Mobilität der Integrinmoleküle innerhalb der Plasmamembran, welches die Anordnung in definierten Membranbereichen ermöglicht. Gesteuert durch lösliche Liganden können Integrine niedrig- oder hochaffine Konformationen annehmen²⁶.

Integrine sind durch die Induktion von Veränderungen in der Zytoskelettorganisation und

Rekrutierung von löslichen Proteasen an der Zellmigration beteiligt. Der Kontakt von Zellen mit der angrenzenden ECM initiiert die Bindung durch verschiedene Adhäsionsmoleküle vor allem der Integrin-Familie. Dies hat eine Kopplung der Integrine via Adaptormolekül an das Aktinzytoskelett und eine lokale Anreicherung zur Folge und mündet in der Ausbildung eines fokalen Adhäsionskomplexes²⁷. Die Anreicherung der Integrine und weiterer Adhäsionsmoleküle führt zu einer Rekrutierung von Zelloberflächenproteasen im Bereich der Zell-Matrix-Interaktionen, welche ECM-Komponenten im Nahbereich der Zelloberfläche abbauen können. Zum Beispiel bindet das Fibroblastenaktivierungsprotein (FAP) an $\alpha 3\beta 1$ Integrin²⁸, MMP1 an $\alpha 2\beta 1$ Integrin²⁹ und MMP2 an $\alpha v\beta 1$ Integrin³⁰. Die Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) spielt dabei eine bedeutende Rolle unter den unterschiedlichen Integrinsignaltransduktionswegen, welche die Migration beeinflussen. Ebenso ist FAK ein Ziel für die Tyrosinphosphorylierungen, die durch Wachstumsfaktorrezeptoren verursacht wird. Aus diesem Grund dient die FAK als wichtiger Integrationspunkt von Wachstumsfaktor- und Integrin-Signaltransduktionswegen in Bezug auf die Zellmigration³¹.

Das Zelloberflächenmolekül CD44 (Abb. 1) ist ein ubiquitär verbreitetes multifunktionelles Zelladhäsionsmolekül, welches in Zell-Zell- als auch in Zell-Matrix-Interaktionen involviert ist³². Dieses Glykoprotein existiert in vielen Isoformen, generiert sowohl durch posttranslationale Modifikationen als auch durch unterschiedliche Nutzung alternativ gespleißter Exons. Die Variationen finden im extrazellulären Teil zwischen der Ligandbindenden globulären Domäne und der Transmembrandomäne statt^{33,34}. Die Folge sind über 20 verschiedene Isoformen mit unterschiedlicher Verteilung und Funktion im Organismus.

Weitere Oberflächenmoleküle, denen eine Funktion in der Interaktion mit Matrixkomponenten und der Zellmigration zugeschrieben werden und die nicht zur Integrinfamilie gehören, sind Discoidinrezeptoren³⁵, Rezeptoren der Immunglobulinfamilie und CD26³⁶. Auf die Bedeutung von CD26 wird im folgenden Kapitel 1.4.1 näher eingegangen.

1.3. Tumor-Stroma-Interaktionen

Tumorzellen stehen durch den Austausch von Enzymen und Zytokinen in ständiger Wechselwirkung mit dem umgebenden Wirtsgewebe, dem Stroma. Diese Wechselwirkungen haben wesentlichen Einfluss auf das Verhalten der Tumorzellen, da die Zellen des Stromas eine große Palette an Wachstumsfaktoren bilden, Entzündungsprozesse steuern, die Angiogenese anregen und die ECM-Proteine den Tumor beeinflussen.

Die Infiltration von Lymphozyten, Makrophagen, Mastzellen und Neutrophilen ist ein Kennzeichen von Entzündungs-, Verteidigungs- und Gewebsreparaturreaktionen, die häufig in Tumoren zu beobachten sind³⁷. Verschiedene Arten der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten, einschließlich zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen werden als mögliche Effektoren der Tumormunität angesehen und können unter anderem durch Initiation der

Apoptose der Tumorprogression entgegenwirken³⁸. Jedoch haben neue Studien gezeigt, dass CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (Treg) in der Tumorumgebung akkumulieren und die Tumor-spezifische T-Zell-Antworten unterdrücken können und dadurch die Tumorreaktion verhindern³⁹. Tumor-assoziierte Makrophagen stellen einen Hauptbestandteil der infiltrierenden Leukozyten dar. Es konnte gezeigt werden, dass aktivierte Makrophagen Tumor-hemmende Eigenschaften besitzen⁴⁰. Andererseits ist bekannt, dass diese Zellen symbiotisch, zum Beispiel durch Induktion der Angiogenese, das Tumorwachstum und dessen Entwicklung fördern⁴¹. Die Rekrutierung der einwandernden Lymphozyten und Monozyten erfolgt durch komplexe Wechselwirkung verschiedener Chemokine, die von Tumor oder Tumor-assoziierten Stromazellen ausgeschüttet werden⁴².

Viele Karzinome zeichnen sich durch eine lokale Akkumulation von Bindegewebszellen und extrazellulärem Material aus, ein Phänomen das Stromareaktion genannt wird. Einer der zellulären Bestandteile der Stromareaktion sind Myofibroblasten, veränderte Fibroblasten, welche die Fähigkeit erlangt haben α -smooth muscle Aktin, eine Aktinisoform, die für glatte Gefäßmuskelzellen typisch ist, zu exprimieren. Des Weiteren werden Kollagene und andere Bestandteile der ECM synthetisiert. Es wird angenommen, dass Myofibroblasten eine Schlüsselrolle bei der Umgestaltung des Bindegewebes während der Wundheilung und Fibroseentwicklung zukommt. Daneben wirken Myofibroblasten auf andere Bindegewebszellen und Endothelzellen ein und fördern auf diese Weise die Tumorentwicklung und Angiogenese⁴³. Auf Grundlage der Bedeutung der Stromazellen für die Tumorprogression stellen sie ein wichtiges Ziel für die Tumorthherapie dar.

Tumorwachstum und -entwicklung sind von der ausreichenden Versorgung mit Nährstoffen abhängig. Ohne ausreichende Vaskularisation ist die Tumorgöße auf 2-3 mm begrenzt, da sonst der Bedarf an Sauerstoff und Glukose durch die Diffusion in das Gewebe nicht gedeckt werden kann. Der Prozess der Gefäßbildung durch Sprossung des bestehenden Kapillarsystems, Angiogenese genannt, wird durch Tumor-assoziierte Stromazellen, Immun- und Endothelzellen gefördert. Lösliche, von Tumor- und Stromazellen sezernierte Faktoren, zu denen VEGF, bFGF, IL8, MCP-1 TNF- α und Angiopoitin-1 und -2 gehören, aktivieren die Endothelzellen, wodurch diese verstärkt proliferieren und chemotaktisch in Richtung des angiogenen Reizes migrieren und dadurch neue Kapillaren ausbilden bzw. verlängern^{41,44}. Durch Bindung der Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren (meist Tyrosinkinase-Rezeptoren) induzieren sie Signaltransduktionskaskaden, die zu einer induzierten Transkription von proteolytischen Enzymen oder Matrix-Adhäsionsrezeptoren führen. Während α v β 3-, α v β 5- und α 5 β 1-Integrine Zell-Matrix-Kontakte vermitteln, stabilisieren insbesondere VE-Cadherin und PECAM bereits gebildete Gefäße.

1.4. Rolle von Proteasen in der Karzinogenese

Proteasen sind sowohl an einer Reihe physiologischer Prozesse (z.B. Um- und Abbau von Geweben, Blutgerinnung und posttranslationale Regulation der Aktivität von Signalpeptiden)

als auch in pathophysiologischen Vorgängen (z.B. Wundheilung und Tumorigenese) beteiligt. In Abhängigkeit der Struktur des katalytisch aktiven Zentrums werden Proteasen in fünf Hauptfamilien unterteilt: 1. Serinproteasen (z.B. Kallikreine, Urokinase Plasminogenaktivator, Dipeptidylpeptidase 4), 2. Cysteinproteasen (z.B. Cathepsin B, Caspasen), 3. Aspartatproteasen (Cathepsin D, Cathepsin E), 4. Threoninproteasen (z.B. Proteasom), 5. Metalloproteasen (z.B. MMPs, Gelatinase, Kollagenase). Im Einzelnen sind folgende Proteasefamilien an der Tumorprogression beteiligt:

Die zur Klasse der Serinproteasen gehörenden Kallikreine konnten in allen Geweben nachgewiesen werden, wobei die Expression der 15 strukturell nahverwandten Steroidhormon-regulierten Gene in den unterschiedlichen Geweben variiert. Einige Kallikreine zeigen in vielen verschiedenen Tumorarten eine erhöhte Expressionsrate und eignen sich deshalb, wie zum Beispiel das Prostata-spezifische Antigen (PSA), als Marker zur Krebsdiagnose. Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass Kallikreine direkt in der Kanzerogenese, in erster Linie in Invasion und Metastasierung, involviert sind. Als mögliche Substrate gelten neben Peptidhormonen und Proteinen der ECM die pro-Form des Urokinase Plasminogenaktivators (uPA), welcher durch die proteolytischer Modifikation aktiviert wird⁴⁵. Der auf diese Weise freigesetzte Plasminogenaktivator ist in der Lage seinerseits Plasminogen in die enzymatisch aktive Form Plasmin zu überführen. Die Serinproteasen Plasminogenaktivator und Plasmin werden zur Plasminkaskade gezählt und können MMPs aktivieren (Abb. 2).

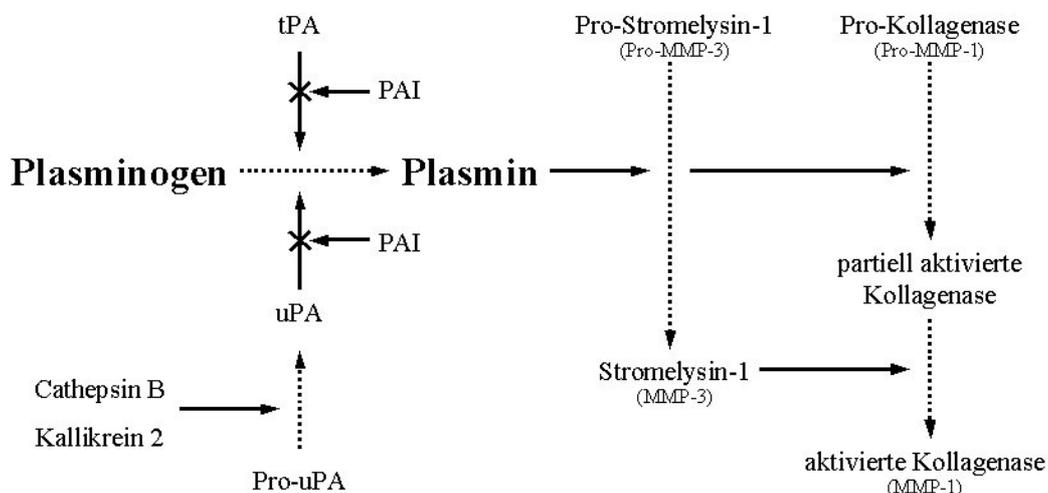


Abbildung 2: Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen durch die Plasminkaskade
Dargestellt sind die verschiedenen proteolytischen Aktivierungen der Plasminkaskade, die letztendlich zu einer Umwandlung von inaktiven Pro-MMPs in enzymatisch aktive MMPs führt. Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI), *tissue-type* Plasminogenaktivator (tPA) Nach Cox *et al.*⁴⁶

Des Weiteren sind Serinproteasen an der proteolytischen Aktivierung von *protease activated receptors* (PAR) beteiligt. Die PAR-Aktivierung ist mit einer verstärkten Tumorzellproliferation und -migration verbunden^{47,48}.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Cysteinproteasen, vor allem

Cathepsin B und Cathepsin S, in unterschiedlichen Prozessen der Tumorprogression wie Proliferation, Invasion und Angiogenese beteiligt sind⁴⁹. Im Zusammenhang mit dem Abbau von ECM-Proteinen konnten Cysteinproteasen in Komplexen mit Integrinen und dem urokinase Plasminogenaktivator-Rezeptor (uPAR) auf Invadopodien nachgewiesen werden. CD82 und CD63, Mitglieder der sogenannten Tetraspanine, regulieren die Entstehung und Funktionalität dieser Komplexe⁵⁰ (Abb. 3). Membranmikrodomänen, wie zum Beispiel *lipid rafts*, Tetraspanin-Mikrodomänen als auch Invadopodien, stellen das Ergebnis einer aktiven Anreicherung von Membranbestandteilen wie Proteasen, Proenzymen und Rezeptoren an ihrem Wirkungsort in definierten Membranbereichen dar. So konnte die Assoziation von Cysteinproteasen in Caveolae von Tumor- und Endothelzellen mit deren Fähigkeit zur Degradation von ECM-Proteinen in Verbindung gebracht werden⁵¹. Invadopodien werden vor allem von migrierenden Tumorzellen ausgebildet und zeichnen sich durch eine große Menge Matrix-bindender Proteine (z.B. Integrine) sowie Matrix-degradierende Enzyme aus und spielen damit eine wichtige Rolle bei der Tumordinvasion⁴.

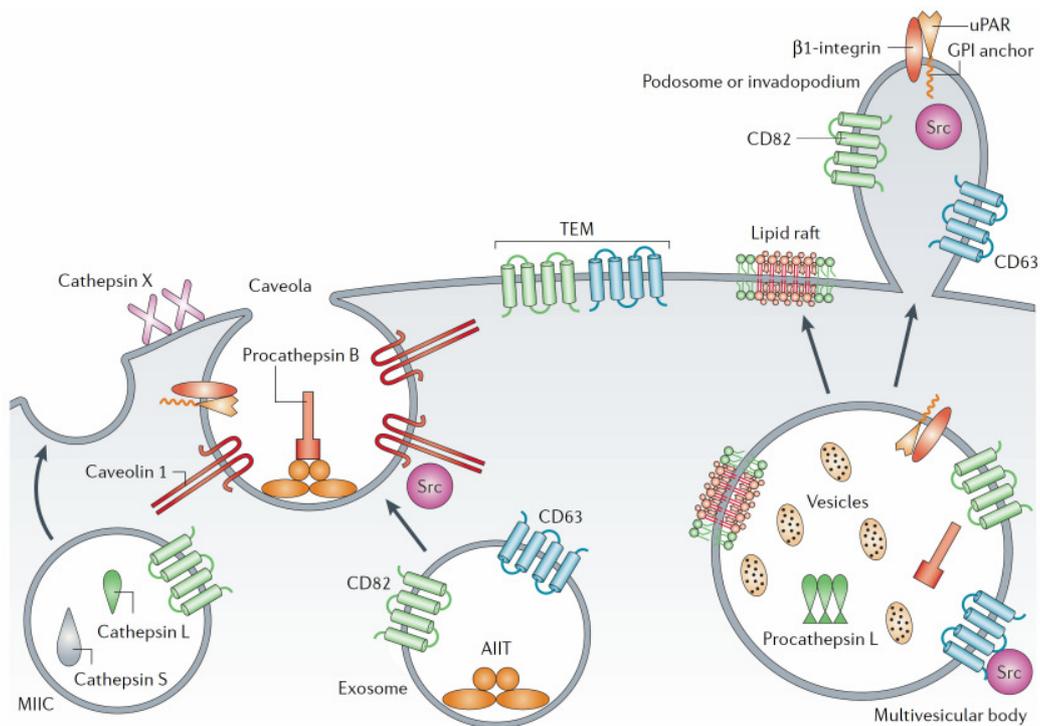


Abbildung 3: Interaktion von Cysteincathepsinen mit Annexin, CD63 und CD82 und deren Lokalisierung in Membranmikrodomänen

Dargestellt sind Membranmikrodomänen wie *lipid rafts*, Tetraspanin-Mikrodomänen und Invadopodien. Die Assoziation von Cathepsin B in der Tumorzellmembran mit Caveolae wird durch die Interaktion mit Annexin-II-Heterotetrameren (AIT) vermittelt. Intrazelluläre Vesikel wie MHC-Klasse-II-Kompartimente (MIIC), Exosome oder *multivesicular bodies* können ebenfalls Cysteincathepsine, vor allem (pro)L-Cathepsin und Cathepsin S, enthalten. Diese Lokalisierung führt zu einer verstärkten Sekretion von Cysteincathepsinen in Membranmikrodomänen einschließlich auf Invadopodien bei denen CD63 kolokalisiert ist. Urokinase Plasminogenaktivator-Rezeptor und β1-Integrine konnten in denselben Mikrodomänen nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine Assoziation der beiden proteolytischen Wege hin. Mohamed *et al.*⁵²

Aspartatproteasen sind durch ihr Optimum der katalytischen Aktivität bei niedrigen pH-Werten in ihrer Verbreitung auf saure Milieus beschränkt. Neben der β - und γ -Sekretase, welche für die Freisetzung des amyloid Peptides ($A\beta$) aus dem *amyloid precursor protein* (APP) verantwortlich sind, konnte unter anderem für Cathepsin D eine Beteiligung an pathologischen Prozessen nachgewiesen werden. Durch fehlende oder falsche Lokalisation kann Cathepsin D von malignen Zellen freigesetzt werden und als auto- und parakrines Mitogen wirken, das wachstumsfördernde Wirkung auf Tumor- und Stromazellen hat⁵³.

Neben Serin-, Aspartat- und Cysteinproteasen wird besonders Mitgliedern der Matrix Metalloproteinasen (MMPs) eine bedeutende Rolle bei der Degradation der Matrixproteine zugeschrieben⁵⁴. Voraussetzung für die Invasion von Tumorzellen in das umliegende Gewebe ist eine verminderte Integration der Zellen im Zellverband, die Migration und der Abbau der ECM. Es konnte gezeigt werden, dass Proteasen an diesen Vorgängen entscheidend mitwirken^{55,56}. Die funktionelle Inaktivierung des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin kann nicht nur über Promoter-*Silencing*, Deletionen oder andere Mutationen erfolgen, sondern auch über die Degradation durch proteolytische Enzyme⁵⁷. So führt zum Beispiel die Überexpression der Metalloprotease Stromelysin-1/MMP-3 in Epithelzellen zur Spaltung von E-Cadherin und damit zur Auflösung der Zell-Zell-Interaktion⁵⁸. Interessanterweise ist der Verlust von E-Cadherin wiederum mit einer transkriptionellen Aktivierung von Matrilysin-1/MMP-7 verbunden¹⁷. ECM abbauende Proteasen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Angiogenese, wo sie sowohl als positive als auch negative Regulatoren der Migration der endothelialen Zellen und so der Gefäßmorphogenese dienen können.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Proteasen eine wichtige Rolle in der Tumorentwicklung spielen, da verschiedenste Prozesse der Tumorentwicklung vom Wirken dieser Enzyme abhängig sind. In Abbildung 4 sind der Verlauf der Metastasenbildung sowie die Bedeutung der Proteasen in den einzelnen Teilschritten dargestellt, wie zum Beispiel Abbau von Strukturproteinen, Freisetzung und Modellierung der Aktivität von Zytokinen und Angiogenese.

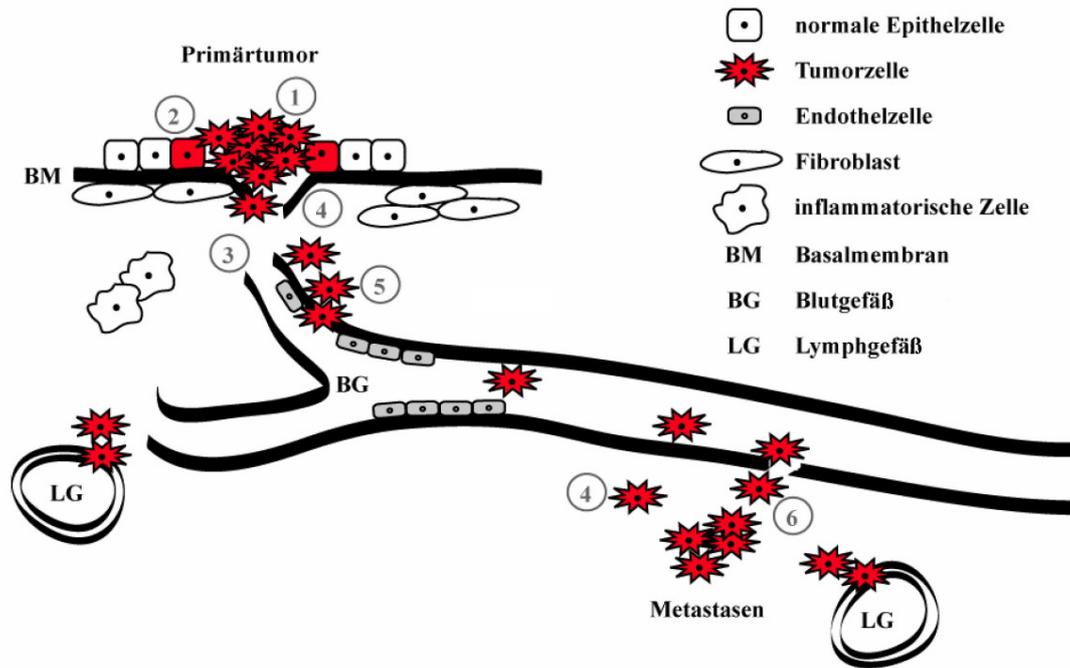


Abbildung 4: schematische Darstellung der Prozesse der Metastasenbildung

- (1) Entstehung eines Primärtumors durch Aktivierung von Onkogenen, Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen sowie weitere epigenetische und genetische Veränderungen
 - (2) Tumorzellen vollziehen den Schritt des epithelialen-mesenchymalen Übergangs (EMT)
 - (3) Im Rahmen der Tumorangiogenese sorgen Endothelzellen für die Ausbildung neuer Blutgefäße
 - (4) Nach Auflösung der Basalmembran sowie der ECM wandern die Tumorzellen in das mesenchymale Gewebe ein
 - (5) Die Tumorzellen dringen in das Gefäßsystem ein und werden im Körper verteilt
 - (6) Metastasen entstehen, wenn die Tumorzellen das Gefäßsystem verlassen und anwachsen
- In allen genannten Prozessen sind Proteasen involviert. Verändert nach Koblinski et al.⁵⁹

Zwei Vertreter der Familie der Serinproteasen, welche Gegenstand dieser Dissertationsarbeit sind, werden nachfolgend näher beschrieben.

1.4.1 Dipeptidylpeptidase 4

Die prolinspezifische Serinprotease Dipeptidylpeptidase 4 (DP4, EC 3.4.14.5) ist als multifunktionelles Protein in eine Reihe von physiologischen Regulationsprozessen involviert. Es besitzt Proteaseaktivität und dient als Bindungspartner verschiedener Proteine wie zum Beispiel Adenosindeaminase (ADA), Chemokinrezeptor (CXCR4)⁶⁰, HIV-Oberflächenprotein (gp120)⁶¹, Manose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR)⁶², Proteinen des Tetraspaninnetzes⁶³ und als Adhäsionsmolekül für die Bindung an Matrixproteine wie Kollagen und Fibronectin^{36,64,65}. Das Enzym ist dem als Antigen CD26 beschriebenen Oberflächenprotein von Lymphozyten identisch⁶⁶.

DP4 konnte erstmals 1966 aus Rattenleber isoliert werden⁶⁷. Das Enzym ist bei Säugetieren ubiquitär verbreitet, wurde aber auch in Hefen (u.a. *Sacharomyces cerevisiae*)⁶⁸, Bakterien⁶⁹ (*Xanthomonas maltophilia*) und Pflanzen⁷⁰ nachgewiesen. Im Säugerorganismus kommt DP4 in besonders hohen Konzentrationen in den Nieren⁷¹, der Plazenta⁷², der Leber⁷³ und dem

Dünndarm⁷⁴ vor und wird vor allem auf der Oberfläche von Epithel- und Endothelzellen exprimiert. Eine lösliche Form des Enzyms konnte im Plasma⁷⁵, Seminalplasma⁷⁶ und Urin nachgewiesen werden. Im hämatopoetischen System wird DP4/CD26 von aktivierten T-Zellen⁷⁷, B-Zellen⁷⁸ und NK-Zellen⁷⁹ exprimiert und dient als Aktivierungsmarker.

Die komplette cDNA-Sequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz der humanen DP4 wurde erstmals 1992 veröffentlicht⁶⁶. Das Enzym gehört zum Clan SC der Familie der Serinproteasen und dort zur Familie S9b, den Prolyloligopeptidasen. Anhand der Aminosäuresequenz errechnet sich ein Molekulargewicht des als Homodimer vorkommenden Enzyms von 176 kDa. In Abhängigkeit von Spezies und Gewebe wurde ein Molekulargewicht der membranständigen DP4 von 220 bis 240 kDa beschrieben, was auf unterschiedliche posttranslationale Modifikationen, in erster Linie Glykosilierungen, zurückzuführen ist.

DP4 ist ein Typ-II-Transmembranprotein, dessen zytoplasmatischer N-Terminus aus sechs Aminosäuren besteht, gefolgt von einer 22 Aminosäure langen hydrophoben Transmembranregion mit dem sich anschließenden 738 Aminosäure umfassenden extrazellulären Teil. Der löslichen, im Serum vorkommenden Enzymform fehlt der Transmembrananker⁷³.

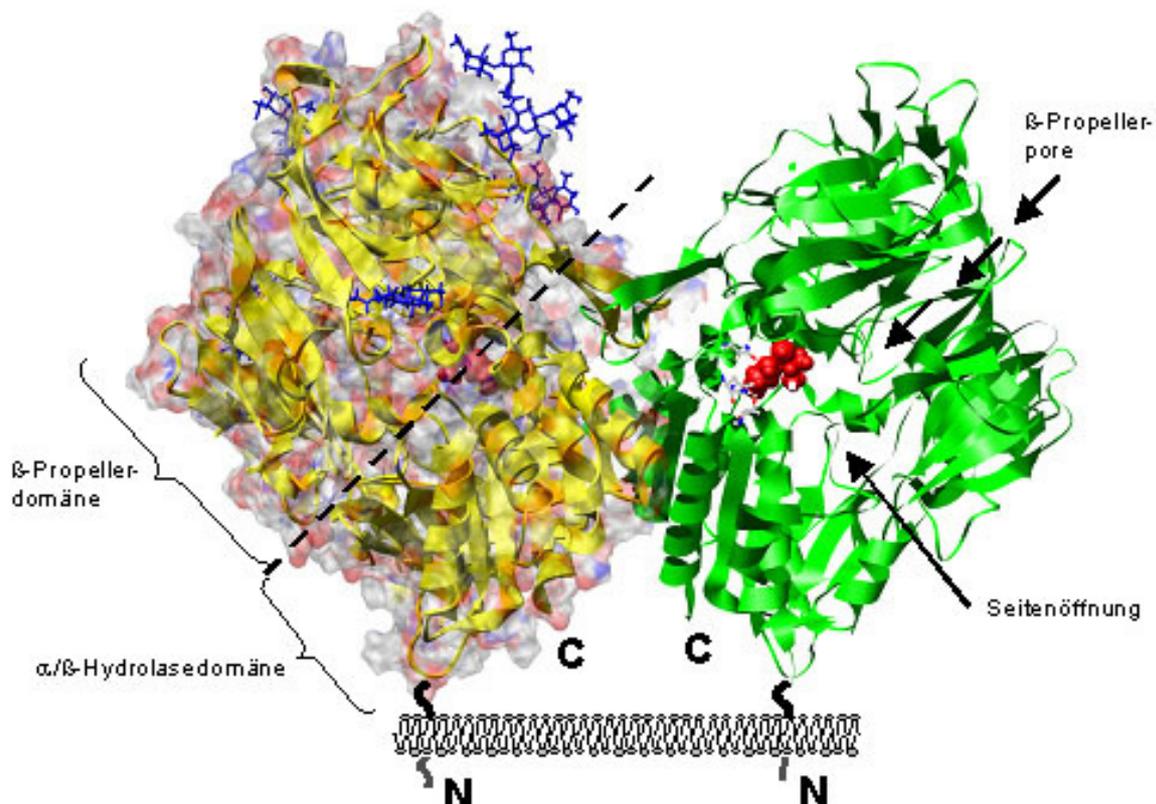


Abbildung 5: Strukturmodell der Dipeptidylpeptidase 4

Darstellung eines DP4-Homodimers, welcher über den Membrananker auf der Zelloberfläche fixiert ist (links ist die Oberflächenladung in *spacefill* und die Glykosilierungen in blau dargestellt, rechts ist der im katalytischen Zentrum (S630, H708, D740) gebundene Inhibitor Valin-pyrrolidid in rot dargestellt). Die Unterteilung des Enzyms in die Domänenstruktur, N- und C-Terminus des Proteins sowie die potentiellen Substrateintrittstellen sind gekennzeichnet. Verändert nach Rasmussen *et al.*⁸⁰

Das enzymatisch aktive Protein setzt sich als Homodimer aus zwei durch nicht-kovalente Wechselwirkungen verbundenen Untereinheiten zusammen. Jede Untereinheit ist aus zwei Domänen aufgebaut, einer α/β -Hydrolase-Domäne und einer β -Propeller-Domäne. Die α/β -Hydrolase-Domäne besteht aus einem zentralen β -Faltblatt und beinhaltet, eingeschlossen von α -Helices, die Aminosäuren der katalytischen Triade. Die β -Propeller-Domäne wird aus acht β -Faltblättern geformt. Auf ihr sind die Glykosilierungen und die Bindungsstellen der Interaktionspartner lokalisiert (Abb. 5).

Durch die spezifische Exopeptidaseaktivität, welche Dipeptide vom ungeschützten N-Terminus von Peptiden nach Prolin an zweiter Position abspaltet, kommt der DP4 eine wichtige Bedeutung bei der Modulation der Aktivität vieler Peptidhormone (GIP, PACAP38), Neuropeptide (Neuropeptid Y) und Chemokine (Tab. 3) zu. Mit der Substratprozessierung greift die DP4 in Prozesse wie Vermittlung des Sättigungsgefühls, Blutdruckregulation, Insulinausschüttung, Schmerzempfinden und Chemotaxis ein⁸¹. Abgesehen von der DP4 gibt es nur wenige Proteasen, die die post-Prolin-Spaltung einer NH_2 -Xaa-Pro-Bindung katalysieren können⁸².

	Name	Sequenz
DP4-Substrate	CXCL6	GP VSAVLTELRCCTCLRVTLRVNPKTIGKLQVFPAGPQCSKVEVVASL KNGKQVCLDPEAPFLKKVIQKILDSGNKKN
	CXCL9	TP VVRKGRCSISTNQGTHLQSLKDLKQFAPSPSCEKIEIATLKNQV QTCLNPDSADVKELIKKEKQVVSQKKKQKNGKKHQKKVVKVRKS QRSRQKKT
	CXCL10	VP LSRTVRCTCISISNQPVNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIATMKKKGE KRCLNPESKAIKNLLKAVSKERSKRSP
	CXCL11	FP MFKRGRCLCIGPGVKAVKVADIEKASIMYPSNCDKIEVIITLKEN KGQRCLNPKSKQARLIKKVERKNF
	CXCL12	KP VSLSYRCPCRFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNR QVCIDPKLKWIEYLEKALNKRFBM
	CCL5	SP YSSDTTPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSKGKSNPAVVFVTRKNRQ VCANPEKKWVREYINSLEMS
	CCL11	GP ASVPTTCCFNLANRKIPLQRLESYRRITSGKCPQKAVIFKTKLAKD ICADPKKKWVQDSMKYLDQKSPTPKP

Tabelle 3: Beispiele von Chemokinen und Zytokinen, deren Umsetzung *in vitro* nachgewiesen werden konnte⁶⁴. Die Zytokine und Chemokine sind mit ihrer Primärstruktur dargestellt. Die putativen Schnittstellen für DP4 sind **fett** hervorgehoben

Neben seiner enzymatischen Aktivität dient die DP4 als Assoziationsmolekül. So wurde nachgewiesen, dass DP4/CD26 auf der Oberfläche von Lymphozyten mit der ADA assoziiert ist und damit identisch mit dem als ADA-Bindeprotein beschriebenen Molekül ist⁸³. Adenosin, das Substrat der ADA, hemmt die T-Zellproliferation. Die Bindung von ADA an der Zelloberfläche über CD26 könnte daher eine wichtige Rolle bei der Regulation der

Aktivität des Immunsystems durch Reduktion der lokalen ADA-Konzentration spielen⁸⁴. Das *human immunodeficiency virus* (HIV) infiziert Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen durch Bindung an CD4 über das Virushüllprotein gp120. DP4 scheint dabei als Kofaktor zu agieren, da das Enzym ebenfalls mit gp120 interagiert. Zudem verhindert die Bindung von gp120 an CD26 die Interaktion mit ADA⁶¹.

Der Interaktion der DP4 mit Proteinen der ECM wird in der Metastasierung eine Bedeutung beigemessen. Zum einen sollen Tumorzellen mittels der Zelloberflächen-DP4 an die ECM adhären³⁶, bzw. nach dem Ablösen vom Ausgangstumor im Blutstrom schwimmende Tumorzellen mittels Zelloberflächen-Fibronectin an das DP4-reiche Lungenendothel anheften⁸⁵. Andererseits konnte in *in vivo* Studien beobachtet werden, dass eine Reexpression von DP4 auf CD26-negativen epithelialen Tumorzellen zu einer Steigerung der Überlebenszeit des Wirtsorganismus führt⁸⁶ bzw. das Tumorwachstum verlangsamt wird⁸⁷. Ein anderes Bild zeigt sich vor allem bei hämatologischen Malignomen. Es ist zu beobachten, dass die DP4-Expression mit der Aggressivität von T-lymphoblastischem Lymphom/T-akuter lymphoblastische Leukämie korreliert⁸⁸. Ebenso führte zum Beispiel eine Reduktion der DP4-Expression mittels siRNA in dem anaplastischen T-Zell Lymphom Karpas299 zu einer verlangsamt Tumorentwicklung und einer erhöhten Überlebensrate der SCID-Mäusen nach Injektion dieser Zellen⁸⁹.

Die spezifische biologische Funktion der DP4 im Tumorgeschehen variiert in Abhängigkeit von der Art der Tumorzellen, der Gegenwart von Interaktionspartnern und der Art und Konzentration von Liganden und Substraten⁹⁰. Auf Grund seiner vielfältigen Funktionen in der Tumorentwicklung stellt die DP4 ein interessantes therapeutisches Ziel zur Behandlung ausgewählter Tumorarten dar. Erste Erfolge bei der Behandlung von Tumoren mit DP4-Inhibitoren konnten in Xenotransplantationsmodellen erzielt werden^{91,92}.

1.4.2 Fibroblastenaktivierungsprotein alpha

Die prolinspezifische Serinprotease Fibroblastenaktivierungsprotein alpha (FAP α , Sepsase) wird unter physiologischen Bedingungen während der Embryonalentwicklung, Wundheilung und des Gewebeumbaus von aktivierten Fibroblasten exprimiert^{93,94}. Ebenso wurde das Protein auf *mesenchymal stromal cells* (MSC), auch als adulte Stammzellen bekannt, nachgewiesen⁹⁵. Daneben ist auch eine Beteiligung an pathologischen Prozessen wie Tumorwachstum^{96,97} und rheumatoide Arthritis⁹⁸ beschrieben, bei denen die Expression des Enzyms durch stromale Myofibroblasten bzw. Myofibroblast-ähnlichen Synovialzellen erfolgt. Entsprechend seines mesenchymalen Ursprungs wird FAP gelegentlich auch von Knochen- und Weichteilsarkomen exprimiert. Das Protein besitzt Proteaseaktivität und konnte auf Invadopodien als Interaktionspartner der β 1-Integrinuntereinheit nachgewiesen werden²⁸. Das Enzym ist identisch mit dem Serumprotein *antiplasmin-cleaving enzyme* (APCE), welchem eine Antiplasminspaltung zugeschrieben wurde⁹⁹.

FAP konnte erstmals 1988 mittels eines monoklonalen Antikörpers auf kultivierten

Fibroblasten nachgewiesen werden¹⁰⁰. Das Enzym ist bei Säugetieren verbreitet, wurde aber auch in niederen Organismen nachgewiesen.

Die komplette cDNA-Sequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des humanen FAP wurde erstmals 1994 veröffentlicht¹⁰¹. Das Enzym gehört zum Clan SC der Familie der Serinproteasen und dort zur Familie S9b, den Prolyloligopeptidasen. Anhand der Aminosäuresequenz errechnet sich ein Molekulargewicht des Monomers von 88 kDa. In Abhängigkeit von Spezies und Gewebe wurde ein Molekulargewicht des membranständigen FAP von 88 bis 95 kDa beschrieben, was auf unterschiedliche posttranslationale Modifikationen, in erster Linie Glykosilierungen, zurückzuführen ist.

FAP ist ein Typ-II-Transmembranprotein, dessen zytoplasmatischer N-Terminus aus vier Aminosäuren besteht, gefolgt von einer 21 Aminosäure langen hydrophoben Transmembranregion mit dem sich anschließenden 735 Aminosäure umfassenden extrazellulären Teil. Der löslichen, im Serum vorkommenden Enzymform fehlt der Transmembrananker.

Humanes FAP besitzt 64 % Nukleotid- und 52 % Aminosäuresequenzidentität mit humaner DP4 (siehe Anhang 1). Strukturvorhersagen basierend auf dem Vergleich mit der aufgelösten DP4-Struktur sagen einen Dimer aufgebaut aus zwei Untereinheiten mit je einer achtblättrigen β -Propeller-Domäne und einer α/β -Hydrolase-Domäne mit der katalytischen Triade voraus¹⁰². Es wird angenommen, dass FAP ebenso wie DP4 als Homodimer vorkommt, daneben gibt es Hinweise, dass FAP und DP4 Heterodimere bilden können¹⁰³ bzw. in supramolekularen Komplexen als Heterotetramer mit DP4 in Verbindung mit urokinase Plasminogenaktivator-Rezeptor und β 1-Integrin vorkommt¹⁰⁴.

Neben der DP4 besitzt FAP eine post-Prolin-spaltende Aktivität einer NH_2 -Xaa-Pro-Bindung, wobei FAP nicht auf einen freien N-Terminus angewiesen ist¹⁰⁵. Durch die spezifische Endopeptidaseaktivität, bei der nach Prolin in Peptiden gespalten wird, besitzt FAP eine hohe Substratspezifität. Obwohl zahlreiche Peptide hypothetische Schnittstellen besitzen, ist mit Antiplasmin bis heute nur ein natürliches Substrat des FAP bekannt. Daneben könnte FAP Dipeptide vom N-Terminus von N-terminal geschützten Peptiden abspalten, die einer Katalyse durch DP4 nicht zugänglich sind. Mit der Umsetzung von Antiplasmin greift FAP in die urokinase Plasminogen-Kaskade ein und könnte auf die Weise die Aktivierung von Plasmin und nachfolgend von MMPs beeinflussen (Abb. 2).

Die spezifische biologische Funktion des FAP im Tumorgeschehen ist trotz der zahlreichen Hinweise auf deren Beteiligung bislang unklar. So wurde zum Beispiel die Anreicherung des FAP auf Invadopodien und der Invasionsfront migrierender Zellen beobachtet^{103,106}. Bei Neoplasien epithelialen Ursprungs welche selbst kein FAP exprimieren scheint die vom Stroma gebildete Protease die Tumorentwicklung zu beeinflussen^{96,107}. Erste Xenotransplantationsmodelle unterstrichen das therapeutische Potential einer Hemmung des FAP¹⁰².

2. Aufgabenstellung

Die Serinproteasen Dipeptidylpeptidase 4 (DP4, EC 3.4.14.5) und Fibroblasten-aktivierungsprotein alpha (FAP, EC 3.4.21.-) sind membranständige Proteine, denen eine Funktion bei unterschiedlichen Prozessen der Tumorprogression zugeschrieben wird. Hervorzuheben sind unter anderem die Zell-Matrix-Interaktionen, Invasion von Tumorzellen und die Modulation der Wirkung von Peptidhormonen sowie Chemokinen durch die enzymatische Hydrolysefunktion.

Ein Forschungsschwerpunkt des Unternehmens probiodrug AG ist es, Effektoren für DP4 und FAP zu entwickeln und somit hochspezifisch die Katalysefunktion der Enzyme zu modulieren und damit in pathophysiologische Prozesse eingreifen zu können.

In vorausgegangenen Allograft-Tiermodellen wurde das Adhäsionsverhalten und die Metastasenbildung von Zellen der Ratten-Adenokarzinomlinie MADB106 im Lungengewebe verschiedener F344-Rattenstämme untersucht¹⁰⁸. Es konnte eine unterschiedlich ausgeprägte Veränderung von Adhäsionsrate sowie Verringerung der Metastasenbildung der MADB106-Zellen bei Einzelinjektion bzw. chronischer Infusion verschiedener DP4-Inhibitorklassen beobachtet werden.

Die in den Tierversuchen beobachtbaren Metastasen sind das Ergebnis einer Kette verschiedener Schritte während der Tumorprogression. Die Rolle der DP4 und des verwandten Proteins FAP sowie deren enzymatischen Aktivitäten in den einzelnen Schritten, wie Zell-Matrix-Interaktion, Migration, Invasion sowie Tumor-Stroma-Interaktion sind weitgehend spekulativ. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bedeutung der DP4 und des FAP auf die unterschiedlichen Schritte der Tumorprogression untersucht werden. Dazu sollten Zelllinien hergestellt werden, welche DP4 und FAP und deren enzymatisch inaktive Varianten überexprimieren, sowie das Verhalten der Zellklone und weiterer Tumorzelllinien in Gegenwart spezifischer Inhibitoren in unterschiedlichen zellbiologischen Modellen untersucht werden.

Diese Arbeit hatte zum Ziel, den Einfluss verschiedener DP4-Inhibitoren auf die Interaktion der DP4 mit extrazellulären Matrixproteinen, als auch die Zelladhäsion an extrazelluläre Matrixproteine sowie auf die Tumor-Stroma-Interaktion mittels proteinchemischer und zellbiologischer Methoden zu untersuchen. Des Weiteren sollten im Rahmen dieser Arbeit die Bedeutung der DP4, des FAP und deren enzymatischen Aktivitäten auf die Zellproliferation, Zelladhäsion, Migration, Invasion, kontaktunabhängiges Wachstum als auch auf die Tumor-Stroma-Interaktion bestimmt werden. Die Hintergründe der funktionellen Veränderungen sollten durch Untersuchung der Signaltransduktion und der Expression ausgewählter Gene aufgeklärt werden.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Verwendete Chemikalien

AEBSF	Roche, Mannheim
Accutase	PAA, Cölbe
Agar	peqlab, Erlangen
CompleteMini Inhibitor mix	Roche, Mannheim
Diethanolamin	Sigma, Taufkirchen
DMSO	Fluka, Sigma, Taufkirchen
EDTA	MP Biochemicals, Eschwege
Extraktionspuffer	BioSource, Invitrogen, Karlsruhe
FCS	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Fibronectin	Biochrom, Berlin
Formaldehyd	BD, Heidelberg
G418	Calbiochem. Merck, Darmstadt
Gentamicin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Glycyl-Prolyl-pNA	Abteilung Chemie, probiodrug AG
Glycyl-Prolyl-AMC	Abteilung Chemie, probiodrug AG
HBS-EP	Biacore, Freiburg
HEPES	Roth, Karlsruhe
IL-2	Cell Concepts, Umkirch
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kollagen I	Sigma, Taufkirchen
Kollagen G	Biochrom, Berlin
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natrium-di-Hydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma, Taufkirchen
PBS, steril	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
PFA	Sigma, Taufkirchen
pNPP	Sigma, Taufkirchen
Proteinstandard SeeBlue®	Invitrogen, Karlsruhe
Saponin	Sigma, Taufkirchen

Surfektant P20	Biacore, Freiburg
TRIS	Roth, Karlsruhe
TRIS/HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Tween®20	Sigma, Taufkirchen
Trypsin/EDTA, steril	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Z-Glycyl-Prolyl-AMC	Abteilung Chemie, probiodrug AG

3.1.2. Verwendete Geräte

Analysenwaage	Satorius, Göttingen
Autoradiographie-Kassette	X-Ray Cassette, Spezial 200, rego, Augsburg
Biacore	BIACORE3000, Biacore, Freiburg
Bunsenbrenner	gasprofi 1 ^{SCS} , WLD-TEC, Göttingen
CCD Kamera	Spot RT Slider, Visitron Systems, Puchheim
Durchflusszytometer	FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg
Einfriergerät	Qualifreeze Cryo-Einfriergerät, Nalgene, Wiesbaden
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert S100, Carl Zeiss, Oberkochen
Geldokumentation	UV-Transiluminator BioDoc-It™, LTF Labortechnik, Wasserburg
Gelelektrophorese	Vertikalelektrophorese-Systems Xcell II Invitrogen, Karlsruhe
Inkubator	Sanyo CO ₂ -Inkubator, MLO-17AI, Sanyo Electric Co., München
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Carl Zeiss, Oberkochen
pH-Meter	MP 220, Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Plattenreader	SpectrafluorPlus, Tecan Deutschland, Crailsheim Sunrise, Tecan Deutschland, Crailsheim
Röntgenfilm	CL-X Posure™ Film, Pierce, Bonn
Rotationsschüttler	Typ 3005, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Rührgeräte	Variomag mono, H+P Labortechnik GmbH, München
Scanner	Epson, perfection 4990 photo
Sterilbank	Kojair Tech Oy, Typ: Kr-125 Safety, Finnland
Stromversorgungsgerät	Typ E835, Consort, Turnhout, Belgien
Tischzentrifuge	Biofuge fresco, W.C. Heraeus GmbH, Hanau
Ultrazentrifuge	Optima Max, Beckman Coulter, Krefeld
Vakuumpumpe	Membran-Vakuumpumpe ME 2C, vacuubrand, Wertheim
Westernblot-System	LTF Labortechnik, Wasserburg
Zellzahlbestimmung	CASY, Modell DT, Schärfe System GmbH, Reutlingen
Zentrifugen	Allegra X-22R, Beckman Coulter, Krefeld Allegra 21, Beckman Coulter, Krefeld

3.1.3. Verwendete Antikörper

Anti-human-DP4-Kaninchenserum (dankenswerter Weise von Prof. Dr. Mentlein, Kiel)
Peroxidase-konjugierter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova, Hamburg)
PE-konjugierte Maus-IgG₁ Fluoreszenzkontrolle (BD, Heidelberg)
PE-konjugierter monoklonaler Maus-Anti-human-CD26-Antikörper (BD, Heidelberg)
PE-konjugierter monoklonaler Maus-Anti-Ratten-CD26-Antikörper (BD, Heidelberg)
Monoklonaler Maus-Anti-human-FAP (Klon F11-24) Antikörper (Alexis, Grünberg)
PE-konjugiertes-F(ab)₂-Fragment-Ziege-Anti-Maus-IgG (Dianova, Hamburg)
PE-konjugierter monoklonaler Maus-Anti-human-CD10-Antikörper (BD, Heidelberg)
PE-konjugierter monoklonaler Maus-Anti-human-CD29-Antikörper (BD, Heidelberg)
PE-konjugierter monoklonaler Maus-Anti-human-CD44 Antikörper (BD, Heidelberg)
APC-konjugierte Maus-IgG₂ Fluoreszenzkontrolle (BD, Heidelberg)
APC-konjugierter monoklonaler Maus-Anti-human-CD13 Antikörper (BD, Heidelberg)
AlexaFluor®647-konjugierter monoklonaler Maus-Anti-human-CCR2-Antikörper (BD, Heidelberg)
APC-konjugierter monoklonaler Maus-Anti-human-EpCAM-Antikörper (BD, Heidelberg)
monoklonaler Maus-Anti-β-Catenin-Antikörper (Sigma, Taufkirchen)
RhodaminRed-X-konjugierter Kaninchen-Anti-Maus-IgG-Antikörper (Dianova, Hamburg)
monoklonaler Kaninchen-Anti-Phospho-NFκB-p65-Antikörper (Ser536) (Cell Signaling, Frankfurt)
monoklonaler Kaninchen-Anti-Phospho-NFκB-p65-Antikörper (Ser276) (Cell Signaling, Frankfurt)
monoklonaler Kaninchen-Anti-NFκB-p65-Antikörper (Cell Signaling, Frankfurt)
monoklonaler Kaninchen-Anti-Phospho-p38-Antikörper (Thr180/Tyr182) (Cell Signaling, Frankfurt)
monoklonaler Kaninchen-Anti-p38-Antikörper (Cell Signaling, Frankfurt)
monoklonaler Kaninchen-Anti-Phospho-JNK-Antikörper (Thr183/Tyr185) (Cell Signaling, Frankfurt)
monoklonaler Kaninchen-Anti-Phospho-ERK1/2-Antikörper (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling, Frankfurt)
monoklonaler Kaninchen-Anti-ERK1/2-Antikörper (Cell Signaling, Frankfurt)
HRP-konjugierter Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Cell Signaling, Frankfurt)
monoklonaler Maus-Anti-α-Tubulin-Antikörper (Sigma, Taufkirchen)
monoklonaler Maus-Anti-E-Cadherin-Antikörper (BD, Heidelberg)
HRP-konjugierter Ziege-Anti-Maus-IgG-Antikörper (Sigma, Taufkirchen)

3.1.4. Verwendete Plasmid-Vektoren

Die Vektoren pEGFP-N1 und pEGFP-C3 (Clontech, BD Bioscience, Heidelberg) wurden in dieser Arbeit als Expressionsvektoren eingesetzt. Mit dem Vektor pEGFP-N1 kann ein EGFP-Fusionsprotein in Säugetierzellen exprimiert werden. Die Fusion erfolgt dabei an den N-Terminus des EGFP. Diese Technik erlaubt es, Lokalisationsstudien *in vivo* oder in fixierten Zellen durchzuführen, ohne spezifische Antikörper verwenden zu müssen. Der Vektor besitzt außerdem noch zwei Resistenzgene zur Selektion in Prokaryoten (Kanamycinresistenz) und in Säugerzellen (Geneticinresistenz). Im Vektor pEGFP-C3 erfolgt die Fusion des klonierten Proteins C-terminal vom EGFP.

3.1.5. Verwendete Zelllinien

Folgende Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

<i>Zellline</i>	<i>Zelltyp</i>	<i>Herkunft</i>
Hep-G2	Humanes Hepatozelluläres Karzinom	1*
U-343 MG	Humanes Glioblastom	2*
MADB106	Ratten Brustdrüsen-Adenokarzinom	3*
US8-93	Weichteilsarkom	5*
MIAPaCa-2	Humanes Pankreas-Karzinom	5*
HupT3	Humanes Pankreas-Karzinom	5*
HEK-293	Adenovirus Typ5 transformierte humane embryonale Nierenzellen (<u>h</u> uman <u>e</u> mbrional <u>k</u> idney)	1*
PA-TU-8988S	Lebermetastase eines humanen Pankreas-Karzinoms	5*
PA-TU-8988T	Lebermetastase eines humanen Pankreas-Karzinoms	5*
NHDF-c	Primäre humane dermale Fibroblasten	6*
Jurkat	Humanes T Zell-Lymphom	4*
THP-1	Humane akute monozytische Leukämie	1*
NK92	Humanes NK Zell-Lymphom	1*

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Zelllinien und Primärzellen

1* Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

2* Prof. Ansorge Institut für Molekulare und Klinische Immunologie Otto von Guericke Universität Magdeburg

3* Prof. Stefan van Hörsten, Medizinische Hochschule, Hannover

4* Institut für Medizinische Immunologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale

5* Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale

6* PromoCell, Heidelberg

3.1.6. Verwendete Inhibitoren

<i>Name</i>	<i>DP4 Ki [M]</i>	<i>FAP IC₅₀ [M]</i>	<i>FAP Ki [M]</i>
P32/98	9,30 E-07	>1 E-04	
UG125	5,63 E-11	5,6 E-08	
UG28	6,35 E-11	9,15 E-09	7,43 E-08
P95/99		3,58 E-05	6,66 E-05
UG92	8,77 E-09	2,10 E-05	
SC415		4,87 E-07	2,26 E-07

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Inhibitoren

Bestimmung der Inhibitor konstanten erfolgte mit den entsprechenden rekombinanten humanen Enzymen und chromophoren Substraten

3.1.7. Verwendete Puffer

PBS (phosphat buffered saline)

8,0 g NaCl
 0,2 g KCl
 1,44 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O
 0,2 g KH₂PO₄

mit deionisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt (pH 7,6)

TBS (Tris buffered saline)

8,77 g NaCl
 0,55 g KCl
 2,42 g TRIS

mit deionisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt (pH 7,6)

PBS-EP

8,0 g NaCl
 0,2 g KCl
 1,44 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O
 0,2 g KH₂PO₄
 0,877 g EDTA

mit deionisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt (pH 7,6)

0,005 % (v/v) Polysorbat P20

HBS-EP (Hepes buffered saline)

8,0 g NaCl

2,38 g HEPES

0,877 g EDTA

mit deionisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt (pH-Wert auf 7,6 eingestellt)

0,005 % (v/v) Polysorbat P20

Peptidasaktivität-Messpuffer

3,22 g HEPES

2,62 g KCl

mit deionisiertem Wasser auf 250 ml aufgefüllt (pH-Wert auf 7,6 eingestellt)

3.2. Methoden

3.2.1. Proteinchemische Methoden

3.2.1.1. Untersuchung der Interaktion von DP4 mit Fibronectin und Kollagen mittels Oberflächenplasmonresonanz

Basierend auf dem Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) können mit einem BIACORE-Gerät die Wechselwirkung zwischen zwei Interaktionspartnern in Echtzeit gemessen werden¹⁰⁹. Das Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz tritt auf, wenn polarisiertes Licht unter Bedingungen der totalen internen Reflexion auf eine elektrisch leitfähige Metalloberfläche an der Grenze zwischen Medien unterschiedlicher refraktiver Indizes trifft. In einem BIACORE-Gerät wird ein keilförmiger Strahl polarisierten Lichts, der dabei einen Bereich verschiedener Einfallswinkel abdeckt, auf die Glasoberfläche eines Sensorchips eingestrahlt und das reflektierte Licht registriert.

In Abhängigkeit von der optischen Dichte werden diskrete Energiepakete in Abhängigkeit vom Einfallswinkel, der Beschaffenheit des Metallfilms und den Eigenschaften des umgebenden Mediums aus dem eingestrahlteten Licht ausgekoppelt und führt auf diese Weise zu einem Intensitätsminimums im reflektierten Licht. Da das Messgerät mit monochromatischem Licht arbeitet, die Eigenschaften des Metallfilms und der Glasoberfläche des Sensorchips während der Messung konstant bleiben, schlägt sich eine Veränderung des refraktiven Index in der Flusszelle als Änderung des Reflexionswinkel des Intensitätsminimums im reflektierten Licht nieder. Die Winkeländerung des Intensitätsminimums wird von einem Diodenarray registriert und auf dem Computer als zeitabhängige Bindungskurve dargestellt. Das Messprinzip ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

Für eine Messung wird ein Bindungspartner (Ligand) kovalent an die Sensoroberfläche gekoppelt, der andere Bindungspartner (Analyt) strömt durch die Messzelle am Liganden vorbei. Jede Veränderung der Masse an der Sensoroberfläche, z.B. durch die Bindung des Analyten an den Liganden, führt zu einer Veränderung der optischen Dichte. Das bewirkt eine Änderung des Reflexionswinkels des Intensitätsminimums innerhalb des von der Goldoberfläche totalreflektierten polarisierten Lichtes. Durch einen kontinuierlichen Pufferstrom werden nicht bindende Bestandteile der Analytenpräparation entfernt. Deshalb können auch Rohextrakte, Seren oder andere verunreinigte Proben verwendet werden, um am immobilisierten Liganden bindenden Analyten zu messen. Des Weiteren führt der kontinuierliche Pufferstrom zu einer konstanten Konzentration des Analyten in der Messzelle und ermöglicht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen gebundenem und nicht gebundenem Analyten

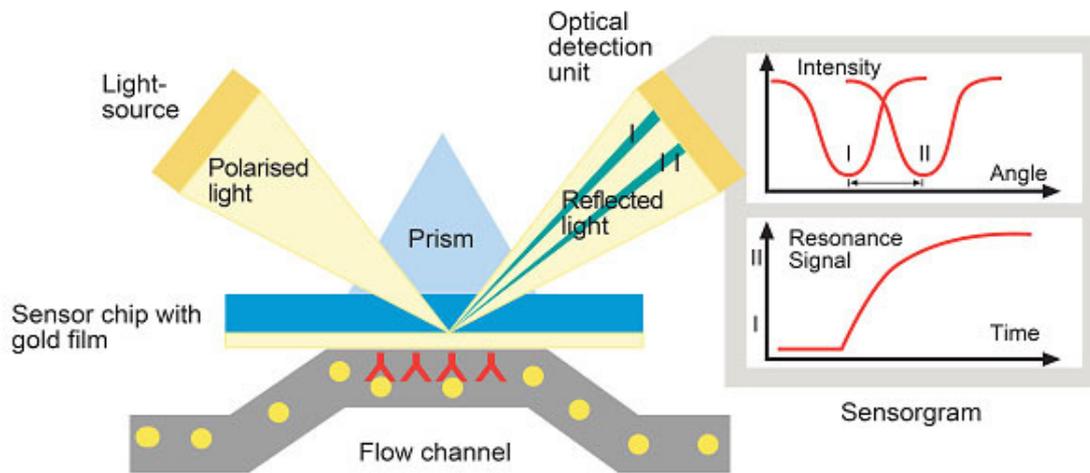


Abb. 6: Schematische Darstellung einer Flusszelle mit SPR-Sensor zur Messung von Wechselwirkungen zwischen Molekülen.

Die Probe mit einem der Bindungspartner strömt durch die Flusszelle, dabei kann der Analyt an den anderen Bindungspartner, den Liganden binden, welcher an der Sensorchipoberfläche immobilisiert ist. Dadurch ändert sich der refraktive Index an der Sensorchipoberfläche. Das bewirkt eine Veränderung des Winkels des Intensitätsminimums im reflektierten Licht. Auf diese Weise können Wechselwirkungen in unmittelbarer Nähe der Sensoroberfläche detektiert werden. (Quelle: Biacore, Freiburg)

Für eine effektive Immobilisierung des Liganden ist eine möglichst hohe lokale Ligandenkonzentration an der Sensoroberfläche notwendig. Diese wird durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen karboxymethylierten Dextranbeschichtung des CM5-Sensorchips (Biacore, Freiburg) und dem Liganden ermöglicht, welcher bei einem unter seinem isoelektrischen Punkt (pI) liegenden pH-Wert eine positive Molekülgesamtladung aufweist.

Die Liganden Fibronektin und Kollagen wurden in 10 mM Natriumacetatpuffer pH 4 (Biacore, Freiburg) gelöst und anschließend erfolgte die Immobilisierung der Liganden durch Aminkopplung. Dafür wurden die Karboxymethylgruppen der Dextranmatrix der Sensorchipoberfläche bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ zunächst mit 50 μl eines äquivalenten Gemisches aus 100 mM EDC (1-Ethyl-3(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid Hydrochlorid) und 25 mM NHS (N-Hydroxysuccinimid) durch Bildung eines aktivierten Esters einer Kopplungsreaktion zugänglich gemacht. Danach erfolgte die Injektion des Liganden im Kopplungspuffer, der dabei kovalent über eine Esterbindung an die Dextranmatrix gekoppelt wurde. Der Erfolg der Kopplung konnte direkt über die Steigung der *response units* (RU) verfolgt werden. Die Injektion wurde wiederholt bis eine ausreichende Beladung der Dextranmatrix erreicht war. Die restlichen noch reaktiven Gruppen der Dextranbeschichtung wurden abschließend durch eine Reaktion mit 50 μl 1 M Ethanolaminlösung (Biacore, Freiburg) inaktiviert. Als Referenz für die folgenden Messungen wurde die Oberfläche von zwei Flusszellen mit NHS/EDC aktiviert und anschließend mit Ethanolamin wieder inaktiviert.

Die Messung der Interaktion von DP4 mit den auf dem Sensorchip immobilisierten Liganden erfolgte durch Injektion von 100 µl DP4 in PBS-EP oder 20 mM Natriumphosphat, 2 mM EDTA, 0,005 % (v/v) P20, pH 7,6 bei einer Flussrate von 20 µl/min. Die DP4 wurde in einer Konzentrationsreihe von 1 pM bis 1 µM eingesetzt. Nach der Injektion schloss sich eine fünfminütige Dissoziationsphase an, gefolgt von einer Regeneration der Sensorchipoberfläche durch Injektion von 10 µl 1 M NaCl. Die einzelnen Bindungskurven der Konzentrationsreihe wurden mit Hilfe der Auswertesoftware BIAevaluation 3.0 zu einer Kurvenschar zusammengefügt.

3.2.1.2. Bestimmung der Interaktion von DP4 mit Fibronectin und Kollagen mittels

ELISA

Um die Bindung von DP4 an Matrixproteine in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen an Matrixprotein und DP4 bestimmen zu können, verwendeten wir einen ELISA. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe von BSA, Fibronectin bzw. Kollagen I von 0, 25, 50 und 100 µg/ml in PBS hergestellt. In jeweils 4 Kavitäten von Mikrotiterplatten (Maxisorb, Greiner Bio-one, Frickenhausen) wurden 100 µl der Proteinlösungen pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Proteinlösung wurde entfernt und anschließend die Kavitäten dreimal mit PBS, 0,05 % v/v Tween®20 gewaschen. Um mögliche noch freie Bindungsstellen in den Kavitäten abzudecken, wurde die Platte mit 1 % w/v BSA in PBS für zwei Stunden bei RT inkubiert und danach erneut 3 mal mit PBS 0,05 % v/v Tween®20 gewaschen. Von einer Verdünnungsreihe von 0, 1, 3, 5, 10 und 20 µg/ml rekombinanter humaner DP4 in PBS wurden jeweils 100 µl so in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert, dass von jeder der Konzentrationskombination von 0 µg/ 0 µg bis 10 µg/ 2 µg (Matrixprotein/ rhDP4) in 4 Kavitäten vorlagen. Die gereinigte rekombinante humane DP4 wurde freundlicherweise von Joachim Bär, probiodrug AG zur Verfügung gestellt¹¹⁰. Die Platte wurde eine Stunde bei RT inkubiert, gefolgt von dreimaligem Waschen mit PBS, 0,05 % v/v Tween®20. Über Nacht bei 4 °C erfolgte die Inkubation der Platte mit einem Kaninchen-Anti-human-DP4 Antiserum mit einer Verdünnung von 1:1000 in jeweils 100 µl PBS. Durch erneutes dreimaliges Waschen mit PBS, 0,05 % v/v Tween®20 wurden nicht gebundene Antikörper entfernt. Die Platte wurde anschließend mit 100 µl einer 1:10000 Verdünnung des sekundären Antikörpers, alkalische Phosphatase gekoppelten Ziege-Anti-Kaninchen Serum, in PBS für 2 Stunden bei RT inkubiert und nachfolgend 3 mal mit PBS, 0,05 % v/v Tween®20 gewaschen. Die Entwicklung des ELISA erfolgte durch dreißigminütige Inkubation mit dNPP-Substrat in 50 mM Diethanolamin (Sigma, Taufkirchen) pH 9,6 1 mM MgCl₂ bei 37 °C. Die Absorption des durch die Phosphatase freigesetzten Farbstoffs wurde im „TECAN Sunrise“ bei 405 nm gemessen. Die Messungen erfolgten jeweils parallel in vier Kavitäten in zwei von einander unabhängigen Versuchen.

3.2.1.3. Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Das Prinzip, welches bei dieser Methode zur Anwendung kommt, ist die proteolytische Freisetzung eines Chromophors oder eines Fluorophors aus einem artifiziellen Peptidsubstrat¹¹¹. Die Messung erfolgt in einem hinsichtlich pH und Ionenstärke optimierten Puffer. Zur Bestimmung der Dipeptidylpeptidase-Aktivität wurde Glycyl-Prolyl-pNA bzw. Glycyl-Prolyl-AMC in folgendem Messansatz verwendet:

200 µl	Messpuffer
10 µl	Inhibitorlösung
10 µl	Substrat (270 µM)
50 µl	Enzymlösung (0,5 µg/ml)

Als erstes wurden der auf 37 °C temperierte Messpuffer, die Inhibitorlösung und die Substratlösung vereinigt, danach erfolgte die Zugabe der Enzymlösung und der Start der Messung. Die enzymatische Aktivität wurde über die Messung der Absorption bei 405 nm im Falle von pNA-Substrat bzw. die Messung der Fluoreszenz bei 465 nm nach einer Anregung bei 380 nm im „SpectrafluorPlus“-Plattenreader bei 37 °C verfolgt.

Zur Bestimmung der Stabilität von DP4-Inhibitoren im Zellkulturüberstand wurden statt 10 µl Inhibitorlösung 50 µl Kulturüberstand verwendet. Das Volumen des Messpuffers wurde entsprechend verringert um ein Gesamtvolumen des Ansatzes von 270 µl zu erreichen.

3.1.2.4. Extraktion der Gesamtproteine

Zur Untersuchung des Einflusses von DP4 und FAP auf die Expression ausgewählter Proteine und die Phosphorylierung verschiedener Kinasen in Signalkaskaden wurde das Gesamtprotein aus den Zellen der unterschiedlichen HEK-293-Klone extrahiert.

Dazu wurden jeweils 1 Mio. Zellen über Nacht in 35 mm Kulturschalen kultiviert. Vor der Lyse wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem Waschpuffer (20 mg Natriumorthovanadat in 100 ml PBS) gewaschen. Anschließend wurden pro Kulturschale 60 µl Extraktionspuffer (1 ml Extraktionspuffer, 1 Tablette CompleteMini Inhibitormix, 1 µl AEBSF) zugegeben, die Zellen mit einem Zellschaber (Schubert Laborfachhandel) abgeschabt und in ein eisgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 4 °C und 15000 x g abgetrennt. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

3.1.2.5. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford mittels „Bradford Reagent“ (Sigma) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Der Methode liegt die Messung der Änderung der Absorption von Coomassie Blue G250 bei 595 nm durch Bindung an Lysin- und Arginin-Seitenketten von Proteinen zu Grunde. Die Absorption bei

595 nm wurde mit dem Photometer SmartSpec 3000 (BIO-RAD) gemessen. Die zur Berechnung der Proteinkonzentration benötigte Eichkurve wurde an Hand vermessener BSA-Verdünnungsreihe vom systeminternen Programm des Photometers berechnet.

3.1.2.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die in SDS-Micellen eingeschlossenen Proteine durch Anlegen einer elektrischen Spannung zur Wanderung durch ein Polyacrylamid-Gel angeregt und dabei entsprechend ihrer Wanderungsgeschwindigkeit und damit der Proteingröße aufgetrennt. Die Trennung der Proteine erfolgte nach der Methode von Laemmli in 4 – 12 %igen BisTris SDS-Polyacrylamid-Gelen (Invitrogen) mittels des Vertikalelektrophorese-Systems Xcell II. Die Proben wurden mit Probenpuffer (Invitrogen) versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und anschließend jeweils 20 µg Protein in die Gel-Taschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde in MES-Puffer (Invitrogen) bei einer konstanten Spannung von 175 V durchgeführt. Als Referenz wurde der Proteinstandard SeeBlue® aufgetragen.

3.1.2.7. Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine mit spezifischen Antikörpern detektieren zu können, müssen sie aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine entsprechende Matrix übertragen werden. Dazu wurden die Proteine mittels des „semi dry“ Verfahrens in der Blotting-Apparatur (LTF Labortechnik, Wasserburg) auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Der Transfer erfolgte innerhalb von 90 Minuten bei 0,8 mA/cm² Gelfläche in einem diskontinuierlichen Puffersystem mit folgendem Schichtaufbau von Anode zu Kathode:

- 2 Lagen Filterpapier GB005 (Whatmann) in Puffer 1 (0,3 M Tris pH 10,4; 20 % (v/v) Methanol)
- 1 Lagen Filterpapier GB005 (Whatmann) in Puffer 2 (0,025 M Tris pH 10,4; 20 % (v/v) Methanol)
- Nitrocellulosemembran Protran BA 83 (Whatmann) mit dest. Wasser equilibriert
- SDS-Polyacrylamid-Gel
- 2 Lagen Filterpapier GB005 (Whatmann) in Puffer 3 (0,025 M Tris pH 9,4; 0,04 M ε-Aminocapronsäure, 20 % (v/v) Methanol)

Der erfolgreiche Transfer konnte durch den Proteinstandard SeeBlue® überprüft werden.

3.1.2.8. Immundetektion von immobilisierten Proteinen

Die Immundetektion der immobilisierten Proteine erfolgte nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und dem Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen. Zur Absättigung freier Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran erfolgte eine Behandlung mit Block-

Lösung (3 % Magermilchpulver (w/v), 0,05 % Tween®20 in TBS) für eine Stunde bei RT unter kontinuierlichem Schütteln. Anschließend wurde die Membran (6 x 8 cm) mit dem in 5 % Magermilchpulver (w/v), 0,05 % Tween®20 in TBS verdünntem Primär-Antikörper über Nacht bei 6 °C inkubiert. Dafür wurde die Membran in einer „feuchten Kammer“ (mit Wasser-getränktem Zellstoff ausgelegtes verschließbares Gefäß) mit 2 ml Antikörperlösung überschichtet. Nach der über Nacht Inkubation wurde die Membran 3 mal 10 Minuten mit TBS gewaschen. Die Inkubation mit HRP-gekoppeltem sekundärem Antikörper (1:2000) erfolgte in 10 ml TBS, 5 % Magermilchpulver (w/v), 0,05 % Tween®20 für eine Stunde unter Schütteln bei RT, gefolgt von erneutem dreimaligem Waschen mit TBS. Die markierten Proteine wurden mit dem Immundetektion-System „SuperSignal West Pico“ (Pierce, Bonn) gemäß den Anweisungen des Herstellers detektiert. Dazu wurden die Membranen zum Schutz der Röntgenfilme nach der Inkubation mit dem Immundetektion-System „SuperSignal West Pico“ in handelsübliche Frischhaltefolie eingeschlagen. Die Exposition der Röntgenfilme erfolgte in der Autoradiographie-Kassette für 10 Sekunden bis 90 Minuten. Die Entwicklung und Fixierung der Filme wurde in der Dunkelkammer von Hand durchgeführt. Zwischen Entwicklung und Fixierung (jeweils Tanal, Norderstedt) wurde der Film kurz in einem Wasserbad geschwenkt, abschließend mit fließendem Wasser gewaschen und luftgetrocknet.

3.2.2. Zellbiologische Methoden

3.2.2.1. Zellzucht

Die Anzucht der Zellen erfolgte in den in Tabelle 6 angegebenen Kulturmedien. Zur Vermehrung der Zellen wurden ca. 1 Mio. Zellen aus den in flüssigem Stickstoff gelagerten Kryoröhrchen in eine 25 cm² Kulturflasche (Greiner Bio-one, Frickenhausen) mit 5 ml Kulturmedium ausgesät und bei 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchte und 37 °C inkubiert. Dazu wurden die Kryoröhrchen nach der Entnahme aus dem Stickstoffbehälter in 37 °C warmen Wasser aufgetaut und danach 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Einfriermedium abgesaugt, die Zellen in 1 ml vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen und in Kulturflaschen überführt. Nach 2 Tagen erfolgte der Wechsel des Kulturmediums, das heißt das verbrauchte Medium wurde abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Die Passagierung der Zellen erfolgte in den in Tabelle 6 angegebenen Intervallen. Dafür wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit sterilem PBS gewaschen, mit 1 ml steriler Trypsin/EDTA Lösung pro 25 cm² Flasche versetzt und gemäß den in Tabelle 6 angegebenen Bedingungen inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 3 ml FCS-haltigem Medium, welches die proteolytische Aktivität des Trypsins inhibiert abgewaschen, ca. 2 Mio. Zellen der Zellsuspension wurde in eine neue 25 cm² Kulturflasche übertragen und mit dem entsprechenden Kulturmedium auf 5 ml aufgefüllt.

Die Anzucht der Suspensionskulturen erfolgte in RPMI-Medium mit 10 % FCS. Zur Vermehrung der Zellen wurden ca. 2 Mio. Zellen aus den in flüssigem Stickstoff gelagerten Kryoröhrchen in einer Suspensionskulturflasche mit einer Dichte von 0,5 Mio. Zellen pro

Milliliter ausgesät und bei 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchte und 37 °C inkubiert. Nach 2 Tagen wurde das Kulturmedium gewechselt. Dafür wurden die Zellen für 5 min bei 300 x g abzentrifugiert und in 1 ml frischem Kulturmedium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellzahl mittels Zellzählgerät bestimmt und die Zellen in frischem Kulturmedium mit einer Dichte von 0,5 Mio. Zellen pro Milliliter ausgesät.

<i>Zelllinie</i>	<i>Kulturmedium</i>	<i>Passagierung</i>	<i>Trypsin</i>
Hep-G2	DMEM	2 x pro Woche	10 min bei 37 °C
U-343 MG	DMEM	2 x pro Woche	5 min bei RT
MADB106	RPMI 1640	2 x pro Woche	5 min bei RT
US8-93	RPMI 1640	3 x pro Woche	5 min bei RT
MIAPaCa-2	RPMI 1640	3 x pro Woche	3 min bei RT
HupT3	RPMI 1640	3 x pro Woche	3 min bei RT
Hek 293	DMEM/F12	3 x pro Woche	abklopfen
PA-TU-8988S	DMEM/F12	2 x pro Woche	7 min bei 37 °C
PA-TU-8988T	DMEM/F12	3 x pro Woche	5 min bei RT
NHDF-c	Fibroblast Basal Medium 2 2 % FCS, 5 µg/ml Insulin, 1 ng/ml bFGF	1 x pro Woche	7 min bei RT
Jurkat	RPMI 1640	2 x pro Woche	
THP-1	RPMI 1640	2 x pro Woche	
NK92	RPMI 1640, 10 ng/ml IL-2	1 x pro Woche	

Tabelle 6: Name und Kulturbedingungen der verwendeten Zelllinien. Die Kulturmedien aller Zelllinien enthielten 10 % (v/v) FCS und 60 µg/ml Gentamicin (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe)

3.2.2.2. Einfrieren von Zellen

Nach Absaugen des Mediums wurden durch Zugabe von Trypsinlösung und anschließendem Abspülen mit FCS-haltigem Medium die Zellen gewonnen. Durch Zentrifugation für 5 min bei 300 x g erfolgte eine Sedimentation der Zellen, die anschließend in 1 ml Einfriermedium (90 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert wurden. Durch Inkubation der Zellen über Nacht in einem Einfriergerät bei -80 °C konnte eine kontinuierliche langsame Abkühlung von ca. 1 °C/min gewährleistet werden. Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2.2.3. Transfektion von Zellen

Für den Transfer der Plasmid-DNA in die Zellen wurde der Transfektionskit Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Das Lipofectamin Transfektionsreagenz besteht aus einem kationischen Lipid, welches während der Transfektion Liposomen bildet. Diese interagieren mit der negativ geladenen DNA und bilden Komplexe, welche mit der Zellmembran fusionieren und durch Endozytose in die Zelle gelangen.

Jeweils 700.000 HEK-293- bzw. PA-TU-8988T-Zellen in 3 ml Kulturmedium wurden pro Kavität von 6-Loch-Kulturschalen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Für jedes zur Transfektion verwendete Plasmid wurden zwei Mikroreaktionsgefäße mit je 250 µl OPTI-MEM (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) gefüllt. In ein Mikroreaktionsgefäß wurde 4 µg Plasmid-DNA zugegeben, in das andere Gefäß wurde 25 µl Lipofectamin Reagenz pipettiert. Nach 10 min wurden die Inhalte beider Reaktionsgefäße vereinigt und 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt und durch 2 ml Serum-freies Medium ersetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Liposom-DNA-Komplexes.

3.2.2.4. Selektion transfizierter Zellen

Die Selektion der Zellen, die das Plasmid, welches eine Neomycin Resistenz vermittelt, stabil in ihr Genom eingebaut hatten, erfolgte mittels Geneticin (G418). Mit der Selektion wurde 48 Stunden nach der Transfektion durch Zugabe des Antibiotikums zum Kulturmedium begonnen. Innerhalb von zwei Wochen bildeten die resistenten Klone Zellkolonien, die anschließend isoliert wurden. Die Etablierung stabil transfizierter Zelllinien erfolgte durch Zugabe von 800 µg/ml G418 in das Kulturmedium. Nach 2 Wochen wurden Zellklone durch direktes Absaugen mit sterilen Filter-Pipettenspitzen isoliert. Anschließend wurden die abgelösten Zellen aufgenommen und in eine 6-Loch-Kulturplatte transferiert und weiter kultiviert. Die Bestimmung der optimalen Konzentration an Geneticin erfolgte in einem Vorversuche mit Hilfe einer Konzentrationsreihe von 0 – 1200 µg/ml G418. Dazu wurden 200.000 Zellen der für die Transfektion verwendeten Zelllinien in 12-Loch-Kulturschalen ausgesät und nach Zugabe der entsprechenden Mengen an G418 in das Kulturmedium die Entwicklung der Zellen über einen Zeitraum von mehreren Tagen mit dem Lichtmikroskop verfolgt.

3.2.2.5. Durchflusszytometrie

Nach der Transfektion der Zellen mit den verschiedenen Vektoren und der Selektion stabiler Klone wurde mittels Durchflusszytometrie die Menge der exprimierten Proteine auf der Zelloberfläche bestimmt. In einem Durchflusszytometer wird die Zellsuspension durch einen Überdruck im Probenröhrchen in die Messzelle gedrückt. Dort wird der Probenstrom von einem schneller fließenden Hüllstrom umgeben und durch die damit einhergehende hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen vereinzelt und in einer Reihe in der Mitte

der Messzelle angeordnet. Die einzelnen Zellen durchqueren die Strahlengänge von zwei Lasern mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen. Beim Durchtritt durch den Laserstrahl werden die Vorwärtsstreuung durch Fotodioden und über Spiegel und ein System aus Filtern die Seitwärtsstreuung und 4 verschiedene Fluoreszenzen mit Photomultipliern registriert. Die so gemessenen analogen Daten werden in 1024 digitale Kanäle umgewandelt und zur Darstellung an den Computer übertragen.

Für eine FACS-Messung wurden die Zellen bis 80 % Konfluenz kultiviert und anschließend zum schonenden Ablösen mit Accutase (PAA, Cölbe) behandelt. Danach erfolgte das Abtrennen der Accutase durch Zentrifugation für 5 min bei 300 x g und anschließend wurden 100.000 Zellen in 100 µl PBS, 3 % FCS aufgenommen. Nach Zugabe von 10 µl Fluoreszenzmarkierten primären Antikörper schloss sich eine dreißigminütige Inkubation im Dunkeln bei 4 °C an, gefolgt von dreimaligem Waschen mit 300 µl PBS, 3 % FCS. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 200 µl PBS, 2 % Formaldehyd resuspendiert. Im Falle von nicht markierten primären Antikörpern schloss sich der Inkubation und den Waschschriften eine weitere Inkubation im Dunkeln bei 4 °C mit 50 µl einer 1:100 Verdünnung des PE-konjugierten-F(ab)₂-Fragment-Ziege-Anti-Maus IgG an, gefolgt von dreimaligem Waschen mit 300 µl PBS 3 % FCS. Als Letztes wurden die Zellen in 200 µl PBS, 2 % Formaldehyd resuspendiert.

3.2.2.6. Bestimmung von DP4- und FAP-Aktivität auf Zellen

Zur Bestimmung der Dipeptidylpeptidase-Aktivität wurde Glycyl-Prolyl-AMC, während zur Bestimmung der FAP-Aktivität das N-teminal geschützte Substrat Z-Glycyl-Prolyl-AMC in folgendem Messansatz verwendet wurde:

250 µl	Messpuffer
10 µl	Inhibitor
10 µl	Substrat (270 µM)

Für die Messung wurden je 150.000 Zellen pro Kavität einer Mikrotiterplatte (Greiner Bio-one, Frickenhausen) eingesät und 4 Stunden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂ kultiviert. Anschließend wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch auf 37 °C vorgewärmten Messpuffer ersetzt. Nach Zugabe von Inhibitor und Substratlösung konnte die Messung gestartet werden. Die enzymatische Aktivität wurde über die Messung der Änderung der Fluoreszenz bei 465 nm nach einer Anregung bei 380 nm im „SpectrafluorPlus“-Plattenreader verfolgt.

3.2.2.7. RNA-Gewinnung aus Zellen

Um die Transkription der von uns in die Zellen eingeschleusten DNA zu überprüfen und um dadurch ausgelöste Veränderungen in den mRNA-Levels anderer Gene feststellen zu können, wurde die Gesamt-RNA nach Herstellervorschrift mit dem NucleoSpin® Kit (Macherey-

Nagel, Düren) isoliert und gereinigt. Dazu wurden die Zellen nach dem Ablösen von der 25 cm² Kulturflasche in 5 ml Kulturmedium aufgenommen, gefolgt von einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 300 x g. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 350 µl im Kit enthaltenen Lysepuffer lysiert und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren.

3.2.2.8. Herstellung mikroskopischer Proben

Neben den FACS-Messungen und der Bestimmung der enzymatischen Aktivität auf den Zellen sollte die Lokalisation der DP4- und FAP-Moleküle auf der Zelloberfläche durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mit EGFP-fusionierten DP4 und FAP in den stabilen Klonen bestätigt werden.

Zur Herstellung der mikroskopischen Proben wurden jeweils 1 Mio. Zellen in 2 ml Kulturmedium auf sterile Deckgläschen in 6 cm Kulturschalen (Greiner Bio-one, Frickenhausen) ausgesät und über Nacht bei 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchte und 37 °C inkubiert. Die Deckgläschen wurden durch Tauchen in 98 % Ethanol (Roth, Karlsruhe) und anschließendem Abflammen über dem Bunsenbrenner sterilisiert. Nach der Inkubation wurde das Kulturmedium abgossen und Restflüssigkeit durch Abklopfen entfernt, gefolgt von dreimaligem Waschen mit 1,5 ml PBS. Zur Fixierung der zellulären Proteine wurde das Deckgläschen für 20 Minuten mit 1 ml PBS, 4 % PFA inkubiert und anschließend erneut 3 mal mit 1,5 ml PBS gewaschen. Der primäre Antikörper wurde mit der entsprechenden Verdünnung in 50 µl PBS, 0,01 % Saponin gelöst. Die Saponinlösung wurde frisch hergestellt und auf Eis gelagert. Die Antikörperlösung wurde in eine Kulturschale pipettiert und das Deckgläschen mit dem Zellrasen nach unten auf den Tropfen platziert. Nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde 1 : 100 in 1 ml PBS, 0,01 % Saponin verdünnt anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf die Deckgläschen gegeben. Für eine DAPI-Färbung wurde zusätzliche für 10 Minuten 100 µl einer 10 µg/ml DAPI Lösung zugegeben. Abschließend wurden dreimal mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift verblieb das Deckglas vorübergehend im Waschpuffer, um den Objektträger zu reinigen, zu beschriften und mit einem Tropfen CITIFluor (Plano, Wetzlar) zu versehen. Danach wurde das Deckgläschen blasenfrei mit dem Zellrasen nach unten auf den Objektträger abgelegt und mit handelsüblichem Nagellack fixiert.

3.2.2.9. Proliferationstest

Mit dem Proliferationstest sollten Veränderungen in der Wachstumsgeschwindigkeit von Zellen, die DP4 und FAP exprimieren im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen festgestellt werden. Dazu wurden jeweils 200.000 Zellen in eine 25 cm² Kulturflasche ausgesät und für 5 Tage bei 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchte und 37 °C inkubiert. Nach 3 Tagen wurde das Kulturmedium gewechselt. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen abgelöst und die Zellzahl mit dem Zellzähler (CASY, Schärfe System GmbH, Reutlingen) bestimmt.

3.2.2.10. Zelladhäsionsassay mittels fluorometrischer Messung

Der Adhäsionsassay dient zur Untersuchung der Anheftung von Zellen an Proteine der extrazellulären Matrix. Veränderungen in den Zell-Matrix-Interaktionen spielen eine wichtige Rolle bei der Zellmigration und der Wiederanheftung abgelöster Tumorzellen während der Metastasierung. Dazu werden Zellen in mit Matrixproteinen beschichtete Kulturschalen ausgesät. Nach definierten Inkubationszeiten wird die Anzahl adhärierter Zellen bestimmt.

Damit die adhärerten Zellen mit dem Plattenreader gemessen werden konnten, wurde die Zellen vor Versuchsbeginn nach Vorschrift des Herstellers mit Calcein AM (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe) angefärbt. Dazu wurden 5 Mio. Zellen nach dem Ablösen mit Accutase zweimal mit 5 ml sterilem PBS gewaschen, in 1 ml serumfreiem Medium aufgenommen und nach Zugabe von 5 µl 1 mM Calcein AM Lösung für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Während der Inkubation diffundiert das ungeladene Molekül in das Zellinnere, wo durch zelleigene Esterasen der geladene Fluorophor freigesetzt wird, der die Zelle nur mit deutlich verringerter Geschwindigkeit verlassen kann. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 5 ml vorgewärmtem serumhaltigem Kulturmedium gewaschen und anschließend jeweils 200.000 Zellen für den Versuch in 500 µl Kulturmedium in die mit Fibronectin bzw. Kollagen I beschichteten 48-Loch-Kulturschalen (BD, Heidelberg) ausgesät. Nach zwei Stunden Inkubation bei 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchte und 37 °C wurde die Fluoreszenz aller Zellen im Plattenreader bei 515 nm nach einer Anregung bei 485 nm gemessen. Anschließend wurde der Kulturüberstand entfernt und durch 300 µl frisches Kulturmedium ersetzt. Durch kurzes dreimaliges Aufnehmen und Ausstoßen wurden nicht adhärerte Zellen abgewaschen. Nach dem Abgießen des Mediums wurden die Kavitäten mit 300 µl Kulturmedium gefüllt und die Fluoreszenz der anhaftenden Zellen im Plattenreader bei 535 nm nach einer Anregung bei 485 nm gemessen.

3.2.2.11. Zelladhäsionsassay mittels Zellzählung

Der Zeitraum über den die Adhäsion der Zellen verfolgt werden kann, wird bei Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Calcein AM durch dessen Verweildauer in den Zellen auf ca. 2 Stunden begrenzt. Um die Anheftung der Zellen über einen längeren Zeitraum verfolgen zu können, wurde die Zahl der Zellen im Überstand bzw. der adhärerten Zellen mittels Zellzählung ermittelt. Zur Bestimmung der Adhäsion von transfizierten und wildtyp Zellen an das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin wurden mit diesem Protein beschichtete 48-Loch-Zellkulturplatten verwendet. Dazu wurde gemäß der Herstellervorschrift 1 ml einer Fibronectinlösung mit einem Proteingehalt von 1 mg/ml mit sterilem deionisiertem Wasser auf 50 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend wurden 150 µl der Proteinlösung in jede Kavität der Kulturplatte pipettiert und die Platte über Nacht im Laminarstrom getrocknet. Die auf diese Weise erhaltene Beschichtung betrug 3 µg Protein pro Kavität bzw. 3 µg/cm². Die für den Versuch vorgesehenen Zellen wurden schonend mit Accutase abgelöst und mit sterilem PBS gewaschen. Für die Messung wurden 3x10⁴ bis 6x10⁴ Zellen pro Kavität der 48-

Loch-Platte ausgesät und anschließend bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 1, 2, 3, 6, 10, 24 und 48 Stunden Inkubation wurde der Kulturüberstand abgenommen, die angehafteten Zellen 3 mal mit 200 µl PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl Trypsin/EDTA Lösung abgelöst. Im Anschluss daran wurden die Zellzahlen im Kulturüberstand, dem Waschpuffer und der Trypsinlösung mittels Zellzählgerät (CASY, Schärfe System GmbH, Reutlingen) bestimmt.

3.2.2.12. Herstellung konditionierten Mediums

Jede Körperzelle und damit auch Tumorzelle schüttet zur Kommunikation mit benachbarten Zellen und dem gesamten Organismus Zytokine und Wachstumsfaktoren aus, deren Aktivität und Lebensdauer unter anderem von verschiedenen Endo- und Exopeptidasen reguliert wird. Um eine modulierende Wirkung von Inhibitoren auf Aktivität und Lebensdauer der von Tumorzellen ausgeschütteten Zytokine zu testen, wurden nach dem Ablösen mit Accutase und Waschen mit sterilem PBS jeweils 700.000 Zellen pro Kavität einer 6-Loch-Kulturplatte ausgesät und die Inhibitoren dem Kulturmedium zugesetzt. Nach 2 Tagen Inkubation bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂ wurde der Kulturüberstand abgenommen, für 5 min bei 1000 x g zentrifugiert und bis zur Verwendung im Motilitätsassay bei -20 °C eingefroren.

3.2.2.13. Migrationsassay

Der Motilitätstest dient zur Untersuchung des Wanderungsverhaltens von Zellen durch 8 µm große Poren von Transwellkammern (Greiner Bio-one, Frickenhausen) mit einer Transwell-Polyethylen-Membran (10 µm Membranstärke, 0,33 cm² Membranfläche) in einem *Boyden-Chamber* System. Dafür wurden die Transwellkammern in die dazu passenden Kavitäten einer 24-Loch-Kulturplatte eingehängt. Es wurden nach dem Ablösen mit Accutase und Waschen mit sterilem PBS 2×10^5 Zellen in 300 µl serumfreiem Medium in die obere Kammer eingesät, in die untere Kammer wurde 1100 µl serumhaltiges Kulturmedium bzw. konditionierter Kulturüberstand zugegeben. Die Platte wurde 16 h bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend die Zellzahl in je 100 µl Zellsuspension aus der oberen als auch der unteren Kammer mittels Zellzählgerät (CASY, Schärfe System GmbH, Reutlingen) bestimmt.

3.2.2.14. Invasionsassay

Eine weitere Eigenschaft, die einen aggressiven Tumor auszeichnet, ist die Invasion in umliegendes Gewebe, was unter anderem mit dem Abbau von extrazellulären Matrixproteinen verbunden ist. In diesem Ansatz soll die Fähigkeit der Zellen, Kollagen oder verschiedene weitere ECM-Proteine zu durchqueren, bestimmt werden. Der Invasionsstest erfolgte in analoger Art und Weise des Migrationsassay unter Verwendung von Kollagen oder ECMatrix™ beschichteten Invasionskammern (Chemicon, Hofheim). Die Invasionskammern wurden in die dazu passenden Kavitäten einer 24-Loch-Kulturplatte eingehängt. Gemäß den

Angaben des Herstellers erfolgte eine Rehydrierung der ECM-Proteine durch 30-minütige Inkubation bei RT mit serumfreiem Medium. Gleichzeitig wurden die für den Versuch vorgesehenen Zellen mit Accutase abgelöst und mit sterilem PBS gewaschen. Jeweils 2×10^5 Zellen wurden in 300 μl serumfreiem Medium in die oberen Kammern ausgesät. In die unteren Kammern wurde 500 μl serumhaltiges Kulturmedium pipettiert. Die Platten wurden 48 Stunden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden nach Entfernen des Kulturmediums aus den Invasionskammern, die durch Invasion in die unteren Kammern gelangten Zellen durch 30-minütige Inkubation bei 37 °C in 225 μl vorgewärmerter *Cell Detachment Solution* (Chemicon, Hofheim) abgelöst. Die Detektion der Zellen erfolgte durch Zugabe von 75 μl Lysepuffer (Chemicon, Hofheim) und 1 μl CyQuant GR Lösung (Chemicon, Hofheim) pro Kavität und Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Fluoreszenz des an die DNA gebundenen Farbstoffs bei 535 nm nach Anregung bei 485 nm gemessen.

3.2.2.15. Kollagenabbau durch Zellen

Um die Fähigkeit der Zellen zur Matrixdegradation unabhängig von der Motilität testen zu können, sollte der Abbau von Kollagen durch von Zellen ausgeschütteten Enzymen in einem gesonderten Versuchsansatz untersucht werden. Dazu wurden die Zellen nach dem Ablösen in ein Kollagengel eingegossen, welches 2 % (w/w) Fluoreszein-markiertes Kollagen enthielt. Das Gel einer Kavität einer 48-Loch-Kulturplatte setzt sich wie folgt zusammen:

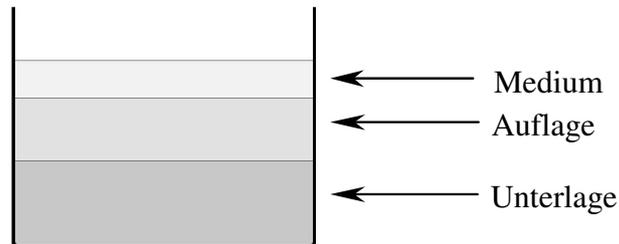
10 μl	1 N NaOH
10 μl	1 M HEPES
20 μl	10x PBS
160 μl	Kollagen G (4 mg/ml)
12,8 μl	Fluoreszein-markiertes Kollagen
50 μl	200.000 Zellen in serumfreiem, phenolrotfreiem RPMI

Als erstes wurden die Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge vereinigt. Danach erfolgte auf Eis die Zugabe der Zellsuspension bzw. der gleichen Menge serumfreiem, phenolrotfreiem RPMI ohne Zellen. Das Gemisch wurde anschließend ausplattiert und bis zum Aushärten des Gels bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Gel mit 500 μl serumhaltigem, phenolrotfreiem RPMI bedeckt und im Inkubator kultiviert. Zur Bestimmung des durch Kollagenase-Aktivität freigesetzten Fluoreszeins nach 48 Stunden Inkubation wurden 200 μl des Überstandes abgenommen, in eine Mikrotiterplatte überführt und die Fluoreszenz bei 535 nm im TECAN Plattenreader nach Anregung bei 485 nm gemessen.

3.2.2.16. Soft-Agar-Test

Eine der Eigenschaften, die entartete Zellen von normalen Körperzellen unterscheidet und

eine Voraussetzung für die Ausbildung von Metastasen darstellt, ist die Fähigkeit der Zellen sich, ohne Kontakt zu einer Unterlage oder benachbarten Zellen zu vermehren. Anhand dieses Assays soll das Kontakt-freie-Wachstum der transformierten Zelllinien verfolgt werden. Der Test in einer Kavität einer 6-Loch-Kulturplatte war wie folgt aufgebaut:



2 ml der Unterlage enthielten folgende Reagenzien:

333 μ l	steriler 3 %iger Agar (auf 70 °C vorgeheizt)
400 μ l	FCS
12 μ l	Gentamicin (10 mg/ml)
20 μ l	G418 (50 mg/ml)
1250 μ l	Kulturmedium

Als Erstes wurden die Reagenzien bis auf den Agar vereinigt, dann der erhitzte Agar zugegeben und sofort in die Kulturschalen überführt. Die Platte wurde zum Abkühlen und Aushärten 15 min bei RT inkubiert und anschließend mit 1,5 ml Auflage folgender Zusammensetzung überschichtet:

200 μ l	steriler 3 %iger Agar (auf 70 °C vorgeheizt)
300 μ l	FCS
9 μ l	Gentamicin (10 mg/ml)
15 μ l	G418
1000 μ l	Kulturmedium

Zusätzlich zu den aufgeführten Bestandteilen wurde der Auflage eine unterschiedliche Anzahl von Zellen der stabilen Klone zugesetzt (2×10^4 , 5×10^4). Nach 15 min Inkubation bei RT lag eine gallertartige Masse mit vereinzelt Zellen darin vor. Diese Masse wurde mit 1 ml Kulturmedium überschichtet und alles bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂ kultiviert. Jede Woche wurde das Medium gewechselt. Nach 2 – 4 Wochen wurden die Zellkolonien durch Zugabe von 200 μ l Iodonitrotetrazoliumchlorid (4 mg/ml, Fluka, Sigma, Taufkirchen) in das Kulturmedium und Kultivierung über Nacht angefärbt. Die Größe und Anzahl der angefärbten Kolonien wurde mit Hilfe des Gel-Dokumentationssystems und des Programms BioProfil ermittelt. Die Messungen erfolgten als dreifach Bestimmung in zwei voneinander

unabhängigen Experimenten.

3.2.2.17. Bestimmung der Apoptoseinduktion

Als Apoptose bezeichnet man den kontrollierten Zelltod, in den verschiedene Signalkaskaden involviert sind und an deren Ende die Aktivierung von Cysteinproteasen (Caspasen), speziell der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7, steht. Die Umsetzung der Caspase-Substrate im Kern und Zytoplasma führt zur DNA-Spaltung, Zytoskeletumbau und Zellmembraninversion mit anschließender Bildung apoptotischer Vesikel. Einfluss auf die Aktivierung der Caspase-Kaskade nehmen Kinasen wie zum Beispiel JNK, NF- κ B oder Proteine der BCL-2 Familie¹¹².

Zur Bestimmung der Aktivität der Effektor-Caspasen-3 und -7 in kultivierten Tumorzellen wurden jeweils 3 x 50.000 Zellen nach dem Ablösen in 200 μ l Kulturmedium in Mikrotiterplatten ausgesät und für 12 Stunden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂ kultiviert. Entsprechend den Anweisungen des Herstellers des Apo-ONE[®] Homogeneous Caspase-3/7 Assays (Promega) wurde der Kulturüberstand abgenommen und durch 100 μ l PBS sowie 100 μ l Lysepuffer inklusive Substrat ersetzt. Zur Unterstützung der Zelllyse wurden die Zellen einem zweimaligen Einfrieren bei -80 °C und Auftauen ausgesetzt und anschließend 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die Messung des freigesetzten Fluorophors erfolgte bei 535 nm im TECAN Plattenreader nach Anregung bei 485 nm. Die Messungen wurden als dreifache Bestimmung in drei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt.

3.2.2.18. Zellzyklus-Bestimmung

Die Mitose ist durch eine Abfolge von Interphase und Mitosis gekennzeichnet, wobei die Interphase weiterhin in G0/G1-, S-, und G2-Phase unterteilt wird. Während der G0/G1-Phase liegt in einer diploiden Zelle der doppelte Chromosomensatz vor, der in der S-Phase durch DNS-Synthese verdoppelt wird. Dieser Vorgang ist in der G2-Phase abgeschlossen. In der folgenden M-Phase trennen sich die Chromosomen und anschließend der Zellkörper. Durch DNA-Färbung und Bestimmung der Menge der angefärbten DNA kann jede Zelle hinsichtlich ihrer Position in der Interphase eingeordnet werden. Eine Kultur sich häufig teilender Zellen sollte sich durch einen hohen Anteil an Zellen in der S- und G2-Phase auszeichnen.

Zur Bestimmung des Einflusses der DP4- und FAP-Expression auf den Zellzyklus wurden jeweils 1 Mio. transfizierte HEK-293-Zellen in 3 ml Kulturmedium in die Kavitäten einer 6-Loch-Kulturschale ausgesät und über Nacht bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂ kultiviert. Nach dem Entfernen des Kulturüberstands wurden die Zellen abgelöst und entsprechend den Angaben des Herstellers des CycleTEST™ PLUS Kits (BD, Heidelberg) gewaschen, lysiert und die Zellkerne angefärbt. Die Bestimmung der DNA-Menge in den Zellkernen erfolgte durch Messung der Kerngröße im FACSCalibur. Die Daten wurden mittels der Software ModFit LT™ ausgewertet.

3.2.2.19. Kokultivierung von Zelllinien

Tumor- und die umgebenden Stromazellen stehen neben direktem Zell-Zell-Kontakt durch zahlreiche lösliche zelluläre Signalmoleküle wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine miteinander in Wechselwirkung. Um den Einfluss der DP4- und FAP-Expression auf der Oberfläche von Karzinomzellen auf die molekularen Tumor-Stroma-Interaktionen zu untersuchen, wurden Transwellkammern (Greiner Bio-one, Frickenhausen) mit einer Transwell-Polyethylen-Membran (10 µm Membranstärke, 0,33 cm² Membranfläche, 0,4 µm Porengröße) in einem *Boyden-Chamber* System zur Kokultivierung von Karzinom- und Fibroblastenzellen verwendet. Nach dem Ablösen der Fibroblastenzellen mittels Accutase und Waschen mit sterilem PBS erfolgte die Kultivierung von jeweils 200.000 Fibroblasten in den Kavitäten einer 24-Loch-Platte über Nacht bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Transwells eingesetzt. Jeweils 80.000 transfizierte HEK-293-Zellen, PA-TU-8988T bzw. PA-TU-8988S wurden nach dem Ablösen und Waschen mit sterilem PBS in 300 µl Kulturmedium in die oberen Kammern ausgesät. Anschließend wurden 1100 µl Kulturmedium in die unteren Kammern zugegeben und weitere zwei Tage bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂ kultiviert.

Nach dem Absaugen des Kulturmediums wurde die Gesamt-RNA nach Herstellervorschrift mit dem NucleoSpin® Kit (Macherey-Nagel, Düren) getrennt aus den oberen und unteren Kammern gewonnen. Die Kokultivierung erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

3.2.2.20. Stimulation von Fibroblasten

Um den Einfluss einer, durch die Kokultivierung veränderten, Zytokin- und Chemokinexpression auf die Translation weiterer Gene zu ermitteln, wurden die Fibroblastenzellen mit in vorausgehenden Versuchen identifizierten exogenen Zytokinen und Chemokinen stimuliert. Dafür erfolgte nach dem Ablösen der Fibroblastenzellen mittels Accutase und Waschen mit sterilem PBS die Kultivierung von jeweils 300.000 Fibroblasten in den Kavitäten einer 6-Loch-Platte für zwei Tage bei 37 °C, 95 % Luftfeuchte und 5 % CO₂. Direkt nach dem Aussäen wurden die entsprechenden Stimulanzien in das Kulturmedium gegeben. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und mittels Accutase für eine FACS-Analyse abgelöst oder die Gesamt-RNA nach Herstellervorschrift mit dem NucleoSpin® Kit (Macherey-Nagel, Düren) gewonnen.

3.2.2.21. Bildung von Tumoren in NOD/SCID Mäusen nach Injektion der HEK-293-Klone

Die in den vorausgegangenen Versuchen untersuchten Einzelaspekte einer Tumorentwicklung stehen im Organismus in einem komplexen Zusammenhang. Um die Bedeutung von DP4 und FAP im Zusammenspiel der Einzelprozesse zu untersuchen, wurden die mit DP4 und FAP transfizierten HEK-293-Zellen in einem Tiermodell verwendet.

Dazu wurden Mäusen jeweils 20 Mio. Zellen der HEK-293-Klone mit Leervektor, mutierter DP4, wildtyp DP4, wildtyp FAP und mutiertem FAP injiziert und über einen Zeitraum von 50 Tagen Bildung eines soliden Tumors verfolgt und dessen Größe bestimmt. Die von uns kultivierten HEK-293-Zellen wurden in den Kulturflaschen der Experimentelle Pharmakologie & Onkologie Berlin-Buch GmbH (EPO) übergeben. Vor Ort wurden die Zellen trypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Nach einem Vitalitätstest erfolgte die subkutane Injektion der Zellen in NOD/SCID Mäuse, sowie die Haltung der Mäuse, Bestimmung der Tumorgroße und Lebengewicht der Tiere. Spätestens am 50. Tag nach der Injektion wurden die Tiere getötet. Der Versuch wurde zweimal mit jeweils drei Tieren durchgeführt.

Nach Versuchsende mit Tötung der Tiere entnahmen Mitarbeiter der EPO Gewebeproben aus den gebildeten Tumoren, welche uns tiefgefroren für weitere Versuche zur Verfügung gestellt wurden. Die Gewinnung der Gesamt-RNA erfolgte nach Herstellervorschrift mit dem NucleoSpin® Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Zerkleinerung der tiefgefrorenen Gewebeproben mittels Pürierstabs.

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung stabil transfizierter Zelllinien

Gewebeproben wie auch davon abgeleitete Tumorzelllinien, die aus dem gleichen Organ verschiedener Patienten gewonnen wurden, unterscheiden sich auf Grund ihres unterschiedlichen genetischen Hintergrundes erheblich in ihrem Proteinexpressionsprofil. Für eine zielgerichtete Untersuchung des Einflusses ausgewählter Proteine auf die Zelleigenschaften ist es daher notwendig, unerwünschte Einflüsse durch Variationen basierend auf der unterschiedlichen Herkunft auszuschließen. Dazu werden Klone von Zelllinien erzeugt, bei denen das Expressionslevel oder die Funktionalität des zu untersuchenden Proteins verändert wurde. Hierfür stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, z.B. *knock out* Mutanten bei denen durch Einführung von Mutationen die Expression bzw. die Funktionstüchtigkeit des zu untersuchenden Proteins unterbunden wurde, durch siRNA-Einschleusung spezifisch herabgesetzte mRNA-Stabilität oder die Überexpression des zu untersuchenden Proteins in Zelllinien, in denen es natürlicherweise nicht oder nur in geringen Mengen vorkommt.

Wir haben uns für letztere Methode entschieden und Zellen der Zelllinien HEK-293 und PATU-8988T stabil mit Varianten der humanen Dipeptidylpeptidase 4 (DP4) und des humanen Fibroblastenaktivierungsproteins (FAP) transfiziert und die erhaltenen Klone charakterisiert. Die durch die variierte Expression hervorgerufenen Veränderungen der Zelleigenschaften wurden untersucht und deren Ursache auf Gen und Proteinebene analysiert.

4.1.1. Herstellung von Fusionsproteinen aus DP4 bzw. FAP und dem EGF-Protein

In der vorliegenden Arbeit wurde in humanen epithelialen Zelllinien der Einfluss der Expression von DP4 und FAP auf Wachstum, Adhäsion, Migration und differentielle Expression von Genen und Proteinen untersucht. Für eine leichtere Isolierung und Charakterisierung der stabil transfizierten Zelllinien erfolgte die Expression der Proteasen als EGFP-Fusionsprotein mit Hilfe der Plasmidvektoren pEGFP-N₁ und pEGFP-C₃. Bei EGFP handelt es sich um das durch gentechnische Verfahren für den Einsatz in Säugetierzellen optimierte grün fluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle pazifischen Ursprungs *Aequorea victoria*. Für die Fluoreszenzmarkierung von DP4 und FAP wurde ein Konstrukt verwendet, bei dem der *open reading frame* (ORF) des EGF-Proteins mit den ORFs der enzymatisch aktiven und inaktiven Varianten von DP4 und FAP fusioniert ist. Zur N-terminalen translationellen Fusion mit EGFP wurde der vollständige ORF von DP4 bzw. FAP in den Säuger Expressionsvektor pEGFP-N₁ kloniert. Anschließend wurden die Konstrukte in den *E.coli*-Stamm XL-10 Gold unter Selektion von Kanamycin transformiert. Die Identifikation positiver *E.coli*-Klone wurde mit Hilfe von PCR- und Restriktions-Analysen durchgeführt. Mittels DNA-Sequenzierung erfolgte die Bestätigung der korrekten

Nukleotidsequenz des Translationsstarts und der translationellen Fusion. Für die Transfektion humaner Zelllinien wurde eine ausreichende Menge an Plasmid DNA hergestellt (Plasmid-Midi-Präparationskit) und bei -20 °C gelagert. Die Herstellung der C-terminalen translationellen Fusion mit EGFP erfolgte in analoger Weise.

Die Herstellung der enzymatisch inaktiven Proteinvarianten erfolgte mit Hilfe der *overlap-PCR*-Technik durch die gerichtete Mutagenese von Serin zu Alanin an Position 630 in der DP4 bzw. an Position 624 in dem FAP. Dieses Serin ist Bestandteil der katalytischen Triade, deren Funktion durch den Aminosäureaustausch aufgehoben wird. Das PCR-Produkt wurde wie oben beschrieben in die Vektoren pEGFP-N₁ und pEGFP-C₃ integriert und vervielfältigt. Die Klonierung, Transformation und Mutagenese sowie weiterer damit verbundener Arbeitsschritte erfolgte durch Nadine Jänkel aus der Arbeitsgruppe „Molekularbiologie“ der probiodrug AG.

4.1.2. Herstellung stabil transfizierter Zelllinien

Für physiologische Studien in Abhängigkeit von der Aktivität und der Expression von DP4 und FAP wurden die aus einer Lebermetastase eines Pankreas-Karzinoms hervorgegangene Zelllinie PA-TU-8988T (Tab. 7) und die humane Adenovirus Typ 5-transformierte embryonale Nierenzelllinie HEK-293 (Tab. 8) mit den verschiedenen Vektor-Konstrukten transfiziert.

Zelllinie	Konstrukt	Klon (GVO) ^a	Verwendung
PA-TU-8988T	pEGFP-C ₃	PATU-T-C3	Kontrolle für pEGFP-C ₃ Fusionskonstrukte
PA-TU-8988T	pEGFP-C ₃ DP4	PATU-T-C3CD26	DP4 fusioniert an den C-Terminus von EGFP
PA-TU-8988T	pEGFP-C ₃ DP4 ^{Ser630Ala}	PATU-T-C3CD26mut	Enzymatisch inaktive DP4 fusioniert an den C-Terminus von EGFP
PA-TU-8988T	pEGFP-C ₃ FAP	PATU-T-C3FAP	FAP fusioniert an den C-Terminus von EGFP
PA-TU-8988T	pEGFP-C ₃ FAP ^{Ser624Ala}	PATU-T-C3FAPmut	Enzymatisch inaktives FAP fusioniert an den C-Terminus von EGFP

Tabelle 7: Etablierte stabil transfizierte PA-TU-8988T-Zelllinien

Es wurden verschiedene Expressionskonstrukte mit Hilfe von LipofectaminTM2000 in humane Zelllinien gemäß den Angaben des Herstellers transfiziert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit G418. Die G418-resistenten Zellklone wurden durch Absaugen der Kolonien mit sterilen Filter-Pipettenspitzen isoliert und anschließend getrennt kultiviert.

^aGVO: gentechnisch veränderter Organismus

Zelllinie	Konstrukt	Klon (GVO) ^a	Verwendung
HEK-293	pEGFP-N ₁	HEK-N1	Kontrolle für pEGFP-N ₁ Fusionskonstrukte
HEK-293	pEGFP-N ₁ DP4	HEK-N1CD26	DP4 fusioniert an den N-Terminus des EGFP
HEK-293	pEGFP-N ₁ DP4 ^{Ser630Ala}	HEK-N1CD26mut	Enzymatisch inaktive DP4 fusioniert an den N-Terminus des EGFP
HEK-293	pEGFP-N ₁ FAP	HEK-N1FAP	FAP fusioniert an den N-Terminus des EGFP
HEK-293	pEGFP-N ₁ FAP ^{Ser624Ala}	HEK-N1FAPmut	Enzymatisch inaktives FAP fusioniert an den N-Terminus des EGFP
HEK-293	pEGFP-C ₃	HEK-C3	Kontrolle für pEGFP-C ₃ Fusionskonstrukte
HEK-293	pEGFP-C ₃ DP4	HEK-C3CD26	DP4 fusioniert an den C-Terminus des EGFP
HEK-293	pEGFP-C ₃ DP4 ^{Ser630Ala}	HEK-C3CD26mut	Enzymatisch inaktive DP4 fusioniert an den C-Terminus des EGFP
HEK-293	pEGFP-C ₃ FAP	HEK-C3FAP	FAP fusioniert an den C-Terminus des EGFP
HEK-293	pEGFP-C ₃ FAP ^{Ser624Ala}	HEK-C3FAPmut	Enzymatisch inaktives FAP fusioniert an den C-Terminus des EGFP

Tabelle 8: Etablierte stabil transfizierte HEK-293-Zelllinien

Es wurden verschiedene Expressionskonstrukte mit Hilfe von Lipofectamin™2000 in humane Zelllinien gemäß den Angaben des Herstellers transfiziert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit G418. Die G418-resistenten Zellklone wurden durch Absaugen der Kolonien mit sterilen Filter-Pipettenspitzen isoliert und anschließend getrennt kultiviert.

^aGVO: gentechnisch veränderter Organismus

Um unbeabsichtigte Veränderungen der Zellen durch Transfektion, Klonierung und Selektion auszuschließen, wurde in den folgenden Experimenten der mit dem Vektor pEGFP-C3 transfizierte Klon als Kontrolle statt der nicht transfizierten Zellen verwendet. Zusätzlich wurde ein mit pEGFP-N1 transfizierter Klon mitgeführt. Während der Untersuchungen erfolgte in regelmäßigen Abständen eine Überprüfung der Klone hinsichtlich ihrer EGFP-, DP4- und FAP-Expression mittels Durchflusszytometrie. Bei signifikanten Abweichungen der DP4- oder FAP-Expression wurden ein entsprechender Kryostock aufgetaut und in Kultur genommen.

4.2. Charakterisierung der stabil transfizierten Zelllinien

Für die Expression der enzymatisch aktiven und inaktiven Varianten von DP4 und FAP wurde die humane Zelllinie HEK-293 mit den in Tabelle 8 angegebenen Konstrukten transfiziert. Auf Grund der gesammelten Erfahrungen mit den HEK-293 Linien erfolgte die Transfektion der humanen Zelllinie PA-TU-8988T nur mit den Konstrukten der N-terminalen Fusion mit EGFP. Die Charakterisierung der G418-resistenten stabilen Zelllinien erfolgte mittels Durchflusszytometrie, Quantitativer-PCR, Fluoreszenz-mikroskopischer Beobachtung,

Bestimmung der enzymatischen Aktivität und Messung des Zellwachstums.

4.2.1 Nachweis der DP4- und FAP-Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es mittels spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper Proteine auf der Zelloberfläche zu detektieren. Um die Expression des EGFP in den Vektor transfizierten Zellen und die Oberflächenexpression von DP4 und FAP in den mit den unterschiedlichen Konstrukten transfizierten Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Von den transfizierten HEK-293 wurden jeweils 48 resistente Klone für jedes Konstrukt isoliert. Auf Grund einer deutlich reduzierten Transfektionseffizienz konnte von PA-TU-8988T nur je 6 - 10 G418-resistente Klone pro Vektor-Konstrukt isoliert werden, die anschließend mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von EGFP, DP4 und FAP überprüft wurden. Dazu wurden die Zellen nach dem Ablösen und Waschen mit monoklonalen Maus-Antikörpern gerichtet gegen DP4 und FAP inkubiert. Der gegen DP4-gerichtete Antikörper ist mit Phytoerythrin (PE) markiert und kann direkt detektiert werden. Zur Messung des FAP ist es auf Grund der fehlenden Markierung des Antikörpers notwendig, diesen mit einem sekundären PE-markierten Anti-Maus Antikörper zu visualisieren. Deshalb wurden die Zellen zusätzlich zur Isotypkontrolle (IgG₁) mit dem sekundären Antikörper allein inkubiert, um eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers an die Zellen ausschließen zu können. Nach weiteren Waschschritten wurde die gebundene Fluoreszenz für jede einzelne Zelle im Durchflusszytometer registriert. Neben der Fluoreszenz der gebundenen Antikörper wurde gleichzeitig die EGFP-Fluoreszenz registriert.

Erwartungsgemäß konnte weder eine Bindung der gegen DP4- und FAP-gerichteten Antikörper an die nicht transfizierten Zellen noch an die EGFP-Kontroll-Transfektanten gemessen werden. In den Zellen der Klone HEK-N₁ und HEK-C₃ konnte die Fluoreszenz des EGFP in Messkanal FL1 registriert werden. Bei den DP4-exprimierenden Klonen konnte eine starke Oberflächenfärbung durch den PE-markierten Anti-human-CD26-Antikörper detektiert werden. Die Färbung mit den Kontrollantikörpern zeigte keine unspezifische Bindung der Antikörper. Bei den FAP-exprimierenden Klonen konnte nach der Färbung mit PE-markiertem Anti-human-CD26-Antikörper keine Fluoreszenz detektiert werden. Die Färbung mit der Isotypkontrolle und Inkubation mit dem sekundären Antikörper allein zeigten auch hier keine unspezifische Bindung der Antikörper. Nach der Inkubation mit dem monoklonalen Anti-human-FAP-Antikörper und PE-markierten Anti-Maus-Antikörper konnte FAP auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Abb. 7).

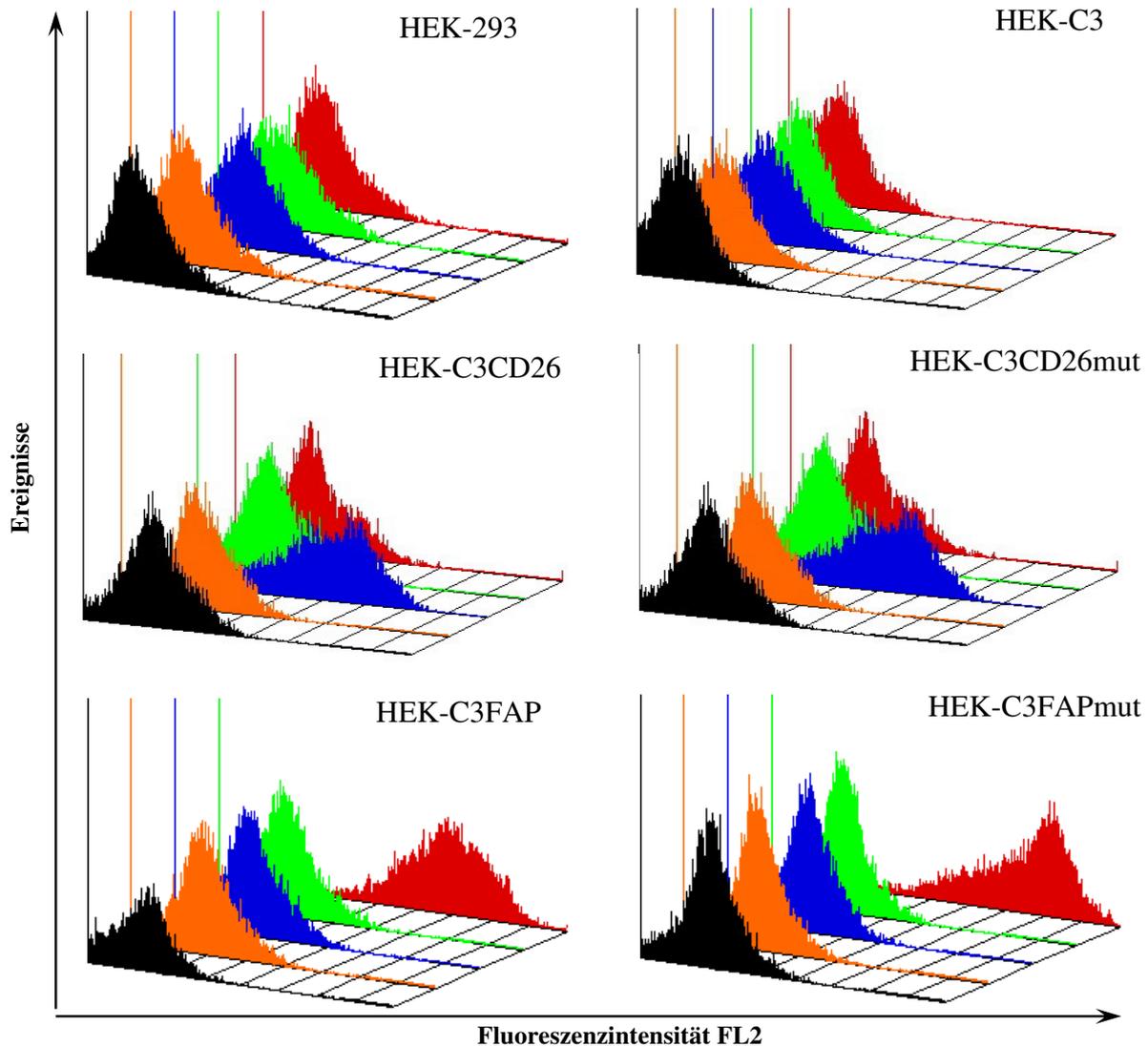


Abbildung 7: Rekombinante Zelloberflächenexpression von DP4 und FAP nach Überexpression in HEK-293-Klonen im Vergleich zu den Kontrollen

HEK-293-Zellen und von HEK-293 abgeleitete Zelllinien wurden mit der Isotypkontrolle (orange), Anti-CD26-Antikörper (blau), sekundärem Antikörper allein (grün) und Anti-FAP-Antikörper und sekundärem Antikörper gefärbt (rot) und im Durchflusszytometer (FACSCalibur) analysiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (schwarz).

Beim Vergleich der EGFP-Fluoreszenz in Messkanal FL1 mit der PE Fluoreszenz der gebundenen Antikörper in Messkanal FL2 konnte eine direkte Korrelation zwischen der Intensität der EGFP-Fluoreszenz und der Fluoreszenz der gebundenen spezifischen Antikörper für CD26 bzw. FAP beobachtet werden (Abb. 8).

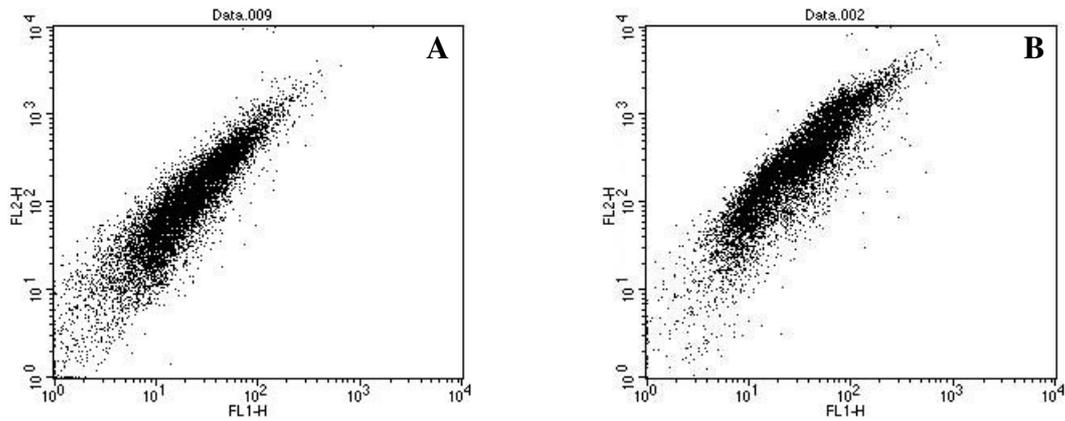


Abbildung 8: Korrelation der EGFP-Expression mit DP4- und FAP-Expression in transfizierten HEK-293-Zellen

Immunfluoreszenzfärbung von DP4- (A) und FAP- (B) exprimierenden HEK-293-Klonen mit Anti-CD26-Antikörper bzw. Anti-FAP-Antikörper und sekundärem Antikörper. Die Analyse der Fluoreszenzen erfolgte im Durchflussszytometer (FACSCalibur). Darstellung der PE- (FL2) und EGFP- (FL1) Fluoreszenz im Dotplot.

Die isolierten Klone zeigen Unterschiede in der Menge der an der Zelloberfläche detektierbaren Proteine. Sowohl die C-terminalen Konstrukte mit DP4 als auch mit FAP zeigen dabei eine höhere Oberflächenexpression dieser Proteine als die N-terminalen Fusionsproteine. (Abb. 9)

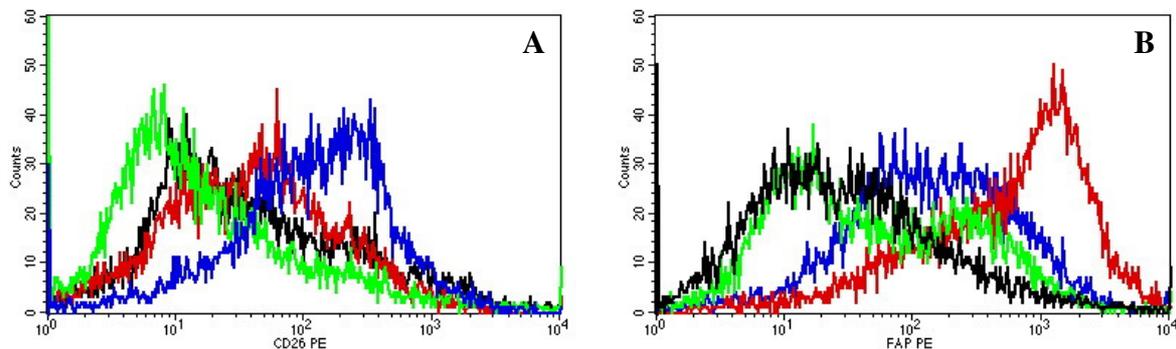


Abbildung 9: Höhere Überexpression N-terminaler Fusionsproteine im Vergleich zu den C-terminalen Fusionsproteinen

(A) Färbung der die verschiedenen DP4-Fusionsproteine exprimierenden Zellen mit PE-Anti-CD26-Antikörper. HEK-N1CD26mut (schwarz), HEK-C3CD26mut (rot), HEK-N1CD26 (grün), HEK-C3CD26 (blau) (B) Färbung der die verschiedenen FAP-Fusionsproteine exprimierenden Zellen mit Anti-FAP-Antikörper und PE-Anti-Maus-Antikörper. HEK-N1FAPmut (schwarz), HEK-C3FAPmut (rot), HEK-N1FAP (grün), HEK-C3FAP (blau)

Bei Färbung der wildtyp PA-TU-8988T-Zellen und der zur Kontrolle mit dem Leer-Vektor transfizierten PA-TU-8988T-Zellen mit den IgG2-Antikörpern und PE-markierten Anti-human-CD26-Antikörpern konnte keine Bindung der gegen DP4 gerichteten Antikörper und der Isotypkontrolle (Abb. 10) beobachtet werden. Sowohl mit den Antikörpern der Isotypkontrolle noch mit den spezifischen Antikörpern für DP4 kann eine gegenüber der nicht behandelten Kontrolle erhöhte Fluoreszenz im Messkanal FL2 gemessen werden. In den Zellen der Klone PATU-T-N₁ und PATU-T-C₃ konnte die Fluoreszenz des EGFP in Messkanal FL1 registriert werden. Ebenso waren keine Bindung des sekundären PE-

markierten Anti-Maus-Antikörpers allein und keine Färbung durch den Anti-human-FAP-Antikörper und PE-markierten Anti-Maus-Antikörper bei wildtyp PA-TU-8988T-Zellen bestimmbar. Die detektierbare Menge von DP4 auf der Zelloberfläche ist in den stabilen Klonen von PA-TU-8988T geringer im Vergleich zu den transfizierten HEK-293-Zellen. Obwohl die Transfektion wiederholt wurde und weitere 6 G418-resistente Klone isoliert wurden, blieb die Oberflächenexpression niedriger als in den Klonen der HEK-293-Zellen.

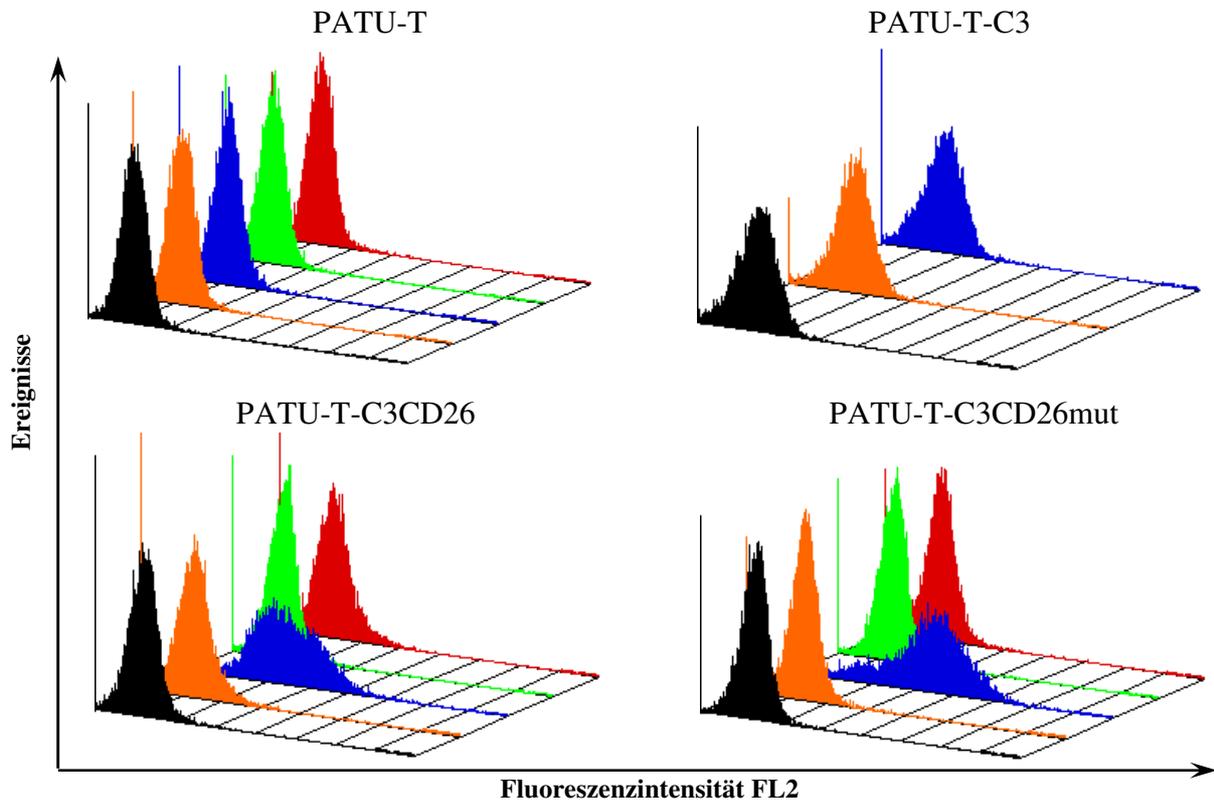


Abbildung 10: Rekombinante Zelloberflächenexpression von DP4 nach Überexpression in PA-TU-8988T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen

PA-TU-8988T-Zellen und Zellen der PA-TU-8988T-Klone wurden mit der Isotypkontrolle (orange), Anti-CD26-Antikörper (blau), sekundärem Antikörper allein (grün) und Anti-FAP-Antikörper und sekundärem Antikörper (rot) gefärbt und im Durchflusszytometer (FACSCalibur) analysiert. Die Immunfluoreszenzfärbung von mit Leer-Vektor transfizierte Zellen erfolgte mit der Isotypkontrolle und Anti-CD26 Antikörpern. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (schwarz).

Trotz mehrfacher Wiederholung der Transfektion war es nicht möglich, von der Zelllinie PA-TU-8988T stabile Klone zu gewinnen, welche die aktiven oder inaktiven Varianten der FAP Fusionsproteine exprimieren.

4.2.2. Nachweis der DP4- und FAP-Expression mittels Quantitativer-PCR

Mit Hilfe der Quantitativen-PCR kann die Menge an mRNA eines bestimmten Transkripts im Vergleich zu einer Kontrolle oder unter Zuhilfenahme eines Standards als absolute Kopienzahl ermittelt werden. Diese Messungen dienen zur Kontrolle der G418-resistenten Klone und zur Quantifizierung des Genproduktes des eingeschleusten Vektor-Konstrukts. Für die Untersuchung wurde aus den Zellen der verschiedenen stabil transfizierten Zelllinien die

Gesamt-RNA gewonnen und in einer *reverse transcriptase*-PCR in cDNA umgeschrieben. In dem nachfolgenden Schritt wurde in der Quantitativen-PCR mittels spezifischer Primer Kopien der DP4- und FAP-cDNA erzeugt. Die Entstehung der Kopien konnte durch Messung der Fluoreszenz des in die DNA interkalierenden Farbstoffes Sybergreen in Echtzeit verfolgt werden. Analog dazu wurde die mRNA-Menge von drei verschiedenen Haushaltsgenen (Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, RNA-Polymerase II, Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase) bestimmt. Durch Vergleich der ermittelten mRNA-Menge der Haushaltsgene mit der mRNA-Menge der DP4 wird deren relativer Gehalt ermittelt. Die Erstellung einer Standardkurve zur Bestimmung der Anzahl der mRNA-Kopien des FAP erfolgte mit dem Plasmid pPCR-Script Cam SK(+) bekannter Konzentration, welches den ORF von FAP enthält.

Die Klone HEK-C3CD26 und HEK-C3CD26mut zeigten eine 20-fach erhöhte Menge an DP4-mRNA (Abb. 11A) im Vergleich zu den nicht transfizierten HEK-293-Zellen und den mit Vektor oder FAP-Vektor-Konstrukt transfizierten Zelllinien. Die mRNA für FAP konnte ausschließlich nur in den mit den Klonen HEK-C3FAP und HEK-C3FAPmut nachgewiesen werden (Abb. 11B). Während DP4-mRNA auch in den Kontrolltransfektanten und den nicht transfizierten Zellen nachgewiesen werden konnte und somit die DP4-Überexpression als Vielfaches dieser Basalexpression angegeben werden konnte, wurde keine FAP-mRNA in diesen Zellen gefunden. Aus diesem Grund musste unter Zuhilfenahme eines Plasmids welches den ORF des FAP enthielt, eine Eichkurve erstellt werden um die Anzahl der FAP-mRNA-Kopien in den transfizierten Zellen bestimmen zu können.

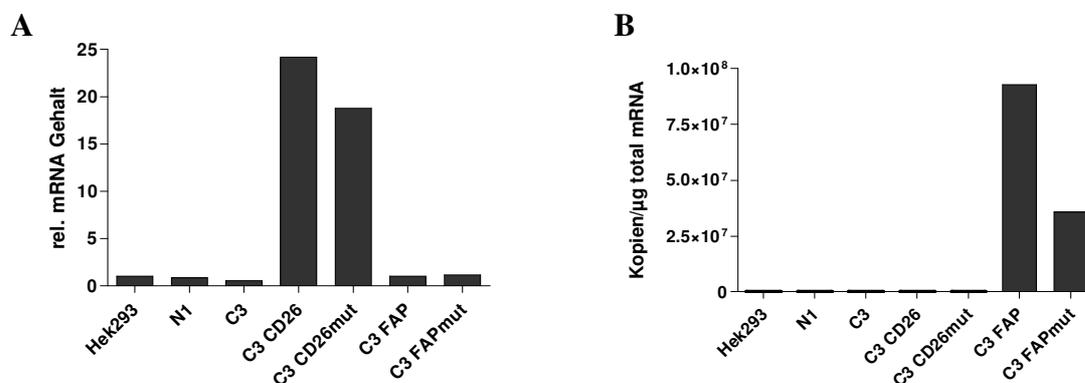


Abbildung 11: Nachweis der Überexpression von DP4 und FAP in den stabil transfizierten Klonen

Aus HEK-293-Zellen und von HEK-293 abgeleitete Zelllinien mit Vektor, wildtyp DP4, enzymatisch inaktiver DP4, wildtyp FAP oder enzymatisch inaktivem FAP wurde die Gesamt-RNA gewonnen. Nach der reversen Transkription in cDNA wurde diese mit spezifischen Primern für DP4 und FAP in einer quantitativen PCR eingesetzt. (A) Darstellung DP4-mRNA-Menge der HEK-293-Klone im Verhältnis zum C3-Vektor transfizierten Kontrollklon. (B) Dargestellt ist die Anzahl der Kopien von FAP-mRNA/µg total RNA der HEK-293-Klone

4.2.3. Nachweis der DP4- und FAP-Oberflächenexpression mittels

Fluoreszenzmikroskopie

Bei der für die Durchflusszytometrie verwendeten Methode können die spezifischen Antikörper auf Grund fehlender Membranperforation nur Proteine auf der Zelloberfläche detektieren. Damit konnte nachgewiesen werden, dass sich ein erheblicher Anteil der exprimierten Proteine auf der Zelloberfläche befinden. Um die Verteilung der verschiedenen eingeführten Proteasen innerhalb der transfizierten Zellen ermitteln zu können, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt mit deren Hilfe die Fluoreszenz des EGFP verfolgt werden konnte. Dazu wurden die Zellen der HEK-293-Klone über Nacht auf Deckgläschen kultiviert. Nach der Fixierung wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops Aufnahmen zur Bewertung der Verteilung der EGFP-Fluoreszenz angefertigt.

Während die Fluoreszenz des freien EGFP in den mit N1- und C3-Vektor transfizierten Zellen homogen verteilt ist (Abb. 12A, D), liegt sie im Falle der Fusionsproteine, bei denen EGFP mit DP4 und FAP fusioniert ist, in der Zellmembran und in der Nähe der Zellkerns angereichert vor (Abb. 12B, C, E, F). Es konnten morphologischen Veränderungen der mit wildtyp DP4, enzymatisch inaktiver DP4, wildtyp FAP oder enzymatisch inaktivem FAP transfizierten Zellen im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen bzw. mit dem Leervektor transfizierten Zellen beobachtet werden. Die DP4 und FAP überexprimierenden Zellen bildeten bei einer eher Pflasterstein-artigen Morphologie intensivere Zell-Zell-Kontakte.

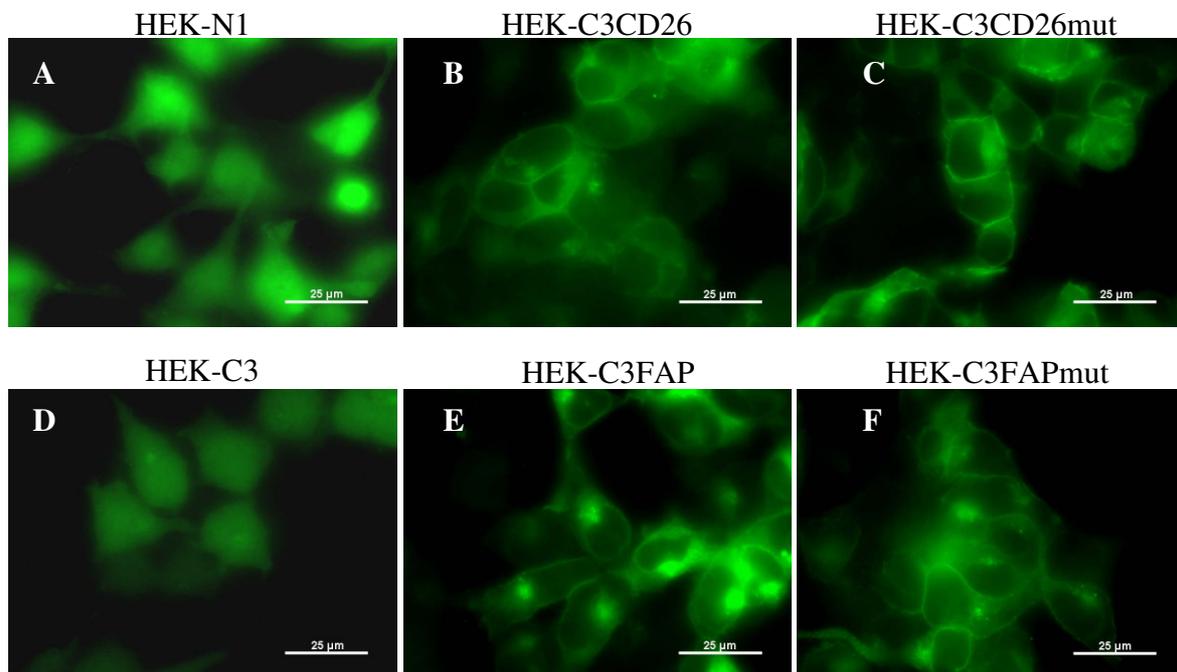


Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen Anreicherung der EGFP-Fusionsproteine in der Zellmembran

1 Mio. Zellen der von HEK-293 abgeleitete Zelllinien mit den Vektor N1 (A) C3 (D), wildtyp DP4 (B), enzymatisch inaktiver DP4 (C), wildtyp FAP (E) oder enzymatisch inaktivem FAP (F) wurden über Nacht in 35 mm Kulturschalen auf Deckgläschen kultiviert. Nach dem Waschen und der Fixierung mit 4 % (w/v) PFA in PBS wurden die EGFP-Fluoreszenz der Zellen bei 1000-facher Vergrößerung mit Hilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskops und einer Mikroskopkamera dokumentiert.

4.2.4. Nachweis der enzymatischen Aktivität nach Überexpression von DP4 und FAP auf der Zelloberfläche der stabilen Transfektanten

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie und den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass die Fusionsproteine auf der Zellmembran lokalisiert sind. Abschließend sollte geklärt werden, ob die Enzyme korrekt gefaltet vorliegen und die für die enzymatische Aktivität notwendigen Dimere gebildet werden^{113,114}. Dazu wurde die Spaltung von Gly-Pro-AMC und Z-Gly-Pro-AMC¹⁰⁵ durch die Peptidasen auf der Oberfläche der intakten Zellen verfolgt. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte Zellen, die Vektor-transfizierten Klone sowie verschiedene Inhibitoren. Wie in Abbildung 13A zu erkennen, zeigten ausschließlich die aktive DP4-exprimierende Klone eine Gly-Pro-AMC spaltende Aktivität, welche sich durch Zugabe des DP4-spezifischen Inhibitors UG92 auf das Niveau der Kontrollen zurückführen lässt. Im Falle des FAP-Substrates Z-Gly-Pro-AMC wurde bei allen eingesetzten Klonen eine Fluorophorfreesetzung beobachtet. Da das Z-Gly-Pro-AMC Substrat auch von Prolylendopeptidase (EC 3.4.21.26, PEP) gespalten werden kann¹¹⁵, vermuteten wir, dass die PEP durch ihre Aktivität den Enzym-Test stört. Die PEP ist zwar als intrazelluläres Protein beschrieben, aber das Enzym könnte durch lysierte Zellen freigesetzt worden sein bzw. kann das Substrat in die Zellen diffundieren. Um den störenden Einfluss der PEP auf die Aktivitätsmessungen auszuschließen, wurde den Ansätzen zur Bestimmung der FAP-Aktivität der PEP-spezifische Inhibitor ZW164 zugesetzt. Nach Inhibierung der PEP konnte bei den aktiven FAP-exprimierenden Zellen im Gegensatz zu den Kontrollen eine AMC-Freesetzung gemessen werden. Bei den inaktiven FAP-exprimierenden Zellen wurde kein Substratumsatz beobachtet (Abb. 13B). Die Messungen erfolgten in drei voneinander unabhängigen Experimenten.

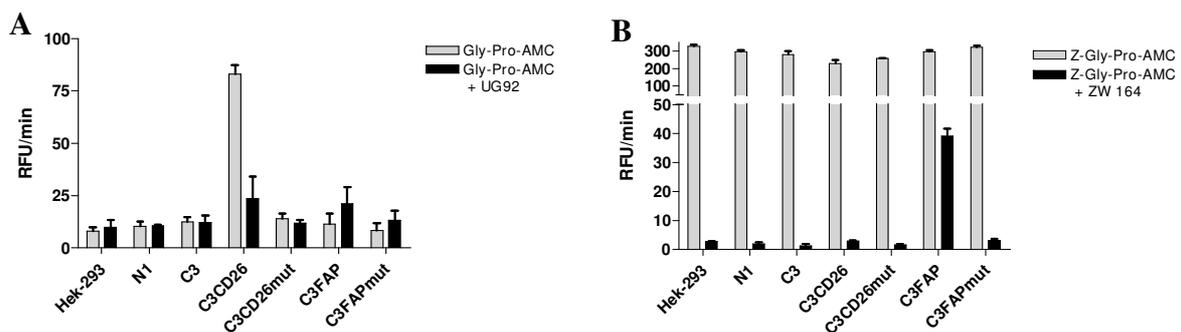


Abbildung 13: Nachweis der enzymatischen Aktivität von DP4 und FAP auf den stabil transfizierten Zelllinien

Von HEK-293 abgeleiteten Zelllinien mit Vektor, wildtyp DP4, enzymatisch inaktiver DP4, wildtyp FAP oder enzymatisch inaktivem FAP wurden in eine Mikrotiterplatte ausgesät. Als Kontrolle kamen nicht transfizierte oder Vektor transfizierte Zellen zur Anwendung. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte durch Messung der freigesetzten AMC-Emission bei 465 nm nach Anregung mit Licht von 380 nm Wellenlänge. (A) Bestimmung der DP4-Aktivität mittels Gly-Pro-AMC Substrates (grau). Mit Zugabe von 1 μ M UG92 kann die DP4-Aktivität vollständig inhibiert werden (schwarz). (B) Bestimmung der FAP-Aktivität mittels Z-Gly-Pro-AMC (grau). Mit Zugabe von 1 μ M ZW164 wird die verfälschende PEP-Aktivität gehemmt (schwarz). Die Darstellung erfolgt als Mittelwert \pm SD mit GraphPad Prism 4.0.

Um die enzymatische Aktivität der DP4 und des FAP der N- und C-terminalen Konstrukte miteinander vergleichen zu können, wurde die eingesetzte Zellzahl entsprechend der mittels Durchflusszytometrie ermittelten Oberflächenexpression angepasst. Der Mittelwert der Fluoreszenz des gebundenen DP4-spezifischen Antikörpers bzw. des gebundenen FAP-spezifischen Antikörpers ist bei den C-terminalen Varianten deutlich höher als bei den N-terminalen Varianten. Basierend auf der mittleren Fluoreszenz der HEK-C3CD26- und HEK-C3FAP-Klone, wurde die Zellzahl der HEK-N1CD26- und HEK-N1FAP-Klone variiert, um eine möglichst vergleichbare Menge an DP4 und FAP im Messansatz zu gewährleisten.

Die Lokalisierung des EGFP im Fusionsprotein zeigte keinen Einfluss auf die Affinität der gegen DP4 und FAP gerichteten spezifischen Antikörper. Die mittlere Fluoreszenz des EGFP zeigte vergleichbare Verhältnisse zwischen den N- und C-terminalen Fusionsproteinen wie die mittlere Fluoreszenz der gebundenen spezifischen Antikörper. Damit können die beobachteten Unterschiede der mittleren Fluoreszenz der gebundenen spezifischen Antikörper auf eine veränderte DP4- und FAP-Oberflächenexpression zurückgeführt werden.

Die enzymatische Aktivität der Varianten in denen das Enzym an den N-Terminus des EGFP fusioniert ist, ist gegenüber der Variante in der die DP4 bzw. das FAP an den C-Terminus des EGFP fusioniert wurde reduziert. (Abb.14)

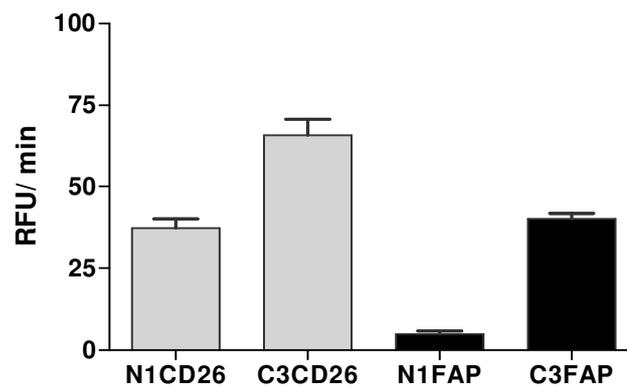


Abbildung 14: Enzymatische Aktivität des N-terminalen Fusionsproteins ist gegenüber den C-terminalen Fusionsproteinen reduziert

Um die enzymatische Aktivität der N- und C-terminalen Fusionsproteine von DP4 und FAP zu vergleichen, wurden Zellen der mit wildtyp DP4 und wildtyp FAP transfizierte HEK-293-Klone in Mikrotiterplatten ausgesät. Die eingesetzte Zellzahl erfolgte in Abhängigkeit der Oberflächenexpression von DP4 und FAP. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte durch Messung der freigesetzten AMC-Emission bei 465 nm nach Anregung mit Licht von 380 nm Wellenlänge. Die DP4-Aktivität wurde mittels Gly-Pro-AMC-Substrates (grau) bestimmt. Die Bestimmung der FAP-Aktivität erfolgte mittels Z-Gly-Pro-AMC-Substrates (schwarz) in Gegenwart eines PEP-spezifischen Inhibitors. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD, n=3, mit GraphPad Prism 4.0.

Da sowohl enzymatische Aktivität als auch Expressionsniveau der C-terminalen Fusionsproteine reduziert ist und um eine Störung möglicher Interaktionen der DP4 und des FAP mit anderen Proteinen durch das sich am C-Terminus der Enzyme befindliche EGFP auszuschließen, haben wir uns entschieden, für die weiteren Untersuchungen die Konstrukte

zu verwenden in denen das EGFP an den N-Terminus von DP4 und FAP fusioniert und damit intrazellulär lokalisiert ist.

4.2.5. Einfluss der Expression von DP4- und FAP-Varianten auf die Proliferation

Vorhergehende Studien zeigten, dass Proteasen auf der Zelloberfläche, DP4 eingeschlossen, die Peptid-vermittelte zelluläre Proliferation und Differenzierung steuern^{116,117}. So konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von *growth hormone releasing hormone* und *gastrin releasing peptide* in einigen Tumoren erhöht ist und damit durch autokrine Stimulation Einfluss auf das Wachstum der Tumorzellen nehmen¹¹⁸. Die biologische Funktionalität dieser Peptide wird durch die proteolytische Aktivität der DP4 beeinflusst⁸¹. Eine vergleichbare Funktion der DP4 konnte ebenfalls im Zusammenhang mit den Tumor-fördernden Eigenschaften von GLP-2 gezeigt werden¹¹⁹.

Um den Einfluss der DP4- und FAP-Expression auf die Proliferation zu untersuchen, wurde eine definierte Zellzahl der verschiedenen transfizierten Zelllinien in Kulturflaschen ausgesät, nach der Inkubation wurden die Zellen abgelöst und deren Anzahl bestimmt. Wie in Abbildung 15 gezeigt, konnten keine Unterschiede in der Proliferation zwischen den nicht transfizierten Zellen und den verschiedenen transfizierten Zelllinien über einen Zeitraum von 5 Tagen beobachtet werden. Die Messungen erfolgten jeweils als 3-fach Bestimmung in zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

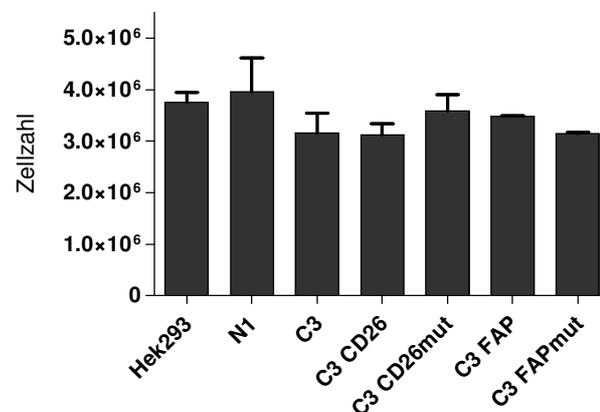


Abbildung 15: Rekombinante Expression von DP4 und FAP zeigte keinen Einfluss auf die Proliferation der transfizierten Zelllinien

Zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit wurden je 200.000 Zellen der Zelllinie HEK-293 und der mit den Leervektoren N1 und C3, wildtyp DP4, mutierter DP4, wildtyp FAP oder mutiertem FAP transfizierten HEK-293-Klone in 25 cm² Kulturflaschen ausgesät. Nach 5 Tagen Inkubation wurde die Zellzahl nach dem Ablösen der Zellen bestimmt. Nicht transfizierte und Vektor transfizierte Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert ± SD mit GraphPad Prism 4.0.

Im Zuge der Zellcharakterisierung konnte mittels Durchflusszytometrie, fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen und Aktivitätsmessungen gezeigt werden, dass die EGFP und DP4- bzw. FAP-Fusionsproteine auf der Zelloberfläche präsent sind und im Fall

der aktiven Varianten enzymatische Aktivität zeigen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Position des EGFP im Fusionsprotein die enzymatische Aktivität und Expressionsrate der Konstrukte beeinflusst. Dagegen konnte keine Veränderung der Proliferationsrate der HEK-293-Zellen nach der Transfektion beobachtet werden.

4.3. Untersuchungen zur Adhäsion von Tumorzellen

4.3.1. Einfluss der Überexpression von DP4 und FAP auf die Adhäsion transfizierter Zelllinien an Fibronektin und Kollagen

In der Literatur wurde die DP4 als Protein beschrieben, welches an Komponenten der ECM wie Kollagen I und Fibronektin bindet^{65,120}. Über diese Interaktion soll die Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix vermittelt werden. Um den Einfluss von DP4 und FAP auf die Zelladhäsion an Proteine der ECM zu bestimmen, wurden die unterschiedlichen Zellklone von HEK-293 und PA-TU-8988T sowie verschiedene wildtyp Tumorzelllinien in einem Adhäsionsassay eingesetzt. Dafür wurden die wildtyp Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt und anschließend in Kollagen I- oder Fibronektin-beschichtete Kulturschalen ausgesät. Nach der Inkubation erfolgte die Messung der Fluoreszenz aller Zellen in den Kulturschalen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und erneut die Fluoreszenz der adhären Zellen in den Kulturschalen ermittelt. Als Kontrolle dienten mit HSA-modifizierte Kulturgefäße. Die Fluoreszenz nach dem Waschen und damit der adhären Zellen wurde zur Gesamtfluoreszenz ins Verhältnis gesetzt.

Die Zellen der DP4- und FAP-exprimierenden HEK-293-Klone zeigen keine Veränderung der Adhäsionsrate gegenüber dem Kontrollklon bei der Verwendung einer Kollagen I-beschichteten Oberfläche als Kulturunterlage (Abb. 16A). Auf den Fibronektin-beschichteten Oberflächen war bei den eingesetzten Zellen ein völlig anderes Adhäsionsverhalten zu beobachten. Wie Abbildung 16B zu entnehmen, zeigten sowohl die aktive DP4- als auch die inaktive DP4-exprimierenden Klone eine signifikant reduzierte Adhäsion an die Fibronektin-beschichtete Oberfläche. Gleiches gilt für die aktives FAP-exprimierenden Klone. Die Adhäsionsrate der Zellen der mutiertes FAP-exprimierenden Klone war ebenfalls reduziert. Auf Grund der höheren Schwankungsbreite der Messwerte war dieser Unterschied jedoch statistisch nicht signifikant.

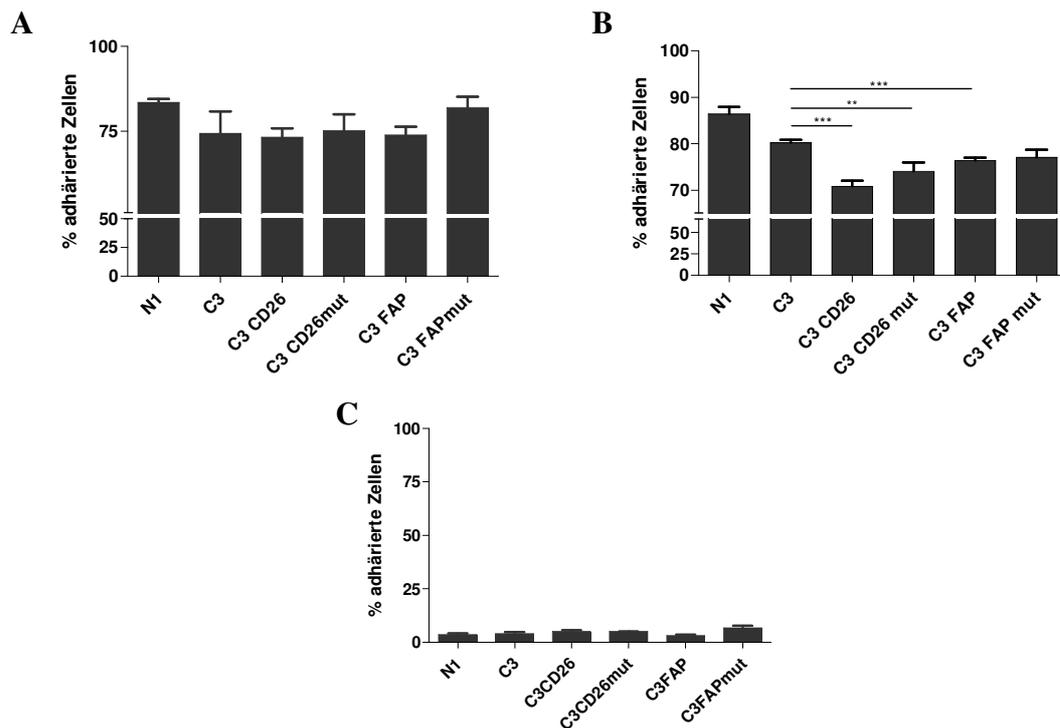


Abbildung 16: DP4- und FAP-Überexpression in HEK-293-Zellklone reduziert die Adhäsion an Fibronectin, aber nicht an Kollagen I

300.000 Zellen der mit den Leervektoren N1 und C3, wildtyp DP4, mutierter DP4, wildtyp FAP oder mutiertem FAP transfizierten HEK-293-Klone wurden in Kollagen I (A) bzw. Fibronectin (B) beschichtete 48-Loch-Kulturschalen ausgesät. Nach 2 Stunden wurde die Fluoreszenz aller Zellen gemessen, anschließend die nicht adhärerten Zellen abgewaschen und die Fluoreszenz der adhärerten Zellen bestimmt. Als Kontrolle dienten mit HSA-beschichtete Kulturgefäße (C). Dargestellt ist Fluoreszenz der adhärerten Zellen nach dem Waschen im Verhältnis zur Gesamtfluoreszenz vor dem Waschen als Mittelwert \pm SD mit GraphPad Prism 4.0, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ $n=6$ ungepaarter Students T-Test

Ein vergleichbarer Effekt der rekombinanten Expression auf die Zell-Matrix-Adhäsion wie bei transfizierten HEK-293-Zellen ist bei der Untersuchung der Adhäsion von transformierten PA-TU-8988T-Zellen zu beobachten. Die Adhäsion der Zellen an Kollagen I wird durch die Expression von DP4 auf der Zelloberfläche nicht beeinflusst (Abb. 17A), wohingegen bei Kultivierung in Fibronectin-beschichteten Kulturgefäßen die Anzahl der angehefteten Zellen nach dem Waschen bei den DP4-exprimierenden Klone um ca. 10 % reduziert ist (Abb. 17B).

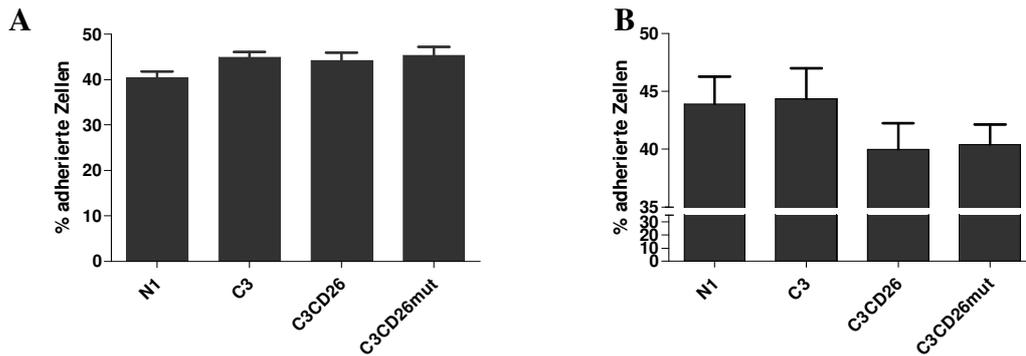


Abbildung 17: DP4-Überexpression in PA-TU-8988T-Klonen reduziert die Adhäsion an Fibronektin aber nicht an Kollagen I

150.000 Zellen der mit den Leervektoren N1 und C3, wildtyp DP4, mutierter DP4 transfizierten PA-TU-8988T-Klone wurden in Kollagen I (A) bzw. Fibronektin (B) beschichtete 48-Loch-Kulturschalen ausgesät. Nach 2 Stunden wurden die Fluoreszenz aller Zellen gemessen, anschließend die nicht adhären Zellen abgewaschen und die Fluoreszenz der adhären Zellen bestimmt. Dargestellt ist Fluoreszenz der adhären Zellen nach dem Waschen im Verhältnis zur Gesamtfluoreszenz vor dem Waschen als Mittelwert \pm SD, n=6, mit GraphPad Prism 4.0.

4.3.2. Einfluss der Expression von DP4 auf die Adhäsion von wildtyp Zelllinien an Fibronektin und Kollagen

Die Expression von aktiver und inaktiver DP4 führte, wie in den vorangegangenen Versuchen gezeigt, zu einer Reduktion der Adhäsion an Fibronektin aber zu keiner Veränderung der Adhäsion an Kollagen I. Mit wildtyp Tumorzelllinien, die natürlicherweise DP4 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, sollten die Beobachtungen, die mit den HEK-293-Klonen gemacht wurde, bestätigt werden. Dazu wurde mittels Durchflusszytometrie die DP4-Oberflächenexpression unterschiedlicher Tumorzelllinien bestimmt. Es konnten mit MADB106, US8-93, MIAPaCa-2 und PA-TU-8988T Zelllinien identifiziert werden, bei denen keine DP4 nachweisbar war (Abb. 18A-D), als auch Zellen der Zelllinien PA-TU-8988S und Hep-G2 die DP4 in großen Mengen auf ihrer Zelloberfläche besitzen. (Abb. 18E, F).

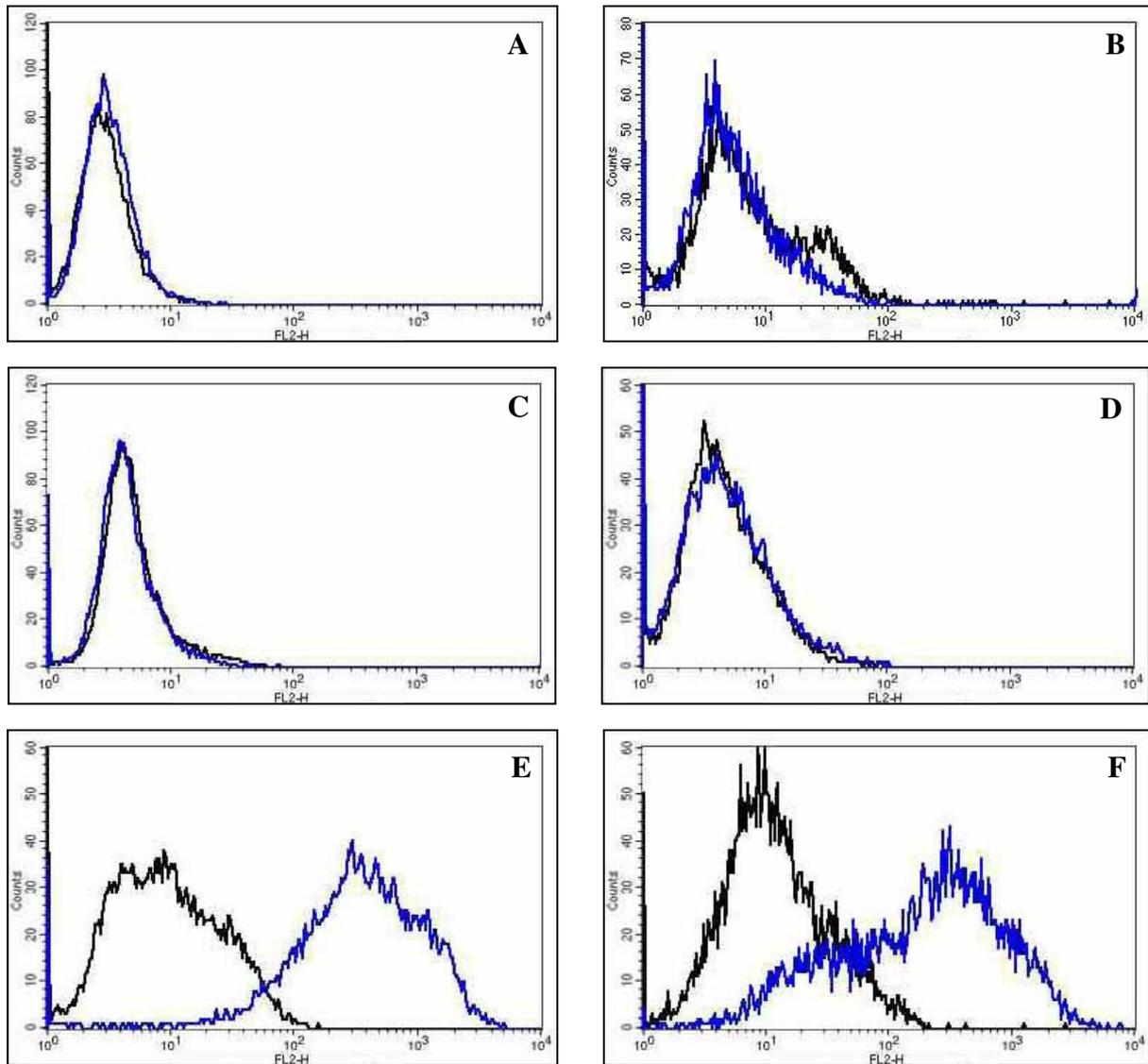


Abbildung 18: FACS-Analyse der DP4-Oberflächenexpression von Tumorzelllinien

Die Immunfluoreszenzfärbung von MADB106 Zellen (A) erfolgte mit der PE-markierten Isotypkontrolle und mit gegen Ratten-CD26 gerichteten PE-markierten Antikörpern. Die Zellen der Zelllinien US8-93 (B), MIA-PaCa (C), PA-TU-8988T (PATU-T, D), PA-TU-8988S (PATU-S, E) und Hep-G2 (F) wurden mit der PE-markierten Isotypkontrolle bzw. mit gegen humanes CD26 gerichteten PE-markierten Antikörpern angefärbt. Die Analyse der Fluoreszenzmarkierung der Zellen erfolgte im Durchflusszytometer (FACSCalibur). Dargestellt ist auf der Y-Achse die Zellzahl, auf der X-Achse die log Fluoreszenzintensität. Schwarze Linie Isotypkontrolle, blaue Linie DP4-Expression

Der Einfluss der DP4 auf die Adhäsion von Zellen an Fibronectin-beschichtete Oberflächen konnte ebenfalls bei den wildtyp Tumorzelllinien beobachtet werden. Wie in Abbildung 19B dargestellt, zeigten die Zellen auf deren Oberfläche mittels Durchflusszytometrie DP4 nachgewiesen werden konnte, eine verringerte Adhäsion an die Fibronectin-modifizierte Oberfläche im Vergleich zu den Zellen, bei denen keine DP4 auf der Zelloberfläche gemessen werden konnte. Bei der Verwendung der verschiedenen Zelllinien im Adhäsionsassay mit Kollagen I-beschichtete Oberflächen konnte jedoch kein Unterschied in der Adhäsionsrate zwischen den unterschiedlichen verwendeten Zelllinien beobachtet werden (Abb. 19A).

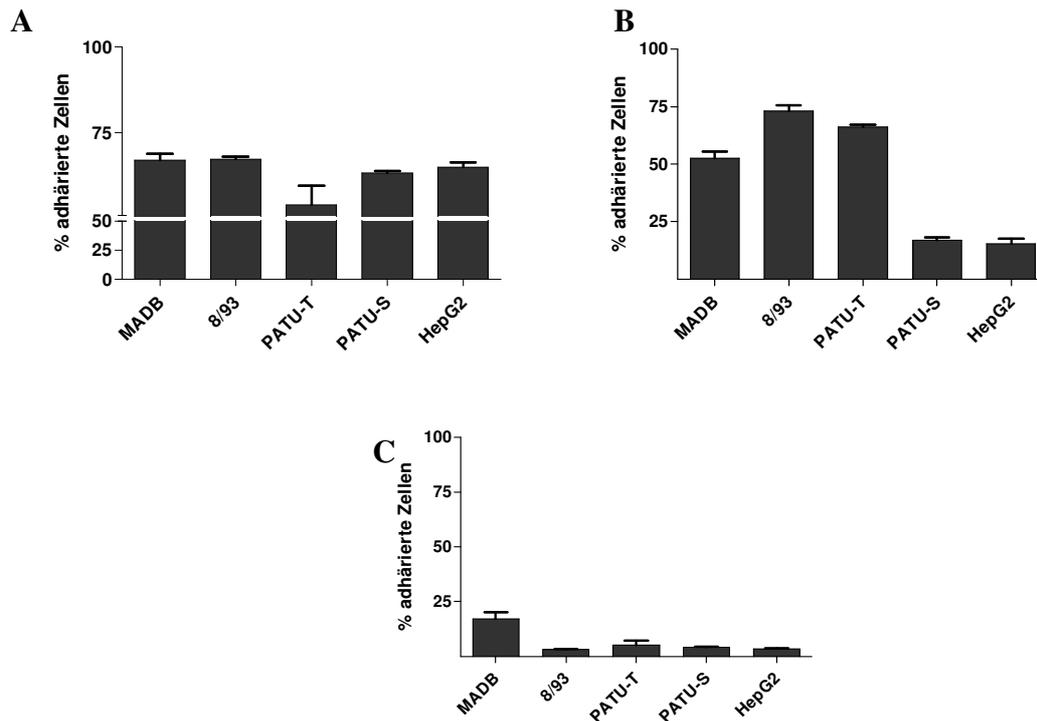


Abbildung 19: DP4-Oberflächenexpression auf Tumorzellen ist mit einer reduzierter Adhäsion an Fibronektin verbunden, beeinflusst jedoch nicht die Anheftung an Kollagen I. 150.000 Zellen der verschiedenen Tumorzelllinien wurden in Kollagen I (A) bzw. Fibronektin (B) beschichtete 48-Loch-Kulturschalen ausgesät. Nach 2 Stunden wurden die Fluoreszenz aller Zellen gemessen, anschließend die nicht adhärte Zellen abgewaschen und die Fluoreszenz der adhärte Zellen bestimmt. Als Kontrolle dienten mit HSA-beschichtete Kulturgefäße (C). Dargestellt ist Zellzahl der adhärte Zellen nach dem Waschen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl vor dem Waschen als Mittelwert \pm SD, n=3, mit GraphPad Prism 4.0.

Sowohl für die erzeugten transformierten Zellklone (Abb. 16,17) als auch für die Tumorzelllinien (Abb. 19) konnte gezeigt werden, dass die DP4-Expression unabhängig von der enzymatischen Aktivität mit einer reduzierten Fähigkeit der Zellen zur Adhäsion an Fibronektin beschichtete Oberflächen einher geht. Der beobachtete Effekt vergrößerte sich mit steigender Expressionsrate. Die Adhäsion der Zellen an Kollagen I beschichtete Oberflächen war von der DP4-Expression unbeeinflusst.

4.3.3. Bestimmung der Interaktion von rekombinanter DP4 mit Fibronektin und Kollagen

In der Literatur wurde eine Interaktion von DP4 mit Kollagen und Fibronektin beschrieben^{65,120}. Im Widerspruch dazu stehen die in den oben beschriebenen Experimenten gemachten Beobachtungen, dass die DP4-Expression auf der Zelloberfläche keinen Einfluss auf die Adhäsion an Kollagen I-beschichtete Oberflächen hat. Auf Fibronektin-beschichteten Oberflächen ist die Adhäsion DP4-exprimierender Zellen sogar reduziert. Um den Effekt der DP4 auf die Zelladhäsion näher zu bestimmen, wurde die Interaktion des rekombinant hergestellten Enzyms mit Fibronektin und Kollagen I mit zwei unterschiedlichen Methoden untersucht.

Als erstes wurde die Interaktion von rekombinanter humaner DP4 (rhDP4) mittels Oberflächenplasmonresonanzspektrometrie (SPR) im BIACORE 3000 untersucht. Dazu erfolgte nach der Aktivierung der Carboxyl-Gruppen der Dextran-Matrix durch NHS/EDC aus einer Proteinlösung heraus die Kopplung von Kollagen I und Fibronectin kovalent an die Dextran-Matrix eines CM5-Sensorchips. Anschließend wurden die freien aktivierten Carboxyl-Gruppen mit Ethanolamin abgesättigt. Als Kontrolle dienten zwei Flusszellen, die mit NHS/EDC aktiviert und mit Ethanolamin wieder inaktiviert wurden. Das Signal der Kontrollzellen wird durch die Software während der Messung direkt mit dem Signal der Messzellen verrechnet.

Bei der Messung der Bindung von rhDP4 mit einer Konzentration von 10^{-11} bis 10^{-6} M an Sensor-Chip-gekoppeltes Kollagen I bzw. Fibronectin konnte nach Abzug des Signals der Kontrollzellen kein Signal im Sensorgram durch die Bindung des Enzyms beobachtet werden wenn die Messung in PBS-Puffer mit physiologischer Salzstärke erfolgte (Abb. 20).

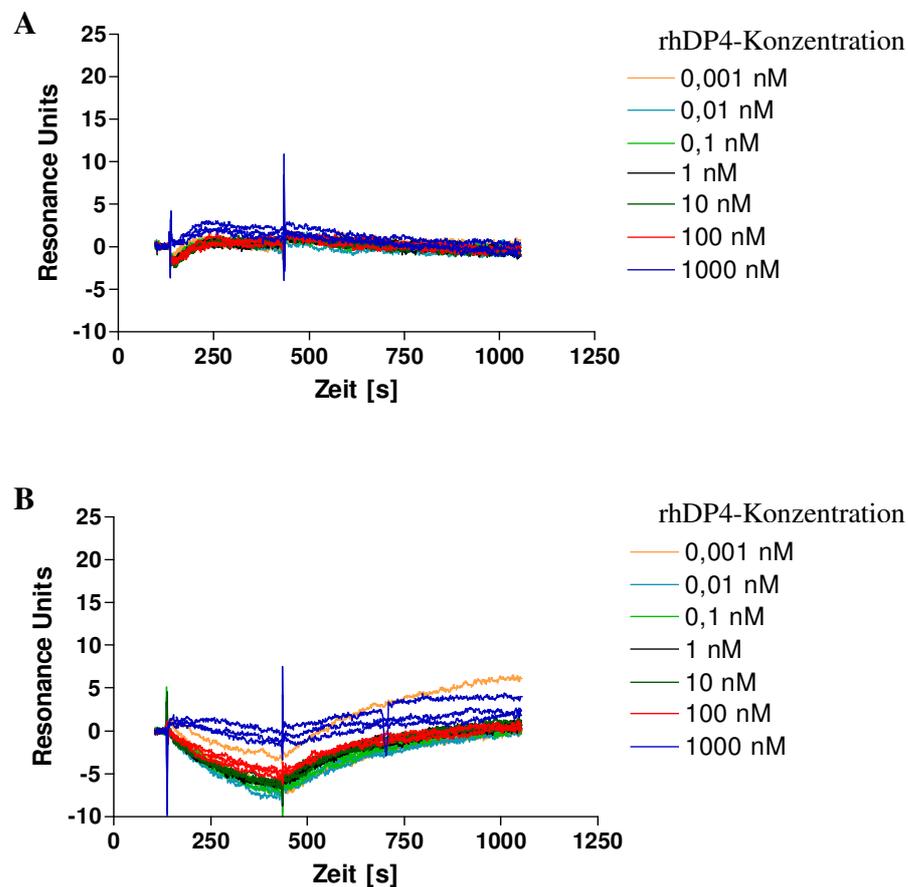


Abbildung 20: BIACORE-Analyse der Interaktion zwischen rhDP4 und Fibronectin bzw. Kollagen bei physiologischer Salzstärke

Unterschiedliche Konzentrationen an rekombinanter humaner DP4 in PBS-P wurden im BIACORE3000 mit einer Flussgeschwindigkeit von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ über die mit 0,4 ng/mm^2 (400 RU) Fibronectin (A) und Kollagen (B) beladenen Flusszellen geführt. Die Interaktionen in der Kontrollzelle mit der aktivierten und deaktivierten Matrix wurden online von den Signalen der Messzellen automatisch durch die Software abgezogen. Die gemessene Kurvenschar wurde mittels der Auswertesoftware BIAevaluation bearbeitet und mit Hilfe von GraphPad Prism 4.0 dargestellt.

Wurde dagegen die rekombinante humane DP4 in 20 mM Phosphat-Puffer aufgenommen und die Messung in diesem Puffer durchgeführt, konnte eine Interaktion des Proteins mit dem Sensor-Chip-gekoppelten Kollagen I gemessen werden (Abb. 21). Eine Bindung der rhDP4 an Fibronectin war dagegen auch in 20 mM Phosphat-Puffer nicht detektierbar.

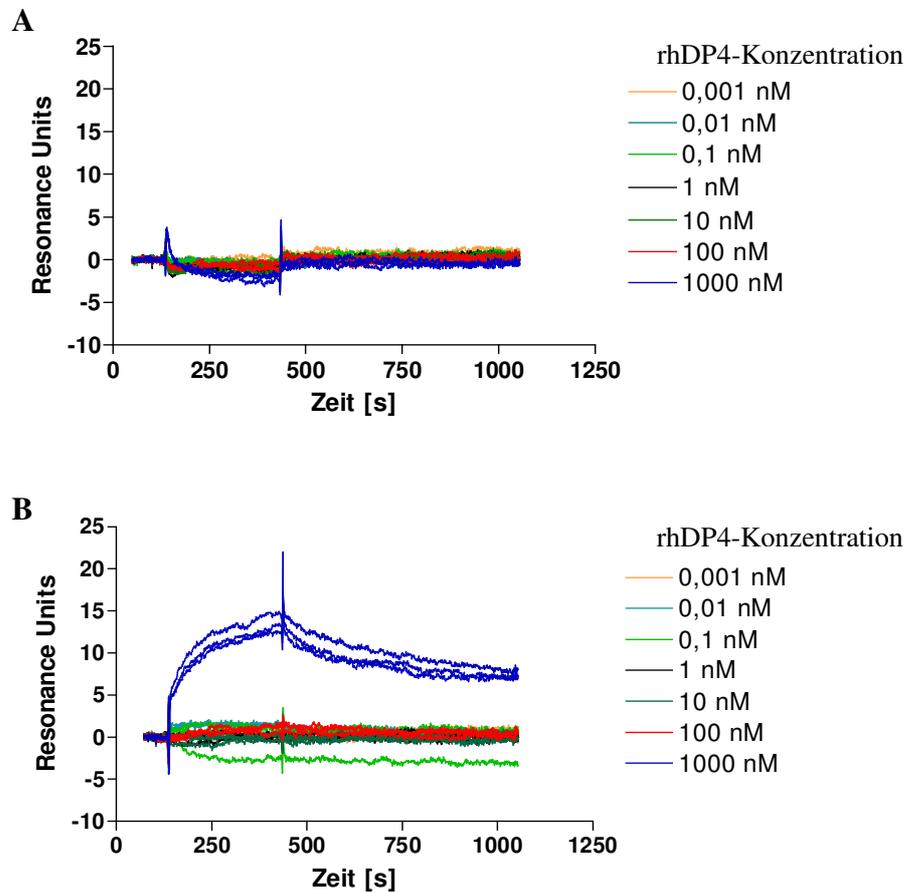


Abbildung 21: BIAcore-Analyse der Interaktion zwischen rhDP4 und Fibronectin bzw. Kollagen bei niedriger Salzstärke

Unterschiedliche Konzentrationen an rekombinanter humaner DP4 in 20 mM Natriumphosphat, 0,02 % P20 wurden im BIAcore3000 mit einer Flussgeschwindigkeit von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ über die mit 0,4 ng/mm^2 (400 RU) Fibronectin (A) und Kollagen (B) beladenen Flusszellen geführt. Die Interaktionen in der Kontrollzelle mit der aktivierten und deaktivierten Matrix wurden online von den Signalen der Messzellen automatisch durch die Software abgezogen. Die gemessene Kurvenschar wurde mittels der Auswertesoftware BIAevaluation bearbeitet und mit Hilfe von GraphPad Prism 4.0 dargestellt.

Um eine mögliche Störung der DP4-Matrix-Interaktion durch die kovalente Bindung des Kollagen I und Fibronectins an die Dextran-Matrix des CM5-Sensorchips oder mögliche sterische Behinderungen auszuschließen, kam als weitere Methode ein modifizierter ELISA zur Anwendung. In der ELISA-Methode wurden verschiedene Konzentrationen an rhDP4 in den Kavitäten, die mit unterschiedlichen Mengen an Kollagen I bzw. Fibronectin beschichtet waren, inkubiert. Nach Abwaschen nicht gebundenen Proteins wurde die Menge an adhärierter rhDP4 mit Hilfe eines spezifischen gegen DP4 gerichteten Antikörpers detektiert. Die Quantifizierung der gebundenen rhDP4 erfolgte mittels Messung des Chromophors,

welcher durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase freigesetzt wurde. Als Negativkontrolle kamen BSA-beschichtete Kavitäten zur Anwendung. Bei der Positivkontrolle handelte es sich um direkt mit rhDP4 beschichtete Kavitäten. Die Messungen in dem ELISA führten zu einem mit den Resultaten der SPR vergleichbaren Ergebnis. Wie in Abbildung 22 dargestellt konnte sowohl an die Kollagen I- als auch Fibronectin-beschichteten Oberflächen keine spezifische Bindung der rhDP4 beobachtet werden. Lediglich in den als Positivkontrolle dienenden, direkt mit rhDP4 beschichteten Kavitäten war eine Bindung des DP4-spezifischen Antikörpers zu beobachten.

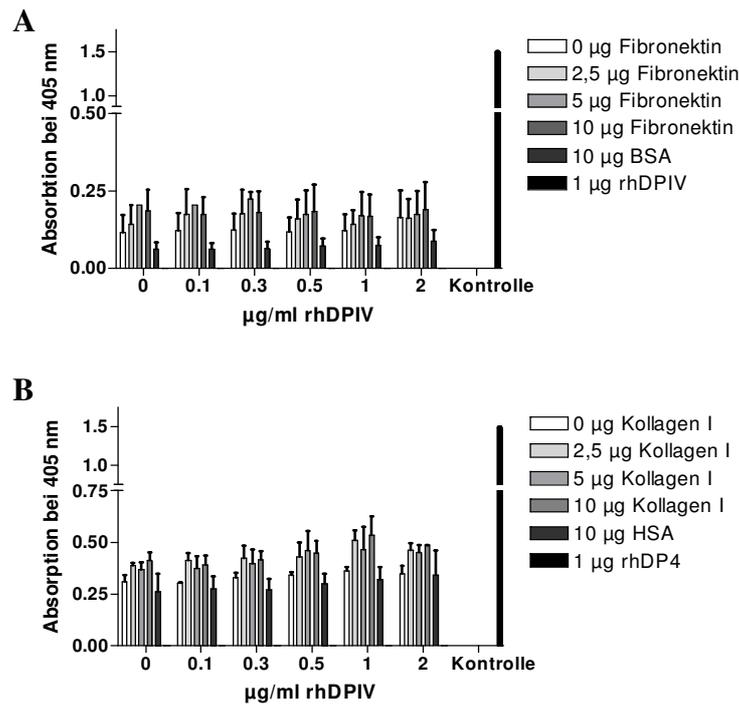


Abbildung 22: Interaktion von rhDP4 mit Kollagen und Fibronectin im ELISA-Test

Jeweils 4 Kavitäten einer Mikrotiterplatten wurden mit verschiedenen Konzentrationen Fibronectin (A) und Kollagen I (B) über Nacht inkubiert. Als Positiv-Kontrolle dienten mit rhDP4-beschichtete Kavitäten. PBS/Tween mit unterschiedlichen Konzentrationen an rhDP4 wurde für 1 Stunde bei RT in den beschichteten Kavitäten inkubiert. Nach dem Waschen wurde über Nacht mit einem Anti-human-DP4 Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem alkalische Phosphatase-gekoppelten sekundären Antikörper und Messung der Absorption bei 405 nm nach Zugabe von dNPP.

Sowohl in der SPR (Abb. 20, 21) als auch im ELISA (Abb. 22) konnte bei physiologischer Salzkonzentration keine Bindung von rhDP4 an Fibronectin und Kollagen I nachgewiesen werden. Damit wurde unabhängig voneinander mit zwei unterschiedlichen Methoden das Fehlen einer Interaktion der rhDP4 mit den ECM-Proteinen bei physiologischer Salzkonzentration nachgewiesen.

4.3.4. Einfluss von Inhibitoren der DP4 auf die Zelladhäsion

In einem allograft Tiermodell, in dem F344-Ratten MADB106-Adenokarzinomzellen injiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass die chronische Gabe von DP4-Inhibitoren die Größe und Anzahl der Tumorkolonien, gemessen 16 Tage nach Injektion der MADB106-Zellen,

gegenüber der Kontrolle reduziert. Um den an Hand der Ergebnisse der Tierexperimente prognostizierten Effekt der DP4-Inhibitoren auf die Zelladhäsion *in vitro* zu überprüfen, wurden unterschiedliche Tumorzelllinien in Gegenwart verschiedener DP4-Inhibitoren in Fibronektin beschichteten Kulturschalen inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurden die nicht adhärenen Zellen abgewaschen und die Anzahl der an der Oberfläche anhaftenden vitalen Zellen durch Zellzählung bestimmt. Um die Bedeutung der DP4 in den Adhäsionsmechanismen herauszustellen, wurden sowohl DP4-exprimierende Zelllinien verwendet als auch Zellen auf deren Oberfläche keine DP4 nachgewiesen werden konnte. Wie in Abbildung 23 zu erkennen, zeigte sich bei der DP4-positiven Zelllinie Hep-G2 im Zeitraum von 3 -10 Stunden eine signifikant reduzierte Adhäsion bei Zugabe von 1 μ M UG28 und 10 μ M P59/99, während 100 μ M P32/98 und 100 nM UG92 keine Wirkung auf die Zelladhäsion zeigten. Bei der DP4-negativen Zelllinie MADB106 ist ebenfalls ein Einfluss dieser Inhibitoren auf die Adhäsion der Zellen an die Fibronektin-beschichtete Oberfläche zu beobachten. Kein Effekt der DP4-Inhibitoren war dagegen bei der DP4-positiven Zelllinie PA-TU-8988S und der DP4-negativen Zelllinie PA-TU-8988T zu beobachten.

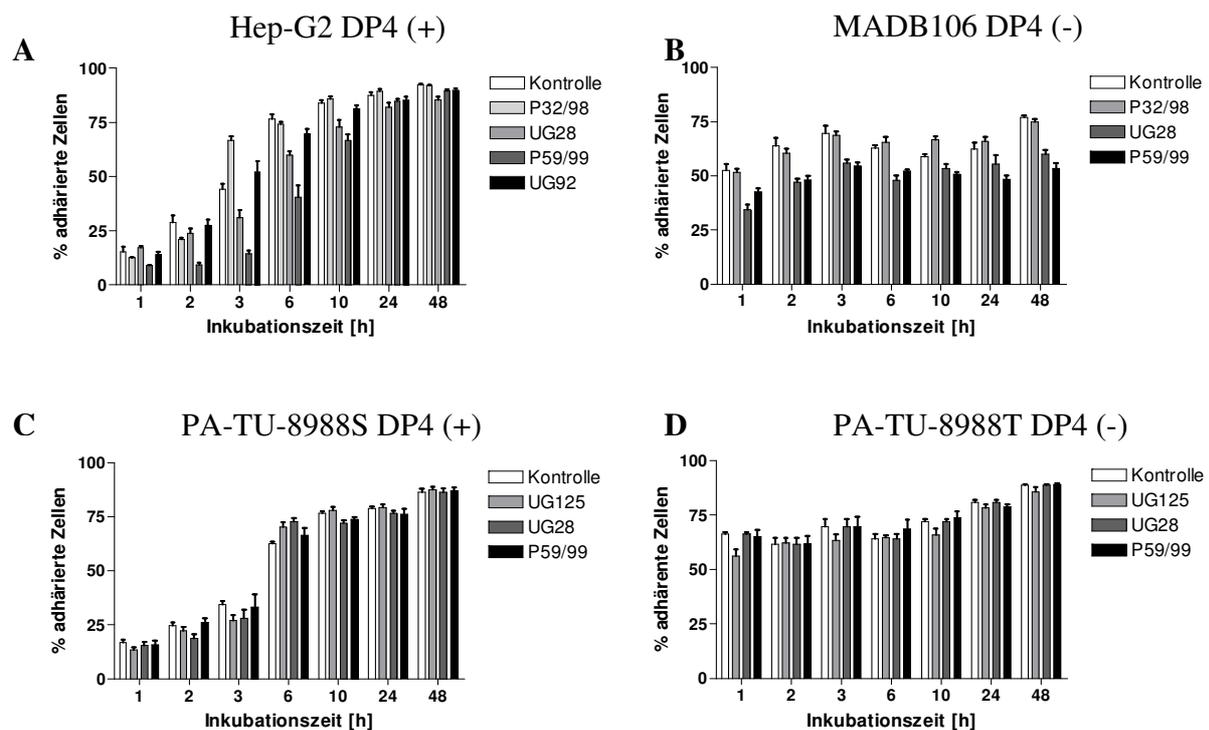


Abbildung 23: Einfluss von DP4-Inhibitoren auf die Adhäsion von Tumorzellen an Fibronektin

60.000 Zellen der Tumorzelllinien Hep-G2 (A), MADB106 (B), PA-TU-8988S (C) und PA-TU-8988T (D) wurden in die Kavitäten von 48-Loch-Kulturplatten ausgesät und in Gegenwart von 100 μ M P32/98, 10 μ M UG125, 1 μ M UG28, 10 μ M P59/99 und 100 nM UG92 kultiviert. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden die nicht adhärenen Zellen abgewaschen, die adhärenen Zellen abgelöst und gezählt. Dargestellt ist Zellzahl der adhärenen Zellen nach dem Waschen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl vor dem Waschen als Mittelwert \pm SD, n=9 mit GraphPad Prism 4.0.

Um zu überprüfen, ob die Wirkung der verwendeten Inhibitoren während der Dauer des Versuches durch Bestandteile des Kulturmediums oder zelluläre Enzyme inaktiviert werden, wurde die DP4-positive Zelllinie PA-TU-8988S in Gegenwart der Inhibitoren inkubiert. Nach 48 Stunden wurde sowohl die DP4-Aktivität auf der Zelloberfläche als auch die inhibitorische Wirkung der Kulturüberstände auf die enzymatische Aktivität gereinigter DP4 in einem Enzymassay gemessen. Während sich die inhibitorische Aktivität von P32/98, UG125, UG28 und UG92 über den Zeitraum von 48 Stunden nicht verändert, ist bei P59/99 eine Verringerung der Inhibierung der DP4-Aktivität zu beobachten (Abb. 24).

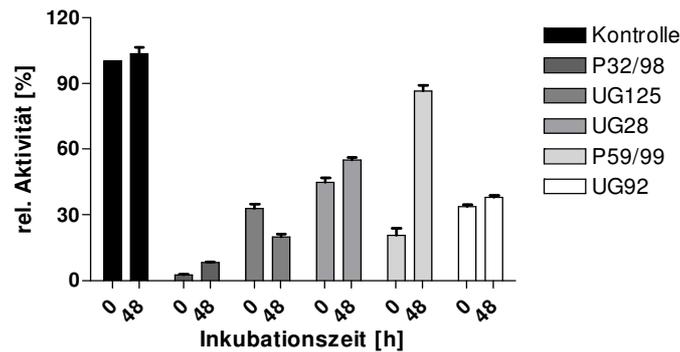


Abbildung 24: Stabilität von DP4-Inhibitoren im Zellkulturüberstand

80.000 Zellen der DP4-positiv getesteten Tumorzelllinie PA-TU-8988S wurden in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte ausgesät und in Gegenwart von 100 μ M P32/98, 10 μ M UG125, 1 μ M UG28, 10 μ M P59/99 und 100 nM UG92 kultiviert. Nach 30 Minuten Vorinkubation wurde zum Zeitpunkt 0 Stunden und 48 Stunden der Kulturüberstand durch Messpuffer ersetzt und die Gly-Pro-AMC-Spaltung durch Messung der Fluoreszenz bei 465 nm nach Anregung bei 380 nm verfolgt. Dargestellt ist das Verhältnis der Fluoreszenzänderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei 30 Minuten als Mittelwert \pm SD mit GraphPad Prism 4.0.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die in der Literatur beschriebene Interaktion von DP4 mit Kollagen bei Verwendung humaner rekombinanter DP4 von den Pufferbedingungen abhängig ist. Während eine direkte Wechselwirkung gereinigter rekombinanter DP4 mit Fibronectin nicht nachweisbar war, war bei der Bindung von gereinigter rekombinanter DP4 an Kollagen eine Abhängigkeit von der Ionenstärke zu beobachten. Im Zellkulturmodell zeigten unterschiedliche DP-Inhibitoren keine spezifische Wirkung, da deren Einfluss auf die Zelladhäsion nicht mit der Oberflächenexpression von DP4 korrelierte.

4.4. Untersuchungen zur Zellmigration

4.4.1. Einfluss von Inhibitoren der DP4 auf die durch konditioniertes Medium induzierte Immuzell-Migration

Neben der Chemotherapie gewinnt die Aktivierung des körpereigenen Immunsystems zur Tumorthherapie zunehmend an Bedeutung^{91,121,122}. Dazu soll das körpereigene Immunsystem aktiviert und auf die Tumorzellen geprägt werden. Eine Möglichkeit dazu stellt die Modulation der Zytokinausschüttung der Tumorzellen dar. Diese Veränderung soll zu einer

verstärkten Einwanderung und Aktivierung von NK-Zellen, Monozyten und zytotoxischen T-Zellen in den Tumor führen, welche nachfolgend die Rejektion des Tumors einleiten. Da eine Reihe von Chemokinen (z.Bsp. CXCL11, CXCL12, CCL5) als Substrate für die DP4 beschrieben werden^{116,123-125}, sollte das Potential von Inhibitoren der DP4 in dieser Hinsicht *in vitro* getestet werden. Dazu wurde eine definierte Anzahl an Zellen verschiedener Tumorzelllinien für 2 Tage in Gegenwart unterschiedlicher DP4-Inhibitoren kultiviert. Der konditionierte Kulturüberstand kam anschließend in einem Immunzell-Migrationsassay als Lockmittel zum Einsatz. Dazu wurden die Kulturüberstände in die unteren Kammern des *Boyden-Chamber* Systems pipettiert, während die Zellen in Serum-freiem Medium in die oberen Kammern ausgesät wurden. Als Kontrolle diente der Kulturüberstand ohne Inhibitorzugabe. Bei den verwendeten Immunzelllinien handelt es sich um THP-1 (monozytäre Leukämie), Jurkat (T-Zelllinie), und NK92 (NK-Zelllinie). Um die Bestimmung der Migration nicht durch einen möglichen Einfluss der eingesetzten konditionierten Medien auf Proliferation und Überleben der Immunzellen zu stören, wurde jeweils die Zahl der vitalen Zellen sowohl in der unteren als auch oberen Kammer des *Boyden-Chamber* Systems ermittelt und zueinander ins Verhältnis gesetzt. In Tabelle 9 sind die Migrationsraten der verschiedenen Immunzelllinien nach Locken mit den Kulturüberständen der Inhibitor-behandelten Tumorzellen gezeigt. Die Migrationsraten sind im Verhältnis zur Kontrolle, die 100 % gesetzt wurde, dargestellt. Die Messungen erfolgten in vier voneinander unabhängigen Versuchen.

Wie in Tabelle 9 dargestellt, variierte die Wirkung der unterschiedlichen Inhibitoren in den verschiedenen Zelllinien. Kein Inhibitor zeigte in allen eingesetzten Tumorzelllinien eine vergleichbare Wirksamkeit. Nur in der DP4-positiven Zelllinie PA-TU-8988S führte die Zugabe jedes der verwendeten Inhibitoren in das Kulturmedium zu einer erhöhten Migrationsrate der THP-1 Zellen. Des Weiteren zeigen auch die strukturell nah verwandten Inhibitoren UG125 und UG28 keine vergleichbaren Effektmuster.

Auf Grund von Problemen bei der Kultivierung der NK92-Zellen konnten nur Einfach- bzw. Doppelbestimmungen vorgenommen werden. Die ermittelten Werte wiesen auch hier auf keine vergleichbare Wirksamkeit der Inhibitoren in den verschiedenen Tumorzelllinien hin (nicht dargestellt).

THP-1 (monozytäre Leukemie)

	unbehandelt	P32/98	UG125	UG28	P59/99
MIAPaCa-2	100	123,00	128,76	117,64	129,62
Hup T3	100	86,26	127,89	116,38	91,70
PATU-T	100	78,50	188,97	102,03	84,05
PATU-S	100	131,02	135,52	152,68	160,07
US8-93	100	109,16	126,61	91,96	82,05
SV80	100	119,63	103,88	129,49	114,27

Jurkat (T-Zell-Lymphom)

	unbehandelt	P32/98	UG125	UG28	P59/99
MIAPaCa-2	100	124,69	141,94	108,08	113,93
Hup T3	100	106,68	133,19	97,08	90,77
PATU-T	100	110,58	112,13	88,18	120,66
PATU-S	100	78,22	103,69	109,45	109,46
US8-93	100	145,13	124,52	113,97	101,85
SV80	100	115,76	124,17	117,62	95,68

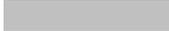
 signifikant erhöhte Zellmigration
 signifikant reduzierte Zellmigration

Tabelle 9: Einfluss von DP4-Inhibitoren auf die durch konditioniertes Medium von Tumorzellen vermittelte Immunzell-Migration

700.000 Zellen der unterschiedlichen Tumorzelllinien wurden 2 Tage in Gegenwart von 100 μ M P32/98, 10 μ M UG125, 1 μ M UG28 oder 10 μ M P59/99 in 6-Loch-Kulturplatten kultiviert. Der Kulturüberstand wurde in einem *Boyden-Chamber* System in die untere Kammer gegeben, um jeweils 200.000 THP-1- oder Jurkat-Zellen aus der oberen Kammer über einen Zeitraum von 16 Stunden anzulocken. Nach der Inkubation wurde die Zellzahl in den oberen und unteren Kammern ermittelt. Dargestellt ist der Quotient aus den Zellzahlen der unteren Kammer und oberen Kammer im Verhältnis zur nicht behandelten Kontrolle. Als signifikant verschieden gelten Werte, die im Students T-Test mit $p < 0,05$ übereinstimmen.

4.4.2. Einfluss der Expression von DP4- und FAP-Varianten auf die Immunzell-Migration

Um einen Einfluss von DP4 und FAP auf die Sekretion bzw. auf die Lebensdauer aktiver Zytokine und Chemokine zu untersuchen, wurde eine definierte Anzahl an Zellen der HEK-293-Klone für 2 Tage kultiviert und anschließend der Kulturüberstand als Lockmittel für die Migration von THP-1-, Jurkat- und NK92-Zellen verwendet. Wie im vorhergehenden Versuch beschrieben, wurde auch hier der Quotient aus der Zellzahl in der unteren Kammer und der Zellzahl in der oberen Kammer des *Boyden-Chamber* Systems verwendet, um mögliche Störungen herauszurechnen. Die Migrationsrate der THP-1-Zellen wird durch die Kulturüberstände der die beiden DP4-Varianten exprimierenden Klone um 10 – 15 % gegenüber den Kontrolltransfektanten erhöht. Die Kulturüberstände der aktives bzw. inaktives FAP-exprimierenden Klone dagegen zeigten eine verringerte Lockwirkung auf die THP-1-Zellen. Auf die Migration der Jurkat-Zellen zeigten nur die Kulturüberstände der DP4-exprimierenden Klone einen geringfügigen Einfluss (Abb. 25). Wurde den Immunzellen keine Lockmittel angeboten, war nur eine geringfügige ungerichtete Migration nachweisbar. Die Messungen erfolgten in vier voneinander unabhängigen Versuchen.

Auf Grund von Problemen bei der Kultivierung der NK92-Zellen konnten die Migrationsuntersuchungen nur als Einfach- bzw. Doppelbestimmungen vorgenommen werden. Die ermittelten Werte wiesen keine signifikanten Unterschiede in den Migrationsraten der NK92-Zellen bei Lockung durch Kulturüberstände der verschiedenen HEK-293 Klone auf (nicht dargestellt).

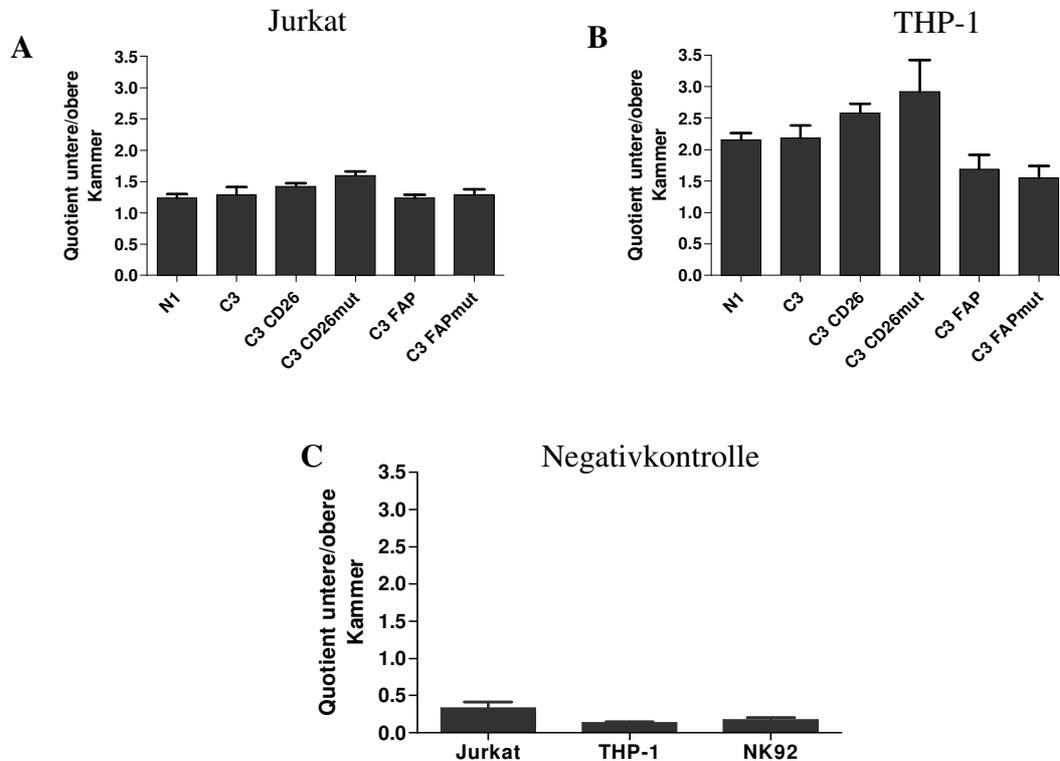


Abbildung 25: Einfluss der Expression von DP4 und FAP auf die durch konditioniertes Kulturmedium vermittelte Immunzell-Migration

700.000 Zellen der mit den Leervektoren N1 und C3, wildtyp DP4, mutierter DP4, wildtyp FAP oder mutiertem FAP transfizierten HEK-293-Klone wurden 2 Tage in 6-Loch-Kulturplatten kultiviert. Der Kulturüberstand wurde in einem *Boyden-Chamber* System in die untere Kammer pipettiert, um jeweils 200.000 Jurkat- (A) oder THP-1- (B) Zellen aus der oberen Kammer über einen Zeitraum von 16 Stunden anzulocken. Die Negativkontrolle erfolgte durch Gabe von Serum-freiem Medium in die untere Kammer (C). Nach der Inkubation wurde die Zellzahl in den oberen und unteren Kammern ermittelt. Dargestellt ist der Quotient aus den Zellzahlen der unteren Kammer und oberen Kammer als Mittelwert \pm SD mit GraphPad Prism 4.0.

4.4.3. Einfluss von DP4-Inhibitoren auf die durch konditioniertes Medium vermittelte Immunzell-Migration

Parallel zu den Untersuchungen zur Wirkung verschiedener DP4-Inhibitoren auf die Lockwirkung von Kulturüberständen unterschiedlicher Tumorzelllinien wurden diese Versuche mit den transfizierten HEK-293-Zellen wiederholt. Die Migrationsraten der unterschiedlichen Immunzelllinien nach Lockung mit den Kulturüberständen der Inhibitor-behandelten transfizierten Zellen sind im Verhältnis zur Kontrolle, die 100 % gesetzt wurde, dargestellt (Tab. 10). Wie bei den Untersuchungen mit den verschiedenen Tumorzelllinien ist auch hier keine Abhängigkeit der Wirkung der Inhibitoren vom Vorhandensein von aktiver

DP4 oder aktivem FAP auf den behandelten Zellen erkennbar.

THP-1 (monozytische Leukemie)

	unbehandelt	P32/98	UG125	UG28	P59/99
N1	100	84,63	90,56	96,54	94,24
C3	100	96,2	93,39	90,38	86,17
C3 CD26	100	127,31	138,52	119,9	104,56
C3 CD26mut	100	98,55	111,71	98,71	104,26
C3 FAP	100	118,86	116,21	117,16	153,28
C3 FAPmut	100	130,25	131,46	115,73	116,18

Jurkat (T-Zell-Lymphom)

	unbehandelt	P32/98	UG125	UG28	P59/99
N1	100	107,99	95,81	103,22	97,32
C3	100	111,61	101,74	87,85	89,59
C3 CD26	100	102,26	90,56	110,64	108,39
C3 CD26mut	100	100,42	80,97	110,45	112,44
C3 FAP	100	129,77	109,4	112,71	122,2
C3 FAPmut	100	159,52	115,57	97,65	80,67

signifikant erhöhte Zellmigration
signifikant reduzierte Zellmigration

Tabelle 10: Einfluss von DP4-Inhibitoren auf die durch konditioniertes Medium von transfizierten HEK-293-Zellen vermittelte Immunzell-Migration

700.000 Zellen der mit den Leervektoren N1 und C3, wildtyp DP4, mutierter DP4, wildtyp FAP oder mutiertem FAP transfizierten HEK-293-Klone wurden 2 Tage in Gegenwart von 100 μ M P32/98, 10 μ M UG125, 1 μ M UG28 oder 10 μ M P59/99 in 6-Loch-Kulturplatten kultiviert. Der Kulturüberstand wurde in einem *Boyden-Chamber* System in die untere Kammer pipettiert, um jeweils 200.000 THP-1- oder Jurkat-Zellen aus der oberen Kammer über einen Zeitraum von 16 Stunden anzulocken. Nach der Inkubation wurde die Zellzahl in den oberen und unteren Kammern ermittelt. Dargestellt ist der Quotient aus den Zellzahlen der unteren Kammern und oberen Kammern im Verhältnis zur nicht behandelten Kontrolle. Als signifikant verschieden gelten Werte die im Students T-Test mit $p < 0,05$ übereinstimmen.

Auf Grund von Problemen bei der Kultivierung der NK92-Zellen konnten die Untersuchungen zum Einfluss der DP4-Inhibitoren nur als Einfach- bzw. Doppelbestimmungen vorgenommen werden. Die ermittelten Werte wiesen auch hier auf keine vergleichbare Wirksamkeit der Inhibitoren in den verschiedenen transformierten Zelllinien hin (nicht dargestellt).

4.4.4. Einfluss der Überexpression von DP4- und FAP-Varianten auf die Zellmigration

Die Invasion in benachbartes Gewebe und ektopisches Überleben sind die kritischen Ereignisse für die Tumorprogression und Voraussetzung zur Bildung von sekundären Tumoren, den sogenannten Metastasen. Dabei ist die proteolytische Modifikation der extrazellulären Matrix eine Voraussetzung für Migration und Invasion von Zellen in das benachbarte Gewebe.

Für die *in vitro* Untersuchung des Migrations- und Invasionspotentials stehen verschiedene Modelle zur Verfügung. Ein Modell ist die Migration der Tumorzellen nach Lockung durch eine mikroporöse Membran. Die Zellmigration ist assoziiert mit der Bindung von Proteinen

auf der Zelloberfläche an die extrazelluläre Matrix¹²⁶. DP4 ist als Zelladhäsionsmolekül diskutiert worden und ihr wird eine Bindung an die extrazellulären Matrix-Komponenten Kollagen und Fibronectin zugeschrieben. Deshalb sollte der Einfluss der Expression von DP4 und FAP auf die *in vitro* Migration in einem *Boyden-Chamber* System bestimmt werden. In der Literatur konnte eine Korrelation zwischen erhöhter Migration der Zellen in einem *Boyden-Chamber* System und erhöhten invasiven Eigenschaften gezeigt werden¹²⁷. HEK-293-Zellen, welche wildtyp DP4 und FAP und die mutierten Varianten exprimieren, wurden in ein *Boyden-Chamber* System ausgesät und nach der Inkubation die Anzahl der migrierten Zellen ausgezählt (Abb. 26). Die Ergebnisse zeigen einen von der enzymatischen Aktivität unabhängigen inhibitorischen Effekt von DP4 und FAP auf die *in vitro* Zellmigration.

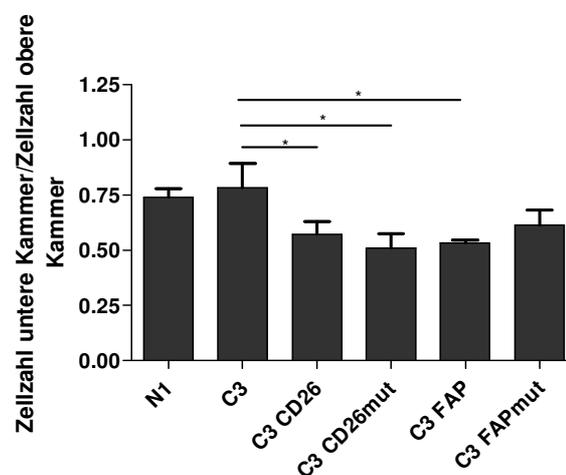


Abbildung 26: DP4- und FAP-exprimierende Zellklone zeigen eine reduzierte Migration

200.000 Zellen der mit den Leervektoren N1 und C3, wildtyp DP4, mutierter DP4, wildtyp FAP oder mutiertem FAP transfizierten HEK-293-Klone wurden in die oberen Kammern des *Boyden-Chamber* System in Serum-freiem Medium ausgesät. Zum Anlocken wurde Serum-haltiges Kulturmedium in die untere Kammer gegeben. Nach 22 Stunden Inkubation wurden die Zellen in den oberen und unteren Kammern ausgezählt und die Zellzahlen zu einander ins Verhältnis gesetzt. Die Vektor-transfizierten Zellen dienten als Kontrolle. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert \pm SD mit GraphPad Prism 4.0. * $p < 0.05$, $n=6$ ungepaarter Students T-Test

4.4.5. Einfluss der Überexpression von DP4- und FAP-Varianten auf die Zellinvasion

Neben der Zellmigration spielt bei der Ausbildung von Metastasen vor allem die Zellinvasion eine wichtige Rolle. Dabei bewegen sich die Zellen nicht nur über eine Oberfläche, sondern durchdringen die ECM und wandern in das umgebene Gewebe ein. Dazu stehen den Zellen verschiedene Proteasen zur Verfügung, welche die Matrixproteine abbauen^{6,28,103,106}. Für die Untersuchung des Invasionsvermögens von Zellen wird ein modifiziertes *Boyden-Chamber* System verwendet. Die Poren der mikroporösen Membran sind durch ECM-Proteine zum Beispiel Kollagen oder Matrigel verschlossen. Bevor die Zellen durch Stimulans induziert in die untere Kammer migrieren können, müssen die ECM-Proteine von zelleigenen Proteasen abgebaut werden. FAP und DP4 wurde in der Literatur eine Funktion bei der Zellinvasion

zugewiesen, wenn auch kein direkter ECM-Abbau durch diese Enzyme nachgewiesen werden konnte^{85,106,128,129}.

Um den Einfluss der Expression der enzymatisch aktiven und inaktiven Varianten von DP4 und FAP auf die Invasion von HEK-293-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen in mit Kollagengel bzw. Matrigel beschichtete *Boyden-Chamber* ausgesät und nach der Inkubation die Anzahl der in die untere Kammer gewanderten Zellen fluorometrisch bestimmt. Wie in Abbildung 27 zu erkennen, ist keine Invasion der HEK-293-Zellen zu beobachten. Weder die Vektor-transfizierten Zellen noch die Transfektanten mit den Enzymvarianten sind in der Lage, die ECM zu durchdringen und in das untere Kompartiment zu gelangen. Erst bei Zugabe von Kollagenase, welche die Matrixproteine abbaut, sind Zellen in der unteren Kammer zu beobachten.

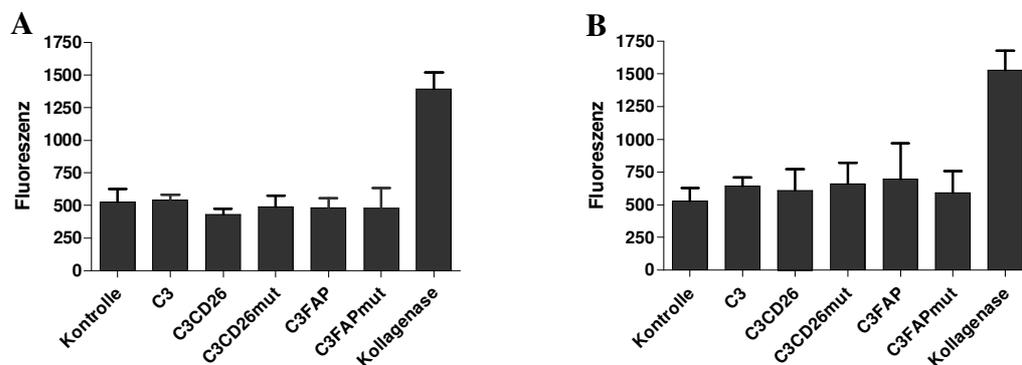


Abbildung 27: Keine Veränderung des Invasionsverhaltens der HEK-293-Zellen durch DP4- und FAP-Überexpression

200.000 Zellen der mit dem Leervektor C3, wildtyp DP4, mutierter DP4, wildtyp FAP oder mutiertem FAP transfizierten HEK-293-Klone wurden in die oberen Kammern des *Boyden-Chamber* System mit Kollagengel (A) oder Matrigel (B) in Serum freiem Medium ausgesät. Zum Anlocken wurde Serum-haltiges Kulturmedium in die untere Kammer gegeben. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Anzahl der migrierten Zellen in den unteren Kammern fluorometrisch bestimmt. Als Negativkontrolle dienten zellfreie Kammern während als Positivkontrolle die Zugabe von 3 µg/ml Kollagenase zu Leervektor transfizierten Zellen verwendet wurde. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert ± SD von drei voneinander unabhängigen Messungen mit GraphPad Prism 4.0.

4.4.6. Einfluss der Überexpression von DP4- und FAP-Varianten auf die Kollagendegradation

Wie in den vorhergehenden Untersuchungen gezeigt, führt die Überexpression von DP4 und FAP nicht zu einer gesteigerten Invasivität der transfizierten HEK-293-Zellen. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Migration dieser Zellen durch DP4 und FAP reduziert wird. Um auszuschließen, dass die fehlende Fähigkeit zur Invasion im Invasionsassay auf die verringerte Migrationsneigung der Zellen zurückzuführen ist, wurde die Fähigkeit der Zellen zur Degradation des ECM-Proteins Kollagen in einem gesonderten Assay untersucht. Dazu wurden die Zellen in ein Kollagengel mit 2 % (w/w) Fluoreszein-markierten Kollagen eingegossen und die Freisetzung des Fluoreszeins durch Kollagenabbau gemessen.

In Abbildung 28 ist die Fluoreszenz des durch die Kollagenproteolyse freigesetzten

Fluoreszeins dargestellt. Sowohl die Kontroll-Transfektanten als auch die enzymatisch aktive und inaktive Varianten der DP4- und des FAP-exprimierenden Zellen setzen kein Fluoreszein aus dem Kollagengel frei. Nur bei Zugabe von Kollagenase ist die Fluoreszeinfluoreszenz im Überstand nachweisbar.

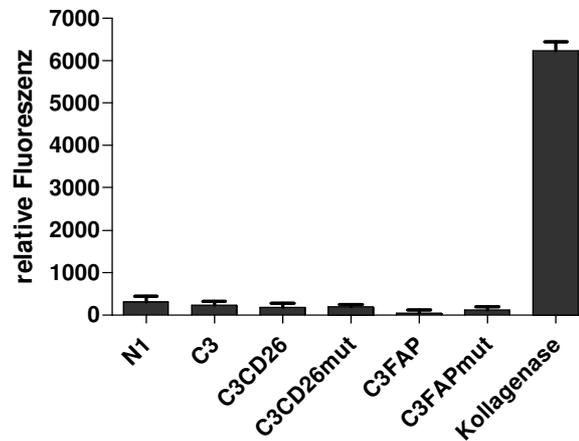


Abbildung 28: HEK-293-Klone zeigen keine Kollagenaseaktivität

200.000 Zellen der mit den Leervektoren N1 und C3, wildtyp DP4, mutierter DP4, wildtyp FAP oder mutiertem FAP transfizierten HEK-293-Klone wurden in Kollagengel mit 2 % (w/w) eingegossen und 48 Stunden in Serum-haltigem Phenolrot-freiem Medium inkubiert. Anschließend wurde die grüne Fluoreszenz des freigesetzten Fluoreszeins im Kulturüberstand gemessen. Als Positiv-Kontrolle diente die Zugabe von 3 µg/ml Kollagenase. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert \pm SD mit GraphPad Prism 4.0.

Die Kulturüberstände von DP4-überexprimierenden HEK-293-Zellen zeigten eine geringe jedoch nicht signifikante Migrations-fördernde Wirkung auf THP-1- bzw. Jurkat-Zellen. Der Effekt der von uns eingesetzten DP4-Inhibitoren auf die durch Kulturüberstände induzierte Migration der Immunzellen korrelierte nicht mit der DP4-Expression auf den unterschiedlichen Tumorzelllinien. DP4- und FAP-Überexpression führte zu einer verringerten Migrationsneigung der HEK-293-Klone. Eine gesteigerte Kollagenaseaktivität von FAP-exprimierenden HEK-293-Zellen konnte nicht nachgewiesen werden.

4.5. Untersuchungen zu Zellwachstum und Morphologie

4.5.1. Einfluss der Überexpression von DP4- und FAP-Varianten auf Kontakt-unabhängiges Wachstum

Die meisten metazoischen Zellarten erfordern einen Kontakt zu einer Oberfläche auf der sie sich ausbreiten und teilen. Dies wird als Kontaktabhängigkeit des Wachstums bezeichnet, eine Steuerung der Zellteilung, die viele transformierte Zellen verloren haben. Die meisten Arten normaler Zellen sind „programmiert“ in Apoptose überzugehen, wenn sie die Verbindung zu anderen Zellen verlieren. Die Fähigkeit auf „weichem Nährboden“ zu wachsen ist ein Routinetest, dessen Ergebnis anzeigt, dass Zellen mit der Fähigkeit zu

Kontakt-unabhängigem Wachstum ausgestattet sind. Dieses ungesteuerte Wachstum ist häufig ein Hinweis auf einer gesteigerte Malignität und Invasionsneigung von Tumorzellen¹³⁰. Die Effizienz mit der maligne Zellen in der Lage sind, Kontakt-unabhängig Kolonien zu bilden, ist eine indirekte Methode, ihre Fähigkeit zur *in vivo* Transformation zu bestimmen^{130,131}.

Zur Analyse der Fähigkeit der transfizierten Zellen zu *anchorage independent* Wachstum, wurden die Zellen in Softagar eingeschlossen, ausplattiert und inkubiert. Nach dem Ende der Inkubation wurden die gebildeten Kolonien durch Zugabe von Iodonitrotetrazoliumchlorid angefärbt. Da der Farbstoff durch eine spezifische Enzymreaktion freigesetzt wird, werden nur vitale Zellkolonien angefärbt (Abb. 29).

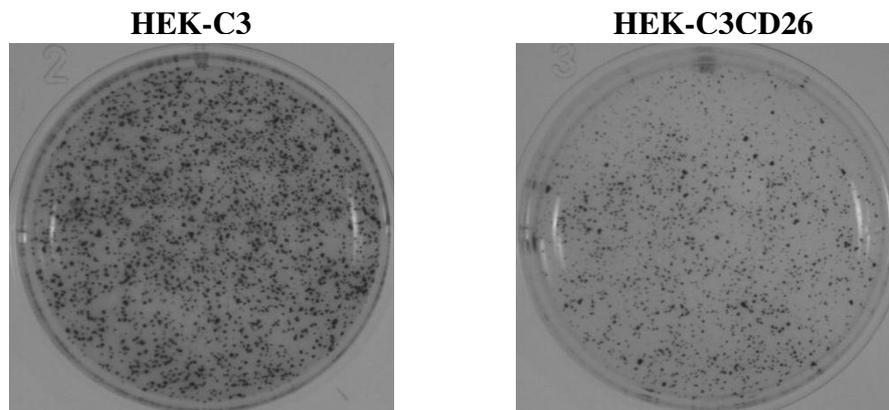


Abbildung 29: DP4-Überexpression in HEK-293-Zellen reduziert die Kolonienzahl in Softagar

50.000 Zellen der mit dem Leervektor C3, wildtyp DP4, mutierter DP4, wildtyp FAP oder mutiertem FAP transfizierten HEK-293-Klone wurden in Softagar in 6-Loch-Kulturplatten ausgesät. Nach 13 Tagen Inkubation wurden die Kolonien mit Iodonitrotetrazoliumchlorid angefärbt und fotografiert.

Wie in Abbildung 30 gezeigt, führt die Expression der beiden DP4-Varianten zu einer signifikant verringerten Fähigkeit Kolonien in dem Softagar auszubilden. Die Anzahl der gebildeten Kolonien ist 60 – 70 % niedriger gegenüber den mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen. Der Effekt der FAP-Expression auf die Koloniebildung ist mit 10 – 15 % Reduktion nicht signifikant. Diese Ergebnisse weisen auf einen starken Wachstumshemmenden Effekt der DP4 hin. Der Versuch wurde als 3-fache Bestimmung in zwei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt.

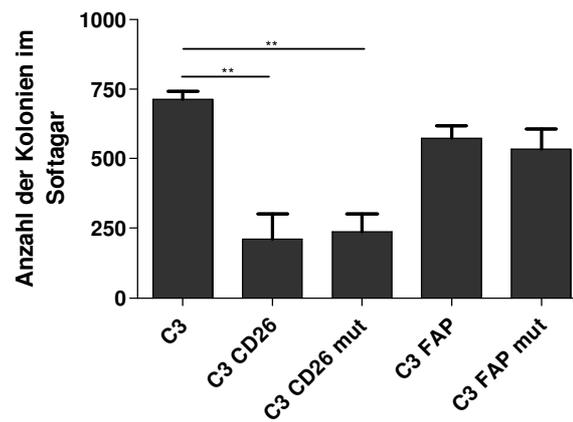


Abbildung 30: DP4-Expression reduziert die Fähigkeit zu Kontakt-unabhängigem Wachstum. 50.000 Zellen der mit dem Leervektor C3, wildtyp DP4, mutierter DP4, wildtyp FAP oder mutiertem FAP transfizierten HEK-293-Klone wurden in Softagar in 6-Loch-Kulturplatten ausgesät. Nach 13 Tagen Inkubation wurden die Kolonien mit Iodonitrotetrazoliumchlorid angefärbt, fotografiert und mittels der Software BioProfil die Koloniezahl bestimmt. Die Leervektor-transfizierten Zellen dienten als Kontrolle. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert \pm SD mit GraphPad Prism 4.0. ** $p < 0,01$; $n=6$ ungepaarter Students T-Test

4.5.2. Einfluss der Expression von DP4- und FAP-Varianten auf die Morphologie von HEK-293-Klonen

Ein Zeichen für die Entartung von Krebszellen ist die Auflösung eines kompakten Zellverbandes. Der Verlust der Zell-Zell-Adhäsion ist Voraussetzung für invasives Verhalten von malignen Tumoren, wie es während der epithelialen Dedifferenzierung zu beobachten ist.

Unter normalen Kultivierungsbedingungen werden 1 – 1,5 Mio. Zellen in 25 cm² Kulturflaschen ausgesät. Dabei bildet sich in kurzer Zeit ein gleichmäßiger Zellrasen, der innerhalb von 2 Tagen zur Konfluenz heranwächst. Um eine durch mögliche Zell-Zell-Interaktionen verursachte Ungleichverteilungen besser beobachten zu können, wurden für diesen Versuch jeweils nur 0,5 Mio. Zellen pro 25 cm² Kulturflasche ausgesät. Nach drei Tagen Kultivierung wurden die Zellen im Invertmikroskop im Phasenkontrast beobachtet und fotografiert. Dabei zeigte sich, dass die Vektor-transfizierten Zellen sich annähernd gleichmäßig auf der Unterlage verteilten und nur wenige Zell-Zell-Kontakte aufwiesen (Abb.31A, B). Die DP4- und FAP-exprimierenden Zellen zeigten dagegen eine Neigung zur Bildung von Zellkolonien in denen die Zellen relativ kompakt vorlagen (Abb. 31C-F). Der Einfluss auf die individuelle Morphologie der Zellen konnte mit dieser Methode nicht so deutlich herausgearbeitet werden wie bei den Aufnahmen der EGFP-Fluoreszenz (Abb. 12A-F). Die DP4- und FAP-transfizierten Zellen zeigten einen eher Kopfsteinpflaster-artigen Zellkörper gegenüber dem spindelförmigen Zellkörper der mit dem Leervektor transfizierten Zellen.

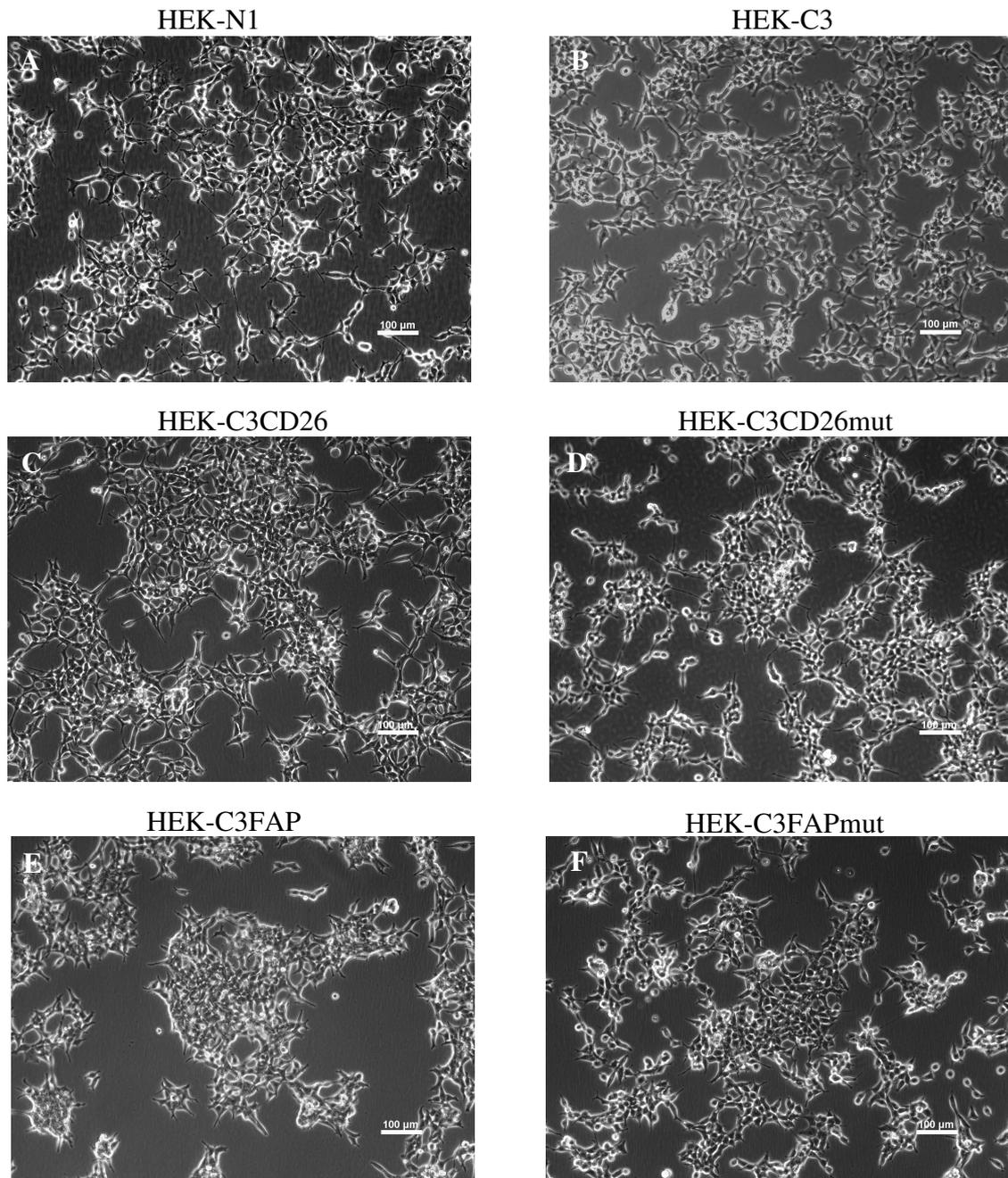


Abbildung 31: DP4- und FAP-Expression führt zur Bildung von kompakten Kolonien
0,5 Mio. Zellen der transfizierten HEK-293-Klone mit Leervektor N1 (A), Leervektor C3 (B), wildtyp DP4 (C), mutierte DP4 (D), wildtyp FAP (E) oder mutiertem FAP (F) wurden für 3 Tage kultiviert. Die Aufnahmen im differentiellen Phasenkontrast erfolgten bei 100-facher Vergrößerung mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops und wurden mittels einer Mikroskopkamera dokumentiert.

4.5.3. Einfluss der Expression von DP4 auf die Morphologie von Tumorzellen

Die Expression von DP4 und FAP führte, wie in den vorangegangenen Versuchen gezeigt, zu einer Veränderung der Zellkoloniemorphologie im Vergleich zu den Vektor-transfizierten Zellen. Mit wildtyp Tumorzelllinien, die natürlicherweise DP4 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, sollten diese Beobachtungen, die mit den transformierten HEK-293-Zellen

gemacht wurde, bestätigt werden. Dazu wurden in analoger Weise 0,5 Mio. Tumorzellen ausgesät und die Morphologie der Zellkolonien nach 3 Tagen Kultivierung im Lichtmikroskop beobachtet und dokumentiert.

Wie in Abbildung 32 zu erkennen, war bei den Tumorzellen ein, zu den mit den DP4 Varianten transformierten HEK-293-Zellen vergleichbarer, wenn auch deutlicherer Effekt zu beobachten. So zeigten ebenfalls die DP4-exprimierenden Tumorzellen eine verstärkte Zell-Zell-Interaktion, welche sich in kompakten Zellkolonien äußert.

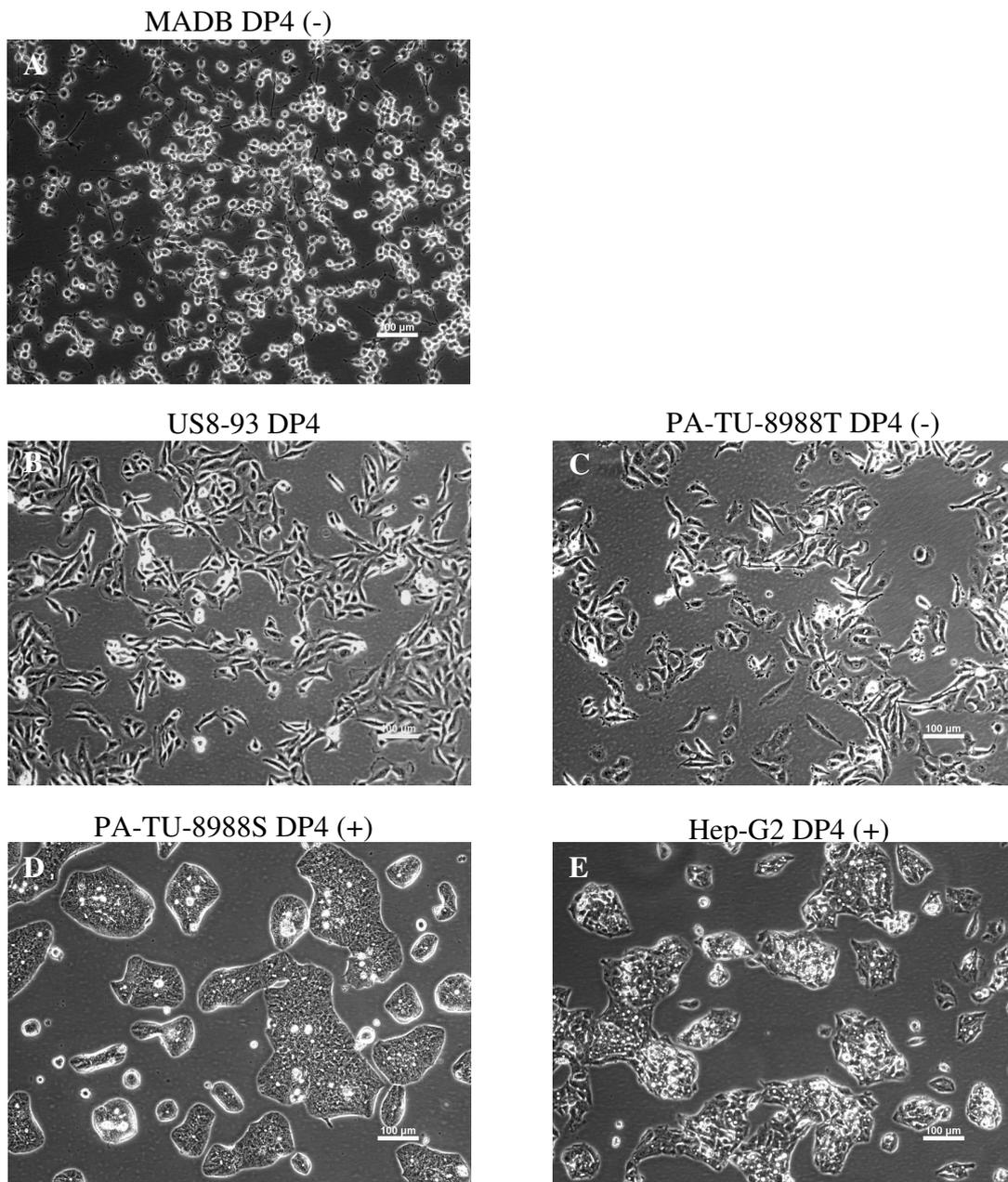


Abbildung 32: DP4-exprimierende Zellen bilden kompakte Kolonien
0,5 Mio. Zellen der Tumorzelllinien MADB106 (A), US8-93 (B), PA-TU-8988T (C), PA-TU-8988S (D) und Hep-G2 (E) wurden für 3 Tage kultiviert. Die Aufnahmen im differentiellen Phasenkontrast erfolgten bei 100-facher Vergrößerung mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops und wurden mittels einer Mikroskopkamera dokumentiert.

Die Expression von DP4 in wildtyp Tumorzellen und transfizierten HEK-293-Zellen ist mit einem gesteigerten epithelialen Charakter der Zellen hinsichtlich Koloniemorphologie und Zellwachstum verbunden. Daneben geht die FAP-Expression in HEK-293-Klonen mit der Ausbildung kompakterer Zellkolonien einher.

4.6. Untersuchung zum Phosphorylierungsstatus von Kinasen und NF- κ B sowie zur differentiellen Genexpression

4.6.1. Einfluss der Überexpression von DP4- und FAP-Varianten auf die Phosphorylierung von ERK1/2, p38, JNK und NF- κ B

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich Eigenschaften, wie zum Beispiel Matrixadhäsion oder Migration der verwendeten Zelllinien bei Expression der DP4- und FAP-Varianten verändern. Diese Änderungen sind, wie gezeigt wurde, vom Vorhandensein der enzymatischen Aktivität der exprimierten Proteine unabhängig. DP4 und FAP sind Moleküle, welche ihre Funktionen auf der Zelloberfläche erfüllen. Die beobachteten Veränderungen der Zelleigenschaften zum Beispiel Zell-Zell-Adhäsion, Migration oder Kontakt-unabhängiges Wachstum, begründen sich unter anderem auf Variation von Vorgängen im Zellinneren. Damit eine DP4- und FAP-Überexpression Einfluss auf diese Prozesse im Zellinneren nehmen kann, müssen die Signale, welche die Expression von DP4 und FAP auf der Zelloberfläche verursachen, in das Zellinnere, beispielsweise den Zellkern übertragen werden. Eine Variation in den dafür verantwortlichen Signalkaskaden sollte an einem veränderten Phosphorylierungsstatus der Kinasen bestimmbar sein.

Um den Effekt der Expression von sowohl DP4 als auch FAP auf den Phosphorylierungszustand der Schlüsselkinase des ERK1/2-Signaltransduktionsweges in HEK-293 Zellen zu untersuchen, wurden jeweils eine Million Zellen der verschiedenen Klone in 35 mm Kulturschalen ausgesät und über Nacht kultiviert. Anschließend wurde das Gesamtprotein der Zellen gewonnen, in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und nach der Übertragung auf Nitrozellulose-Membran mit spezifischen Antikörpern gerichtet gegen die phosphorylierte Kinase ERK1/2 analysiert. Dies erfolgt durch Schwärzung eines Röntgenfilmes, welche durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase-katalysierte Chemolumineszenzreaktion hervorgerufen wird. Mit Oncostatin M (OSM) stimulierte U343-Zellen dienten dabei als Positiv-Kontrolle. Die Quantifizierung der Schwärzung erfolgte durch densitometrische Bestimmung der Banden auf den Röntgenfilmen mittels der Software BioLight.

Die Auswertung der Röntgenfilme zeigte einen leicht gesteigerten Phosphorylierungsgrad der ERK2-Kinase in den aktives FAP-exprimierenden Klonen im Vergleich zum Kontrolltransfektanten (Abb. 33). In den aktive DP4-exprimierenden Klonen war keine Veränderung der Aktivierung der ERK2-Kinase gegenüber der Kontrolle zu beobachten. In

den mutierte DP4- und mutiertes FAP-exprimierenden HEK-293-Klonen war dagegen eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung der ERK2-Kinase gegenüber der C3-Vektorkontrolle zu beobachten. Der Phosphorylierungsgrad der ERK1-Kinase war in allen Klonen niedriger als der der ERK2-Kinase. Im Vergleich zu Vektorkontrolle zeigte sich eine erhöhte Phosphorylierung der ERK1-Kinase in den DP4- und FAP-exprimierenden Klonen (Abb. 33, 34). Deutlich zu erkennen ist, dass in den als Positivkontrolle verwendeten U343-Zellen durch Zugabe von OSM eine starke Aktivierung der Kinasen erfolgte.

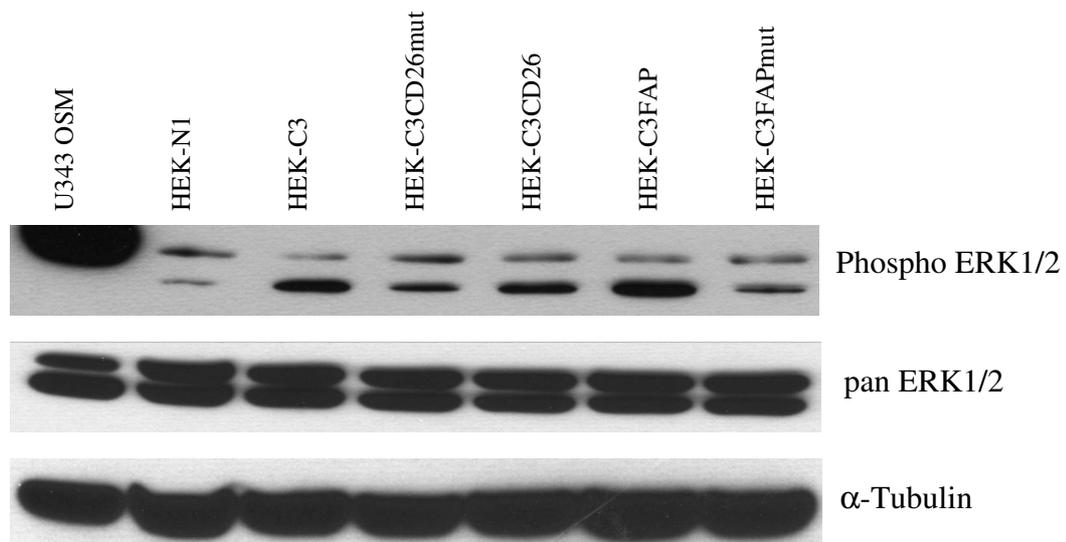


Abbildung 33: Westernblotanalyse des Phosphorylierungszustandes von ERK1/2 in HEK-293-Klonen

1 Mio. U343-Zellen und Zellen der mit den Leervektoren N1 und C3, wildtyp DP4, mutierter DP4, wildtyp FAP oder mutiertem FAP transfizierten HEK-293-Klone wurden über Nacht kultiviert. Als Positiv-Kontrolle dienten für 30 min mit OSM stimulierte U343-Zellen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und lysiert, die zellulären Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion erfolgte mit Anti-Phospho-ERK1/2-Antikörper (Thr202/Tyr204) über Nacht gefolgt von Peroxidasegekoppeltem Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper für 1 Stunde. Nach 5 Minuten Inkubation in „SuperSignal West Pico“ wurde der Film für 90 Minuten belichtet und anschließend von Hand entwickelt. Die Detektion der Kinase erfolgte mit Anti-pan-ERK1/2-Antikörper über Nacht, gefolgt von Peroxidase-gekoppeltem Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper für 1 Stunde. Nach 5 Minuten Inkubation in „SuperSignal West Pico“ wurde der Film für 1 Minute belichtet und anschließend von Hand entwickelt. Zur Kontrolle erfolgte die Detektion des α -Tubulins in analoger Weise auf demselben Blot.

Zusätzlich zur Untersuchung der Aktivierung wurde der Einfluss der Expression von DP4 und FAP auf die Menge des ERK1/2-Proteins analysiert. Dazu wurde neben dem Anti-pan-ERK1/2-Antikörper ein Anti- α -Tubulin-Antikörper verwendet, um eine Vergleichbarkeit der auf das SDS-Gel aufgetragenen Proteinmengen zu überprüfen. Wie in Abbildung 33 gezeigt, führt die Expression von DP4 und FAP in HEK-293-Zellen zu keiner Veränderung des ERK1/2-Proteinlevels.

Die densitometrische Auswertung der Röntgenfilme bestätigte den optischen Eindruck hinsichtlich einer reduzierten ERK2-Phosphorylierung in den inaktiven DP4- und FAP-exprimierenden Klonen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 34). Ebenso zeigte sich, dass der

Phosphorylierungsgrad der ERK1 in den die DP4- und FAP-Varianten exprimierenden Klonen gegenüber der Vektorkontrolle erhöht war.

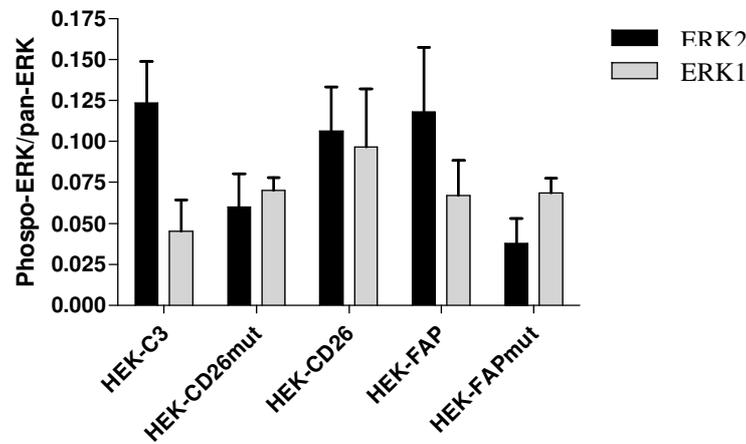


Abbildung 34: Densitometrische Auswertung des ERK1/2 Westernblots der HEK-293-Klone. Nach dem Einscannen der Röntgenfilme wurde die Intensität der Banden mit Hilfe der Software BioLight ermittelt. Dargestellt ist der Quotient aus Intensität der Proteinbande und der Bande der phospho-spezifischen Antikörper. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert \pm SD, n=6.

Mit der Bestimmung des Aktivierungszustandes der Kinase p38 wurde eine Schlüsselkinase eines weiteren Signaltransduktionsweges untersucht. Der p38-Signaltransduktionsweg wird durch Stress und proinflammatorische Zytokine der TNF-Familie aktiviert¹³². Die Gewinnung, Auftrennung der Proteine und Detektion der p38-Kinase erfolgte in analoger Art und Weise wie oben beschrieben. Mit UV stimulierte U343-Zellen dienten als Positiv-Kontrolle.

Hier zeigten sich keine Unterschiede in der Aktivierung der Kinase in den verschiedenen HEK-293-Klonen. In Abbildung 35 ist erkennbar, dass neben der Positiv-Kontrolle bei allen Zellklonen eine vergleichbare Schwärzung des Filmes erfolgte. Zusätzlich zur Untersuchung der Aktivierung wurde der Einfluss der Expression von DP4 und FAP auf die Menge des p38-Proteins analysiert. Dazu wurde neben dem Anti-pan-p38 Antikörper ein Anti- α -Tubulin-Antikörper verwendet, um eine Vergleichbarkeit der auf das SDS-Gel aufgetragenen Proteinmengen zu überprüfen. Wie in Abbildung 35 gezeigt, führt die Expression von DP4 und FAP in HEK-293-Zellen zu keiner Veränderung des p38-Proteinlevels. Die Menge an p38-Protein in den stimulierten U343-Zellen war so gering, dass erst bei deutlich längeren Belichtungszeiten eine Bande sichtbar wurde. Zu diesem Zeitpunkt war jedoch der Film durch die Banden des p38 in den HEK-293-Zellen überbelichtet und es wurde daher zur Darstellung der Film mit der kürzeren Belichtungszeit ausgewählt.

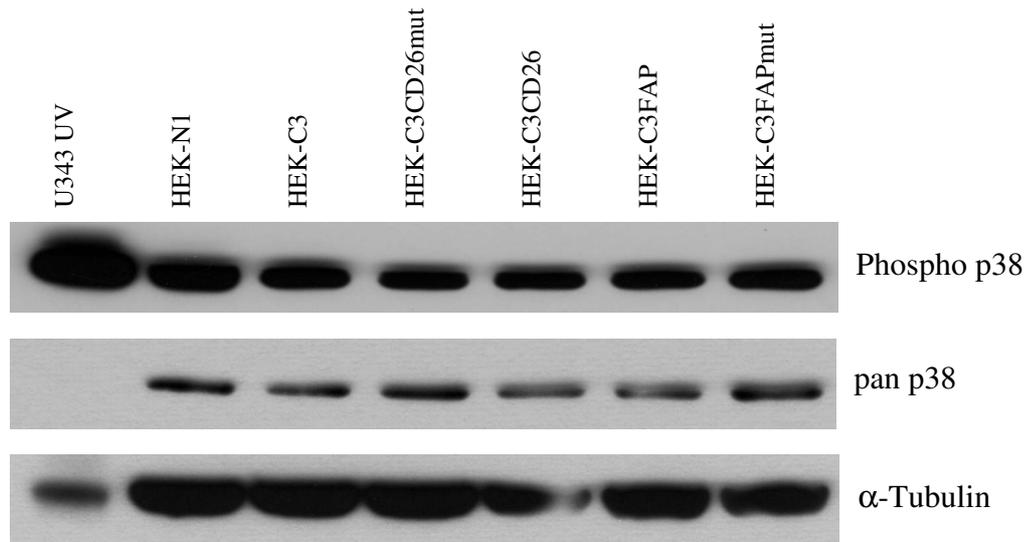


Abbildung 35: Westernblotanalyse des Phosphorylierungszustandes von p38 in den HEK-293-Klonen

1 Mio. U343 Zellen und Zellen der mit den Leervektoren N1 und C3, wildtyp DP4, mutierter DP4, wildtyp FAP oder mutiertem FAP transfizierten HEK-293-Klone wurden über Nacht kultiviert. Als Positiv-Kontrolle dienten für 10 min mit UV-Licht bestrahlte U343-Zellen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und lysiert, die zellulären Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion erfolgte mit Anti-Phospho-p38-Antikörper (Thr180/Tyr182) über Nacht gefolgt von Peroxidase-gekoppeltem Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper für 1 Stunde. Nach 5 Minuten Inkubation in „SuperSignal West Pico“ wurde der Film für 90 Minuten belichtet und anschließend von Hand entwickelt. Die Detektion der Kinase erfolgte mit Anti-pan-p38-Antikörper über Nacht, gefolgt von Peroxidase-gekoppeltem Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper für 1 Stunde. Nach 5 Minuten Inkubation in „SuperSignal West Pico“ wurde der Film für 20 Minuten belichtet und anschließend von Hand entwickelt. Zur Kontrolle erfolgte die Detektion des α -Tubulins in analoger Weise auf demselben Blot.

Als Drittes wurde der Signalweg untersucht, dessen Schlüsselenzym die Kinase JNK ist. Die JNK-Signaltransduktion wird vor allem durch Stress und pathogene Einflüsse aktiviert¹¹². Dabei tritt JNK via c-Jun-Phosphorylierung und Cytochrom-C-Freisetzung als Aktivator der Apoptose in Erscheinung^{133,134}.

Die Gewinnung und Auftrennung der Proteine sowie Detektion der JNK Kinase erfolgte in analoger Art und Weise wie oben beschrieben. Mit UV-Licht stimulierte U343-Zellen dienten als Positiv-Kontrolle.

Während bei den mit UV-Licht behandelten U343-Zellen eine deutliche Aktivierung der JNK-Kinase detektierbar war, konnte bei den HEK-293-Zellen nur eine sehr schwache basale Phosphorylierung beobachtet werden. Bei den mit FAP transfizierten Klonen war eine im Vergleich zu den Kontrolltransfektanten leichte Aktivierung nachweisbar (Abb. 36)

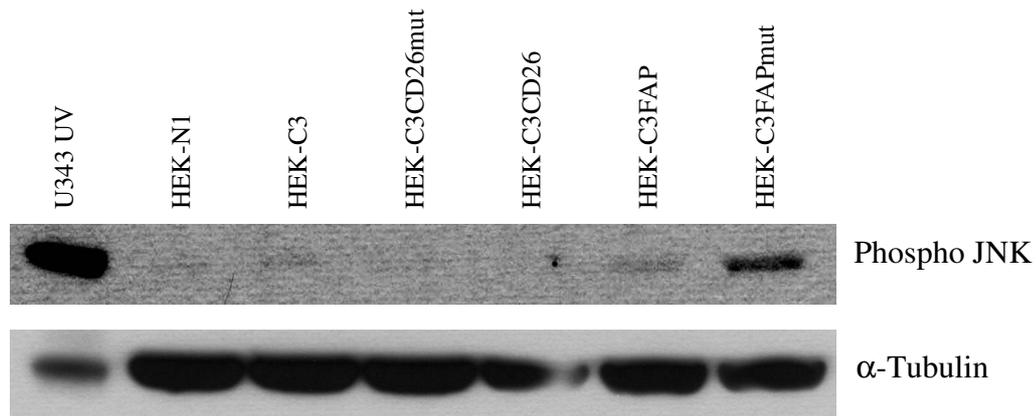


Abbildung 36: Westernblotanalyse des Phosphorylierungszustandes von JNK

1 Mio. U343 Zellen und Zellen der mit den Leervektoren N1 und C3, wildtyp DP4, mutierter DP4, wildtyp FAP oder mutiertem FAP transfizierten HEK-293-Klone wurden über Nacht kultiviert. Als Positiv-Kontrolle dienten für 10 min mit UV-Licht bestrahlte U343-Zellen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und lysiert, die zellulären Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion erfolgte mit Anti-Phospho-JNK-Antikörper (Thr183/Tyr185) über Nacht, gefolgt von Peroxidasegekoppeltem Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper für 1 Stunde. Nach 5 Minuten Inkubation in „SuperSignal West Pico“ wurde der Film für 90 Minuten belichtet und anschließend von Hand entwickelt.

Ein weiterer Signalweg ist die NF- κ B-Signalkaskade, welcher wie der JNK-Signalweg zu den durch äußeren Stress aktivierbaren Signaltransduktionswegen gehört. Daneben ist der NF- κ B-Transkriptionsfaktor in der Vermittlung und Reaktion auf Apoptose-Signalen involviert. Eine Funktion dieses Signalweges ist die Unterstützung des Zellüberlebens durch Induktion von Genen deren Produkte Komponenten des Apoptose-Weges inhibieren¹³⁵. Dabei spielt das Verhältnis zwischen NF- κ B- und JNK-Aktivierung eine wichtige Rolle¹³⁶. Eine Relevanz in der Tumorthherapie kommt NF- κ B durch die Vermittlung der Chemo- und Strahlungsresistenz der Tumorzellen zu^{137,138}. In einem kolorektal Tumor-Xenograft-Modell konnten Cusack *et al.* zeigen, dass durch Inhibierung der NF- κ B-Aktivierung die Chemosensitivität der Tumorzellen ansteigt¹³⁷.

Die Gewinnung und Auftrennung der Proteine sowie Detektion des NF- κ B-Transkriptionsfaktors erfolgte in analoger Art und Weise wie oben beschrieben. Mit TNF- α stimulierte U343-Zellen dienten als Positiv-Kontrolle.

Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt über zwei verschiedene Phosphorylierungsstellen, die auf der Primärstruktur weit auseinander liegen, und von unterschiedlichen Antikörpern erkannt werden. Die Expression der Varianten von DP4 und FAP zeigte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung des Serin 536 von NF- κ B im Vergleich zu den Kontrolltransfektanten. Während in der TNF- α -stimulierten Positiv-Kontrolle eine im Vergleich zu den HEK-293-Zellen deutliche Aktivierung von NF- κ B detektierbar war, konnte zwischen den verschiedenen HEK-293-Klonen kein Unterschied in der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors beobachtet werden.

Zusätzlich zur Untersuchung der Aktivierung wurde der Einfluss der Expression von DP4 und

FAP auf die Menge des NF- κ B-Proteins analysiert. Dazu kam neben dem Anti-pan-NF- κ B-Antikörper ein Anti- α -Tubulin-Antikörper zur Anwendung, um eine Vergleichbarkeit der auf das SDS-Gel aufgetragenen Proteinmengen zu überprüfen. Wie in Abbildung 37 ersichtlich, führte die Expression von DP4 und FAP in HEK-293-Zellen zu keiner Veränderung des NF- κ B- Proteinlevels.

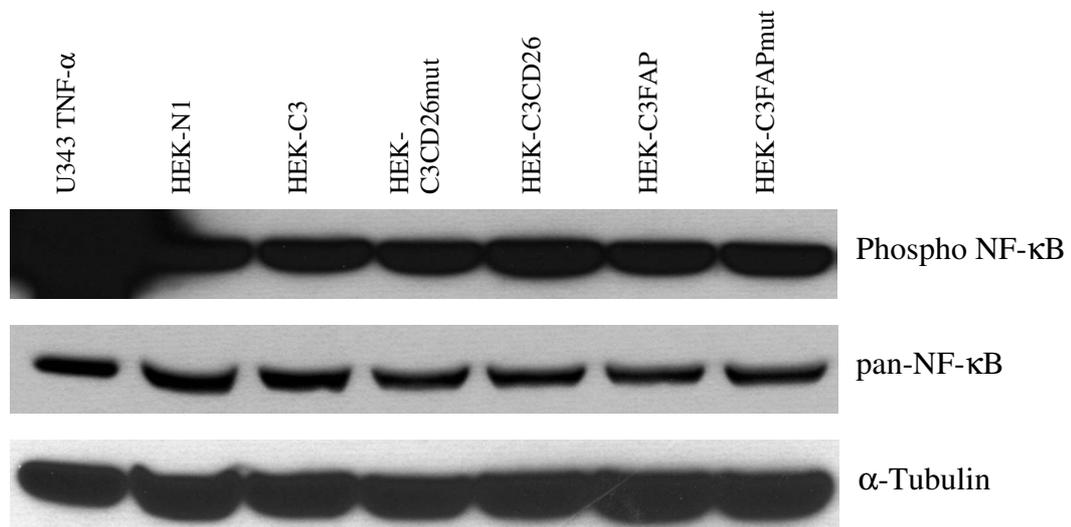


Abbildung 37: Westernblotanalyse des Phosphorylierungszustandes von NF- κ B in den HEK-293-Klonen

1 Mio. U343 Zellen und Zellen der mit den Leervektoren N1 und C3, wildtyp DP4, mutierter DP4, wildtyp FAP oder mutiertem FAP transfizierten HEK-293-Klone wurden über Nacht kultiviert. Als Positiv-Kontrolle dienten für 30 min mit TNF- α -stimulierte U343-Zellen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und lysiert, die zellulären Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion erfolgte mit Anti-Phospho-NF- κ B-Antikörper (Ser536) über Nacht, gefolgt von Peroxidase-gekoppeltem Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper für 1 Stunde. Nach 5 Minuten Inkubation in „SuperSignal West Pico“ wurde der Film für 90 Minuten belichtet und anschließend von Hand entwickelt. Die Detektion der Kinase erfolgte mit Anti-pan-NF- κ B-Antikörper über Nacht gefolgt von Peroxidase-gekoppeltem Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper für 1 Stunde. Nach 5 Minuten Inkubation in „SuperSignal West Pico“ wurde der Film für 10 Sekunden belichtet und anschließend von Hand entwickelt. Zur Kontrolle erfolgte die Detektion des α -Tubulins in analoger Weise auf demselben Blot.

Die Westernblot Analysen wurden jeweils zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt und ein ausgewählter Blot dargestellt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich hinsichtlich der Variation der Aktivierung unterschiedlicher Signalwege ein heterogenes Bild ergibt. Während beim NF- κ B und p38 Signalweg keine durch DP4- und FAP-Expression induzierte Veränderung der Aktivierung zu beobachten war, konnte ein Einfluss der Überexpression auf die ERK1/2 Phosphorylierung nachgewiesen werden.

4.6.2. Einfluss der Überexpression von DP4- und FAP-Varianten auf die differentielle Genexpression

In der Literatur wurde eine Vielzahl von Genen beschrieben, deren Expression in Tumorzellen gegenüber normalen Körperzellen variiert ist und denen deshalb eine Bedeutung bei der Tumorentwicklung zugeordnet wird¹³⁹⁻¹⁴¹. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Veränderung der Expression verschiedener Proteine zu einer Regulation weiterer Gene führt und damit die Tumorigenität beeinflusst werden kann¹⁴²⁻¹⁴⁴. Wie in den vorangegangenen Untersuchungen gezeigt, beeinflusst die Überexpression von DP4 und FAP die Eigenschaften der transfizierten Tumorzellen. Um einen Einblick in die Mechanismen hinter den durch die Expression von DP4- und FAP-Varianten hervorgerufenen modifizierten Zelleigenschaften zu bekommen, wurde die differentielle Expression verschiedener Gene mittels Quantitativer-PCR untersucht und durch Westernblot Analysen bzw. durchflusszytometrischer Messungen verifiziert. In Tabelle 11 sind die Gene zusammengestellt, deren Expression durch Q-PCR untersucht wurde, aber keine signifikante Veränderung der mRNA-Level nach DP4- und FAP-Überexpression festgestellt wurde.

<i>Protein</i>	<i>Name</i>	<i>Gen</i>	<i>Funktion</i>
CXCR1	interleukin-8 receptor A	NM_000634.2	Chemokin-Rezeptor
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4	NM_003467.2	Chemokin-Rezeptor ¹⁴¹
CCL2	monocyte chemotactic protein-1	NM_002982.3	Chemokin
IL1 β	Interleukin 1 beta	NM_000576.2	Chemokin
CXCL1	growth regulated oncogen- α	NM_001511.1	Chemokin
CXCL8	Interleukin 8	NM_000584.2	Chemokin
CXCL10	Interferon-inducible protein-10	NM_001565.1	Chemokin
TGF β	Transforming growth factor beta	NM_000660.3	Wachstumsfaktor
CTGF	Connective tissue growth factor	NM_003881.2	Wachstumsfaktor
CD63	Melanoma-associated antigen	NM_001780.4	Tumorprogression, Wachstumsregulation
PLOD	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase	NM_000302.2	ECM modifizierendes Enzym
LOXL2	Lysyl oxidase-like protein 2	NM_002318.2	ECM modifizierendes Enzym
MMP1	Matrixmetalloprotease 1	NM_002421.2	Kollagenase
MMP2	Matrixmetalloprotease 2	NM_004530.2	Kollagenase, Spaltet KiSS1
MMP3	Matrixmetalloprotease 3	NM_002422.3	Abbau von ECM-Proteinen, Aktivierung von Prokollagenasen
MMP9	Matrixmetalloprotease 9	NM_004994.2	Kollagenase, spaltet KiSS1
MMP13	Matrixmetalloprotease 13	NM_002427.2	Kollagenase
TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteinases	NM_003254.2	Matrixmetalloprotease-Inhibitor ¹³⁹
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1	NM_000389.2	Inhibiert cyclinabhängige Kinasen

<i>Protein</i>	<i>Name</i>	<i>Gen</i>	<i>Funktion</i>
Col1A1	Collagen alpha-1(I) chain	NM_000088.2	ECM-Bestandteil
Wnt5a		NM_003392.3	Ligand des Frizzled-Rezeptors, ECM assoziiert
CD29	Integrin β 1	NM_002211.2	Untereinheit des Fibronektinrezeptors
CD49e	Integrin α 5	NM_002205.2	Untereinheit des Fibronektinrezeptors
CTNNA1	Alpha-Catenin	NM_001903.2	Zytoskelettbestandteil, E-Cadherin assoziiert
CTNNB1	Beta-Catenin	NM_001904.2	Zytoskelettbestandteil, E-Cadherin assoziiert
CTNND1	Delta-Catenin	NM_001331.1	Zytoskelettbestandteil, E-Cadherin assoziiert
Plakoglobin	Desmoplakin-3	NM_002230.1	Zytoskelettbestandteil, Zell-Zell-Kontaktprotein ¹⁴⁵
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	NM_000201.1	Zell-Zell-Kontaktprotein
N-Cadherin	Neural-cadherin	NM_001792.2	Zell-Zell-Kontaktprotein
Ep-CAM	Epithelial cell adhesion molecule	NM_002354.1	Zell-Zell-Kontaktprotein
DDR1	Epithelial discoidin domain receptor 1	NM_001954.3	Zell-Zell-Interaktion, Erkennung
CNTN6	Contactin-6	NM_014461.2	Zell-Oberflächen-Interaktion
CD13	Aminopeptidase N	NM_001150.1	Protease
HOXA 10	homeo box A10	NM_018951.3	Transkriptionsfaktor
c-myc	Myc proto-oncogene protein	V00568.1	Transkriptionsfaktor
CD248	Endosialin	NM_020404.2	Tumormarker, Angionese
Vimentin		NM_003380.2	Tumormarker, Intermediärfilament
CD44	Phagocytic glycoprotein I	NM_000610.3	Rezeptor für Hyaluronsäure, Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktion
CD82	Suppressor of tumorigenicity-6	NM_002231.3	
ATX	Autotaxin	NM_006209.3	Tumorzell-Motilität
ORM1	Alpha-1-acid glycoprotein 1	NM_000607.1	Immunmodulation
bcl2	Apoptosis regulator Bcl-2	NM_000633.2	Apoptose-Suppression
bax	BCL2-associated X protein	NM_004324.3	Anatgonis von bcl2
HLCC86	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha	Z34817.1	

Tabelle 11: Liste der Gene deren differentielle Expression mittels quantitativer PCR untersucht wurde und die keine Veränderung nach DP4- und FAP-Überexpression zeigten.

Im nachfolgenden Abschnitt werden die Ergebnisse präsentiert, die eine durch die DP4- und FAP-Überexpression hervorgerufene Veränderung der Expression weiterer Gene zeigen.

Das transmembrane Protein E-Cadherin ist ein homophiles Zelladhäsionsmolekül, welches im Adhäsionsgürtel vorkommt und die Zell-Zell-Adhäsion von Epithelzellen vermittelt. Dazu

bildet E-Cadherin über seine cytoplasmatische Domäne einen Komplex mit α -, β - und γ -Cateninen. Dieser Komplex verbindet Cadherin mit dem Actinfilament-Netzwerk und weiteren cytoplasmatischen und transmembranen Proteinen¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. In verschiedenen Publikationen konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der E-Cadherin-Menge und damit des Cadherin-Catenin-Komplexes die Tumorprogression besonders die Invasivität und Metastasierung begünstigt¹⁴⁸⁻¹⁵¹. In der Literatur konnte bisher ein positiver Zusammenhang zwischen DP4-Expression in Tumorzellen und der Menge an E-Cadherin in den Zellen hergestellt werden^{152,153}.

Für die Untersuchung des Einflusses der DP4- und FAP-Transfektion auf die E-Cadherin-Expression wurde aus Zellen der verschiedenen stabil transfizierten Zelllinien die Gesamt-RNA gewonnen und in einer *reverse transcriptase*-PCR in cDNA umgeschrieben. In dem nachfolgenden Schritt wurde in der Quantitativen-PCR mittels spezifischer Primer Kopien der E-Cadherin-cDNA erzeugt. Die Entstehung der Kopien konnte durch Messung der Fluoreszenz des in die DNA interkalierenden Farbstoffes Sybergreen in Echtzeit verfolgt werden. Analog dazu wurde die mRNA-Menge von drei unterschiedlichen Haushaltsgenen bestimmt. Durch Vergleich der ermittelten mRNA-Menge der Haushaltsgene mit der mRNA-Menge des E-Cadherin wird dessen relativer Gehalt ermittelt.

Wie in Abbildung 38 dargestellt, konnte in den Zellen, welche die DP4- und FAP-Varianten exprimieren, eine deutliche Erhöhung der E-Cadherin-mRNA gegenüber den mit Leervektor transfizierten Zellen beobachtet werden.

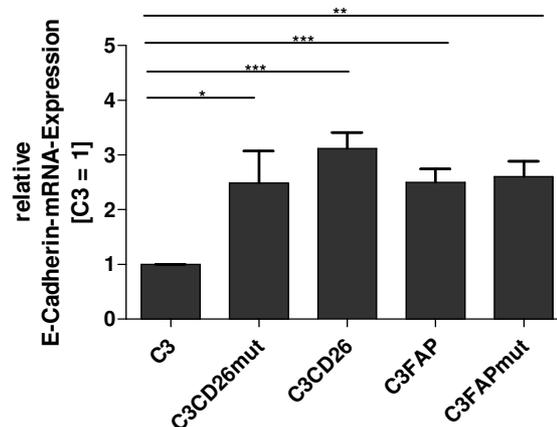


Abbildung 38: Die E-Cadherin-mRNA Levels werden unabhängig von der enzymatischen Aktivität bei DP4- und FAP-Überexpression erhöht

Aus Zellen der mit dem Leervektor C3, wildtyp DP4, mutierter DP4, wildtyp FAP oder mutiertem FAP transfizierten HEK-293-Klone wurde die Gesamt-RNA gewonnen und nach Transkription in cDNA mit spezifischen Primern die Menge an E-Cadherin-mRNA in einer quantitativen PCR bestimmt. Dargestellt ist die E-Cadherin mRNA-Menge im Verhältnis zum C3-Vektor transfizierten Kontrollklon. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert \pm SD mit GraphPad Prism 4.0. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n=5$ ungepaarter Students T-Test

Die Ergebnisse der Quantitativen-PCR-Analyse deuten eine geringfügig gesteigerte Aktivierung der E-Cadherin-Expression in den mit der aktiven Enzymvariante der DP4 transfizierten HEK-293-Zellen an. Um diesen Einfluss der Enzymaktivität auf die E-Cadherin-Expression zu überprüfen, wurden die wildtyp DP4- und wildtyp FAP-exprimierenden Zellen in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitoren kultiviert. Anschließend erfolgte eine Analyse der E-Cadherin-Expression wie oben beschrieben mittels Quantitativer-PCR und Westernblot. Wie in Abbildung 39 zu erkennen, konnte mit den unterschiedlichen Inhibitoren keine Veränderung in der Menge der E-Cadherin-mRNA hervorgerufen werden.

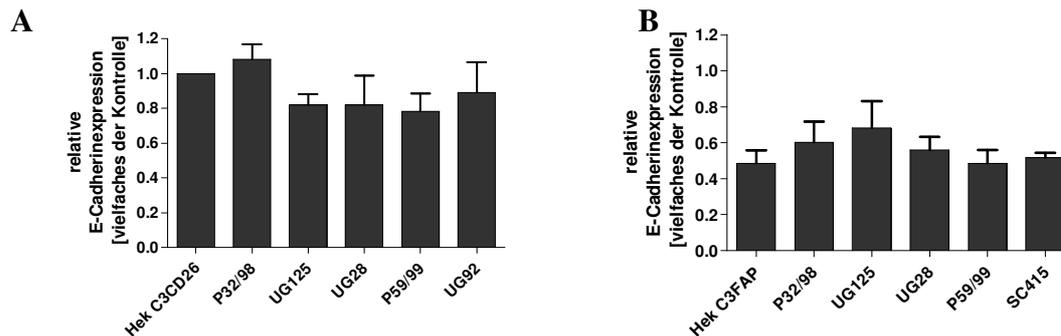


Abbildung 39: DP4-Inhibitoren zeigen keinen Einfluss auf den E-Cadherin-mRNA-Level

Zellen der mit wildtyp DP4 transfizierten HEK-293-Klone (**A**) wurden 2 Tage in Gegenwart von 100 μ M P32/98, 10 μ M UG125, 1 μ M UG28, 10 μ M P59/99 und 100 nM UG92 kultiviert. Zellen der mit wildtyp FAP transfizierten HEK-293-Klone (**B**) wurden 2 Tage in Gegenwart von 100 μ M P32/98, 10 μ M UG125, 1 μ M UG28, 10 μ M P59/99 und 10 μ M SC415 kultiviert. Anschließend wurde mit spezifischen Primern die Menge an E-Cadherin-mRNA in einer quantitativen PCR bestimmt. Dargestellt ist die E-Cadherin-mRNA-Menge im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle.

Um die Ergebnisse der PCR Analyse bezüglich des Einflusses unterschiedlicher Inhibitoren auf die E-Cadherin Expression mittels Westernblot zu bestätigen, wurden die Zellen des aktive DP4-überexprimierenden HEK-293-Klons für 2 Tage mit P32/98, UG125, UG28, P59/99 und UG92 inkubiert. Anschließend wurde das Gesamtprotein gewonnen, mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion des E-Cadherins erfolgte mit einem Maus-Anti-human-E-Cadherin-Antikörper, einem sekundären Peroxidase-gekoppelten Ziege-Anti-Maus-Antikörper und der Belichtung eines Röntgenfilms durch Lumineszenz. Im Westernblot (Abb. 40) konnte analog zur Q-PCR keine Veränderung der E-Cadherin-Expression durch Inhibitorgabe zu aktive DP4-überexprimierenden HEK-293-Zellen festgestellt werden.

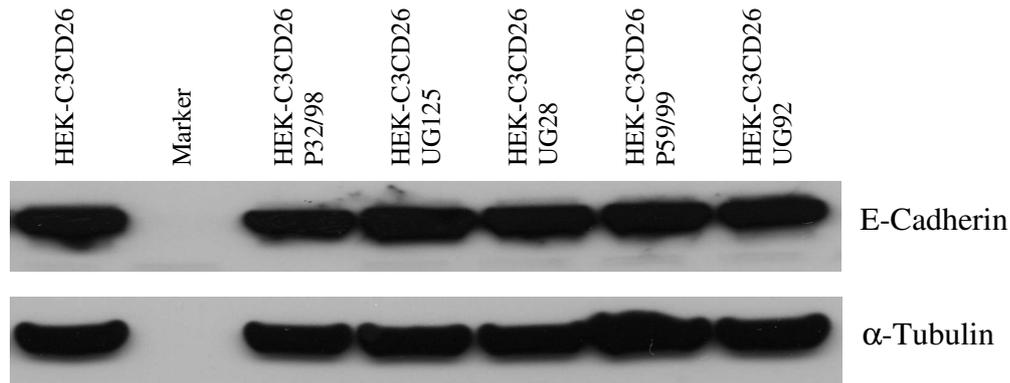


Abbildung 40: Westernblotanalyse der Proteinmenge von E-Cadherin

1 Mio. Zellen der mit wildtyp DP4 transfizierten HEK-293-Klone wurden über Nacht in Gegenwart von 100 μ M P32/98, 10 μ M UG125, 1 μ M UG28, 10 μ M P59/99 und 100 nM UG92 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und lysiert, die zellulären Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion erfolgte mit Anti-E-Cadherin-Antikörper über Nacht, gefolgt von Peroxidase-gekoppeltem Ziege-Anti-Maus-Antikörper für 1 Stunde. Nach 5 Minuten Inkubation in „SuperSignal West Pico“ wurde der Film für 30 Minuten belichtet und anschließend von Hand entwickelt. Zur Kontrolle erfolgte die Detektion des α -Tubulins in analoger Weise auf demselben Blot.

Neben der Vermittlung der Interaktion des membranständigen E-Cadherins mit dem zytoplasmatischen Aktinfilament-Netzwerk wird dem β -Catenin eine weitere Funktion als Signalmolekül zugeordnet. Durch eine Reduktion der E-Cadherin-Expression während der Tumorentwicklung bindet β -Catenin auf Grund des fehlenden Interaktionspartners in der Zellmembran verstärkt an einen zytosolischen Komplex. Dieser besteht aus Axin, Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) und Adenomatous Polyposis Coli (APC) und phosphoryliert das zytosolische Catenin, markiert es dadurch für die Ubiquitinierung und somit für den Abbau im Proteasom. Die Fähigkeit dieses Komplexes den β -Catenin-Abbau zu steuern, wird durch den Wnt-Signalweg reguliert. Die Bindung von Wnt an den *Frizzled*-Rezeptor aktiviert die Signalkaskade, an dessen Ende das Protein *Dishevel* den β -Catenin-Umsatz durch Inhibierung der GSK3 unterdrückt. Daraus resultiert eine Akkumulation des β -Catenins im Zytosol und Zellkern. Es komplexiert mit Transkriptionsfaktoren der TCF-Familie und aktiviert die entsprechenden Zielgene zum Beispiel das Protoonkogen *c-myc*^{148,154}. Durch eine Immunfluoreszenzfärbung sollte untersucht werden, welchen Einfluss die durch DP4- und FAP-Überexpression gesteigerte E-Cadherin-Menge auf die Verteilung des β -Catenins in den Zellen der HEK-293-Klone hat. Dazu wurden die Zellen der HEK-293-Klone über Nacht auf Deckgläschen kultiviert. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit einem Maus-Anti-human- β -Catenin-Antikörper und einem Rhodamin-gekoppelten Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper angefärbt. Für die Kernfärbung, wurden die Zellen mit DAPI behandelt. Die Zellen wurden nach Einbettung der Deckgläschen in Glycerin und Fixierung auf dem Objektträger in einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet sowie fotografiert und anschließend wurden die Aufnahmen elektronisch überlagert.

Wie in Abbildung 41 gezeigt, ist in den DP4- und FAP- exprimierenden Klonen eine Anreicherung des β -Catenins im Bereich der Zellmembranen zu beobachten. Besonders deutlich wurde dieser Effekt in den DP4-exprimierenden Klonen (Abb. 41B, 41C). Im Bereich der Zellkerne war dagegen kein β -Catenin nachweisbar.

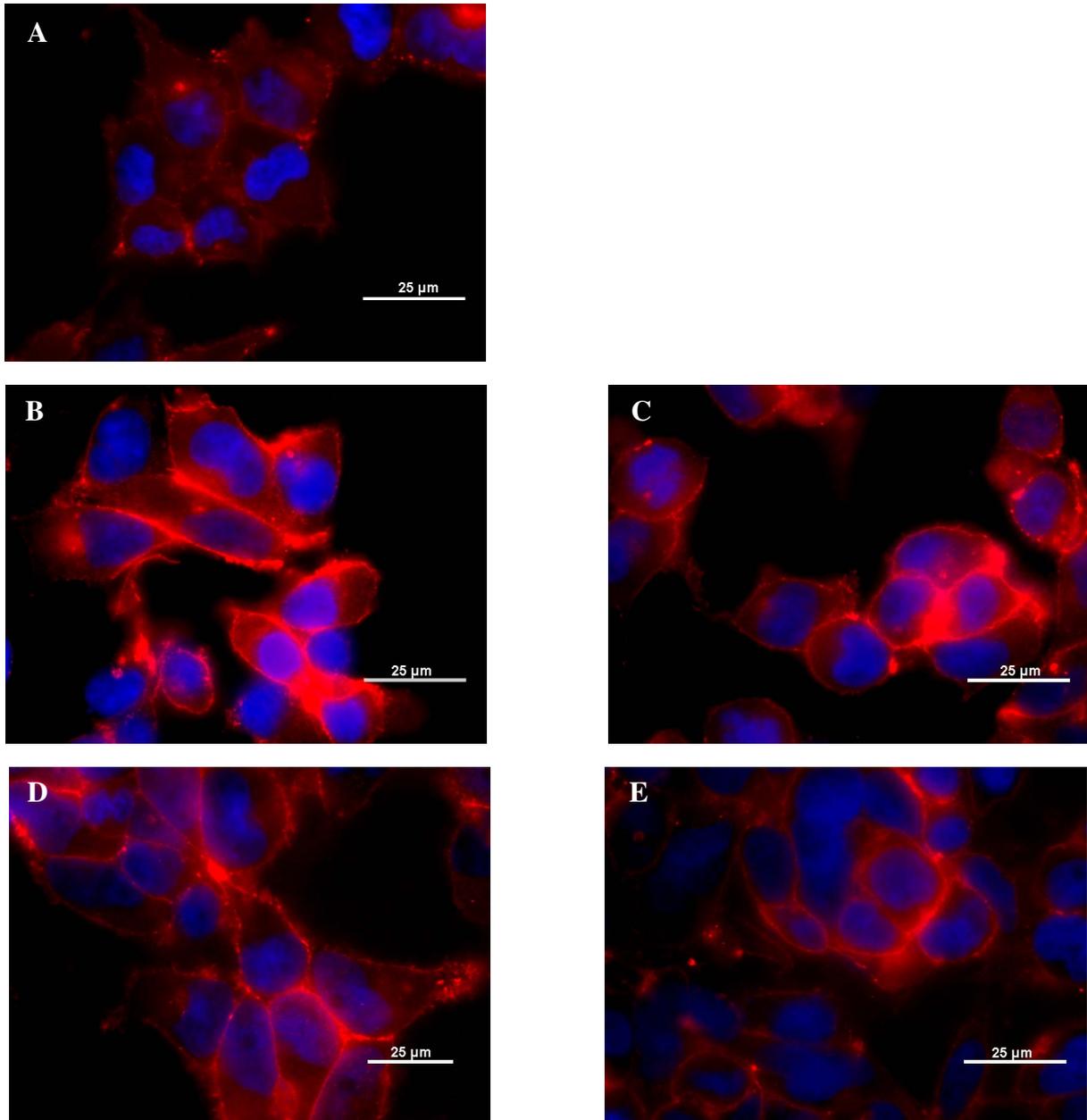


Abbildung 41: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HEK-293-Klonen

1 Mio. Zellen der mit Vektor (A), wildtyp DP4 (B), mutierter DP4 (C), wildtyp FAP (D) oder mutiertem FAP (E) transfizierte HEK-293-Klone wurden über Nacht in 35 mm Kulturschalen auf Deckgläschen kultiviert. Nach dem Waschen und der Fixierung mit 4 % (w/v) PFA in PBS wurden die Fluoreszenzen der Zellen bei 1000-facher Vergrößerung mit Hilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskops und einer Mikroskopkamera dokumentiert. Die Überlagerung der Aufnahmen der β -Catenin-Färbung und der DAPI-Fluoreszenz erfolgte mit Hilfe von Adobe Photoshop LE.

Es konnte für HEK-293-Zellen gezeigt werden, dass die Transfektion mit DP4 zu einer verstärkten Zell-Zell-Interaktion führt und dass in diesen Zellen die Expression von

E-Cadherin, einem homophilen Zelladhäsionsmolekül, gegenüber den Leervektor transfizierten Zellen erhöht ist. Für natürlicherweise DP4-exprimierende Tumorzellen konnte ebenfalls eine im Vergleich zu nicht DP4-exprimierenden Zellen gesteigerte Zell-Zell-Interaktion gezeigt werden. Aus diesem Grund sollte in den Tumorzelllinien ebenfalls die E-Cadherin-Menge mittels Westernblot bestimmt werden.

Da für den Maus-Anti-human-E-Cadherin-Antikörper eine Kreuzreaktivität mit E-Cadherin aus Ratte beschrieben ist, sollte das Protein ebenfalls in der Rattenzelllinie detektiert werden können.

Wie in Abbildung 42 gezeigt, korreliert die natürlich vorhandene DP4-Expression in den ausgewählten Tumorzelllinien mit einer stark erhöhten Menge E-Cadherin in den DP4-positiven Zellen im Vergleich zu den nicht DP4-exprimierenden Tumorzelllinien

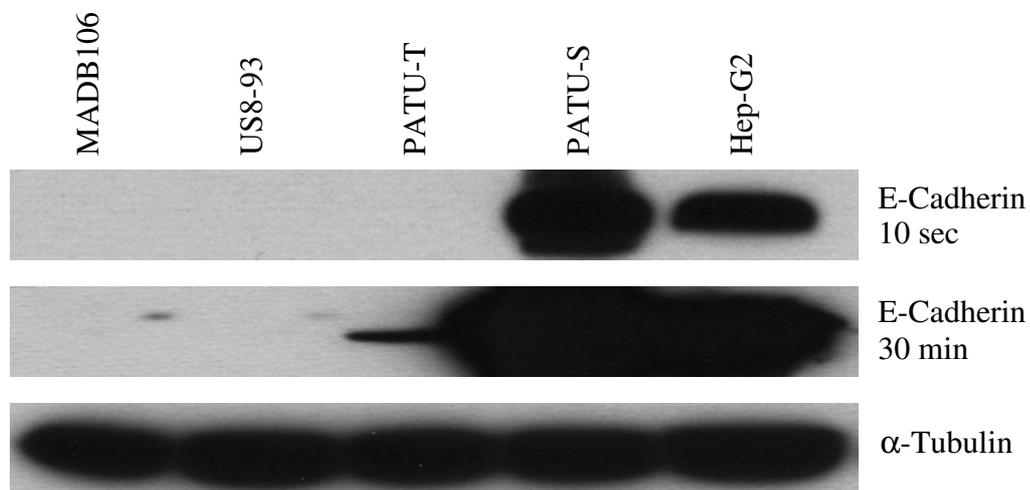


Abbildung 42: Westernblotanalyse der Proteinmenge von E-Cadherin in Tumorzellen

1 Mio. Zellen der Tumorzelllinien MADB106, US8-93, PA-TU-8988T, PA-TU-8988S und Hep-G2 wurden über Nacht kultiviert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und lysiert, die zellulären Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion erfolgte mit Anti-E-Cadherin-Antikörper über Nacht, gefolgt von Peroxidase-gekoppeltem Ziege-Anti-Maus-Antikörper für 1 Stunde. Nach 5 Minuten Inkubation in „SuperSignal West Pico“ wurde der Film für 10 Sekunden bzw. 30 Minuten belichtet und anschließend von Hand entwickelt. Zur Kontrolle erfolgte die Detektion des α -Tubulins in analoger Weise auf demselben Blot.

Sowohl in den Tumorzelllinien als auch in transfizierten HEK-293-Zellen korreliert die DP4-Expression mit einer erhöhten E-Cadherin-Expression. Ebenso ist eine gesteigerte E-Cadherin-Expression in FAP-exprimierenden HEK-293-Klonen nachzuweisen. Ein Einfluss auf den Anstieg der Menge an E-Cadherin-mRNA als auch Protein in HEK-293-Zellen in Abhängigkeit von der enzymatischen Aktivität der DP4 und des FAP konnte nicht belegt werden.

4.6.3. Einfluss von DP4 und FAP auf die Expression von Oberflächenantigenen

Neben der quantitativen PCR diente die Untersuchung der HEK-293-Klone mittels Durchflusszytometrie zur Bestimmung des Einflusses der Überexpression von DP4 und FAP auf die Expression von CCR2, CD10, CD13, CD29, CD44 und EpCAM auf der Zelloberfläche.

CD10 ist eine 90 - 110 kDa Zelloberflächen-ständige Zink-Metalloprotease, welches auch Neutrale Endopeptidas (NEP, EC 3.4.24.11), Enkephalinase oder Neprilysin genannt wird. Das Enzym wird auf einer Vielzahl von normalen und neoplastischen Geweben exprimiert. Die Bedeutung dieser Protease hinsichtlich seiner Funktion in der Tumorentwicklung wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einerseits wurden der NEP Tumor-suppressive Eigenschaften in Ovarialkarzinom-Zellen¹⁵⁵ und in Prostata Krebs¹⁵⁶ zugeschrieben. Andererseits ist die Expression der NEP mit der Progression von malignen Melanomen assoziiert. So konnten Bialovic *et al.* bei der Untersuchung von 70 Biopsien von primären und metastasierenden malignen Melanomen zeigen, dass die CD10-Expression in den metastasierenden Tumoren signifikant gegenüber den primären Tumoren erhöht ist¹⁵⁷. Sowohl bei den Vektor- als auch DP4- und FAP-transfizierten Zellen konnte mit dem CD10-spezifischen Antikörper keine im Vergleich zur Isotypkontrolle erhöhte Fluoreszenz detektiert werden. Die beobachteten Unterschiede in der NEP-Menge auf der Zelloberfläche liegen innerhalb der Schwankungsbreite der Messwerte (Tab. 12).

Dem transmembranen Metalloenzym Aminopeptidase N (APN/CD13, EC 3.4.11.2) wurde in der Literatur eine funktionelle Rolle in der Tumorigenese zugewiesen. Das Enzym wird als Marker für den Grad der Dedifferenzierung beschrieben, welches unter anderem die Motilität von thyroiden Karzinomzellen steigert und Einfluss auf die Expression von Proteinen des Tetraspanin Netzes nimmt¹⁵⁸. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CD13 ein wichtiger positiver Regulator der Angiogenese ist^{159,160}. Wie in Tabelle 12 zu erkennen, ist die CD13-Expression in den mit inaktiver ($p < 0,01$; $n = 4$) und wildtyp ($p < 0,001$; $n = 4$) DP4-transfizierten Zellen gegenüber den Vektor-transfizierten Zellen signifikant reduziert. Die Überexpression der FAP-Varianten führte zu keiner Veränderung in der Menge an CD13 auf der Zelloberfläche.

Der Rezeptor CCR2 ist Bindungspartner für verschiedene Chemokine der CC-Chemokinfamilie wie zum Beispiel CCL2, CCL7, CCL8 und CCL13. Neben seiner Bedeutung für die Chemotaxis von Monozyten konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass der Rezeptor ebenfalls Einfluss auf die Metastasierung und Tumorprogression von humanen Brustkarzinomzellen hat¹⁶¹. Bei der Bestimmung der CCR2-Oberflächenexpression konnten keine Unterschiede zwischen den Vektor-transfizierten Zellen und den DP4- und FAP-exprimierenden HEK-293-Klonen beobachtet werden.

Bei CD29 handelt es sich um die $\beta 1$ -Untereinheit des Fibronektinrezeptors aus der Familie der Integrine. Wie Tabelle 12 zu entnehmen ist die CD29-Expression in den mit wildtyp

($p < 0,01$; $n = 4$) und inaktives FAP ($p < 0,05$; $n = 4$) transfizierten Zellen gegenüber den Vektor-transfizierten Zellen signifikant erhöht. Dagegen ist die Menge des an der Oberfläche detektierbaren CD29 in den wildtyp DP4 und mutierte DP4 exprimierenden Zellen nicht signifikant verändert.

CD44 ist als Zelladhäsionsmolekül an Zell-Zell- als auch an Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt. Die Oberflächenexpression von CD44 ist sowohl in den wildtyp ($p < 0,001$; $n = 4$) und mutierte DP4 ($p < 0,05$; $n=4$) als auch in den wildtyp ($p < 0,001$; $n = 4$) und mutiertes FAP ($p < 0,05$; $n = 4$) exprimierenden Klonen gegenüber der Vektorkontrolle erhöht (Tabelle 12)

EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) ist ein epitheliales Differenzierungsantigen, welches in unterschiedlicher Ausprägung auf zahlreichen Karzinomen exprimiert wird. Es ist eng mit dem Cadherin-Catenin-Komplex und dem WNT-Signalweg verbunden und so mit der intrazellulären Kommunikation und der Zellpolarisierung assoziiert. Ein signifikanter Einfluss der DP4- und FAP-Expression auf die Menge an EpCAM war an Hand transfizierten HEK-293-Zellen nicht nachweisbar.

HEK-	CCR2		CD10		CD13		CD29		CD44		EpCAM	
	∅	SD	∅	SD	∅	SD	∅	SD	∅	SD	∅	SD
N1	15,36	4,98	3,75	0,63	19,49	8,75	372,84	3,38	672,53	129,70	5,79	2,51
C3	13,77	4,11	2,01	2,02	20,38	0,50	348,07	23,50	653,55	118,19	9,45	8,93
C3 CD26	11,74	1,45	2,03	1,19	11,57	1,81	340,92	54,44	951,56	78,23	11,89	4,02
C3 CD26mut	10,05	2,70	2,19	1,49	13,52	3,51	385,74	45,92	823,93	173,10	7,78	6,70
C3 FAP	15,20	3,22	0,10	1,91	19,58	7,50	483,07	42,51	972,39	92,41	6,23	2,23
C3 FAPmut	16,02	5,05	1,94	3,47	17,45	6,46	485,83	43,92	1079,82	172,14	9,98	6,68

 signifikant erhöhte Fluoreszenz
 signifikant reduzierte Fluoreszenz

Tabelle 12: Quantifizierung der Expression ausgewählter Proteine auf der Zelloberfläche transformierter HEK-293-Zellen

Zellen der HEK-293-Klone wurden mit der Isotypkontrolle und spezifischen Fluoreszenz-markierten Antikörpern gerichtet gegen CCR2, CD10, CD13, CD29 CD44 und EpCAM gefärbt und im Durchflusszytometer (FACSCalibur) analysiert. Dargestellt ist der Median der Fluoreszenzintensität als Mittelwert \pm SD. Die Werte von jeder entsprechenden Isotypfärbung wurden subtrahiert. \emptyset = Mittelwert, $n=4$, Als signifikant unterschiedlich gelten Wert, die im Students T-Test mit $p < 0,05$ übereinstimmen.

Wie in vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, führt die Expression von DP4 und FAP in transformierten HEK-293-Zellen zu einer Veränderung der Zellmorphologie im Vergleich zu den mit Leervektor-transfizierten Zellen. Mit Tumorzelllinien, die endogene DP4 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, konnten diese Beobachtungen, die mit den transformierten HEK-293-Zellen gemacht wurde, bestätigt werden. Aus diesem Grund sollte auch hier die Oberflächenexpression ausgewählter Proteine mittels Durchflusszytometrie ermittelt werden.

	CD13		CD29		CD44		EpCAM	
	Ø	SD	Ø	SD	Ø	SD	Ø	SD
MADB106	0,69	1,37	1,10	1,95	0,87	1,79	6,77	1,86
8/93	8255,02	1443,51	459,25	87,60	2033,96	515,80	8,72	0,61
PATU-T	0,00	1,57	608,03	194,38	1205,85	340,67	74,55	15,30
PATU-S (DP4+)	1,66	2,14	709,28	52,32	1417,07	247,04	9904,73	n.b.
HepG2 (DP4+)	802,04	187,90	314,64	62,22	0,00	3,19	1857,39	440,95

Tabelle 13: Quantifizierung der Expression ausgewählter Proteine auf der Zelloberfläche von Tumorzellen

MADB106, US8-93, PA-TU-8988T, PA-TU-8988S und HepG2-Zellen wurden mit der Isotypkontrolle und spezifischen Fluoreszenz-markierten Antikörpern gerichtet gegen CD13, CD29, CD44 und EpCAM gefärbt und im Durchflusszytometer (FACSCalibur) analysiert. Dargestellt ist der Median der Fluoreszenzintensität als Mittelwert \pm SD. Die Werte von jeder entsprechenden Isotypfärbung wurden subtrahiert. Ø = Mittelwert, n=3, n.b. = nicht bestimmbar (Messwert überstieg den Messbereich)

Es zeigte sich in allen untersuchten Zelllinien, dass sowohl in den HEK-293-Klonen als auch in den Tumorzellen die DP4-Expression mit einer hohen E-Cadherin-Expression einhergeht. Ergänzend dazu konnte gezeigt werden, dass ebenfalls die Überexpression von FAP in HEK-293-Zellen mit einer Erhöhung der E-Cadherin-Expression verbunden ist. Die Aktivierung der E-Cadherin-Expression durch DP4 und FAP erfolgte unabhängig von deren enzymatischen Aktivität. Ebenso konnte beobachtet werden, dass die CD44-Expression in den DP4- und FAP-exprimierenden HEK-293-Klonen unabhängig von der enzymatischen Aktivität erhöht war. Ein analoger die CD13-Expression reduzierender Einfluss der DP4 konnte in den FAP-exprimierenden HEK-293-Klonen nicht gemessen werden. Dagegen zeigte sich eine erhöhte CD29-Oberflächenexpression in den FAP-exprimierenden HEK-293-Klonen. Die neben E-Cadherin hinsichtlich ihrer Expression untersuchten Zelloberflächen-Proteine reagierten in den verschiedenen untersuchten Tumorklonen unterschiedlich auf eine veränderte DP4-Expression. Eine Verallgemeinerung ist auf Grund der Zelllinien-spezifischen Reaktion nicht möglich. So ist zum Beispiel die Oberflächenexpression des CD44 in den DP4-exprimierenden HEK-293 erhöht, in den ebenfalls DP4-positiven PA-TU-8988S ist ein im Vergleich zu den PA-TU-8988T analoger Effekt nicht zu beobachten.

4.6.4. Einfluss der Expression von DP4 und FAP auf Apoptose und Zellzyklus

In der Literatur wurde ein Zusammenhang zwischen den Aktivitäten von JNK sowie NF- κ B und der Apoptoseinduktion hergestellt. Die Untersuchungen des Phosphorylierungszustandes des Transkriptionsfaktors NF- κ B und der Kinase JNK zeigten keine Unterschiede in der Aktivierung von NF- κ B in den unterschiedlichen HEK-293-Klonen, wohingegen bei JNK in den FAP-exprimierenden Klonen eine schwache Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte (Abb. 37, 36). Dies könnte auf einen Einfluss der FAP-Expression auf die Aktivierung der Apoptose hinweisen. In weiteren Versuchen sollte deshalb die Wirkung der FAP-Expression auf die Apoptose und den Zellzyklus detaillierter untersucht werden.

Eine definierte Anzahl an transfizierten HEK-293-Zellen wurde kultiviert und im Anschluss

daran die Aktivität der Effektor-Caspasen-3 und -7 mittels spezifischer fluorogener Substrate, sowie die Position der Zellen im Zellzyklus nach DNA-Färbung durch durchflusszytometrische Messungen bestimmt.

Während die Aktivität der Caspasen-3 und -7 in den Zellen der DP4-exprimierenden Klone gegenüber den Zellen der Kontrolltransfektanten keinen Unterschied zeigte, war dagegen in den FAP-exprimierenden HEK-293-Klonen eine signifikant gesteigerte Aktivität zu beobachten (Abb. 43).

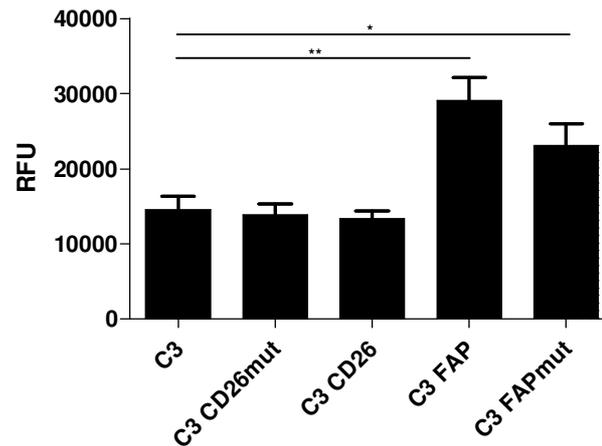


Abbildung 43: FAP-transfizierte Klone zeigen eine erhöhte Caspase-3/7-Aktivität

50.000 Zellen der mit dem Leervektor C3, wildtyp DP4, mutierter DP4, wildtyp FAP oder mutiertem FAP transfizierten HEK-293-Klone wurden in eine Mikrotiterplatte ausgesät. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen lysiert und die Freisetzung des Fluorophors aus dem Caspase-3/7- spezifischen Substrat verfolgt. Die Leervektor-transfizierten Zellen dienten als Kontrolle. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert \pm SD mit GraphPad Prism 4.0. * $p < 0,05$; $n=6$, ** $p < 0,01$; $n=6$ ungepaarter Students T-Test

Neben der Induktion der Apoptose wurde ebenfalls der Einfluss der DP4- und FAP-Expression auf den Zellzyklus untersucht.

Mittels durchflusszytometrischer Messungen konnte bei den FAP-exprimierenden HEK-293-Klonen eine Verringerung des Anteils an Zellen in der S-Phase und eine Anreicherung in der G0/G1-Phase beobachtet werden. Bei den DP4-exprimierenden Klonen war dagegen kein Unterschied in der Verteilung der Zellen in den Zellzyklus-Phasen im Vergleich zu den Kontrolltransfektanten feststellbar (Abb. 44).

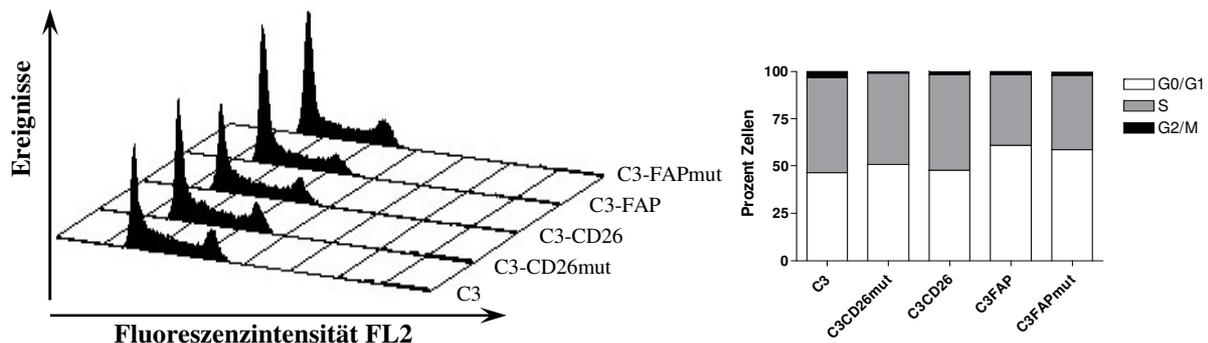


Abbildung 44: FAP-Expression in HEK-293-Zellen führt zu einem erhöhten Anteil von Zellen in der G0/G1-Phase

1 Mio. Zellen der von HEK-293 abgeleitete Zelllinien mit dem Leervektoren C3, enzymatisch inaktiver DP4, wildtyp DP4, wildtyp FAP und enzymatisch inaktivem FAP wurden in eine Kulturschale ausgesät. Die Zellkerne wurden nach der Kultivierung mit Propidium-Iodid angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt ist die DNA-Menge pro Zelle. Die Zellzyklusanalyse erfolgte mit Hilfe der Software ModFit LT, die ermittelte Verteilung der Zellen auf Zellzyklusphasen ist als Mittelwert von drei voneinander unabhängigen Messungen dargestellt.

Unabhängig von der enzymatischen Aktivität führt die Expression von FAP in HEK-293-Zellen zu einer Steigerung der Aktivität der Effektor-Caspasen-3 und -7 sowie zu einer Anreicherung der Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus.

4.6.5. Einfluss der Expression von DP4 und FAP auf die Tumor-Stroma-Interaktion

In den bisherigen Untersuchungen kamen Methoden zum Einsatz, bei denen die wechselseitigen Interaktionen des Tumors mit stromalen Zellen nicht berücksichtigt werden konnten. Um einen Einfluss der DP4- und FAP-Expression von Karzinomzellen auf die Wechselwirkungen mit stromalen Zellen zu untersuchen, wurden Zellen der HEK-293-Klone, PA-TU-8988S-Zellen (DP4 positiv) und PA-TU-8988T-Zellen (DP4 negativ) kontaktfrei mit Fibroblasten kokultiviert. Als Modell für die stromalen Fibroblasten dienten in den folgenden Untersuchungen primäre NHDF-c-Zellen. Eine mikroporöse Membran ermöglicht eine räumliche Trennung der unterschiedlichen Zelltypen, gewährleistete jedoch den Stoff- und somit Signalaustausch durch lösliche Zytokine und Chemokine zwischen den Kultivierungskompartimenten.

Mittels Quantitativer-PCR konnte eine Steigerung der mRNA-Menge ausgewählter Zytokine und Chemokine in den Fibroblasten der Kokultur gegenüber den allein kultivierten Zellen nachgewiesen werden. Die Kokultivierung mit transfizierten HEK-293-Zellen führte zu einer Stimulation der Fibroblasten. Zusätzlich konnte eine Variation der IL-1 β -, CCL11-, CXCL8- und CXCL10-Expression in Abhängigkeit vom Vorhandensein bzw. der enzymatischen Aktivität von DP4 und FAP auf den HEK-293-Klonen beobachtet werden (Abb. 45). Es zeigte sich, dass die Expression des Chemokins CCL11 in den Fibroblasten, welche mit aktive DP4 ($p < 0,05$; $n = 4$), aktives FAP ($p < 0,01$; $n = 4$) und mutiertes FAP ($p < 0,05$; $n = 4$) exprimierenden HEK-293-Zellen kokultiviert wurden, gegenüber der Leervektorkontrolle erhöht war. Ebenso war der mRNA-Level von CXCL10 in den mit

mutierter DP4 ($p < 0,01$; $n = 4$) kokultivierten Fibroblasten signifikant gegenüber der Leervektorkontrolle erhöht, während die CXCL10-mRNA-Level in den mit DP4- und FAP-exprimierenden HEK-293-Klonen kokultivierten Fibroblasten deutlich aber nicht signifikant erhöht waren. Im Gegensatz dazu war die CXCL8-Expression in den Fibroblasten, welche mit mutierter DP4-transfizierten Zellen kokultiviert wurden, gegenüber den mit Leervektor-transfizierten Zellen kokultivierten ($p < 0,05$; $n = 4$) signifikant reduziert. In den mit aktiver DP4, aktivem FAP sowie mutiertem FAP transfizierten HEK-293-Klonen kokultivierten Fibroblasten war die CXCL8-Expression ebenfalls gegenüber der Leervektorkontrolle deutlich reduziert. Die Messwerte waren auf Grund einer höheren Schwankungsbreite jedoch nicht signifikant verschieden.

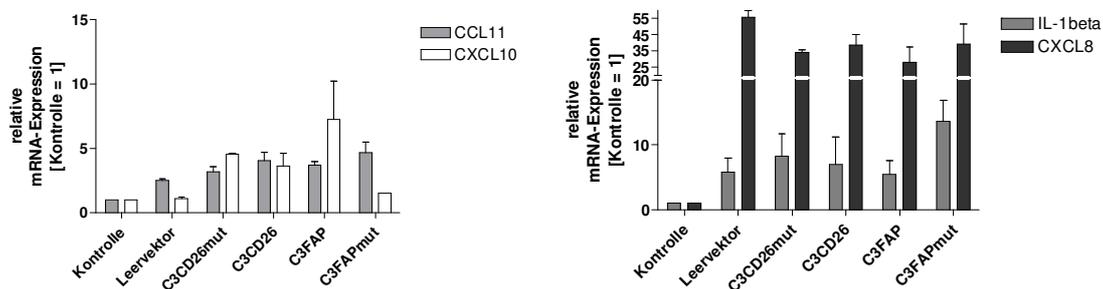


Abbildung 45: Kokultivierung mit HEK-293-Klonen steigert mRNA-Menge verschiedener Zytokine in Fibroblasten

Aus mit dem Leervektor C3, wildtyp DP4, mutierter DP4, wildtyp FAP oder mutiertem FAP transfizierten HEK-293-Klone kokultivierten Fibroblastenzellen wurde die Gesamt-RNA gewonnen und nach Transkription in cDNA mit spezifischen Primern die Menge an mRNA verschiedener Zytokine und Chemokine mittels quantitativer PCR bestimmt. Dargestellt ist die mRNA-Menge im Verhältnis zu separat kultivierten Fibroblasten. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert \pm SD, $n=4$ mit GraphPad Prism 4.0.

Neben den in Abbildung 45 aufgeführten Chemokinen und Zytokinen wurde weiterhin die Veränderung der Expression von CCL2, CCL5, TNF-alpha, CXCL1, CXCL11, CXCL12, TGF- β , uPA, TIMP1, MMP-1 und FAP durch Kokultivierung mit HEK-293-Klonen in den Fibroblasten untersucht. Dabei konnte jedoch keine deutliche Veränderung gegenüber der Kontrolle beobachtet werden.

Während in den Fibroblastenzellen durch Kokultivierung eine bis zu 50-fach erhöhte CXCL8 mRNA-Menge nachweisbar war, konnte eine Veränderung der Expression dieses Gens in den Zellen der HEK-293-Klonen nicht beobachtet werden.

Neben den verschiedenen HEK-293-Klonen wurden die Zelllinien PA-TU-8988S und PA-TU-8988T zur Bestimmung des Einflusses der DP4-Oberflächenexpression auf Zellkommunikation mittels löslicher Zytokine und Chemokine untersucht. Mit Hilfe der Q-PCR konnte eine durch die Kokultivierung in den Fibroblasten induzierte differentielle Genexpression von IL-1 β , CXCL1, CXCL8, CCL5, CCL11, TNF- α und MMP-1 nachgewiesen werden. Ein mit den HEK-293-Klonen vergleichbarer Effekt der Kokultivierung war bei der CXCL8-mRNA zu beobachten. Die CXCL8-Expression der

Fibroblasten war bei Kokultivierung mit den DP4-erprimierenden PA-TU-8988S-Zellen ($p < 0,001$; $n = 6$) signifikant niedriger als in Gegenwart der PA-TU-8988T-Zellen. Im Gegensatz zu den Versuchen mit den transfizierten HEK-293-Zellen konnte eine deutlich aber nicht signifikante Reduktion des CCL11-mRNA-Levels bei Kokultivierung der Fibroblasten mit den DP4-positiven PA-TU-8988S-Zellen beobachtet werden. Daneben zeigte sich eine signifikante Reduktion der Genexpression von IL-1 β ($p < 0,001$; $n = 6$), CXCL1 ($p < 0,001$; $n = 6$), und MMP-1 ($p < 0,01$; $n = 4$) in den Fibroblasten welche mit PA-TU-8988S-Zellen kokultiviert wurden gegenüber den mit PA-TU-8988T-Zellen kokultivierten (Abb. 46).

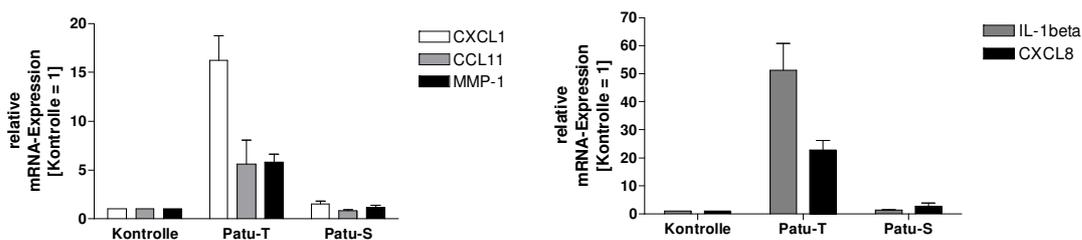


Abbildung 46: Kokultivierung mit PA-TU-8988T und PA-TU-8988S steigert mRNA-Menge verschiedener Zytokine in Fibroblasten

Aus mit PA-TU-8988T- und PA-TU-8988S-kokultivierten Fibroblastenzellen wurde die Gesamt-RNA gewonnen und nach Transkription in cDNA mit spezifischen Primern die Menge an mRNA verschiedener Zytokine und Chemokine mittels quantitativer PCR bestimmt. Dargestellt ist die mRNA-Menge im Verhältnis zu separat kultivierten Fibroblasten. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert \pm SD, $n=6$ mit GraphPad Prism 4.0.

Zusätzlich zu den in Abbildung 46 aufgeführten Chemokinen und Zytokinen, wurde die Veränderung der Genaktivität von CXCL10, CXCL12 und FAP durch Kokultivierung mit PA-TU-8988T und PA-TU-8988S in den Fibroblasten untersucht. Eine deutliche Veränderung gegenüber der Kontrolle war jedoch nicht zu beobachten.

Die Kokultivierung erfolgte auf Grund des begrenzten Volumens an Kulturmedium nur über einen Zeitraum von zwei Tagen. Eine autokrine Aktivierung als Reaktion auf die beobachteten Expressionsänderungen könnte jedoch einen längeren Zeitraum erfordern. Um die parakrinen und autokrinen Effekte der Kokultivierung deutlicher hervorzuheben, wurden die Fibroblasten deshalb mit ausgewählten Chemokinen und Zytokinen stimuliert. Nach zwei Tagen Kultivierung in Gegenwart von TGF- β und IL-1 β wurde die Oberflächenexpression von DP4 und FAP mittels FACS analysiert bzw. die Gesamt-RNA gewonnen und mittels quantitativer PCR die differentielle Expression ausgewählter, mit der Tumorprogression assoziierter Gene bestimmt.

Während bei der Kokultivierung der Fibroblasten mit den DP4 und FAP überexprimierenden HEK-293-Klonen keine Veränderung der TGF- β Expression beobachtet werden konnte, wurde die IL-1 β Produktion stimuliert. In dem Folgeexperiment zeigte IL1- β zusätzlich ein ausgeprägteres Potential zur autokrinen Stimulation der Fibroblasten im Vergleich zum TGF- β . In Abbildung 47 dargestellt ist die Stimulation der FAP- als auch der MMP-1-

Expression in den Fibroblasten durch Zugabe von 1 bzw. 10 ng/ml IL-1 β .

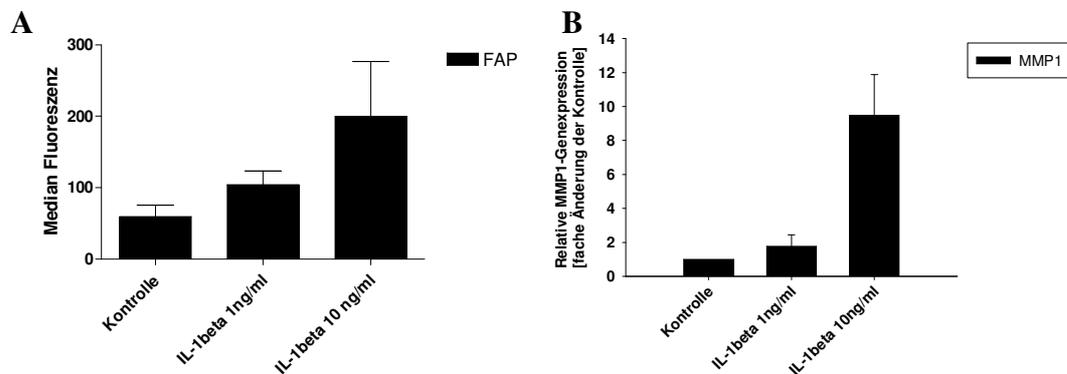


Abbildung 47: IL1-b stimuliert von FAP-Proteinexpression sowie MMP-1-Genexpression von Fibroblasten

Fibroblastenzellen wurden für zwei Tage mit 1 ng/ml sowie 10 ng/ml IL-1 β stimuliert. Anschließend wurde die FAP-Oberflächenexpression mittels FACS-Messung bestimmt (A), bzw. die Gesamt-RNA gewonnen und nach Transkription in cDNA mit spezifischen Primern die Menge an mRNA von MMP-1 mittels quantitativer PCR bestimmt (B). Dargestellt ist der Median der Fluoreszenz und die mRNA-Menge im Verhältnis zu unstimuliert kultivierten Fibroblasten. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert \pm SD, n=3 mit GraphPad Prism 4.0.

Durch Kokultivierung von humanen dermalen Fibroblastenzellen mit Karzinomzellen konnten die Fibroblasten zur Ausschüttung unterschiedlicher Zytokine angeregt werden. In einem zweiten Schritt konnte mit Zytokinen, deren Expression durch die Kokultivierung erhöht war, sekundäre Effekte wie eine Steigerung der MMP-1 Expression in den Fibroblastenzellen induziert werden.

4.7. Einfluss der Expression von DP4 und FAP auf die Tumorbildung von transfizierten Zellen im xenograft Tiermodell

In den vorangegangenen Versuchen wurden der Einfluss der DP4- und FAP-Expression auf verschiedene Schritte der Metastasenbildung getrennt von einander untersucht. Um das Ergebnis des Zusammenspiels der einzelnen Prozesse und den Einfluss der DP4- und FAP-Expression auf die Tumorentwicklung in einem Wirtsorganismus verfolgen zu können, wurden die unterschiedlichen HEK-293-Klone in einem Tiermodell eingesetzt.

Es konnte, wie in Abbildung 48 dargestellt, beobachtet werden, dass die Zellen, welche mutierte DP4 exprimieren, nach 21 Tagen signifikant vergrößerte Tumoren ausbildeten. Die Zellen des wildtyp FAP exprimierenden Klons hatten an Tag 24 messbar größere Tumoren ausgebildet. Dagegen waren durch die Zellen der Leervektor-transfizierten Kontrolle, wildtyp DP4- und mutiertes FAP-exprimierenden Klone nach 24 Tagen noch keine größeren Tumoren ausgebildet. Auf Grund der Tumorgöße mussten am Tag 24 die ersten Tiere getötet werden und die danach gewonnenen Daten wurden deshalb in der Grafik nicht mehr verwendet.

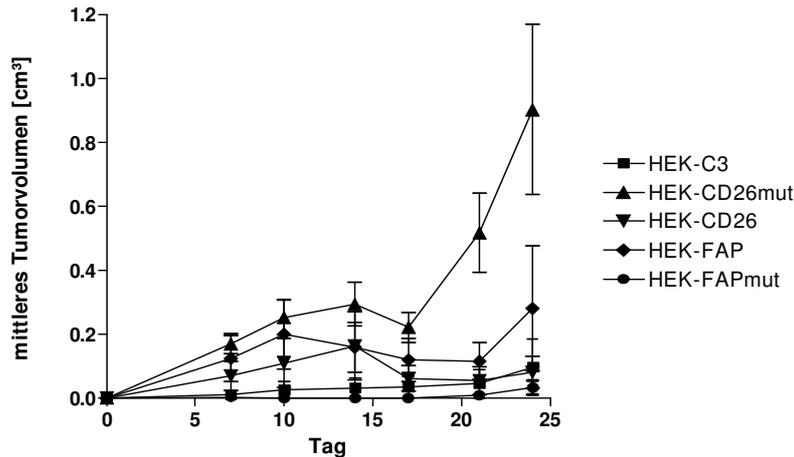


Abbildung 48: inaktive DP4 und wildtyp FAP auf HEK-293-Zellen fördert Tumorwachstum in NOD/SCID Mäusen

20 Mio. Zellen der von HEK-293 abgeleitete Zelllinien mit den Leervektoren C3, enzymatisch inaktiver DP4, wildtyp DP4, wildtyp FAP oder enzymatisch inaktivem FAP wurden in NOD/SCID Mäuse subkutan injiziert und die Ausbildung von Tumoren verfolgt. Dargestellt ist das mittlere Tumorstadium als Mittelwert \pm SD, n=6. In Abhängigkeit von Tumorstadium und Zustand wurden Tiere vor Versuchsende getötet.

Um die molekularen Ursachen der Ergebnisse der Xenotransplantation besser verstehen zu können, wurde die differentielle Genexpression in den gebildet Tumoren mittels Q-PCR analysiert. Tumore, die aus inaktive DP4-exprimierenden bzw. aktives FAP-exprimierenden Klonen gebildet wurden, zeichnen sich bei einer relativ geringen E-Cadherinexpression durch eine hohe CXCL8-Genaktivität aus. Im Gegensatz dazu haben die Tumoren der DP4-Transfektanten die höchsten E-Cadherinlevel und eine geringe CXCL8-Expression (Abb 49).

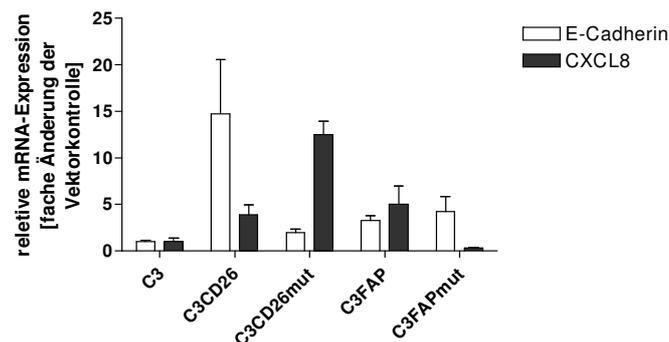


Abbildung 49: Expression von E-Cadherin und CXCL8 in Tumoren, die aus DP4- und FAP-überexprimierenden Transfektanten gebildet wurden.

20 Mio. Zellen der von HEK-293 abgeleitete Zelllinien mit den Leervektoren C3, enzymatisch inaktiver DP4, wildtyp DP4, wildtyp FAP oder enzymatisch inaktivem FAP wurden in NOD/SCID Mäuse subkutan injiziert. Bei Versuchsende mit Tötung der Tiere erfolgte eine Entnahme von Tumorgewebe und die Gewinnung der Gesamt-RNA aus dem Tumorgewebe. Nach Transkription in cDNA wurde mit spezifischen Primern die Menge an mRNA von E-Cadherin und CXCL8 mittels quantitativer PCR bestimmt. Dargestellt ist die mRNA-Menge im Verhältnis zur Leervektorkontrolle. Die Darstellung erfolgt als Mittelwert \pm SD, n=6 mit GraphPad Prism 4.0.

Die Ergebnisse der *in vivo* Studie deuten darauf hin, dass einerseits enzymatisch inaktive DP4 und andererseits aktives FAP auf der Oberfläche der HEK-293-Zellen das Wachstum der aus diesen Klonen hervorgegangenen Tumoren fördern. Gleichzeitig zeigen diese Zellen eine relativ geringe E-Cadherin- und die höchste CXCL8-Genaktivität. Das Tumorgewebe der Klone die aktive DP4 und inaktives FAP exprimieren wiesen die höchste E-Cadherin- und eine relativ niedrige CXCL8-Genaktivität auf. Ebenso zeigten die gebildeten Tumoren eine im Vergleich zur Leervektorkontrolle vergleichbare Wachstumsgeschwindigkeit.

5. Diskussion

Der ursprüngliche den Proteasen zugeordnete Beitrag in der Tumorprogression bestand im Abbau von Oberflächenproteinen und extrazellulären Matrixkomponenten während der Auflösung des Zellverbandes, der Matrixremodellierung, des Basalmembranabbaus, der Zellmigration und Invasion. Es konnte gezeigt werden, dass die funktionelle Inaktivierung zum Beispiel des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin nicht nur über Promoter-*Silencing*, Deletion oder Mutationen stattfindet, sondern auch über die Degradation durch proteolytische Enzyme^{57,58}. Metastasen-bildende Zellen exprimieren signifikante Mengen an Matrixabbauenden Enzymen, vorzugsweise Metalloproteinasen, Serinproteasen und Cathepsine. Obwohl unterschiedlichste Enzyme am Abbau der Basalmembran beteiligt sind, scheinen Kollagenase IV als auch Serinproteasen die wichtigsten Enzyme während der Basalmembran-Invasion zu sein und werden während der Metastasierung in größerer Menge ausgeschüttet^{162,163}. In der Phase der Zellmigration und Invasion sind zum Beispiel neben Serinproteasen und Cathepsinen vor allem die Matrixmetalloproteinasen von Bedeutung. Es wurde beobachtet, dass sich die erhöhte Expression und Aktivität an der Invasionsfront der eindringenden Zellen und Zellverbände konzentriert⁴.

Zusätzlich zum Abbau von extrazellulären Matrixkomponenten wird den Proteinasen eine Funktion in der Aktivierung von Zytokinen und Chemokinen, sowie der Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus der extrazellulären Matrix zugewiesen, welche Tumorwachstum und Überleben sichern²². Eine herausgehobene Stellung kommt dabei der DP4 zu, da *in vitro* gezeigt werden konnte, dass DP4 eine wichtige Rolle in der posttranslationalen Regulation der Aktivität verschiedener Chemokine, zum Beispiel CXCL12 (SDF-1), CCL5 (RANTES) CCL11 (Eotaxin) spielt und damit eine Funktion in der Steuerung des Immunsystems zukommt¹²³. Neuere Untersuchungen unterstreichen den Einfluss von Zelloberflächen-Proteasen und deren Inhibitoren auf die Angiogenese. Eine besondere Bedeutung kommt auch hier den Matrixmetalloproteinasen und den Serinproteasen des Plasmin-Systems zu. Es konnte gezeigt werden, dass Stimuli der Angiogenese wie Hypoxie oder spezifische Wachstumsfaktoren, z.B. VEGF, die Expression von Plasmin-Proteasen und Matrix-Metalloproteasen erhöhen^{164,165}. Dies steht im Zusammenhang mit dem Umbau der ECM durch die migrierenden Endothelzellen. Ein für die Aktivität der Plasmin-Systems beschriebener Regulationsmechanismus basiert auf der Spaltung des Antiplasmin-2 durch das Serum-FAP. Das verkürzte Protein bindet effizienter an Fibrin und verlangsamt die Blutgerinnsel-Lyse durch Plasmin wirksamer als das unmodifizierte Antiplasmin-2⁹⁹. Durch den vielfältigen Einfluss des Plasmin-Systems auf die Tumorprogression kommt einem Regulationsmechanismus der Plasminaktivität durch FAP eine eminente Bedeutung zu.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, eine effektive und dauerhafte Expression von DP4 und FAP in den Zellen der Zelllinien HEK-293, PA-TU-8988T zu erzielen, um in unterschiedlichen Experimenten die Bedeutung der Serinproteasen DP4 und FAP auf die Tumorprogression genauer untersuchen zu können.

5.1. Etablierung und Charakterisierung stabil transfizierter Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden stabil transfizierte Zelllinien erzeugt, die enzymatisch aktive und inaktive Varianten von DP4 und FAP als Fusionsproteine mit EGFP exprimieren. Die transiente Expression ist durch Transfektion von Vektoren mit eukaryotischen Promotoren in Zielzellen ohne Selektionsdruck zu erreichen. Die transiente Transfektionstechnik mittels Plasmid/Lipidkomplex erfordert einen geringen Aufwand, erlaubt aber keine Analyse der Veränderungen durch die Überexpression des Zielproteins über längere Zeiträume. Zudem kann in Abhängigkeit vom transfizierten Zelltyp eine hohe Toxizität beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die stabile Transfektion vorgezogen.

Mittels Durchflusszytometrie, fluoreszenzmikroskopischer Analysen und Aktivitätsmessungen konnte nachgewiesen werden, dass die Fusionsproteine auf der Zelloberfläche präsent sind und im Fall der aktiven Varianten enzymatische Aktivität zeigen.

Da die DP4 über keine Signalsequenz verfügt, welche während der Prozessierung des Proteins abgeschnitten wird, sondern der Membrananker zugleich die Signalsequenz darstellt⁷³, können sowohl der N- als auch der C-Terminus mit translationellen Fusionen versehen werden. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Fusionsproteine, in welchen DP4 und FAP an den N-Terminus von EGFP fusioniert sind, eine reduzierte Oberflächenexpression gegenüber den C-terminalen Konstrukten zeigen (Abb. 9). Für die enzymatisch aktiven Varianten des DP4-EGFP- und FAP-EGFP-Fusionsproteins konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Aktivität der N-terminalen Konstrukte gegenüber den C-terminalen Varianten reduziert ist (Abb. 14). Voraussetzung für die Ausbildung einer vollständig enzymatisch aktiven DP4 ist die Dimerisierung^{113,114}. Der C-Terminus der DP4 und somit auch das fusionierte EGFP befinden sich in unmittelbarer Nähe zur Dimerisierungsstelle (Abb. 3). Eine sterische Hinderung der Dimerisierung durch das EGFP könnte somit für die reduzierte enzymatische Aktivität und eine vergleichsweise geringere Oberflächenexpression der N-terminalen Fusionsproteine verantwortlich sein. Ein Verschluss der Substratzugangsöffnungen ist auf Grund der Lage des C-Terminus dagegen eher nicht zu erwarten.

Wesley *et al.* konnten zeigen, dass eine Transfektion von DP4 in die nicht kleinzellige Lungenkarzinom-Zelllinie SK-LUC-8⁸⁷ sowie der SK-MEL-28 Melanomzelllinie¹⁶⁶ zu einer Aktivierung der FAP-Expression führt. Ein analoger Effekt konnte in den von HEK-293 abgeleiteten transformierten Zellklonen mittels Durchflusszytometrie (Abb. 7) und quantitativer PCR (Abb. 11B) nicht nachgewiesen werden. Wang *et al.* konnten ebenfalls keine Induktion der FAP-Expression durch transiente Transfektion von HEK-293 mit DP4 mittels Durchflusszytometrie nachweisen¹⁶⁷. In den von PA-TU-8988T abgeleiteten transformierten Zellklonen wurde ebenfalls keine Aktivierung der FAP-Expression durch DP4-Überexpression beobachtet (Abb. 10). Genauso zeigten die DP4-positiv getesteten Tumorzelllinien HepG2 und PA-TU-8988S keine parallele FAP-Expression. Es ist daher

anzunehmen, dass es sich bei diesem Effekt um eine zelllinienspezifische Expressionsänderung handelt.

5.2. Untersuchungen zur Zelladhäsion

In ihren Arbeiten mit den Lungenmetastasen-bildenden Rattenkarzinom-Zelllinien R3230AC-MET und RPC-2 konnten Johnson *et al.* *in vitro* eine Präferenz dieser Zelllinien für die Interaktion mit aus Lungenendothel gewonnen Vesikeln zeigen¹⁶⁸. Ein gegen Ratten-DP4 gerichteter Antikörper war in der Lage, die Tumorzell-Vesikel-Interaktion zu unterbinden. Abdel-Ghany *et al.* zeigten, dass die Rattenadenokarzinom-Zelllinie MTF7 konzentrationsabhängig an Ratten-DP4 beschichtete Unterlagen adhäreren. Diese Adhäsion ließ sich konzentrationsabhängig durch lösliche Ratten-DP4 und einen Ratten-DP4 spezifischen Antikörper inhibieren. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass die Anzahl an Lungenmetastasen nach Injektion von MTF7-Zellen in Fischer 344-Ratten durch Vorinkubation dieser Tumorzellen in löslicher Ratten-DP4 zurückgeht¹⁶⁹. In einer vergleichbaren Arbeit von Cheng *et al.* wurde auf der Oberfläche der Tumorzellen assoziiertes Fibronectin als Interaktionspartner der Ratten-DP4 identifiziert⁸⁵.

In den Versuchen zur Bestimmung des Einflusses einer DP4- und FAP-Expression auf die Zelladhäsion an Kollagen I- und Fibronectin-beschichteten Oberfläche konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die stabil transfizierten Zelllinien, welche aktive und inaktive Varianten der DP4 auf ihrer Oberfläche exprimieren, eine um 10 % reduzierte Adhäsion an Fibronectin aufweisen, während die Anheftung an Kollagen I unbeeinflusst bleibt (Abb. 16 und 17). Diese Beobachtung konnte durch humane Zelllinien, die natürlicherweise DP4 auf ihrer Oberfläche tragen, bestätigt werden (Abb. 19). Während der Effekt der DP4- Expression bei den HEK-293-Klonen statistisch signifikant war, ist bei den Zellen der PA-TU-8988T-Klone nur eine geringfügige Reduktion der Adhäsionsrate zu beobachten. Eine Erklärung für diesen Unterschied kann in der niedrigeren Oberflächenexpression von DP4 in den PA-TU-8988T-Klonen gegenüber den HEK-293-Klonen gesucht werden. Bestätigt wird diese Vermutung durch Beobachtungen bei den Tumorzelllinien. Diese besitzen eine größere Menge an DP4 auf der Zelloberfläche gegenüber den transfizierten Zelllinien und es war ein ausgeprägterer Effekt auf die Adhäsionsrate an Fibronectin zu beobachten. Da die Expression sowohl der enzymatisch inaktiven als auch der enzymatisch aktiven Variante der DP4 mit einer Reduktion der Zelladhäsion korreliert, kann man daraus schließen, dass die enzymatische Aktivität für den zu Grunde liegenden Mechanismus nicht von Bedeutung ist. Des Weiteren konnte erstmalig gezeigt werden, dass durch Transfektion mit wildtyp und mutiertem FAP die Adhäsion der HEK-293-Zellen an Fibronectin ebenfalls reduziert wird, während die Adhäsion an Kollagen I unbeeinflusst bleibt.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die beobachtete Veränderung der Zelladhäsion an Fibronectin weder in den transfizierten HEK-293-Zellen noch in den wildtyp Tumorzellen

mit der auf der Zelloberfläche nachweisbaren Menge an CD29 (Integrin-1 β), einer Untereinheit des Fibronektinrezeptors, korrelierte (Tab. 12, 13). Dagegen konnte eine Variation der Interaktion der Zellen mit Fibronektin-beschichteten Oberflächen bei Veränderung der E-Cadherin-Expression beobachtet werden. Die Ergebnisse der Q-PCR (Abb. 38), des Westernblots (Abb. 42) und der Adhäsionsstudien (Abb. 16B, 19B) weisen auf eine inverse Korrelation zwischen E-Cadherin-Expression und Zelladhäsion an Fibronektin-beschichtete Oberflächen hin. Das Kalzium-abhängige homophile Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin ist über einen Catenine enthaltenden Proteinkomplex mit dem Zytoskelett verbunden und bildet zusammen mit den gleichartigen E-Cadherin-Catenin-Komplexen der Nachbarzellen die Adherens Junctions. Als Adherens Junctions bezeichnet man eine Gruppe der Zell-Zell-Verbindungen, die zu den Desmosomen gerechnet werden. Diese haben die Aufgabe, Zellkontakte herzustellen und sind hauptsächlich in Epithelien verbreitet. Adherens Junctions bilden ein Band um die Zellen, die außen mit den Bändern der Nachbarzellen und innen mit dem Zytoskelett verbunden sind. Damit geben Adherens Junctions Epithelzellen mechanische Festigkeit und sorgen für einen festen Zellverbund (Abb. 50)¹⁰.

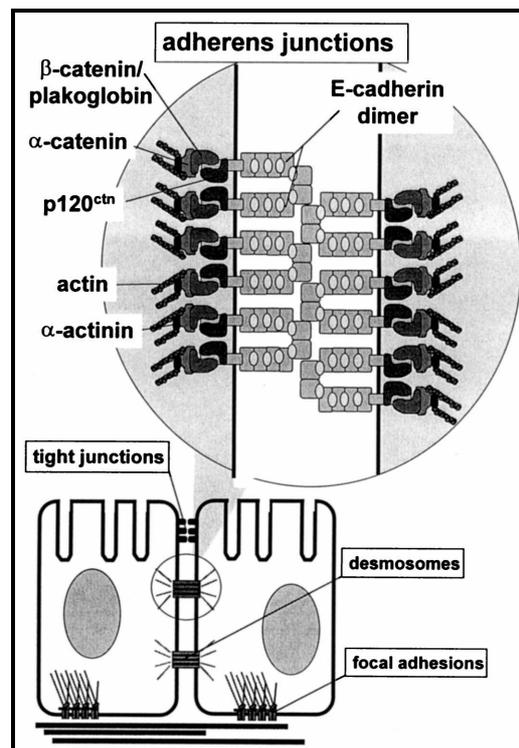


Abbildung 50: schematische Darstellung des Zell-Zell-Kontaktes

Dargestellt ist ein Adherens Junction, welches durch die Cadherin-Catenin-Komplexe zwei benachbarter Epithelzellen gebildet wird. Pötter *et al.*¹⁴⁸

Eine erhöhte E-Cadherin-Menge könnte über diesen Proteinkomplex zu einer Umordnung des Zytoskeletts führen, welche sich durch eine Veränderung der Zellmorphologie äußert und die Zell-Fibronektin-Interaktion beeinträchtigt. Gestützt wird diese These durch die Beobachtungen von Keratinozyten, deren Fähigkeit zur Integrin vermittelten Zell-Matrix-Adhäsion nach Verlust von E-Cadherin ansteigt^{170,171}.

Der in dieser Arbeit gezeigte Effekt der DP4-Expression in transformierte Zelllinien auf die Adhäsion dieser Zellen an Fibronectin-beschichtete Oberflächen steht im Widerspruch zu den publizierten Ergebnissen von Wang *et al.*¹⁶⁷, die in ihrer Arbeit mit transient transfizierten 293T-Zellen eine gesteigerte Adhäsionsneigung der DP4-exprimierenden Zellen beobachteten. Als eine Erklärung für diesen Unterschied ist in Betracht zu ziehen, dass im Gegensatz zu den im Rahmen dieser Dissertation vorgenommenen Versuchen die Gruppe um Wang keine stabil transformierten Zelllinien verwendete, sondern mit transient transfizierten Zellen arbeitete. Des Weiteren handelt es sich bei dem von Wang *et al.* verwendeten Plasmid um das Konstrukt, bei dem die DP4 an den N-Terminus des EGFP fusioniert wurde. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das N-terminale Fusionsprotein eine geringere enzymatische Aktivität zeigt gegenüber der C-terminalen Fusion. Woraus sich schließen lässt, dass die Position des EGFP im Fusionsprotein für die Funktion desselben von Bedeutung ist. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte eine sterische Hinderung der Dimerisierung und Interaktion mit anderen Proteinen durch das fusionierte EGFP sein.

In verschiedenen Publikationen wurde beschrieben, dass aus Ratten-Lebergewebe isolierte DP4 an mit Kollagen I beladene Sepharose bzw. Mikrotiterplatten bindet^{65,172}. Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels Messungen mit dem BIACORE System die von Hanski *et al.* diskutierte Bedeutung der unphysiologisch niedrigen Salzkonzentration für die Bindung von DP4 an Kollagen bestätigt werden. Wir konnten zeigen, dass rekombinante humane DP4 nur in Puffer mit niedriger Salzkonzentration mit Sensorchip-gekoppeltem Kollagen I interagiert (Abb. 21B). Da diese Interaktion in einem Puffer mit physiologischer Salzkonzentration nicht auftritt (Abb. 20B, 22B), kann man annehmen, dass es sich bei dieser Bindung um unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen handelt. Löster *et al.* und Hanski *et al.* verwendeten in ihren Studien zur Bindung von gereinigter DP4 an Kollagen Puffer mit geringer Ionenstärke und könnten daher elektrostatische Wechselwirkungen beobachten haben.

Eine mögliche Interaktion der DP4 mit Fibronectin wurde dagegen kontrovers diskutiert. So konnte zum einen eine Interaktion gezeigt werden^{85,120}, während in anderen Arbeiten keine Bindung von DP4 an Fibronectin nachgewiesen werden konnte⁶⁵. In der vorliegenden Arbeit wurde keine direkte Interaktion von rekombinanter humaner DP4 mit Fibronectin nachgewiesen (Abb. 20A, 21A, 22A). Ein möglicher Grund für das Fehlen einer Interaktion von DP4 mit Fibronectin könnten die verwendeten Messmethoden sein. Für die Messungen mit dem BIACORE System wurde natives Fibronectin einer Proteinlösung kovalent an die Dextran-Matrix des CM5-Sensorchips gekoppelt. Piazza *et al.* zeigte, dass Rattenleber-DP4 an auf Nitrozellulose-Membranen gekoppeltes denaturiertes Fibronectin bindet¹²⁰, während Löster *et al.* bei Verwendung von nativem Fibronectin in Mikrotiterplatten keine Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen beobachten konnten⁶⁵. Die Messungen mit dem BIACORE-System bestätigen damit die Beobachtung von Löster *et al.*, dass DP4 *in vitro* nicht an natives Fibronectin bindet. Im Gegensatz zu den zitierten Arbeiten wurde in dieser Dissertationsarbeit statt Ratten-DP4 rekombinante humane DP4 verwendet. Humane und Ratten-DP4 zeigen eine

Sequenzidentität von 86.4 %⁶⁶, die Variationen in der putativen Bindungsregion der DP4 können die Bindungseigenschaften der Proteine grundlegend ändern. Während die Sequenzen der katalytischen Domäne in humaner und Ratten-DP4 nahezu identisch sind, treten in der cysteinreichen Region, welche als Bindungsregion verschiedener Proteine beschrieben wurde¹⁷³, eine Anzahl von Aminosäureaustausche und Deletionen auf (Anhang 2). Des Weiteren wurde gezeigt, dass sich das Glykosilierungsmuster des rekombinanten Enzyms von dem aus natürlichen Quellen gereinigtem unterscheidet¹¹⁰.

Wenn den Zuckerresten auf der Proteinoberfläche eine Funktion bei der Protein-Protein-Interaktion zukommt⁶², sollte eine Veränderung im Glykosilierungsmuster ebenfalls zu einem veränderten Bindungsverhalten des Proteins führen. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass DP4 auf der Zelloberfläche im Komplex mit weiteren Proteinen vorkommt^{28,63,103,174}. Diese beschriebenen Komplexe enthalten eine Anzahl von Proteinen denen, einen Funktion in der Zell-Matrix-Interaktion zugeschrieben wird wie zum Beispiel CD44 und verschiedene Integrine. Die Bedingungen mit denen diese Komplexe aus den Zellmembranen herausgelöst wurden, ähneln den Bedingungen mit den Löster *et al.* und Piazza *et al.* die DP4 für ihre Untersuchungen aus der Rattenleber isoliert haben. Es ist daher möglich, dass die beschriebene Bindung von DP4 an die ECM-Proteine auf die Interaktion eines solchen Proteinkomplexes mit der extrazellulären Matrix zurückzuführen ist. Die Ausbildung solcher Komplexe ist bei der heterologen Expression der DP4 nicht zu erwarten und ist als eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Bindungseigenschaften von gereinigter und rekombinanter DP4 in Betracht zu ziehen.

Die physiologische Bedeutung einer möglichen DP4-Fibronectin-Interaktion auf die Anheftung von im Blutkreislauf zirkulierenden Tumorzellen an Gefäßendothelzellen konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Durch Vorinkubation der der MTF7-Zellen mit löslicher Ratten-DP4 wurde die Ausbildung von Tumorkolonien reduziert. Dies ist insofern eine Überraschung, da im Serum von Säugern erhebliche Mengen löslicher DP4 nachweisbar sind. Dass Rattenadeneokarzinomzellen nach Injektion in den Blutstrom innerhalb kurzer Zeit diese lösliche DP4 auf der Zelloberfläche akkumulieren, konnte durch Shingu *et al.* gezeigt werden¹⁷⁵. Die Ergebnisse der *in vitro* Studien zur Interaktion von verschiedenen Tumorzelllinien mit Ratten-DP4 via Zelloberflächen-gebundenem Fibronectin sind möglicherweise nicht auf alle Säuger übertragbar. Ein Hinweis, dass einzelne Tumorzelllinien von der DP4-Fibronectin-Interaktion verschiedene Prozesse zur Anheftung an das Lungenendothel und zur Extravasation nutzen, sind die folgenden Arbeiten. Während Cheng *et al.* *in vitro* eine Adhäsion von Zellen der Lungenmetastasen-bildenden murinen Melanomzelllinie B16-F10 an Ratten-DP4-beschichtete Oberflächen über an die Zellüberfläche gebundenes Fibronectin zeigen konnten¹²⁸, wurde die Anheftung der B16-F10-Zellen an das Lungenendothel von Mäusen durch die Gabe eines gegen Lu-ECAM-1 gerichteten monoklonalen Antikörpers in einer *in vivo* Studie von Zhu *et al.* nahezu vollständig unterdrückt¹⁷⁶. Ein Einfluss des verwendeten Antikörpers auf die Interaktion von Zelloberflächen-gebundenen Fibronectin mit Ratten-DP4 konnte dagegen ausgeschlossen

werden¹⁶⁹.

Wie in der Einleitung bereits ausgeführt, reduzierte die chronische Gabe von DP4-Inhibitoren die Koloniebildung von Zellen der Rattenadenokarzinom-Linie MADB106 in den Lungen von Fischer 344-Ratten. Die Koloniebildung setzt neben der Anheftung der Tumorzellen an das Gefäßendothel deren Extravasation voraus. *In vitro* werden diese beiden Prozesse in getrennten Modellen, dem Zelladhäsionsassay und dem Migrations/Invasionsassay nachempfunden.

Bei den Untersuchungen des Einflusses verschiedener Inhibitoren der DP4 auf die Adhäsion von sowohl DP4 positiv als auch negativ getesteten Zellen an Fibronectin-beschichtete Oberflächen konnte kein Hinweis auf eine Korrelation zwischen Inhibitorwirkung und dem Vorhandensein von DP4 auf der Zelloberfläche gefunden werden (Abb. 23). Der in einzelnen Zelllinien zu beobachtende Einfluss der DP4-Inhibitoren könnte daher auf unspezifische Wirkung zurückgeführt werden. Gestützt wird diese Interpretation durch die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss der Expression von enzymatisch aktiver und inaktiver DP4 auf die Adhäsion an Fibronectin und Kollagen I (Abb. 16). Es konnte gezeigt werden, dass der beobachtete Effekt von der enzymatischen Aktivität unabhängig ist und somit eine Wirkung DP4-spezifischer Inhibitoren auf diesen Mechanismus nicht zu erwarten ist.

5.3. Untersuchungen zur Anlockung von Immunzellen

Die prognostische Bedeutung der Tumor-assoziierten Lymphozyten (TILs) wurde lang debattiert. In den Fällen in denen TILs den Krankheitsverlauf von Krebspatienten verbesserten, wurden T-Lymphozyten als die Haupteffektoren der immunen Antitumorantwort identifiziert. Jedoch haben neue Studien gezeigt, dass CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, bezeichnet als regulatorische T-Zellen (Treg), in der Tumorumgebung akkumulieren und die Tumor-spezifische T-Zell-Antworten unterdrücken können und dadurch die Tumorrejektion verhindern³⁹. Das Vorhandensein von infiltrierenden CD4⁺CD25⁺ Treg kann der Immunantwort des Patienten in der Verteidigung gegen den Tumor hinderlich sein¹⁷⁷, während das Vorhandensein der Effektor-T-Lymphozyten, einschließlich CD8⁺ T-Zellen, NK-Zellen und eosinophiler Granulozyten vorteilhaft sein kann¹²². Durch Tumortransformation, virale Infektion oder andere Ereignisse kann es zu einem Verlust oder einer substanziellen Veränderung der *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse I-Moleküle kommen. Auf diese Weise transformierte Zellen können sich leicht der Detektion durch T-Zellen entziehen. NK-Zellen lysieren spontan transformierte oder Virus-infizierte Zellen, aber töten nicht normale Körperzellen. Die Anfälligkeit der Zielzelle für diese spontane Zytotoxizität ist umgekehrt proportional zur Menge an MHC-Klasse I-Molekülen auf der Zelloberfläche¹⁷⁸. Diese Eigenschaft, ohne vorherige Sensibilisierung und ohne zusätzliche Aktivierung Tumorzellen zu lysieren, verleiht den NK-Zellen eine große Bedeutung bei der Bekämpfung von Tumorzellen, die sich der T-Lymphozyten vermittelten Immunabwehr entziehen. Eine weitergehende Aktivierung der NK-Zellen ist durch Zytokine,

beispielsweise IL-2, IL-12, IL-15 und Interferone wie Interferon- α und Interferon- β möglich. Effektoren der NK-Zell Aktivität sind zytotoxische Substanzen wie Perforin, Granzyme und TNF- α sowie Entzündungsreaktionen stimulierende Zytokine und Chemokine, zum Beispiel INF- γ und GM-CSF.

Die Entwicklung von soliden Tumoren ist verbunden mit und abhängig von der Gefäßneubildung, der Neovaskularisierung zur Versorgung des wachsenden Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen. Es konnte festgestellt werden, dass dieser Prozess durch Tumor-assoziierte normale Zellen, Immunzellen, Endothelzellen und stromale Zellen gefördert wird. Insbesondere infiltrierende Immunzellen unterstützen mit ihrem Repertoire an Wachstumsfaktoren und Proteasen die Angiogenese. Besonders Makrophagen und ihre Chemoattraktanten (z.B. Makrophage chemoattractant protein-1, MCP-1) sind dabei hervorzuheben⁴¹. Die Rekrutierung der einwandernden Lymphozyten und Monozyten erfolgt durch ein komplexes Gemisch verschiedenster Chemokine, die von Tumor oder Tumor-assoziierten Stromalen Zellen ausgeschüttet werden. Eine Veränderung der Zusammensetzung und Wirksamkeit dieses Chemokine variiert die Menge und Aktivität der Tumorf infiltrierenden Immunzellen und nimmt so Einfluss auf das Überleben des Tumors im Patienten. Ziel einer verbesserten Krebs-Immuntherapie sollte folglich eine Verstärkung der Einwanderung von Antitumor-T-Lymphozyten und NK-Zellen sein bei gleichzeitiger Hemmung von lokalen Treg-Zellen und Angiogenese-fördernden Makrophagen.

Bei den Untersuchungen zum Migrationsverhalten von THP-1-, Jurkat- und NK92-Zellen bei Verwendung von konditioniertem Medium von mit DP4-Inhibitoren behandelten Tumorzelllinien und transfizierten Zelllinien als Lockmittel, zeigte sich keine eindeutige Korrelation zwischen Inhibitorwirkung und Vorhandensein von DP4 (Tabelle 9, 10). Eine Ausnahme bildet das Verhalten von THP-1-Zellen bei Lockung mit Kulturüberständen von DP4-positiv getesteten Zellen. Hier führt die Gabe von Inhibitoren der DP4 zu einer beschleunigten Migration der THP-1-Zellen.

Des Weiteren fällt auf, dass eine Inhibitorwirkung bei Inkubation mit Zellen, die mutierte Varianten von DP4 und FAP exprimieren bzw. weder über DP4 noch FAP verfügen, festzustellen war. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen einer Tierstudie mit DP4 (-/-) Mäusen die von Adams *et al.*⁹² durchgeführt wurde. Sie konnten zeigen, dass der DP4-Inhibitor PT100 seine Wirksamkeit bei der Stimulation der Ausschüttung verschiedener Zytokine in den DP4-negativen Mäusen nicht verliert.

Eine abschließende Erkenntnis über den Einfluss der DP4-Inhibitoren auf die wechselseitigen Zytokinausschüttungen ist auf Grund komplexer Wechselwirkungen zwischen Tumor und Wirt erst im Tiermodell möglich.

In den Tierstudien mit dem murinen Fibrosarkom WEHI 164 konnten Adams *et al.* bei Gabe von PT100 eine deutliche Erhöhung der mRNA-Level verschiedener Zytokine und Chemokine, z.B. CXCL1, CXCL10, IL1 β , in den benachbarten Lymphknoten als auch in den

Tumoren selbst feststellen⁹¹. Bei der Untersuchung der mRNA-Level dieser Zytokine und Chemokine in verschiedenen Tumorzelllinien (Schilddrüsen-, Pankreaskarzinom- bzw. Sarkomzelllinien), die *in vitro* mit den unterschiedlichen DP4-Inhibitoren behandelt wurden, konnte keine signifikante Erhöhung der Expression dieser Zytokin und Chemokine festgestellt werden (Probiodrug). Beispielsweise war bei einer Gabe von 100 μM P32/98 bzw. 10 μM UG125 in das Kulturmedium von PA-TU-8988S (DP4 positiv), PA-TU-8988T (DP4 negativ) kein Einfluß auf die Genaktivität ausgewählter Zytokin und Chemokine (z.Bsp: IL1 β , CCL2, CXCL1) zu beobachten. Dies deutet daraufhin, dass die Zytokin- und Chemokin-Expression modulierende Wirkung der Inhibitoren erst *in vivo* mit dem Eingriff in die Tumor-Wirt-Wechselwirkungen entfaltet werden kann. Es kann angenommen werden, dass in den *in vitro* Versuchen die sich gegenseitig beeinflussenden Wechselwirkungen mit dem Immunsystem des Körpers fehlen. Die fehlende Rückkopplung zum System sowie die kurze Versuchsdauer wären eine Erklärung für die nur geringfügig, ca. 20 – 30 %, gesteigerte Anzahl an migrierten Immunzellen in den *in vitro* Versuchen dieser Arbeit. Unter Beachtung der Ergebnisse des Einflusses von Inhibitoren der DP4 auf die Zelladhäsion und die Migration von Immunzellen können die beobachteten Ergebnisse der Injektion von MADB106 Adenocarcinomzellen in F344/Ztm- Ratten bei gleichzeitiger chronischer Gabe verschiedener DP4-Inhibitoren eher auf eine immunmodulierende Wirkung der Inhibitoren als auf eine Inhibierung der Zelladhäsion zurückzuführen sein.

5.4. Untersuchungen des Zellwachstums und der Morphologie

Die Fähigkeit maligner Zellen sich den Regulationsmechanismen für Wachstum und Differenzierung zu entziehen, ist eine der Voraussetzungen für die Entwicklung von Tumoren. Dabei werden zwei grundlegende Wirkungsweisen unterschieden, zum einen die konstitutive Aktivierung der Wachstums-Signaltransduktionswege durch Produkte von Onkogenen und zum anderen die Veränderung der Produktion von Wachstums-modulierenden Substanzen bzw. deren Rezeptoren. Die Veränderung der Produktion von Wachstumsfaktoren kann parakrinen Charakters sein, indem zum Beispiel rekrutierte Leukozyten durch ihre Ausschüttung von Zytokinen die Tumorentwicklung stimulieren¹⁷⁹. Die Tumorzellen selbst sind durch die autokrine Wirkung der von ihnen sezernierten Substanzen in der Lage ihre eigene Entwicklung zu fördern¹⁸⁰. Ziel einer verbesserten Tumorthherapie könnte ein Eingriff in die beschriebenen Regulationskreisläufe zu Gunsten einer Reduzierung der Wachstumsstimulation hin zu einer Redifferenzierung.

Während des fünftägigen Proliferationstests zeigte sich kein Unterschied in der Proliferationsrate zwischen den nicht transfizierten HEK-293-Zellen und den mit Vektor transfizierten Klonen sowie den DP4- und FAP-exprimierenden HEK-293-Zellen (Abb. 15). Die von Wesley *et al.* beschriebene Kontaktinhibierung des Wachstums von DP4 transformierte SK-LUC-8⁸⁷ konnte mit den HEK-293-Klonen nicht beobachtet werden.

In ihren Arbeiten zeigten Wesley *et al.*, dass mit der Reexpression von DP4 in Melanozyten,

humanen nicht kleinzelligen Lungenkarzinomzellen und Prostatakrebszellen deren Fähigkeit zum Kontakt-unabhängigen Wachstum sinkt^{87,166,181}. Dieselbe Beobachtung wurden mit den die aktiven und inaktiven DP4 Varianten exprimierenden HEK-293-Zellen gemacht (Abb. 30). Zusätzlich dazu konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von FAP ebenfalls die Fähigkeit der Zellen zum Kontakt-unabhängigen Wachstum reduziert, wobei dieser Effekt deutlich geringer ausfällt im Vergleich zu den Folgen einer DP4-Expression. Wenn man die Fähigkeit von Tumorzellen zum Kontakt-unabhängigen Wachstum in Softagar als Maß der Dedifferenzierung und autokrinen Wachstumsstimulation ansieht, war es im Rahmen dieser Arbeit möglich einen Einfluss der DP4- und FAP-Expression auf diese Parameter zu zeigen. Da die beobachtete Wachstumshemmende Wirkung von der enzymatischen Aktivität der überexprimierten Enzyme unabhängig ist, kann eine proteolytische Modulation der Wirkung der Wachstumsfaktoren ausgeschlossen werden, und es sind andere Mechanismen in Betracht zu ziehen.

Eine weitere Veränderung als Begleitung der DP4- und FAP-Expression war bei den HEK-293-Klonen und in besonderem Maße bei den wildtyp Tumorzelllinien zu beobachten. Während die mit dem Leervektor transfizierten HEK-293-Zellen und DP4-negativen Tumorzellen eine spindelförmige Morphologie aufweisen und nur vereinzelte Zell-Zell-Kontakte ausbilden (Abb. 12A, D; 31A, B; 32A-C), formten DP4-überexprimierende HEK-293-Zellen (Abb. 12B, C; 31C, D) und die DP4-positiven Tumorzelllinien kompakte Kolonien und zeigten eine Kopfsteinpflaster-artige Morphologie (Abb. 32D, E). Besonders deutlich wird dies beim Vergleich der aus demselben Patienten stammenden Zelllinien PA-TU-8988T und PA-TU-8988S. Der Effekt der Transformation der HEK-293-Zellen mit DP4 auf die Kolonieform ist geringer, doch auch hier werden eher zusammenhängende Zellverbände gebildet (Abb. 32C, D). Während der Einfluss einer DP4-Reexpression auf die Zellmorphologie durch verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt wurde^{153,166}, konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Transfektion mit FAP zu einem vergleichbaren Effekt führt und verstärkte Zell-Zell-Kontakte ausgebildet werden (Abb. 31E, F) und die Zellmorphologie beeinflusst wird (Abb. 12E, F).

5.5. Untersuchung zur Phosphorylierung und differentiellen Genexpression

Die Kinasen ERK1/2, p38 und JNK gehören zur MAP-Kinase Familie und stellen die Schlüsselkinasen von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen dar. Durch Kinasen dieser Familie werden zum Beispiel die Signale von Wachstumsfaktorrezeptoren, Rezeptoren von Chemokinen und Zytokinen sowie G-Protein gekoppelter Rezeptoren übertragen. Sie stellen damit ein wichtiges Element zur Reaktion der Zellen auf Stimulation zu Proliferation, Differenzierung, Stress und Entzündung dar. Huntington *et al.* konnten zeigen, dass die Überexpression von MMP-1 und damit die Invasivität von Melanomazellen durch den MEK/ERK-Signalweg vermittelt wird und dass eine Blockierung der MEK/ERK-Aktivität zu einer verringerten Proliferation, Kollagen-Degradation und damit zu einer Reduzierung des

invasiven Phänotyps führt¹⁸². In Arbeiten mit metastasierenden Prostatakarzinomzellen zeigten Wesley *et al.*, dass nach der Transfektion mit DP4 die Phosphorylierung von ERK1/2 zurückgeht¹⁸¹. Dabei wurde beobachtet, dass mit der Reexpression von DP4 in Prostatakarzinomzellen ein Reduktion des malignen Phänotyps einhergeht⁸⁷. Dieser Effekt wurde von ihnen mit der verringerten Aktivierung der MAP Kinase ERK1/2 in Verbindung gebracht. Eine durch die Expression von wildtyp DP4 in den transformierten HEK-293-Zellen hervorgerufene reduzierte Aktivierung der Kinase ERK1/2 wurde nicht beobachtet (Abb. 33, 34). Ein Grund für diese Diskrepanz könnte der fehlende maligne Phänotyp der verwendeten HEK-293-Zellen sein. Dagegen gelang erstmalig im Rahmen dieser Arbeit der Nachweis einer Abhängigkeit der Aktivierung der ERK1-Kinase von der enzymatischen Aktivität der DP4 und des FAP. Ebenso war eine differenzierte Aktivierung der ERK1- und ERK2-Kinasen durch Überexpression von DP4 und FAP in HEK-293-Zellen zu beobachten.

Mit unseren Untersuchungen konnte erstmals gezeigt werden, dass die Überexpression von DP4 und FAP im Gegensatz zu ERK1/2 sowohl keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von p38 und NF-κB als auch auf deren Expressionsgrad hat (Abb. 35, 37). Im Unterschied dazu beschrieben Yamochi *et al.* eine Steigerung der p38-Phosphorylierung und keinen Einfluss auf die JNK-Aktivierung der DP4-Überexpression in Jiyoye-Zellen¹⁸³. In dieselbe Richtung weisen die Untersuchungen mit KARPAS-299-Zellen, in denen durch Transfektion mit siRNA die DP4-Expression reduziert wurde, was zu einer Reduktion der p38-Phosphorylierung führte. Der Grund für die ungleiche Aktivierung der Signalkaskaden dürfte die unterschiedliche Herkunft der Zellen sein. Im Gegensatz zu den epithelialen HEK-293-Zellen handelt es sich bei Jiyoye- und KARPAS-299-Zellen um hämatopoetische Zellen.

Wang *et al.* konnten in ihrer Arbeit mit transient transfizierten HEK-293-Zellen eine gesteigerte Apoptose in Gegenwart von 4 μM Staurosporin in den DP4- und FAP-exprimierenden Zellen nachweisen¹⁶⁷. Wir wiesen mit unterschiedlichen Methoden eine Aktivierung von an der Apoptose beteiligten Prozessen in FAP-exprimierenden HEK-293-Zellen nach. Mittels Westernblot konnte in den FAP- transfizierten Klonen eine schwache Phosphorylierung der Kinase JNK gezeigt werden (Abb. 36). In verschiedenen vorausgegangenen Arbeiten wurde beobachtet, dass das Verhältnis der Aktivitäten von NF-κB und JNK für das Überleben der Zellen von Bedeutung ist, bzw. dass die Aktivierung von JNK zur Induktion der Apoptose Mechanismen führt^{133,135,136}. Da NF-κB wie gezeigt durch die FAP-Expression unbeeinflusst blieb, könnte man hier eine Induktion der Apoptose oder einer gesteigerten Sensivität für proapoptotische Signale vermuten. Durch fluorometrische Bestimmung der enzymatischen Aktivität der im Apoptose-Signalweg downstream liegenden Caspase-3 und Caspase-7 konnte mit einer zweiten Methode eine Aktivierung dieser Kaskade in FAP-exprimierenden Klonen bestätigt werden (Abb. 43). Die beobachtete geringfügige Aktivierung der JNK-Kinase und die gesteigerte Caspase-3- und Caspase-7-Aktivität könnte Ausdruck einer gesteigerten Sensivität für proapoptotische Signale sein. Daneben zeigte sich in den FAP- exprimierenden HEK-293-Klonen eine Anreicherung der Zellen in der G0/G1-

Phase des Zellzyklus (Abb. 44). Die beobachteten Unterschiede in der Effektor-Caspase-Aktivität und im Zellzyklus der FAP-exprimierenden HEK-293-Klone erweist sich als zu gering, um sich in einem fünftägigen Proliferationstest als signifikante Differenz in den Zellzahlen zu etablieren.

In den Arbeiten mit Schilddrüsenkarzinomzellen zeigten Kehlen *et al.*, dass eine Überexpression von Aminopeptidase N (APN, CD13) zu einer Reduktion der DP4- und FAP-Expression dieser Zellen führt¹⁵⁸. Des Weiteren war zu beobachten, dass CD13 in Schilddrüsenkarzinomzellen als Marker für den Grad der Malignität der verschiedenen Tumorstadien angesehen werden kann. Die CD13-Expression könnte somit als ein Zeichen für den fortschreitenden Verlauf des epithelialen-mesenchymalen Übergangs angesehen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass DP4 aber nicht FAP die Expression von CD13 reduziert. Die mit der wildtyp bzw. mutierten DP4 transfizierten HEK-293-Zellen zeigten eine Reduktion der CD13-Expression (Tab. 12). Dies wird begleitet von einer gesteigerten E-Cadherin-Expression (Abb. 38), verstärkten Zell-Zell-Kontakten (Abb. 31C, D), reduzierter Fähigkeit zum Kontakt-unabhängigen Wachstum (Abb. 30) und verringerter Motilität (Abb. 26). Die Summe dieser Ergebnisse kann als Hinweise auf eine Verringerung der Malignität und einem gestiegenen epithelialen Charakter der Zellen gewertet werden. Bei den mit wildtyp bzw. mutiertem FAP transfizierten HEK-293-Zellen hingegen sind nicht alle der untersuchten Zelleigenschaften in gleicher Weise Veränderungen unterworfen wie durch die DP4-Transfektion. So wurde in den FAP-exprimierenden HEK-293-Klonen eine gesteigerte E-Cadherin-Expression (Abb. 38), ein verstärkter Zell-Zell-Kontakt (Abb. 31E, F) und eine verringerte Motilität (Abb. 26) beobachtet. Die Fähigkeit zum Kontakt-unabhängigen Wachstum (Abb. 30) war dagegen nur geringfügig reduziert. Die DP4 stellt damit unabhängig von ihrer enzymatischen Aktivität eine Oberflächenmolekül dar, dessen Expression im Prozess der EMT einer Veränderung unterliegt^{158,184,185}. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten lassen den Schluss zu, dass die veränderte Oberflächenexpression der DP4 nicht nur das Endergebnis einer Kette verschiedener Prozesse während des EMT ist, sondern dass die Veränderungen der Zelleigenschaften an den Verlust des DP4-Moleküls als wichtiges Zelloberflächen-Molekül epithelialer Zellen gekoppelt ist. Die DP4 stellt möglicherweise nicht nur ein Markerprotein epithelialer Zellen dar, sondern scheint durch Interaktionen mit weiteren Proteinen an der Ausbildung der epithelialen Eigenschaften beteiligt zu sein. Durch die DP4 aktivierte MAK-Kinase-Signalwege könnten bei der Modulation der Zelleigenschaften eine Rolle spielen. Gestützt wird diese These durch die Ergebnisse der Arbeiten mit den Tumorzelllinien. Besonders deutlich wird dies beim Vergleich der Zellen der Zelllinien PA-TU-8988T und PA-TU-8988S. Obwohl gleichen genetischen Hintergrunds führt der Verlust der DP4 auf der Oberfläche der PA-TU-8988T zu einem Verlust epithelialer Eigenschaften, wie zum Beispiel der E-Cadherin-Expression (Abb. 42) und intensiver Zell-Zell-Kontakt, welche sich in einer veränderten Zellmorphologie äußert (Abb. 32C, D). Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen Kajiyama *et al.* in ihrer Arbeit. Sie konnten zeigen, dass die Überexpression von enzymatisch aktiver DP4 in der

Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 zu einer Steigerung der E-Cadherin-, TIMP1- und TIMP2-Proteinmenge führt. Ebenso konnte eine Veränderung der Zellmorphologie beobachtet werden, die auf einen epithelialen Charakter der DP4-exprimierenden Zellen hinweist¹⁵². Die Folge dieses molekularen Umbaus ist eine Reduktion des malignen Potentials der mit DP4-transfizierten Zellen, das zu einer verringerten Metastasenbildung und einer gesteigerten Überlebensrate der Mäuse führt, denen die Ovarialkarzinomzellen gespritzt wurden⁸⁶. Die Resultate dieser *in vivo* Studie unterstreichen noch einmal die Bedeutung der DP4 in der Differenzierung epithelialer Zellen.

Einen interessanten Ansatz für weitere Untersuchungen liefern eigene Ergebnisse eines Vorversuches mit immobilisierter DP4. Membranprotein-Präparationen der humanen Glioblastomlinie U-343 wurden über eine Säule mit an NHS-Sepharose immobilisierter gereinigter Schweinenieren-DP4 gegeben. Nach dem Waschen wurden die gebundenen Proteine durch 1 M NH₄SCN, 150 mM Glycin pH 3,5 eluiert. Anschließend wurde das Eluat mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die 3 stärksten Banden ausgeschnitten. Um die Gefahr der Kontamination mit Proteinen aus Kälberserum zu vermindern, erfolgte eine parallele Auftrennung von FCS im selben Gel. Die Proteine in den ausgeschnittenen Banden wurden tryptisch verdaut und die Peptide anschließend mittels MALDI-MS und Fragmentierung durch *post source decay* analysiert. Aus den Fragmentierungsmustern konnte auf eine Reihe möglicherweise in der Probe enthaltende Proteine geschlossen werden. Neben verschiedenen intrazellulären Proteinen, die auf Grund der Verwendung einer Membranprotein-Präparation ausgeschlossen werden konnten, ergaben sich Sequenzhomologien mit Fibrilin, Low-density Lipoprotein receptor related protein 1 (CD91), Low-density Lipoprotein receptor related protein 2 (LRP-2), Wnt-2 sowie Wnt-16. Low-density Lipoprotein receptor related Proteine sind als Bindungspartner von Matrixmetalloproteasen (MMP) und des urokinase Plasminogenaktivatorrezeptor (uPAR) beschrieben und für deren Internalisierung und deren zellulären Katabolismus verantwortlich^{186,187}. Daneben kommt den LPR als Korezeptoren des Frizzled-Rezeptors eine Bedeutung in der Wnt-Signaltransduktion zu¹⁸⁸. Sowohl die MMPs, das Plasminogen-System als auch die Wnt-Signaltransduktion spielen eine wichtige Rolle in der Tumorentwicklung. Eine Interaktion der DP4 mit diesen Komponenten könnte deren Einfluss auf die Tumorentwicklung begründen.

Ein im Vergleich zu den epithelialen Tumoren gegenteiliger Effekt der DP4-Expression wurde bei Zellen verschiedener Lymphome beobachtet. Patienten mit CD26-positiv getesteten T-Zell-Lymphomen hatten eine deutliche schlechtere Prognose hinsichtlich der Überlebenszeit gegenüber Patienten mit CD26-negativ getesteten T-Zell-Lymphomen⁸⁸. Dies konnte in einem Tiermodell von Sato *et al.* bestätigt werden. Sie konnten zeigen, dass bei KARPAS-299-Zellen eine Reduktion der endogenen DP4-Expression durch siRNA zu einer Herabsetzung der Metastasenbildung führte. Damit verbunden war eine Erhöhung der Überlebensrate der in dem Versuch eingesetzten SCID-Mäuse. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Senkung der DP4-Oberflächenexpression mit einer Verringerung der β 1-

Integrin-Phosphorylierung einhergeht, ebenso ist die Adhäsion an Fibronectin und Kollagen I reduziert⁸⁹. Die Ergebnisse der Untersuchungen von Yamochi *et al.* mit der humanen Burkitt B-Zelllymphom-Linie Jiyoye deuten aber darauf hin, dass noch weitere Faktoren die Malignität von Lymphomen beeinflussen¹⁸³.

Unabhängig von dem gezeigten Einfluss auf die Malignität konnte in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen werden, dass die Sensivität unterschiedlicher Lymphome für Doxorubicin durch die DP4-Expression erhöht wird. Doxorubicin ist ein in der Krebstherapie viel benutztes Anthracyclin-Antibiotikum mit einem breiten Spektrum antineoplastischer Aktivität gegen solide Tumoren und hämatologische Entartungen. Die Wirkung des Doxorubicins beruht auf der Interkalation in die DNA. Die dabei während der DNA-Replikation verursachten Schäden führen durch Inhibierung der Dephosphorylierung der p34^{cdc2}-Kinase zu einem Arrest in der G₂-Phase. Auf Grund des Wirkmechanismus ergibt sich besonders für proliferierende Zellen eine Sensivität gegenüber Doxorubicin. Da CD26 an der Aktivierung von Lymphozyten beteiligt ist^{78,79,189}, lässt sich damit deren erhöhte Sensivität gegenüber Doxorubicin erklären.

Sowohl bei DP4 als auch bei FAP zeigte die enzymatische Aktivität keinen Einfluss auf die Proliferation über einen Zeitraum von fünf Tagen, Zelladhäsion und Migration der transformierten Zellen. Ebenso konnte kein Zusammenhang zwischen Inhibitorgabe und einem Effekt auf die Zelladhäsion und Migration nachgewiesen werden. Es kann daher angenommen werden, dass die beobachteten Einflüsse einer DP4- bzw. FAP-Expression durch die Regulation von zellulären Prozessen oder Signalwegen unabhängig von der enzymatischen Aktivität erfolgen. Vorhergehende Publikationen konnten zeigen, dass für die Interaktion des Multifunktionsmolekül DP4 mit ADA, CD45 und CXCR4 die enzymatische Aktivität nicht erforderlich ist¹⁸⁴. Durch Kolokalisierung der Tyrosinphosphatase CD45 mit CD26 in *lipid rafts* kann DP4 unabhängig von der enzymatischen Aktivität Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung nehmen. Ein Beispiel vergleichbar zur DP4 ist die Neutrale Endopeptidase (NEP), eine weitere Zelloberflächenprotease. Die Blockierung der enzymatischen Aktivität von NEP, entweder durch kompetitive Inhibitoren oder Mutation des aktiven Zentrums, konnte den Einfluss auf die Phosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und Zellmigration nicht vollständig ausschalten¹⁹⁰. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die Expression von NEP auf der Zelloberfläche die FAK-Dephosphorylierung über einen Mechanismus unabhängig von der katalytischen Aktivität induzieren kann. Vergleichbar könnten auch die DP4 und FAP einen Teil ihre Funktion über einen Mechanismus vermitteln, für den die enzymatische Aktivität nicht von Bedeutung ist.

Durch die Kokultivierung humaner Fibroblasten und der HEK-293-Klone, PA-TU-8988S- und PA-TU-8988T-Zellen konnten in begrenztem Maße Tumor-Stroma-Interaktionen nachempfunden werden und die Bedeutung von DP4 und FAP sowie deren enzymatische Aktivität auf die Zell-Zell-Kommunikation untersucht werden. Hervorzuheben ist hierbei, dass bei diesem Modell keine direkten Zell-Zell-Kontakte auftreten sondern die Stimulation

ausschließlich über lösliche Moleküle erfolgt. Neben einer von der DP4- und FAP-Expression der Tumorzellen unabhängigen Veränderung der Genexpression in den humanen Fibroblasten konnte ebenso eine differentielle Genexpression in Abhängigkeit vom Vorhandensein von DP4 und FAP auf den kokultivierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 45, 46). Als Ergebnis ihrer Kokultivierungsversuche von verschiedenen Melanomlinien mit humanen Vorhautfibroblasten beschrieben Gallagher *et al.* ebenfalls eine erhöhte Expression von CXCL8, CXCL1 und IL-1 β in den Fibroblastenzellen. Zusätzlich konnten sie im Gegensatz zu uns eine deutliche Aktivierung der uPA und MMP-1-Expression nachweisen¹⁹¹. Eine Erhöhung der MMP-1-mRNA-Menge konnten wir als direkte Folge der Kokultivierung nicht beobachten, jedoch als sekundären Effekt einer IL-1 β Ausschüttung messen (Abb. 47). Ein interessanter Aspekt ist in diesem Zusammenhang die parallele Aktivierung der MMP-1- und FAP-Expression bei Stimulation der Fibroblasten mit IL-1 β . Für FAP ist bisher kein natürliches Substrat außer α 2-Antiplasmin beschrieben, Christiansen *et al.* konnten jedoch zeigen, dass FAP in der Lage ist Spaltprodukte der MMP-1-Spaltung von Kollagen I und III weiter umzusetzen¹⁹². Eine gleichzeitige Bereitstellung beider Enzyme könnte daher für die Prozesse des ECM-Abbau erforderlich sein.

IL-1 β , CXCL8 und CXCL10 gehören zu den proinflammatorischen Zytokinen. Während jedoch IL-1 β und CXCL8 zusätzlich über unterschiedliche Mechanismen die Tumorprogression fördern¹⁹³⁻¹⁹⁵, wurde für CXCL10 eine Angiogenese-hemmende Wirkung beschrieben^{196,197}. Eine Reduktion der CXCL8-Menge mittels spezifischer Antikörper führte zu einem verringerten Auswachsen von humanen Melanomzellen in einem Mausmodell¹⁹⁸. Die Gabe von CXCL10 verstärkt die Wirkung einer Cisplatin-Therapie gegenüber Lewis Lungenkrebs- und Dickdarmkarzinomzellen in Mäusen¹⁹⁹.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zytokin- und Chemokinausschüttung stellen nur einen geringen Teil der Zell-Zell-Kommunikation dar. Des Weiteren sind sowohl Tumorwachstum-fördernde als auch -hemmende Zytokine in ihrer Expression verändert. Auf Grund der komplexen Wechselwirkungen der hemmenden und fördernden Einflüsse ist eine abschließende Bewertung an Hand der *in vitro* Untersuchungen nicht möglich. Um jedoch ein Gesamtbild der Auswirkungen der verschiedenen Zytokine und Chemokine auf das Tumorwachstum zu erhalten, sind in einem nächsten Schritt Tiermodelle notwendig.

In einer von der probiodrug AG in Auftrag gegebenen Tierstudie sollte der Einfluss von fünf verschiedenen DP4-Inhibitoren und Inhibitorvorstufen auf die Metastasenbildung der murinen Melanomlinie B16-F10 in der Lunge von Mäusen des Stammes Crl:B6D2F1 untersucht werden. Zusätzlich wurden an Tag 7 und Tag 14 des Versuches den Mäusen Blut abgenommen und die Serumkonzentration der Zytokine IL-2, IL-4, TNF- α , IL6, MCP-1 und IFN- γ bestimmt. Im Serum des an Tag 7 entnommenen Blutes konnte eine Steigerung der Konzentration von IL6 von durchschnittlich 7,11 pg/ml in der Kontrolle auf durchschnittlich 32,78 pg/ml bei zweimaliger Injektion pro Tag von 2 mg/kg UG125 beobachtet werden.

Ebenso war ein Anstieg der Serumkonzentration des MCP-1 von durchschnittlich 145 pg/ml in der Kontrolle auf durchschnittlich 374 pg/ml in den behandelten Tieren zu messen. Des Weiteren war eine Erhöhung der Serumkonzentration des IFN- γ von durchschnittlich 3,97 pg/ml in der Kontrolle auf 8,3 pg/ml in den behandelten Tieren zu beobachten. Während die Serumkonzentration des IL-6 an Tag 14 in den behandelten Tieren auf durchschnittlich 7,14 pg/ml gegenüber 4,25 pg/ml in der Kontrolle absinkt, war die im Serum gemessene MCP-1-Konzentration mit 125,46 pg/ml gegenüber den Kontrolltieren mit 84,17 pg/ml weiterhin erhöht. Ebenso war die INF- γ -Serumkonzentration in den mit UG125 behandelten Tieren am Tag 14 mit durchschnittlich 20,12 pg/ml gegenüber 3,54 pg/ml in den Kontrolltieren gesteigert. Keine Veränderung konnte bei den Serumkonzentrationen der Zytokinen IL-2, IL-4 und TNF- α festgestellt werden. Ebenso wurde kein Einfluss der weiteren im Versuch verwendeten vier Inhibitoren und Inhibitorvorstufen auf die Serumkonzentration der gemessenen Zytokine beobachtet. Der Versuch endete am Tag 21 mit der Tötung der Mäuse, der Bestimmung des Lungengewichts und einer semiquantitativen Bestimmung der Anzahl der Lungenmetastasen. Die Behandlung der Tiere mit dem DP4-Inhibitor UG125 führte zu einem reduzierten Lungengewicht von durchschnittlich 0,29 g im Gegensatz zu durchschnittlich 0,35 g in den Kontrolltieren und einer sichtbar reduzierten Anzahl an Metastasen im Lungengewebe. Die ebenfalls verwendeten weiteren 4 Inhibitoren bzw. Inhibitorvorstufen zeigten auch auf die Parameter Lungengewicht und Anzahl an Lungenmetastasen keinen Einfluss. Die Ergebnisse dieser *in vivo* Studie weisen auf ein therapeutisches Potential des DP4-Inhibitors UG125 hin. Hervorzuheben ist hierbei die mit der Inhibitorgabe einhergehende Steigerung der Serumkonzentration von INF- γ , denn der antiproliferative, proapoptotische und immunmodulierende Effekt des INF- γ ^{200,201} wird schon heute in der klinischen Praxis zur Anwendung gebracht.

Die Bedeutung des Immunsystems bzw. deren Zellen konnte in einem weiteren Experiment der probiodrug AG unterstrichen werden. Während die Kultivierung verschiedenster Tumorzellen in Gegenwart von DP4-Inhibitoren zu keiner signifikant erhöhten Produktion ausgewählter Zytokine führte, konnte gezeigt werden, dass die monozytäre Zelllinie THP-1 mit einer Steigerung der Produktion des Zytokins IL-1 β auf die Gabe von 10 μ M UG28 und 10 μ M UG125 und in abgeschwächter Form auf 100 μ M P32/98 reagiert. Bei den Zelllinien Jurkat und NK92 konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten die DP4-Inhibitoren P59/99 und UG92 sowie der FAP-spezifische Inhibitor SC415 in keiner der untersuchten Zelllinien einen Einfluss auf die Produktion der ausgewählten Zytokine und Chemokine. Da strukturell mit P32/98 und UG125 nicht vergleichbare DP4- und FAP-Inhibitoren keinen Effekt hervorrufen, kann davon ausgegangen werden, dass die im Tiermodell beobachtete Wirkung der Inhibitoren P32/98 und UG125 wahrscheinlich nicht durch DP4 oder FAP vermittelt wird. Gestützt wird diese Annahme ebenfalls durch die Ergebnisse der Studie von Adams *et al.* in der sie nachwiesen, dass der DP4 Inhibitor PT100 seinen immunmodulierenden und Tumor-hemmenden Effekt auch in DP4-defizienten

Mäusen entfalten kann⁹². Ein besonderes Augenmerk sollte auf die Ergebnisse der Kultivierung von KARPAS-299-Zellen in Gegenwart der Inhibitoren UG125 und P32/98 gelegt werden. Die Zellen der humanen anaplastischen Lymphom-Zelllinie KARPAS-299 zeichnen sich durch ein für regulatorische T-Zellen typisches mRNA- und Oberflächenexpressions-Muster aus und sind in der Lage die Proliferation von aus peripherem Blut gewonnenen mononukleären Zellen zu hemmen²⁰². Nach einer 2-tägigen Kultivierung der KARPAS-299-Zellen mit 1 μ M UG125 und 100 μ M P32/98 konnte eine Hemmung der Proliferation und 30 % spätapoptotische und nekrotische Zellen nachgewiesen werden. Der strukturell nah verwandte Inhibitor UG28 sowie die Inhibitoren P59/99 und SC415 zeigten dagegen keinen Effekt. Ebenso konnte kein Einfluss der DP4-Inhibitoren und des FAP-Inhibitors auf die Proliferation verschiedener Tumorzelllinien gefunden werden. Die spezifische zytotoxische Wirkung der Inhibitoren P32/98 und UG125 gegenüber der Lymphomzelllinie KARPAS-299 könnte als eine Erklärung für den in den unterschiedlichen *in vivo* Studien beobachtete immunmodulierende Effekt der Inhibitorgabe betrachtet werden. Eine Hemmung der Proliferation bzw. Steigerung der Apoptose von Treg-Zellen sollte deren Tumor-fördernden Einfluss zurückdrängen und eine Immunantwort des Patienten gegenüber dem Tumor fördern. Zur Bestätigung dieser Theorie wäre es notwendig, die beobachtete Wirkung der Inhibitoren auf die KARPAS-299-Zellen mit aus Blut isolierten Treg-Zellen zu wiederholen. Des Weiteren empfiehlt sich eine Aufklärung des Wirkmechanismus der Inhibitoren zur Entwicklung spezifischerer Hemmstoffe, um unerwünschte Nebenwirkungen der DP4-Inhibierung auf die Modulation der Aktivität verschiedenster Peptide ausschließen zu können. Ein Proliferations- und Migrations-fördernder Effekt der DP4-Hemmung wurde zum Beispiel von Masur *et al.* an zwei humanen Dickdarmkrebs-Zelllinien untersucht¹¹⁹. Sie konnten nachweisen, dass die Inhibitorgabe die Lebensdauer von GLP-2 und damit dessen Proliferations- und Migrations-fördernden Beitrag verlängert.

In einer *in vivo* Studie mit NOD/SCID Mäusen war eine Abhängigkeit des Auswachsens von Tumoren aus injizierten HEK-293-Zellen von der enzymatischen Aktivität feststellbar (Abb. 48). Dies deutet auf eine Konkurrenz zwischen enzymatischer Aktivität und Oberflächenexpression der DP4 im Tumorgeschehen hin. Einerseits scheint das Molekül als solches in der Lage zu sein das Tumorwachstum zu fördern, während die enzymatische Aktivität diesem Effekt entgegenwirkt. Dabei spielen die mit der DP4-Überexpression einhergehenden weiteren differentiellen Genexpressionen eine Rolle. Zum Beispiel kann die DP4 mit Rezeptoren interagieren und könnte auf diese Weise deren Affinität oder Signaltransduktion beeinflussen⁶⁰. Andererseits stellt zum Beispiel der Ligand des Chemokinrezeptors CXCR4, das CXCL12 (SDF-1), ein natürliches Substrat der DP4 dar^{123,203}. Ein enzymatisch inaktives Protein kann Einfluss auf diese unterschiedlichen Aspekte nehmen und auf diese Weise die Tumorprogression fördern. Dies könnte zum Beispiel über die beschriebene Stimulation der EMT durch das SDF-1/CXCR4 System erfolgen²⁰⁴. Die Folgen einer solchen möglichen differenzierten Stimulanz der EMT in den Zellen der Tumoren sind in Abbildung 49 sichtbar. Die erhöhte E-Cadherin-Genaktivität kann

für verstärkte Zell-Zell-Kontakte und damit einer Kontaktinhibierung des Wachstums verantwortlich sein, während die niedrigere CXCL8-Genaktivität für eine reduzierte Angiogenese verantwortlich sein kann und so die Nährstoffversorgung der Tumoren limitiert. Beim FAP scheint dagegen eher die enzymatische Aktivität für das verstärkte Tumorstadium verantwortlich zu sein. In einem vergleichbaren Tiermodell konnten Cheng *et al.* ebenfalls zeigen, dass für die Tumorstadium-fördernde Wirkung des FAP dessen enzymatische Aktivität ausschlaggebend ist. In einem xenografen Tiermodell wurde von Cheng *et al.* beobachtet, dass nach Injektion von transformierten HEK-293-Zellen in C.B17/Icr-scid-Mäuse die den Leervektor und enzymatisch inaktives FAP exprimierenden Zellen nahezu gleich schnell wachsende Tumoren bildeten, wohingegen die Tumoren hervorgegangen aus den die enzymatisch aktive Variante des FAP exprimierenden Zellen größere Tumoren bildete¹⁰². Als Folge der Expression enzymatisch aktiven FAPs sind ähnlich wie bei der inaktiven DP4 die E-Cadherin-Genaktivität vergleichsweise erniedrigt, während die CXCL8-Genaktivität erhöht ist. Eine daraus resultierende verminderte Kontaktinhibierung des Wachstums auf Grund der reduzierten Zell-Zell-Interaktionen sowie einer umfangreicheren Nährstoffversorgung infolge einer CXCL8 geförderten Angiogenese, können das verstärkte Wachstum dieser Tumoren erklären. Der Einfluss der DP4- und FAP-Überexpression in den aus HEK-293-Zellen gebildeten Tumoren auf die FAP-Expression stromaler Zellen wurde in diesem Xenotransplantationsmodell nicht untersucht. Ein wichtiger Aspekt der systemischen Tumorentwehr konnte in den NOD/SCID Mäusen leider nicht untersucht werden. Da diese Tiere über keine T- und B-Zellen verfügen, war es nicht möglich, den Einfluss der DP4- und FAP-Expression auf die Interaktion der Tumorzellen mit Lymphozyten in diesem Modell zu untersuchen. Eine Wiederholung dieses Versuchs mit SCID Mäusen, welche mit humanen T-, B- und myeloiden Zellen ausgestattet sind, sollte das Bild über die Tumorentwicklung in Abhängigkeit der DP4- und FAP-Expression auf der Oberfläche von entarteten Zellen sinnvoll ergänzen²⁰⁵.

Hinsichtlich einer medizinisch pharmakologischen Anwendung deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass ein Proteaseinhibitor möglichst in der Lage sein sollte, zwischen FAP und DP4 zu selektieren, um eine Überlagerung der gegensätzlichen Effekte der Inhibierung von DP4 und FAP auf die Tumorstadiumprogression auszuschließen. Ein FAP-spezifischer Hemmstoff der Proteaseaktivität ist auf Grund der im Xenotransplantationsmodell beobachteten Effekte der Expression inaktiven FAPs als auch angesichts der Eingangs genannten häufig beschriebenen FAP-Expression auf stromalen Fibroblasten ein vielversprechender Ansatzpunkt für weitergehende Untersuchungen zur Behandlung von Karzinomen. Ein weiterer interessanter Ansatzpunkt wäre, die in den unterschiedlichen Studien beobachteten immunmodulierenden Effekte verschiedener DP4-Inhibitoren gezielt herauszuarbeiten und zu nutzen, ohne dabei die DP4 zu inhibieren.

6. Zusammenfassung

Metastasierende Krebserkrankungen sind die zweithäufigste Todesursache weltweit. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit sollten die zellulären und molekularen Ereignisse, die durch Dipeptidylpeptidase 4 (DP4) und *Fibroblast Activation Protein* (FAP, Seprase) vermittelt werden und zu möglicher unkontrollierter Proliferation, Invasion und Metastasierung führen, charakterisiert werden. Die Identifikation der Aktivitäts-vermittelten molekularen Mechanismen ist die Voraussetzung für die Entwicklung von Inhibitoren als neue Tumorthapeutika. DP4 ist eine membranständige Serinprotease mit spezifischen biologischen Funktionen im Tumorgeschehen, welche in Abhängigkeit vom Typus der Tumorzellen, der Gegenwart von Interaktionspartnern und der Art und Konzentration von Liganden und Substraten variieren. Zu den Substraten der DP4 gehören unter anderem Zytokine und Chemokine deren Rezeptorbindungseigenschaften durch Abspaltung eines Dipeptides vom N-Terminus moduliert werden. Humanes FAP besitzt 64 % Nukleotid- und 52 % Aminosäuresequenzidentität mit humaner DP4 und eine vergleichbare Tertiärstruktur. Gleichzeitig ist die biologische Funktion des FAP bisher unklar obwohl es zahlreiche Hinweise auf eine Beeinflussung der Tumorentwicklung gibt.

Stabil mit enzymatisch aktiven und inaktiven Varianten der humanen DP4 und des humanen FAP transfizierte HEK-293-Zellen wurden von uns als Modell für funktionelle Untersuchungen etabliert. Die Expression der Fusionsproteine aus Enzym und EGFP konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie und enzymatischen Tests nachgewiesen werden. Erstmals wurde die Bedeutung eines freien C-Terminus für die Ausbildung der enzymatisch aktiven Homodimere der DP4 und des FAP gezeigt. Im Vergleich zur N-terminalen Variante besitzen die Konstrukte mit EGFP am C-Terminus von DP4 und FAP eine stark reduzierte enzymatische Aktivität.

Unabhängig von der enzymatischen Aktivität zeigten DP4- und FAP-exprimierende Zellklone eine Reduktion der Adhäsion an Fibronectin-beschichtete Oberflächen, während die Zelladhäsion an Kollagen I-beschichtete Oberflächen unbeeinflusst blieb. Diese Beobachtung wurde von Tumorzellen, die endogen DP4 exprimieren, bestätigt. Der aus den Ergebnissen der in vivo Studie zur Metastasenbildung von MADB106-Zellen in Fischer Ratten gefolgerte Einfluss von DP4-Inhibitoren auf die Interaktion von DP4 mit Fibronectin war nicht zu belegen. Eine direkte Interaktion rekombinanter humaner DP4 mit humanem Fibronectin konnte mit der SPR-Methode und im ELISA nicht nachgewiesen werden. Dagegen war es möglich, die von der Salzkonzentration abhängigen elektrostatischen Wechselwirkungen der DP4 mit Kollagen I mittels BIACORE-Messungen zu bestätigen.

Die Untersuchungen der funktionellen Eigenschaften der verschiedenen HEK-293-Klone offenbarten eine von der enzymatischen Aktivität unabhängige Veränderung des Phänotyps der transfizierten Zellen hin zu einem eher epithelialen Charakter. Beide Enzyme hemmten die Zellmotilität. DP4 zeigte unabhängig von der enzymatischen Aktivität einen inhibierenden

Effekt auf das *anchorage independent* Wachstum im Softagar, was ein Maß für die Invasivität von Tumorzellen darstellt. Der Einfluss der FAP-Expression auf das Kontakt-unabhängige Wachstum hingegen war nicht signifikant. Dagegen war in den FAP-exprimierenden Transfektanten eine Erhöhung der Caspase-3/7-Aktivität und ein erhöhter Anteil von Zellen in der G0/G1-Phase zu beobachten. Die Überexpression von DP4 und FAP führte zu einer Veränderung der zellulären Phänotyps hin zu einer eher Kopfsteinpflaster-artigen Morphologie und zu verstärkten Zell-Zell-Interaktionen. Neben diesen funktionellen Veränderungen war eine Steigerung der E-Cadherin-Expression nachweisbar, was auf einen verringerten malignen Charakter hinweist, da der Verlust der E-Cadherin-Expression mit Tumorprogression und Metastasierung assoziiert ist.

Ein Einfluss der DP4- und FAP-Expression sowie deren enzymatischer Aktivität auf die Zell-Zell-Kommunikation mittels löslicher Signalmoleküle konnte in der *in vitro* Kokultur nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zur Interaktion von Tumor und Stromazellen ergaben, dass die Tumorzellen die Genexpression von Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL}1\beta$ und von Chemokinen wie CXCL1, CCL11, CCL5, CXCL10 und CXCL8 in kokultivierten Fibroblasten induziert. Erstmals zeigten wir, dass die Induktion der CXCL8-Genaktivität durch DP4- und FAP-exprimierende Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen geringer war, wohingegen die CCL11-Expression gesteigert wird. Da CXCL8 für seine Angiogenese-steigernde Wirkung bekannt ist und CCL11 eine die Tumorabwehr stärkende Wirkung durch Einwanderung von Eosinophilen zugeschrieben wird, könnten DP4 und FAP auf Tumorzellen zu einer Hemmung der Tumorprogression beitragen.

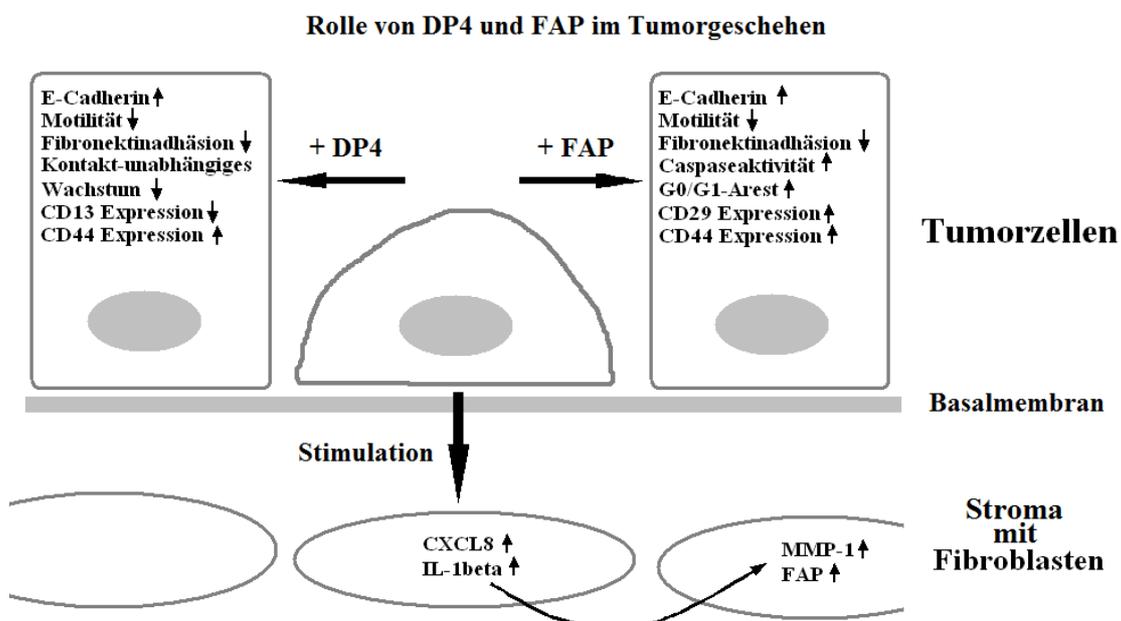


Abbildung 51: Rolle von DP4 und FAP im Tumorgeschehen

Dargestellt ist die Wandlung dedifferenzierter epithelialer Tumorzellen durch Expression von DP4 und FAP zu Zellen mit differenzierterer Morphologie begleitet von einer Veränderung der Zell-Zell-Kommunikation.

Zur Untersuchung des Einflusses der DP4- und FAP-Überexpression auf die komplexen Tumor-Wirt-Wechselwirkungen wurden die HEK-293-Klone im Xenotransplantationsmodell eingesetzt. Nach Injektion in NOD/SCID-Mäuse bildeten die Zellen, welche die inaktive Form der DP4 exprimieren die größten Tumoren. Die zweitgrößten Tumoren waren bei FAP-exprimierenden Zellen sichtbar. Dagegen führte enzymatisch aktive DP4 und enzymatisch inaktives FAP auf der Oberfläche der HEK-293-Zellen zu keinem gesteigerten Tumorwachstum.

Bezüglich der Bedeutung der enzymatischen Aktivität zeigten sich in den *in vitro* Untersuchungen keine Differenzen in den untersuchten funktionellen Eigenschaften zwischen den aktive oder inaktive Varianten exprimierenden Zellen. Jedoch waren Unterschiede im Verhalten der Klone in der Kokultur und insbesondere in der Xenotransplantationsstudie zu beobachten. Die Ergebnisse der Xenotransplantationsstudie unterstreichen, dass eine Hemmung der DP4 für viele Tumorentitäten kontraproduktiv zu sein scheint. Dagegen stellt FAP gemäß den Resultaten des Tiermodells ein geeignetes Target für einen Inhibitor zur Tumorthherapie dar. Zudem wird bei Tumoren epithelialer Herkunft häufig eine FAP-Expression auf den umgebenden stromalen Zellen beobachtet und macht die Seprase damit zu einem interessanten Objekt für weitere Untersuchungen. Hinsichtlich einer medizinisch pharmakologischen Anwendung bedeuten unsere Ergebnisse, dass ein Proteaseinhibitor in der Lage sein muss, zwischen FAP und DP4 zu selektieren.

7. Literaturverzeichnis

1. Ross, J. S., Fletcher, J. A., Bloom, K. J., Linette, G. P., Stec, J., Symmans, W. F., Pusztai, L., and Hortobagyi, G. N. Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Mol.Cell Proteomics.*, 3: 379-398, 2004.
2. McMahon, G. The genetics of human cancer: implications for ecotoxicology. *Environ.Health Perspect.*, 102 Suppl 12: 75-80, 1994.
3. Guo, W., Lasky, J. L., III, and Wu, H. Cancer stem cells. *Pediatr.Res.*, 59: 59R-64R, 2006.
4. Friedl, P. and Wolf, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat.Rev.Cancer*, 3: 362-374, 2003.
5. Friedl, P., Hegerfeldt, Y., and Tusch, M. Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int.J Dev.Biol*, 48: 441-449, 2004.
6. Friedl, P. and Wolf, K. Proteolytic and non-proteolytic migration of tumour cells and leucocytes. *Biochem.Soc Symp.*, 277-285, 2003.
7. Foxall, C., Watson, S. R., Dowbenko, D., Fennie, C., Lasky, L. A., Kiso, M., Hasegawa, A., Asa, D., and Brandley, B. K. The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide. *J Cell Biol*, 117: 895-902, 1992.
8. Erbe, D. V., Watson, S. R., Presta, L. G., Wolitzky, B. A., Foxall, C., Brandley, B. K., and Lasky, L. A. P- and E-selectin use common sites for carbohydrate ligand recognition and cell adhesion. *J Cell Biol*, 120: 1227-1235, 1993.
9. Takeichi, M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr.Opin.Cell Biol*, 7: 619-627, 1995.
10. Cereijido, M., Contreras, R. G., and Shoshani, L. Cell adhesion, polarity, and epithelia in the dawn of metazoans. *Physiol Rev.*, 84: 1229-1262, 2004.
11. Christofori, G. Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression. *EMBO J*, 22: 2318-2323, 2003.
12. Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J., and Weis, W. I. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell*, 123: 903-915, 2005.
13. Gates, J. and Peifer, M. Can 1000 reviews be wrong? Actin, alpha-Catenin, and adherens junctions. *Cell*, 123: 769-772, 2005.
14. Mareel, M. and Leroy, A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev.*, 83: 337-376, 2003.
15. Hsu, M., Andl, T., Li, G., Meinkoth, J. L., and Herlyn, M. Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J Cell Sci*, 113 (Pt 9): 1535-1542, 2000.
16. Gruss, C. and Herlyn, M. Role of cadherins and matrixins in melanoma. *Curr.Opin.Oncol.*, 13: 117-123, 2001.
17. Lochter, A., Galosy, S., Muschler, J., Freedman, N., Werb, Z., and Bissell, M. J. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol*, 139: 1861-1872, 1997.
18. Prindull, G. and Zipori, D. Environmental guidance of normal and tumor cell plasticity: epithelial mesenchymal transitions as a paradigm. *Blood*, 103: 2892-2899, 2004.

19. Thompson, E. W., Newgreen, D. F., and Tarin, D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res.*, 65: 5991-5995, 2005.
20. Saiki, I. Cell adhesion molecules and cancer metastasis. *Jpn.J Pharmacol.*, 75: 215-242, 1997.
21. Aumailley, M. and Gayraud, B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol.Med.*, 76: 253-265, 1998.
22. Taipale, J. and Keski-Oja, J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J*, 11: 51-59, 1997.
23. Dedhar, S., Ruoslahti, E., and Pierschbacher, M. D. A cell surface receptor complex for collagen type I recognizes the Arg-Gly-Asp sequence. *J Cell Biol*, 104: 585-593, 1987.
24. Pierschbacher, M. D. and Ruoslahti, E. Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. *J Biol Chem*, 262: 17294-17298, 1987.
25. Miles, A. J., Skubitz, A. P., Furcht, L. T., and Fields, G. B. Promotion of cell adhesion by single-stranded and triple-helical peptide models of basement membrane collagen alpha 1(IV)531-543. Evidence for conformationally dependent and conformationally independent type IV collagen cell adhesion sites. *J Biol Chem*, 269: 30939-30945, 1994.
26. Liu, S., Calderwood, D. A., and Ginsberg, M. H. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci*, 113 (Pt 20): 3563-3571, 2000.
27. Zamir, E. and Geiger, B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*, 114: 3583-3590, 2001.
28. Mueller, S. C., Gherzi, G., Akiyama, S. K., Sang, Q. X., Howard, L., Pineiro-Sanchez, M., Nakahara, H., Yeh, Y., and Chen, W. T. A novel protease-docking function of integrin at invadopodia. *J Biol Chem*, 274: 24947-24952, 1999.
29. Dumin, J. A., Dickeson, S. K., Stricker, T. P., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Roby, J. D., Santoro, S. A., and Parks, W. C. Pro-collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the alpha(2)beta(1) integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen. *J Biol Chem*, 276: 29368-29374, 2001.
30. Brooks, P. C., Silletti, S., von Schalscha, T. L., Friedlander, M., and Cheresch, D. A. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell*, 92: 391-400, 1998.
31. Plopper, G. E., McNamee, H. P., Dike, L. E., Bojanowski, K., and Ingber, D. E. Convergence of integrin and growth factor receptor signaling pathways within the focal adhesion complex. *Mol.Biol Cell*, 6: 1349-1365, 1995.
32. Shimizu, Y. and Shaw, S. Lymphocyte interactions with extracellular matrix. *FASEB J*, 5: 2292-2299, 1991.
33. Sneath, R. J. and Mangham, D. C. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol.Pathol.*, 51: 191-200, 1998.
34. Naor, D., Sionov, R. V., and Ish-Shalom, D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv.Cancer Res.*, 71: 241-319, 1997.
35. Kamohara, H., Yamashiro, S., Galligan, C., and Yoshimura, T. Discoidin domain receptor 1 isoform-a (DDR1alpha) promotes migration of leukocytes in three-dimensional collagen lattices. *FASEB J*, 15: 2724-2726, 2001.
36. Hanski, C., Huhle, T., and Reutter, W. Involvement of plasma membrane dipeptidyl peptidase IV in fibronectin-mediated adhesion of cells on collagen. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 366: 1169-1176, 1985.
37. Ravenswaay Claasen, H. H., Kluin, P. M., and Fleuren, G. J. Tumor infiltrating cells in human cancer. On the possible role of CD16+ macrophages in antitumor cytotoxicity. *Lab Invest*, 67: 166-174, 1992.

38. Wang, E., Panelli, M. C., Monsurro, V., and Marincola, F. M. A global approach to tumor immunology. *Cell Mol.Immunol.*, *1*: 256-265, 2004.
39. Shimizu, J., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol.*, *163*: 5211-5218, 1999.
40. Pozzi, L. A. and Weiser, W. Y. Human recombinant migration inhibitory factor activates human macrophages to kill tumor cells. *Cell Immunol.*, *145*: 372-379, 1992.
41. Yu, J. L. and Rak, J. W. Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory and immune cells in tumour angiogenesis and arteriogenesis. *Breast Cancer Res.*, *5*: 83-88, 2003.
42. Mantovani, A., Allavena, P., Sozzani, S., Vecchi, A., Locati, M., and Sica, A. Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors. *Semin.Cancer Biol.*, *14*: 155-160, 2004.
43. Desmouliere, A., Guyot, C., and Gabbiani, G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int.J Dev.Biol.*, *48*: 509-517, 2004.
44. Hartlapp, I., Abe, R., Saeed, R. W., Peng, T., Voelter, W., Bucala, R., and Metz, C. N. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. *FASEB J.*, *15*: 2215-2224, 2001.
45. Borgono, C. A., Michael, I. P., and Diamandis, E. P. Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. *Mol.Cancer Res.*, *2*: 257-280, 2004.
46. Cox, G., Steward, W. P., and O'Byrne, K. J. The plasmin cascade and matrix metalloproteinases in non-small cell lung cancer. *Thorax*, *54*: 169-179, 1999.
47. Darmoul, D., Gratio, V., Devaud, H., Lehy, T., and Laburthe, M. Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells. *Am J Pathol.*, *162*: 1503-1513, 2003.
48. Ossovskaya, V. S. and Bunnett, N. W. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev.*, *84*: 579-621, 2004.
49. Gocheva, V., Zeng, W., Ke, D., Klimstra, D., Reinheckel, T., Peters, C., Hanahan, D., and Joyce, J. A. Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev.*, *20*: 543-556, 2006.
50. Bass, R., Werner, F., Odintsova, E., Sugiura, T., Berditchevski, F., and Ellis, V. Regulation of urokinase receptor proteolytic function by the tetraspanin CD82. *J Biol Chem*, *280*: 14811-14818, 2005.
51. Mai, J., Finley, R. L., Jr., Waisman, D. M., and Sloane, B. F. Human procathepsin B interacts with the annexin II tetramer on the surface of tumor cells. *J Biol Chem*, *275*: 12806-12812, 2000.
52. Mohamed, M. M. and Sloane, B. F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat.Rev.Cancer*, *6*: 764-775, 2006.
53. Fusek, M. and Vetvicka, V. Dual role of cathepsin D: ligand and protease. *Biomed.Pap.Med.Fac.Univ Palacky.Olomouc.Czech.Repub.*, *149*: 43-50, 2005.
54. John, A. and Tuszynski, G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol.Oncol.Res.*, *7*: 14-23, 2001.
55. Dano, K., Romer, J., Nielsen, B. S., Bjorn, S., Pyke, C., Rygaard, J., and Lund, L. R. Cancer invasion and tissue remodeling--cooperation of protease systems and cell types. *APMIS*, *107*: 120-127, 1999.
56. Liotta, L. A. and Stetler-Stevenson, W. G. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res.*, *51*: 5054s-5059s, 1991.

57. Katayama, M., Hirai, S., Kamihagi, K., Nakagawa, K., Yasumoto, M., and Kato, I. Soluble E-cadherin fragments increased in circulation of cancer patients. *Br.J Cancer*, 69: 580-585, 1994.
58. Compagni, A. and Christofori, G. Recent advances in research on multistage tumorigenesis. *Br.J Cancer*, 83: 1-5, 2000.
59. Koblinski, J. E., Ahrm, M., and Sloane, B. F. Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin.Chim.Acta*, 291: 113-135, 2000.
60. Herrera, C., Morimoto, C., Blanco, J., Mallol, J., Arenzana, F., Lluís, C., and Franco, R. Comodulation of CXCR4 and CD26 in human lymphocytes. *J Biol Chem*, 276: 19532-19539, 2001.
61. Blanco, J., Valenzuela, A., Herrera, C., Lluís, C., Hovanessian, A. G., and Franco, R. The HIV-1 gp120 inhibits the binding of adenosine deaminase to CD26 by a mechanism modulated by CD4 and CXCR4 expression. *FEBS Lett*, 477: 123-128, 2000.
62. Ikushima, H., Munakata, Y., Iwata, S., Ohnuma, K., Kobayashi, S., Dang, N. H., and Morimoto, C. Soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV enhances transendothelial migration via its interaction with mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Cell Immunol.*, 215: 106-110, 2002.
63. Le Naour, F., Andre, M., Greco, C., Billard, M., Sordat, B., Emile, J. F., Lanza, F., Boucheix, C., and Rubinstein, E. Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells. *Mol.Cell Proteomics.*, 5: 845-857, 2006.
64. Lambeir, A. M., Durinx, C., Scharpe, S., and De Meester, I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 40: 209-294, 2003.
65. Loster, K., Zeilinger, K., Schuppan, D., and Reutter, W. The cysteine-rich region of dipeptidyl peptidase IV (CD 26) is the collagen-binding site. *Biochem Biophys.Res Commun*, 217: 341-348, 1995.
66. Darmoul, D., Lacasa, M., Baricault, L., Marguet, D., Sapin, C., Trotot, P., Barbat, A., and Trugnan, G. Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) gene expression in enterocyte-like colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2. Cloning of the complete human coding sequence and changes of dipeptidyl peptidase IV mRNA levels during cell differentiation. *J Biol Chem*, 267: 4824-4833, 1992.
67. Hopsu-Havu, V. K. and Glenner, G. G. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. *Histochemie.*, 7: 197-201, 1966.
68. Bordallo, C., Schwencke, J., and Suarez, R. M. Localization of the thermosensitive X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase in the vacuolar membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 173: 199-203, 1984.
69. Kabashima, T., Ito, K., and Yoshimoto, T. Dipeptidyl peptidase IV from *Xanthomonas maltophilia*: sequencing and expression of the enzyme gene and characterization of the expressed enzyme. *J Biochem.(Tokyo)*, 120: 1111-1117, 1996.
70. Davy, A., Thomsen, K. K., Juliano, M. A., Alves, L. C., Svendsen, I., and Simpson, D. J. Purification and characterization of barley dipeptidyl peptidase IV. *Plant Physiol*, 122: 425-432, 2000.
71. Kenny, A. J., Booth, A. G., George, S. G., Ingram, J., Kershaw, D., Wood, E. J., and Young, A. R. Dipeptidyl peptidase IV, a kidney brush-border serine peptidase. *Biochem.J*, 157: 169-182, 1976.
72. Puschel, G., Mentlein, R., and Heymann, E. Isolation and characterization of dipeptidyl peptidase IV from human placenta. *Eur.J Biochem.*, 126: 359-365, 1982.
73. Ogata, S., Misumi, Y., and Ikehara, Y. Primary structure of rat liver dipeptidyl peptidase IV deduced from its cDNA and identification of the NH₂-terminal signal sequence as the membrane-anchoring domain. *J Biol Chem*, 264: 3596-3601, 1989.

74. Darmoul, D., Voisin, T., Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C., Salomon, R., Wang, Y., Swallow, D. M., and Laburthe, M. Regional expression of epithelial dipeptidyl peptidase IV in the human intestines. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 203: 1224-1229, 1994.
75. Durinx, C., Lambeir, A. M., Bosmans, E., Falmagne, J. B., Berghmans, R., Haemers, A., Scharpe, S., and De, M., I Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. *Eur.J Biochem.*, 267: 5608-5613, 2000.
76. Lambeir, A. M., Diaz Pereira, J. F., Chacon, P., Vermeulen, G., Heremans, K., Devreese, B., Van Beeumen, J., De Meester, I., and Scharpe, S. A prediction of DPP IV/CD26 domain structure from a physico-chemical investigation of dipeptidyl peptidase IV (CD26) from human seminal plasma. *Biochim.Biophys.Acta*, 1340: 215-226, 1997.
77. Gorrell, M. D., Wickson, J., and McCaughan, G. W. Expression of the rat CD26 antigen (dipeptidyl peptidase IV) on subpopulations of rat lymphocytes. *Cell Immunol.*, 134: 205-215, 1991.
78. Buhling, F., Junker, U., Reinhold, D., Neubert, K., Jager, L., and Ansorge, S. Functional role of CD26 on human B lymphocytes. *Immunol.Lett.*, 45: 47-51, 1995.
79. Buhling, F., Kunz, D., Reinhold, D., Ulmer, A. J., Ernst, M., Flad, H. D., and Ansorge, S. Expression and functional role of dipeptidyl peptidase IV (CD26) on human natural killer cells. *Nat.Immun.*, 13: 270-279, 1994.
80. Rasmussen, H. B., Branner, S., Wiberg, F. C., and Wagtmann, N. Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV/CD26 in complex with a substrate analog. *Nat Struct.Biol*, 10: 19-25, 2003.
81. Mentlein, R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul.Pept.*, 85: 9-24, 1999.
82. Yaron, A. and Naider, F. Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol*, 28: 31-81, 1993.
83. Ludwig, K., Fan, H., Dobers, J., Berger, M., Reutter, W., and Bottcher, C. 3D structure of the CD26-ADA complex obtained by cryo-EM and single particle analysis. *Biochem Biophys.Res Commun*, 313: 223-229, 2004.
84. Dong, R. P., Kameoka, J., Hegen, M., Tanaka, T., Xu, Y., Schlossman, S. F., and Morimoto, C. Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response. *J Immunol.*, 156: 1349-1355, 1996.
85. Cheng, H. C., Abdel-Ghany, M., Elble, R. C., and Pauli, B. U. Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV promotes adhesion and metastasis of rat breast cancer cells via tumor cell surface-associated fibronectin. *J Biol Chem*, 273: 24207-24215, 1998.
86. Kajiyama, H., Kikkawa, F., Suzuki, T., Shibata, K., Ino, K., and Mizutani, S. Prolonged survival and decreased invasive activity attributable to dipeptidyl peptidase IV overexpression in ovarian carcinoma. *Cancer Res*, 62: 2753-2757, 2002.
87. Wesley, U. V., Tiwari, S., and Houghton, A. N. Role for dipeptidyl peptidase IV in tumor suppression of human non small cell lung carcinoma cells. *Int J Cancer*, 109: 855-866, 2004.
88. Carbone, A., Gloghini, A., Zagonel, V., Aldinucci, D., Gattei, V., Degan, M., Improta, S., Sorio, R., Monfardini, S., and Pinto, A. The expression of CD26 and CD40 ligand is mutually exclusive in human T-cell non-Hodgkin's lymphomas/leukemias. *Blood*, 86: 4617-4626, 1995.
89. Sato, T., Yamochi, T., Yamochi, T., Aytac, U., Ohnuma, K., McKee, K. S., Morimoto, C., and Dang, N. H. CD26 regulates p38 mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of integrin beta1, adhesion to extracellular matrix, and tumorigenicity of T-anaplastic large cell lymphoma Karpas 299. *Cancer Res.*, 65: 6950-6956, 2005.

90. Havre, P. A., Abe, M., Urasaki, Y., Ohnuma, K., Morimoto, C., and Dang, N. H. The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Front Biosci.*, *13*: 1634-1645, 2008.
91. Adams, S., Miller, G. T., Jesson, M. I., Watanabe, T., Jones, B., and Wallner, B. P. PT-100, a small molecule dipeptidyl peptidase inhibitor, has potent antitumor effects and augments antibody-mediated cytotoxicity via a novel immune mechanism. *Cancer Res*, *64*: 5471-5480, 2004.
92. Adams, S., Miller, G., and Jones, B. T-cell independent activity of talabostat (PT-100) against human tumor xenografts in mice. *Journal of Immunotherapy*, *27*: 54, 2004.
93. Niedermeyer, J., Garin-Chesa, P., Kriz, M., Hilberg, F., Mueller, E., Bamberger, U., Rettig, W. J., and Schnapp, A. Expression of the fibroblast activation protein during mouse embryo development. *Int.J Dev.Biol*, *45*: 445-447, 2001.
94. Brown, D. D., Wang, Z., Furlow, J. D., Kanamori, A., Schwartzman, R. A., Remo, B. F., and Pinder, A. The thyroid hormone-induced tail resorption program during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Proc Natl.Acad Sci U.S A*, *93*: 1924-1929, 1996.
95. Bae, S., Park, C. W., Son, H. K., Ju, H. K., Paik, D., Jeon, C. J., Koh, G. Y., Kim, J., and Kim, H. Fibroblast activation protein alpha identifies mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Br.J Haematol.*, *142*: 827-830, 2008.
96. Park, J. E., Lenter, M. C., Zimmermann, R. N., Garin-Chesa, P., Old, L. J., and Rettig, W. J. Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J Biol Chem*, *274*: 36505-36512, 1999.
97. Dolznig, H., Schweifer, N., Puri, C., Kraut, N., Rettig, W. J., Kerjaschki, D., and Garin-Chesa, P. Characterization of cancer stroma markers: in silico analysis of an mRNA expression database for fibroblast activation protein and endosialin. *Cancer Immun.*, *5*: 10, 2005.
98. Bauer, S., Jendro, M. C., Wadle, A., Kleber, S., Stenner, F., Dinser, R., Reich, A., Faccin, E., Goedde, S., Dinges, H., Mueller-Ladner, U., and Renner, C. Fibroblast activation protein is expressed by rheumatoid myofibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res.Ther.*, *8*: 2006.
99. Lee, K. N., Jackson, K. W., Christiansen, V. J., Lee, C. S., Chun, J. G., and McKee, P. A. Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. *Blood*, 2005.
100. Rettig, W. J., Garin-Chesa, P., Beresford, H. R., Oettgen, H. F., Melamed, M. R., and Old, L. J. Cell-surface glycoproteins of human sarcomas: differential expression in normal and malignant tissues and cultured cells. *Proc Natl.Acad Sci U.S A*, *85*: 3110-3114, 1988.
101. Scanlan, M. J., Raj, B. K., Calvo, B., Garin-Chesa, P., Sanz-Moncasi, M. P., Healey, J. H., Old, L. J., and Rettig, W. J. Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Proc Natl.Acad Sci U.S A*, *91*: 5657-5661, 1994.
102. Cheng, J. D., Valianou, M., Canutescu, A. A., Jaffe, E. K., Lee, H. O., Wang, H., Lai, J. H., Bachovchin, W. W., and Weiner, L. M. Abrogation of fibroblast activation protein enzymatic activity attenuates tumor growth. *Mol.Cancer Ther.*, *4*: 351-360, 2005.
103. Gherzi, G., Zhao, Q., Salamone, M., Yeh, Y., Zucker, S., and Chen, W. T. The protease complex consisting of dipeptidyl peptidase IV and seprase plays a role in the migration and invasion of human endothelial cells in collagenous matrices. *Cancer Res.*, *66*: 4652-4661, 2006.
104. Kelly, T. Fibroblast activation protein-alpha and dipeptidyl peptidase IV (CD26): Cell-surface proteases that activate cell signaling and are potential targets for cancer therapy. *Drug Resist.Updat.*, *8*: 51-58, 2005.
105. Edosada, C. Y., Quan, C., Tran, T., Pham, V., Wiesmann, C., Fairbrother, W., and Wolf, B. B. Peptide substrate profiling defines fibroblast activation protein as an endopeptidase of strict Gly(2)-Pro(1)-cleaving specificity. *FEBS Lett.*, *580*: 1581-1586, 2006.

106. Chen, W. T. and Kelly, T. Seprase complexes in cellular invasiveness. *Cancer Metastasis Rev*, 22: 259-269, 2003.
107. Cheng, J. D. and Weiner, L. M. Tumors and their microenvironments: tilling the soil. Commentary re: A. M. Scott et al., A Phase I dose-escalation study of sibtrotuzumab in patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein-positive cancer. *Clin. Cancer Res.*, 9: 1639-1647, 2003. *Clin.Cancer Res.*, 9: 1590-1595, 2003.
108. von Horsten, S., Helfritz, A., Kuhlmann, S., Nave, H., Tschernig, T., Pabst, R., Ben Eliyahu, S., Meyer, D., Schmidt, R. E., and Schmitz, C. Stereological quantification of carboxyfluorescein-labeled rat lung metastasis: a new method for the assessment of natural killer cell activity and tumor adhesion in vivo and in situ. *J Immunol.Methods*, 239: 25-34, 2000.
109. Liedberg, B., Nylander, C., and Lundström, I. Biosensing with surface plasmon resonance - how it all started. *Biosensors and Bioelectronics*, 10: i-ix, 1995.
110. Bar, J., Weber, A., Hoffmann, T., Stork, J., Wermann, M., Wagner, L., Aust, S., Gerhartz, B., and Demuth, H. U. Characterisation of human dipeptidyl peptidase IV expressed in *Pichia pastoris*. A structural and mechanistic comparison between the recombinant human and the purified porcine enzyme. *Biol Chem*, 384: 1553-1563, 2003.
111. Kato, T., Nagatsu, T., Fukasawa, K., Harada, M., Nagatsu, I., and Sakakibara, S. Successive cleavage of N-terminal Arg1--Pro2 and Lys3-Pro4 from substance P but no release of Arg1-Pro2 from bradykinin, by X-Pro dipeptidyl-aminopeptidase. *Biochim.Biophys.Acta*, 525: 417-422, 1978.
112. Herr, I. and Debatin, K. M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*, 98: 2603-2614, 2001.
113. Fan, H., Meng, W., Kilian, C., Grams, S., and Reutter, W. Domain-specific N-glycosylation of the membrane glycoprotein dipeptidylpeptidase IV (CD26) influences its subcellular trafficking, biological stability, enzyme activity and protein folding. *Eur.J Biochem.*, 246: 243-251, 1997.
114. Chien, C. H., Tsai, C. H., Lin, C. H., Chou, C. Y., and Chen, X. Identification of Hydrophobic Residues Critical for DPP-IV Dimerization. *Biochemistry*, 45: 7006-7012, 2006.
115. Goossens, F., De, M., I, Vanhoof, G., and Scharpe, S. A sensitive method for the assay of serum prolyl endopeptidase. *Eur.J Clin.Chem Clin.Biochem.*, 30: 235-238, 1992.
116. Busek, P., Malik, R., and Sedo, A. Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologues (DASH) and their substrates in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 36: 408-421, 2004.
117. Sedo, A., Busek, P., Scholzova, E., Malik, R., Vlasticova, K., Janackova, S., and Mares, V. 'Dipeptidyl peptidase-IV activity and/or structure homologs' (DASH) in growth-modulated glioma cell lines. *Biol Chem*, 385: 557-559, 2004.
118. Schally, A. V., Comaru-Schally, A. M., Nagy, A., Kovacs, M., Szepeshazi, K., Plonowski, A., Varga, J. L., and Halmos, G. Hypothalamic hormones and cancer. *Front Neuroendocrinol.*, 22: 248-291, 2001.
119. Masur, K., Schwartz, F., Entschladen, F., Niggemann, B., and Zaenker, K. S. DPPIV inhibitors extend GLP-2 mediated tumour promoting effects on intestinal cancer cells. *Regul.Pept.*, 2006.
120. Piazza, G. A., Callanan, H. M., Mowery, J., and Hixson, D. C. Evidence for a role of dipeptidyl peptidase IV in fibronectin-mediated interactions of hepatocytes with extracellular matrix. *Biochem J*, 262: 327-334, 1989.
121. Qian, F., Gnjjatic, S., Jager, E., Santiago, D., Jungbluth, A., Grande, C., Schneider, S., Keitz, B., Driscoll, D., Ritter, G., Lele, S., Sood, A., Old, L. J., and Odunsi, K. Th1/Th2 CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in HLA-DPB1*0401/0402 patients with epithelial ovarian cancer. *Cancer Immun.*, 4: 12, 2004.

122. Yu, P. and Fu, Y. X. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Lab Invest*, 86: 231-245, 2006.
123. Lambeir, A. M., Proost, P., Durinx, C., Bal, G., Senten, K., Augustyns, K., Scharpe, S., Van Damme, J., and De Meester, I. Kinetic investigation of chemokine truncation by CD26/dipeptidyl peptidase IV reveals a striking selectivity within the chemokine family. *J Biol Chem*, 276: 29839-29845, 2001.
124. Van Damme, J., Struyf, S., and Opdenakker, G. Chemokine-protease interactions in cancer. *Semin.Cancer Biol*, 14: 201-208, 2004.
125. Boonacker, E. and Van Noorden, C. J. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur J Cell Biol*, 82: 53-73, 2003.
126. Yin, Z., Giacomello, E., Gabriele, E., Zardi, L., Aota, S., Yamada, K. M., Skerlavaji, B., Doliana, R., Colombatti, A., and Perris, R. Cooperative activity of alpha4beta1 and alpha4beta7 integrins in mediating human B-cell lymphoma adhesion and chemotaxis on fibronectin through recognition of multiple synergizing binding sites within the central cell-binding domain. *Blood*, 93: 1221-1230, 1999.
127. Klemke, R. L., Leng, J., Molander, R., Brooks, P. C., Vuori, K., and Cheresch, D. A. CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. *J Cell Biol*, 140: 961-972, 1998.
128. Cheng, H. C., Abdel-Ghany, M., and Pauli, B. U. A novel consensus motif in fibronectin mediates dipeptidyl peptidase IV adhesion and metastasis. *J Biol Chem*, 278: 24600-24607, 2003.
129. Ghersi, G., Dong, H., Goldstein, L. A., Yeh, Y., Hakkinen, L., Larjava, H. S., and Chen, W. T. Regulation of fibroblast migration on collagenous matrix by a cell surface peptidase complex. *J Biol Chem*, 277: 29231-29241, 2002.
130. Carney, D. N., Gazdar, A. F., and Minna, J. D. Positive correlation between histological tumor involvement and generation of tumor cell colonies in agarose in specimens taken directly from patients with small-cell carcinoma of the lung. *Cancer Res.*, 40: 1820-1823, 1980.
131. Ross, R. A., Biedler, J. L., and Spengler, B. A. A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. *Cancer Lett.*, 197: 35-39, 2003.
132. Kyriakis, J. M. and Avruch, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.*, 81: 807-869, 2001.
133. Kuwabara, M., Takahashi, K., and Inanami, O. Induction of apoptosis through the activation of SAPK/JNK followed by the expression of death receptor Fas in X-irradiated cells. *J Radiat.Res.(Tokyo)*, 44: 203-209, 2003.
134. Tournier, C., Hess, P., Yang, D. D., Xu, J., Turner, T. K., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S. N., Flavell, R. A., and Davis, R. J. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*, 288: 870-874, 2000.
135. Luo, J. L., Kamata, H., and Karin, M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin.Invest*, 115: 2625-2632, 2005.
136. Papa, S., Zazzeroni, F., Pham, C. G., Bubici, C., and Franzoso, G. Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. *J Cell Sci*, 117: 5197-5208, 2004.
137. Cusack, J. C., Jr. Overcoming antiapoptotic responses to promote chemosensitivity in metastatic colorectal cancer to the liver. *Ann.Surg.Oncol.*, 10: 852-862, 2003.
138. Veiby, O. P. and Read, M. A. Chemoresistance: impact of nuclear factor (NF)-kappaB inhibition by small interfering RNA. Commentary re J. Guo et al., Enhanced chemosensitivity to irinotecan by RNA interference-mediated down-regulation of the NF-kappaB p65 subunit. *Clin Cancer Res* 2004;10:3333-3341. *Clin.Cancer Res.*, 10: 3262-3264, 2004.

139. Jarzab, B., Wiench, M., Fajarewicz, K., Simek, K., Jarzab, M., Oczko-Wojciechowska, M., Wloch, J., Czarniecka, A., Chmielik, E., Lange, D., Pawlaczek, A., Szpak, S., Gubala, E., and Swierniak, A. Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications. *Cancer Res.*, 65: 1587-1597, 2005.
140. Sloan, K. E., Eustace, B. K., Stewart, J. K., Zehetmeier, C., Torella, C., Simeone, M., Roy, J. E., Unger, C., Louis, D. N., Ilag, L. L., and Jay, D. G. CD155/PVR plays a key role in cell motility during tumor cell invasion and migration. *BMC.Cancer*, 4: 73, 2004.
141. Marchesi, F., Monti, P., Leone, B. E., Zerbi, A., Vecchi, A., Piemonti, L., Mantovani, A., and Allavena, P. Increased survival, proliferation, and migration in metastatic human pancreatic tumor cells expressing functional CXCR4. *Cancer Res*, 64: 8420-8427, 2004.
142. Sanchez-Carbayo, M., Belbin, T. J., Scotlandi, K., Prystowsky, M., Baldini, N., Childs, G., and Cordon-Cardo, C. Expression profiling of osteosarcoma cells transfected with MDR1 and NEO genes: regulation of cell adhesion, apoptosis, and tumor suppression-related genes. *Lab Invest*, 83: 507-517, 2003.
143. Pulukuri, S. M., Gondi, C. S., Lakka, S. S., Jutla, A., Estes, N., Gujrati, M., and Rao, J. S. RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *J Biol Chem*, 280: 36529-36540, 2005.
144. Plath, T., Detjen, K., Welzel, M., von Marschall, Z., Murphy, D., Schirner, M., Wiedenmann, B., and Rosewicz, S. A novel function for the tumor suppressor p16(INK4a): induction of anoikis via upregulation of the alpha(5)beta(1) fibronectin receptor. *J Cell Biol*, 150: 1467-1478, 2000.
145. Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Munemitsu, S., and Polakis, P. The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin. *J Biol Chem*, 270: 5549-5555, 1995.
146. Ozawa, M., Ringwald, M., and Kemler, R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl.Acad Sci U.S A*, 87: 4246-4250, 1990.
147. Kemler, R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.*, 9: 317-321, 1993.
148. Potter, E., Bergwitz, C., and Brabant, G. The cadherin-catenin system: implications for growth and differentiation of endocrine tissues. *Endocr.Rev.*, 20: 207-239, 1999.
149. Takeichi, M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr.Opin.Cell Biol*, 5: 806-811, 1993.
150. Beavon, I. R. Regulation of E-cadherin: does hypoxia initiate the metastatic cascade? *Mol.Pathol.*, 52: 179-188, 1999.
151. Frixen, U. H., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A., Lochner, D., and Birchmeier, W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*, 113: 173-185, 1991.
152. Kajiyama, H., Kikkawa, F., Khin, E., Shibata, K., Ino, K., and Mizutani, S. Dipeptidyl peptidase IV overexpression induces up-regulation of E-cadherin and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, resulting in decreased invasive potential in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*, 63: 2278-2283, 2003.
153. Kikkawa, F., Kajiyama, H., Shibata, K., Ino, K., Nomura, S., and Mizutani, S. Dipeptidyl peptidase IV in tumor progression. *Biochim.Biophys.Acta*, 1751: 45-51, 2005.
154. Zhurinsky, J., Shtutman, M., and Ben Ze'ev, A. Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *J Cell Sci*, 113 (Pt 18): 3127-3139, 2000.

155. Kajiyama, H., Shibata, K., Terauchi, M., Morita, T., Ino, K., Mizutani, S., and Kikkawa, F. Neutral endopeptidase 24.11/CD10 suppresses progressive potential in ovarian carcinoma in vitro and in vivo. *Clin.Cancer Res.*, *11*: 1798-1808, 2005.
156. Osman, I., Yee, H., Taneja, S. S., Levinson, B., Zeleniuch-Jacquotte, A., Chang, C., Nobert, C., and Nanus, D. M. Neutral endopeptidase protein expression and prognosis in localized prostate cancer. *Clin.Cancer Res.*, *10*: 4096-4100, 2004.
157. Bilalovic, N., Sandstad, B., Golouh, R., Nesland, J. M., Selak, I., and Torlakovic, E. E. CD10 protein expression in tumor and stromal cells of malignant melanoma is associated with tumor progression. *Mod.Pathol.*, *17*: 1251-1258, 2004.
158. Kehlen, A., Lendeckel, U., Dralle, H., Langner, J., and Hoang-Vu, C. Biological significance of aminopeptidase N/CD13 in thyroid carcinomas. *Cancer Res.*, *63*: 8500-8506, 2003.
159. Bhagwat, S. V., Petrovic, N., Okamoto, Y., and Shapiro, L. H. The angiogenic regulator CD13/APN is a transcriptional target of Ras signaling pathways in endothelial morphogenesis. *Blood*, *101*: 1818-1826, 2003.
160. Bhagwat, S. V., Lahdenranta, J., Giordano, R., Arap, W., Pasqualini, R., and Shapiro, L. H. CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood*, *97*: 652-659, 2001.
161. Salcedo, R., Ponce, M. L., Young, H. A., Wasserman, K., Ward, J. M., Kleinman, H. K., Oppenheim, J. J., and Murphy, W. J. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood*, *96*: 34-40, 2000.
162. Albini, A. Tumor and endothelial cell invasion of basement membranes. The matrigel chemoinvasion assay as a tool for dissecting molecular mechanisms. *Pathol.Oncol.Res.*, *4*: 230-241, 1998.
163. Hooper, J. D., Clements, J. A., Quigley, J. P., and Antalis, T. M. Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. *J Biol Chem*, *276*: 857-860, 2001.
164. Noel, A., Maillard, C., Rocks, N., Jost, M., Chabottaux, V., Sounni, N. E., Maquoi, E., Cataldo, D., and Foidart, J. M. Membrane associated proteases and their inhibitors in tumour angiogenesis. *J Clin.Pathol.*, *57*: 577-584, 2004.
165. Pepper, M. S. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol*, *21*: 1104-1117, 2001.
166. Wesley, U. V., Albino, A. P., Tiwari, S., and Houghton, A. N. A role for dipeptidyl peptidase IV in suppressing the malignant phenotype of melanocytic cells. *J Exp Med*, *190*: 311-322, 1999.
167. Wang, X. M., Yu, D. M., McCaughan, G. W., and Gorrell, M. D. Fibroblast activation protein increases apoptosis, cell adhesion, and migration by the LX-2 human stellate cell line. *Hepatology*, *42*: 935-945, 2005.
168. Johnson, R. C., Zhu, D., Augustin-Voss, H. G., and Pauli, B. U. Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV is an adhesion molecule for lung-metastatic rat breast and prostate carcinoma cells. *J Cell Biol*, *121*: 1423-1432, 1993.
169. Abdel-Ghany, M., Cheng, H., Levine, R. A., and Pauli, B. U. Truncated dipeptidyl peptidase IV is a potent anti-adhesion and anti-metastasis peptide for rat breast cancer cells. *Invasion Metastasis*, *18*: 35-43, 1998.
170. Zhang, W., Alt-Holland, A., Margulis, A., Shamis, Y., Fusenig, N. E., Rodeck, U., and Garlick, J. A. E-cadherin loss promotes the initiation of squamous cell carcinoma invasion through modulation of integrin-mediated adhesion. *J Cell Sci*, *119*: 283-291, 2006.

171. Margulis, A., Andriani, F., Fusenig, N., Hashimoto, K., Hanakawa, Y., and Garlick, J. A. Abrogation of E-cadherin-mediated adhesion induces tumor cell invasion in human skin-like organotypic culture. *J Invest Dermatol.*, *121*: 1182-1190, 2003.
172. Hanski, C., Huhle, T., Gossrau, R., and Reutter, W. Direct evidence for the binding of rat liver DPP IV to collagen in vitro. *Exp Cell Res*, *178*: 64-72, 1988.
173. De Meester, I., Korom, S., Van Damme, J., and Scharpe, S. CD26, let it cut or cut it down. *Immunol.Today*, *20*: 367-375, 1999.
174. Levy, S. and Shoham, T. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat.Rev.Immunol.*, *5*: 136-148, 2005.
175. Shingu, K., Helfritz, A., Zielinska-Skowronek, M., Meyer-Olson, D., Jacobs, R., Schmidt, R. E., Mentlein, R., Pabst, R., and von Horsten, S. CD26 expression determines lung metastasis in mutant F344 rats: involvement of NK cell function and soluble CD26. *Cancer Immunol.Immunother.*, 2003.
176. Zhu, D., Cheng, C. F., and Pauli, B. U. Blocking of lung endothelial cell adhesion molecule-1 (Lu-ECAM-1) inhibits murine melanoma lung metastasis. *J Clin.Invest*, *89*: 1718-1724, 1992.
177. Clarke, S. L., Betts, G. J., Plant, A., Wright, K. L., El Shanawany, T. M., Harrop, R., Torkington, J., Rees, B. I., Williams, G. T., Gallimore, A. M., and Godkin, A. J. CD4CD25FOXP3 Regulatory T Cells Suppress Anti-Tumor Immune Responses in Patients with Colorectal Cancer. *PLoS.ONE.*, *1*: e129, 2006.
178. Daniels, B. F., Karlhofer, F. M., Seaman, W. E., and Yokoyama, W. M. A natural killer cell receptor specific for a major histocompatibility complex class I molecule. *J Exp.Med.*, *180*: 687-692, 1994.
179. Kulbe, H., Levinson, N. R., Balkwill, F., and Wilson, J. L. The chemokine network in cancer--much more than directing cell movement. *Int.J Dev.Biol*, *48*: 489-496, 2004.
180. Opdenakker, G. and Van Damme, J. The countercurrent principle in invasion and metastasis of cancer cells. Recent insights on the roles of chemokines. *Int.J Dev.Biol*, *48*: 519-527, 2004.
181. Wesley, U. V., McGroarty, M., and Homoyouni, A. Dipeptidyl peptidase inhibits malignant phenotype of prostate cancer cells by blocking basic fibroblast growth factor signaling pathway. *Cancer Res.*, *65*: 1325-1334, 2005.
182. Huntington, J. T., Shields, J. M., Der, C. J., Wyatt, C. A., Benbow, U., Slingluff, C. L., Jr., and Brinckerhoff, C. E. Overexpression of collagenase 1 (MMP-1) is mediated by the ERK pathway in invasive melanoma cells: role of BRAF mutation and fibroblast growth factor signaling. *J Biol Chem*, *279*: 33168-33176, 2004.
183. Yamochi, T., Yamochi, T., Aytac, U., Sato, T., Sato, K., Ohnuma, K., McKee, K. S., Morimoto, C., and Dang, N. H. Regulation of p38 phosphorylation and topoisomerase IIalpha expression in the B-cell lymphoma line Jiyoye by CD26/dipeptidyl peptidase IV is associated with enhanced in vitro and in vivo sensitivity to doxorubicin. *Cancer Res.*, *65*: 1973-1983, 2005.
184. Dang, N. H. and Morimoto, C. CD26: an expanding role in immune regulation and cancer. *Histol.Histopathol.*, *17*: 1213-1226, 2002.
185. Tanaka, T., Umeki, K., Yamamoto, I., Sakamoto, F., Noguchi, S., and Ohtaki, S. CD26 (dipeptidyl peptidase IV/DPP IV) as a novel molecular marker for differentiated thyroid carcinoma. *Int.J Cancer*, *64*: 326-331, 1995.
186. Hahn-Dantona, E., Ruiz, J. F., Bornstein, P., and Strickland, D. K. The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *J Biol Chem*, *276*: 15498-15503, 2001.

187. Czekay, R. P., Kuemmel, T. A., Orlando, R. A., and Farquhar, M. G. Direct binding of occupied urokinase receptor (uPAR) to LDL receptor-related protein is required for endocytosis of uPAR and regulation of cell surface urokinase activity. *Mol.Biol Cell*, *12*: 1467-1479, 2001.
188. Li, Y. and Bu, G. LRP5/6 in Wnt signaling and tumorigenesis. *Fut.Oncol.*, *1*: 673-681, 2005.
189. Munoz, E., Blazquez, M. V., Madueno, J. A., Rubio, G., and Pena, J. CD26 induces T-cell proliferation by tyrosine protein phosphorylation. *Immunology*, *77*: 43-50, 1992.
190. Sumitomo, M., Shen, R., Walburg, M., Dai, J., Geng, Y., Navarro, D., Boileau, G., Papandreou, C. N., Giancotti, F. G., Knudsen, B., and Nanus, D. M. Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer cell migration by blocking focal adhesion kinase signaling. *J Clin.Invest*, *106*: 1399-1407, 2000.
191. Gallagher, P. G., Bao, Y., Prorock, A., Zigrino, P., Nischt, R., Politi, V., Mauch, C., Dragulev, B., and Fox, J. W. Gene expression profiling reveals cross-talk between melanoma and fibroblasts: implications for host-tumor interactions in metastasis. *Cancer Res.*, *65*: 4134-4146, 2005.
192. Christiansen, V. J., Jackson, K. W., Lee, K. N., and McKee, P. A. Effect of fibroblast activation protein and alpha2-antiplasmin cleaving enzyme on collagen types I, III, and IV. *Arch.Biochem.Biophys.*, *457*: 177-186, 2007.
193. Kate, M., Hofland, L. J., van Koetsveld, P. M., Jeekel, J., and van Eijck, C. H. Pro-inflammatory cytokines affect pancreatic carcinoma cell. *Endothelial cell interactions. JOP.*, *7*: 454-464, 2006.
194. Inoue, K., Slaton, J. W., Eve, B. Y., Kim, S. J., Perrotte, P., Balbay, M. D., Yano, S., Bar-Eli, M., Radinsky, R., Pettaway, C. A., and Dinney, C. P. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastases in androgen-independent prostate cancer. *Clin.Cancer Res.*, *6*: 2104-2119, 2000.
195. Rofstad, E. K. and Halsor, E. F. Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts. *Cancer Res.*, *60*: 4932-4938, 2000.
196. Shiraha, H., Glading, A., Gupta, K., and Wells, A. IP-10 inhibits epidermal growth factor-induced motility by decreasing epidermal growth factor receptor-mediated calpain activity. *J Cell Biol*, *146*: 243-254, 1999.
197. Bodnar, R. J., Yates, C. C., and Wells, A. IP-10 blocks vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and tube formation via inhibition of calpain. *Circ.Res.*, *98*: 617-625, 2006.
198. Huang, S., Mills, L., Mian, B., Tellez, C., McCarty, M., Yang, X. D., Gudas, J. M., and Bar-Eli, M. Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma. *Am J Pathol.*, *161*: 125-134, 2002.
199. Li, G., Tian, L., Hou, J. M., Ding, Z. Y., He, Q. M., Feng, P., Wen, Y. J., Xiao, F., Yao, B., Zhang, R., Peng, F., Jiang, Y., Luo, F., Zhao, X., Zhang, L., Zhou, Q., and Wei, Y. Q. Improved therapeutic effectiveness by combining recombinant CXC chemokine ligand 10 with Cisplatin in solid tumors. *Clin.Cancer Res.*, *11*: 4217-4224, 2005.
200. Bromberg, J. Signal transducers and activators of transcription as regulators of growth, apoptosis and breast development. *Breast Cancer Res.*, *2*: 86-90, 2000.
201. Gollob, J. A., Sciambi, C. J., Huang, Z., and Dressman, H. K. Gene expression changes and signaling events associated with the direct antimelanoma effect of IFN-gamma. *Cancer Res.*, *65*: 8869-8877, 2005.
202. Wolke, C., Tadge, J., Bukowska, A., Tager, M., Bank, U., Ittenson, A., Ansoerge, S., and Lendeckel, U. Assigning the phenotype of a natural regulatory T-cell to the human T-cell line, KARPAS-299. *Int.J Mol.Med.*, *17*: 275-278, 2006.

203. Christopherson, K. W., Hangoc, G., and Broxmeyer, H. E. Cell surface peptidase CD26/dipeptidylpeptidase IV regulates CXCL12/stromal cell-derived factor-1 alpha-mediated chemotaxis of human cord blood CD34+ progenitor cells. *J Immunol.*, 169: 7000-7008, 2002.
204. Onoue, T., Uchida, D., Begum, N. M., Tomizuka, Y., Yoshida, H., and Sato, M. Epithelial-mesenchymal transition induced by the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 system in oral squamous cell carcinoma cells. *Int.J Oncol.*, 29: 1133-1138, 2006.
205. Fraser, C. C., Kaneshima, H., Hanstee, G., Kilpatrick, M., Hoffman, R., and Chen, B. P. Human allogeneic stem cell maintenance and differentiation in a long-term multilineage SCID-hu graft. *Blood*, 86: 1680-1693, 1995.

DP4-Alignment

Mensch	MKTPWKVLLGLLGAAALVTIIITVPVLLNKGTTDDATADSRKTYTLTDYLNKNTYRLKLYSLRWISDHEYLYKQENNILVFNAEYGNSSVFLNSTFDEFHGHSINDYSISPDGQFILLEYNVVK
Ratte	MKTPWKVLLGLLGVAALVTIIITVPVLLNK--DEAAADSRRTYTLADYLKNTFRVKSYSRLRWSDSEYLYKQENNILFNAEHGNSIFLENSTFEIFGDSISDYSVSPDRFLVLLLEYNVVK
	*****.***** *:*.***:***:*****:*. * *****: * *****:***:***:*****: *.**.*:*** *:*****
	
Mensch	QWRHSYTASYDIYDLNKRQLITEERIPNNTQWVTWSPVGHKLAYVWNNDIYVKIEPNLPSYRITWTGKEDIYNGITDWWYEEEVFSAYSALWWSPNGTFLAYAQFNDTEVPLIEYSFYSD
Ratte	QWRHSYTASYSIYDLNKRQLITEEKIPNNTQWITWSQEGHKLAYVWKNDIYVKIEPHLPSHRITSTGKENVIFNGINDWVYEEIFGAYSALWWSPNGTFLAYAQFNDTGVPVPLIEYSFYSD
	*****.*****:*****:*** *****:*****:***:*** *****:*.***.*****:*. *****:***** *****
	
Mensch	SLQYPKTVRVPYPKAGAVNPTVKFFVNTDSLSSVTNATSIQITAPASMLIGDHLYCDVTWATQERISLQWLRRIQNSVMDICDYDESSGRWNCLVARQHIEMSTGWVGRFRPSEPHFTL
Ratte	SLQYPKTVWIPYPKAGAVNPTVKFFIVNTDSLSTTTTIPMQITAPASVTTGDHLYCDVAWVSEDRISLQWLRRIQNSVMAICDYDKTTLVWNCPTTQEHETSATGWCGRFRPAEPHFTS
	***** :*****:*****:*. :.*****: *****:*. :.*****:***** *****:*. :.*** :.*** *.* *****:*****
	
Mensch	DGNSFYKIIISNEEGYRHICYFQIDKKD--CTFITKGTWEVIGIEALTSYLYIISNEYKMPGGRNLYKIQLSDYTKVTCLSCENPERCQYYSVFSKEAKYYQLRCSGGLPLYTLHSS
Ratte	DGSSFYKIVSDKDGKHCQFQKDRKPEQVCTFITKGAWEVISIEALTSYLYIISNEYKMPGGRNLYKIQLTDHTNKKCLSCDLNPERCQYYSVLSKEAKYYQLGCRGGLPLYTLHRS
	..*****:*. :.*** ** *.* *****:***.***** *****:*. :.***:*****:***** ***** *
	
Mensch	VNDKGLRVLEDNSALDKMLQNVQMPKSKLDFIILNETKFWYQMILPPHFDKSKKYPLLLDVYAGPCSQKADTVFRLNWTATLASTENIIVASFDRGSGYQGDKIMHAINRRLGTFEVEDQI
Ratte	TDQKELRVLEDNSALDKMLQDVQMPKSKLDFIVLNETRFWYQMILPPHFDKSKKYPLLLIDVYAGPCSQKADAAFRNLNWTATLASTENIIVASFDRGSGYQGDKIMHAINRRLGTLEVEDQI
	. :.* *****:*****:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
	
Mensch	EAARQFSKMGFVDNKRVAIWGWSYGGYVTSMLVLSGSGVFKCGIAPVSRWEYDVSVYTERYMGGLPTPEDNLDHYRNSTVMSRAENFKQVEYLLIHGTADDNVHFQQAQISKALVDVGV
Ratte	EAARQFLKMGFVDSKRVAIWGWSYGGYVTSMLVLSGSGVFKCGIAPVSRWEYDVSVYTERYMGGLPTPEDNLDHYRNSTVMSRAENFKQVEYLLIHGTADDNVHFQQAQISKALVDAGVD
	***** *****. :.*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
	
Mensch	FQAMWYTDEDHGIIASSTAHQHIYTHMSHFQCFSLP
Ratte	FQAMWYTDEDHGIIASSTAHQHIYSHMSHFQCFSLR
	*****:*****:*****
	

Anhang 1: Alignment von humaner und Ratten-DP4

Die Erstellung des Alignment der Aminosäuresequenz erfolgte mit Hilfe des Programms ClustalW 1.83. Schematische Darstellung der Tertiärstruktur nach Mentlein⁸¹, zyttoplasmatischer N-terminus (weiß), Membranregion (gelb), Glykosilierungsregion (grau), cysteinreiche Region (blau) und katalytische Domäne (grün)

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen herzlichst bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

An erster Stelle danke ich herzlichst Herrn Prof. Dr. H.-U. Demuth und Herrn PD Dr. K. Glund für die Überlassung des interessanten Themas, das mir geschenkte Vertrauen und die Gewährung optimaler Arbeitsbedingungen bei der Anfertigung meiner Promotionsarbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner direkten Betreuerin PD Dr. A. Kehlen für die Hilfestellung bei der praktischen Arbeit und ihrer ständigen Diskussionsbereitschaft. Ihre Hilfestellung trug entscheidend dazu bei, dass die angefertigte Arbeit in der vorliegenden Qualität und Umfang angefertigt werden konnte. Mein Dank gilt auch Dr. T. Hoffmann der mich in der ersten Zeit meiner Arbeit leitete und mit seiner steten Diskussionsbereitschaft sowie Anregungen zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Dr. I. Schulz gilt mein Dank für die Diskussionsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung bei Fragen bezüglich Zellkulturarbeiten, Westernblot-Analysen und Mikroskopie.

Nancy Funk und Monique Bornack danke ich für die Durchführung der Quantitative-PCR.

Bei M. Werrmann und Dr. Joachim Bär möchte ich mich insbesondere für die Bereitstellung gereinigter sowie rekombinanter DP4 bedanken.

Bei der Arbeitsgruppe Chemie, speziell Ulf-Torsten Gärtner bedanke ich mich für die Bereitstellung der Inhibitoren.

Bei der Arbeitsgruppe Molekularbiologie, insbesondere Nadine Jänckel bedanke ich mich für die Bereitstellung der Vektorkonstrukte.

Ich möchte mich insbesondere bedanken bei R. Wolf, K. Gans, und Dr. J.-U. Rahfeld für die Diskussionsbereitschaft und Hilfestellung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Zellbiologie sowie allen anderen Kollegen von Probiodrug AG, Halle (Saale) danke ich ganz herzlich für die tolle Zusammenarbeit sowie die immer währende Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Mein außerordentlicher Dank gilt meiner Familie und Elke Wilms, für die Liebe und Geduld mit mir und meiner Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Jörg Stork geboren am 13.08.1975 in Löbau, an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Ich habe mich mit dieser Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben.

Wesel, 10. Juni 2009

Lebenslauf

Name: Jörg Stork

Geburtsdatum: 13. August 1975

Geburtsort: Löbau

Familienstand: ledig

09/1982 – 07/1990 Polytechnische Oberschule in Cunewalde

09/1990 – 06/1994 Gymnasium „Geschwister Scholl“ in Löbau

08/1994 – 07/1995 Grundwehrdienst

10/1995 – 07/2000 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle/Saale

11/1999 – 07/2000 Diplomarbeit zum Thema „Einfluss der Peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerase auf die EGF Rezeptor Signaltransduktion“ unter Anleitung von Prof. Dr. G. Fischer und Dr. C. Schiene, angefertigt in der Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaft e.V.

01/2001 – 12/2006 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der probiodrug AG in der Arbeitsgruppe „cell biology“ unter Leitung von PD Dr. A. Kehlen