

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. med. Langner



Untersuchung der Regulation der Promotoraktivität von Aminopeptidase N (APN) in hämatopoietischen Zellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Michael Geisler

geboren am 11.02.1976 in Wippra

Gutachter:

Prof. Dr. J. Langner

PD. Dr. Lendeckel

Prof. Dr. Lasch

Eröffnungsdatum des Promotionsverfahrens: 24.02.2004

Datum der Verteidigung: 12.01.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000008113

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008113>]

Widmung

Ich widme diese Dissertationsarbeit meinem Sohn Hannes Leonhard Michael Kinitz.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Aktivität des myeloischen Promotors und des Enhancers der Aminopeptidase N (APN/CD13) mittels Dual-Lyciferase-Assay. APN/CD13 ist ein ubiquitäres Ektoenzym, welches Funktionen im Bereich der Differenzierung hämatopoietischer Zellen, der Entstehung und Progredienz von Tumorerkrankungen, sowie chronischen Entzündungen hat. APN/CD13 ist ein Homodimer mit einem klassischen Promotor mit TATA-Box, der in epithelialen Zellen aktiv ist, sowie einem weiter in 5'-Position gelegenen Promotor, der in hämatopoietischen Zellen aktiv ist. Die APN/CD13-Expression auf hämatopoietischen Zellen in engen Grenzen reguliert. Es besteht eine Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad, weiterhin führt eine Änderung des Aktivitätszustandes z. B. durch Zytokine zu einer Veränderung der Expressionsrate. Für die Expression in myeloischen Zellen verdeutlichen die eigenen Ergebnisse die Bedeutung der Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren ETS, MYB und DMP-1. Anhand der Untersuchungen lässt sich auch zeigen, dass es sowohl in myeloischen als auch in lymphatischen Zellen weitere bisher nicht identifizierte Transkriptionsfaktoren geben muss, die für die transkriptionelle Regulation des APN-Gens verantwortlich sind.

Die Transkriptionsaktivität stellt letztlich das Integral der Einflüsse aus verschiedenen Signalkaskaden dar. In dieser Arbeit konnte ein positiv regulierender Einfluss des TGF- β Signalweges auf den myeloischen APN-Promotor in monozytären Zelllinien aufgezeigt werden. Die Ergebnisse sprechen auch für eine ausgeprägte intrazelluläre Interaktion zwischen den verschiedenen Signalkaskaden.

Weiterhin untersucht wurde der Einfluss des Enhancers. Eine aktivierende Funktion sowohl in myeloischen als auch lymphatischen Zellen konnte nachgewiesen werden. In epithelialen Zellen konnten innerhalb des Enhancers DNA-Bereiche identifiziert werden, die eine essentielle Funktion für die APN/CD13-Expression zu haben scheinen. Punktmutationen in diesen aktiven Bereichen führten nicht zu signifikanten Aktivitätsveränderungen in den untersuchten hämatopoietischen Zelllinien. Es ist anzunehmen, dass für die Vermittlung der Enhancerwirkung in hämatopoietischen Zellen andere Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen.

Geisler, Michael: Untersuchung der Regulation der Promotoraktivität von APN in hämatopoietischen Zellen.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 53 Seiten, 2004

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Proteinstruktur der Aminopeptidase N	1
1.2. Vorkommen und Funktion von APN, Koinzidenz mit anderen Aminopeptidasen	3
1.2.1. Vorkommen und Funktion der Aminopeptidase N	3
1.2.2. Klinisch-Immunologische Bedeutung	3
1.3. Genlokus und Genregulation	6
1.4. Bedeutung von TGF- β 1, der TGF- β Signaltransduktionsweg	9
1.5. Zielstellung	10
2. Materialien und Methoden	12
2.1. Kulturmedien und Antibiotika	12
2.2. Materialien und Chemikalien, Kits	12
2.3. Geräte	12
2.4. Konstrukte	12
2.4.1. Promotor Konstrukte	12
2.4.2. Enhancer Konstrukte	14
2.4.3. Renilla-Kontroll-Konstrukte	16
2.5. Plasmidvervielfältigung	17
2.5.1. Transformation von E. coli XL-1 blue, Selektion und Vermehrung	17
2.5.2. DNA-Extraktion, Gelelektrophorese, Absorptionsspektrometrie	17
2.6. Verwendete Zelllinien	18
2.6.1. K562	18
2.6.2. U937	18
2.6.3. Jurkat	18
2.7. Transfektion	18
2.7.1. Jurkat und K562	18
2.7.2. U937	19
2.8. Dual-Luciferase TM Assay	21
2.8.1. Lyse	21
2.8.2. Messung	21
2.9. Statistische Berechnungen	22

3.	Ergebnisse	23
3.1.	Optimierung der Transfektion	23
3.2.	Stimulation von transfizierten Jurkat- und K562-Zellen mit PMA	27
3.3.	Stimulation von transfizierten U937-Zellen mit TGF- β 1	31
4.	Diskussion	35
4.1.	Zur Methode	35
4.2.	Differenzen in der Promotoraktivierung–lymphatische Zellen versus myeloische Zellen	36
4.3.	Untersuchungen des TGF- β Signaltransduktionsweges	40
4.4.	Verhalten der Deletionskonstrukte des Enhancers unter TGF- β 1-Stimulation	43
4.5.	Zusammenfassung	43
	Literaturverzeichnis	45
	Thesen	52

Abkürzungsverzeichnis

APN	Aminopeptidase N
AS	Aminosäuren
BAL	Broncho-alveoläre Lavage
bp	Base Pairs = Basenpaare
CD	cluster of differentiation
DLR	Dual-Luciferase Reporter Assay System
DMRIE-C	1 : 1-Mischung: N-[1-(2,3-dimyristyloxy)propyl]-N,N-dimethyl-N-(2-hydroxyethyl) ammoniumbromid und Cholesterol
DNA	Desoxyribonucleic Acid = Desoxyribonukleinsäure
DPP IV	Dipeptidylpeptidase IV
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	extracellular response kinase
FCS	fetal calf serum = fetales Kälberserum
Hepes	N-(2-hydroxymethyl)piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid
HLA	human leucocyt antigen
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyrametid
kDA	Kilodalton
LU	light units
MAPK	Mitogen Aktivierte Protein Kinase
PBS	phosphate buffered saline
PKC	Proteinkinase C
PLB	passive lysis buffer
RLU	relative light units
RNA	Ribonucleic Acid = Ribonukleinsäure
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute medium No. 1640
TGF	Transforming Growth Factor
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid

1. Einleitung

Die Proteolyse bezeichnet den Vorgang des enzymgesteuerten Ab- und Umbaus von Eiweißen. Sie ist lebensnotwendig und wird von allen Lebewesen, und auch Viren, genutzt. Bisher sind über 500 proteolytisch aktive Enzyme bekannt, sie werden Proteasen oder Peptidasen genannt. Die Funktionen umfassen zum einen den vollständigen Abbau der Eiweiße und Peptide zu Aminosäuren (AS) im Rahmen digestorischer Vorgänge und beim Proteinturnover eines Organismus. Zum anderen auch die limitierte Proteolyse, z.B. im Rahmen von Gerinnung, Immunprozessen und der Aktivierung von Proteinvorstufen. Die limitierte Proteolyse kann Eigenschaften eines Eiweißstoffes modifizieren und neue Eigenschaften generieren. Sie stellt damit eine eigene Regulationsebene der Genexpression und des Zellstoffwechsels dar. Einige membranständige Proteasen haben auch Rezeptorfunktionen und spielen eine Rolle in der interzellulären Kommunikation, sowohl über ihre Substrate als auch über den direkten Zell-Zell-Kontakt. Ektopeptidasen haben in diesem Rahmen zentrale Bedeutung in komplexen Prozessen wie Zellvermehrung, Zelldifferenzierung, Virusvermehrung, Blutdruck- und Immunregulation bzw. -fehlregulation. Die fördernde oder auch hemmende Beeinflussung tumoröser Erkrankungen hinsichtlich Transformation, Wachstum, Tumorinvasion und Metastasierung wird für Peptidasen postuliert oder ist bereits erwiesen.

Das Interesse an der Regulation der Genexpression von Peptidasen hat deutlich zugenommen, da sowohl die Peptidasen selbst, als auch ihre genetischen Regulationselemente Zielstrukturen für die pharmakologische Therapie, beispielsweise von Bluthochdruck, der Immunschwäche AIDS, der Thrombose oder des Diabetes mellitus darstellen. Eine dieser Peptidasen, die in den letzten Jahren ins Zentrum des klinisch-therapeutischen Interesses gerückt wurde, ist die Aminopeptidase N (APN)/CD13, E.C.3.4.11.2.

1.1. Proteinstruktur der Aminopeptidase N

Aminopeptidase N ist ein 967 Aminosäuren großes, Membranprotein vom Typ II mit einer relativen molekularen Masse von 160 kDa, bildet auf Zellmembranen nichtkovalente Dimere und ist in der Zelle stets mit Membranstrukturen assoziiert. Das primäre Translationsprodukt ist ein 115 kDa Polypeptid, die Translation erfolgt durch an das Endoplasmatische Reticulum gebundene Ribosomen. Die ersten 24 AS dienen als Signalsequenz für die Membraninsertion

und dann als hydrophobe Verankerung des Enzyms in der Zellmembran, die ersten acht AS befinden sich im Zytoplasma [11,12,57].

Transmembrandomäne und Ektodomäne sind für eine korrekte aktive Sortierung des Moleküls zur apikalen Membran in epithelialen Zellen essentiell [89,90]. Vor dem Erscheinen auf der Oberfläche unterliegt das Enzym noch posttranslationalen Veränderungen. Im Golgi-Apparat finden O- und N- Glycosylierung statt [9,10,12,51]. Im extrazellulären katalytisch aktiven Teil, der größten Domäne des Proteins, findet man das Zn^{2+} -Bindungsmotiv: His Glu X X His, bekannt auch aus anderen Metalloproteasen. Dieses Pentapeptid ist für die Enzymaktivität absolut notwendig [57,59]. Bei einer Deletion in diesem Bereich verändert sich auch der Antigencharakter von APN [4]. Das aktive Enzym spaltet Aminosäuren vom N-terminus des Substrates ausgehend, neutrale Aminosäuren werden dabei bevorzugt [59,77].

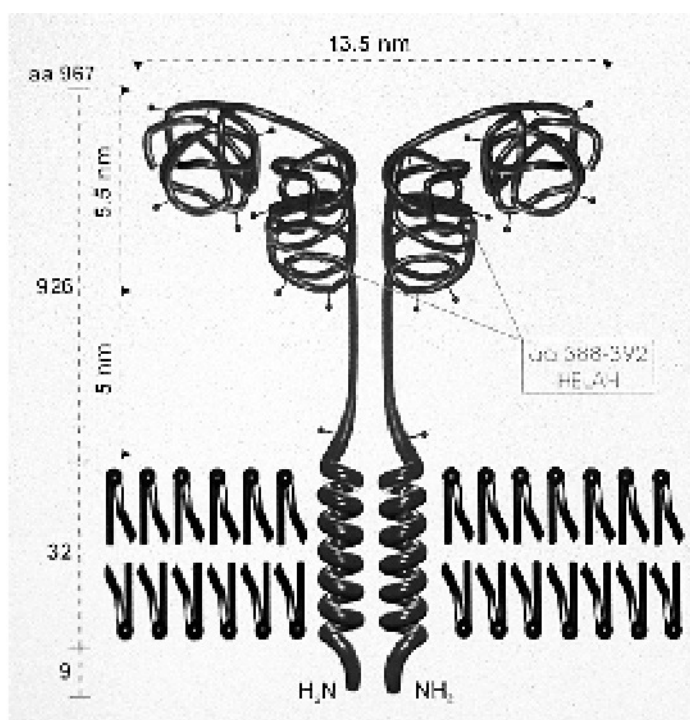


Abb. 1: Strukturmodell der Aminopeptidase N–nach [67]

1.2. Vorkommen und Funktion von APN, Koinzidenz mit anderen Aminopeptidasen

1.2.1. Vorkommen und Funktion der Aminopeptidase N

Sehr reichlich findet sich APN auf der apikalen Membran von Mukosazellen des Gastrointestinaltraktes und auf den Epithelzellen des proximalen Tubulus der Niere. Die Funktion besteht hier im Abbau von Oligopeptiden, welche im Rahmen der Verdauung von Nahrungsproteinen bzw. filtrierter Peptide anfallen [53]. Im Bereich synaptischer Membranen

erfolgt in Kombination mit der Neutralen Aminopeptidase/CD10 der Abbau von Endorphinen und Enkephalinen [1,47]. Eine eingeschränkte APN-Funktionalität führt zu Störungen bei der Reifung biliärer Kanalstrukturen in der Leber [44] und bei der Granulosazell-Differenzierung [85] ein Hinweis auf entscheidende Regulationsaufgaben in diesen Organen. Weitere bekannte Lokalisationen sind Endometrium- und Deciduazellen, in denen APN und Neutrale Endopeptidase/CD10 zyklusabhängig exprimiert werden [26].

1.2.2. Klinisch-Immunologische Bedeutung

APN ist identisch mit dem immunologischen Marker CD 13 [45] und spielt bei Erkrankungen unterschiedlichster Organe eine Rolle. So ist bekannt, daß APN auf trachealen Epithelzellen Corona- und Cytomegalieviren als Rezeptor dient [13] und dadurch bei Infekten der oberen Luftwege pathogenetisch beteiligt ist [18,81]. Erhöhte APN-Expression oder biochemische Veränderungen des Enzyms gelten als ursächliche Faktoren bei der Gallensteinentstehung [54,55]. Schwerpunkt der Betrachtungen sollen jedoch die pathogenetischen Funktionen von APN auf hämatopoietischen Zellen sein. Im Klassifizierungssystem hämatopoietischer Zellen dient CD13, wie auch CD10, der immunologischen Charakterisierung von Leukämie- und Lymphomzellen. Entsprechend den ursprünglichen Untersuchungsergebnissen war CD13 anfangs als Marker für Zellen der myeloischen Reihe festgelegt. Stammzellen und die meisten Zellstadien in der Entwicklung der myeloischen Reihe, granulo- und monozytäre Progenitorzellen, exprimieren CD13, jedoch auch die frühesten Stadien lymphoider Zellen. Reife B- oder T-Lymphozyten werden im Verlauf der Reifung CD13-negativ. Lymphozyten aus peripherem Blut, den Tonsillen oder der Milz exprimieren kein CD13 [79]. Allerdings konnte auch in Zellen der lymphatischen Linie CD13-mRNA detektiert werden [40]. Es ist weiterhin festzuhalten, dass APN/CD13 auf hämatopoietischen Zellen nicht nur einen Marker eines erreichten Entwicklungsstadiums darstellt, sondern auch Zellaktivität und Zellwachstum von dendritischen Zellen und Makrophagen Progenitor-/Precursorzellen reflektiert und nicht zuletzt selbst Einfluss auf die Differenzierung dieser Zellen ausübt [34,74].

Über die Funktion auf der Oberfläche dendritischer, antigenpräsentierender Zellen (APC), ist bekannt, dass APN/CD13 an MHC II gebundene Proteinantigene im Dienste des Antigen-Processing proteolytisch modifizieren kann. Auf den genannten Zellen existiert eine Koexpression von APN/CD13 und den Proteinen des MHC II [14,21,36]. Mehrere Wege zur Induktion der APN/CD13-Expression auf CD13-negativen Zellen sind beschrieben worden, die Funktion auf lymphatischen Zellen ist jedoch in weiten Gebieten noch unklar. Zum

Beispiel ist eine CD13-Expression nachgewiesen in T-Lymphozyten aus Synovialpannus von Arthritis-Patienten und aus Perikardergussflüssigkeit von Patienten nach Herzbeutel-eröffnung. Im Gegensatz dazu sind tonsilläre und Blut-T-Lymphozyten CD13-negativ [71,72]. Bei Kokultur von CD13-negativen T-Zellen (tonsilläre/Blut-T-Lymphozyten und Jurkat) mit CD13-positiven fibroblastenähnlichen Synoviozyten, Endothel-, Epithel- und Karzinomzellen konnte in vitro eine Induktion nachgewiesen werden. Diese Induktion der Expression in CD13-negativen Zellen wird durch Zell-Zell-Kontakt mit adhären-ten, CD13-positiven Zellen, Membranpräparationen CD13-positiver Synoviozyten oder fixierten Synoviozyten erreicht [68,69,87]. Bei der Rheumatoiden Arthritis (RA), einer chronisch entzündlichen Gelenkerkrankung, an der humorale und zellvermittelte Mechanismen beteiligt sind, scheint APN/CD13 somit eine wichtige pathophysiologische Rolle einzunehmen. Es kommt bei der RA zur Infiltration der Synovialis mit Lymphozyten und Monozyten, verbunden mit einer Freisetzung matrixzerstörender Enzyme und Zytokine und zur Proliferation der Synovialzellen mit nachfolgender Entwicklung eines Pannus und Gelenkzerstörung [2,97,98].

Eine Beeinflussung eines Tumorleidens durch APN/CD13-Präsenz wurde nachgewiesen, wobei die Pathomechanismen in vielen Fällen noch unklar sind. Eine APN/CD13-Expression ist beispielsweise auf tumorinfiltrierenden T-Zellen aus Nierenkarzinomen beschrieben. Hierbei handelt es sich auch um einen Aktivitätsmarker für T-Zellen [66]. B-Zell-Leukämien können ebenfalls APN/CD13-positiv verlaufen, zum Teil mit Auswirkungen auf die Prognose. So beeinflusst eine APN/CD13-Expression die Prognose im Erwachsenenalter negativ, im Kindesalter wiederum jedoch nicht [15,56,67]. Eine Rolle beim Abbau extrazellulärer Matrix bei der Tumorinvasion wird ebenfalls in Betracht gezogen. So lässt sich der Abbau von Kollagen IV durch Tumorzellen mittels Antikörpern gegen APN/CD13 und Inhibitoren des Enzyms konzentrationsabhängig hemmen [76].

Auf Endothelzellen existiert eine direkte Korrelation von APN/CD13-Expression mit der Angiogeneseaktivität. Endothelzellen innerhalb menschlicher Tumoren zeigen eine deutlich erhöhte Expression von APN/CD13, weniger stark innerhalb nicht tumoröser, proliferierender Gewebe. Endothelzellen innerhalb ruhender Gewebe exprimieren keine APN. Mittels der APN-Antagonisten Bestatin und Actinonin ließ sich die Angiogeneseaktivität und über die verminderte Durchblutung auch die Tumorprogression hemmen [5,63]. Der APN-Inhibitor Bestatin findet klinische Anwendung als Zytostatikum unter dem Namen Ubenimex [27,50,100]. Die verstärkte APN-Expression auf Endothelzellen wird u.a. ausgelöst durch

Hypoxie und angiogenetische Wachstumsfaktoren, wobei APN-Antagonisten nicht die Proliferation der Endothelzellen beeinträchtigen, sondern ihr Einfluss darin besteht, die Formation zu kapillären Strukturen zu verhindern [5].

APN hat eine hohe Affinität zu NGR-Aminosäuresequenzen. Dieser Sachverhalt lässt sich klinisch nutzen. Die Koppelung von Medikamenten an eine NGR-Sequenz führt dazu, dass die Konzentration in Gefäßgebieten mit erhöhter APN-Expression über der systemischen liegt [63]. Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha), ein Zytokin mit potenter antitumoröser Wirkung, besitzt leider eine ausgeprägte Toxizität bei systemischer Gabe. Eine Koppelung von TNF-alpha an eine NGR-Sequenz erhöht die antitumoröse Wirkung auf das 12-15fache des ungekoppelten Medikaments. Eine längere Verweildauer oder höhere Konzentration innerhalb der Tumorgefäße aufgrund einer Bindung an APN/CD13 wird als Ursache der besseren Wirksamkeit angesehen [8]. Die klinische Anwendbarkeit wird damit deutlich verbessert.

Bei Patienten mit Sarkoidose ist APN nicht nur ein Aktivitätsmarker, sondern besitzt selbst Einfluss auf die Aktivität der beteiligten Immunzellen. Die APN-Aktivität in der Broncho-Alveolären-Lavage von Patienten mit Sarkoidose ist höher als bei Gesunden, insbesondere bei parenchymaler Beteiligung. APN/CD13 war in Alveolar-Makrophagen bei Sarkoidose erhöht nachzuweisen und führte zur verstärkten Induktion einer chemotaktischen Migration von Lymphozyten, welche sich durch Bestatin hemmen ließ [86]. Es zeigt sich, dass APN/CD13 bei vielen Erkrankungen im Pathomechanismus eine Rolle spielt. Ein Verständnis der Funktionen dieses Enzyms und seiner Regulation wird auch zu einem besseren Verständnis der Pathogenese der genannten Krankheitsbilder führen und kann mögliche Ansatzpunkte für eine therapeutische Intervention aufdecken.

1.3. Genlokus und Genregulation

Das humane APN-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 15 (q25-q26) lokalisiert. Es ist über 30 kb groß und besteht aus 20 Exons [45]. [42,93] Die Regulationseinheit dieses Gens ist schematisch in Abb 2. dargestellt und besteht aus einem epithelialen Promotor, in 5'-Position, vor diesem liegt, durch ein Intron von 8kb Länge getrennt, der myeloische Promotor [79]. Ein 300 bp *bona fide* Enhancer liegt 2,7 kb in 5'-Orientierung vom APN-Gen zwischen beiden Promotoren [60].

Somit können zwei Transkripte existieren, ein 3,7 kb langes Transkript vom myeloischen und ein 3,4 kb langes Transkript vom epithelialen Promotor stammend, wobei das längere Transkript die regulativen Elemente des epithelialen Promotors enthält (Abb. 2). Die Proteine beider Transkripte unterscheiden sich jedoch nicht, da die Translationsinitiation beider Transkripte vom identischen Codon erfolgt.

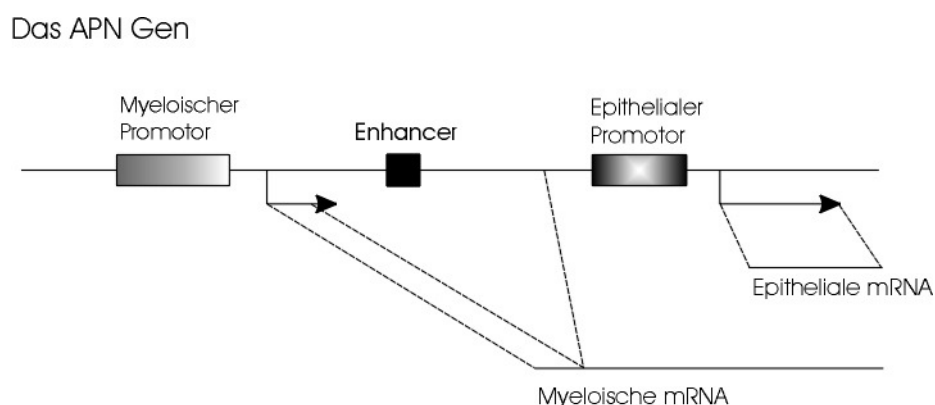


Abb. 2: Anordnung der regulativen Elemente des APN-Genlokus

Der epitheliale Promotor ist in epithelialen Zellen aktiv, z. B. in Bürstensaumzellen des Gastrointestinaltraktes und der Niere, Hepatozyten und Endometriumzellen, sowie in Endothelzellen und zeigt eine mäßige bis hohe konstitutive Expression, während der myeloische Promotor hauptsächlich in hämatopoietischen Zellen aktiv ist und eine geringere Expressionrate aufweist [5, 58, 59, 79]. Der Aufbau beider Promotoren unterscheidet sich deutlich. Der epitheliale Promotor zeigt einen klassischen Aufbau mit TATA-Box. Weiterhin konnten drei cis-Elemente identifiziert werden. Eine Region bindet den SP1-Transkriptionsfaktor, eine weitere interagiert mit dem Lebertranskriptionsfaktor LF-B1(HNF-1), welcher auch im Zellkern von Mukosazellen zu finden ist, und eine weitere Region, coup, interagiert mit verschiedenen nukleären Faktoren aus der Steroidrezeptorgruppe, welche differenziert in Leber und Mukosazellen exprimiert werden [59,61,62].

Der myeloische Promotor besitzt keine TATA-Box. Ein 455 bp großer Teil des Promotors enthält eine myb- und drei potentielle ets-Bindesequenzen (Abb. 3). MYB ist ein Transkriptionsfaktor, der vor allem in myeloischen Zellen Aktivierungsfunktionen ausübt. ETS gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, welche an der Regulation von Proliferation und Differenzierung in hämatopoietischen Zellen beteiligt sind. Intaktes c-MYB und c-ETS-2, welche beide in myeloischen Zellen exprimiert werden, kooperieren im Bereich

von -411 bp bis -219 bp synergistisch bei der Transaktivierung des myeloischen APN-Promotors. Eine Mutation der myb-Bindesequenz führt zu Inaktivität des Promotors [59,78,79].

Eine weitere Rolle spielt DMP1, ein MYB-ähnlicher Transkriptionsfaktor, welcher endogen in frühen myeloischen Zellen vorhanden ist. DMP1 bindet an eine der drei ets-Bindestellen und synergisiert mit c-MYB bei der Aktivierung. Der DMP1-DNA-Komplex ist deutlich stabiler als der ETS-DNA-Komplex [28]. Eine weitere Beeinflussung der Expression existiert durch den nuklearen Faktor c-MAF. Dieser kann Komplexe mit c-MYB bilden und führt dadurch zu einer ausgeprägten Expressionsverminderung des APN/CD13 Promotors. Die Expression von c-MAF bleibt während der Differenzierung myeloischer Zellen relativ konstant, jedoch zeigt sich in den unreifen Zellstadien ein hoher Anteil des MYB-MAF-Komplexes, welcher bei weiterer Differenzierung abnimmt. Damit nimmt auch die Inhibition der APN/CD13-Expression im Verlauf ab. Dies entspricht in etwa den Veränderungen der APN/CD13-Oberflächenexpression im Verlauf der Differenzierung. Über die Kombination von Hemmung bestimmter MYB-abhängiger Gene und zu vermutender Aktivierung bisher unidentifizierter Gene führt c-MAF in myeloischen Zellen zu einem Differenzierungsimpuls in Richtung Monozyten/Makrophagenreihe [22,23].

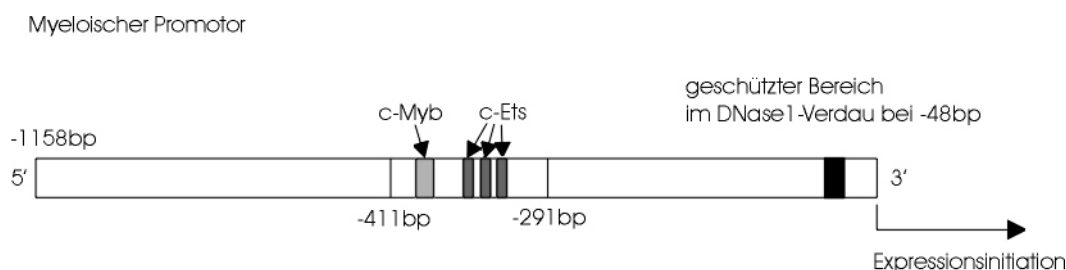


Abb. 3: Anordnung der aktiven Elemente des myeloischen Promotors

Der im Intron zwischen beiden Promotoren gelegene ca. 300 bp große Enhancer weist mehrere funktionell bedeutende Regionen auf, zwei davon könnten mit ETS-Transkriptionsfaktoren zusammenwirken, eine Region mit einem CCAAT/enhancer-binding-protein (C/EBP) und eine Region mit dem Transkriptionsfaktor SP1, wobei eine Kooperation der ETS-Faktoren mit einem an den myeloischen Promotor gebundenen c-MYB denkbar ist [59]. Die schematische Anordnung der identifizierten Elemente zeigt Abb. 4.

Eine Aktivität des Enhancers wurde nachgewiesen, sowohl in Zellen, die den epithelialen Promotor nutzen, als auch in Zellen, bei denen die APN/CD13 Expression über den myeloischen Promotor initiiert wird. Die Fähigkeit zur Kooperation mit beiden Promotoren ist somit wahrscheinlich. Eine Verstärkung der Expression wurde in Leberzellen (HepG2), intestinalen Zellen (CACO2) und myeloischen Zellen (K562) nachgewiesen [60].

Der APN/CD13-Enhancer

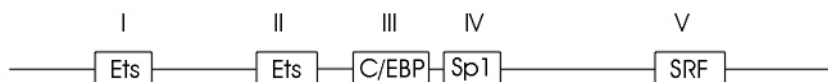


Abb. 4: Anordnung der aktiven Elemente des Enhancers

Von der APN sind keine Zymogene bekannt, das macht *in vivo* eine Regulation der Aktivität - neben Synthese und Abbau des Enzyms - über endogene Inhibitoren wahrscheinlich [67]. In monozytären Zellen scheint die Existenz von Speichergranula eine Rolle bei der rapiden Oberflächenexpression aktivierter Zellen zu spielen [94]

1.4. Bedeutung von TGF- β 1, der TGF- β -Signaltransduktionsweg

TGF- β ist ein potentes, multifunktionelles Zytokin mit zum Teil aktivierenden, zum Teil inhibierenden Effekten auf Entwicklung, Stoffwechsel und immunologische Antworten verschiedenster Zelltypen. TGF- β 1 ist die verbreitetste Isoform einer Familie strukturell verwandter Proteine. Es handelt sich um ein 25 kDa Homodimer, bestehend aus zwei 12,5 kDa Untereinheiten, welche über eine Disulfid-Brücke verbunden sind [83]. TGF- β 1 ist ein Wachstumsinhibitor für die meisten Zelltypen und wird von verschiedensten Zellen und Geweben in allen Stadien der Differenzierung produziert. Funktionell bedeutsam zeigt sich TGF- β 1 bei der Zelldifferenzierung, Knochenbildung, Angiogenese, Hämatopoiese, Zell-Zyklus-Progression, zellulärer Migration und der Produktion extrazellulärer Matrix [46,82], entscheidende Vorgänge bei Gewebedifferenzierung und Wundheilung [3].

Hinsichtlich immunologischer Funktionen besitzt TGF- β 1 ausgeprägte antiinflammatorische Effekte [75,91]. Hemmender Einfluss besteht beispielsweise auf die T- und B-Zellproliferation [33, 64], wie auch die Reifung [84] und Aktivierung [20] myeloischer Zellen. Auch in der Tumorgenese nimmt TGF- β eine zentrale Rolle ein [92]. Die Signaltransduktion vom Rezeptor zum Zellkern läuft über sogenannte Smad-Proteine, zytoplasmatische Mediatoren des TGF- β -Signalweges, vereinfacht dargestellt in Abb. 5. Die Bindung an den

TGF- β -Rezeptor aktiviert die Phosphorylierung der rezeptorassoziierten Smads wie z. B. Smad 2 und 3. Die aktivierten Smad-Proteine vereinen sich mit Smad 4 zu heteromeren Komplexen. Smad 4 ist ein nicht mit dem TGF- β -Rezeptor assoziiertes Protein. Alle über die Smad Proteine laufenden Signale benutzen Smad 4 gemeinsam. Die Komplexe mit Smad 4 agieren nach Einwandern in den Zellkern als Transkriptionsfaktoren für Gene des Zellstoffwechsels. Ziel sind jedoch auch Regulationsproteine des Smad-Signalweges selbst, so erfolgt im Sinne einer Rückkopplung die Expression von Smad 7, einem Inhibitor des Signalweges [46, 101]. Weitere Signalpfade laufen unter anderem auch über Mitogen-aktivierte-Protein-Kinasen (MAPK). Jedoch sind Bedeutung und Ankoppelung dieser möglichen Signalpfade erst in Ansätzen verstanden [92].

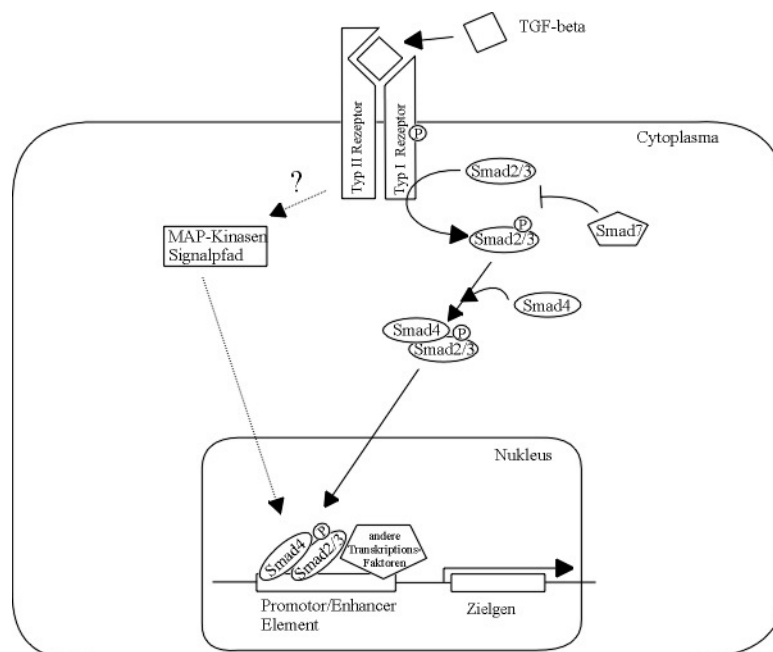


Abb. 5: Signaltransduktionsweg von TGF beta

1.5 Zielstellung

Die vorgelegte Arbeit untersucht die Induktion bzw. Inhibition des myeloischen APN/CD13 Promotors, sowie die Rolle des Enhancers in hämatopoietischen Zelllinien. Im Rahmen des Teilprojektes A-9 des Sonderforschungsbereiches 387 „Rolle zellulärer Peptidasen bei Immunfunktionen“ erfolgte am Institut für Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg die Untersuchung der Funktionen von APN/CD13. Eine Stimulation der Oberflächen- und mRNA-Expression wurde nachgewiesen durch Zell-Zell-Kontakt bzw.

Mitogenstimulation auf T-Zellen, sowie mit dem Zytokin TGF- β 1 auf myeloischen Zellen [31, 41, 69].

In dieser Arbeit soll die Aktivität der bekannten cis-Elemente vergleichend in myeloischen bzw. lymphatischen Zellen untersucht werden. Es soll festgestellt werden, innerhalb welches Zeitraumes sich eine Aktivierung des myeloischen Promotors durch das Mitogen PMA nachweisen lässt. Aufmerksamkeit gilt weiterhin dem Einfluss des Zytokins TGF- β 1 auf die Promotor- und Enhanceraktivität in U937 Zellen. Hierbei soll die Bedeutung des TGF- β -Signalweges für die Aktivierung bzw. Inhibition untersucht werden. Dabei kommen Plasmidkonstrukte zum Einsatz, welche eine Überexpression von Proteinen dieses Signalweges ermöglichen. Die Arbeit gehört eher dem Bereich der Grundlagenforschung an, es lassen sich jedoch bereits Aspekte der klinisch-therapeutischen Anwendbarkeit der Erkenntnisse über zelluläre Ektopeptidasen aufzeigen.

2. Materialien und Methoden

2.1. Kulturmedien und Antibiotika

RPMI 1640 (500 ml)

- Zusätze für Zellkultur:

Glutamin (5 ml, Konz. = 200 mM), Hepes (1,785 g), Gentamicin (15 mg), β -Mercaptoethanol (500 μ l, Konz. = 0,1 mM), Fungizone (125 μ g), FKS (10 %)

- Zusätze für Transfektion:

Glutamin (5 ml), Hepes (1,785 g)

OPTI-MEM (Invitrogen)

2.2. Materialien und Chemikalien, Kits

LB-Agar mit: 1 mg Ampicillin, 20 μ l X-Gal [20 ng/ml in Dimethylformamid], 100 μ l IPTG [200 mg/ml in H₂O]

Agarose Gel 0,9 % mit Ethidiumbromid 10 μ g/ml

Dual-Luciferase™ Reporter Assay System	Promega®
Mini Prep Kit	Qiagen®
Mega Prep Kit	Qiagen®
Phorbol-12-Myristate-13-Acetat	Calbiochem®
E.coli XL 1-Blue	Stratagene®

2.3. Geräte

Luminometer	Lumat LB 9507 (EG&G Berthold)
UV/VIS Spektrometer	LKB Ultrospec III (Pharmacia)
Inkubator	CO ₂ Unitherm 170 (UNIEQUIP)
Geldokumentationssystem	Polaroid MP 4 plus (Polaroid)

2.4. Konstrukte

2.4.1. Promotor-Konstrukte

Um einzelne Bereich des myeloischen Promotors auf aktive Transkriptionselemente zu untersuchen, mehrere auf dem pGL2-Vector basierende Konstrukte verwendet. Diese enthalten als aktive Elemente den vollständigen myeloischen Promotor (1158 Basenpaare, pGL2-1158luc) bzw. 5'-Deletionskonstrukte desselben (jeweils 411, 291, 216, 120 oder 40 Basenpaare in 3'-Position) gefolgt von der cDNA-Sequenz der Firefly-Luciferase als Reporter gen (pGL2-411luc, pGL2-291luc, pGL2-216luc, pGL2-120luc, pGL2-40luc). Weitere Bestandteile des Plasmides sind ein Beta-Lactamase-Gen, poly-A-Signale in 3'-Position des Promotor bzw. in 5'-Position vom Luciferase-Gen, sowie ein Intron in 5'-Position der Luciferase-cDNA gelegen, dargestellt in Abb. 6.

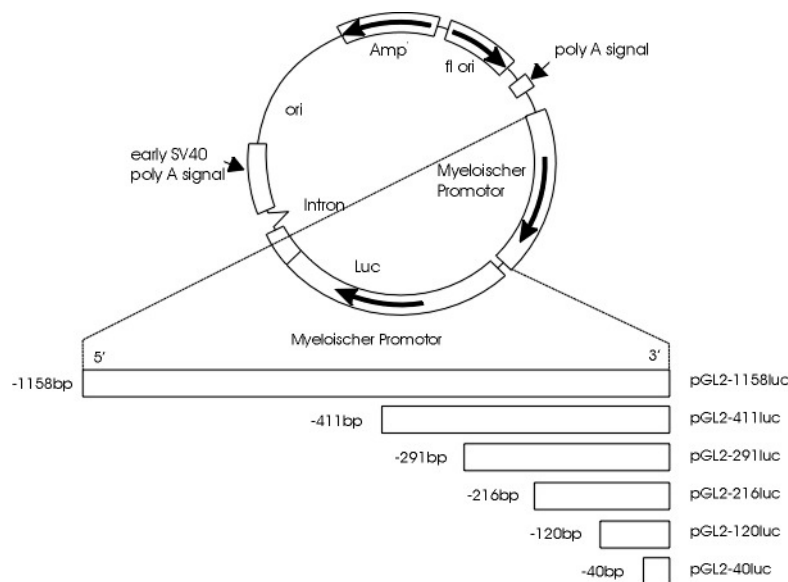


Abb. 6: Aufbau der Deletionskonstrukte: Luc - cDNA codierend für Firefly-Luciferase, Amp^r-Beta-Lactamase-Gen, vermittelt Ampicillin-Resistenz in *E. coli*, fl ori-Origin / filamentous phage abstammend, ori-Origin der Plasmidreplikation in *E. coli*, SV40-DNA-Bereich vom Simianvirus 40 stammend, poly A signal - mRNA Polyadenylationssignal

Um die Hintergrundlumineszens zu ermitteln, diente als Kontrollkonstrukt der pSK1.15WT-Vector, ein Plasmid, welches den myeloischen Promotor in voller Länge (-1158bp bis +65bp), jedoch kein Reportergen (Fireflyluciferase) enthält (pGL2-1158), schematisch in Abb. 7 dargestellt.

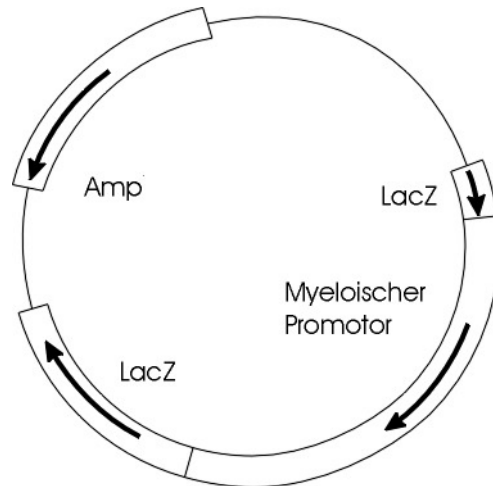


Abb. 7: Kontroll-Konstrukt ohne Reportergen: Amp^r – Beta-Lactamase-Gen, vermittelt Ampicillin-Resistenz in *E. coli*, LacZ – durch Klonen getrennte Teile des Galactosidase-Gens

Diese Plasmide wurden freundlicherweise von Linda Shapiro (Department of Experimental Oncology, St. Jude Children's Reserch Hospital, Memphis, Tennessee) zur Verfügung gestellt.

2.4.2. Enhancer Konstrukte

Um den Einfluss des Enhancers auf die Expressionsstärke zu untersuchen, wurden auf dem pGL3-Vector basierende Konstrukte verwendet. Ein Konstrukt enthielt den vollständigen myeloischen Promotor gefolgt vom Reportergen (pGL3-1158luc), ein weiteres zusätzlich den nativen Enhancer (pGL3-1158enh). Weiterhin wurden vier Plasmide verwendet, die Mutationen im Enhancerbereich aufweisen (pGL3-1158enh-mut1, pGL3-1158enh-mut2, pGL3-1158enh-mut4, pGL3-1158enh-mut6) (Abb. 8).

Die pGL3-Vektoren weisen eine deutlich höhere Expressionsrate auf als die pGL2-Vektoren. Ursächlich sind mehrere Modifikationen des pGL3- im Vergleich zum pGL2-Vektor anzunehmen. Austausch des SV40 „early“ poly-A Signal gegen das SV40 „late“ poly-A Signal, Einfügen eines synthetischen poly-A Signals und eines Transkriptionspause-Signals vor die Multikloningsite, und somit vor den Promotor, Entfernung des T-Introns und Einfügen einer

Kozak-Sequenz bedingen eine höhere Translation und Transkription bei geringerer Hintergrundaktivität [43, 16, 25, 35]. Veränderungen im Luciferase-Gen wie Entfernung einer Peroxisomen-Zielsequenz, sowie von Bindesequenzen für genetisch Regulationsproteine (AP1, AP2, SP1, TGT-3, LFA1) als auch potentieller Glykosylierungsstellen führen zu einer erhöhten Stabilität des Luciferase-Enzyms [19]. Beim verwendeten Kontrollplasmid erfolgte bei den Transfektionen ein Wechsel vom Renilla-Luciferase Plasmid mit dem Thymidin-Kinase-(TK)Promotor auf das Konstrukt mit dem Cytomegalie-Virus-(CMV)Promotor, da dieser Promotor ebenfalls eine erhöhte Expression aufweist. So konnte das Mengen-Verhältnis von Firefly-Luciferase-Vektor zum Kontrollplasmid von 1 : 10 beibehalten werden [80].

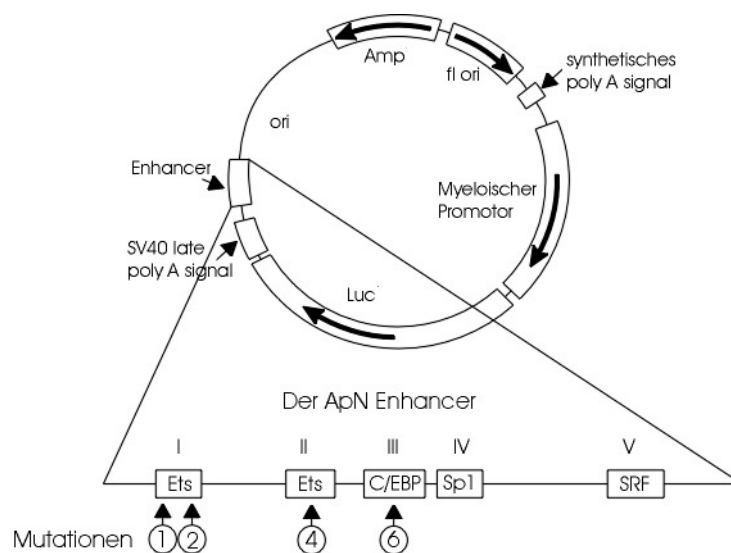


Abb. 8 Enhancer-Konstrukte: Luc⁺ - cDNA codierend für modifizierte Firefly-Luciferase, Amp^r-Betalactamasegen (vermittelt Ampicillin-Resistenz in E. coli), fl ori- Origin (filamentous phage abstammend), ori- Origin der Plasmidreplikation in E.coli, SV40 -DNA-Bereich vom SV40 stammend, poly A signal-mRNA Poly-adenylationssignal (Positionen der Mutation gemäß [57])

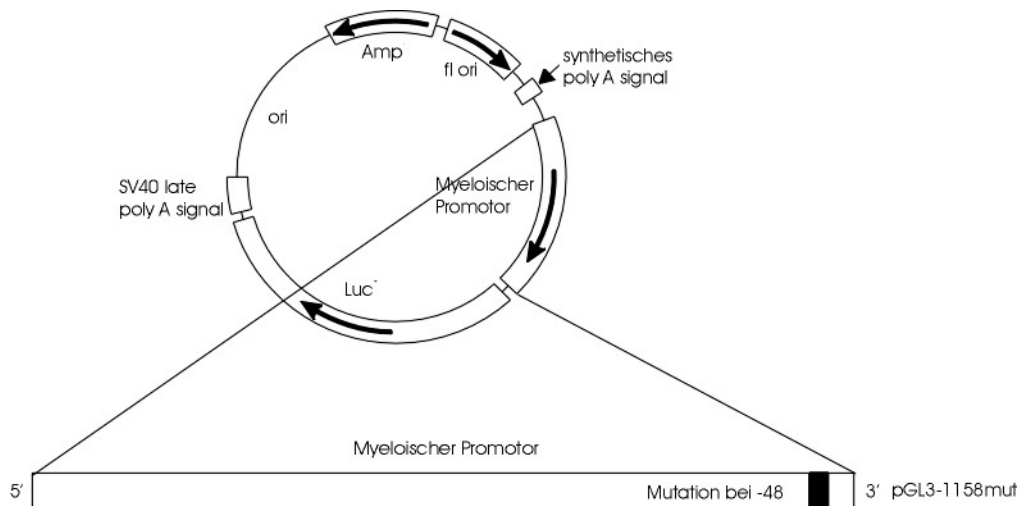


Abb. 9 Promotor-Mutations-Konstrukt: Luc⁺ - cDNA codierend für modifizierte Firefly-Luciferase, Amp^r - Betalactamasegen, vermittelt Ampicillin-Resistenz in *E. coli*, fl ori – Origin / filamentous phage abstammend, ori – Origin der Plasmidreplikation in *E. coli*, SV40 – DNA-Bereich vom SV40 stammend, poly A signal – mRNA Polyadenylationssignal

Im DNase I footprinting des Myeloischen Promotors, konnte unter Verwendung von T-Zellextrakten eine Proteinbindung im Bereich von -48 bis -35 bp nachgewiesen werden [32]. Dieser Bereich wurde deletiert (Abb. 9) und das Konstrukt (pGL3-1158mut) hinsichtlich seiner Aktivität in U937 Zellen untersucht.

Um den Einfluss von Faktoren der TGF-beta-Signaltransduktionskette untersuchen zu können, wurden Plasmide kotransfiziert, die eine hohe konstitutive Expression von Smad 3 bzw. Smad 4 aufweisen (pcDNA3.1Smad3, pcDNA3.1Smad4). Diese Konstrukte enthalten als aktive Elemente den SV40 Promotor, welcher eine hohe konstitutive Expression bedingt, gefolgt von der cDNA des Smad3- bzw. Smad4-Proteins. Die beschriebenen smad3- und smad4-Expressions-Konstrukte wurden freundlicherweise von Dr. R. Derynck (San Francisco, CA) zur Verfügung gestellt, die in Abb. 8 dargestellten Konstrukte stammen von Jorgen Olsen (Panum Institute, Kopenhagen).

2.4.3. Renilla-Kontroll-Konstrukte

Um den Einfluss von Schwankungen in Transfektionseffizienz und Zellzahl, sowie Pipettierfehlern auf das Ergebnis zu vermindern, erfolgte stets eine Kotransfektion mit einem Kontrollplasmid. Diese Kontrollplasmide enthalten einen Promotor mit konstanter vom untersuchten Transkriptionselement möglichst unabhängiger Expression gefolgt von einem cDNA-Abschnitt, welcher die Luciferase von *Renilla reniformis*, einem Coelenteraten,

codiert. Verwendung fanden zwei Plasmide, eines mit dem Promotor der Thymidinkinase des Herpesvirus (pRL-TK), ein zweites mit einem Promotor des Cytomegalievirus (pRL-CMV). Beide Konstrukte werden als Kontrollen in Verbindung mit dem Dual-Luciferase™-Assay-System verwendet.

2.5. Plasmidvervielfältigung

2.5.1. Transformation von E.coli XL 1-Blue, Selektion und Vermehrung

Die Transformation jedes der verwendeten Plasmide erfolgte in E.coli XL 1-Blue (Stratagene): auf 25 µl kompetenter Zellen wurden 25 ng Plasmid-DNA und 1µl beta-Mercaptoethanol gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 30 sec bei 42 °C erfolgte die erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Anschliessend wurden 500 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. 5-20 µl der Transformationslösung wurden auf LB-Agar-Platten (vorbehandelt mit 1 mg Ampicillin, 20 µl X-Gal [20 ng/ml in Dimethylformamid], 100 µl IPTG [200 mg/ml in H₂O]) aufgebracht und 16 h bei 37°C inkubiert. Unter sterilen Bedingungen wurde mit einer Pipettenspitze eine blaue Einzelkollonie abgenommen und in 2 ml LB-Medium ([Ampicillin] = 50 µg/ml) 16 h bei 37°C inkubiert. 100 µl werden asserviert, der gesamte Rest für den Miniprep (Qiagen) verwendet (siehe unten). Mit dem Asservat werden 500 ml LB-Medium ([Ampicillin] = 50µg/ml) beimpft. Nach 16 h Inkubation bei 37 °C erfolgte die Extraktion mit Hilfe des Mega Prep Kit (Qiagen) laut Herstellerangaben.

2.5.2. DNA- Extraktion, Gelelektrophorese, Absorptionsspektrometrie

Die Extraktion von DNA erfolgte als Miniprep oder Megaprep (beide Qiagen) nach technischer Anleitung des Herstellers. Verwendet wurden die Kits der Firma Qiagen, welche die Bakterien mittels alkalischer Lyse aufschließen, nach Adsorption an einer Silica-Gel-Membran erfolgt das Waschen und anschließend die Elution der Plasmid-DNA. Eine Probe der extrahierten DNA wurde mittels Gelelektrophorese untersucht (Agarose-Gel, 0,9 %, [Ethidiumbromid] = 1 µg/ml). Mit Hilfe der Absorptionsspektrometrie (LKB Ultrospec III, Pharmacia) wurde die Konzentration ermittelt und auf ca. 1,5 µg DNA/µl H₂O eingestellt. Als Lösungsmittel für die DNA wurde Wasser für Injektionszwecke (Braun) statt TE-Puffer verwendet, um einen zytotoxischen Effekt zu vermindern.

2.6. Verwendete Zelllinien

In den Experimenten wurden kontinuierliche Zelllinien verwendet. Als maligne transformierte Repräsentanten einer myeloischen Zelllinie fanden K562- und U937-Zellen Verwendung, sowie Jurkat-Zellen als Repräsentant einer lymphoiden Linie. Die verwendeten Zelllinien stammen aus der American Type Culture Collection (ATCC) und wurden im Institut für Medizinische Immunologie kultiviert. Als Kulturmedium für die erwähnten Zelllinien diente RPMI 1640 mit Zusätzen von Glutamin, HEPES, Gentamicin, beta-Mercaptoethanol, Fungizone und FKS (siehe unten).

2.6.1. K562

K562 stammt von Tumorzellen einer Chronisch Myeloischen Leukämie ab, die einer 53 Jahre alten Frau während einer Blastenkrise entnommen worden sind. Histologisch handelt es sich um erythrozytäre Vorläuferzellen. K562 sind multipotente, hämatopoietische maligne Zellen, die spontan in Vorläufer der erythrozytären, granulozytären und monozytären Reihe differenzieren. K562 Zellen exprimieren APN/CD13 und CD33, besitzen jedoch kein HLA-DR.

2.6.2. U937

Die mit U937 bezeichneten Zellen sind ebenfalls humanen Ursprungs. Sie sind als myelomonozytär charakterisiert. U937-Zellen exprimieren sowohl APN/CD13 als auch HLA-DR, CD4 und CD7.

2.6.3. Jurkat

Die Zellen der Linie Jurkat leiten sich von Tumorzellen einer akuten lymphoblastoiden Leukämie ab [48]. Auf ihrer Oberfläche exprimieren die Zellen CD2 und CD3, beides T-Zellmarker, und sind CD5-, CD26- und HLA-DR-negativ. Die Zytokine TNF und IL-2 werden von diesen Zellen sezerniert. APN/CD13 lässt sich unter normalen Kulturbedingungen auf der Zellmembran nicht nachweisen.

2.7. Transfektion

2.7.1. Jurkat und K562

Der Plasmidtransfer in die Zelle erfolgte mit der Methode der Lipotransfektion. Für die Transfektion der beiden Zelllinien Jurkat und K562 wurde DMRIE-C als Transfektionsreagens verwendet. DIMRIE-C ist eine 1:1 Mischung von N-[1-(2,3-dimyristyloxy)propyl]-N,N-dimethyl-N-(2-hydroxyethyl)ammoniumbromid und Cholesterol. Als Träger dienten 12-Loch-Platten. In den Vorversuchen wurde die DNA-Menge und die Menge an Lipofektionsreagenz variiert. Die Mengenverhältnisse betragen $1\mu\text{g}$ DNA zu $4\mu\text{l}$ DMRIE-C bei einer Zellzahl von 3×10^5 Zellen/Kavität. Als Medium während des Transfektionsvorganges diente OPTI-MEM. Weiterhin erfolgte ein Abgleich mit dem als Kontrolle verwendeten Renilla-Luciferase Plasmid. Es wurde das Plasmid mit dem Thymidinkinase Promotor benutzt. Ein Mengenverhältnis von Kontroll-Konstrukt zum untersuchten Plasmid betrug 1:10. Nach dem Mischen der Reagenzien erfolgte für 5 h die Inkubation in serum- und antibiotikafreiem RPMI 1640, um die Transfektionseffizienz nicht herabzusetzen.

Protokoll: Zellkultur in RPMI 1640 (mit Zusätzen für die Zellkultur)

- Zellen am Vortag der Transfektion aufsplitten und auf eine Dichte von ca. 5×10^5 Zellen/ml einstellen
- in 12-Loch-Platten pro Kavität: $250\mu\text{l}$ OPTI-MEM, $4\mu\text{l}$ DMRIE-C Reagenz mischen
- $1\mu\text{g}$ Plasmid-DNA, $0,1\mu\text{g}$ TK-Renilla-Plasmid in $250\mu\text{l}$ OPTI-MEM /Kavität hinzufügen
- 30 min bei $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 inkubieren
- 3×10^5 Zellen/Kavität in $250\mu\text{l}$ RPMI 1640 (mit Zusätzen für die Transfektion) zufügen
- 5 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 inkubieren
- 1 ml RPMI (für Kultur)/Kavität zufügen
- 24 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 wachsen lassen
- Stimulation mit $17,5\mu\text{l}$ PMA ($1\text{ng}/\mu\text{l}$)/Kavität \rightarrow entspricht einer Konzentration im Medium von $[\text{PMA}] = 10\text{ ng/ml}$
- Zellen ernten \rightarrow Dual-LuciferaseTM Assay

2.7.2. U937

Für die Transfektion von U937 erwies sich DMRIE-C als zu ineffektiv. Deshalb wurde Superfect (Qiagen) verwendet, mit dem sich eine ausreichende Transfektionsrate erzielen ließ. Als Träger dienten 48-Loch-Platten. Die Mengenverhältnisse betragen 4 µg DNA zu 4 µl Superfect bei einer Zellzahl von 5×10^5 Zellen/Kavität. Die Zellen können in normalem Transfektionsmedium verbleiben, nur der Vorgang der Komplexbildung DNA-Superfect muss in serum- und antibiotikafreiem RPMI 1640 Medium erfolgen.

Protokoll:

- Zellkultur in RPMI 1640 (mit Zusätzen für die Zellkultur)
- Zellen am Vortag der Transfektion aufsplitten und auf eine Dichte von ca. 5×10^5 Zellen/ml einstellen

In 48-Loch-Platten wurden vorbereitet:

- 5×10^5 Zellen/Kavität in 400 µl RPMI 1640 (für die Zellkultur mit Zusätzen) in einem sterilen Reagenzglas werden je Kavität vorbereitet:
- 4 µg DNA werden in 50 µl RPMI 1640 (mit Zusätzen für die Transfektion) gelöst
- 4 µl Superfect zufügen
- 10 sec. vortexen, 10 min. bei Raumtemperatur inkubieren
- mit 50 µl RPMI 1640 (für Transfektion ohne Zusätze) verdünnen → Mix zu den Zellen hinzufügen
- 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubieren
- Stimulation mit 15 µl TGF-β1 (1 ng/µl)/Kavität → entspricht einer Konzentration im Medium von [TGF-β1] = 30 ng/ml
- Zellen ernten → Dual-Luciferase™ Assay

2.8. Dual-Luciferase™ Assay

Gemessen werden über die Lichtemission die Konzentrationen von Firefly-Luciferase und Renilla-Luciferase.

Reporter Enzym	mRNA Halbwertszeit	Protein Halbwertszeit	Molekulargewicht	Substrat	Sensitivität
Firefly Luciferase	6 h	3 h	62 kDa Monomer	Käferluciferin	1 fg 10^{-20} mol
Renilla Luciferase	unbekannt	5 h	35 kDa Monomer	Coelenterazin	10 fg 3×10^{-19} mol

Tab. 1: Vergleich experimentell wichtiger Parameter von Firefly- und Renilla-Luciferase [49,65]

Die Aufbereitung der Zellen und die Messung erfolgte, bei geringfügiger Modifikation des Protokolls, mit dem Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega) und einem Luminometer mit Dual-Injektor (Lumat LB 9507, EG&G Berthold). Die Lösungen Passive Lysis Buffer (PLB), Luciferase Assay Reagent II (LARII) und Stop&Glo Reagent sind Bestandteile des Dual-Luciferase™ Reporter Assay Systems (Promega) und wurden laut technischem Handbuch hergestellt.

2.8.1. Lyse

Der gesamte Inhalt einer Kavität wird in ein 2-ml-Eppendorf-Röhrchen überführt. Danach wird bei 25 °C mit 3600 U/min zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Pellet wird mit 1 ml PBS (Raumtemperatur) gewaschen. Durch die Zugabe von 200 µl PLB (Promega) pro Röhrchen erfolgt die chemische Lyse der Zellen. Der Vorgang erfolgt in einem Schüttler 15 min bei Raumtemperatur.

2.8.2. Messung

35 µl des oben gewonnenen Lysates werden in ein Messröhrchen überführt. Die Messung erfolgt im Luminometer automatisch in zwei Schritten. Beim ersten Schritt erfolgt die Zugabe von 70 µl LARII™ (Promega). Nach einem kurzen Intervall von 0,6 s erfolgt die Messung der

Lichtemission über 10 s. Nach der Messung der Firefly-Lumineszenz werden im zweiten Schritt 70 µl Stop&Glo™ (Promega) zugefügt. Nach 0,6 s Intervall erfolgt die Messung der Renilla-Lumineszenz über 10 s, Darstellung in Abb. 10. Das Gerät errechnet den Koeffizienten Messwert 1 / Messwert 2 aus und druckt die absoluten Messwerte, sowie den Koeffizienten aus.

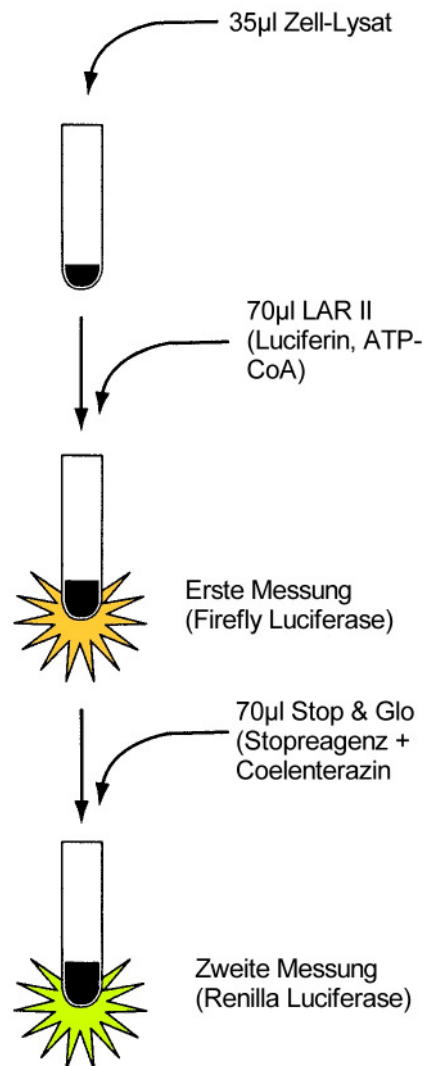


Abb. 10: Schematische Darstellung des Messvorganges beim Dual-Luciferase™ Reporter Assay System. [65]

2.9 Statistische Berechnungen

Die Vorversuche zur Optimierung der Transfektion wurden jeweils einmal wiederholt, der in LU (light units) angegebene Wert ist Mittelwert der erhobenen Daten. Die in den Diagrammen zu den Stimulationsversuchen gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 3malig identisch durchgeführten Experimenten. Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung wieder. (Die Berechnung erfolgte mittels Microsoft Excel.)

3. Ergebnisse

3.1. Optimierung der Transfektion

Die Optimierung erfolgte mit den Konstrukten, die den „full length“- Promotor enthielten. Später kamen die Deletionskonstrukte zum Einsatz, siehe Abb. 11, um die Aktivität einzelner Abschnitte des Promotors beurteilen zu können, insbesondere ihre Aktivitätsdifferenz in Zelllinien lymphatischer bzw. myeloischer Abstammung.

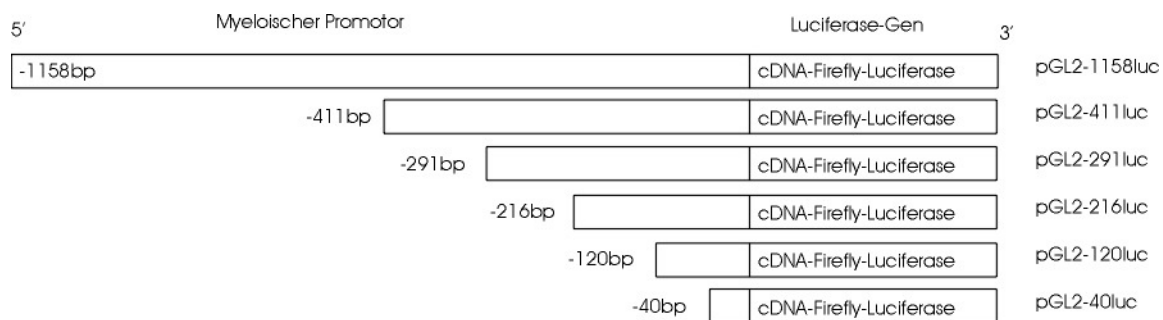


Abb. 11: Die Deletionskonstrukte des myeloischen Promotors

Die Optimierung der Menge sowohl von DNA als auch von Transfektionsreagenz erfolgten, um sich bei den Messungen genügend weit über der Hintergrundlumineszenz zu bewegen, da effektive Transfektionsprotokolle anderer Arbeitsgruppen nicht existierten und die vom Hersteller angegebenen Mengbereiche von Transfektionsreagenz, DNA und Zellen sich als zu ineffektiv erwiesen. Die Experimente wurden in 12-Loch-Platten durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle wurde das Plasmid mit vollständigem myeloischen Promotor gefolgt von der Fireflyluciferase-cDNA (pGL2-1158luc) verwendet. Als Negativ-Kontrolle für die Hintergrundlumineszenz diente ein Leervektor, ein Konstrukt mit vollständigem myeloischen Promotor ohne Fireflyluciferase-cDNA (pGL2-1158) (Abb. 7). Auf eine Kotransfektion mit einem Renilla-Luciferase-Plasmid wurde verzichtet, da hier nur die absolute Ausbeute an Luciferase interessierte. Jurkat und K562 ließen sich effizient mit DMRIE-C transfizieren (nicht alle Daten gezeigt).

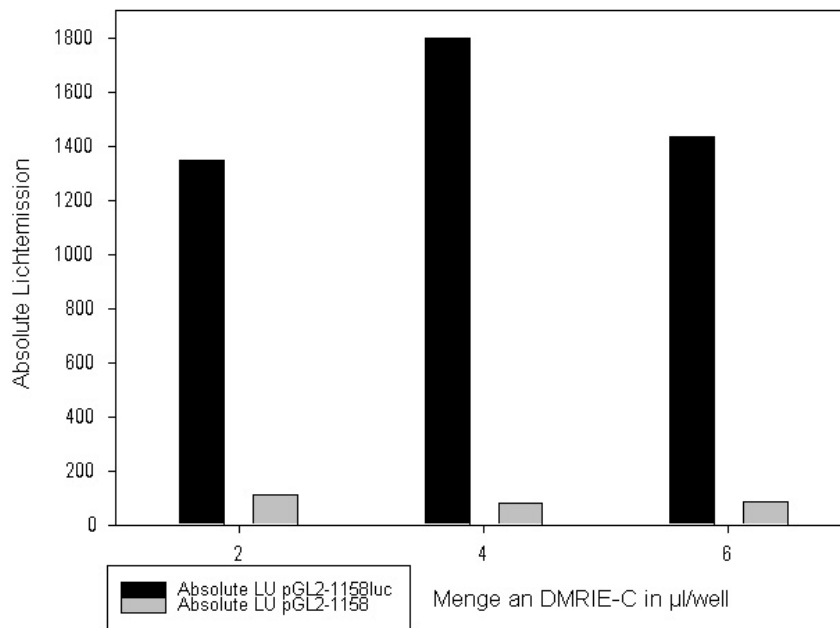


Abb. 12: Optimierung der Transfektion von Jurkat (Zellzahl 5×10^5 Zellen, DNA-Menge: $1 \mu\text{g}$)

Abb. 12 und Abb. 13 zeigen die Ergebnisse bei der Variation der eingesetzten DMRIE-C Menge, bei konstanter Menge an DNA und Zellen. Somit erwiesen sich eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen, $1 \mu\text{g}$ DNA und $4 \mu\text{l}$ DMRIE-C pro Kavität, sowohl bei Jurkat als auch bei K562 als günstig.

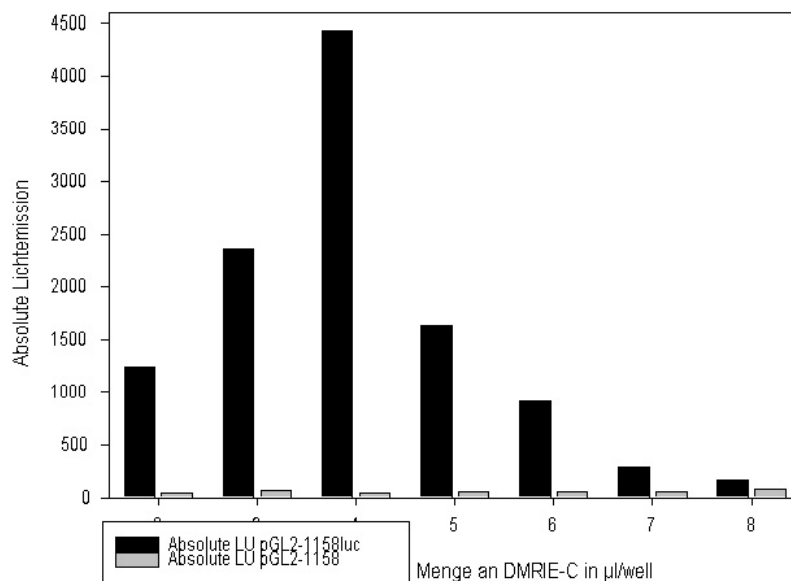


Abb. 13: Optimierung der Transfektion von K562 (Zellzahl 5×10^5 Zellen, DNA-Menge: $1 \mu\text{g}$)

Für die Zelllinie U937 konnte mit DMRIE-C keine effiziente Transfektion erreicht werden, unter mehreren anderen getesteten Lipotransfectionsreagenzien erwies sich jedoch Superfect als effektives Reagenz, siehe Abb. 14.

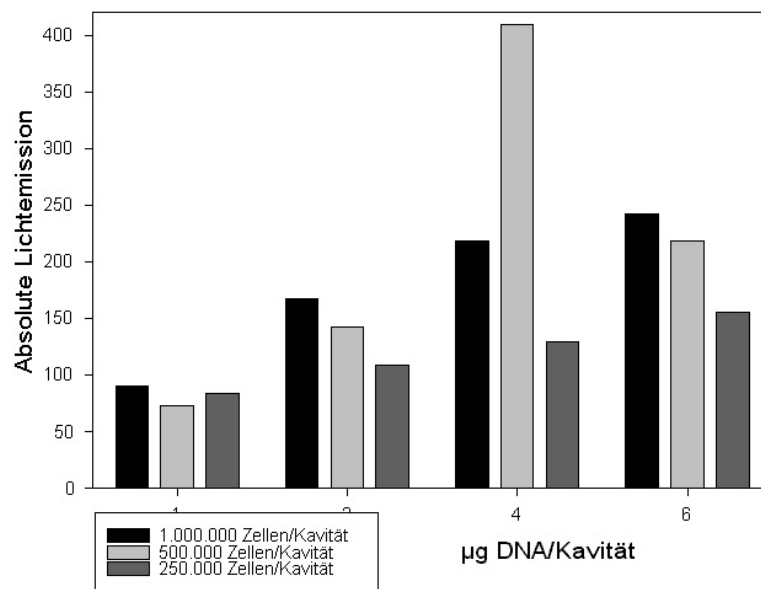


Abb. 14: Ermitteln des optimalen Mischungsverhältnisses Superfect/DNA (Zellzahl: 5×10^5)

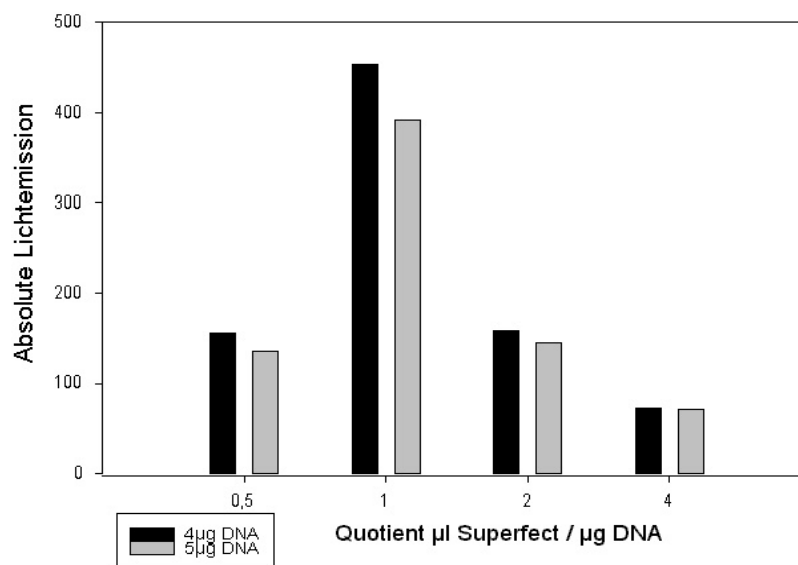


Abb. 15: Transfektionsoptimierung von U937 (Verhältnis DNA-Menge zu Superfect = $1 \mu\text{g}:1 \mu\text{l}$)

Abb. 15 zeigt die höchste Luciferase-Ausbeute bei einem Einsatz von 5×10^5 Zellen, 4 μg DNA und 4 μl Superfect pro Kavität in 48-Loch-Platten. Auf eine Kotransfektion mit einem Renilla-Kontrollplasmid wurde aus oben genannten Gründen auch hier verzichtet. Da die DNA-Menge des Renilla-Plasmids im endgültigen Transfektionsprotokoll im Verhältnis 1 : 10 zum Luciferase Plasmid steht, wird eine Minderung der Transfektionseffizienz als vernachlässigbar angesehen.

3.2. Stimulation von transfizierten Jurkat- und K562-Zellen mit PMA

Um Differenzen der APN-Promotoraktivierung herauszustellen erfolgte die Aktivierung der Zellen mit dem Phorbolesther PMA als unspezifischem Aktivator. Nach Transfektion der Zellen mit dem pGL2-1158luc-Konstrukt und anschließender 24stündiger Ruhephase erfolgte die Zugabe von PMA zu den transfizierten Zellen. Nach jeweils $\frac{1}{2}$, 1, 3, 6, und 24 Stunden erfolgte die Messung der Luciferase-Aktivität. Die Aktivität wird in „Relative Light Units“ angegeben, dieser Wert stellt den Quotienten von absoluter Firefly-Luciferase-Lichtemission und absoluter Renilla-Luciferase-Lichtemission dar. Der Wert 100 entspricht der unstimulierten Aktivität des „full length“- Promotors.

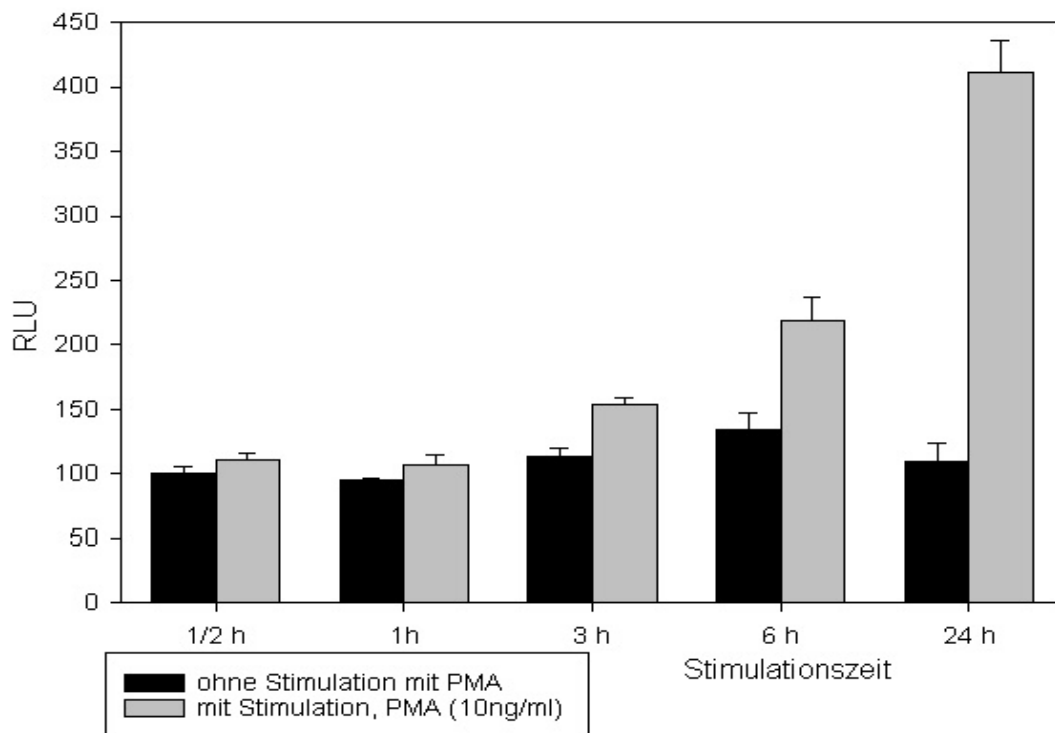


Abb. 16: Transfektion des Konstruktes mit dem vollständigen Promotor (pGL2-1158luc) in Jurkat-Zellen, PMA- Stimulation

Abb. 16 zeigt, dass in der Zelllinie Jurkat eine höhere Luciferase-Aktivität bereits 3h nach PMA-Stimulation nachzuweisen ist. Nach 24 h beträgt sie das ca. 3,8fache der Aktivität in unstimulierten Jurkatzellen. Bei K562 ist eine Aktivitätszunahme 6h nach PMA- Zugabe nachweisbar und erreicht 24 h nach Stimulation das 11fache der Grundaktivität. Die Daten sind in Abb. 17 dargestellt.

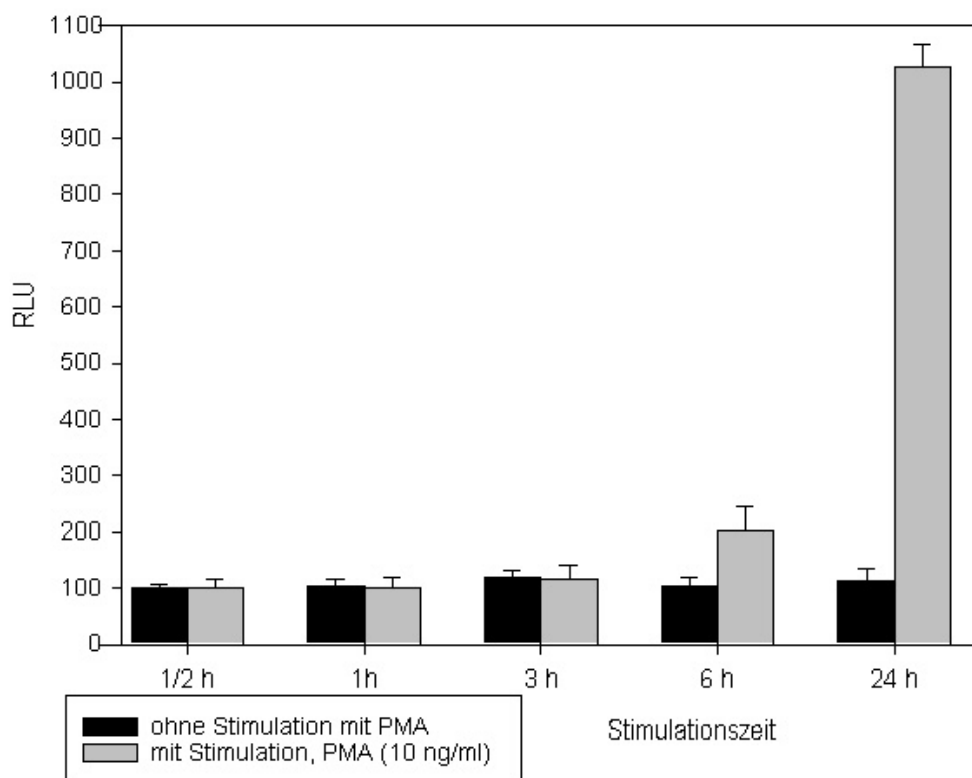


Abb. 17: Transfektion des Konstruktes mit dem vollständigen Promotor (pGL2-1158luc) in K562-Zellen, PMA- Stimulation

Der Abgleich zur Hintergrundlumineszenz erfolgte stets durch Kotransfektion mit dem Renilla-Luciferase-Plasmid.

In den vorangegangenen Experimenten kamen die Konstrukte mit vollständigem Promotor zum Einsatz. Um jedoch vorhandene funktionelle Bereiche im myeloischen Promotor zu identifizieren, erfolgte nun die Transfektion der Deletionskonstrukte. Nach 12stündiger PMA-Stimulation (10 ng/ml) wurden die Zellen lysiert und mittels Dual-Luciferase-Assay die Luciferase-Aktivität gemessen.

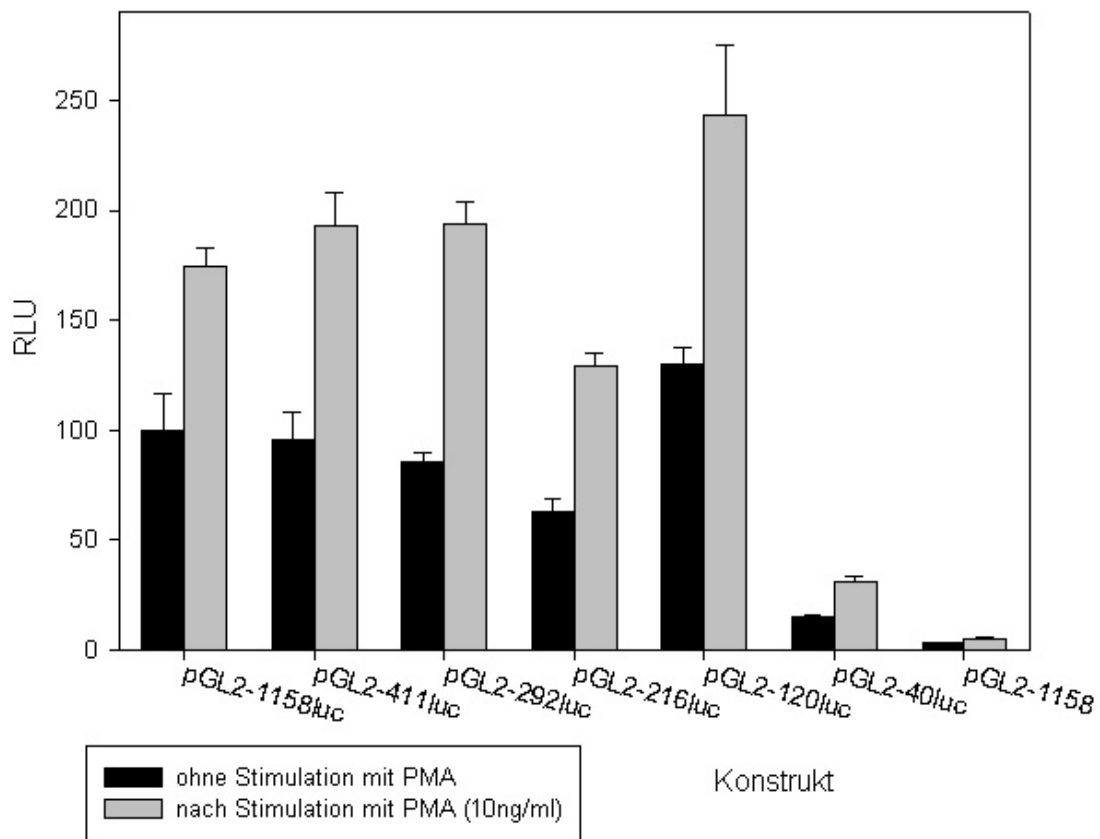


Abb. 18: Transfektion der Deletions-Konstrukte in Jurkat-Zellen, 12h Stimulation mit PMA

Abb. 18 zeigt die Aktivität der Deletionskonstrukte sowohl unstimuliert als auch nach 12 h PMA-Stimulation in Jurkatzellen. Es zeigt sich eine Abnahme der Aktivität im Vergleich zum vollständigen Promotor beim -216-Konstrukt (0,6fach), eine Zunahme beim -120-Konstrukt (1,3fach), und ein deutlicher Verlust beim -40-Konstrukt (0,14faches der Aktivität des vollständigen Promotors). Die PMA-Stimulation verändert das Aktivitätsprofil kaum, eine gleichsinnige Aktivitätserhöhung auf etwa doppelte Aktivität bei allen Konstrukten wird deutlich (minimal ca. 1,75fach beim vollständigen Promotor bis maximal 2,1fach beim -292-Konstrukt).

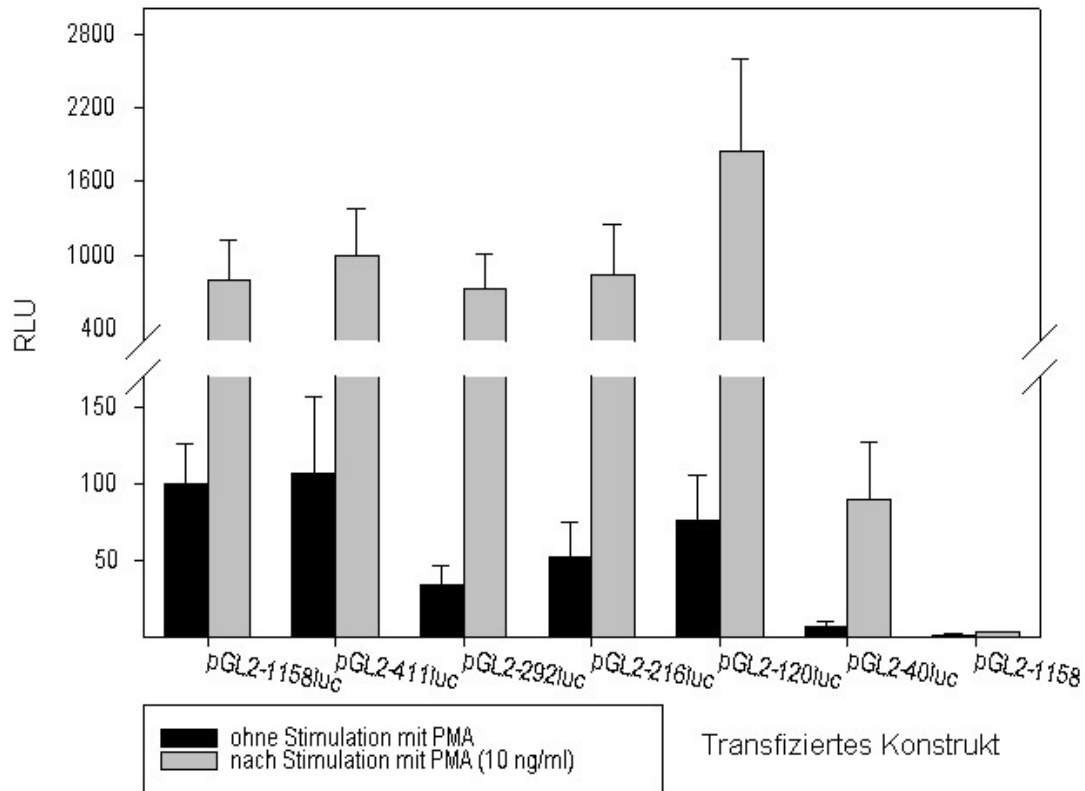


Abb. 19: Transfektion der Deletions-Konstrukte in K562-Zellen, 12 h Stimulation mit PMA

In den Zellen der Zelllinie K562 findet sich im unstimulierten Zustand eine deutliche Aktivitätsabnahme beim-292-Konstrukt (0,3faches des vollständigen Promotors), ein Anstieg im Bereich des-120-Konstruktes (0,8fach) und ebenfalls ein drastischer Abfall der Aktivität beim-40-Konstrukt (0,07fach). Die Stimulation mit PMA führt zu einer erheblichen Zunahme der Luciferaseaktivität bei allen Deletionsprodukten. Während sie die Aktivität des vollständigen Promotors auf das 8fache erhöht, liegt sie bei den anderen Konstrukten noch darüber, 21fache Aktivität beim-292-, 16fache beim-216- und 24fache beim-120-Konstrukt (siehe Abb. 19).

3.3. Stimulation von transfizierten U937-Zellen mit TGF-beta-1

Durch TGF- β 1 konnte in Versuchen anderer Arbeitsgruppeneine Stimulation der Expression von APN/CD13-mRNA und Oberflächenprotein nachgewiesen werden, siehe auch Kapitel 1. Die folgenden Experimente sollen untersuchen, ob die erhöhten Mengen an APN/CD13-mRNA eher aus einer Neusynthese, entsprechend einer Promotoraktivierung, resultieren oder eher auf Stabilisierung der mRNA. Weiteres Augenmerk soll auf die Bedeutung des Smad-Signaltransduktionsweges gerichtet werden. Zur Aktivierung dieses Weges wurden Smad-cDNA-Konstrukte zu den APN-Promotor-Luciferase-Konstrukten kotransfiziert. Abb. 20 zeigt die Untersuchung des pGL3 Konstrukts mit myeloischem Promotor, des pGL3-Konstrukts mit myeloischem Promotor und Enhancer in der myeloischen Zelllinie U937. Zum Abgleich wurde wie in den vorhergehenden Experimenten das Renilla-Konstrukt kotransfiziert.

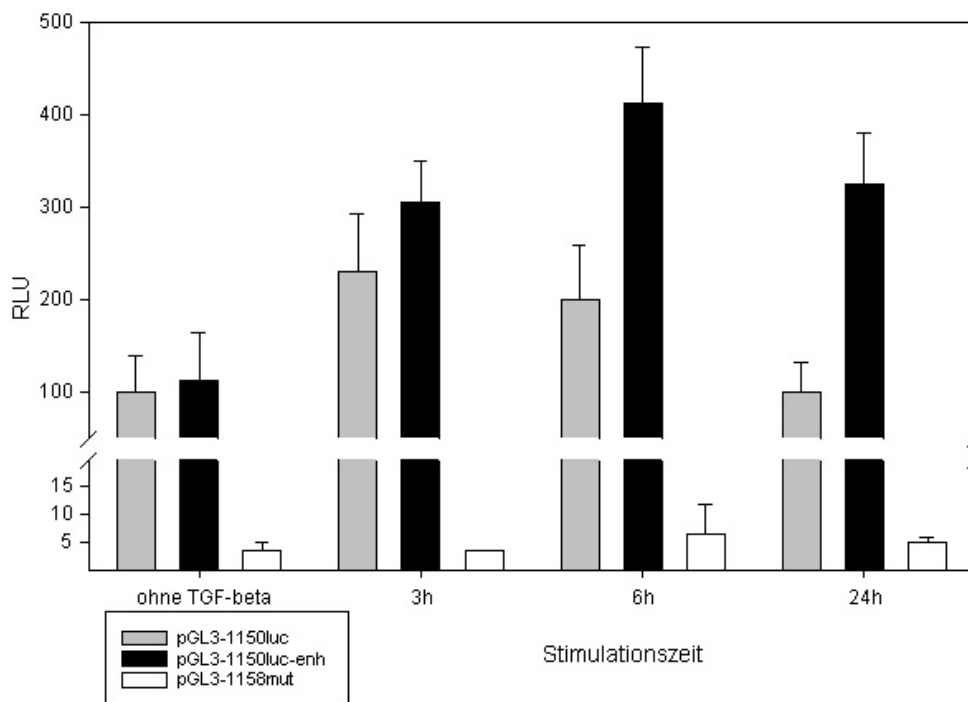


Abb.20: Transfektion der pGL3-Konstrukte (vollständiger Promotor, Promotor und Enhancer, mutierter Promotor) in U937-Zellen, Stimulation mit TGF- β 1, Untersuchungszeitpunkt 48 h nach Transfektion

Die in Abb. 20 dargestellten Ergebnisse zeigen eine maximale Stimulation der Aktivität des Enhancer-losen Plasmids nach 3 h und eine Rückkehr zur ursprünglichen Aktivität nach 24 h, während das Maximum des Enhancerkonstruktes erst nach 6 h erreicht wird und die Stimulation nach 24 h noch weiterhin anhält. Das Promotorkonstrukt mit der Mutation bei Nukleotid-48 bis-35 (pGL3-1158mut) weist eine ca. 50fach verringerte Aktivität auf, welche sich auch nicht nennenswert durch TGF- β 1 stimulieren lässt.

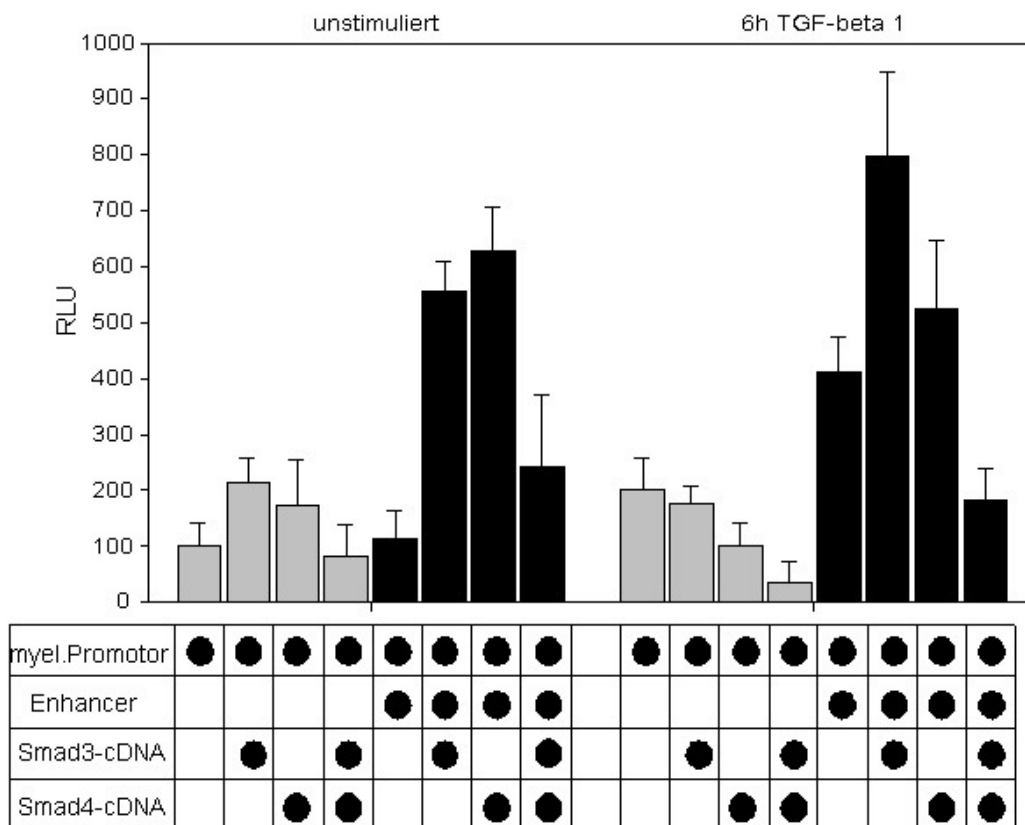


Abb. 21: Kotransfektion von pGL3-1158luc (grau) und pGL3-1158luc-enh (schwarz) mit den Expressionskonstrukten für Smad3 und Smad4, (Ein Konstrukt, welches transfiziert wurde, ist in der Tabelle mit einem Punkt gekennzeichnet.) Untersuchungszeitpunkt 48 h nach Transfektion, Zelllinie U937.

In weiteren Experimenten erfolgte zusätzlich zur Transfektion der Plasmidkonstrukte mit dem myeloischen Promotor allein oder dem Promotor mit Enhancer die Kotransfektion mit Expressionskonstrukten, welche für Smad 3 bzw. Smad 4 kodieren, um so eine Überexpression dieser Faktoren in der Zelle zu erreichen. Abb. 21 zeigt die Daten nach Transfektion und Stimulation mit TGF-beta-1.

Die Luciferaseexpression des enhancerlosen Promotorkonstrukts, beträgt nach 6 h das ca. 2fache, nach 24 h wird der Ausgangswert wieder erreicht (Daten nicht gezeigt). Bei Kotransfektion des enhancerlosen Konstruktes mit einem der Smad-Konstrukte kommt es zu einer 1,5 bis 2fachen Überexpression von Luciferase, welche bei Transfektion beider Smad-Konstrukte nicht nachweisbar ist. Unter zusätzlichem TGF- β 1-Einfluss wird durch die Kotransfektion eines Smad-Konstruktes der oben beschriebene expressionsfördernde Einfluss aufgehoben. Bei Kotransfektion beider Smad-Konstrukte kommt es nach 6 h TGF- β 1-Einwirkung sogar zu einer deutlichen Suppression auf das ca.0,5fache des Ausgangswertes. Bei Vorhandensein des Enhancers steigt die Stimulierbarkeit der Luciferaseexpression durch TGF- β 1 auf das 3,5fache. Wobei auch nach 24h Stimulation die Aktivität noch das 2,8fache des Ausgangswertes beträgt (Daten nicht gezeigt). Die Kotransfektion eines Smad-Konstruktes führt zu einer Erhöhung der Expression auf das 5fache beim Smad3- bzw. auf das 5,6fache beim Smad4-Konstrukt. Bei Kotransfektion beider Smad-Konstrukte liegt die Expression wieder deutlich niedriger. 6 h nach Zugabe von TGF- β 1 zeigt sich keine signifikante Änderung der RLU bei den mit einem einzelnen Smad-Konstrukt kotransfizierten Zellen. Bei Kotransfektion beider Smad-Vektoren ist die Expression im Vergleich zum stimulierten Enhancerprodukt auf das 0,4fache verringert.

Im folgenden Experiment wurden Konstrukte transfiziert, welche als aktive Elemente neben dem vollständigen Promotor auch den Enhancerbereich enthielten (siehe Materialien und Methoden 2.4.2.). Es handelt sich hierbei jedoch nicht um den nativen APN-Enhancer, sondern um einen durch zusätzlich eingeführte Punktmutationen veränderten Enhancer.

Der ApN Enhancer

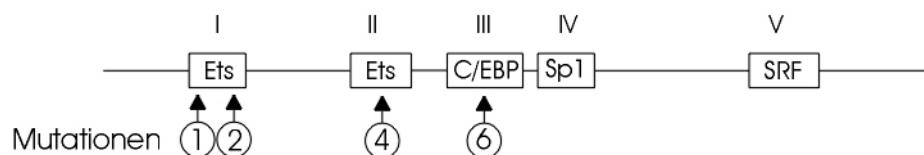


Abb. 22 Lage der Enhancer-Mutationen im Bereich aktiver Elemente (gemäß [57])

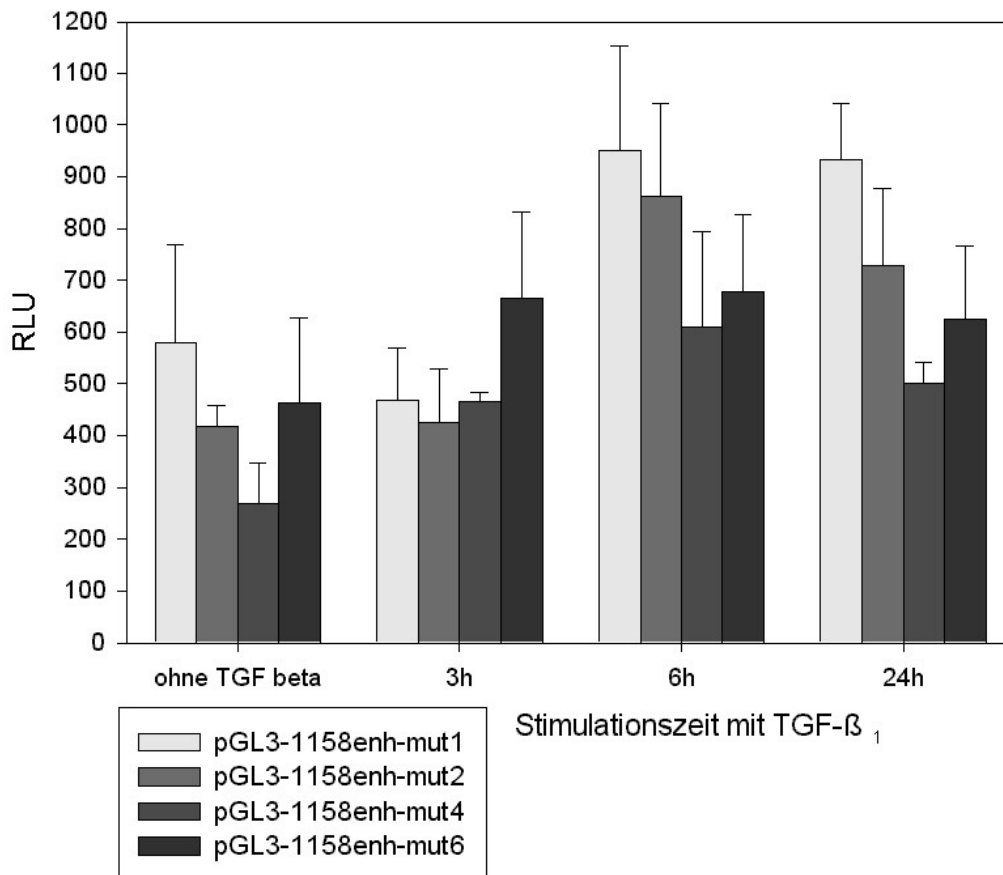


Abb. 23 Aktivität der Enhancer-Mutationen (100% entspricht dem unstimulierten pGL3-1158luc-Konstrukt)

Die Konstrukte mit Mutationen im Bereich aktiver Enhancerelemente zeigen eine deutlich erhöhte Aktivität im Vergleich zum enhancerlosen Konstrukt und ebenfalls zum Konstrukt mit dem unmutierten Enhancer. Im unstimulierten Zustand resultieren im Vergleich zum unstimulierten enhancerlosen Konstrukt bei Mutation 1 eine 5,7fache Aktivität, 4,2fache bei Mutation 2, 2,6fache bei Mutation 4 und 4,6fache bei Mutation 6. Die Messwerte nach Zugabe von TGF- β_1 zeigen nach 3ständiger Stimulation eine Aktivitätsverringerng bei Mut1 vom 5,7fachen auf das 4,5fache, keine Veränderung bei Mut2, einen Anstieg vom 2,6fachen auf das 4,5fache bei Mut4 bzw. auf das 6,5fache bei Mut6. Die Differenzen zwischen 6ständiger und 24ständiger Expression sind minimal. Nach 6ständiger Stimulation lässt sich bei Mut1 ein Anstieg auf das ca.10fache, bei Mut2 auf das 8,5fache, bei Mut4 auf das 6fache und bei Mut6 auf das 7fache nachweisen.

4. Diskussion

4.1. Zur Methode

Bei einem Reporter gen Assay werden die zu untersuchenden aktiven Elemente eines Gens, des Promotor und/oder Enhancers vor die codierende Sequenz eines Reporter gens kloniert, hier beim Dual-Luciferase™ Reporter Assay (DLR) vor die Sequenz der Firefly-Luciferase. Anhand der Aktivität des Reporter enz yms im Zelllys at können dann Aussagen über die Aktivität dieser regulativen Elemente gemacht werden. Die Enzymaktivität im Lysat korreliert mit der Aktivität der Transkription des Gens, von dem diese aktiven Elemente stammen. Vorteile dieses Assays sind eine hohe Nachweisempfindlichkeit des Reporter gens und eine verringerte Störanfälligkeit durch die Kotransfektion mit einem Konstrukt, welches ein anderes Reporter enzym, hier die Renilla-Luciferase konstant exprimiert und somit einen Abgleich von Transfektions-, Milieuschwankungen u. ä. ermöglicht. Ein Nachteil dieses Assays ist die zeitliche Verzögerung, die sich durch die notwendige Synthese der Reporter-Proteine ergibt. Diese Verzögerung liegt bei ca. ½ bis 1 Stunde. Für kinetische Experimente ist diese Methode somit nur eingeschränkt verwendbar.

Als Transfektionsmethode wurde die Lipotransfektion gewählt, da sie die momentan zellschonendste und effektivste Transfektionsmethode erschien. Sowohl die Lipotransfektion als auch der DLR waren am Institut für Medizinische Immunologie nicht etabliert, es waren deshalb umfangreiche Vorversuche nötig. Eine ineffektive Transfektion beeinträchtigt die Ergebnisse ebenso wie eine zu starke Zellschädigung bei der in gewissem Maße zytotoxischen Lipotransfektion. Um eine ausreichende Ausgangsvitalität zu gewährleisten, wurde mit den Experimenten jeweils in der logarithmischen Wachstumsphase der Zellen begonnen. Trotz identischem Versuchsprotokoll zeigten sich Schwankungen in den absoluten Lumineszenzraten von bis zum 5fachen der Luciferaseaktivität. Die verantwortlichen Mechanismen (Transport der Konstrukte durch die Zellmembran, Transfer in den Zellkern) sind multifaktoriell und kaum überschaubar. Die einzige Möglichkeit im Rahmen dieser Promotionsarbeit darauf Einfluss zu nehmen bestand darin, bei Zellkultur und experimentellen Versuchen die äußeren Bedingungen so konstant als möglich zu halten.

Durch den Abgleich mit dem kotransfizierten Konstrukt, welches Renilla-Luciferase konstant exprimiert, sind zumindest Schwankungen in Zellzahl, Vitalität der Zellen und Pipettierfehler weitgehend ausgleichbar. Um Schwankungen durch mangelnde Stimulierbarkeit zu verringern

erfolgte außer den Vorversuchen zu jedem Experiment, jedes Experiment dreimalig nach dem definitiven Versuchsprotokoll.

Zu bemerken ist, das bei den Experimenten mit der Zelllinie U937 (Abb. 15, 20, 21, 23) andere Plasmidvektoren (pGL3-statt pGL2-Vektoren) zur Anwendung kamen. Diese stellen eine Weiterentwicklung der pGL2-Vektoren dar und weisen aufgrund höherer intrazellulärer Stabilität eine höhere Expressionsrate auf. Beim verwendeten Kontrollplasmid wurde deshalb auf das Renilla-Luciferase-Konstrukt mit dem Cytomegalie-Virus-(CMV)Promotor zurückgegriffen, da dieser Promotor ebenfalls eine höhere konstitutionelle Expression gegenüber dem Plasmid mit dem Thymidin-Kinase-(TK)Promotor aufweist. So konnte im Protokoll das Mengen-Verhältnis von Firefly-Luciferase-Vektor zum Kontrollplasmid von 1 : 10 beibehalten werden.

Die Ergebnisse der Transfektion der pGL-2-Deletionskonstrukte entsprachen denen der Arbeitsgruppe von Linda Shapiro [78]. Hier waren zum einen die myeloblastische Zelllinie KG1a als auch die T-ALL Linie Jurkat mit den identischen Promotorkonstrukten transfiziert worden. Als myeloische Zelllinie wurde, da bereits im Hause kultiviert, K562 verwendet, jedoch glichen sich die Aktivitätsprofile beider myeloischer Zelllinien. Die durchgeführten Experimente waren konstant reproduzierbar. Somit kann eine Zuverlässigkeit der eigenen experimentellen Methodik angenommen werden.

4.2. Differenzen in der Promotoraktivierung - lymphatische Zellen versus myeloische Zellen

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist im weitesten Sinne die Regulation der Transkription von APN/CD13 auf hämatopoietischen Zellen. Besonderes Augenmerk gilt der Aktivität bereits mittels anderer Methoden identifizierter cis-Elemente des Promotors, zum einen in verschiedenen Zelllinien zum anderen deren Aktivitätsänderung bei Stimulation der Zellen. Ein weiterer Teil der Arbeit untersucht die Funktion des Enhancers, die Bedeutung seiner aktiven Elemente im Zusammenhang mit einer Stimulation durch TGF-beta-1. Eine Beeinflussung der APN/CD13-Regulation in myeloischen Zellen durch den TGF-beta-Signaltransduktionsweg soll nachgewiesen und wenn möglich näher definiert werden. Für die Experimente wurden immortalisierte Zelllinien verwendet, Jurkat als Modell für Zellen der lymphatischen Reihe, K562 und U937 als Modelle für Zellen der myeloischen Reihe.

Die Betrachtungen sollten sowohl den Ruhezustand als auch die Phase erhöhter Zellaktivierung beinhalten. Um die Zellen in verschiedenen Aktivitätszuständen untersuchen zu können, wurde ein unspezifischer Stimulus der Zellaktivität benötigt. Hier fand der Phorbolesther PMA Verwendung, der die Proteinkinase C (PKC) aktiviert und über dieses Protein auch Ras und den Signalweg Mitogen-aktivierter-Protein (MAP)-Kinasen beeinflusst. Unter physiologischen Bedingungen führen viele extrazelluläre Einflüsse über Signaltransduktionsproteine und u.a. auch Ca^{2+} -Einstrom, zu einer PKC-Aktivierung. Die aktivierte PKC steht für eine allgemeine Aktivierung der Zelle. PKC ist ein intrazelluläres Protein und wird ubiquitär exprimiert, PMA kann deshalb gleichermaßen bei der lymphatischen als auch der myeloischen Zelllinie zum Einsatz kommen.

APN/CD13 wird auf K562-Zellen konstitutiv exprimiert und ist im Ruhezustand auf Jurkat-Zellen nicht nachweisbar. Durch verschiedene Arbeitsgruppen ist jedoch eine Stimulation der Oberflächenexpression dieses Enzyms auf lymphatischen Zellen nachgewiesen worden. Eine inaktive Vorstufe ist nicht bekannt. Somit müssen andere Mechanismen auf verschiedenen extra- und intrazellulären Regulationsebenen für eine Expressionssteigerung verantwortlich sein. Als entscheidende Mechanismen gelten Promotoraktivität, Stabilität der bereits vorhandenen mRNA, Regulation des intrazellulären Transportes, Kompartimentierung in intrazellulären Speichern, Regulation durch endogene Inhibitoren (Bradykinin, Substanz P) und Regulation der Abbauvorgänge [31, 67, 96]. Der Luciferase-Reporter-Gen-Assay ermöglicht Einblick ausschließlich in die Aktivität des Promotors, sämtliche andere o. g. Mechanismen bleiben außen vor.

Die Experimente zur Betrachtung der Kinetik der Stimulation zeigen eine erhöhte Promotoraktivität in Jurkat-Zellen 3 h nach PMA-Stimulation. Bei der myeloischen Zelllinie K562 dagegen zeigt sich ein Aktivitätsunterschied erst nach ca. 6 h. Die Stimulation verläuft in der lymphatischen Zelllinie somit schneller als in der myeloischen, jedoch zeigen die 24 h Werte wiederum eine deutlich höhere Aktivitätszunahme in der myeloischen Zelllinie. Dies lässt bereits Differenzen in der Signaltransduktionskette vermuten. Durch Riemann et al. ist APN-mRNA-Induktion bereits 30 Minuten nach Stimulation von tonsillären T-Lymphozyten durch Zell-Zell-Kontakt nachgewiesen worden [69]. Zieht man die zeitliche Verzögerung durch die Synthese der Luciferase in Betracht, kann man vom Nachweis einer Promotoraktivierung mittels DLR innerhalb von 2 h nach PMA-Stimulation sprechen. Für nähere Aussagen bezüglich der Kinetik innerhalb dieser recht kurzen Zeiträume reagiert der DLR

jedoch zu träge, da allein für die Synthese des Luciferase-Proteins eine halbe Stunde benötigt wird.

Die Induktion von APN/CD13 auf T-Zellen verläuft zweiphasig (20 h und 3 - 4 d) [39]. Dies spricht für verschiedene Mechanismen in der Regulation der Oberflächenexpression. Für eine Erhöhung der Expression kommen die Neusynthese des Proteins als auch die Aktivierung intrazellulärer Speicherformen in Frage. In peripheren T-Lymphozyten konnte der Gehalt an APN/CD13-mRNA durch mitogene Stimulation mit Phytohämagglutinin (PHA) auf das 4fache gesteigert werden [41]. Die durch die eigenen Daten gezeigte Steigerung der Promotoraktivität, spricht für einen hohen Anteil der Neusynthese von mRNA und somit APN/CD13, wie teilweise durch andere Methoden belegt [96]. Die Stabilisierung von APN-mRNA wirkt additiv [96]. Beides resultiert in einer vermehrten Neusynthese von Protein.

In monozytären Zellen wurde APN/CD13 auch in sogenannten Membranmikrodomänen nachgewiesen [52]. Dabei handelt es sich um cholesterolangereicherte Membranbestandteile, welche eine Rolle bei Signaltransduktion, Kompartimentierung von Membranmolekülen, Vesikelendo- und Exozytose spielen. Die Funktion dieser Membranbestandteile als Speicherform und ihr Anteil an der rapiden Induktion von APN/CD13 auf der Zelloberfläche ist noch weitgehend unklar.

Mehrere für Promotoraktivierung bzw. -inhibierung entscheidende cis-Elemente und daran bindende Transkriptionsfaktoren sind bereits identifiziert worden. Es existieren Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren MYB und ETS (Abb. 3) [78] im Promotorbereich von -411bp bis -292bp. In vivo binden c-MYB-Proteine an die myb-Bindestelle und DMP-1, ein den MYB-Proteinen verwandter Transkriptionsfaktor, an eine der ets-Bindestellen. Diese aktivieren synergistisch den myeloischen Promotor [24]. Auch ETS-Proteine sind in der Lage, mit MYB synergistisch zu kooperieren [78]. Aus der Familie der ETS-Proteine spielen dabei vor allem die Transkriptionsfaktoren ETS-1 und ETS-2 eine Rolle. ETS-1 fungiert als inhibierender nukleärer Faktor und ist ein Repressor des APN-Gens. ETS-1 wird in ruhenden T-Zellen stark exprimiert und bei Aktivierung herabreguliert. Reziprok zu ETS-1 wird der aktivierende Faktor ETS-2 exprimiert [6, 73].

Kehlen et al. konnten im Bereich von -48 bp bis -35 bp unter Verwendung von T-Zell-extrakten eine geschützte Region im DNase I-footprint nachweisen. Potentielle c-MYB- und c-ETS-Bindungsstellen liegen in diesem Bereich. Eine erhöhte mRNA-Expression von c-MYB oder

c-ETS 1/2 in durch Zell-Zell-Kontakt aktivierten T-Zellen ließ sich nicht nachweisen [70]. Nukleäre Faktoren, die in diesem Bereich binden, konnten jedoch bisher nicht identifiziert werden. Eine regulative Bedeutung dieses DNA-Bereichs für die basale APN-Transkription ist nachgewiesen, auf die Zell-Zell-Kontakt-induzierte Promotoraktivierung hatte die Mutation des geschützten Bereiches keinen Einfluss [32]. Nach Transfektion der Promotordeletionskonstrukte zeigt sich deutliche Unterschiede in der Expression zwischen den Zellen der lymphatischen und der myeloischen Zelllinie.

In den Zellen der myeloischen Linie K562 liegen von -411 bp bis -292 bp des myeloischen Promotors aktivierende Bereiche. Der Bereich zwischen -292 bp und -120 bp zeigt eine negativ regulierende Funktion. Die Region zwischen -120bp und -40bp enthält erneut aktivierende DNA-Bereiche. Letztgenannte Region weist eine im Vergleich zu den übrigen Promotorabschnitten eine deutlich erhöhte Stimulierbarkeit durch PMA auf (siehe Abb.19), was für eine Funktion i. R. der stimulierten Expression spricht. Die Deletion des Bereiches von -411 bp bis -292 bp führt zu hochgradigen Aktivitätseinbußen des Promotors. Anhand dieser Ergebnisse lassen sich die Funktionen von MYB, DMP1 und ETS in myeloischen Zellen nachweisen. Die Region um -40 bp hat nicht nur in lymphatischen Zellen eine Schlüsselrolle inne. In K562-Zellen zeigt sich ein bedeutender Anteil, sowohl an der basalen, als auch an der stimulierten Expression: Bei Deletion dieses Bereiches sinkt die basale Promotoraktivität stark ab (Abb.19). Dagegen ist eine deutliche Aktivitätszunahme dieses Promotorbereiches 12 h nach Mitogenstimulation des -40bp-Konstruktes feststellbar. Die essentielle Bedeutung der Region von -48 bp bis -35 bp zeigt sich auch bei der Transfektion des Konstruktes mit dem mutierten Bereich von -48 bis -35 bp in U937-Zellen. Das Deletionskonstrukt weist eine im Vergleich zum undeletierten Konstrukt 30- bis 40-fach verringerte Expression auf. Auch eine Stimulierbarkeit mit TGF- β 1 war nach Deletion nicht mehr nachweisbar (siehe Abb. 20).

Im Vergleich mit der T-ALL Zelllinie Jurkat sind ebenfalls positiv regulierende Elemente zwischen -411 bp bis -216 bp und zwischen -120 bp bis -40 bp, sowie negativ regulierende Elemente zwischen -216 bp bis -120 bp nachweisbar. Nach der 12stündiger Mitogenstimulation findet sich jedoch eine gleichsinnige Erhöhung bei allen Konstrukten ohne Betonung spezifischer Bereiche. Dies spricht für eine höhere Proteinsynthese im Rahmen einer allgemeinen Zellstoffwechselaktivierung. Eine spezifische Aktivierung des Promotors über diesen Signalweg existiert offenbar nicht. Die Deletion des Bereiches von -411 bp bis -292 bp führt zu keinen nachweislichen Aktivitätseinbußen des Promotors. Dies spricht gegen eine Bedeutung

dieser Bindestellen für MYB- und ETS-Proteine bei der Promotoraktivierung in lymphatischen Zellen. Dem entspricht auch die mangelnde Aktivierung von ETS 1, ETS 2 und MYB in den durch Zell-Zell-Kontakt aktivierten Lymphozyten [70]. Die eigenen Ergebnisse stützen die These, dass die Region von -48 bp bis -35 bp für die basale Expression in lymphatischen Zellen notwendig ist. Bei Deletion dieses Bereiches sinkt die Promotoraktivität unter die Nachweisgrenze des DLR ab. Elemente zwischen -292 bp und -120 bp besitzen sowohl in lymphatischen als auch myeloischen Zellen eine inhibierende Wirkung. Wobei die dafür verantwortlichen nukleären Faktoren bisher jedoch noch nicht identifiziert werden konnten.

Da hier Promotorkonstrukte ohne den Enhancer verwendet wurden, kann über Unterschiede, die aus veränderter Enhanceraktivität resultieren, keine Aussage gemacht werden. Eine höhere basale bzw. stimulierte Aktivität aufgrund synergierender Enhanceraktivität ist wahrscheinlich. Der Einfluss von TGF- β auf die Enhancer-Aktivität wurde untersucht (siehe folgender Abschnitt), nicht jedoch der Einfluss von PMA.

4.3. Untersuchungen des TGF- β Signaltransduktionsweges

In den letzten Jahren wurde die enge Vernetzung der APN/CD13-Expression mit den Regulationsmechanismen der Zytokine aufgezeigt. Zytokine haben an Regulation von Wachstum, Differenzierung und Funktionalität hämatopoietischer Zellen einen sehr großen Anteil. APN/CD13 ist nicht nur Ziel zytokinvermittelter Regulationsmechanismen, das Enzym ist selbst Bestandteil dieser in weiten Teilen noch unbekanntenen Mechanismen und beispielsweise am Abbau oder der Modifikation von Zytokinen beteiligt [67]. Schwerpunkt der Betrachtungen soll hier das Zytokin TGF- β 1, die dadurch aktivierte Signaltransduktionskette und der Einfluss auf die APN/CD13-Expression sein.

Auf monozytären Zellen rufen Inhibitoren der APN/CD13 wie Bestatin, Actinonin und Probestin Änderungen in der Zytokin- und Zytokin-Rezeptor-Expression mehrerer immunologisch bedeutender Zytokine hervor, u.a. beim Interleukin (IL)-1-Rezeptorantagonisten, TNF-alpha, IL-1- β , IL-2, GM-CSF [37]. Auch TGF- β 1 wird infolge einer Inhibitorgabe verstärkt exprimiert und sezerniert [38]. Eine kombinierte Gabe von Antagonisten für CD13/APN und für DP IV bewirkt eine Erhöhung der Expression und Sekretion von TGF- β 1, bei gleichzeitiger Verringerung der Freisetzung immunstimulatorischer Zytokine, z.B. IL-2 [37]. In Nierenkarzinom-Zellen (RCC für „Renal-Carcinoma-Cells“) und Nieren-Tubulus-Epithel-Zellen wirkte TGF- β 1 erniedrigend auf die mRNA-Expression von Aminopeptidase A

(APA) und Dipeptidylpeptidase (DPP)IV/CD26, hatte jedoch keinen nachweislichen Effekt auf die APN/CD13-Expression [30]. Für hämatopoietische Zellen ist TGF- β 1 ein Induktor der myelo-/monozytären Differenzierung [29,88].

Die Signaltransduktionswege, die in eine Aktivierung der APN/CD13-Transkription münden, sind bisher nur lückenhaft aufgeklärt. In U937-Zellen kann TGF- β 1 die APN-Expression durch posttranslationale Stabilisierung der mRNA in den ersten 3 Stunden hochregulieren [31]. Auch ist bekannt, dass TGF- β 1 die Expression und/oder Aktivität von Cyklin-dependent-Kinasen (CDK) inhibieren kann [37, 92]. In myeloischen Zellen wird die Expression von c-MYB durch TGF-beta-1 negativ reguliert [88].

Einer der wichtigsten Signaltransduktionswege, über die TGF- β 1 die Expression von Zielgenen im Nukleus reguliert, ist der Weg über die sogenannten Smad-Proteine. Dabei sind sowohl aktivierende als auch inhibierende Wirkung der Smad-Proteine auf die Genexpression in monozytären Zellen nachgewiesen worden [95]. Ausgeprägte Vernetzungen existieren auf allen intrazellulären Ebenen des Smad Signalpfades. So besitzt Smad3 Einfluss auf Signalkaskaden, welche über MAP-Kinasen laufen. Smads können weiterhin mit den Kernproteinen p300 und CBP interagieren. Beide Proteine sind Koaktivatoren einer Reihe von Transkriptionsfaktoren, unter anderem auch von ETS-Proteinen [46, 99, 101]. Auch die Hemmung der CDK über Expressionssteigerung inhibitorischer Proteine kann Smad-abhängig erfolgen [92].

Die eigenen Ergebnisse zeigen eine Transkriptionserhöhung bei der Kotransfektion des Smad3- oder des Smad4-Proteins. Die Überexpression entspricht einer Verstärkung dieses Signalweges. Somit hat der Smad-Signalpfad nachweislich eine entscheidende Bedeutung für die TGF- β -verstärkte Aktivierung des myeloischen Promotors in myeloischen Zellen. Da die Aktivierung durch Smad-Koexpression bei vorhandenem Enhancer etwa 3-fach stärker ausfällt, ist anzunehmen, dass ein großer Anteil der Transkriptionsaktivierung über enhancergebundene Transkriptionsfaktoren läuft.

Bei der Kotransfektion beider Plasmide ist eine Transkriptionserhöhung jedoch nicht mehr nachweisbar. Wider Erwarten führt die Überexpression beider Smad-Proteine nicht zu einer weiteren Steigerung der Transkriptionsaktivität, sondern es zeigt sich kein Effekt (Abb. 21 links „unstimuliert“). Dieser Fakt könnte dafür sprechen, dass die Überexpression heterodimerer Smad-Komplexe aus Smad3 und Smad4 eher an regulative DNA-Elemente anderer

Promotoren binden, wobei es durch die höhere Aktivität an anderen Promotoren zu einer Rekrutierung nukleärer Kofaktoren kommt, die nun wiederum bei der Aktivierung des myeloischen Promotors fehlen. Resultat ist die verringerte Promotoraktivität. Dieses Phänomen wird in der Literatur als „Squelching“ beschrieben [17, 7].

Stimuliert man die mit dem enhancerlosen Konstrukt transfizierten Zellen mit TGF- β 1, so zeigt sich kein Effekt auf die Promotoraktivität bei Überexpression von Smad3 (siehe Abb. 21 rechts). Die Überexpression des Smad4-Proteins führt zu einer Expressionsabnahme, noch ausgeprägter ist dieser Effekt bei Überexpression von Smad3 und 4. Dabei liegt die resultierende Aktivität noch unter der des unstimulierten Promotorkonstruktes. Eine mögliche Erklärung für diesen Aktivitätsverlust kann wiederum das oben beschriebene „Squelching“-Phänomen darstellen. Ist der Enhancer im transfizierten Konstrukt vorhanden, verläuft die Aktivierung des APN/CD13-Promotors durch TGF- β 1 deutlich stärker. Dies lässt vermuten, dass die TGF- β 1-responsiblen Elemente auf dem Enhancer gelegen sind, beziehungsweise mit diesem bei der Promotoraktivierung interagieren. Eine Überexpression von Smad3 kann diese Aktivierung nochmals deutlich verstärken, während eine Überexpression beider Smad-Proteine eine Inhibierung des Promotors nach sich zieht. Dies kann ebenfalls als Folge eines Kofaktormangels aufgrund einer Rekrutierung zu anderen durch Smad-Heterodimere aktivierte Genloci diskutiert werden. Da die Aktivität jedoch so deutlich erniedrigt ist, könnte auch eine Aktivierung inhibierender DNA-Elemente bzw. Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen. Kehlen et al. fanden eine Hochregulation von Smad7-mRNA, einem inhibitorischen Smad-Protein, mit einem Maximum 3 h nach TGF- β 1-Stimulation in U937-Zellen [31]. Die Smad7-Expressionsaktivierung kann unter anderem über aktivierte MAP-Kinasen verlaufen. Zwischen Smad3 und den MAP-Kinasen bestehen enge Vernetzungen. Eine direkte oder indirekte Aktivierung der Smad7-Genexpression über Smad3/4 Heterodimere ist ebenfalls denkbar [46,101]. Sichere Aussagen über die inhibierenden Einflüsse in der Signalkaskade können mittels dieser Methode jedoch nicht gemacht werden. Eine Überexpression beider Smad-Proteine und damit eine Verstärkung des TGF- β -Signalweges könnte auch durch das von U937-Zellen selbst produzierte TGF- β eine Autoinhibition dieser Signalkaskade herbeiführen. Folge wäre eine verminderte Stimulierbarkeit. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, müsste man die Smad7-mRNA-Expression nach Kotransfektion mit den Smad3/4-Konstrukten experimentell untersuchen.

4.4. Verhalten der Deletionskonstrukte des Enhancers unter TGF- β 1-Stimulation

Eine Aktivität des Enhancers ist sowohl in hämatopoietischen Zellen, jedoch auch in Zellen, in denen der epitheliale Promotor aktiv ist, nachweisbar. Eine hohe Aktivität findet sich in hämatopoietischen Zellen der myeloischen Reihe, welche auch APN/CD13 auf der Oberfläche exprimieren, in Zellen der lymphatischen Reihe konnte im unstimulierten Zustand keine Enhanceraktivität nachgewiesen werden [60]. Punktmutationen in den aktiven Elementen des Enhancers, mit Ausnahme des srf-bindenden Elements, führten zu einer verminderten Fähigkeit, den SV40-early-promoter in epithelialen Zellen zu aktivieren [57].

In den eigenen Experimenten aktivierten insbesondere die innerhalb der ersten potentiellen ets-Bindestelle mutierten Versionen den myeloischen Promotor stärker als der native Enhancer. Als Ursache dafür kann die Störung der Bindung eines Repressors diskutiert werden. Die geringen Unterschiede im Aufbau des Trägerplasmids sollten eine untergeordnete Rolle spielen. Die Differenzen zwischen 6stündiger und 24stündiger Expression sind minimal. Die Expression sämtlicher Konstrukte beträgt nach diesen Zeiträumen etwa das 2fache der unstimulierten Aktivität.

Die Stimulationsfähigkeit aller Mutations-Konstrukte blieb erhalten und differierte praktisch kaum zwischen den Mutationen. Bei keiner Mutation veränderte sich die Aktivität signifikant im Vergleich zu den anderen Mutationen. Es ist anzunehmen, dass die Mutationen nicht in Bereichen liegen, die in myeloischen Zellen für die Enhanceraktivierung über TGF- β 1 bedeutsam sind. Die geschützten Regionen wurden in epithelialen Zellen identifiziert [60]. Die dort erhaltenen Ergebnisse lassen sich deshalb nicht zwingend auf myeloische Zellen übertragen.

4.5. Zusammenfassung

Aminopeptidase N eine mit Membranstrukturen assoziierte Metalloprotease besitzt u. a. Bedeutung in der Verdauung von Nahrungsproteinen im Darm, filtrierte Proteinen in den Nierentubuli, bei der Modulation von Kininen und Neuropeptiden. Immunologische Bedeutung besteht u.a. als Rezeptor für Viren im oberen Respirationstrakt, beim Antigen-Prozessing auf der Oberfläche dendritischer, antigenpräsentierender Zellen (APC), bei Adhäsionsprozellen und bei der zellulären Kommunikation mittels Zell-Zell-Kontakt sowie

bei der Progression maligner Tumoren. Das Enzym dient im Bereich der Hämatologie als Marker bei der Charakterisierung von Leukämie- und Lymphomzellen.

Die Aufgabe der vorgelegten Arbeit war es, die Induktion bzw. Inhibition der APN-Expression in myeloischen bzw. lymphatischen Zellen vergleichend zu untersuchen. Die Aufmerksamkeit galt zum einen der Funktion der bekannten cis-Elemente, der Rolle des Enhancers bei der Aktivierung und den Differenzen in der Kinetik der Aktivierung durch das Mitogen PMA. Die Experimente erfolgten modellhaft an immortalisierten Zelllinien. Die Zelllinie Jurkat diente als lymphatischer bzw. die Zelllinie K562 als myeloischer Repräsentant. Ein weiterer Abschnitt der Arbeit beschäftigt sich mit dem TGF- β -Signalweg bei Aktivierung bzw. Inhibition des APN-Promotors und Enhancers in myeloischen U937-Zellen.

Die Untersuchungen basieren auf einem Reportergen-Assay, dem Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (DLR). Reporterenzym ist hier die Firefly-Luciferase, es wurden Konstrukte mit dem myeloischen Promotor bzw. Deletionen desselben sowie Konstrukte mit einer Kombination aus Promotor mit Enhancer bzw. Enhancerdeletionen verwendet. Kontrolle war ein Plasmid welches zur konstitutiven Expression einer andere Luciferase (Renilla) führt und einen Abgleich ermöglicht, sodass Experimentierfehler teilweise ausgeglichen werden können.

Das Versuchsprotokoll (Lipotransfektion in Verbindung mit dem Dual Luciferase Assay), welches im Rahmen dieser Arbeit am Institut für Medizinische Immunologie etabliert wurde, zeigte nach Optimierung der Parameter Zellzahl und Menge der eingesetzten Reagenzien zwar noch Schwankungen im Bereich der absoluten Lumineszenzwerte, jedoch konnten verlässliche, reproduzierbare Daten erhalten werden. Die zeitliche Verzögerung durch die Reporter-Protein-Synthese zeigte sich als Nachteil dieses Systems bezüglich der Vergleichbarkeit mit anderen kinetischen Untersuchungen auf mRNA-Ebene.

Die APN/CD13-Expression auf hämatopoietischen Zellen ist abhängig von Differenzierungsgrad und aktivierenden bzw. hemmenden externen Einflüssen (z. B. Zytokine, Zell-Zell-Kontakt, Milieufaktoren, Mitogene). Die Signalwege, über die externe Stimuli zur Veränderung der Oberflächenexpression führen, setzen auch im Zellkern an. Dort ändern sich Aktivität und Konzentration an Transkriptionsfaktoren. Dies führt zu einer veränderten Transkription des APN-Gens. Eine Promotoraktivierung über die Bindestellen für c-MYB, DMP-1 und c-ETS in myeloischen Zellen ist aus den Ergebnissen ersichtlich. Die

Experimente mit dem unspezifischen Stimulator PMA zeigen jedoch zum einen eine Differenz in der Kinetik der Aktivierung, in Jurkat-Zellen lässt sich bereits nach 3 h, in K562-Zellen erst nach 6 h eine Aktivitätszunahme nachweisen, zum anderen spricht die eher gleichsinnige Aktivitätserhöhung aller Deletionskonstrukte in lymphatischen Zellen für eine höhere Proteinsynthese im Rahmen einer allgemeinen Zellstoffwechselaktivierung und gegen eine Bedeutung der myb- und ets-Bindestellen.

Die Region um -40 bp deren nukleärer Transkriptionsfaktor bisher noch nicht identifiziert ist, hat einen bedeutenden Anteil sowohl an der basalen, als auch an der stimulierten Expression von APN in myeloischen und in lymphatischen Zellen. Bei Deletion dieses Bereiches sinkt die basale Promotoraktivität stark ab, weiterhin ist eine starke Aktivitätszunahme dieses Promotorbereiches 12 h nach Mitogenstimulation nachweisbar. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass es sowohl in myeloischen als auch in lymphatischen Zellen weitere bisher nicht identifizierte Transkriptionsfaktoren geben muss, die für die transkriptionelle Regulation des APN-Gens verantwortlich sind.

Die Transkriptionsaktivität stellt letztlich das Integral der Einflüsse verschiedener Signalkaskaden dar. Die Ergebnisse weisen eine Aktivierung des myeloischen APN-Promotors durch den TGF- β -Signalweg nach. Schlüsselpositionen besitzen die beiden Signalproteine Smad3 und Smad4, bei der vermehrten Expression eines einzelnen dieser Proteine kommt es zu einer deutlich erhöhten Ansprechbarkeit auf TGF- β . Bei Überexpression beider Konstrukte zeigt sich allerdings eine Suppression. Dies kann im Rahmen eines „Squelching“-Phänomens gewertet werden, auch die Aktivierung inhibierender DNA-Elemente bzw. Transkriptionsfaktoren (z.B. Smad7) durch intranukleären Überschuss an Smad3/Smad4-Heterodimeren kann diskutiert werden.

Eine deutlich stärkere Aktivierung des APN/CD13-Promotors durch TGF- β -1 wird erreicht, wenn das transfizierte Konstrukt den Enhancer enthält. Dies spricht für TGF- β -1-responsiblen Elemente auf dem Enhancer. Die Enhancer-Konstrukte, welche innerhalb der ersten potentiellen ETS-Bindestelle Mutationen aufweisen, aktivieren den myeloischen Promotor stärker als der native Enhancer. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die Störung der Bindung eines Repressors. Die Aktivitätsdifferenzen der Konstrukte untereinander sind gering. Es ist deshalb anzunehmen, dass für die Vermittlung der Enhancerwirkung in hämatopoietischen Zellen andere als die in epithelialen Zellen identifizierten DNA-Bereiche eine Rolle spielen. Hier besteht noch weiterer Klärungsbedarf.

Aminopeptidase N ist ein Schlüsselenzym des menschlichen Zellstoffwechsels. Insbesondere die pathogenetische Bedeutung im Rahmen vieler, nicht seltener Erkrankungen (Infektionen der Atemwege, Krebserkrankungen) lassen bei näherer Kenntnis von Regulation und Funktion auf die Aufdeckung neuer therapeutischer Angriffspunkte dieser Erkrankungen hoffen. Als ein weiterer Baustein zum Verständnis der regulativen nukleären Elemente dieses Proteins ist diese Doktorarbeit einzuordnen.

Literaturverzeichnis

- 1 Amoscato, A. A., Spiess, R. R., Sansoni, S. B., Herberman, R. B., Chambers, W. H.: Degradation of enkephalins by rat lymphocyte and purified rat natural killer cell surface aminopeptidases. *Brain Behav.Immun.* 7 (1993) 176-187
- 2 Arend, W. P.: The pathophysiology and treatment of rheumatoid arthritis [editorial]. *Arthritis Rheum.* 40 (1997) 595-597
- 3 Ashcroft, G. S., Yang, X., Glick, A. B., Weinstein, M., Letterio, J. L., Mizel, D. E., Anzano, M., Greenwell-Wild, T., Wahl, S. M., Deng, C., Roberts, A. B.: Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat.Cell Biol.* 1 (1999) 260-266
- 4 Ashmun, R. A., Shapiro, L. H., Look, A. T.: Deletion of the zinc-binding motif of CD13/aminopeptidase N molecules results in loss of epitopes that mediate binding of inhibitory antibodies. *Blood* 79 (1992) 3344-3349
- 5 Bhagwat, S. V., Lahdenranta, J., Giordano, R., Arap, W., Pasqualini, R., Shapiro, L. H.: CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* 97 (2001) 652-659
- 6 Bhat, N. K., Thompson, C. B., Lindsten, T., June, C. H., Fujiwara, S., Koizumi, S., Fisher, R. J., Papas, T. S.: Reciprocal expression of human ETS1 and ETS2 genes during T-cell activation: regulatory role for the protooncogene ETS1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87 (1990) 3723-3727
- 7 Cahill, M. A., Ernst, W. H., Janknecht, R., Nordheim, A.: Regulatory squelching. *FEBS Lett.* 344 (1994) 105-108
- 8 Curnis, F., Sacchi, A., Borgna, L., Magni, F., Gasparri, A., Corti, A.: Enhancement of tumor necrosis factor alpha antitumor immunotherapeutic properties by targeted delivery to aminopeptidase N (CD13). *Nat.Biotechnol.* 18 (2000) 1185-1190
- 9 Danielsen, E. M.: Biosynthesis of intestinal microvillar proteins. Pulse-chase labelling studies on aminopeptidase N and sucrase-isomaltase. *Biochem.J.* 204 (1982) 639-645

- 10 Danielsen, E. M., Hansen, G. H., Niels-Christiansen, L. L.: Localization and biosynthesis of aminopeptidase N in pig fetal small intestine. *Gastroenterology* 109 (1995) 1039-1050
- 11 Danielsen, E. M., Noren, O., Sjostrom, H.: Biosynthesis of intestinal microvillar proteins. Translational evidence in vitro that aminopeptidase N is synthesized as a Mr-115000 polypeptide. *Biochem.J.* 204 (1982) 323-327
- 12 Danielsen, E. M., Noren, O., Sjostrom, H.: Biosynthesis of intestinal microvillar proteins. Processing of aminopeptidase N by microsomal membranes. *Biochem.J.* 212 (1983) 161-165
- 13 Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L. K., Sjostrom, H., Noren, O., Laude, H.: Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature* 357 (1992) 417-420
- 14 Dong, X., An, B., Salvucci, K. L., Storkus, W. J., Amoscato, A. A., Salter, R. D.: Modification of the amino terminus of a class II epitope confers resistance to degradation by CD13 on dendritic cells and enhances presentation to T cells. *J.Immunol.* 164 (2000) 129-135
- 15 Drexler, H. G., Thiel, E., Ludwig, W. D.: Review of the incidence and clinical relevance of myeloid antigen- positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 5 (1991) 637-645
- 16 Enriquez-Harris,P., Levitt,N., Briggs,D., Proudfoot,N.J.: A pause site for RNA polymerase II is associated with termination of transcription. *The EMBO Journal* (1991) 1833-1842
- 17 Gill, G., Ptashne, M.: Negative effect of the transcriptional activator GAL4. *Nature* 334 (1988) 721-724
- 18 Giugni, T. D., Soderberg, C., Ham, D. J., Bautista, R. M., Hedlund, K. O., Moller, E., Zaia, J. A.: Neutralization of human cytomegalovirus by human CD13-specific antibodies. *J.Infect.Dis.* 173 (1996) 1062-1071
- 19 Groskreutz,D.J., Sherf,B.A., Wood,K.V., Schenborn,E.T.: Increased Expression and Convenience with the new pGL3 Luciferase Reporter Vectors. *Promega Notes Magazin* (1995) 2-

-
- 20 Haak-Frendscho, M., Wynn, T. A., Czuprynski, C. J., Paulnock, D.: Transforming growth factor-beta 1 inhibits activation of macrophage cell line RAW 264.7 for cell killing. *Clin.Exp.Immunol.* 82 (1990) 404-410
 - 21 Hansen, A. S., Noren, O., Sjostrom, H., Werdelin, O.: A mouse aminopeptidase N is a marker for antigen-presenting cells and appears to be co-expressed with major histocompatibility complex class II molecules. *Eur.J.Immunol.* 23 (1993) 2358-2364
 - 22 Hedge, S. P., Kumar, A., Kurschner, C., Shapiro, L. H.: c-Maf interacts with c-Myb to regulate transcription of an early myeloid gene during differentiation. *Mol.Cell Biol.* 18 (1998) 2729-2737
 - 23 Hegde, S. P., Zhao, J., Ashmun, R. A., Shapiro, L. H.: c-Maf induces monocytic differentiation and apoptosis in bipotent myeloid progenitors. *Blood* 94 (1999) 1578-1589
 - 24 Hirai, H., Sherr, C. J.: Interaction of D-type cyclins with a novel myb-like transcription factor, DMP1. *Mol.Cell Biol.* 16 (1996) 6457-6467
 - 25 Huang, M.T., Gorman, C.M.: Intervening sequences increase efficiency of RNA 3' processing and accumulation of cytoplasmic RNA. *Nucleic Acids Research* (1990) 937-947
 - 26 Imai, K., Kanzaki, H., Mori, T.: Cell surface peptidases in human endometrium. *Mol.Hum.Reprod.* 2 (1996) 425-431
 - 27 Imamura, N., Kimura, A.: Effect of Ubenimex (Bestatin) on the Cell Growth and Phenotype of HL-60 and HL-60R Cell Lines: Up-And Down-Regulation of CD13/aminopeptidase N. *Leuk.Lymphoma* 37 (2000) 663-667
 - 28 Inoue, K., Sherr, C. J., Shapiro, L. H.: Regulation of the CD13/aminopeptidase N gene by DMP1, a transcription factor antagonized by D-type cyclins. *J.Biol.Chem.* 273 (1998) 29188-29194
 - 29 Jaksits, S., Kriehuber, E., Charbonnier, A. S., Rappersberger, K., Stingl, G., Maurer, D.: CD34+ cell-derived CD14+ precursor cells develop into Langerhans cells in a TGF-beta 1-dependent manner. *J.Immunol.* 163 (1999) 4869-4877

-
- 30 Kehlen, A., Gohring, B., Langner, J., Riemann, D.: Regulation of the expression of aminopeptidase A, aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 in renal carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by cytokines and cAMP-increasing mediators. *Clin.Exp.Immunol.* 111 (1998) 435-441
 - 31 Kehlen, A., Langner, J., Riemann, D.: Transforming growth factor-beta increases the expression of aminopeptidase N/CD13 mRNA and protein in monocytes and monocytic cell lines. *Adv.Exp.Med.Biol.* 477 (2000) 49-56
 - 32 Kehlen, A., Olsen, J., Langner, J., Riemann, D.: Increased lymphocytic aminopeptidase N/CD13 promoter activity after cell-cell contact. *J.Cell Biochem.* 80 (2000) 115-123
 - 33 Kehrl, J. H., Wakefield, L. M., Roberts, A. B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M. B., Fauci, A. S.: Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J.Exp.Med.* 163 (1986) 1037-1050
 - 34 Kirshenbaum, A.S., Goff, J.P., Semere, T., Foster, B., Scott, L.M., Metcalfe, D.D.: Demonstration That Human Mastcells Arise From a Progenitor Cell Population That is CD34+, c-kit+ and Expresses Aminopeptidase N (CD13). *Blood* (1999) 2333-2342
 - 35 Kozak, M.: The scanning model for translation: an update. *The Journal of Cell Biology* (1989) 229-241
 - 36 Larsen, S. L., Pedersen, L. O., Buus, S., Stryhn, A.: T cell responses affected by aminopeptidase N (CD13)-mediated trimming of major histocompatibility complex class II-bound peptides [published erratum appears in *J Exp Med* 1996 Nov 1;184(5):2073]. *J.Exp.Med.* 184 (1996) 183-189
 - 37 Lendeckel, U., Arndt, M., Firla, B., Wolke, C., Wex, T., Ansorge, S.: CD13/APN in hematopoietic cells - expression, function, regulation and clinical aspects. Langner, J. and Ansorge, S. (eds.): *Ecto-peptidases. CD13/Aminopeptidase N and CD26/ Dipeptidylpeptidase IV in Medicine and Biology.* Kluwer Academic/Plenum Publ. New York, London u.a. (2002) 25-49
 - 38 Lendeckel, U., Arndt, M., Frank, K., Wex, T., Ansorge, S.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (review). *Int.J.Mol.Med.* 4 (1999) 17-27

-
- 39 Lendeckel, U., Wex, T., Ittenson, A., Arndt, M., Frank, K., Mayboroda, O., Schubert, W., Ansorge, S.: Rapid mitogen-induced aminopeptidase N surface expression in human T cells is dominated by mechanisms independent of de novo protein biosynthesis. *Immunobiology* 197 (1997) 55-69
- 40 Lendeckel, U., Wex, T., Kahne, T., Frank, K., Reinhold, D., Ansorge, S.: Expression of the aminopeptidase N (CD13) gene in the human T cell lines HuT78 and H9. *Cell Immunol.* 153 (1994) 214-226
- 41 Lendeckel, U., Wex, T., Reinhold, D., Kahne, T., Frank, K., Faust, J., Neubert, K., Ansorge, S.: Induction of the membrane alanyl aminopeptidase gene and surface expression in human T-cells by mitogenic activation. *Biochem.J.* 319 (Pt 3) (1996) 817-821
- 42 Lerche, C., Vogel, L. K., Shapiro, L. H., Noren, O., Sjostrom, H.: Human aminopeptidase N is encoded by 20 exons. *Mamm.Genome* 7 (1996) 712-713
- 43 Levitt,N., Briggs,D., Gil,A., Proudfoot,N.J.: Definition of an efficient synthetic poly(A) site. *Genes & Development* (1989) 1019-1025
- 44 Lian,W.-N., Tsai,J.-W., Yu,P.-M., Wu,T.-W., Yang,S.-C., Chau,Y.-P., Lin,C.-H.: Targetting of Aminopeptidase N to Bile Canaliculi Correlates With Secretory Activities of The Developing Canalicular Domain. *Hepatology* (1999) 748-760
- 45 Look, A. T., Ashmun, R. A., Shapiro, L. H., Peiper, S. C.: Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J.Clin.Invest* 83 (1989) 1299-1307
- 46 Massague, J.: TGF-beta signal transduction. *Annu.Rev.Biochem.* 67 (1998) 753-791
- 47 Matsas, R., Rattray, M., Kenny, A. J., Turner, A. J.: The metabolism of neuropeptides. Endopeptidase-24.11 in human synaptic membrane preparations hydrolyses substance P. *Biochem.J.* 228 (1985) 487-492
- 48 Matsuo,M., Minowada,J.: Human leukemia cell lines - Clinical and theoretical significancies. *Human Cell* (1988) 263-274
- 49 Matthews,J.C., Hori,K., Cormier,M.J.: Purification and Properties of Renilla reniformis luciferase. *Biochemistry* (1977) 85-91

-
- 50 Murata, M., Kubota, Y., Tanaka, T., Iida-Tanaka, K., Takahara, J., Irino, S.: Effect of ubenimex on the proliferation and differentiation of U937 human histiocytic lymphoma cells. *Leukemia* 8 (1994) 2188-2193
- 51 Naim,H.Y., Joberty,G., Alfalah,M., Jacob,R.: Temporal Association of the N- and O-Linked Glycosylation Events and Their Implication in the Polarized Sorting of Intestinal Brush Border Sucrase-Isomaltase, Aminopeptidase N and Dipeptidyl Peptidase IV. *Journal of Biological Chemistry* (1999) 17961-17967
- 52 Navarrete, S. A., Roentsch, J., Danielsen, E. M., Langner, J., Riemann, D.: Aminopeptidase N/CD13 is associated with raft membrane microdomains in monocytes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 269 (2000) 143-148
- 53 Noren,O., Sjöström,E.M., Danielsen,E.M., Cowell,G.M., Skovbjerg,H.: The Enzymes of the Enterocyte Plasma Membrane. Desnuelle P, Sjöström H, Olsen O: *Molecular and Cellular Basis of Digestion*, Elsevier, Amsterdam (1986) 335-
- 54 Nunez, L., Amigo, L., Mingrone, G., Rigotti, A., Puglielli, L., Raddatz, A., Pimentel, F., Greco, A. V., Gonzalez, S., Garrido, J.: Biliary aminopeptidase-N and the cholesterol crystallisation defect in cholelithiasis. *Gut* 37 (1995) 422-426
- 55 Nunez, L., Amigo, L., Rigotti, A., Puglielli, L., Mingrone, G., Greco, A. V., Nervi, F.: Cholesterol crystallization-promoting activity of aminopeptidase-N isolated from the vesicular carrier of biliary lipids. *FEBS Lett.* 329 (1993) 84-88
- 56 Ohsaka, A., Sato, N., Imai, Y., Hirai, S., Oka, Y., Kikuchi, M., Takahashi, A.: Multiple gastric involvement by myeloid antigen CD13-positive non- secretory plasma cell leukaemia. *Br.J.Haematol.* 92 (1996) 134-136
- 57 Olsen,J.: Molecular biology of aminopeptidase N - Amino acid sequence, gen structure and tissue-specific gene regulation. *Habilitationsarbeit*, Panum Institute Kopenhagen (1999)
- 58 Olsen, J., Classen-Linke, I., Sjostrom, H., Noren, O.: Pseudopregnancy induces the expression of hepatocyte nuclear factor-1 beta and its target gene aminopeptidase N in rabbit endometrium via the epithelial promoter. *Biochem.J.* 312 (Pt 1) (1995) 31-37

-
- 59 Olsen, J., Kokholm, K., Noren, O., Sjostrom, H.: Structure and expression of aminopeptidase N. *Adv.Exp.Med.Biol.* 421 (1997) 47-57
- 60 Olsen, J., Kokholm, K., Troelsen, J. T., Laustsen, L.: An enhancer with cell-type dependent activity is located between the myeloid and epithelial aminopeptidase N (CD 13) promoters. *Biochem.J.* 322 (Pt 3) (1997) 899-908
- 61 Olsen, J., Laustsen, L., Karnstrom, U., Sjostrom, H., Noren, O.: Tissue-specific interactions between nuclear proteins and the aminopeptidase N promoter. *J.Biol.Chem.* 266 (1991) 18089-18096
- 62 Olsen, J., Laustsen, L., Troelsen, J.: HNF1 alpha activates the aminopeptidase N promoter in intestinal (Caco- 2) cells. *FEBS Lett.* 342 (1994) 325-328
- 63 Pasqualini, R., Koivunen, E., Kain, R., Lahdenranta, J., Sakamoto, M., Stryhn, A., Ashmun, R. A., Shapiro, L. H., Arap, W., Ruoslahti, E.: Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* 60 (2000) 722-727
- 64 Petit-Koskas, E., Genot, E., Lawrence, D., Kolb, J. P.: Inhibition of the proliferative response of human B lymphocytes to B cell growth factor by transforming growth factor-beta. *Eur.J.Immunol.* 18 (1988) 111-116
- 65 Promega,M.: Dual Luciferase Reporter Assay System Technical Manual. Technical Manual (1996)
- 66 Riemann, D., Gohring, B., Langner, J.: Expression of aminopeptidase N/CD13 in tumour-infiltrating lymphocytes from human renal cell carcinoma. *Immunol.Lett.* 42 (1994) 19-23
- 67 Riemann, D., Kehlen, A., Langner, J.: CD13--not just a marker in leukemia typing. *Immunol.Today* 20 (1999) 83-88
- 68 Riemann, D., Kehlen, A., Thiele, K., Lohn, M., Langner, J.: Co-incubation of lymphocytes with fibroblast-like synoviocytes and other cell types can induce lymphocytic surface expression of aminopeptidase N/CD13. *Adv.Exp.Med.Biol.* 421 (1997) 75-79

-
- 69 Riemann, D., Kehlen, A., Thiele, K., Lohn, M., Langner, J.: Induction of aminopeptidase N/CD13 on human lymphocytes after adhesion to fibroblast-like synoviocytes, endothelial cells, epithelial cells, and monocytes/macrophages. *J.Immunol.* 158 (1997) 3425-3432
- 70 Riemann, D., Rontsch, J., Hause, B., Langner, J., Kehlen, A.: Cell-cell contact between lymphocytes and fibroblast-like synoviocytes induces lymphocytic expression of aminopeptidase N/CD13 and results in lymphocytic activation [In Process Citation]. *Adv.Exp.Med.Biol.* 477 (2000) 57-66
- 71 Riemann, D., Schwachula, A., Hentschel, M., Langner, J.: Demonstration of CD13/aminopeptidase N on synovial fluid T cells from patients with different forms of joint effusions. *Immunobiology* 187 (1993) 24-35
- 72 Riemann, D., Wollert, H. G., Menschikowski, J., Mittenzwei, S., Langner, J.: Immunophenotype of lymphocytes in pericardial fluid from patients with different forms of heart disease. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 104 (1994) 48-56
- 73 Romano-Spica, V., Georgiou, P., Suzuki, H., Papas, T. S., Bhat, N. K.: Role of ETS1 in IL-2 gene expression. *J.Immunol.* 154 (1995) 2724-2732
- 74 Rosenzweig, M., Tallieux, L., Gluckman, J.C.: CD13/aminopeptidase N is involved in the development of dendritic cells and macrophages from cord blood CD34+ cells. *Blood* (2000) 453-460
- 75 Ruscetti, F. W., Palladino, M. A.: Transforming growth factor-beta and the immune system. *Prog.Growth Factor Res.* 3 (1991) 159-175
- 76 Saiki, I., Fujii, H., Yoneda, J., Abe, F., Nakajima, M., Tsuruo, T., Azuma, I.: Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. *Int.J.Cancer* 54 (1993) 137-143
- 77 Sanderink, G. J., Artur, Y., Siest, G.: Human aminopeptidases: a review of the literature. *J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* 26 (1988) 795-807
- 78 Shapiro, L. H.: Myb and Ets proteins cooperate to transactivate an early myeloid gene. *J.Biol.Chem.* 270 (1995) 8763-8771

-
- 79 Shapiro, L. H., Ashmun, R. A., Roberts, W. M., Look, A. T.: Separate promoters control transcription of the human aminopeptidase N gene in myeloid and intestinal epithelial cells. *J.Biol.Chem.* 266 (1991) 11999-12007
- 80 Sherf, B. A., Wood, K. V.: Firefly Luciferase Engineered for Improves Genetic Reporting. *Promega Notes Magazin* (1994) 14-
- 81 Soderberg, C., Giugni, T. D., Zaia, J. A., Larsson, S., Wahlberg, J. M., Moller, E.: CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *J.Virol.* 67 (1993) 6576-6585
- 82 Sporn, M. B., Roberts, A. B.: Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J.Cell Biol.* 119 (1992) 1017-1021
- 83 Sporn, M. B., Roberts, A. B., Wakefield, L. M., Assoian, R. K.: Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science* 233 (1986) 532-534
- 84 Strassmann, G., Cole, M. D., Newman, W.: Regulation of colony-stimulating factor 1-dependent macrophage precursor proliferation by type beta transforming growth factor. *J.Immunol.* 140 (1988) 2645-2651
- 85 Tachibana, T., Fujiwara, H., Suginami, H., Nakamura, K., Honda, T., Yamada, S., Maeda, M., Mori, T.: An aminopeptidase inhibitor, bestatin, enhances progesterone and oestradiol secretion by porcine granulosa cells stimulated with follicle stimulating hormone in vitro. *Hum.Reprod.* 11 (1996) 497-502
- 86 Tani, K., Ogushi, F., Huang, L., Kawano, T., Tada, H., Hariguchi, N., Sone, S.: CD13/aminopeptidase N, a novel chemoattractant for T lymphocytes in pulmonary sarcoidosis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 161 (2000) 1636-1642
- 87 Thiele, K., Riemann, D., Kehlen, A., Lohn, M., Vogel, L. K., Langner, J.: Two transfected endothelial cell lines expressing high levels of membrane bound or soluble aminopeptidase N. *Adv.Exp.Med.Biol.* 421 (1997) 81-84
- 88 Turley, J. M., Falk, L. A., Ruscetti, F. W., Kasper, J. J., Francomano, T., Fu, T., Bang, O. S., Birchenall-Roberts, M. C.: Transforming growth factor beta 1 functions in monocytic differentiation of hematopoietic cells through autocrine and paracrine mechanisms. *Cell Growth Differ.* 7 (1996) 1535-1544

-
- 89 Vogel, L. K., Noren, O., Sjostrom, H.: Transcytosis of aminopeptidase N in Caco-2 cells is mediated by a non- cytoplasmic signal. *J.Biol.Chem.* 270 (1995) 22933-22938
- 90 Vogel, L. K., Spiess, M., Sjostrom, H., Noren, O.: Evidence for an apical sorting signal on the ectodomain of human aminopeptidase N. *J.Biol.Chem.* 267 (1992) 2794-2797
- 91 Wahl, S. M.: Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a cause and a cure. *J.Clin.Immunol.* 12 (1992) 61-74
- 92 Wakefield, L. M., Roberts, A. B.: TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 12 (2002) 22-29
- 93 Watt, V. M., Willard, H. F.: The human aminopeptidase N gene: isolation, chromosome localization, and DNA polymorphism analysis. *Hum.Genet.* 85 (1990) 651-654
- 94 Werfel, T., Sonntag, G., Weber, M. H., Gotze, O.: Rapid increases in the membrane expression of neutral endopeptidase (CD10), aminopeptidase N (CD13), tyrosine phosphatase (CD45), and Fc gamma-RIII (CD16) upon stimulation of human peripheral leukocytes with human C5a. *J.Immunol.* 147 (1991) 3909-3914
- 95 Werner, F., Jain, M. K., Feinberg, M. W., Sibinga, N. E., Pellacani, A., Wiesel, P., Chin, M. T., Topper, J. N., Perrella, M. A., Lee, M. E.: Transforming growth factor-beta 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *J.Biol.Chem.* 275 (2000) 36653-36658
- 96 Wex, T., Lendeckel, U., Wex, H., Frank, K., Ansorge, S.: Quantification of aminopeptidase N mRNA in T cells by competitive PCR. *FEBS Lett.* 374 (1995) 341-344
- 97 Weyand, C. M., Goronzy, J. J.: Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Med.Clin.North Am.* 81 (1997) 29-55
- 98 Weyand, C. M., Goronzy, J. J.: The molecular basis of rheumatoid arthritis. *J.Mol.Med.* 75 (1997) 772-785
- 99 Wrana, J. L.: Crossing smads. *Sci.STKE.* 2000 (2000) RE1-
- 100 Xu, Y., Lai, L. T., Gabilove, J. L., Scheinberg, D. A.: Antitumor activity of actinonin in vitro and in vivo. *Clin.Cancer Res.* 4 (1998) 171-176

101 Zhang, Y., Derynck, R.: Regulation of Smad signalling by protein associations and signalling crosstalk. *Trends Cell Biol.* 9 (1999) 274-279

Thesen

1. Aminopeptidase N eine mit Membranstrukturen assoziierte Zinkmetalloprotease besitzt u.a. Bedeutung in der Verdauung von Nahrungsproteinen im Darm, filtrierten Proteinen in den Nierentubuli, bei der Modulation von Kininen und Neuropeptiden. Immunologische Bedeutung besteht u.a. als Rezeptor für Viren im oberen Respirationstrakt, im Antigen-Prozessing auf der Oberfläche dendritischer, antigenpräsentierender Zellen (APC), bei Adhäsionsprozellen und bei der zellulären Kommunikation mittels Zell-Zell-Kontakt sowie bei der Progression maligner Tumoren. Das Enzym dient im Bereich der Hämatologie als Marker bei der Charakterisierung von Leukämie- und Lymphomzellen.
2. Es wurden Untersuchungen bezüglich der regulativen Elemente des Promotors der Aminopeptidase N (APN/CD13) an hämatopoietischen Zellen durchgeführt. Als Modell für lymphatische Zellen diente die T-Zelllinie Jurkat, als Modelle für myeloische Zellen die Zelllinien K562 und U937.
3. Die Untersuchungen basieren auf einem Reportergen-Assay, dem Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (DLR). Reporterenzym ist hier die Firefly-Luciferase. Im Rahmen der Etablierung des DLR am Institut für Medizinische Immunologie zeigte der Vergleich mit bereits vorhandenen Daten anderer Arbeitsgruppen ähnliche Ergebnisse.
4. Als unspezifischer Aktivator, um eine zelluläre Expressionsänderung zu provozieren, wurde ein Phorbolesther (PMA) verwendet, welcher einen Aktivator der Protein-Kinase C darstellt.
5. Eine Expressionsaktivierung in Jurkat-Zellen lässt sich bereits nach 3h, in K562-Zellen nach 6h nachweisen. In anderen Arbeiten wurde eine mRNA-Erhöhung nach 30 Minuten beschrieben und auch eine Stabilisierung der mRNA als Ursache der erhöhten APN-Expression nachgewiesen. Eine Verzögerung durch von 30-60 min ergibt sich durch die notwendige Luciferase-Synthese. Für kinetische Untersuchungen ist der Dual-Luciferase Reporter Assay nicht das System der Wahl.
6. Eine Bedeutung der Bindestellen für Myb- und Ets-Proteine bei der Promotoraktivierung lässt sich in myeloischen Zellen nachweisen, die gleichsinnige Aktivitätserhöhung bei allen Deletionskonstrukten in lymphatischen Zellen nach 12stündiger Mitogenstimulation

spricht eher für eine höhere Proteinsynthese im Rahmen einer allgemeinen Zellstoffwechselaktivierung und gegen eine Bedeutung der Myb- und Ets-Bindestellen.

7. Die Region um -40 bp hat einen bedeutenden Anteil sowohl an der basalen, als auch an der stimulierten Expression von APN in myeloischen und lymphatischen Zellen. Bei Deletion dieses Bereiches sinkt die basale Promotoraktivität stark ab, eine starke Aktivitätszunahme dieses Promotorbereiches ist 12 Stunden nach Mitogenstimulation des -40bp-Konstruktes feststellbar.
8. Die Transfektion von Konstrukten, welche zusätzlich den nativen bzw. mutierten Enhancer enthielten, brachte folgende Ergebnisse: Die insbesondere innerhalb der ersten potentiellen ETS-Bindestelle mutierten Konstrukte aktivierten den myeloischen Promotor stärker als der native Enhancer. Als Ursache dafür kann die Störung der Bindung eines Repressors diskutiert werden, Differenzen des Trägerplasmids sollten eine untergeordnete Rolle spielen. Die Aktivitätsdifferenzen der Konstrukte untereinander ist gering. Dies spricht für das Vorhandensein anderer aktiver DNA-Bereiche auf dem Enhancer, als den in epithelialen Zellen identifizierten.
9. TGF- β stimuliert die Expression der APN/CD13. Bei einer Überexpression eines der beiden hier untersuchten Proteinen dieses Signalweges, Smad3 oder Smad4, kommt es zu einer deutlich erhöhten Ansprechbarkeit auf TGF- β .
10. Bei Überexpression beider Konstrukte kommt es zur Suppression. Dies kann im Rahmen eines „Squelching“-Phänomens gewertet werden: Smad-Komplexe aus Smad3 und Smad4 binden auch an regulative DNA-Elemente anderer Promotoren, wobei es durch die höhere Transkriptionsaktivität an anderen Promotoren zu einer Rekrutierung nukleärer Kofaktoren kommt, die nun wiederum bei der Aktivierung des myeloischen Promotors der APN/CD13 fehlen. Resultat ist die verringerte Promotoraktivität. Auch die Aktivierung inhibierender DNA-Elemente bzw. Transkriptionsfaktoren (z.B. Smad7) kann diskutiert werden.
11. Ist der Enhancer im transfizierten Konstrukt vorhanden, verläuft die Aktivierung des APN/CD13-Promotors durch TGF- β -1 deutlich stärker. Dies lässt vermuten, dass entscheidende TGF- β -1-responsible Elemente auf dem Enhancer gelegen sind, beziehungsweise mit diesem bei der Promotoraktivierung interagieren.

12. Nähere Kenntnis von Regulation und Funktion der Amino-peptidase lässt auf die Aufdeckung neuer therapeutischer Angriffspunkte bei vielen, nicht seltenen Erkrankungen (z.B. Infektionen der Atemwege, Krebserkrankungen) hoffen. Als ein weiterer Baustein zum Verständnis der regulativen nukleären Elemente ist diese Doktorarbeit einzuordnen.

Tabellarischer Lebenslauf

PERSONALIEN

Name, Vorname: Geisler, Michael
Adresse: Rebenweg 16, 06333 Hettstedt
e-mail: michageisler@web.de
Geburtsdatum: 11. Februar 1976
Geburtsort: Wippra
Familienstand: ledig
Kinder: ein Sohn, Hannes Leonhard Michael Kinitz, * 5.3.1997
Nationalität: deutsch

SCHULISCHE AUSBILDUNG

1982–1991 Polytechnische Oberschule I Hettstedt, Klasse 1 - 8
1991–1994 Gymnasium am Markt Hettstedt, Klasse 9–12
1994 Erhalt der Hochschulreife

STUDIUM

10/1994 Beginn des Medizinstudiums an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
09/1996 Physikum, Note 2
08/1997 Erstes Staatsexamen, Note 2
08/2000 Zweites Staatsexamen, Note 2
09/2001 Drittes Staatsexamen, Note 2

PRAKTISCHES JAHR

10/2000–02/2001 Innere Medizin im St. Elisabeth-Krankenhaus, Lehrkrankenhaus der
Martin-Luther-Universität
02/2001–05/2001 Psychiatrie in der Klinik für Orthopädie der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
05/2001–09/2001 Allgemein Chirurgie im Spital Affoltern/Schweiz, Lehrkrankenhaus der
Universität Zürich

BERUF

02/2002 Arzt im Praktikum, Neurologische Klinik, Klinikum Bergmannstrost

08/2003 Assistenzarzt, Medizinische Klinik, Klinikum Bergmannstrost

INTERESSEN

Musik: Gitarre

Computer: Kenntnisse in Word, Excel

Fremdsprache: Englisch

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe bisher weder zu diesem noch zu einem anderen Thema eine Dissertation verfasst.

Halle, den

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. habil. Jürgen Langner. Er ermöglichte die Anfertigung dieser Arbeit an dem von ihm geleiteten Institut. Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Astrid Kehlen für die sehr gute fachliche Betreuung, ihre ständige Bereitschaft mir bei Problemen beizustehen und nicht zuletzt für die unermüdliche Motivationsarbeit bei Rückschlägen jeder Art. Frau Dr. med. Dagmar Riemann und Dipl.-Biol. Katja Thiele danke ich für die Diskussionen und Hinweise, die mir bei der Lösung vieler Probleme eine große Hilfe waren. Mein Dank gebührt Frau Walcker, deren große Erfahrung in Sachen Rechtschreibung, Satzbau und Absatzformate mir dabei half die Arbeit in die rechte Form zu bringen. Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität für die angenehme Arbeitsatmosphäre.