

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**FRET-basierte Untersuchung der Kollokalisierung der Aminopeptidase
APN/CD13, Dipeptidyl-Peptidase/CD26 und Neprilysin/CD10 mit
anderen membranständigen Molekülen**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Anatolij Tcherkes

geboren am 12.08.1980 in Belzy

Betreuer: PD Dr. Dagmar Riemann

Gutachter: PD Dr. Dagmar Riemann

Prof.Dr. Uwe Lendeckel (Universität Greifswald)

Prof.Dr. Dirk Reinhold (Universität Magdeburg)

05.03.2019

10.10.2019

Referat

Das Ziel dieser Arbeit ist die Suche nach möglichen Interaktionspartnern von Aminopeptidase N (APN), Neutraler Endopeptidase (NEP) und Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV) auf der Zelloberfläche hämatopoetischer Zellen. Die Suche erfolgte mittels durchflusszytometrischer FRET-Messung.

Die Ergebnisse sollten mit einer 2. Methode z.B. Koimmunopräzipitation bestätigt werden.

Zur Kalibrierung des Systems wurde eine Positiv- und eine Negativkontrolle etabliert. Als Positivkontrolle wurde FRET zwischen 2 APN-Monomeren oder zwischen der schweren Kette (HC) der HLA Klasse-I-Moleküle und β 2-Mikroglobulin (β 2-Mi) gemessen. Die FRET-Messung zwischen APN/CD13 und Siglec-3/CD33 wurde für myeloische Zellen als Negativkontrolle etabliert. Es konnte eine enge räumliche Beziehung zwischen APN und den Fc γ -Rezeptoren-I und-II gezeigt werden. Die Ergebnisse wurden verifiziert durch Koimmunopräzipitation und mit Immungold-Elektronenmikroskopie (im Rahmen der Zusammenarbeit mit dem Panum-Institut, Kopenhagen).

Wir konnten für U937-Zellen zeigen, dass die Stimulation mit TPA zur signifikanten Steigerung der Expression von APN/CD13 und CD64 und zur signifikanten Verringerung des Abstandes zwischen Fc γ -Rezeptor-II und APN führt.

Nach der Stimulation von U937-Zellen mit TPA kam es zur Verringerung des Abstandes zwischen APN und HLA-DR. Nach der Stimulation mit LPS konnte eine signifikante Herunterregulation von CD32 ohne Veränderung des FRET-Wertes zwischen APN und Fc- γ -Rezeptoren-I und -II gezeigt werden.

Nach Stimulation mit IL-4 zeigten wir auf Perikardmakrophagen die Heraufregulation von APN und Herunterregulation von CD64, verbunden mit einem Wegrücken von CD64 von APN.

Auf THP-1-Zellen zeigten wir eine enge räumliche Beziehung zwischen APN/CD13 und den Integrinen CD11b/CD18. Mit der durchflusszytometrischen FRET-Messung konnte weder ein enger Abstand zwischen NEP und CD59 auf Namalwa-Zellen, noch zwischen DPPIV und CD59 auf Jurkat-Zellen, noch zwischen DPPIV und CXCR4 auf Jurkat-, PM- und Raji-Zellen gezeigt werden, wobei das negative Ergebnis eine räumliche Nähe nicht ausschließen kann.

Die durchflusszytometrische FRET-Messung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern erwies sich als eine probate, kostengünstige und effektive Methode zur Erforschung der APN-Interaktionen auf der Zelloberfläche.

Tcherkes, Anatolij: FRET-basierte Untersuchung der Kollokalisierung der Aminopeptidase APN/CD13, Dipeptidyl-Peptidase/CD26 und Neprilysin/CD10 mit anderen membranständigen Molekülen

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 70 Seiten 2019

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Aminopeptidase N	1
1.1.1 Expression	1
1.1.2 Struktur	1
1.1.3 Funktion	2
1.1.4 Regulation	3
1.1.5 Beteiligung von APN an Signaltransduktion	3
1.2 Dipeptidylpeptidase IV	4
1.2.1 Expression von DPPIV	4
1.2.2 Struktur	4
1.2.3 Funktion	5
1.2.4 Regulation	7
1.3 NEP/CALLA/CD10	7
1.3.1 Expression	8
1.3.2 Struktur	8
1.3.3 Funktion	9
1.3.4 Signaltransduktion/Regulation	10
2 Zielsetzung der Arbeit	11
3 Material und Methoden	12
3.1 Material	12
3.1.1 Verwendete Zellen	12
3.1.2 Verwendete Antikörper und Stimulanzien	13
3.1.3 Lösungen und Puffer	15
3.1.4 Verwendete Geräte, Software und Verbrauchsmittel	17
3.1.5 Statistischen Analysen	18
3.2 Methode I: FRET in der Durchflusszytometrie	18
3.2.1 FRET-Grundlagen	18
3.2.2 Durchflusszytometrie	20
3.2.3 Immunfluoreszenz	21
3.2.4 Berechnung der FRET-Effizienz E_{T_p} in der Durchflusszytometrie	21
3.2.5 Versuchsanordnung	23
3.2.6 Stimulationsansätze	24
3.2.7 Datenaufnahme	24
3.2.8 Datendarstellung und Datenverarbeitung	24
3.3 Methode II: Koimmunopräzipitation	26
3.3.1 Vorbereitung der Zellen	26
3.3.2 SDS-PAGE	27
3.3.3 Western Blot	27

4 Ergebnisse	30
4.1 Positivkontrolle	30
4.1.1 FRET zwischen APN-Monomeren	30
4.1.2 FRET zwischen β 2-Mi und der HC-MHC-Klasse-I-Moleküle	30
4.2 Negativkontrolle	31
4.3 Kolokalisation von APN mit Fc-Rezeptoren	31
4.3.1 Koimmunpräzipitation zwischen APN und Fc γ -Rezeptor I und II	32
4.3.2 Stimulation von THP-1-Zellen mit LPS	33
4.3.3 Stimulation von THP-1-Zellen mit Substanz P	34
4.3.4 Stimulation von Perikard-Makrophagen mit IL-4	35
4.3.5 Stimulation von U937-Zellen mit TPA	36
4.4 Kolokalisation von NEP, APN und DPPIV mit MIRL/CD59	37
4.5 Kolokalisation von APN, NEP und DPPIV mit CXCR4	38
4.6 Kolokalisation von APN und NEP mit HLA-DR	39
4.6.1 Stimulation von U937-Zellen mit TPA	39
4.7 Kolokalisation zwischen APN und den Adhäsionsmolekülen	40
4.8 Interaktionspartner von Fc-Rezeptoren auf monozytären Zellen	41
5 Diskussion	42
5.1 FRET in der Durchflusszytometrie	42
5.2 Positivkontrollen	42
5.3 Negativkontrolle	43
5.4 Untersuchung der Kolokalisation von APN mit anderen Membran-Molekülen	44
5.4.1 Kolokalisation von APN mit Fc γ -Rezeptoren	44
5.4.2 Kolokalisation von NEP, APN und DPPIV mit MIRL/CD59	45
5.4.3 Interaktion zwischen APN und Adhäsionsmolekülen	46
5.5 Zweidimensionale Kartierung der Zelloberfläche	47
5.5.1 Kolokalisation zwischen CD32 und CD18	47
5.5.2 Interaktion zwischen CD32 und CD59	48
5.5.3 Interaktion zwischen HLA-DR und Fc γ -Rezeptor-I und -II	49
5.6 Stimulationsversuche	49
5.6.1 Stimulation mit LPS	50
5.6.2 Stimulation mit Substanz P	51
5.6.3 Stimulation mit IL-4	51
5.6.4 Stimulation von U937-Zellen mit TPA	52
5.6.5 Interaktion zwischen APN, NEP, DPPIV und CXCR4	53
6 Zusammenfassung	55
7 Literaturverzeichnis	56
8 Thesen	69

Abkürzungsverzeichnis

β 2-Mi	β 2-Mikroglobulin
ADA	Adenosin-Desaminase
ANP	atriales natriuretisches Peptid
APN	Aminopeptidase N/CD13
AS	Aminosäure
CALLA	Common Acute Lymphocytic Leukemia Antigen
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DCs	Dendritic cells
DPPIV	Dipeptidyl peptidase-IV
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ETp	Energietransfer-Effizienz
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fc γ -Rezeptor	Rezeptor für Fc-Teil des Immunglobulin-G
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSC	forward scatter
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GHRH	growth hormon releasing hormon
GLP-1	Glucagon-Like Peptide-1
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HC	heavy chain
HRP	Meerrettich-Peroxidase
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1/CD54
IFN- γ	γ -Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
kb	Kilo-Basenpaaren
kDa	Kilodalton
Ko-IP	Koimmunopräzipitation
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LPS	Lipopolysaccharid
LSC	Laser scanning cytometry
mAb	monoklonaler Antikörper
MAP-Kinase	mitogen-activated protein-kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIRL	membrane inhibitor of reactive lysis/CD59
mRNA	messenger RNA

n.d.	not done
n.s.	nicht signifikant
NEP	Neutrale Endopeptidase, Nephilysin/CD10
NK	natürliche Killerzellen
NP40	Nonoxinol 40
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBMo	periphere Blutmonozyten
PE	Phycoerythrin
PI3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PM	Perikard-Makrophagen
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RANTES	Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted
RCC	renal cell carcinoma
RE	relative Einheiten
RNA	ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung des Mittelwertes
SDF-1 α	Stromal-cell-derived factor-1- α
SDS	sodium dodecyl sulfate
SFC	Fibroblasten-artige Synoviozyten
SP	Substanz P
Src-Kinase	cellular und sarcoma, Tyrosinkinase
SSC	sideward scatter
syk	spleen tyrosine kinase
TCR	T cell receptor
TLR4	Toll-like receptor-4
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Zap 70	ζ -chain-associated protein kinase 70

Abbildungsverzeichnis

1	Hypothetische Struktur von APN/CD13	2
2	Schematische Darstellung von DPPIV/CD26 in dimerer Struktur	5
3	Schematische Darstellung von NEP/CALLA/CD10	9
4	FRET im Jablonski-Diagramm und auf Fluorophorebene	19
5	Räumliche Abhängigkeit zwischen κ^2 und Förster-Radius	20
6	Schematischer Aufbau des Gerätes FACS Calibur	22
7	Auswertung mittels Zweiparameteranalyse (Dot-Plot)	25
8	Auswertung mittels Einparameteranalyse (Histogramm)	25
9	Fluoreszenzintensität von CD64 auf U937-Zellen	32
10	Koimmunpräzipitation von CD32 und CD13 auf THP-1-Zellen	33
11	Fluoreszenzintensität von CD14 auf THP-1-Zellen	34
12	Stimulation von THP-1-Zellen mit LPS	34
13	Stimulation von THP-1-Zellen mit Substanz P	35
14	Stimulation von Perikard-Makrophagen mit IL-4	36
15	Ergebnisse der Stimulation von U937-Zellen mit TPA	37
16	TPA-induzierte Stimulation von HLA-DR und CD13 auf U937-Zellen	40
17	Cluster-Darstellung der Interaktionen von APN mit verschiedenen Molekülen auf monozytären Zellen	48
18	Schematische Darstellung der Interaktionen nach Stimulation mit IL-4	52

Tabellenverzeichnis

1	Expression relevanter Antigene	12
2	Verwendete Zellen	13
3	Verwendete FACS-Antikörper	13
4	Antikörperliste für Koimmunopräzipitation	14
5	Verwendete Stimulanzen	15
6	Verwendete Lösungen und Puffer	15
7	Verwendete Geräte und Verbrauchsmittel	17
8	Versuchsanordnung für die FACS-Färbungen	23
9	FRET-Positivkontrolle	30
10	FRET-Negativkontrolle	31
11	Kolokalisation zwischen CD32 und CD64 mit APN	32
12	Kolokalisation zwischen NEP, APN, DPPIV und MIRL/CD59	38
13	Kolokalisation zwischen APN, NEP und DPPIV mit CXCR4	38
14	Kolokalisation zwischen APN und NEP mit HLA-DR	39
15	Kolokalisation zwischen APN und Adhäsionsmolekülen	41
16	Interaktionspartner von Fc-Rezeptoren auf monozytären Zellen	41

1 Einleitung

1.1 Aminopeptidase N

1.1.1 Expression

Aminopeptidase N/CD13 (APN) gehört zur Gruppe der transmembranären Ektoenzyme. 1989 wurde APN als Oberflächenmarker CD13 identifiziert [Look et al., 1989].

Im hämatopoetischen System wird CD13 auf myeloischen Zellen ab der Stammzelle exprimiert und dient deshalb als pan-myeloisches Antigen. Als solches wird CD13 in der Phänotypisierung eingesetzt [Fruehauf et al., 2001]. Auch die Zellen in den frühesten Stadien der T- und B- Zelldifferenzierung sind CD13-positiv [Syrjala et al., 1994]., während periphere B- und T-Lymphozyten keine CD13 exprimieren [Ashmun et al., 1992]. Man findet eine abnorme Expression von CD13 bei einigen hämatologischen B- und T-Zell-Neoplasien [Lendeckel et al., 2000]. Auch bei Nierentumoren [Riemann et al., 1994a] und bei Gelenkentzündungen [Riemann et al., 1993] findet man APN-tragenden T-Lymphozyten.

Außerhalb des hämatopoetischen System wird APN ubiquitär exprimiert: auf Stromazellen im Knochenmark, Endothelzellen, Fibroblasten und synaptischer Membran der Nervenzellen wie auf Keratinozyten, Darmepithelien und auf proximalen Nierentubulusepithelzellen [Mina-Osorio, 2008].

1.1.2 Struktur

APN ist eine Alanylaminopeptidase (EC 3.4.11.2) der M1-Familie der Metalloproteasen und zählt zu den Gluzinkinen. Das humane Gen wurde 1988 kloniert [Olsen et al., 1988] und 1990 auf dem Chromosom (q25-q26) lokalisiert [Watt and Willard, 1990]. Die Aufklärung der Exon-Intron-Struktur gelang erst 1996 [Lerche et al., 1996]. Diese umfasst eine kodierende Sequenz von 3560 Basenpaaren, die auf 20 Exone verteilt sind.

Die humane APN ist ein Homodimer aus zwei ca. 140-160 kDa großen, nicht-kovalent assoziierten Untereinheiten. Die Kohlenhydrate machen mindestens 20% des Gewichtes aus. Die Dimerisierung findet intrazellulär statt noch vor der Prozessierung im Golgi-Apparat. Es wird vermutet, dass die Dimerisierung für den Transport des Moleküls aus dem endoplasmatischen Retikulum notwendig ist [Danielsen, 1990].

Die kodierende Sequenz beschreibt APN als TypII-Membranprotein von 967 Aminosäuren (AS) mit einer kurzen (8 – 10 AS) N-terminalen intrazellulären Domäne, einer hydrophoben transmembranären Domäne von 24 AS und einer großen extrazellulären Zn-bindende Domäne, die das katalytische Zentrum mit einem HEXXH...E - Motiv und Glutaminsäure (GXMEN-Motiv) enthält [Hooper, 1994]. Aus der cDNA-Sequenz lassen sich elf potentielle N-Glykosylierungsorte und sieben Cystinreste ableiten [Olsen et al., 1988]. Der Extrazellulärbereich enthält zwei Untereinheiten. Nach einer Stielregion aus 40 AS, reich an Serin und Threonin als Ort von O-Glykosylierung, kommt das katalytische Zentrum mit der Zink-Bindungsregion (HELAH-Motiv: AS 388-392, ein Zinkatom gebunden) [Noren et al., 1997]. Eine hypothetische Struktur von APN/CD13 ist in der Abbildung 1 dargestellt.

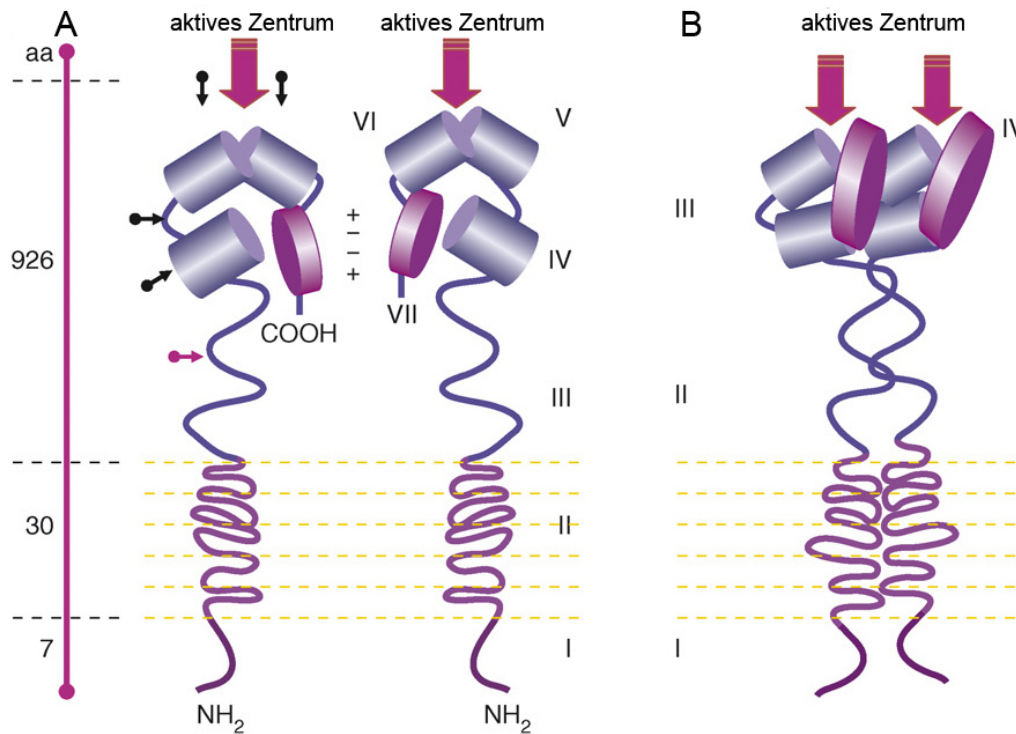


Abbildung 1 Hypothetische Struktur von APN/CD13 [Mina-Osorio et al., 2008]

(A) Schematische Darstellung der Organisation von sieben Domänen. Das aktive Zentrum ist zwischen den Domänen V und VI lokalisiert. Die Dimerisierung findet zwischen den Domänen VII des jeweiligen Monomers statt. Die N-Glykosylierungsstellen sind mit schwarzen Pfeilen und die O-Glykosylierungsstellen sind mit violetter Pfeil gekennzeichnet. Die AS-Sequenz der Monomere ist links dargestellt. (B) Schematische Darstellung der APN-Struktur als Dimer

1.1.3 Funktion

Als Oligopeptidase spaltet APN vorwiegend neutrale AS vom N-Terminus eines Proteins, darunter Alanin. Durch die Spaltung herausragender Peptide aus der MHC-Klasse-II-Grube ist APN/CD13 an der Antigenprozessierung beteiligt [Larsen et al., 1996].

Die enzymatische Spaltung biologisch aktiver Peptide dient als negative Rückkopplung im neuroendokrinen Metabolismus. Durch Spaltung von Opioiden beteiligt sich APN an der Regulation der Schmerzempfindung. Durch die Spaltung von Enkephalinen nimmt APN an Stimmungs- und Schmerzregulation teil [Konig et al., 1996]. Durch enzymatische Spaltung vasoaktiver Peptide, wie Angiotensin III, ist APN an der Blutdruckregulation beteiligt [Danziger, 2008].

Indem APN weitere Peptide, wie Tuftsin, Kinine, Glutathion, Somatostatin, Thymopentin, Neurokinin A enzymatisch spaltet, beeinflusst APN Vorgänge wie Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose sowie immunologische Funktionen wie Inflammation und Chemotaxis [Mina-Osorio et al., 2008].

APN/CD13 ist als Rezeptor für Coronavirus [Yeager et al., 1992] und für TGEV (transmissible gastroenteritis virus) [Delmas et al., 1992] bekannt. Durch die Virus-Bindung an APN ist diese an der Endozytose beteiligt. Neuere Arbeiten belegen zunehmend die Beteiligung von APN an der Phagozytose durch Monozyten [Mina-Osorio and Ortega, 2005], MΦ (Makrophagen) und Den-

dritischen Zellen (DCs) [Villaseñor-Cardoso et al., 2013]. So ist APN/CD13 in Abhängigkeit der Lokalisation an verschiedenen Mechanismen beteiligt. Dabei ist für die jeweilige Funktion der Ort der Expression entscheidend.

1.1.4 Regulation

Es finden sich keine enzymatisch inaktiven Vorstufen (Zymogene) der APN *in vivo*. Es wird angenommen, dass die Enzymaktivität über Synthese, Abbau oder endogene Inhibitoren reguliert wird. Die kleinen endogenen Peptide wie Substanz P und Bradykinin sind im Stande, APN-Aktivität in geringen Konzentrationen zu hemmen [Xu et al., 1995].

Die Untersuchung der Kristallstruktur von APN zeigte dazu den genauen Mechanismus. Substanz P blockiert den Kanal zum aktiven Zentrum des Enzyms [Chen et al., 2012]. Die Expression von CD13 nimmt im Rahmen des Zellwachstums und Differenzierung zu [Laouar et al., 1993]. Die Expression von APN auf der Oberfläche von Monozyten/M Φ , Endothelzellen und Zellen des renalen Epithels wird durch Interleukin-4 (IL-4) und Interferon- γ (IFN- γ) heraufreguliert [Riemann et al., 1999].

IL-10 reguliert die Expression von CD13 auf Monozyten herunter, während TGF- β (transforming growth factor β) die Expression von CD13 steigert [Kehlen et al., 2004].

APN/CD13 wurde lange Zeit als myeloischer Marker angesehen. Jedoch findet man im lymphatischen System APN auf synovialen T-Lymphozyten der Patienten mit rheumatoider Arthritis [Riemann et al., 1993] und in der perikardialen Flüssigkeit bei Patienten nach Herzklappenersatz [Riemann et al., 1994b]. Die tumor-infiltrierenden T-Lymphozyten bei Patienten mit renalem Karzinom (RCC) weisen ebenfalls eine Expression von CD13 auf [Riemann et al., 1994a]. IL-4 und IFN- γ konnten in separierten B- und T-Lymphozyten keine Expression von CD13 induzieren. Nach Zell-Zell-Kontakt mit Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten kann unter Stimulation mit Mitogen die Expression von CD13 induziert werden [Riemann et al., 1997]. Die Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung der APN an Zelladhäsionsprozessen, die einen Zell-Zell-Kontakt und Einwirkung von Mitogenen erforderlich machen. Als mögliche Interaktionspartner während der Zelladhäsion kommen Fibronektine, Integrine, CD40-CD40L und E-Selektine in Frage [Riemann et al., 1999].

1.1.5 Beteiligung von APN an Signaltransduktion

APN ist nicht nur als Enzym bekannt. Die Beteiligung von APN an der Signaltransduktion wurde seit langem vermutet. 1989 bemerkte MacIntyre eine intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung nach Stimulation von Fc-Rezeptoren mit einem Anti-CD13 mAb (monoklonaler Antikörper). Er vermutete, dass die Signaltransduktion durch Kreuzvernetzung mittels mAb zwischen APN und Fc-Rezeptor zustande kommt [MacIntyre et al., 1989].

Nachfolgend wurde eine Lokalisation der APN in den «lipid rafts» gezeigt [Navarrete Santos et al., 2000b] und zusammen mit CALLA/CD10 und DPPIV/CD26 in den Caveolae/«lipid rafts» von fibroblasten-artigen Synoviozyten (SFC) [Riemann et al., 2001].

Navarrete-Santos zeigte, dass eine Kreuzvernetzung von APN mit dem Enzymaktivität-hemmenden mAb (WM15) zur intrazellulären Ca²⁺ Freisetzung führt. Das bedeutet, dass APN unabhängig von der Enzymaktivität an der Signaltransduktion beteiligt ist. Weitere Experimente zeigten, dass die Signaltransduktion intrazellulär über die C-terminale Domäne erfolgt und zur Aktivie-

1 Einleitung

rung der MAP-Kinasen (Mitogen-Activated-Protein) ERK1/2, JNK und p38 führt. Auf RNA-Ebenen zeigte sich dabei eine Steigerung der Prozessierung von IL-8-mRNA [Navarrete Santos et al., 2000a].

Lange Zeit wurde angenommen, dass die zytoplasmatische Domäne (7-aa) von APN an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt ist, jedoch war der genauer Mechanismus nicht klar. Die neusten Arbeiten zeigen, dass eine Kreuzvernetzung von APN mit dem aktivierenden Anti-CD13 mAb (Clone 452, Dr. Meenhard Herlyn, The Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, PA) auf U937-Zellen eine vorübergehende Steigerung der Phosphorylierung von FAK, ERK und Src-Kinasen verursacht. Dies führt zur Phosphorylierung von Tyr⁶ in der C-terminalen Domäne von APN, was eine Bindung mit IQGAP, einem zytoskelettalen Adapter-Protein ermöglicht. Über dieses Adapter-Protein wird eine weitere Bindung an FAK, ERK und Src-Kinasen vermittelt, was ebenfalls zur Freisetzung von intrazellulärem Ca²⁺ führt [Subramani et al., 2013].

1.2 Dipeptidylpeptidase IV

Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV)/CD26 (EC 3.4.14.5) ist eine Ektopeptidase. Das Enzym wurde erstmal im Jahre 1966 beschrieben [Hopsu-Havu and Glenner, 1966]. Sie ist in der Lage, die Freisetzung von N-terminalen Dipeptiden aus Oligo- und Polypeptiden zu bewirken. Bevorzugt werden Peptide mit Prolin oder Hydroxyprolin [Vanhoof et al., 1995].

1.2.1 Expression von DPPIV

Im Säuglingsorganismus kommt DPPIV ubiquitär vor und lässt sich in verschiedenen Geweben nachweisen. DPPIV ist mit dem Oberflächenmarker CD26 identisch [Lojda, 1977].

Im hämatopoetischen System wird CD26 vorwiegend auf lymphatischen Zellen während der Differenzierung und spät im Thymus exprimiert [Morimoto and Schlossman, 1998]. Im peripheren Blut erscheint sie auf aktivierten B und NK-Zellen (natürlichen Killerzellen) [Bhling et al., 1994] und auf aktivierten T-Lymphozyten [Mentlein et al., 1984].

Im myeloischen System ist eine Expression auf alveolären Makrophagen [Jackman et al., 1995] und DCs [Gliddon and Howard, 2002] bekannt.

Auf nicht-hämatopoetischen Zellen ist die Expression von DPPIV/CD26 auf Endothelzellen, Hepatozyten, Enterozyten, Zellen der proximalen Nierentubuli bekannt [Lambeir et al., 2003]. Zusammen mit CD13 und CD10 wurde die Expression in den Caveolae auf SFCs gefunden [Riemann et al., 2001].

1.2.2 Struktur

Die DPPIV/CD26-cDNA kodiert ein Protein mit 766 AS und 9 potentiellen Glykosylierungsorten. Das Gen von DPPIV ist auf Chromosom 2q24.3 lokalisiert und setzt sich aus 26 kleinen Exonen zusammen [Abbott et al., 1994]. Das Enzym ist ein Homodimer und besteht aus zwei unabhängigen katalytischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 100-150 kDa [Smith et al., 1998]. DPPIV/CD26 ist ein Typ-II-Membranprotein. Wie APN und NEP (CD10/Neutrale Endopeptidase, Neprilysin) kommt DPPIV auch in löslicher Form vor. In gebundener Form ist CD26

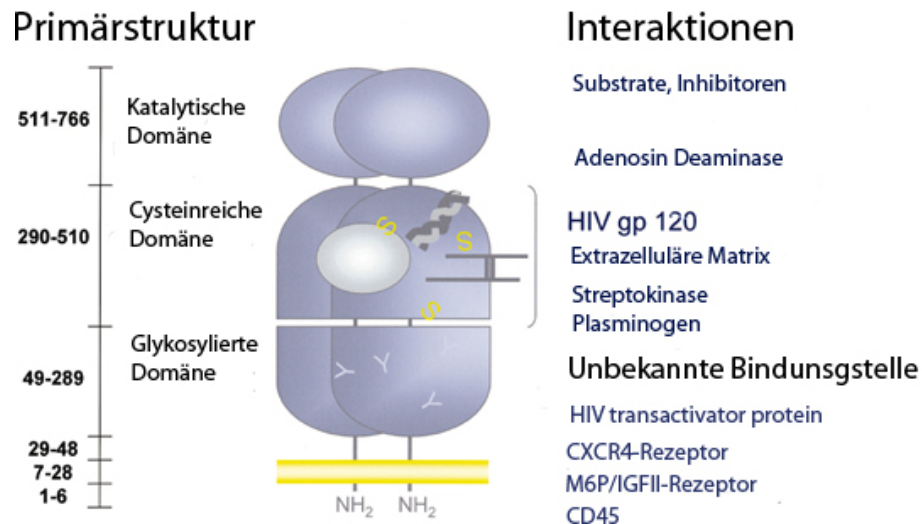


Abbildung 2 Schematische Darstellung von DPPIV/CD26 in dimerer Struktur [Lambeir et al., 2003]

Die vertikale Linie auf der linken Seite repräsentiert die primäre Struktur verschiedener Regionen. Auf der rechten Seite sind mehrere Liganden dargestellt mit bekannten und noch nicht bekannten Bindungsorten

durch einen Transmembrananker an der Zelloberfläche fixiert [Vanhoof et al., 1992]. Intrazellulär findet sich nur ein kleiner Rest aus 6 AS gefolgt von einem Transmembrananker (AS 7-28), eine kurzen flexiblen Stiel (AS 29-39), einer katalytischen Domäne Alpha-Beta-Hydrolasedomäne (AS 39-51 und AS 506-766) und einer Beta-Propellerdomäne (AS 55-497), die den trichterförmigen Eingang in das katalytische Zentrum darstellt [Rasmussen et al., 2003].

Ähnlich wie bei APN besitzt DPPIV nur eine kurze intrazelluläre Domäne. Lange Zeit wurde aufgrund der AS-Sequenz eine Phosphorylierung als Antwort auf eine Antikörperstimulation als nicht möglich angenommen [Bristol et al., 1992]. Inzwischen ist eine intrazelluläre Phosphorylierung an Tyr⁶-Position bei APN bekannt [Subramani et al., 2013]. Die schematische Struktur der DPPIV/CD26 ist in der Abbildung 2 dargestellt.

1.2.3 Funktion

Wie auch bei CD13 sind die Funktionen des Enzyms durch die Substrate und Orte der Expression bedingt. Die DPPIV hat mindestens 4 Funktionen:

- als Serinprotease

Im Immunsystem spaltet DPPIV Chemokine wie RANTES (Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted), was funktionell zur Hemmung der monozytären Chemotaxis mit gleichzeitiger Steigerung der Migration der T-Zellen führt [Waumans et al., 2015]. Indem DPPIV SDF-1 α (Stromal-cell-derived factor-1- α) spaltet, wird eine Bindungsstelle am CXCR4 frei und DPPIV kann als HIV-Co-rezeptor für das Andocken und Eindringen durch den HI-Virus genutzt werden.

Weitere Substrate der DPPIV sind NPY (Neuropeptide Y) [Frerker et al., 2007], GLP-1 (Glucagon-

1 Einleitung

Like Peptide-1), GHRH (Growth hormone releasing hormon) [Faidley et al., 2006]. Dadurch ist DPPIV/CD26 an endokrinen und Wachstumsvorgängen beteiligt. Durch die Spaltung von GLP-1 ist DPPIV an der Pathogenese des Diabetes mellitus beteiligt [Lambeir et al., 2003].

Eine funktionelle Ähnlichkeit zu NEP lässt sich durch gemeinsame Substrate wie Neuropeptid Y, Substanz P und BNP (brain natriuretic peptide) [Keane et al., 2011] feststellen. Gemeinsam mit NEP ist DPPIV an der Steuerung des Hungergefühls, der Angst, der Schmerz- und der Kreislaufregulation beteiligt [Hildebrandt et al., 2000].

- als Rezeptor

Die AS der Beta-Propellerdomäne wurden als Bindungsstelle für das HIV-Hüllprotein gp120 identifiziert [De Meester et al., 1999]. HIV-Hüllprotein gp120 geht eine Wechselwirkung mit der C3-Region von DPPIV/CD26 auf T-Lymphozyten ein. Die Interaktion erfolgt in der Nähe der ADA (Adenosin-Desaminase) -Bindungsstelle. Die Bindung führt zur Veränderungen der Konformation von gp120, die das Verdrängen der ADA von seiner Bindungsstelle hervorruft. In T-Lymphozyten induziert die Bindung von gp120 an DPPIV die Bildung von Pseudopodien. Auf deren Oberfläche wurden CD4, CXCR4 und CD26 in Clustern gefunden [Lambeir et al., 2003]. Die Zugabe der löslichen DPPIV zu T-Lymphozyten führt zur Bindung von DPPIV an Cavolin-1 [Ohnuma et al., 2005]. Eine weitere Beteiligung von DPPIV an der Pathophysiologie der HIV-Infektion passiert durch die Interaktion zwischen Tat-Protein, einem der HIV-Hüllproteine und DPPIV. Durch die Bindung selbst kann die Rolle von DPPIV in der Pathogenese der HIV-Infektion als weiterer Rezeptor verstanden werden. Die Bindung von Tat-Protein an die DPPIV erfolgt in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms, was zu kompetitiven Hemmung führt [Weihs et al., 2005].

- Adhäsionsmolekül

DPPIV besitzt die Fähigkeit, mit ECM (extrazelluläre Matrix)-Proteinen, wie Fibronectin und Kollagen I und III zu interagieren. DPPIV besitzt eine Kollagenbindungsstelle zwischen AS 236 und 491. Funktionell spielt dies eine Rolle bei Zell-Zell- und Zell-ECM-Interaktionen im Sinne der Zellmigration und T-Zell-Aktivierung [Lambeir et al., 2003]. Lösliche DPPIV ist in der Lage, neutrophile Granulozyten vom Ort der höheren Konzentration zum Ort der niedrigeren Konzentration wandern zu lassen (Chemorepellent). Diese Funktion geht nach der Zugabe von DPPIV-Inhibitor verloren. Der genaue Mechanismus ist weitestgehend unbekannt [Herlihy et al., 2013].

- Als kostimulierendes Protein während einer Signaltransduktion

Es wurden mehrere Interaktionspartner der DPPIV/CD26 identifiziert: Die Koexpression von CD26 und CD45RO wird auf T-Gedächtniszellen beobachtet. So interagiert DPPIV/CD26 direkt mit CD45, einer Tyrosin-Phosphatase, die den T-Zell-Rezeptor dephosphoryliert und zur Freisetzung von Ca^{2+} und Sekretion von IL-2, T-Zell-Aktivierung und Proliferation führt [Klemann et al., 2016]. An dem Signaltransduktionsweg beteiligen sich folgende intrazelluläre Proteine: Tyrosinkinasen der src-, Zap 70, syk-Familien, MAP-Kinasen und Phospholipase C. Die Aktivierung ist an das Vorhandensein eines aktivierten T-Zell-Rezeptors gekoppelt [Hegen et al., 1997]. Alleinige Stimulation des T-Zell-Rezeptors reicht nicht zur IL-2-Produktion aus. Es bedarf einer Kostimulation vermittelt durch DPPIV/CD26 [Huhn et al., 2000].

CD26 wurde als Bindungsprotein für adhärenz ADA identifiziert [Blanco et al., 1996]. ADA baut

Adenosin zu Inosin ab. Inosin hemmt die Zellproliferation. Dadurch ist DPPIV an Regulation von Wachstumsvorgängen beteiligt.

Eine direkte Interaktion zwischen DPPIV und CXCR4 wird vermutet, da DPPIV SDF- α spaltet. SDF- α ist wiederum als einziger Agonist von CXCR4 bekannt [Lambeir et al., 2003]. Auf Th2-Zellen wurde eine Internalisation von CD26 und CXCR4 gezeigt [Willheim et al., 1997].

CD26 wurde zusammen mit CD13 und CD10 in den Caveolae gezeigt. Dabei wurde eine funktionelle Beteiligung von DPPIV an der T-Zell-Aktivierung vermutet [Riemann et al., 2001].

1.2.4 Regulation

In Abhängigkeit von der Gewebeart wird die Expression von DPPIV/CD26 unterschiedlich reguliert.

So führt die Stimulation von Nierenzellkarzinom-Zellen (RCC) mit T-Zell-Zytokinen wie IL-4 und IL-13 zur Steigerung der Expression und der enzymatischen Aktivität von APN und von DPPIV [Riemann et al., 1995]. Die Stimulation mit TNF- α hatte einen ähnlichen Effekt wie IL-4 auf APN, jedoch nicht auf DPPIV. TGF- β hemmt die Expression und enzymatische Aktivität von DPPIV, aber nicht die von APN. Die Stimulation mit IL-6, IL-7, IL-10 und GM-CSF zeigten keinen Effekt auf Expression und enzymatische Aktivität von APN und DPPIV [Riemann et al., 1995].

Die Stimulation von RCC-Zellen und Nierentubulus-Zellen mit IFN- α , IFN- β und IFN- γ führte zur Steigerung der Expression von APN, Aminopeptidase A (APA) und DPPIV. Die Stimulation mit IL-1, IL-6, IL-7, IL-12 und GM-CSF zeigte keinen Effekt auf die Expression von APN und DPPIV. Die Stimulation mit cAMP-Spiegel steigernden Substanzen führt zur Heraufregulation der Expression von APA, DPPIV aber nicht von APN [Kehlen et al., 1998].

Nach Stimulation von Fibroblasten mit IL-4 und IFN- γ sowie mit Dexamethason und Hydrocortison wurde eine Heraufregulation von APN/CD13 beobachtet. Die Expression von DPPIV/CD26 wies ein anderes Muster auf. Deren Expression nahm nach Stimulation mit IL-1 α und IL-1 β zu. Stimulation mit Glucocorticoiden, TNF- α und TGF- β führten zur Abnahme der Expression von DPPIV [Sorrell et al., 2003].

Auf humanen gingivalen Fibroblasten führt die Stimulation mit IL-1 α zur Steigerung der DPPIV-Expression [Nemoto et al., 1999]. In einer weiteren Arbeit wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) mit IL4, IFN- γ und IL-12 stimuliert.

Die Stimulation mit IL-4 führte zur Herausbildung eines T_{H2}-Phänotyps mit deutlich niedrigerer Expression von CD26. Die Stimulation mit IFN- γ und mit IL-12 führte zur Herausbildung eines T_{H1}-Phänotyps und zur Steigerung der Expression von CD26 auf CD4⁺-Zellen [Willheim et al., 1997; Klemann et al., 2016].

1.3 NEP/CALLA/CD10

NEP oder Neutrale Endopeptidase (EC 3.4.24.11) ist eine Thermolysin-ähnliche Oligopeptidase, die Peptide bis 50 AS von N-terminaler Seite an den hydrophoben AS hydrolytisch spalten kann [Roques et al., 1993].

Das Enzym wurde erstmals im Jahre 1974 als «kidney brush border neutral proteinase» beschrieben [Kerr and Kenny, 1974].

Im 1978 wurde das Enzym als NEP (Neutrale Endopeptidase) identifiziert [Malfroy et al., 1978]. 1987 wurde das Enzym kloniert und sequenziert [Devault et al., 1987], woraus die Identität mit dem Leukozyten-Oberflächenantigen «common acute lymphoblastic leukemia antigen» (CALLA oder CD 10) erkannt wurde [Letarte et al., 1988].

1992 hat das «Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)» wegen der vielfältigen Bezeichnungen für diese Peptidase den Namen Neprilysin vorgeschlagen.

1.3.1 Expression

Im Gegensatz zu APN ist NEP ein weit verbreitetes, aber nicht ubiquitär vorkommendes Enzym. Die Expression ist im hämatopoetischen System nur in einem engen zeitlichen Fenster gegeben, deswegen wird CD10 als Marker der frühen B-Zell-Differenzierung im Knochenmark (Common- und Prä-B-Lymphozyten) eingesetzt. Im peripheren lymphatischen System sind Lymphozyten nur im folliculären Zentrum CD10⁺ [Fruehauf et al., 2001]. Im Rahmen der T-Zell-Differenzierung wird eine CD10-Expression vermutet [Beaumont et al., 1989]. Auf myeloischen Zellen wird CD10 als Expressionsmarker der segmentkernigen Granulozyten angesehen [Elghetany, 2002]. CD10 ist in der Hämatopathologie ein Marker der unreifen B-Zellen und ist spezifisch für Common-ALL (Akute lymphatische Leukämie). Weitere CD10-positive Hämatoblastosen sind B-lymphoblastische Leukämie/Lymphome, diffus großzelliges B-Zell-Lymphom, folliculäres Lymphom und Burkitt-Lymphom [Fruehauf et al., 2001].

Im nicht-hämatopoetischen Gewebe lässt sich das Molekül in der Bürstensaum-Membran der proximalen Tubuli und Glomeruli der Niere nachweisen. In folgenden Lokalisationen wurde ebenfalls NEP-Expression festgestellt: Lunge, Darm, Plazenta, Prostata und der Plexus choroideus des Auges, Gehirn, Ovarien, Fettgewebe und im Pankreas. Im Blut und Samenflüssigkeit kommt die NEP in einer löslichen Form vor [Maguer-Satta et al., 2011].

1.3.2 Struktur

Das Gen für die NEP wurde in der chromosomalen Region 3q21-q27 lokalisiert [Barker et al., 1989]. Das Gen umspannt mehr als 80 kb (Kilo-Basenpaaren) besteht aus 24 Exons [D'Adamio et al., 1989]. Die Klonierung der humanen cDNA ergab ein Glycoprotein bestehend aus 752 AS [Malfroy et al., 1988].

NEP ist ein homodimeres Ektoenzym, bestehend aus 2 unabhängigen Untereinheiten. Das Enzym ist ein integrales Membranprotein vom Typ II [Fulcher and Kenny, 1983] und besitzt eine kleine intrazytoplasmatische Domäne (27 AS), gefolgt von der transmembranären Domäne (22 hydrophoben AS) und der großen extrazellulären Domäne (703 AS), die das katalytischen Zentrums beinhaltet. Der C-Terminus des Enzyms beinhaltet das für viele Zink-Peptidasen typische HExxH-Motiv [Malfroy et al., 1988].

Das Molekulargewicht von NEP variiert je nach Gewebeart zwischen ca. 85 bis 100 kDa, abhängig vom Ausmaß der Glykosylierung. NEP besitzt 5 bis 6 Glykosylierungsstellen, mindestens 4 Disulfidbrücken sowie 12 Cysteine, von denen 10 innerhalb der gesamten M13-Familie der Metallopeptidasen konserviert sind [Tam et al., 1985]. In der Abbildung 3 ist eine schematische Darstellung von NEP/CD10 gezeigt.

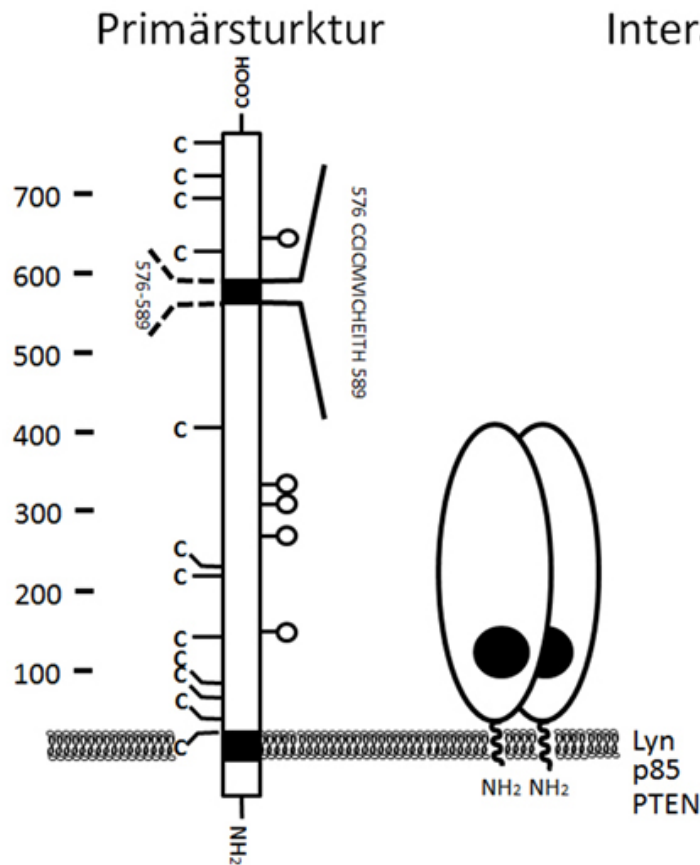


Abbildung 3 Schematische Darstellung von NEP/CALLA/CD10 [Maguer-Satta et al., 2011]
 Schematische Darstellung von NEP/CALLA/CD10 in dimerer Struktur auf der Zelloberfläche. Die vertikale Struktur auf der linken Seite repräsentiert die Primärstruktur des Glykoproteins. Die Zahlen geben orientierende Position der AS an [Roques et al., 1993]. Auf der rechten Seite sind bekannte Interaktionspartner des Glycoproteins dargestellt. Lyn: ist eine Tyrosinkinase; p85 ist eine Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase; (PTEN): Phosphatase and Tensin homolog ist ein Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankertes Protein was mit src-Tyrosinkinase assoziiert ist. Funktionell ist PTEN ein Gegenspieler der PI3-Kinase und somit ein Tumorsuppressor

1.3.3 Funktion

NEP ist während der embryonalen Entwicklung auf verschiedenen Geweben zu finden und wird als Stammzellmarker der Zellen mit nicht-hämatopoetischen Ursprung diskutiert [Bachelard Cascales et al., 2010].

Im Immunsystem spielt NEP eine modulatorische Rolle in der Ausreifung von B-Zellen [Bene, 2005]. Die Hemmung enzymatischer Aktivität von NEP führt zur Reduktion der Produktion von IL-2 in den T-Lymphozyten [Bhling et al., 1994].

Im myeloischen System reguliert NEP die Funktion von Granulozyten, indem sie proinflammatorische Peptide wie Endothelin, Bradykinin, Tachykinine und IL-1- β spaltet und so inaktiviert. Chemotaktisch wirksame Substrate der NEP sind Met-Enkephalin, Substanz P und FMLP (N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine)[Roques et al., 1993].

1 Einleitung

Die Hemmung von NEP auf polymorphonukleären Leukozyten führt zur Steigerung der Migration durch das intestinale Epithel [Hofman et al., 1998].

In der Niere und in der Lunge spaltet NEP kreislaufwirksame Peptide wie ANP (atriales natriuretisches Peptid) und Endothelin-1 [Kenny and Stephenson, 1988], sowie Angiotensin II [Roques et al., 1993] und ist somit an der Kreislaufregulation beteiligt.

NEP übt im zentralen Nervensystem den Einfluss auf spezifische physiologische/pathologische Prozesse wie Schmerz, Entzündung und Nahrungsaufnahme aus [Roques et al., 1993]. So reguliert NEP die Entzündungsreaktion durch die enzymatische Spaltung der proinflammatorischen Mediatoren wie z. B. Substanz P. Zudem beteiligt sich NEP an der NK₁R und β -Arrestin-vermittelten Signaltransduktion [Cattaruzza et al., 2013]. Die Nähe zum Substrat ist entscheidend für die Funktion, so übernimmt NEP den Abbau von Amyloid- β -Peptiden und ist so kausal an der Entstehung von Alzheimer-Demenz beteiligt [Grimm et al., 2013].

Durch die Spaltung von Bombesin und Endothelin 1 wird die RhoA -abhängige-Signaltransduktion in Gang gesetzt, was eine Migration und Invasion von Prostata-Karzinomzellen zur Folge hat [Zheng et al., 2006]. Durch die Spaltung von fibroblast growth factor-2 (FGF2) wird eine Reduktion der Angiogenese verursacht. Zudem kann CD10 direkt an ezrin/radixin/moesin-Proteinen binden und dadurch die Bindung an CD44 (Hyaluron-Rezeptor) reduzieren, wodurch die Migration der Zellen reduziert wird [Iwase et al., 2004].

1.3.4 Signaltransduktion/Regulation

Wie APN und DPPIV ist NEP an Signaltransduktion beteiligt, die von der katalytischen Funktion des Proteins unabhängig ist. APN und DPPIV [Danielsen, 1995], sowie NEP [Navarrete Santos et al., 2000b] wurden in den «lipid rafts» und in den Caveolae [Riemann et al., 2001] gefunden. CD10 verursacht die Aktivierung von FAK (focal adhesion kinase). Sie wurde mit den intrazellulären Proteinen Lyn und p85, die an GPI-Anker gebunden sind koimmunopräzipitiert [Sumitomo et al., 2005].

Es wird ein Komplex zwischen NEP, Lyn und p85 gebildet und die Interaktion zwischen PI3K und FAK kompetitiv gehemmt. Durch diese Hemmung der Phosphorylierung wird FAK aktiviert. Die LNCaP-Zellen (Prosta-Karzinom-Zellen) zeigen eine Steigerung der Zellmigration. Auch die enzymatisch inaktive NEP ist im Stande PTEN zu rekrutieren und die Aktivierung von AKT (Proteinkinasen B $\alpha/\beta/\gamma$) zu verhindern. Dadurch wird das Zellwachstum stimuliert [Maguer-Satta et al., 2011].

In glatter Muskulatur senkt NEP die Empfindlichkeit von platelet-derived growth factor receptor (PDGFR). Die Regulation erfolgt via Src- Kinase- abhängige Phosphorylierung von PTEN. Dadurch wird die Migration und Proliferation der pulmonary artery smooth muscle cell herabgesetzt [Karoor et al., 2013].

2 Zielsetzung der Arbeit

Die membranständigen Peptidasen NEP, APN und DPPIV weisen eine Vielzahl Homologien auf:

Sie werden im hämatopoetischen System in den Caveolae/Rafts exprimiert. Ihre Funktion ist streng reguliert. Sie sind an der Regulation der Ausreifung und Migration der lymphatischen und myeloischen Zellen beteiligt. Gemeinsam ist bei APN und DPPIV die Interaktion mit Adhäsionsmolekülen. Auch auf der struktureller Ebene sind Gemeinsamkeiten erkennbar: APN und NEP sind Zn^{2+} -bindende Metallopeptidasen, die eine Homologie zu Thermolysin aufweisen. DPPIV hingegen ist ein Serinprotease.

Alle 3 Peptidasen kommen als Homodimere vor, auch lösliche Formen sind bekannt. Bei allen 3 finden sich keine kovalente Bindungen zwischen Monomeren und jedes Monomer ist selbstständig katalytisch aktiv. DPPIV und NEP haben wie APN eine große katalytisch aktive Ektodomäne, eine transmembranäre Domäne und eine kurze zytoplasmatische Domäne.

Alle 3 Proteine sind nicht nur Enzyme, sondern sind auch an der Signaltransduktion unabhängig von der katalytischen Funktion beteiligt. Bisher ist wenig über genauere Mechanismen der Interaktion bekannt.

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, mögliche Interaktionspartner auf der Zelloberfläche hämatopoetischer Zellen zu finden, die mit CD13, CD10 oder CD26 in einer engeren räumlichen Beziehung stehen, als eine Voraussetzung für eine mögliche Interaktion.

Die Ermittlung der räumlichen Nähe sollte mittels durchflusszytometrischer FRET-Messung erfolgen. Die Ergebnisse sollten mit einer biochemischen Methode, wie z. B. Koimmunopräzipitation bestätigt werden.

Mögliche Interaktionspartner ergeben sich aus:

- Vorkommen in den «lipid rafts»
- Proteine mit bekannter Beteiligung an der Signaltransduktion, z. B. via GPI-Verankerung oder Kopplung an ein G-Protein
- Funktionelle Beteiligung an Chemotaxis und Zelladhäsion

Zudem sollen folgende praktische Voraussetzungen der Liganden erfüllt sein:

- Koexpression mit CD13, CD10 oder mit CD26 auf einer Zelle
- Ausreichend hohe Expression der möglichen Interaktionspartner
- Kommerzielle Verfügbarkeit eines FACS (Fluorescence activated cell sorting)-fähigen Antikörpers, markiert mit Phycoerythrin und/oder Biotin

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Zellen

Für die Experimente im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden hämatopoetische Zellen und periphere Blutzellen gesunder Spender und Zellen aus Perikard-Flüssigkeit untersucht. Tabelle 1 zeigt hämatopoetische Zellen und Zelllinien mit Expression der für die Fragestellung der Arbeit relevanten möglichen Interaktionspartner. Anhand dieser Tabelle können die Experimente geplant werden. Die Verwendeten Zelllinien sind in der Tabelle 2 dargestellt. Der Expressions-

Tabelle 1 Expression relevanter Antigene

Zelllinien, in Klammern Spezifität: Jurkat(T), Raji-(B), Namalwa-(B), THP-1 und U937-(monozytär); PM-(Perikard-Makrophagen); PBMo-(periphere Blutmonozyten); «-» 1-10 relativer Einheiten (RE), «+» 10-100 RE, «++» 100-1000 RE, «+++» >1000 RE, ab «+++» Verwendung möglich; n.d.: nicht gemacht. ¹ CD13-transfiziert, sonst «-». ² CD26-transfiziert.

CD	Jurkat	Raji	Namalwa	THP-1	U937	PM	PBMo
CD10	++	++	++	-	-	+	-
CD11b	-	-	-	++	++	+++	+++
CD13	+++ ¹	-	-	+++	+++	+++	+++
CD18	++	n.d.	n.d.	++	++	+++	n.d.
CD26	+++ ²	-	-	-	-	++	-
CD32	-	++	++	++	++	++	+++
CD33	-	-	-	+++	++	++	++
CD54	++	++	n.d.	++	++	++	n.d.
MIRL/CD59	+++	n.d.	++	++	+	+++	n.d.
CD64	-	-	-	++	++	++	++
CXCR4	+++	++	+	-	-	++	-
HLA-DR	-	+++	++	++	+++	+++	+++
HC MHC-Klasse I	n.d.	+++	++	++	++	+++	+++
β2-Mi	n.d.	+++	++	++	++	+++	+++

muster der Zellen/Zelllinien ist in der Tabelle 1 abgebildet.

Perikard-Flüssigkeit wurde freundlicherweise aus der Klinik für Herz und Thoraxchirurgie der Martin-Luther-Universität (Direktor Prof. Dr. Silber) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um Perikard-Flüssigkeit von Patienten, die sich einer offenen Herzoperation unterzogen haben. Bei der Operation wird diese Flüssigkeit nach Anschneiden des Herzbeutels abgesaugt. Wir erhielten zwischen 2 bis 8 ml Flüssigkeit. In der Perikard-Flüssigkeit stellen Makrophagen und T-Zellen den Hauptanteil der Zellen dar. Die T-Lymphozyten exprimieren Aktivierungsmarker wie CD69, HLA-DR, CD45 und CD26 und sehr stark CD11b [Riemann et al., 1994a].

Periphere Blutzellen Periphere Blutzellen erhielten wir von freiwilligen gesunden Spendern. Periphere Blutmonozyten exprimieren CD13. CD10 findet sich auf Granulozyten. Weitere Oberflächenmoleküle sind in der Tabelle 1 dargestellt.

Das Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität vom

Tabelle 2 Verwendete Zellen

Die Tabelle zeigt die verwendeten Zelllinien mit Zellzugehörigkeit und morphologischer Differenzierung sowie eine ATCC-Nr. Die verwendeten Zelllinien wurden kommerziell erworben; Jurkat¹ CD26⁺ und CD13⁺, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. J. Wulfänger

Zelllinie	Ursprung	Morphologie	ATCC [®] -Nr.
Raji	Burkitt-Lymphom; B-Lymphozyt	Lymphoblast	CCL-86 [™]
Jurkat ¹	Akute T-Zell Leukämie; T-Lympho-zyt	Lymphoblast	TIB-152 [™]
U937	Histiocytisches Lymphom; myeloische Linie, Histiocyten	Monozyt	CRL-1593.2 [™]
THP-1	akute monozytische Leukämie	Monozyt	TIB-202 [™]
Namalwa	Burkitt-Lymphom; B-Lymphozyt	Lymphoblastoid	CRL-1432 [™]

02.12.2003 liegt vor.

3.1.2 Verwendete Antikörper und Stimulanzen

In der Tabelle 3 sind Antikörper aufgelistet, die in den FACS-Versuchen Verwendung fanden. In der Tabelle 4 sind primäre und sekundäre Antikörper sowie Firma und Bezugsort dargestellt, die für die Koimmunopräzipitation verwendet wurden. In der Tabelle 5 sind Zytokine und Konzentrationen gezeigt, die in der Herstellung dieser Arbeit Verwendung fanden.

Tabelle 3 Verwendete monoklonale Antikörper

Die Antikörper sind entweder direkt mit Phycoerythrin (PE) markiert, oder sind biotinyliert (b)

Antikörper	Clon	Firma
CD10 PE	ALB1	Immunotech, Marseille
CD10 PE	H10a	BD, Heidelberg
CD11b PE	M1/70	BD, Heidelberg
CD13 PE	22A5	Dako, Hamburg
CD13 PE	LeuM7	BD, Heidelberg
CD13 PE	WM15	BD, Heidelberg
CD26 PE	M-A261	BD, Heidelberg
CD32 PE	FLI 8.26	BD, Heidelberg
CD33 PE	P67.6	BD, Heidelberg
CD54 (Leu54) PE	LB-2	BD, Heidelberg
CD59 PE	p282 (H19)	BD, Heidelberg

Fortsetzung von **Tabelle 3**

Tabelle 3: Verwendete monoklonale Antikörper

Antikörper	Clon	Firma
CD64 PE	10.1	Ancell, Hamburg
CXCR4 PE CD184	12G5	BD, Heidelberg
HLA-DR PE	L243	BD, Heidelberg
MHC-Klasse I PE	G46-2.6	BD, Heidelberg
β 2-Mi PE	TÜ99	BD, Heidelberg
CD10 b	SN5c	Serotec, Puchheim
CD13 b	LeuM7	BD, Heidelberg
CD18 b	IAB4	Ancell, Hamburg
CD26 b	M-A261	BD Pharmingen, Heidelberg
CD32 b	FLI 8.26 (2003)	BD, Heidelberg
CD54 b	8.4 A6	Ancell, Hamburg
CD59 b	BAA-10G	Ancell, Hamburg
CXCR4 b	12G5	R & D Systems, Wiesbaden
HLA-DR b	L243	BD, Heidelberg

Tabelle 4 Antikörperliste für Koimmunopräzipitation

Die Tabelle zeigt eine Auflistung der Antikörper, die in der Immunpräzipitation verwendet wurden, mit Antikörper-Bezeichnung, Clon-Angabe in eckigen Klammern, Spezies-Zuordnung, Angabe von Isotyp (m: monoklonal, p: polyklonal) und Bezugsort. Anti CD13 Wistar wurde freundlich zur Verfügung gestellt durch Dr. M. Herlyn, Wistar-Institut, Philadelphia, PA

Ak / Clon / Markierung	Spezies	Isotyp	Firma / Bezugsort
CD13 [Wistar, 452]	Maus	IgG; m	Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, PA ¹
CD13 [WM15]	Maus	IgG ₁ , κ ; m	BD Biosciense, Heidelberg
CD13 [3D8]	Maus	IgG _{2a} , κ ; m	Santa Cruz, Heidelberg
CD13	Kaninchen	IgG; p	Panum Institut, Kopenhagen, Dänemark
CD32 [FLI8.26 (2003)]	Maus	IgG ₂ , κ ; m	BD Biosciense, Heidelberg
CD32 [2E1]	Maus	IgG _{2a} ; m	Dianova, Hamburg

Fortsetzung von **Tabelle 4**

Tabelle 4: Antikörperliste für Koimmunopräzipitation

Ak / Clon / Markierung	Spezies	Isotyp	Firma / Bezugsort
CD32-A [N-20]	Ziege	IgG; p	Santa Cruz, Heidelberg
CD32-A/C [C-17]	Ziege	IgG; p	Santa Cruz, Heidelberg
CD64 [N-19]	Ziege	IgG; p	Santa Cruz, Heidelberg
CD64 [10.Jan]	Maus	IgG ₁ , κ; m	Dianova, Hamburg
CD64 [10.01]	Maus	IgG ₁ , κ; m	Dako, Hamburg
anti-Ziege IgG-HRP	Kaninchen	IgG; p	Amersham-Pharmacia, Freiburg
anti-Maus IgG-HRP	Schaaf	IgG; p	Amersham-Pharmacia, Freiburg

Tabelle 5 Verwendete Stimulanzen

Stimulanz	Quelle
IL-4	PBH Hannover/Strathmann
LPS	Sigma, Hamburg
TPA	Sigma-Aldrich, Seelze b. Hannover
Substanz P	Sigma-Aldrich, Seelze b. Hannover

Charakterisierung verwendeter Stimulanzen mit Quelle und Firma

3.1.3 Lösungen und Puffer

In der Tabelle 6 sind für die Experimente verwendeten Lösungen samt Herstellung und Bezugsquelle dargestellt.

Tabelle 6 Verwendete Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Hersteller/Herstellung
FACS clean	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS flow	Becton Dickinson, Heidelberg
TRIS pH 8,8:	1,5 M Tris base 91g in 500ml dH ₂ O pH 8,8 mit HCl/NaOH einstellen 0,4% SDS 2 g

Fortsetzung von **Tabelle 6**

Tabelle 6: Verwendete Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Hersteller/Herstellung
TRIS pH 6,8	0,5M Tris base 6,05 g in 100 ml dH ₂ O pH 6,8 mit HCl/NaOH einstellen 0,4% SDS 0,4 g
Probenpuffer 6x	70% SDS- Tris 0,5M, pH 6,8 7 ml 3% Glycerol 3 ml 10% SDS 1g
Bromphenolblau 1,2 mg	10% - Mercaptoethanol 1 ml 0,5 ml Aliquots bei -70 lagern
RIPA I	1% NP40 substitute 0,5 ml 0,5% Deoxycholat 0,25 g 4 mM EDTA 0,4 ml 500 mM PBS auf 50 ml auffüllen
RIPA II	150 mM NaCl 5 ml 1,5M 1% Triton X-100 0,5 ml 1% Deoxycholat 0,25 g 0,1% SDS 0,5 ml 10% 4 mM EDTA 0,4 ml 500 mM PBS auf 50 ml auffüllen
30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	30% Acrylamid 30 g 0,8% Bisacrylamid 0,8 g dH ₂ O auf 100 ml auffüllen und filtrieren
Coomassie-Färbelösung	50% Methanol 500 ml 10% Essigsäure 100 ml dH ₂ O auf 1000 ml auffüllen
Coomassie Brilliant Blue R 2,5 g	
Coomassie-Entfärbelösung	15% Methanol 150 ml 10% Essigsäure 100 ml
TBST	1×TBS, 0,1% Tween-20 dH ₂ O auf 1000 ml auffüllen
Anodenlösung I-pH 10,4	0,3 M Tris 20% (v/v) Methanol destilliertes Wasser auf 1000 ml auffüllen
Anodenlösung II-pH 10,4	25 mM Tris, 20% (v/v) Methanol destilliertes Wasser

Fortsetzung von **Tabelle 6**

Tabelle 6: Verwendete Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Hersteller/Herstellung
Kathodenlösung-pH 7,6	40 mM 6-Aminohexansäure, 20% (v/v) Methanol destilliertes Wasser
TBS	137 mM NaCl, 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KCl
Protein G Sepharose	Amersham Biosciences, Freiburg
Protease-Phosphatase Inhibitor-Cocktail	Thermo Scientific, Bonn
BCA Protein Assay Kit	Merck Chemicals Ltd., Nottingham, U.K.
Tris-Acetat-Gel NuPAGE	Invitrogen, Darmstadt
Tris-Glycin-Gel Novex	Invitrogen, Darmstadt
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Molekulargewichtsmarker	Sigma-Aldrich, Steinheim
Peroxidase Detektionsreagenz 1+2	Amersham Biosciences, Freiburg
NP40 10%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween-20	Roth, Karlsruhe

3.1.4 Verwendete Geräte, Software und Verbrauchsmittel

Tabelle 7 Verwendete Geräte und Verbrauchsmittel

Gerät	Hersteller
Durchflusszytometer, FACSCalibur	BD Bioscience, Heidelberg
Neubauerzählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Mikroskop CH30 (10x10)	Olympus, Hamburg
Vortex Genie 1	Bender & Hoebin AG, Ismaning
Specol II	Carl Zeiss, Jena
Zentrifuge Typ 5415C	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Rotina 38	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Rotanta/TRC	Hettich, Tuttlingen
automatische Pipetten	Abimed, Langfeld
FACS-Röhrchen 5 ml	BD Falcon, Heidelberg

In der Arbeit wurden folgendes Software verwendet: CellQuest (Version 2.0), BD Bioscience, Heidelberg; SigmaPlot 10.0 Systat Software, Chicago, IL; Photoshop CS4 Adobe, München; Mi-

Microsoft Office 2010 Microsoft Corporation, Redmond, WA. R version 2.14.2 (2012-02-29) Copyright (C) 2012 The R Foundation for Statistical Computing ISBN 3-900051-07-0

3.1.5 Statistischen Analysen

Alle angegebenen p-Werte wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Testes für zwei unabhängige Stichproben ermittelt. Das Signifikanzniveau der p-Werte wurde mit $< 0,05$ festgelegt. Alle angegebenen p-Werte wurden aufgrund der geringen Fallzahl nicht für das Problem des multiplen Testens korrigiert (Bonferoni-Korrektur).

3.2 Methode I: FRET in der Durchflusszytometrie

3.2.1 FRET-Grundlagen

Bestrahlt man ein Fluorophor mit einem Laserlicht einer Frequenz, die im Absorptionsspektrum des Fluorophors liegt, so wird das Fluorophor in den angeregten Zustand gebracht und strahlt wieder zurück. Jedoch ist das Emissionsspektrum des Fluorophors in den roten Bereich verschoben (Stokes-Shift). Vergleich Abbildung 4.

Befindet sich in der unmittelbaren Nähe des angeregten Fluorophors (Donor) ein zweites Fluorophor (Akzeptor), das sich vom Donor in seinen spektralen Eigenschaften unterscheidet, so kann die Energie strahlungslos von dem Donormolekül auf das Akzeptormolekül übertragen werden. Die Übertragung erfolgt via «long range dipole-dipole interactions». Abbildung 4 A zeigt FRET in einem Jablonski-Diagramms. Die Energieübertragung kann mit einem Gleichgewicht beschrieben werden: (Gleichung 1)



Die Energietransfer-Effizienz (ETp) ist die Anzahl der zum Akzeptor transferierten Photonen, nominiert auf die gesamte Absorption und kann mit einer weiteren Gleichung 2 anhand der Abbildung 4 mit Hilfe von Geschwindigkeitskonstanten beschrieben werden.

$$ETp = \frac{k_T}{k_T + k_F + k_D} = \frac{\text{Energietransferrate}}{\text{Donorabsorption}} \quad (2)$$

und die spektralen Verläufe sind in der Abbildung 4 B erklärt. Bei FRET kommt es zur Verringerung der Intensität im Donor-Emissionsspektrum (roter Pfeil). Der Vorgang wird als «donor quenching» bezeichnet. Donor quenching wird begleitet von einer Steigerung im Emissionsspektrum des Akzeptors (violetter Pfeil). Der Vorgang wird «donor sensitised emission» genannt.

Die Energietransfereffizienz kann über die Fluoreszenzlebensdauer des Donors τ_D , beziehungsweise über den Förster-Radius (R_0) ausgedrückt werden (Abbildung 5 C und Gleichung 3). Somit ist die ETp ein indirektes Maß für die Abstände auf der Zelloberfläche.

$$ETp = \frac{k_T}{k_T + \frac{1}{\tau_D}} = \frac{1}{\left[1 + \left(\frac{R}{R_0} \right)^6 \right]} \quad (3)$$

Der Förster-Radius R_0 ist der Abstand, bei dem genau die Hälfte aller Anregungen des Donors

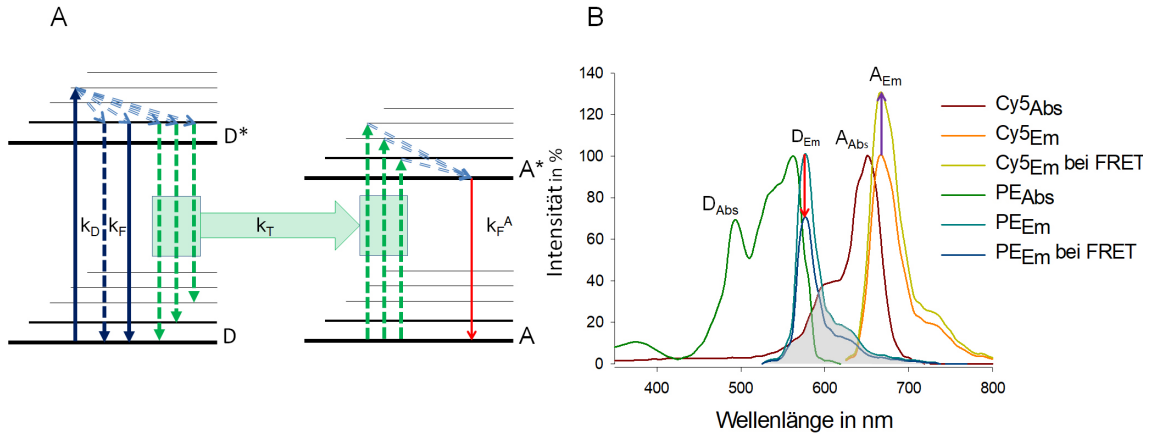


Abbildung 4 Das Prinzip von FRET in Jablonski-Diagramm und auf der Fluorophorebene, modifiziert nach [Szöllösi et al., 2006]

A: D: Donor im nicht-aktivierten Zustand, D*: Donor im aktivierten Zustand, A: Akzeptor im nicht-aktivierten Zustand und A*: Akzeptor im aktivierten Zustand. k_F , beschreibt FRET-wirksame Emissionen vom Donor, k_D beschreibt alle anderen Emissionen im Grundzustand, k_T ist die Geschwindigkeit der Hinreaktion und k_F^A beschreibt die durch FRET entstandene Emission vom Akzeptor. **B:** D_{Abs} , D_{Em} : Emissionsspektren von Donor (PE_{Abs} , PE_{Em}); A_{Abs} , A_{Em} Absorptionsspektrum von Akzeptor ($Cy5_{Abs}$, $Cy5_{Em}$). Die graue Fläche zeigt das spektrale Überlappungsintegral $J(\lambda)$ zwischen der Fluoreszenz des Donors und der Absorption des Akzeptors als Voraussetzung für FRET

auf den Akzeptor übertragen werden. Für jedes Fluorophorenpaar ist R_0 eine spezifische Konstante. Die Berechnung von R_0 ist in der Gleichung 4 gezeigt.

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-24} \Phi_D \kappa^2 \eta^{-4} J(\lambda) \quad (4)$$

R: Abstand zwischen Donor und Akzeptor; R_0 : Förster-Radius; Φ_D ist die Fluoreszenzquantenausbeute; κ^2 : Orientierungsparameter, beschreibt die Anordnung der Übergangsdipolmomente, kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen; η : Refraktionsindex, beschreibt wie das Medium zwischen den Fluorophoren den Energietransfer beeinflusst; $J(\lambda)$: beschreibt die spektrale Überlappung (Überlappintegral)

Die FRET-Übertragung ist richtungsabhängig κ^2 beschreibt die Ausrichtung der Dipole beider Fluorophore im Raum. In Abbildung 5 A ist reometrische Wechselwirkung zwischen dem Donor und dem Akzeptor dargestellt.

$$\kappa^2 = (\cos\Theta_R - 3\cos\Theta_D \cdot \cos\Theta_A) \quad (5)$$

Dabei kann κ^2 im wesentlichen 3 Werte annehmen (Abbildung 5 B). Stehen beide Dipole senkrecht aufeinander, so nimmt κ^2 den Wert von 0 an. Sind die beiden Dipole gleichgerichtet, so nimmt κ^2 den Wert 1 an. Wenn die Fluorophore frei rotieren, so wird statistisch gemittelt und den Wert $2/3$ angenommen.

Somit, um eine möglichst effiziente strahlungsfreie Übertragung der Energie vom Donor auf den

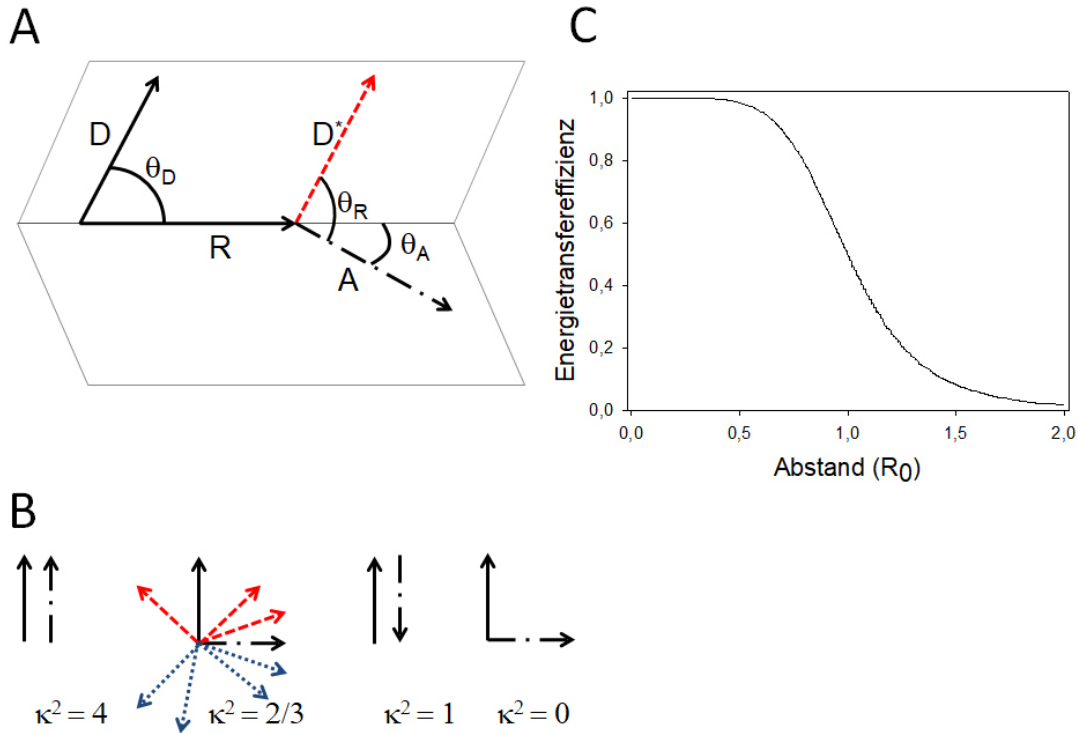


Abbildung 5 Räumliche Abhängigkeit zwischen κ^2 und Förster-Radius modifiziert nach [Szöllösi et al., 1999],[Loura, 2012]

A: Θ_D Winkel zwischen Emission-Dipol des Donors und der gedachten Verbindung zwischen den beiden Fluorophoren, Θ_R Winkel zwischen Emissionsdipol des Donors und dem Absorptionsdipol des Akzeptors, Θ_A Winkel zwischen dem Absorptions-Dipol und der gedachten Verbindung zwischen den beiden Fluorophoren **B:** geometrische Beziehung zwischen zwei Dipolen: κ^2 kann die Werte $0 \leq \kappa^2 \leq 4$ annehmen (in den meisten Fällen wird der Wert von $\kappa^2 = 2/3$ angenommen **C:** Für jedes Fluorophoren Paar existiert ein Förster-Radius, bei dem die Effizienz der Energieübertragung 50% beträgt

Akzeptor über FRET zu ermöglichen, müssen drei wesentlichen Kriterien erfüllt sein [Szöllösi et al., 1987]:

1. Der räumliche Abstand zwischen Donor- und Akzeptor-Farbstoff darf nicht größer als 10 nm sein
2. Das Strahlungsemissionsspektrum des Donorfarbstoffs muss mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptorfarbstoffs überlappen
3. Donor- und Akzeptorfarbstoff sollten möglichst parallele elektronische Schwingungsebenen haben (oder zumindest frei rotieren)

3.2.2 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie ist die automatisierte Messung von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Zellen/Partikeln in Suspension. Die Messung erfolgt in einem Durchflusszytometer.

Die Funktionsweise des Zytometers wird anhand des Durchflusszytometers der FACS Calibur (BD Bioscience, Heidelberg) erklärt. Im Wesentlichen besteht der FACS Calibur aus vier Komponenten: 1. Flüssigkeitssystem, 2. optisches System, 3. Detektionseinheit, 4. Datenverarbeitung. Im hydrodynamischen System werden die Zellen aus dem Probegefäß angesaugt und in einem FACS-Puffer aufgenommen. Die Zellen werden in einem Strom im «Gänsemarsch» dem optischen System (Messküvette) zugeführt. Die s.g. «hydrodynamische Fokussierung» verhindert durch laminare Strömungseigenschaften eine Durchmischung von Probenlösung und Trägerflüssigkeit.

In der Messküvette trifft das Laser-Licht im rechten Winkel auf den Flüssigkeitsstrom. Das analoge Signal wird in einem optischen System aus Umlenkspiegel, Filter und Photodioden aufgenommen, verstärkt und in ein digitales Signal umgewandelt sowie mit elektronischer Datenverarbeitung analysiert. Es werden folgende Signale aufgenommen: 1. Vorwärtsstreulicht (forward light scatter, FSC) in einem Winkel zwischen $1,5$ und $1,0^\circ$ zur Strahlenrichtung des Anregungslasers und 2. Seitwärtsstreulicht (sideward scatter, SSC) im 90° -Winkel. 3. Die Fluoreszenz, gemessen in unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen.

Während FSC die Information über Größe der Zellen liefert, wird im SSC-Streulicht Information über die Granularität gesammelt.

Das Durchflusszytometer FACS Calibur besitzt 2 Laser: Argon-Laser (488 nm) und roten Diodenlaser (~ 635 nm). Die Abbildung 6 zeigt die schematische Anordnung der Spiegel und der Filter im FACSCalibur.

3.2.3 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist eine biochemische und medizinische Analysemethode, bei der Antikörper eingesetzt werden, die mit Fluorophoren markiert sind. Durch die Antikörper-Farbstoff-Kopplung wird die Spezifität des Antikörpers mit der Möglichkeit der Visualisierung durch den Farbstoff kombiniert. Dadurch ist es möglich, *in vivo* spezifische Epitope auf der Zelloberfläche zu visualisieren. Es wird zwischen einer direkten und indirekten Immunfluoreszenz unterschieden.

Während bei der direkten Immunfluoreszenz ein Antikörper bereits an den Farbstoff gekoppelt ist, wird bei der indirekten Immunfluoreszenz das Epitop in einem weiteren Schritt visualisiert. Ein Beispiel dazu ist Biotin-Avidin-System [Schiemann and Busch, 2007].

Mit Hilfe von Immunfluoreszenz kann mittels Durchflusszytometrie auch FRET gemessen werden.

3.2.4 Berechnung der FRET-Effizienz ET_p in der Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrische Berechnung des ET_p zwischen 2 Molekülen auf der Zelloberfläche sind 2 Antikörper notwendig, die gegen das jeweilige Epitop (z.B. CD13 und CD32) gerichtet sind. Dabei muss der eine Antikörper mit einem Donorfarbstoff und der andere mit einem Akzeptorfarbstoff markiert sein. Als Donor wurde Phycoerythrin und als Akzeptor Cyanin 5 verwendet.

Mit Hilfe der Zwei-Laser-Anregung am FACSCalibur wird mit dem Argon-Laser bei 488 nm selektiv der Donorfarbstoff (PE) und mit einem roten Laser bei 635 nm der Akzeptorfarbstoff (Cy5) an-

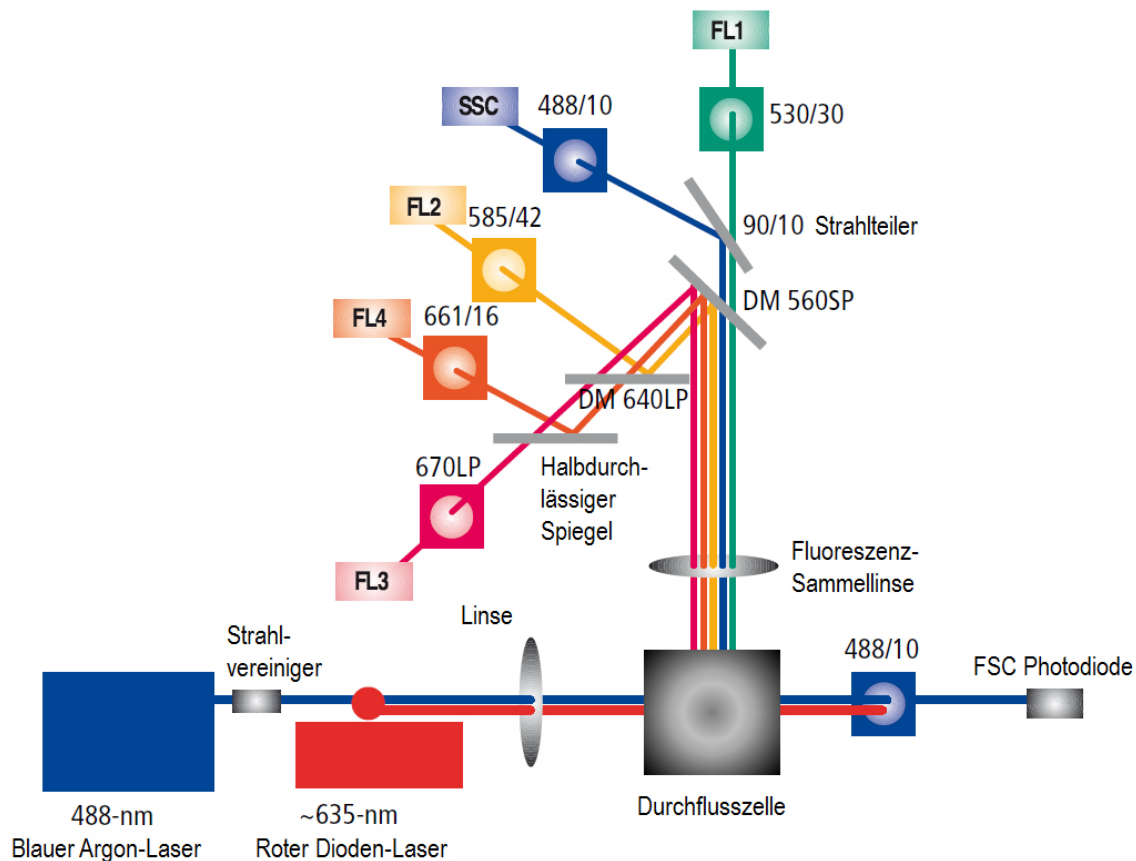


Abbildung 6 Schematischer Aufbau des Gerätes FACSCalibur [Becton and Company, 2007]

Schematische Darstellung des optischen Systems des Durchflusszytometers FACSCalibur. DM: dichroischer Spiegel, LP: Langpassfilter, SP: Kurzpassfilter; FL1-FL4: Detektoren für Fluoreszenzkanäle 1-4, SSC: Detektor für sideward scatter light und FSC: Photodiode für Forward Scatter. Für die Bandpassfilter ist die maximale Transmission und die Hälfte der Bandbreite angegeben

geregt. Die Emissionsspektren werden in den entsprechenden Kanälen detektiert. Dabei wird für jede Zelle ein Datensatz in allen Fluoreszenzkanälen (FL1-FL4) aufgenommen (siehe auch Kapitel 3.2.7). Um FRET mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu messen, sind mindestens vier Proben notwendig:

1. ungefärbte Probe, die als Autofluoreszenz bezeichnet wird
2. Donor-only-Probe in der die Zellen nur mit dem Donor-Farbstoff (PE) markiert werden
3. Akzeptor-only-Probe: Die Zellen werden nur mit Akzeptor-Farbstoff markiert (Cy5) und
4. Doppelfärbung (FRET) in der die Zellen sowohl mit PE als auch mit Cy5 markiert werden

Die Methode der durchflusszytometrischen FRET-Messung wurde bei Frau Dr. Pfeiffer, Universität Regensburg, Institut für klinische Chemie und Labormedizin erlernt und verwendet eine Kombination aus direkter und indirekter Immunfluoreszenz. Dabei wird der Antikörper gegen das 1. Epitop direkt mit dem Donorfarbstoff (PE) markiert. Der 2. Antikörper gegen das 2. Epitop wird biotinyliert hinzugegeben und erst im zweiten Schritt an den Akzeptor-Farbstoff (Cy5)

via Biotin-Streptavidin-Bindung gekoppelt. Siehe auch (Kapitel 3.2.3). In der Tabelle 8 ist ein Färbeschema gezeigt. Die Vorteile der indirekten Immunfluoreszenz liegen in der Minimierung der sterischen Wechselwirkungen zwischen 1. und 2. Antikörper bei Epitopbesetzung.

3.2.5 Versuchsanordnung

Für die Untersuchung der Kolo-kalisation von CD13, CD10 und CD26 mit anderen Membranmolekülen wurden am Tag der FRET-Analysen ca. 5×10^6 zu untersuchenden Zellen geerntet und $2 \times$ in 0,5 %-iger PBS/BSA-Lösung gewaschen. Bei Stimulationsversuchen werden die Zellen zuvor stimuliert wie in dem Kapittel 3.2.6 erklärt ist.

Der geplante Ansatz wurde durchgeführt wie in der Tabelle 8 beschrieben.

Um unspezifische Bindung zu vermeiden, wurde jede Probe mit $1 \mu\text{l}$ polyklonalem humanem IgG (Stammlösung $1 \text{ mg}/1 \mu\text{l}$) für 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben entsprechend der in Tabelle 8 dargestellten Reihenfolge gefärbt.

Tabelle 8 Versuchsanordnung für die FACS-Färbungen

Die Probennummern in den Klammern bedeuten die Nummern der Proben nach Teilung. Siehe auch Kapitel 3.2.4. Die Menge der Zellsuspension ist in μl angegeben. Maximal wurde 10^6 Zellen/ml angesetzt

Proben-nummer	Donor-Antikörper	Akzeptor-Antikörper	Menge Zellen in μl	Cy5 in μl	Bezeichnung
1 (9)	CD13 PE	CD13 b	100	-	Donor-only
2 (10)	CD32 PE	CD13 b	100	-	Donor-only
3 (11)	CD64 PE	CD13 b	100	-	Donor-only
4 (12)	CD33 PE	CD13 b	100	-	Donor-only
5		CD13 b	50	5	Akzeptor-only
7	IgG-PE		50	-	Isotypkontrolle
8			50	-	Autofluoreszenz
Teilung der Proben 1-4 in 9-12					
9	CD13 PE	CD13 b	50	5	Doppelfärbung
10	C32 PE	CD13 b	50	5	Doppelfärbung
11	CD64 PE	CD13 b	50	5	Doppelfärbung
12	CD33 PE	CD13 b	50	5	Doppelfärbung

Die Antikörper wurden in zuvor ermittelten Sättigungskonzentrationen (Daten nicht gezeigt) durchgeführt.

Nach Färben wurden die Proben 1-8 gemischt und bei 0°C für 40 min unter Lichtausschluss inkubiert. Vor der Teilung wurden die Proben erneut gemischt. Im Anschluss erfolgte die Teilung der Proben 1-4 in die 9-10, wie in der Tabelle 8 gezeigt.

Nach Teilung wurden die Zellen bei 4°C in 0,5 %-iger BSA/PBS-Lösung gewaschen. Die Proben 5-6 und 9-12 wurden mit je $5 \mu\text{l}$ Cy5-SA (Endverdünnung in der Probe 1:20) inkubiert.

Nach 30 minütiger Inkubation bei 0°C wurden die Proben wieder $2 \times$ bei 4°C in 0,5 %-iger BSA/PBS-Lösung gewaschen und in 0,2-0,4 ml PBS aufgenommen. Im Anschluss wurden die Proben im Durchflusszytometer FACS Calibur bei folgenden Einstellungen gemessen:

3 Material und Methoden

- FSC und SSC im linearen Modus
- Fluoreszenz-Kanäle FL2-FL4 im logarithmischen Modus
- Pro Ansatz wurden mindestens 5.000 Zellen des gewählten Zelltyps gemessen

3.2.6 Stimulationsansätze

Stimulation mit LPS: Am Tag der Stimulationenversuche mit anschließender FRET-Messung wurden 5×10^6 Zellen geerntet und $2 \times$ in PBS gewaschen und für 15 min mit 40 ng/ml LPS bei RT inkubiert und weiter verarbeitet, wie in der Tabelle 8 dargestellt.

Stimulation mit Substanz P: Es wurden 5×10^6 Zellen geerntet und für 48 Stunden mit 20 $\mu\text{g/ml}$ der Substanz P bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen $2 \times$ in PBS gewaschen und weiter verarbeitet, wie in der Tabelle 8 dargestellt.

Stimulation mit IL-4: Es wurden 5×10^6 Zellen geerntet und für 2 Tage in Kultur mit 40 ng/ml IL-4. Im Anschluss werden die Zellen $2 \times$ in PBS gewaschen und weiter verarbeitet, wie in der Tabelle 8 dargestellt.

Stimulation mit TPA: Es wurden 5×10^6 Zellen geerntet und für 2 Tage in Kultur mit 10^{-7} mol/l TPA bei RT inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen $2 \times$ in PBS gewaschen und weiter verarbeitet, wie in der Tabelle 8 dargestellt.

3.2.7 Datenaufnahme

Die Messung wurde im Datenfile FSC 2.0, Flow Cytometry Standard 2.0 gespeichert. Dabei wurden folgenden Parameter aufgenommen: FSC, SSC, FL1-FL4. Die gesammelten Datensätze wurden mithilfe der Standardsoftware (CellQuest, BD Bioscience, San Jose, CA, USA) analysiert.

3.2.8 Datendarstellung und Datenverarbeitung

Zur Identifizierung der Zellpopulation werden die Parameter Größe (FSC) und Granularität (SSC) in einem zweidimensionalen Diagramm, einem *Dot-* oder *Density-Plot* graphisch dargestellt (Abbildung 7 A). Diese Darstellung ermöglicht, eine Population der vitalen Zellen von den Zelltrümmern zu trennen. Das Verfahren wird als «Gating» bezeichnet. Dabei wird rechnerisch ein Bereich eingegrenzt, aus dem die Information weiterverarbeitet werden soll (Vergleich Abbildung 7 B und C). Aus dem Gate ist es möglich, deskriptive statistische Daten zu jedem gemessenen Parameter zu generieren.

In einer weiteren *Dot-Plot-Darstellung* wird das Anfärben der Zellen mit Farbstoff-markierten Antikörpern dargestellt, z. B. FL2 für PE (Vergleich Abbildung 4 B). Die Fluoreszenzintensität eines Farbstoffes wird auf der Ordinate gegen das SSC-Signal auf der Abszisse aufgetragen. Mit dieser Darstellung lassen sich die Zellpopulationen anhand des Färbeverhaltens als indirektes Maß für die Expression spezifisch gefärbter Moleküle auf der Zelloberfläche darstellen.

Eine weitere Form der Datendarstellung ist ein Histogramm. Dabei wird die Information von einem der gemessenen Parameter gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen. (Abbildung 8). Mithilfe von Gating können die Subpopulationen eingegrenzt und deskriptiv statistisch verarbeitet werden.

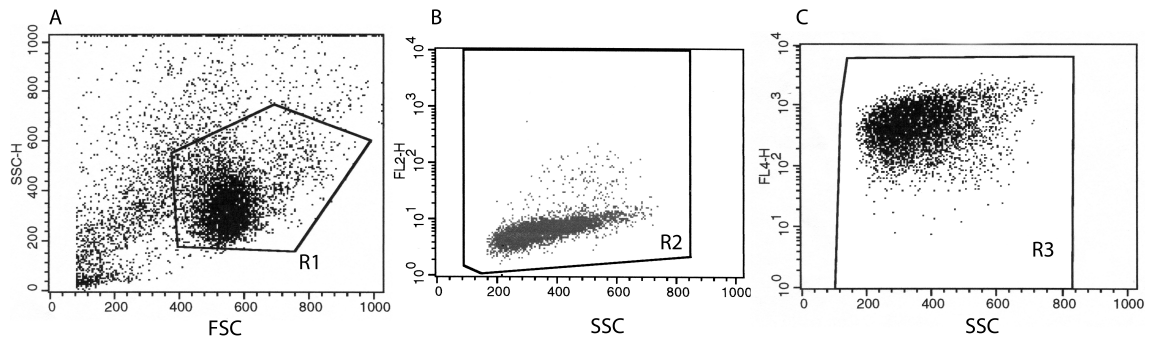


Abbildung 7 Auswertung mittels Zweiparameteranalyse (Dot-Plot)

Graphische Darstellung der Zelllinie THP-1 in einem A: FSC/SSC-Dot-Plot, B: FL2/SSC-Dot-Plot, C: FL4/SSC-Dot-Plot; Gating ist durch das Anlegen der Bereiche R1-3 dargestellt

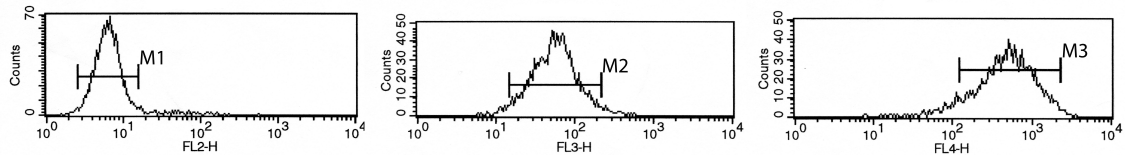


Abbildung 8 Auswertung mittels Einparameteranalyse (Histogramm)

Graphische Darstellung in einem Histogramm; M1, M2 und M3 sind eindimensionale Gates

Gleichung 7 beschreibt die Korrektur der spektralen Überlappung zwischen FL2 und FL3 und die Gleichung 8 die Korrektur der Überlappung zwischen FL3 und FL4.

$$ETp = \frac{\frac{FL3(D,A)-FL2(D,A)}{a} - \frac{FL4(D,A)}{b}}{FL3(D,A)} \quad (6)$$

$$a = \frac{FL2(A)}{FL3(A)} \quad (7)$$

$$b = \frac{FL4(D)}{FL3(D)} \quad (8)$$

ETp: Energietransfereffizienz, FL2: Fluoreszenzkanal 2 (488 → 585 nm), FL3: Fluoreszenzkanal 3 (570 → 580 nm), FL4: Fluoreszenzkanal 4 (633 → 670 nm); D: Donor, A: Akzeptor [Pfeiffer et al., 2001]

Die Messungen wurden mit Hilfe der Standardsoftware CellQuest durchgeführt. Die Mean-Werte der gemessenen Datensätze wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel unter Verwendung der Formeln 6, 7 und 8 eingegeben. Für jedes FRET-Paar wurde der ETp-Wert bestimmt.

3.3 Methode II: Koimmunopräzipitation

Um die mittels Durchflusszytometrie beobachtete Kolokalisation mit einer zweiten Methode zu verifizieren, wurde Koimmunopräzipitation verwendet.

Bei dieser Methode werden die Zellen zerstört (lysiert) und in Lösung aufgenommen. Die Lösung wird mit dem primären Antikörper, einem polyklonalen Antikörper, z. B. gegen CD13, inkubiert. Durch die Kopplung an Protein G-Sepharose kann das Protein aus der Lösung spezifisch isoliert (präzipitiert) werden. Nach Abtrennung von anderen Zellbestandteilen werden die Proteinkomplexe in ihre Fragmente zerlegt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western Blot wird anschließend mit spezifischen Antikörpern der Bindungspartner, z. B. CD32 oder CD64, detektiert.

3.3.1 Vorbereitung der Zellen

Pro Ansatz wurden 10^7 THP-1 Zellen pelletiert und in PBS bei 4°C gewaschen, anschließend in 400 µl RIPA-Puffer lysiert. Zum Schutz des Lysates vor Proteolyse und Phosphorylierung wurden je 10 µl Protease- und Phosphataseinhibitoren verwendet.

- Kopplung des primären Antikörpers an Protein-G-Sepharose

Parallel wurde der Primärantikörper an Protein-G-Sepharose (Amersham pharmacia biotech) gebunden. Dafür wurden für 4 Ansätze 300 µl Protein G-Sepharose entnommen und bei 4°C für 20 s pelletiert und anschließend 4 × in RIPA-Puffer gewaschen und in 1200 µl PBS aufgenommen. Je 300 µl Anti-Maus-IgG-Sepharose wurde in 4 × 2 ml Eppendorf-Tubes überführt. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4 dargestellt.

- Inkubation des Zelllysates mit dem an Protein-G-Sepharose gekoppelten Antikörper

Die Ansätze wurden über Nacht bei 4°C in einem Reaktionsgefäß rotiert. Anschließend wurde 3 × in PBS bei 4°C gewaschen und in je 200 µl PBS aufgenommen. Zu den Ansätzen (Tabelle 4) wurde je 100 µl Zelllysate hinzugefügt und bei 4°C 2 Stunden in einem Greiner-Röhrchen rotiert. Dann wurden die an die Beads gebundenen Antikörper mit dem THP1-Lysat inkubiert und so das spezifische Protein gebunden.

- Elution

Die pelletierte Sepharose wurde in 40 µl SDS-Puffer und 4 µl DTT aufgenommen und bei 95°C erhitzt, dabei wurde das Protein von der Sepharose abgelöst. Die präzipitierten Proben, sowie der Waschüberstand wurden auf ein 10% -iges Tris-Glycin-Gel aufgetragen und im SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot untersucht.

- Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Proteinmenge wurde nach der Biuret-Methode durchgeführt. Dabei werden Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung durch die Proteine zu Cu^+ -Ionen reduziert. Die reduzierten Cu^+ -Ionen bilden mit der Bicinchonininsäure einen violetten Farbkomplex [Smith et al., 1985].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proteinkonzentrationen mit dem BCA Protein Assay Kit

(Merck Chemicals Ltd., Nottingham, U.K) bestimmt. Anhand eines mitgemessenen BSA-Standards konnte die Proteinkonzentration mittels linearer Regression bestimmt werden. Die Messungen wurden bei 562 nm in einem Specol-Spektrometer durchgeführt.

3.3.2 SDS-PAGE

Die Elektrophorese dient zur Trennung von Proteinen auf der Grundlage ihrer Wanderung in einem elektrischen Feld. Bei der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) werden die Proteinproben auf eine hochvernetzte Gelmatrix aus Polyacrylamid gegeben, an die anschließend ein elektrisches Feld gelegt wird.

Die Matrix wird durch Pufferung auf einen schwach alkalischen pH-Wert eingestellt, so dass die meisten Proteine in einer anionischer Form vorliegen und zur Anode wandern.

Die Gelmatrix bremst die wandernden Proteine auf der Basis ihrer Ladung. Die Ladung ist proportional zur Größe des Proteins. Eine Modifikation der Elektrophorese-Technik verwendet die negativ geladenen Anionen des Detergens Natriumdodecylsulfat, um die natürlichen Ladung der Proteine zu maskieren, so dass die Trennung nur noch aufgrund der Masse der Proteine erfolgt. Bei der SDS-PAGE wird das Detergens sowohl dem Polyacrylamidgel als auch den Proteinproben hinzugefügt. Zu den Proteinproben wird außerdem ein Reduktionsmittel gegeben, um alle Disulfidbindungen zu reduzieren. Alle SDS-Protein-Komplexe sind stark negativ geladen und wandern zur Anode, dabei ist ihre Wanderungsgeschwindigkeit durch das Gel umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Masse. Da größere Proteine beim Durchwandern der netzartigen Struktur des Gels einen größeren Widerstand überwinden müssen, wandern sie langsamer als die SDS-Komplexe kleinerer Proteine [Laemmli, 1970].

Die Elektrophorese wurde in vertikalen Elektrophorese-Kammern durchgeführt. Je nach Größe der Proteine wurden Trenngel mit Acrylamid-Konzentrationen zwischen 7 % und 12 % eingesetzt. Es wurden Tris-Glycin-Gele und Tris-Acetat-Gele der Firma NuPAGE (Invitrogen) verwendet. Die Tris Glycin-Gele wurden auch gegossen [Sambrook and Russell, 2001]. Die Elektrophorese erfolgte dann mit der elektrischen Spannung von 150 V konstant über 1 Stunde und bis die Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hatte. Ein Gel besteht aus einem Sammel- und Trenngel. Die selbst gegossenen Gele wurden mit unterschiedlichem Acrylamidgehalt (Sammelgel 4%, Trenngel 7-12 %) verwendet.

Zum Abschätzen der Molekulargewichtsgröße wurden Molekulargewichtsmarker (Firma Sigma) verwendet.

Der Erfolg der Elektrophorese wurde mittels Coomassie-Färbung beurteilt. Coomassie Brillant Blau bindet nicht spezifisch die Proteine innerhalb der Gelmatrix. Die Proteine werden als blauen Banden im durchsichtigen Gel visualisiert [Wilson, 1983]. Weitere Analyse erfolgt im Western Blot.

3.3.3 Western Blot

Western Blot, auch Immunoblot genannt, dient der Darstellung und Detektion gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine nach Übertragung auf eine geeignete Trägermembran mit Hilfe immunologischer Methoden.

Als Trägermembran dient eine Nitrozellulose-Membran [Towbin et al., 1979]. Ein wesentlicher

Vorteil dieser Methode besteht darin, dass das gesuchte Protein nicht in einem Gel verteilt, sondern auf der Oberfläche einer Membran konzentriert ist und somit wesentlich leichter detektiert werden kann.

Die Methode besteht aus mehreren Schritten:

- Übertragen der aufgetrennten Proteine auf eine Membran
- Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen der Membran
- Inkubation der Membran mit spezifischen Antikörpern
- Detektion des gebundenen Antikörpers

Das Übertragen der aufgetrennten Proteine wurde im elektrischen Feld (elektrophoretische Elution) mittels «semi-dry»-Methode durchgeführt. Das Sammelgel des Polyacrylamidgels wurde vom Trenngel abgetrennt und in eine semidry-Blot-Kammer eingebracht.

Auf die Anode wurden jeweils drei Lagen Whatman Papier gelegt, die zuvor in die der Anodenlösung I und II getränkt waren. Im Anschluss wird das Blotmembran aus Nitrozellulose gelegt, diese wurde zuvor in der Anodenlösung II getränkt. Das Trenngel wird auf das Blotmembran gelegt, gefolgt von 3 Lagen Whatman-Papier getränkt in der Kathodenlösung. Die Schichten werden luftblasen-frei gelegt. Die Zusammensetzung der Lösugen ist in der Tabelle 6 gezeigt. Die Kammer wird mit einem Deckel verschlossen, der eine Kathode im elektrischen Feld darstellt. Die Elektrophorese erfolgte für eine Stunde bei RT mit einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Gelfläche. Das Ergebnis der Übertragung wurde durch Ponceau-S-Färbung visualisiert und dokumentiert. Der Molekulargewichtsmarker wurde nachgezeichnet.

- Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen der Membran

Die Membran wurde nach Transfer über Nacht in einer Milchpulverlösung blockiert.

- Inkubation der Membran mit spezifischen Antikörpern

Am nächsten Tag wurde die Membran in 5 ml eines 5% Milch-TBST-Puffer überführt und der primäre monoklonale Antikörper anti-CD13 (Wistar) in 1:500 Endkonzentration für 1,5 Stunden bei RT rotiert. Im Anschluss wird die Membran 3 x in TBST-Lösung gewaschen.

- Detektion des gebundenen Antikörpers

Die Detektion geschieht im indirekten Nachweis. Dabei wird der gebundene spezifische Primäranantikörper mit einem Sekundäranantikörper nachgewiesen. Der Zweitantikörper ist ein Anti-Maus-Antikörper, markiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP). Nach Zugabe des Substrates (Amersham, ECL Prime) kommt es zur Chemilumineszenz. Die Membran wird mit einem 1:1000 in Milch verdünnten anti-Maus-Meerrettich-Peroxidase-Antikörper für 1,5 Stunden inkubiert. Nach 3 Waschschritten von je 5 min bei RT im TBST-Lösung wurde die Membran im vierten Waschschriff in TBS-Lösung gewaschen. Nach Zugabe von Substrat (Amersham) wurde die Membran in eine Folie luftdicht eingeschweißt und nach einer Minute Wirkdauer des Substrates auf einen Planfilm (Kodak, BioMax) in der Dunkelkammer zwischen 3-60 Minuten exponiert. Der Planfilm wurde in einem Entwickler (Ilford) entwickelt in einem Fixierer (Ilford) fixiert.

Nach Trocknen wurden die Planfilme ausgewertet.

- Stripping und erneute Detektion

Stripping und erneute Detektion mit dem primären Antikörper: Die Nitrozellulose-Membran wird im Anschluss bei 50° C in einem Strippuffer gewaschen. Dabei werden alle gebrauchten Antikörper entfernt, sodass erneut mit einem Primärantikörper markiert werden kann. Nach 3 Waschschritten in 5 ml TBST-Puffer für je 5 min bei RT wurde die Membran mit dem Anti-CD32-Antikörper Klon C17 (Santa Cruz, Heidelberg, Ziege) in Verdünnung 1:500 inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein Anti-Ziege-HRP (Amersham) in der Verdünnung 1:1000 verwendet. Die weiteren Waschschrritte sowie Detektion und Auswertung wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Positivkontrolle

Eine Positivkontrolle ermöglicht eine Prüfung der Richtigkeit der FRET-Messung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Positivkontrolle etabliert, die strukturelle Eigenschaften von APN als Homodimer sowie von MHC-I als ein Membranprotein bestehend aus einer schweren und leichten Kette (β 2-Mikroglobulin) ausnutzt.

4.1.1 FRET zwischen APN-Monomeren

Zwischen 2 Monomeren eines Homodimers setzt man eine enge räumliche Beziehung voraus, deswegen wurde eine hohe Energietransfereffizienz zwischen 2 APN-Monomeren erwartet. Hierzu wurden die Zellen, die APN exprimieren mit jeweils mit 2 mAb markiert, die gegen das gleiche Epitop (gleicher Clon) gerichtet sind. Der erste Antikörper ist mit Phycoerythrin, einem Donor-Farbstoff markiert, und der zweite Antikörper mit Cy5, einem Akzeptor-Farbstoff markiert. Auf diese Weise kann FRET zwischen 2 Monomeren gemessen werden.

Die Ergebnisse der Versuche sind in der Tabelle 9 dargestellt. Die FRET-Effizienzen waren auf allen gemessenen Zellen vergleichbar hoch und lagen zwischen 42,1 und 57,1 %.

4.1.2 FRET zwischen β 2-Mikroglobulin und der schweren Kette der MHC-Klasse-I-Molekülen

Die FRET-Effizienz zwischen HC-MHC-Klasse-I-Moleküls und dem β 2-Mi wurde als Positivkontrolle bei den Zellen verwendet, wo CD13 nicht exprimiert wird.

In der Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Positivkontrollen auf verschiedenen Zellen dargestellt.

Tabelle 9 FRET-Positivkontrolle

Positivkontrolle der FRET-Effizienz zwischen zwei APN-Monomeren bzw. zwischen β 2-Mi und der HC MHC-Klasse-I-Moleküle. In der Tabelle sind Zellen, Donor und Akzeptor; Mean-Werte der Fluoreszenzintensitäten von Donor und Akzeptor, Energietransfereffizienz ETp mit \pm (SD) Standardabweichung und Anzahl der Versuche n dargestellt. ¹Es wurden mit CD13 transfizierte Jurkat-Zellen verwendet

Zellen	Donor	Akzeptor	Donor-Mean	Akzeptor-Mean	ETp in %	n
PBMo	CD13 PE	CD13 b	519 \pm 280	730 \pm 490	57,1 \pm 7,1	5
PM	CD13 PE	CD13 b	601 \pm 652	657 \pm 522	47,8 \pm 20,8	3
THP-1	CD13 PE	CD13 b	856 \pm 270	638 \pm 155	61,0 \pm 5,2	6
U937	CD13 PE	CD13 b	318 \pm 174	140 \pm 52	52,8 \pm 10,6	6
Jurkat ¹	CD13 PE	CD13 b	400 \pm 128	296 \pm 31	38,7 \pm 8	3
PM	β 2-Mi PE	MHC-I b	1154 \pm 149	2275 \pm 83	27,6 \pm 1,9	2
U937	β 2-Mi PE	MHC-I b	321 \pm 79	981 \pm 230	18,4 \pm 2,1	5
Raji	β 2-Mi PE	MHC-I b	1014 \pm 127	1083 \pm 153	18,6 \pm 1,0	2

Der Wert der Positivkontrolle zwischen $\beta 2$ -Mi und der HC MHC-Klasse-I-Moleküle ist im Allgemeinen geringer, als der Wert zwischen zwei APN-Monomeren. Es liegt zwischen 18,4 und 27,6%.

4.2 Negativkontrolle

Um die Spezifität der Messungen zu verbessern ist eine Negativkontrolle notwendig. In der Arbeit von [Pérez-Oliva et al., 2011] wurde CD33 als «nonraft-Marker» beschrieben.

FRET zwischen APN und CD33 wurde gemessen (Tabelle 10). Der ETp-Wert wurde als Negativkontrolle verwendet. Die Expression von CD33 war auf PM-Zellen am höchsten, gefolgt von PBMo.

Tabelle 10 FRET-Negativkontrolle

Negativkontrolle der FRET-Effizienz gemessen zwischen CD13 und CD33 auf PBMo, PM und der Zelllinie THP-1. In der Tabelle sind Zellen, Donor und Akzeptor; Mean-Werte der Fluoreszenzintensitäten von Donor und Akzeptor, Energietransfereffizienz ETp mit \pm (SD) Standardabweichung und Anzahl der Versuche n dargestellt

Zellen	Donor	Akzeptor	Donor-Mean	Akzeptor-Mean	ETp in %	n
PBMo	CD33 PE	CD13 b	703 \pm 731	1012 \pm 403	6,0 \pm 2,0	6
PM	CD33 PE	CD13 b	823 \pm 156	602 \pm 250	4,9 \pm 0,75	3
THP-1	CD33 PE	CD13 b	213 \pm 35	728 \pm 81	6,3 \pm 0,6	4

Die Expression auf der monozytären Zelllinie THP-1 war deutlich niedriger als die auf PM-Zellen. Die Expression von CD13 war auf PBMo am höchsten, gefolgt von THP-1 Zellen. Die Werte der FRET-Effizienz waren vergleichbar niedrig und lagen zwischen 4,9 und 6,3%. Deswegen wurde der ETp-Wert von 6,3% als cut-off-Wert für die Energietransfereffizienz angenommen. Um die Sensitivität der Messung zu erhöhen wurde der cut-off-Wert durch uns auf $> 10\%$ gesetzt.

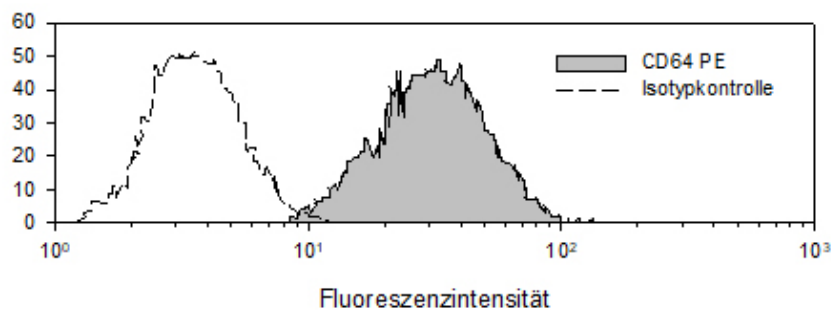
4.3 Kolokalisation von CD13/APN mit CD32/Fc γ -Rezeptor II und CD64/Fc γ -Rezeptor I

Die Experimente sollen zeigen, ob Fc γ -Rezeptor-I und -II eine enge räumliche Nähe mit CD13 als Voraussetzung für eine Signaltransduktion eingehen. Die Experimente wurden mit myeloischen Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 11 gezeigt. Die Expression von CD13 war auf PM-Zellen am höchsten. Die Zelllinien THP-1 und U937 exprimierten vergleichsweise wenig CD64. In der Abbildung 9 ist gezeigt, dass die Fluoreszenzintensität von CD64 signifikant von der Isotypkontrolle zu trennen ist (T-Test für 2 unabhängige Stichproben; $p=0,0069$). Die FRET-Effizienz zwischen CD32 und CD13 war auf peripheren Blutmonozyten am höchsten. Die FRET-Effizienz zwischen CD64 und CD13 war auf U937-Zellen höher als auf peripheren Blutmonozyten, gefolgt von PM und THP-1-Zellen.

Tabelle II Kolokalisation zwischen CD32 und CD64 mit APN

Die Tabelle zeigt Fluoreszenzintensität von CD13 und CD32; \pm SD ist Standardabweichung des Mittelwertes, ETp ist die Energietransfereffizienz in %, n ist die Anzahl der Versuche. Als Positivkontrolle dient ETp-Wert zwischen CD13 und CD13

Zellen	Donor	Akzeptor	Donor- Mean	Akzeptor-Mean	ETp in %	n
PBMo	CD32 PE	CD13 b	1619 \pm 1251	1328 \pm 783	26,6 \pm 16,0	6
PM	CD32 PE	CD13 b	2259 \pm 634	657 \pm 310	15,9 \pm 8,6	5
THP-1	CD32 PE	CD13 b	390 \pm 289	598 \pm 96	17,4 \pm 5,3	8
U937	CD32 PE	CD13 b	561 \pm 460	171 \pm 84	15,2 \pm 7,6	5
PBMo	CD64 PE	CD13 b	1219 \pm 69	1920 \pm 658	18,04 \pm 3,7	4
PM	CD64 PE	CD13 b	840 \pm 486	827 \pm 504	14,2 \pm 8,7	3
THP-1	CD64 PE	CD13 b	190 \pm 89	570 \pm 30	13,0 \pm 1,8	6
U937	CD64 PE	CD13 b	63 \pm 4	270 \pm 341	34,7 \pm 13,1	5

**Abbildung 9** Fluoreszenzintensität von CD64 auf U937-Zellen

Histogramm-Darstellung der Fluoreszenzintensitäten im Fluoreszenzkanal 2 von Isotypkontrolle (Mean-Wert 4) und CD64 (Mean-Wert 69)

4.3.1 Koimmunpräzipitation zwischen APN/CD13 und Fc γ -Rezeptor II/CD32 und Fc γ -Rezeptor I/CD64

Die in den durchflusszytometrischen Versuchen gezeigte Nähe zwischen CD32 und CD64 mit CD13 sollte nun in einer zweiten Methode überprüft werden. Dazu wurde Koimmunpräzipitation verwendet. Wegen der guten Expression von CD13, CD32 und CD64 sowie hohen Werten der FRET-Effizienz auf THP-1-Zellen wurden für die Experimente THP-1-Zellen verwendet.

Die Ergebnisse der Koimmunpräzipitation zwischen APN und Fc γ -Rezeptor II sind in der Abbildung 10 dargestellt. Die Versuche, CD64 auf THP-1-Zellen und auf U937-Zellen zu präzipitieren schlugen fehl. Die Präzipitation von CD13 mit polyklonalem Antikörper auf THP-1-Zellen gelang zwar, jedoch konnte auf den Präzipitaten CD64 weder mit einem polyklonalen Antikörper (CD64 N-19, Santa Cruz) noch mit einem monoklonalen Ak (CD64 10.01, Dianova und Dako) detektiert werden.

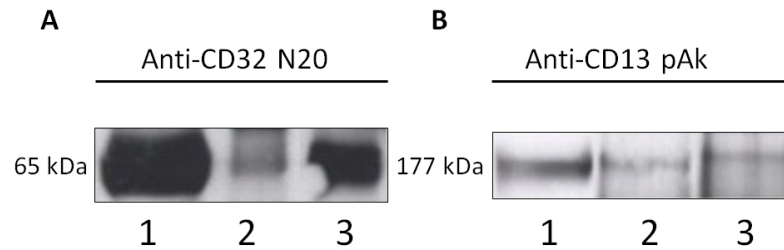


Abbildung 10 Koimmunpräzipitation von CD32 und CD13 auf THP-1-Zellen

A: Es wurde mit einem Anti-CD32 N20 Antikörper präzipitiert. Die erste Linie zeigt das Präzipitat von Zellysat bei 65 kDa. Die 2. Linie zeigt Detektion mit einem Anti-CD13 3D8 Antikörper. Hier zeigt sich die Bande bei 65 kDa als Ausdruck der Ko-IP zwischen CD13 und CD32. Die 3. Linie zeigt Positivkontrolle mit Anti-CD32 C17 Antikörper. **B:** Es wurde mit einem Anti-CD13 Antikörper präzipitiert. Die erste Linie zeigt die Menge des präzipitierten Zellysates bei 177 kDa. Die 2. Linie zeigt Detektion mit einem Anti-CD13 3D8 Antikörper, als Positivkontrolle. Die 3. Linie zeigt Detektion mit einem Anti CD32 C-17-Antikörper. Hier zeigt sich eine Bande bei 177 kDa als Ausdruck der Ko-IP zwischen CD13 und CD32.

4.3.2 Stimulation von THP-1-Zellen mit LPS

LPS (Lipopolysaccharid) ist ein Protein der Zellwand der Gram-negativen Bakterien. Monozyten werden durch LPS aktiviert. Der Hauptaktivierungsweg verläuft über einen mit CD14-gekoppelten Mustererkennungsrezeptor. Nach Bindung von LPS an den membranständigen CD14-Rezeptor wird eine über NF- κ B vermittelte Signaltransduktion in Gang gesetzt, die zur Transkription und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-1 und TNF- α führt [Beutler and Rietchel, 2003].

Die Stimulation mit LPS sollte zeigen, ob die Abstände zwischen APN und Fc γ -Rezeptor I sowie zwischen APN und Fc γ -Rezeptor-II dadurch beeinflusst werden. Zudem soll untersucht werden, ob die Stimulation mit LPS einen Einfluss auf die Expression von APN, Fc γ -Rezeptor I und II hat. Auch dieses Experiment wurde mit THP-1-Zellen durchgeführt. Da die LPS-vermittelte Reaktion über den CD14-Rezeptor erfolgt, ist die Expression von CD14 auf THP-1-Zellen entscheidend. Die Expression von CD14 ist in der Abbildung 11 dargestellt. Sie ist signifikant von der Isotypkontrolle zu trennen (T-Test für 2 unabhängige Stichproben; $p=0,0026$) In der Abbildung 12 ist die Expression von CD13, CD32 und CD64 sowie die FRET-Effizienz zwischen CD32 und CD13 sowie zwischen CD64 und CD13 dargestellt. Als Positivkontrolle wurde FRET zwischen 2 APN-Monomeren gemessen. Die Expression von CD32 sinkt signifikant nach Stimulation mit LPS, während die Expression der CD13 und von CD64 in etwa gleich bleiben. Die Unterschiede der Expression sind nicht signifikant (n.s.) und korrelieren nicht mit den räumlichen Abständen auf der Zelloberfläche, so bleiben die FRET-Effizienzen zwischen APN und Fc-Rezeptoren vor und nach der Stimulation mit LPS in etwa gleich

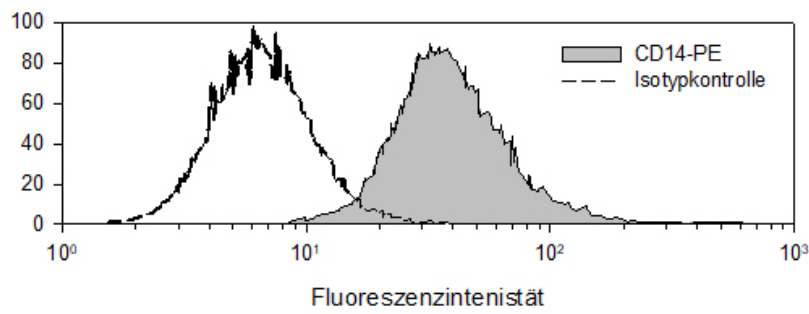


Abbildung 11 Fluoreszenzintensität von CD14 auf THP-1-Zellen

Histogramm-Darstellung der Fluoreszenzintensitäten im Fluoreszenzkanal 2 von Isotypkontrolle (Mean-Wert 9) und CD14 (Mean-Wert 65)

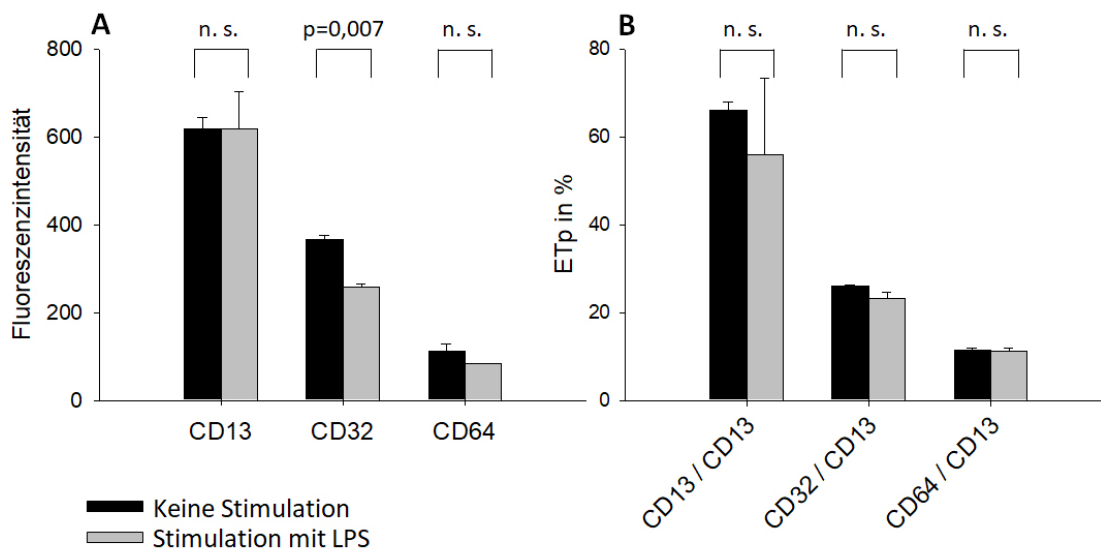


Abbildung 12 Stimulation von THP-1-Zellen mit LPS

A: Fluoreszenzintensität als Mittelwert \pm SD von CD32, CD64 und CD13; **B:** ETp als Mittelwert \pm SD zwischen CD13 und CD13, CD32 und CD13 sowie zwischen CD64 und CD13; n=3

4.3.3 Stimulation von THP-1-Zellen mit Substanz P

Substanz P steht in direktem Bezug zu den untersuchten Metallopeptidasen. Sie ist ein Substrat der DPPIV und der NEP und hemmt in geringen Konzentrationen die Aktivität von APN [Xu et al., 1995]. Die Experimente sollten zeigen, ob Substanz P einen Einfluss auf die Expression von APN und/oder Fc γ -Rezeptor-I und / oder -II hat, und ob Substanz P eine Veränderung der räumlichen Beziehung zwischen APN und Fc γ -Rezeptor-I und -II verursachen kann. Die Stimulationsversuche wurden mit THP-1-Zellen durchgeführt. In der Abbildung 13 sind die Ergebnisse der Stimulation mit Substanz P auf THP-1-Zellen gezeigt. Durch die Stimulation mit Substanz P lässt sich keine sichere Veränderung der Expression von CD13, CD32 und CD64 feststellen. In der FRET-Messung findet sich erwartungsgemäß ein starker Energietransfer zwischen CD13 und CD13 im

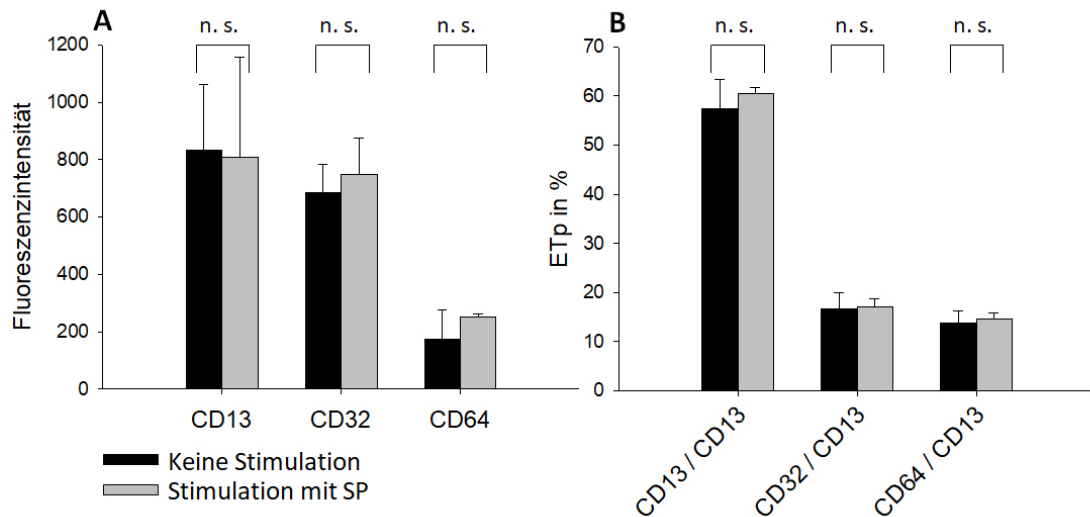


Abbildung 13 Stimulation von THP-1-Zellen mit Substanz P

A: In der Abbildung sind Fluoreszenzintensitäten als Mittelwert \pm SD von CD13, CD32 und CD64 in THP-1-Zellen dargestellt. **B:** In der Abbildung sind ETp Werte als Mittelwert \pm SD zwischen CD13 und CD13, CD32 und CD64 sowie CD64 und CD13 dargestellt; n=3

Sinne der Positivkontrolle. Es finden sich ebenfalls hohe ETp-Werte zwischen CD32 und CD13 und zwischen CD64 und CD13. Die Werte sind mit den anderen Ergebnissen (Tabelle 11) vergleichbar. Somit führt die Stimulation mit Substanz P weder zur Veränderung der Expression noch zur Variation der Abstände zwischen Fc γ -Rezeptor II und I und APN.

4.3.4 Stimulation von Perikard-Makrophagen mit IL-4

IL-4 gehört zu den anti-inflammatorischen Zytokinen. Die Stimulation mit IL-4 führt zur Steigerung der Expression von APN auf Monozyten/M Φ [van Hal et al., 1994]. Derselbe Effekt wurde auch auf PM [Riemann, 2002] und auf gingivalen Fibroblasten [Kunii et al., 2005] beschrieben. Unsere Experimente sollten klären, ob die Stimulation mit IL-4 zu einer räumlichen Veränderung der Beziehung zwischen Fc γ -Rezeptor und APN bzw. zwischen HLA-DR und APN führen.

In der Abbildung 14 ist die Stimulation von PM mit IL-4 dargestellt. Die Expression von CD13 wird durch Stimulation mit IL-4 signifikant heraufreguliert. Die Expression von CD32 auf PM ist deutlich höher als auf peripheren Blutmonozyten (vergleiche Tabelle 11) und wird durch die Stimulation mit IL-4 nicht beeinflusst. Die Expression von CD64 ist höher als bei den peripheren Blutmonozyten und nimmt nach der Stimulation mit IL-4 signifikant von 590 ± 449 auf 359 ± 43 ab. Die Expression von HLA-DR auf Perikard-Makrophagen ist höher als bei peripheren Blutmonozyten (Vergleich Tabelle 4.6) und nimmt nach Stimulation mit IL-4 tendenziell, jedoch n.s. von 1391 ± 1032 auf 2543 ± 885 zu ($p=0,082$). Trotz unterschiedlicher Expression bleibt die FRET-Effizienz, gemessen zwischen 2 APN-Monomeren in etwa gleich. Somit führt die Stimulation mit IL-4 zu keiner Veränderung der APN-Monomere. Nach Stimulation mit IL-4, nimmt die FRET-Effizienz gemessen zwischen CD32 und CD13 zu und erreicht den auf peripheren Blutmonozyten gemessenen Wert von 26,6 %. (Vergleiche Tabelle 11). Die FRET-Effizienz zwischen CD64 und

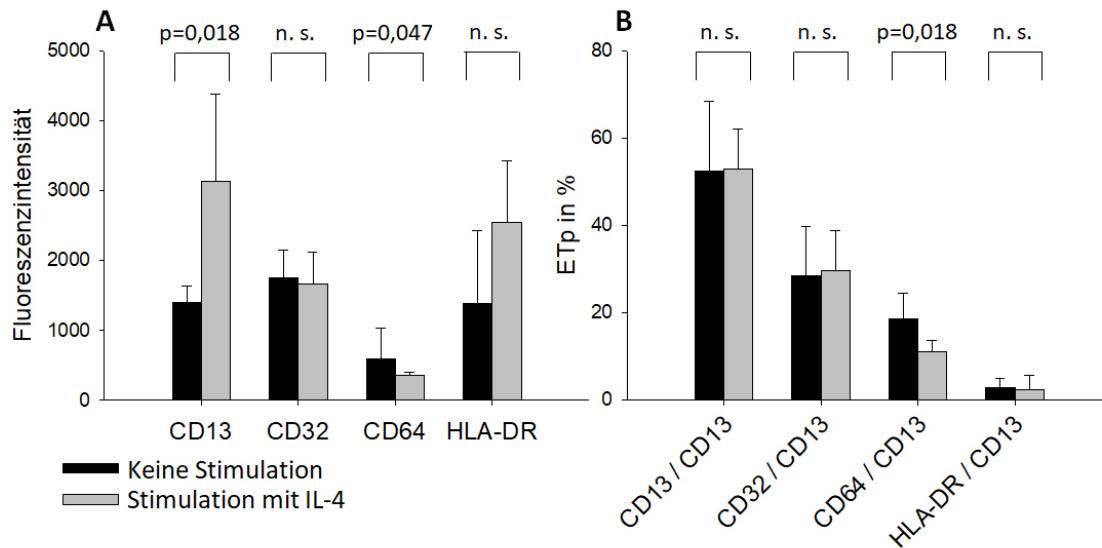


Abbildung 14 Stimulation von Perikard-Makrophagen mit IL-4

A: Fluoreszenzintensitäten als Mittelwert \pm SD von CD13, CD32, CD54 und von HLA-DR ohne und nach der Stimulation mit IL-4; **B:** ETp als Mittelwert \pm SD, der Interaktion zwischen CD13 und CD13, CD32 und CD13, CD64 und CD13 sowie zwischen HLA-DR und CD13 ohne und nach der Stimulation mit IL-4; n=2

CD13 nimmt signifikant ab. Trotz IL-4 vermittelter Steigerung der Expression von HLA-DR wird die FRET-Effizienz zwischen HLA-DR und CD13 nicht durch die Stimulation beeinflusst.

4.3.5 Stimulation von U937-Zellen mit TPA

Durch die Stimulation der unreifen myelo-monozytären Zelllinie U937 mit TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), einem Phorbol-ester, wird eine Differenzierung in Richtung reifen Monozyten induziert [Nilsson et al., 1980]. Durch die Ausreifung der Zelllinie erwarten wir, dass U937-Zellen einen monozytären Immunphänotyp und monozytäre Funktionen annehmen.

Die funktionelle Kollokalisierung zwischen APN und Fc γ -Rezeptor ist dabei von besonderem Interesse. In der Abbildung 15 sind die Ergebnisse der Expression und der FRET-Effizienz dargestellt. Die Expression des Fc γ -Rezeptor I/CD64 und APN sind auf U937-Zellen, im Vergleich zu anderen untersuchten Zellen, am geringsten.

Die Stimulation mit TPA führt zur signifikanten Steigerung der Expression von APN auf etwa das Niveau der peripheren Blut-Monozyten bzw. PM (vergleiche Tabelle 11). Die Expression von Fc γ -Rezeptor I/CD64 ist auf U937-Zellen niedrig, jedoch deutlich von der Isotyp-Kontrolle zu trennen (Abbildung 9). TPA erhöht die CD64-Expression signifikant. TPA führt zur nicht signifikanten, jedoch tendentiellen Steigerung der Expression von CD32.

Die Messung der FRET-Effizienz zwischen 2 APN-Monomeren diene als Positivkontrolle. Die Werte der Positivkontrolle waren mit anderen gemessenen Positivkontrollen vergleichbar. Siehe Tabelle 9.

Nach Stimulation mit TPA nimmt der Abstand zwischen 2 APN-Monomeren nicht signifikant ab,

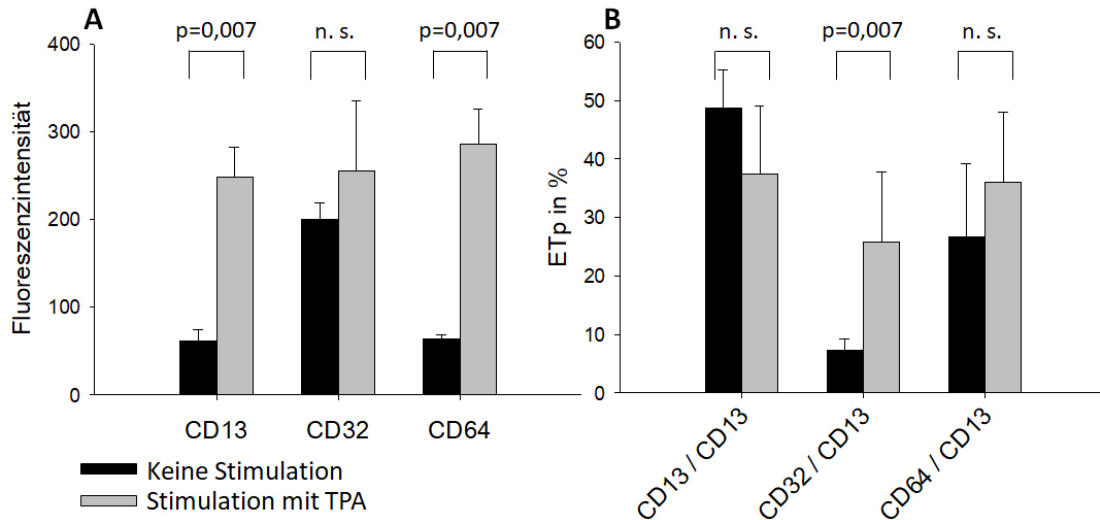


Abbildung 15 Ergebnisse der Stimulation von U937-Zellen mit TPA

A: In der Abbildung sind Fluoreszenzintensitäten als Mean-Wert \pm SD von CD13, CD32 und CD64 in U937-Zellen dargestellt; **B:** In der Abbildung sind ETp Werte als Mittelwert \pm SD zwischen CD13 und CD13, CD32 und CD13, sowie CD64 und CD13 nach Stimulation mit TPA abgebildet; n=3

während ETp zwischen CD32 und CD13 signifikant steigt. (Vor Stimulation: $7,3 \pm 1,9$, nach Stimulation: 25 ± 12). Die FRET-Effizienz zwischen CD64 und CD13 nimmt nach Stimulation mit TPA nicht signifikant zu (Vor Stimulation: 26 ± 12 , nach Stimulation: 36 ± 12).

Somit führt die Stimulation mit TPA zu einer signifikanten Verringerung des Abstandes zwischen CD13 und CD32 bzw. zur tendenziellen Verringerung des Abstandes zwischen CD13 und CD64.

4.4 Kolokalisation von CD10/NEP, CD13/APN und CD26/DPPIV mit MIRL/CD59

CD59 oder MIRL (membrane inhibitor of reactive lysis) ist auch als Protectin bekannt. Es ist ein GPI-verankertes-Glykoprotein, das auf einer Vielzahl von Zellen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Ursprunges vorkommt. Im hämatopoetischen System verhindert CD59 die Bindung des Membranangriffskomplexes und schützt die Zellen vor Zerstörung durch das Komplement-System [Xiao et al., 2017].

In dieser Arbeit ist jedoch die Rolle des Moleküls als GPI-verankertes Glykoprotein von Interesse, weil es ein Bestandteil von «lipid rafts» ist. Die Untersuchung der möglichen Kolokalisation zwischen NEP, DPPIV wurde auf der T-Zelllinie Jurkat und auf einer B-Zelllinie Namalwa untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 12 gezeigt. Die Expression von CD59 ist auf den lymphatischen Zelllinien Jurkat und Namalwa am höchsten. Die Expression von CD13 war erwartungsgemäß auf monozytären Zelllinien am höchsten, gefolgt von Jurkat (CD13-transfiziert). Die Messwerte der FRET-Effizienz waren durchwegs niedrig.

Tabelle 12 Kolokalisation zwischen NEP, APN, DPPIV und MIRC/CD59

In der Tabelle sind Zellen, Donor und Akzeptor; Mean-Werte der Fluoreszenzintensitäten von Donor und Akzeptor, Energietransfereffizienz ETp mit \pm SD und Anzahl der Versuche n dargestellt. Jurkat¹: CD13⁺

Zellen	Donor	Akzeptor	Donor-Mean	Akzeptor-Mean	ETp in %	n
Namalwa	CD10 PE	CD59 b	384 \pm 210	246 \pm 25	3,2 \pm 0,1	2
Jurkat	CD26 PE	CD59 b	462 \pm 70	2369 \pm 471	5,4 \pm 2,3	3
THP1	CD13 PE	CD59 b	3257	176	1,98	1
Jurkat ¹	CD59 PE	CD13 b	1141	830	4,04	1

4.5 Kolokalisation von APN/CD13, NEP/CD10 und DPPIV/CD26 mit dem Chemokinrezeptor CXCR4

DPPIV/CD26 spaltet Chemokine wie RANTES und SDF-1 α , einen Liganden für den CXCR4-Rezeptor. CXCR4 ist ein Transmembranprotein aus der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und ist wie APN in den «lipid rafts» lokalisiert [Chinni et al., 2008]. Unsere Experimente sollten zeigen, ob eine enge räumliche Beziehung zwischen CXCR4 und den Membranpeptidasen APN, NEP und DPPIV besteht. In der Tabelle 13 sind Ergebnisse der Kolokalisation zwischen APN, NEP, DPPIV und CXCR4 dargestellt. Die Untersuchungen der Kolokalisation mit CXCR4 mussten aufgrund des divergenten Expressionsmusters auf verschiedenen Zellen durchgeführt werden. So wurde FRET zwischen APN und CXCR4 auf PM gemessen, FRET zwischen CXCR4 und NEP auf der B-Zelllinie Raji und zwischen CXCR4 und DPPIV auf der T-Zelllinie Jurkat. Vergleiche Tabelle 1.

Als Positivkontrolle wurde auf Raji-Zellen FRET zwischen schwerer Kette von MHC-Klasse I und β 2-Mi gemessen. Auf PM wurde als Positivkontrolle FRET zwischen 2 APN Monomeren gemessen. Durch die Verwendung von mit APN transfizierten Jurkat-Zellen war es möglich, FRET wie bei PM zwischen 2 CD13-Monomeren zu messen. Vergleiche Tabelle 9.

Die Negativkontrolle zwischen CD33 und CD13 wurde auf PM gemessen. Vergleiche Tabelle 10.

Die Expression von CXCR4 war auf Jurkat-Zellen am höchsten. Raji-Zellen und PM wiesen eine geringere Expression auf, die jedoch deutlich von der Isotypkontrolle abwich (Werte nicht gezeigt).

Tabelle 13 Kolokalisation zwischen APN, NEP und DPPIV mit CXCR4

In der Tabelle sind Zellen, Donor und Akzeptor; Mean-Werte der Fluoreszenzintensitäten von Donor und Akzeptor, Energietransfereffizienz ETp mit \pm SD und Anzahl der Versuche n dargestellt

Zellen	Donor	Akzeptor	Donor-Mean	Akzeptor-Mean	ETp in %	n
Jurkat	CD26 PE	CXCR4 b	690 \pm 74	707 \pm 97	4,2 \pm 3,4	5
Raji	CXCR4 PE	CD10 b	185 \pm 157	357 \pm 95	5,4 \pm 6,4	2
PM	CXCR4 PE	CD13 b	88,3 \pm 9,1	184 \pm 136	4,8 \pm 2,8	2
Raji	β 2-Mi PE	MHC-I b	1014 \pm 127	1083 \pm 153	18,6 \pm 1,0	2

Die Expression von CD26 war auf Jurkat-Zellen höher als die Expression von CD10 auf Raji-Zellen und als die Expression von CD13 auf PM. Die FRET-Effizienzen der Positivkontrollen waren mit den anderen Positivkontrollen vergleichbar. Die FRET-Effizienz zwischen CXCR4 und CD26 auf Jurkat-Zellen war nicht von der Negativkontrolle zu trennen.

Auf Raji-Zellen war die FRET-Effizienz zwischen CXCR4 und CD10 sehr niedrig. Die FRET-Effizienz zwischen CXCR4 und CD13 auf PM war ebenfalls niedrig.

Zusammenfassend kann eine enge räumliche Beziehung zwischen APN, NEP, DPPIV und CXCR4 nicht bewiesen werden. Das negative Ergebnis der FRET-Messung kann eine räumliche Nähe zwischen den o.g. Proteinen, jedoch nicht ausschließen (Siehe Kapitel 5.6.5).

4.6 Kolokalisation von APN und NEP mit HLA-DR

Das Ziel der Experimente ist es zu prüfen, ob APN und NEP mit HLA-DR in einer engen räumlichen Beziehung zueinander stehen, als eine Voraussetzung für eine Beteiligung an der intrazellulären Signaltransduktion.

Da die Koexpression von Membranpeptidasen nicht auf allen hämatopoetischen Zellen im gleichen Maße vorliegt, haben wir die Kolokalisation zwischen APN und HLA-DR in folgenden Zellen untersucht: periphere Blutmonozyten (PBMo), Makrophagen (PM) und monozytäre Zelllinie U937. Die Kolokalisation zwischen NEP/CD10 und HLA-DR wurde auf Raji-Zellen untersucht. In der Tabelle 14 sind die Ergebnisse der FRET-Messungen zwischen HLA-DR und den membranständigen Peptidasen APN und NEP dargestellt. Die höchste Expression von HLA-DR gab es auf PM-Zellen, gefolgt von peripheren Blutmonozyten und der B-Zelllinie Raji. Die geringste Expression von HLA-DR war auf der myelo-monozytären Zelllinie U937 zu finden. Die Expression von CD13 auf U937-Zellen war geringer als auf PM-Zellen. Die höchste Expression wiesen PBMo auf. Die FRET-Messungen zeigten durchweg einen niedrigen Wert der FRET-Effizienz. Die niedrigen ETP-Werte können, wie in den anderen Experimenten, die Kolokalisation der Moleküle nicht ausschließen, hierzu siehe Kapitel 3.2.1.

4.6.1 Stimulation von U937-Zellen mit TPA

In der Abbildung 16 sind die Ergebnisse der Stimulation mit TPA auf U937-Zellen dargestellt. Nach der Stimulation mit TPA steigt sowohl die Expression von HLA-DR als auch der HLA-I-Moleküle. Die FRET-Effizienz zwischen HLA-DR und CD13 nimmt nach der Stimulation mit TPA ebenfalls

Tabelle 14 Kolokalisation zwischen APN und NEP mit HLA-DR

In der Tabelle sind Zellen, Donor und Akzeptor; Mean-Werte der Fluoreszenzintensitäten von Donor und Akzeptor, Energietransfereffizienz ETP mit \pm SD und Anzahl der Versuche n dargestellt

Zellen	Donor	Akzeptor	Donor-Mean	Akzeptor-Mean	ETp in %	n
PBMo	HLA-DR	CD13	1232 \pm 156	409 \pm 63	5,6 \pm 0,6	2
PM	HLA-DR	CD13	2376 \pm 363	289 \pm 80	2,3 \pm 1,4	2
U937	HLA-DR	CD13	501 \pm 276	186 \pm 152	5,1 \pm 2,9	6
Raji	HLA-DR	CD10	1616 \pm 665	353 \pm 246	0,8 \pm 0,1	2

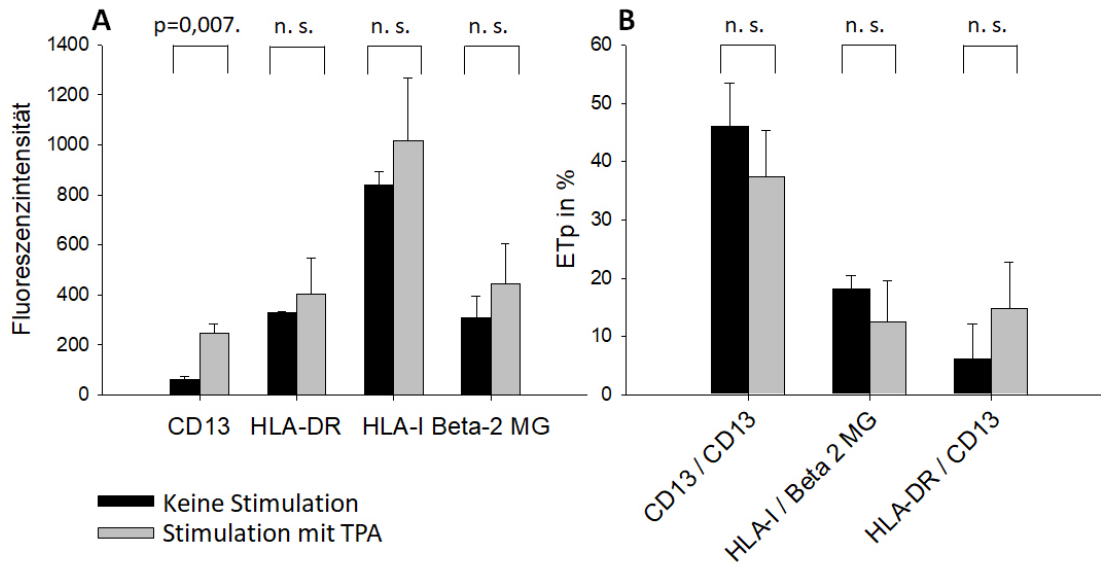


Abbildung 16 TPA-induzierte Stimulation von HLA-DR und CD13 auf U937-Zellen

A: In der Abbildung sind Fluoreszenzintensitäten als Mean-Wert \pm SD von CD13, HLA-DR, MHC-Klasse I und β 2-Mi dargestellt. **B:** In der Abbildung sind ETp Werte als Mittelwert \pm SD der Positivkontrollen zwischen CD13 und CD13, β 2-Mi und MHC-Klasse-I und zwischen HLA-DR und CD13 vor und nach der Stimulation mit TPA auf U937-Zellen dargestellt; n=3

von $6 \pm 5,9$ auf $14,8 \pm 8$ % zu. Damit kann die TPA-induzierte monozytäre Reifung zu einer Kolokalisation führen.

4.7 Kolokalisation zwischen APN und den Adhäsionsmolekülen CD11b, CD18 und CD54

Zell-Zell-Kontakt zwischen T-Lymphozyten und Monozyten, Endothelzellen und SFC führt zu einer schnellen Expression von APN-mRNA in den T-Lymphozyten [Riemann et al., 1997; Kehlen et al., 2000]. Die APN ist in der Lage, durch die Zelladhäsion eine Signaltransduktion intrazellulär zu verursachen [Mina-Osorio et al., 2006].

Unsere Untersuchungen sollen klären, ob APN in der Nähe von Adhäsionsmolekülen wie CD11b/-CD18 und/oder CD54 lokalisiert ist. Die Experimente wurden auf PM-Zellen, ausgereiften Monozyten/M Φ und auf den unreifen monozytären Zelllinien U937 und THP-1 durchgeführt. In der Tabelle 15 sind die Ergebnisse dargestellt.

Die Kolokalisation mit CD13 wurde auf Perikard-M Φ untersucht. Die Expression von CD54 war niedriger als die CD13-Intensität. Es ergab sich eine hohe SD. Die niedrigen Werte der FRET-Effizienz können die Kolokalisation der Moleküle Methoden-bedingt (Vergleich Kapitel 3.2.1) nicht ausschließen.

Die Expression von CD11b war auf U937-Zellen niedrig, jedoch klar von der Isotypkontrolle zu trennen (Daten nicht gezeigt). Die ETp-Werte zwischen APN und CD11b waren hoch. Da CD11b ein Heterodimer mit CD18 bildet, wurde zwischen APN und CD18 ebenfalls FRET gemessen. Auf den THP-1-Zellen war die Expression von CD18 deutlich höher. Die Energietransfer-Effizienz

Tabelle 15 Kolokalisation zwischen APN und Adhäsionsmolekülen

In der Tabelle sind Zellen, Donor und Akzeptor; Mean-Werte der Fluoreszenzintensitäten von Donor und Akzeptor, Energietransfereffizienz ETp mit \pm SD und Anzahl der Versuche n dargestellt

Zellen	Donor	Akzeptor	Donor-Mean	Akzeptor-Mean	ETp in %	n
PM	CD54 PE	CD13 b	267 \pm 124	690 \pm 616	5,9 \pm 8,5	2
U937	CD11b PE	CD13 b	60,2 \pm 47	593 \pm 635	18,5 \pm 16,9	7
THP-1	CD13 PE	CD18 b	1201 \pm 108	1285 \pm 344	11,5 \pm 0,6	2

zwischen APN und CD18 war hoch. Wir vermuten eine engere räumliche Beziehung zwischen dem β 2-Integrin CD11b/CD18 und CD13.

4.8 Interaktionspartner von Fc-Rezeptoren auf monozytären Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Assoziation zwischen APN und Fc-Rezeptoren gezeigt werden. Nun soll nach einer räumlichen Beziehung zu anderen Mitgliedern von «lipid rafts» untersucht werden. Es wurde FRET zwischen Fc-Rezeptoren und HLA-DR, CD59 und Integrinen

Tabelle 16 Interaktionspartner von Fc-Rezeptoren auf monozytären Zellen

In der Tabelle sind Zellen, Donor und Akzeptor; Mean-Werte der Fluoreszenzintensitäten von Donor und Akzeptor, Energietransfereffizienz ETp mit \pm SD und Anzahl der Versuche n dargestellt

Zellen	Donor	Akzeptor	Donor-Mean	Akzeptor-Mean	ETp in %	n
U937	CD32	HLA-DR	1551 \pm 391	2240 \pm 95	15,5 \pm 0,4	2
U937	CD64	HLA-DR	668 \pm 189	2288 \pm 171	24,3 \pm 2,2	2
U937	CD32	CD54	1509 \pm 178	881 \pm 96	5,9 \pm 1,6	2
THP-1	CD32	CD54	1156 \pm 420	566 \pm 384	3,8 \pm 3,8	4
THP-1	CD32	CD59	1196 \pm 30	970 \pm 722	14,3 \pm 4,8	3
THP-1	CD32	CD18	1201 \pm 108	1285 \pm 344	13,0 \pm 1,4	2

gemessen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 16 dargestellt. Die Expression von HLA-DR war auf U937-Zellen höher als auf THP-1-Zellen. Die Expression von β 2-Integrin/CD18 war auf THP-1-Zellen deutlich höher als auf U937-Zellen. Die Expression von Fc γ -Rezeptor II/ CD32 variierte stark auf U937-Zellen und war in etwa mit der Expression auf THP-1-Zellen vergleichbar.

Die FRET-Effizienz zwischen CD32 und CD18 war auf THP-Zellen hoch. Die FRET-Effizienz zwischen CD54 und CD32 war sowohl auf THP-1 als auch auf U937-Zellen niedrig. Die FRET-Effizienz zwischen CD32 und HLA-DR war auf U937-Zellen hoch. Die vorgestellten Ergebnisse, geben Hinweise auf eine enge Kolokalisation von Fc γ -Rezeptor II mit β 2-Integrin CD11b/CD18 und MIR-L/CD59 sowie zwischen CD64 und HLA-DR.

5 Diskussion

5.1 FRET in der Durchflusszytometrie

Es gibt 3 am häufigsten verwendeten Arten der FRET-Messung: 1. Messung der Fluoreszenzintensität, 2. Zeitdauer der Fluoreszenz und 3. Anisotropie-Messung [Shrestha et al., 2015]. In der Durchflusszytometrie wird am häufigsten die Messung der Fluoreszenzintensität als Variable verwendet. FRET wird nicht direkt visualisiert, wie in der Mikroskopie, sondern ratiometrisch ermittelt. Man kann über die Fluoreszenzintensität FRET mit einer spektralen Analyse in 2 Kanälen und in 3 Kanälen messen. Bei einer 2-Kanal-Methode wird die Intensität im Donor-Kanal und im FRET-Kanal gemessen. Bei einer 3 Kanal-Methode wird zusätzlich noch im Akzeptor-Kanal gemessen.

Mit Fortschreiten der technischen Entwicklung ist eine Mehrkanal-Messung möglich, so kann ein FACS-Calibur bereits in 3 Kanälen arbeiten. Die in dieser Arbeit verwendete Methode ist eine 3-Kanal-basierte Methode.

Eine weitere Entwicklung der 3 Kanal-Methode auf dem Zytometer FACS-Calibur ist eine 3-Kanal-Methode zur FRET-Messung bei niedriger SNR (Signal-to-noise ratio). Hierfür werden die FRET-Messungen auf Einzelzell-Ebene (Cell by Cell) durchgeführt [Sebestyen et al., 2002].

Neue Ansätze finden sich in laser scanning cytometry (LSC). Dabei werden die Vorteile des FACS, wie hoher Zelldurchsatz, mit der hohen örtlichen Auflösung eines Mikroskops kombiniert. Die technischen Voraussetzungen dafür erfüllte die nächste Generation der Zytometer mit Sorter Funktion z.B. FACSAria III.

Die Daten werden auf Einzelzellebene aufgenommen und mit Pixel by Pixel Verfahren kombiniert. So kann FRET mit der 3 Kanal-Methode in einem ratiometrischen Verfahren ermittelt und der räumlichen Koordinate der Zelle zugewiesen werden [Szalóki et al., 2013]. Damit kann FRET räumlich, zeitlich und statistisch genau visualisiert werden.

5.2 Positivkontrollen

In der Untersuchung der Kolo-kalisation von APN, NEP und DPPIV mit anderen Membranproteinen wurde es notwendig, die Ergebnisse der FRET-Messungen auf verschiedenen Zellen miteinander zu vergleichen. Somit wurde eine Positivkontrolle eingeführt. Die Anwendung von Positivkontrollen während der FRET-Messung dient der Methodvalidierung und zum Ausschluss von falsch negativen Ergebnissen.

Als Kandidaten boten sich die Moleküle an, die einen bekannten homodimeren Charakter haben, wie z. B. APN, NEP und DPPIV und die Moleküle, bei denen eine Interaktion bekannt ist, wie z. B. schwerer Kette von HLA-Klasse-I-Molekülen und β_2M . Die Voraussetzung für die Verwendung der Positivkontrolle ist die Expression der o. g. Membranproteinen auf der Zelloberfläche der zu untersuchenden Zellen.

Der Einsatz der durchflusszytometrischen FRET-Messung zwischen zwei APN-Monomeren erwies sich als eine gute Positivkontrolle, jedoch kann diese nur in Zellen verwendet werden, die APN exprimieren. Bei fehlender APN-Expression wurde FRET zwischen schwerer Kette von HLA-

Klasse-I-Molekülen und β_2M als 2. Positivkontrolle etabliert. Die Positivkontrolle wurde immer mitgemessen. Unsere Ergebnisse der Positivkontrolle zwischen der schweren Kette von HLA-Klasse-I-Molekülen und dem β_2M (Tabelle 9) sind mit den publizierten Daten von Vámosi et al. [2007] vergleichbar. In unseren Messungen war die FRET-Effizienz $18,2\% \pm 2,1$ und in dem Buchbeitrag von Vámosi et al. [2007] zwischen 15 und 30%.

Somit kann sowohl FRET-Messung zwischen 2 APN-Monomeren und zwischen der schweren Kette von HLA-Klasse-I-Molekülen und β_2M als Positivkontrolle verwendet werden.

Da HLA-Moleküle von allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, ist prinzipiell diese Positivkontrolle für eine breitere Verwendung geeignet. Aufgrund unserer Ergebnisse ist die Verwendung beider Positivkontrollen gleichwertig.

5.3 Negativkontrolle

Es wird empfohlen, für die durchflusszytometrischen FRET-Untersuchungen eine systeminterne Negativkontrolle zu etablieren und sich dann an den cut-off-Wert zu orientieren [Nagy et al., 2006]. Hierzu müssen beide Moleküle, zwischen denen FRET gemessen werden soll, ausreichend exprimiert sein. Dabei soll die Intensität mindestens das Doppelte der Hintergrundfluoreszenz betragen [Davis and Muller, 2007]. Trotz ausreichender Expression dürfen die Moleküle sich in ihrer Funktion nicht beeinflussen. Während CD13 in den «lipid rafts» vorkommt, wurde CD33 als ein non-raft-Molekül identifiziert [Pérez-Oliva et al., 2011]. In der Arbeit von Mina-Osorio and Ortega [2005] wurde gezeigt, dass CD33 keinen Einfluss auf die CD13- oder CD64 vermittelte Phagozytose auf U937-Zellen hat.

In unseren Messungen lag der cut off-Wert für FRET-Effizienz zwischen 4,4-6,3 % (vergleiche Kapitel 4.1.2). Basierend auf der Berechnung von Förster-Radien für das Fluorophoren-Paar PE und Allophycocyanin (APC) wurde die Signifikanzgrenze des Energietransfers ermittelt. Sie lag bei ca. 5 % [Glazer and Stryer, 1983]. In der Arbeit von [Pfeiffer et al., 2001], wird diese Berechnung zitiert und als Signifikanz-Grenze für Energietransfereffizienz zwischen Donor-Akzeptor-Paar PE und Cy-5 angegeben.

Auf myeloischen Zellen wurde der Etp- Wert für FRET zwischen CD13 und CD33 als Negativkontrolle etabliert. Um die Aussagekraft noch zu verbessern wurde für weitere Untersuchungen (KO-IP) der Wert von 10% gefordert.

Leider kann unsere systeminterne Negativkontrolle nur dort eingesetzt werden, wo CD13 gemeinsam mit CD33 exprimiert wird. Die Koexpression von CD13 und CD33 (Siglec-3), einem Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie wird während der frühen myelo/monozytären Entwicklung beobachtet. Auf reifen, peripheren Blutleukozyten wird die höchste Koexpression auf Monozyten, gefolgt von Neutrophilen, Basophilen und eosinophilen Granulozyten beobachtet [Terstappen et al., 1990].

Die niedrigen FRET-Werte schließen eine Interaktion zwischen zwei Proteinen keinesfalls aus. Die quantenmechanische Natur von FRET stellt selbst eine Fehlerquelle dar. So ist der Förster-Radius von der Ausrichtung der Dipole zueinander abhängig (κ^2) siehe (Abbildung 3).

Der Wert wird als 2/3 angenommen (s.g. dynamisch-isotropisches Limit) [Loura, 2012]. Zudem kann ein Donor-Molekül unter bestimmten Voraussetzungen mehrere Akzeptormoleküle anregen und somit unterschiedliche «Entfernungen» generieren. Wird eine Interaktion dennoch ver-

mutet, so ist es notwendig, diese mit anderen Antikörpern oder in einer anderen Methode zu überprüfen.

5.4 Untersuchung der Kolokalisation von APN mit anderen Membran-Molekülen

5.4.1 Kolokalisation von APN mit Fc γ -Rezeptoren

Erstmalig wurde die Interaktion zwischen APN und Fc γ -Rezeptor-II von [MacIntyre et al., 1989] vermutet. Er stellte eine Erhöhung intrazellulärer Ca²⁺-Freisetzung in U937-Zellen durch Stimulation der Zellen mit einem Anti-CD13 mAb (WM15) fest. Dabei vermutete er eine Kreuzvernetzung, vermittelt durch Antigenbindung des monoklonalen Anti-CD13 Antikörpers und Bindung des Fc-Teils des Antikörpers an den Fc-Rezeptor. Infolge dieser Bindung soll eine Formation auf der Zelloberfläche entstehen, die für die Ca²⁺-Freisetzung verantwortlich ist. Da damals nur eine Signaltransduktion via Fc-Rezeptor bekannt war, schlussfolgerte er, dass durch die Kreuzvernetzung der Fc-Rezeptor aktiviert wird. Navarrete Santos et al. [2000b] demonstrierte mit dem Anti-CD13 mAb (WM15) Ca²⁺-Freisetzung. Da Anti-CD13 (WM 15) in der Nähe des aktiven Zentrums von APN bindet und die Enzymaktivität hemmt, ist die Kreuzvernetzung von APN unabhängig von deren Enzymeigenschaften.

Aufschlüsselung der Struktur von APN und Computersimulation der Wechselwirkung der Dimeren in einem 3D-Modell demonstrieren Veränderung der Konformation beim Spalten der Substrate. Es wird vermutet, dadurch eine Initiierung der Signaltransduktion zu begünstigen [Chen et al., 2012]. Der selbe Mechanismus kann durch die Kreuzvernetzung von Dimeren durch einen Antikörper für die Signaltransduktion ursächlich sein.

Subramani et al. [2013] beschrieb jedoch eine Stelle in der intrazytoplasmatischen Domäne von APN, die phosphoryliert werden kann und somit eine direkte Beteiligung von APN an intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen erklärt.

In der Arbeit von Navarrete Santos et al. [2000b] wurde das Vorkommen der APN in den «lipid rafts» gezeigt. CD32 wurde ebenfalls in den «lipid rafts» nachgewiesen [Bournazos et al., 2009] und als Marker für «lipid rafts» verwendet [Wallner et al., 2016].

In dieser Arbeit konnten wir mit FRET-Messungen eine enge räumliche Nähe zwischen APN und den Fc-Rezeptoren-I und II auf myeloischen Zellen zeigen. Eine Bestätigung der Kolokalisation muss auch mit anderen Methoden gelingen. Als weitere Methode wurde Ko-IP gewählt (Vergleiche Kapitel 3.3). In mehreren Versuchen konnte APN und CD32, jedoch nicht CD64 präzipitiert werden. Zwischen CD13 und CD64 konnte somit keine Ko-IP gezeigt werden. Der Grund dafür liegt zu einem Teil in der niedrigen Expression von CD64 auf THP-1-Zellen (Vergleich Tabelle 11) und zum anderen Teil an der Methode selbst. Die Ko-IP weist im Vergleich zu Immunfluoreszenz niedrigere Sensitivität auf. Durch die Denaturierung werden viele Epitope zerstört. Durch die Präzipitation mit einem polyklonalen Antikörper ohne bekannte Epitop-Selektivität werden nur ca. 1-2% des Gesamt-IgG gebunden. Solch ein Antikörper kann im Westernblot gut funktionieren, jedoch für Ko-IP völlig ungeeignet sein [Thermo-scientific, 2009].

Weitere Versuche (Arbeit von Frau Dr. T. Bloß) mit Kreuzvernetzung und anschließender Koimmunopräzipitation waren ebenfalls nicht erfolgreich (Daten nicht publiziert).

Als eine weitere Nachweismethode der Interaktion zwischen APN und Fc-Rezeptoren wurde konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie und die Elektronenmikroskopie mit Immunogold-Methode verwendet. Dadurch gelang es, die Interaktion zwischen CD32, CD64 und CD13 auf THP-1-Zellen durch Herrn Dr. J. Wulfänger mittels Laser-Scanning-Mikroskopie und durch Prof. Danielsen (Am Panum-Institut in Kopenhagen, Dänemark) mittels Elektronenmikroskopie [Riemann et al., 2005] zu zeigen.

Fast zeitgleich fanden Mina-Osorio and Ortega [2005] eine funktionelle Kolokalisation zwischen APN und Fc-Rezeptoren bei Phagozytose auf U937-Zellen. Dabei wurden Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierte anti-Dinitrophenol-Antikörper an die Erythrozyten gekoppelt. Die Erythrozyten werden durch den Fc γ -Rezeptor I auf Phagozyten gebunden und gefressen. Zur Visualisierung von CD13 wurden biotinylierte Anti-CD13 F(ab)₂-Fragmente (Wistar-Clon) verwendet, die in einem zweiten Schritt über Biotin-Streptavidin-Bindung mit Texas Red gefärbt worden. Mittels Laser-Scanning-Mikroskopie wurde eine Kolokalisation nur an den Stellen gesehen, wo U937-Zellen die Erythrozyten phagozytieren, zudem wurde eine verstärkende Wirkung auf die Signaltransduktion gezeigt (Verlängerung der Dauer der Src-Phosphorylierung, induziert durch Fc γ -Rezeptor I). Die Erythrozyten, die über Fc γ -Rezeptor I mit Mitwirkung von CD13 phagozytiert werden, sind schneller phagozytiert als über Fc γ -Rezeptor I allein [Mina-Osorio and Ortega, 2005]. Die Arbeit von Villaseñor-Cardoso et al. [2013] zeigte, dass eine Kreuzvernetzung von CD13 mit Anti-CD13-Antikörper (Wistar-Clon) auf Makrophagen und DCs zur Steigerung der Phagozytose von Zymosan und Bakterien führt. Dabei wurde die Internalisierung von CD13 in einem Phagosom gezeigt. Zymosan ist ein Homoglykan aus sich wiederholenden Glucose-Einheiten mit einer β -1,3-glykosidischen Bindung. Zymosan aktiviert den TLR-2 und den alternativen Weg des Komplementsystems [Sato et al., 2003], somit lässt sich eine Rolle von APN an der Komplement-vermittelten Phagozytose vermuten.

5.4.2 Kolokalisation von CD10/NEP, CD13/APN und CD26/DPPIV mit MIRL/CD59

Hinweise für eine Interaktion zwischen NEP und GPI-verankerten Molekülen sind bereits bekannt. So wird im Review von Maguer-Satta et al. [2011] die Beteiligung von CD10 an der Signaltransduktion via GPI-Komplex beschrieben [Maguer-Satta et al., 2011].

Es gibt auch mehrere Hinweise auf eine Beteiligung von DPPIV an GPI-vermittelter Signaltransduktion. Eine direkte Interaktion zwischen Glypican 3 (GPC3), einem GPI-verankertem Protein und CD26 wurde von Davoodi et al. [2007] beschrieben.

CD59 ist ein GPI-verankertes Molekül, das Komplementaktivierung auf der Ebene der Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC) inhibiert. In der Literatur ist eine Expression von CD59 auf den Zellen der Erythropoese, Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten beschrieben [Hillmen and Richards, 2000]. Im hämatopoetischen System findet sich eine Anreicherung von CD59 in den Mikrodomänen von Caveolae [Sprenger et al., 2006]. Die Lokalisation von CD59 wurde (wie APN) in den «lipid rafts» auf Nierenepithel [Danielsen, 1990] und Monozyten [Navarrete Santos et al., 2000b] gezeigt. Die Lokalisation von NEP und DPPIV in den «lipid rafts» und Caveolae von SFCs wurde gezeigt von [Riemann et al., 2001].

Die Kolokalisation zwischen NEP und DPPVI konnte in der B-Zelllinie Namalwa und in der T-

Zelllinie Jurkat gezeigt werden. Die Expression von APN auf Jurkat-Zellen wurde nur nach Zell-Zell-Kontakt mit SFCs beschrieben [Kehlen et al., 2000]. Für die Untersuchung der Kollokalisierung mit APN wurden mit CD13 transfizierte Jurkat-Zellen verwendet. Es konnte trotz ausreichender Expression von APN und MIRL kein FRET gemessen werden. Auf den myeloischen Zelllinien U937- und THP-1 fand sich eine sehr inhomogene Expression von CD59, was eine Aussage der FRET-Messung zwischen CD59 und CD13 limitiert.

Die Messergebnisse der FRET-Messung zwischen NEP und CD59/MIRL auf Namalwa-Zellen und zwischen DPPIV und MIRL auf Jurkat-Zellen waren ebenfalls niedrig. Eine funktionelle Interaktion nach Zell-Zell-Kontakt oder nach Aktivierung der T-Zellen wurde nicht durchgeführt. Anhand von FRET-Messungen konnte man eine mögliche Interaktion in dieser Arbeit nicht aufdecken.

5.4.3 Interaktion zwischen APN und Adhäsionsmolekülen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir mittels durchflusszytometrischer FRET-Messung eine enge räumliche Beziehung zwischen APN und Beta-2-Integrin/ CD11b/CD18 zeigen.

β_2 -Integrin ist ein Heterodimer und besteht aus 2 Untereinheiten α (CD11b) und β (CD18). In unseren Experimenten wurde FRET sowohl zwischen APN und beiden Untereinheiten detektiert. Hinweise auf eine mögliche Interaktion zwischen Adhäsionsmolekülen und APN liegen schon länger vor. Die Interaktion kann sowohl enzymatisch, als auch unabhängig von den Enzymeigenschaften ablaufen [Bauvois, 2004].

Ein enzymunabhängiger Mechanismus wurde während der homotypen Aggregation von Monozyten vermutet. Die Bindung von APN-Glykosylierungsstellen an Galectin-3 wurde auf U937-Zellen gezeigt. Da das Galectin-3 an der Fc γ -Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion beteiligt ist, wird eine Kooperation zwischen APN und Fc γ -Rezeptor via Galectin-3 bei Phagozytose, Angiogenese, Tumordinvasion und Metastasierung diskutiert [Mina-Osorio et al., 2007].

Die Expression von Galectin-3 ist im Immunsystem auf folgenden Geweben bekannt: Monozyten und Makrophagen [Liu et al., 1995], aktivierte T-Zellen [Joo et al., 2001].

Mina-Osorio et al. [2008] zeigte auf HUVEC-Zellen (human umbilical vein endothelial cell), wie eine Ligation von APN mit anti-APN-Antikörpern (Wistar, WM15, YK2) zu einer Ausbildung von Filopodien führt.

Die Arbeit von Riemann et al. [2001] zeigte wie Zell-Zell-Kontakte die Expression von APN auf T-Lymphozyten und auf SFCs steigern. Die gleichzeitige Heraufregulation der Expression von APN und Integrinen ($\alpha\nu\beta$ 3 und 5) wurde in Endothelzellen bei Tumorneoangiogenese beobachtet [Veikkola et al., 2000].

Ein weiterer möglicher Interaktionspartner von APN ist ICAM-1, ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und funktioneller Rezeptor für β_2 -Integrin. Die Expression von ICAM-1 kann durch proinflammatorische Stimuli wie TNF- α und IL-1 induziert werden [Xiao et al., 2014]. Die durch ICAM-1 und ICAM-2 vermittelte Signaltransduktion ist entscheidend für die Diapedese und Extravasation von neutrophilen Granulozyten in entzündetes Gewebe [Lyck and Enzmann, 2015].

Eine Interaktion zwischen APN und ICAM-1 wurde von [Jenke et al., 2013] auf DCs gezeigt. Dabei induzierte APN via TLR4 (toll like receptor) eine NF- κ B vermittelte Herunterregulierung von ICAM-1 und proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α , IL-6, IL-12 und CCL2.

In der direkten FRET-Messung zwischen APN und ICAM-1 auf PM-Zellen konnten wir keinen

FRET messen. Auch die Indirekte Messung zwischen Fc γ -Rezeptoren konnte kein FRET gemessen werden.

Durch die durchflußzytometrische FRET-Messung konnte eine räumlichen Nähe zwischen APN und β_2 -Integrin, sowie zwischen CD32, CD64 und β_2 -Integrin, jedoch nicht zwischen APN/CD13 und ICAM-1/CD54, sowie zwischen CD32 und CD54 nachgewiesen werden (Vergleich Tabellen 15 und 16).

Die FRET-Messung kann in dieser Versuchsanordnung, jedoch die Interaktion zwischen ICAM-1 und APN nicht ausschließen. Es ist möglich, dass die Interaktion zwischen APN und ICAM-1 erst unter bestimmten Bedingungen z.B. Inflammation zu Stande kommt.

5.5 Zweidimensionale Kartierung der Zelloberfläche

In dieser Arbeit wurde nach einer direkten Interaktion zwischen APN, NEP und DPPIV mit einem vermuteten Interaktionspartner gesucht. Die Voraussetzung für die Untersuchung war eine bekannte Lokalisation der Moleküle in den «lipid rafts». Methodisch bedingt ist eine FRET-sensitive Untersuchung im Bereich zwischen 1-10 nm möglich. Da die FRET-Messung von vielen Faktoren abhängt (Vergleiche Kapitel 3.2.1), ist ein negatives FRET-Ergebnis nur als Hinweis zu betrachten. Um die FRET-basierten Untersuchung zu veranschaulichen, ist eine Art Kartierung der Zelloberfläche von Vorteil. Die zweidimensionale Darstellung der APN mit möglichen Interaktionspartnern und der Interaktionspartner untereinander (Abbildung 17) erweitert die Vorstellung über die Kolokalisation auf der Zelloberfläche und bietet einen Ausblick über 10 nm hinaus.

5.5.1 Kolokalisation zwischen Fc γ -Rezeptor II/CD32 und der β -Untereinheit des β_2 -Integrins/CD18

Die Kolokalisation beider Moleküle wurde auf Monozyten/Makrophagen in FRET-Technik in der Arbeit von Pfeiffer et al. [2001] gezeigt. Eine weitere Arbeit von Pilling et al. [2009] bestätigte das Ergebnis. Die Ergebnisse der Kolokalisation lassen sich in unseren Experimenten mit THP-1-Zellen bestätigen. In der Abbildung 17 ist eine mögliche Anordnung der Moleküle auf monozytären Zellen gezeigt. Die räumliche Nähe lässt eine modulatorische Wirkung von APN auf die β_2 -Integrin-Fc γ -Rezeptor-II-vermittelte Signaltransduktion vermuten.

In der Arbeit von Futosi et al. [2013] wurde eine funktionelle Interaktion zwischen ITAM-Motiven (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) der Fc-Rezeptoren und dem β_2 -Integrin auf neutrophilen Granulozyten gezeigt. Die intrazelluläre Aktivierung verläuft via Syk-Tyrosin-Kinase. Die Syk^{-/-} negativen Neutrophilen sind nicht mehr im Stande, eine Signaltransduktion via β_2 -Integrin oder Fc-Rezeptor zu vermitteln [Futosi et al., 2013]. Da APN in Position Tyr⁶ phosphoryliert werden kann [Subramani et al., 2013], ist eine synergistische Aktivierung von APN, CD18 und CD32 denkbar. Eine solche Interaktion ist im Rahmen der Inflammation bzw. der Phagozytose, Differenzierung von Monozyten zu M Φ und DCs nach Stimulation mit IL-4 denkbar. Diese Vorgänge werden durch die Signaltransduktion via Fc γ -Rezeptor vermittelt [Tanaka et al., 2009].

Nach Stimulation mit IL-4 fand sich eine Steigerung von FRET zwischen Fc γ -Rezeptor II und APN und eine Abnahme von FRET zwischen Fc γ -Rezeptor I und APN (vergleiche Abbildung 14). Vor dem Hintergrund dieser Befunde vermuten wir eine modulatorische Rolle der APN bei Fc γ -

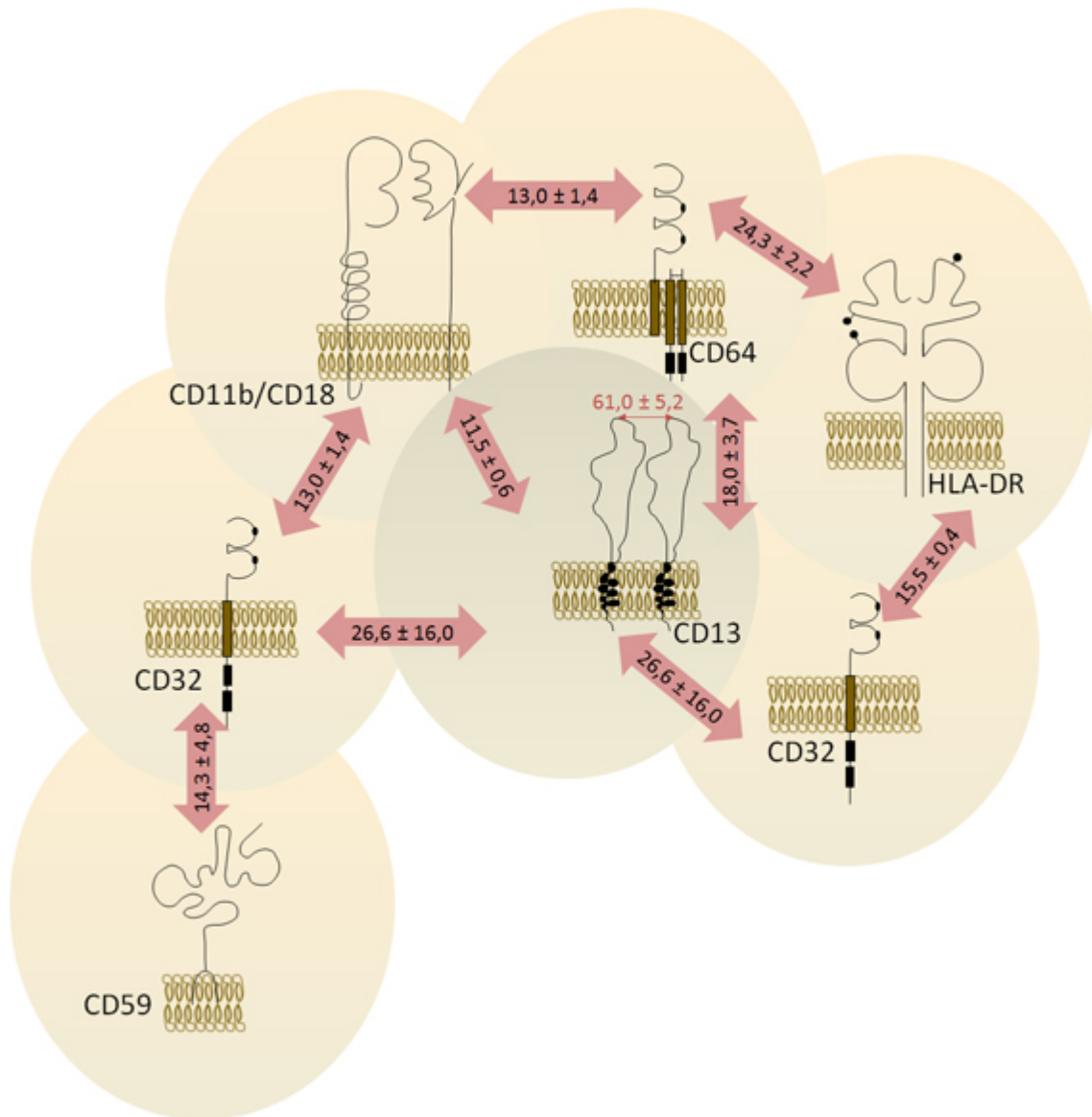


Abbildung 17 Cluster-Darstellung der Interaktionen von APN mit verschiedenen Molekülen auf monozytären Zellen

Die Abbildung stellt eine schematische Anordnung der Moleküle um APN auf myeloischen Zellen dar. In den Pfeilen ist der Mean-Wert der Energietransfereffizienz \pm SD gezeigt. Als Positivkontrolle wurde der Energietransfer zwischen 2 APN-Monomeren genommen. Die Überschneidung der farblichen Felder bedeuten eine Entfernung zwischen 1-10 nm

Rezeptor-vermittelten Zelldifferenzierungsvorgängen, die möglicherweise eine Mitwirkung von Integrinen erfordern. Inwiefern die Beteiligung von Integrinen stattfindet, lässt sich im Rahmen dieser Arbeit nicht klären. Hierzu sind weitere Untersuchungen nötig.

5.5.2 Interaktion zwischen CD32 und CD59

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir mit Hilfe der durchflusszytometrischen FRET-Messung eine räumliche Nähe zwischen $Fc\gamma$ -Rezeptor II und CD59 feststellen (siehe Tabelle 16). Bisher

wurde auf den epithelialen DCs des respiratorischen Traktes eine simultane Überexpression von CD59 und Fc γ -Rezeptoren IA, IIA und IIB gezeigt. Eine funktionelle Interaktion zwischen GPI-verankertem CD59 und Fc γ -RIIA wurde auf Jurkat-Zellen gezeigt, die mit Fc γ -Rezeptor IIA transfiguriert wurden. Nach einer Kreuzvernetzung von CD32 und CD59 wurde ein intrazellulärer Influx von ($[Ca^{2+}]_i$) beobachtet. Eine Ursache dafür wurde in der Tyrosin-abhängigen Aktivierung der ITAM-Domäne des Fc γ -Rezeptors-IIA gefunden [Green et al., 1997]. In der zweidimensionalen Darstellung von Pfeiffer et al. [2001] wurde eine Nähe zwischen dem GPI-verankertem Fc γ -Rezeptoren-III (CD16) und CD32 auf U937-Zellen beschrieben. Die Interaktion zwischen APN und Fc γ -Rezeptoren-I und II wurde durch uns bereits beschrieben [Riemann et al., 2005]. Somit konnten wir mit unserer durchflusszytometrischen FRET-Messungen eine bekannte Interaktion zwischen CD32 und dem GPI-verankerten Molekül CD59 bestätigen.

5.5.3 Interaktion zwischen HLA-DR und Fc γ -Rezeptor-I/CD64 und Fc γ -Rezeptor-II/CD32

Physiologischerweise sind beide Moleküle (HLA-DR und Fc γ -Rezeptor-I, -II) in antigenpräsentierenden Zellen, wie Monozyten/Makrophagen und DCs zu finden. Die Bindung eines Immunkomplexes an einen Fc-Rezeptor führt zur Signaltransduktion, vermittelt durch Tyrosin-basierte Aktivierung des Fc γ -Rezeptors. Diese Aktivierung führt zur Heraufregulierung von MHC-Klasse-I und -II Molekülen und kostimulatorischen Proteinen [Pincetic et al., 2014].

Die Fc-Rezeptoren bilden eine Brücke zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. Die Interaktion zwischen Fc-Rezeptoren und MHC-Klasse-I und -II-Molekülen findet u.a. im Rahmen der Antigenprozessierung statt. So erfolgt die Internalisation von IgG-Immunkomplexen und die Präsentation von diesem Antigen mithilfe der MHC-I- oder -II-Moleküle im Rahmen der Kreuzpräsentation [Baker et al., 2013].

In unseren Versuchen konnte eine enge räumliche Nähe zwischen HLA-DR und Fc γ -Rezeptor I und II gezeigt werden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 16 dargestellt. In der Abbildung 17 ist eine Kolokalisation zwischen APN und Fc-Rezeptoren sowie zwischen Fc-Rezeptoren und HLA-DR dargestellt. Der direkte Nachweis der Kolokalisation zwischen APN und HLA-DR war leider nicht erfolgreich (Vergleich Tabelle 14).

Funktionell betrachtet, bedeutet Kolokalisation zwischen APN, Fc-Rezeptoren und HLA-DR eine mögliche Beteiligung der APN an Chemotaxis, Phagozytose und Antigenprozessierung. Wie bereits im Kapitel 5.5.1 diskutiert, ist eine nichtenzymatische Beteiligung der APN denkbar. Im Falle der Antigenprozessierung ist auch eine enzymatische Interaktion denkbar.

5.6 Stimulationsversuche

Durch die Stimulation von myeloischen Zelllinien THP-1 und U937 mit LPS, Substanz-P, IL-4 und TPA soll geprüft werden, ob es auch zu einer räumlichen Veränderung zwischen APN und Fc-Rezeptoren kommt.

5.6.1 Stimulation mit LPS

LPS bindet an Mustererkennungsrezeptoren und stimuliert Phagozytose. Die Auswirkung der Stimulation mit LPS auf APN wurde in dieser Arbeit und zu einem späteren Zeitpunkt durch die Arbeitsgruppe von Shapiro untersucht [Subramani et al., 2013].

In unseren Experimenten hat die Stimulation mit LPS zur Verringerung der Expression von CD32 bei in etwa gleichbleibender Expression von CD13 und CD64 (Abbildung 12) geführt. Dabei war die Kolokalisation zwischen APN und den Fc-Rezeptoren stets nachweisbar und wurde von der Stimulation nicht beeinflusst.

In der Arbeit von Pfeiffer et al. [2001] wurde eine Kolokalisation zwischen CD14 und den Fc γ -Rezeptoren-I und -II sowie CD18 auf Monozyten gezeigt. Nach Stimulation mit LPS kam es zu einer signifikante Steigerung von FRET zwischen CD18 und CD14. Eine Veränderung von FRET zwischen CD64 und CD32 und CD18 auf THP-1-Zellen wurde nicht beobachtet. Dort wurde nach Aktivierung von Monozyten mit LPS eine Cluster-Bildung zwischen CD18/CD11b und CD14 und Toll-like Rezeptor-4 (TLR4) beobachtet. Zudem wurde gezeigt, wie ein Teil von CD32 durch CD16 ersetzt wurde.

In Anlehnung an die Arbeit von [Pfeiffer et al., 2001] wurde in unseren Experimenten ebenfalls mit 40 ng/ml LPS über 15 min stimuliert. Unsere Arbeit zeigt eine Interaktion zwischen APN und Fc-Rezeptoren auf monozytär- differenzierten THP-1-Zellen. Die Abstände zwischen APN und Fc γ -Rezeptoren-I und -II bleiben nach Stimulation mit LPS gleich, was mit der Aussage der Arbeit von Pfeiffer et al. [2001] übereinstimmt.

Anhand von unseren Daten wurde eine modulatorische Rolle von APN nach LPS-Stimulation vermutet, die jedoch nicht über FC-Rezeptoren abzulaufen schien. Eine direkte Kolokalisation zwischen APN und CD14 konnte in unseren FRET-Experimenten nicht gezeigt werden (Daten nicht publiziert).

In der Arbeit von Ghosh et al. [2015] führt die Stimulation mit LPS auf Monozyten zu einer Bindung von LPS an CD14 und Cluster-Bildung zwischen TLR4 und CD14/LPS-Komplexen. Diese Cluster-Bildung führt zu einer zeitabhängigen Endozytose und Internalisierung von TLR4-APN-Dynamin-Komplexen. Der Effekt ist ca. 40 min nach Stimulation mit LPS maximal ausgeprägt. Bei CD13^{KO}-Mäusen konnte keine TLR4-vermittelte Aktivierung mehr nachgewiesen werden. Somit ist es möglich, dass Fc γ -Rezeptor II, der mit CD13 kolokalisiert ist, im gleichen Zug internalisiert wird.

In der Arbeit von Huschak et al. [2003] wurde beschrieben, dass die Stimulation von peripheren Blutmonozyten mit LPS zur Steigerung der CD13-Expression führt. Die Stimulationsdauer betrug dabei zwischen einem und 3 Tagen. In dieser Arbeit wählten wir eine kürzere Stimulationsdauer von 5 Minuten aus. Die 5 Minuten reichen offenbar nicht aus um den Effekt in vollem Umfang zu erzeugen.

Der biologische Sinn dieser Interaktion könnte im Rahmen der M1-Differenzierung von THP-1-Zellen zu den «Effektorzellen der Opsonierung» erklärt sein. Dabei wird die stimulierende Wirkung von Fc γ -Rezeptor II nicht mehr benötigt und wird deswegen herunterreguliert. Durch die Regulation der Rezeptor-vermittelten Antigen-Aufnahme in DCs erfolgt die Kontrolle von Aktivierungsgrad der T-Zellen [Ghosh et al., 2015], damit wird die zentrale Rolle der APN an der Schaltstelle zwischen unspezifischer und spezifischer Immunantwort deutlich.

5.6.2 Stimulation mit Substanz P

SP ist ein Neuropeptid und gehört zur Gruppe der Tachykine. Die Wirkung der Substanz P wird durch die Bindung an den G-Protein-gekoppelten Neurokinin Rezeptor (NKR) vermittelt.

Die Produktion von SP konnte in Granulozyten, Monozyten und Makrophagen [Ho et al., 1997] sowie auf Eosinophilen [Aliakbari et al., 1987] und auf peripheren Blutmonozyten [Lai et al., 1998, 1999] identifiziert werden.

SP blockiert die enzymatische Aktivität von APN [Xu et al., 1995]. Die Röntgen-Struktur-Untersuchungen von APN haben gezeigt, wie SP den Kanal zum aktiven Zentrum des Enzyms sterisch blockiert [Chen et al., 2012]. Dadurch wird eine hemmende Wirkung der SP auf die Enzymeigenschaften von APN erklärt.

Als biologische Konsequenz dieser Interaktion vermutete Chen et al. [2012] eine Initialisierung der Signaltransduktion.

Vorliegende Arbeit sollte klären, ob die Bindung von Substanz P an APN zu einer Veränderung der Expression und/oder zur Veränderung des Abstandes zwischen APN und den Fc γ -Rezeptoren-I und -II führt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Veränderung der Expression von APN oder von Fc γ -Rezeptor I oder II gesehen werden. Auch der Abstand zwischen 2 APN-Monomeren sowie zwischen Fc γ -Rezeptoren und APN war von der Stimulation nicht beeinflusst.

5.6.3 Stimulation mit IL-4

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir eine Heraufregulation von APN nach Stimulation mit IL-4 auf PM-Zellen zeigen. Dies deckt sich mit den Daten von [Kunii et al., 2005] auf Fibroblasten und [van Hal et al., 1994] auf peripheren Blutmonozyten.

Membranpeptidasen können durch Zytokine moduliert werden. IL-4 und IFN- γ führen in Nieren-Epithel- und Nierentumoren zur Heraufregulation von APN, jedoch nicht von DPPIV/CD26 [Riemann et al., 1994a]. Die oft mit APN und DPPIV kolokalisierte Membranpeptidase NEP/CD10 steigert ihre Expression in SFCs nach Stimulation mit IL-4. Der Effekt bleibt auf Lymphozyten-Kulturen aus [Riemann, 2002].

In unseren Experimenten konnten wir eine tendenzielle Steigerung der Expression von HLA-DR zeigen. Die Ergebnisse liegt in einem Trend mit den Daten von Huschak et al. [2003], erhoben auf peripheren Blutmonozyten. Wir zeigten auch eine Reduktion der Expression von CD64. Ähnliche Ergebnisse wurden von Boltz-Nitulescu et al. [1995] auf Monozyten, MM6, THP-1 und U93 gezeigt.

Die signifikante Reduktion der Expression von aktivierenden CD64 und Steigerung des Abstandes zwischen zu APN deuten auf die Reduktion der Aktivierung der Zellaktivität. Die Vorgänge sind in der Abbildung 18 verdeutlicht. Eine biologische Erklärung für diesen Sachverhalt kann in der antiinflammatorischen Wirkung von IL-4 liegen. Die Expression von CD32 blieb hingegen in etwa gleich. Auch die FRET-Effizienz zwischen APN und Fc γ -Rezeptor II/CD32 ist gleich geblieben.

Aus der Literatur ist bekannt, dass IL-4 ein anti-inflammatorisches Zytokin ist das an verschiedenen regulatorischen Prozessen beteiligt ist. Die Wirkung von IL-4 ist über die Bindung des Zytokins an den IL-4-Rezeptor vermittelt [Moshkovits et al., 2015].

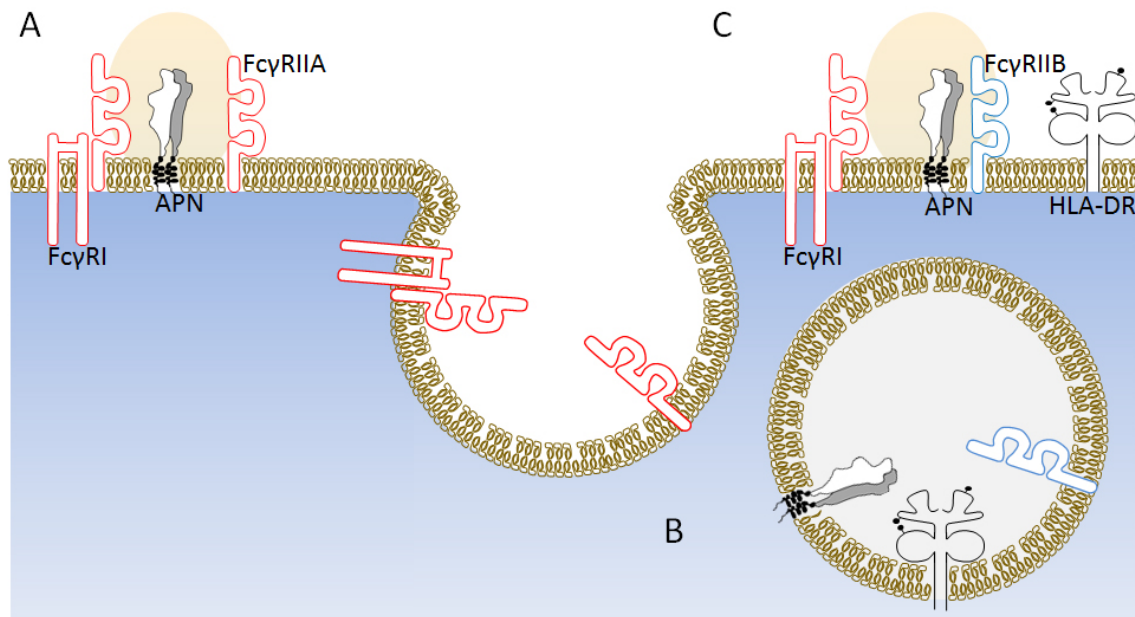


Abbildung 18 Schematische Darstellung der Interaktionen nach Stimulation mit IL-4

A Schematische Darstellung der Expression von APN mit Fc-Rezeptoren und HLA-DR auf der Oberfläche von Perikardmakrophagen. Die ovale Fläche stellt den Abstand zwischen 1-10 nm dar (FRET); **B** nach Stimulation mit IL-4 kommt es zu Umverteilung auf der Zelloberfläche, hier in Form der Endo- und Exocytose dargestellt. Dabei werden die stimulierenden Rezeptoren Fc- γ I und IIA eliminiert und Fc- γ IIB exprimiert. Die Expression von APN und HLA-DR nehmen zu; **C** Die Umverteilung hat zur Verringerung des Abstandes zwischen APN und Fc γ -RIIB, sowie zur Zunahme des Abstandes zwischen APN und Fc- γ I geführt. Trotz Zunahme der Expression findet sich kein FRET zwischen APN und HLA-DR

Die Stimulation von PM mit IL-4 führt zur Zunahme der Expression des inhibierenden Fc γ -Rezeptors-IIB, um den Aktivierungsgrad der IgG-vermittelten Vorgänge wie z.B. Infektion zu senken [Pincetic et al., 2014]. Zudem kommt es zur «alternativen Aktivierung» von M Φ mit Ausbildung eines s.g. M2-Phänotyps. Die M2-M Φ sind an der Hemmung proinflammatorischer Stimuli und Förderung der Reparaturprozesse beteiligt [Gordon, 2003]. Vor diesem Hintergrund kann die gleichbleibende Expression von CD32 durch die Zunahme der inhibierenden Subpopulation bei gleichzeitiger Abnahme der aktivierenden Population (Fc γ -RIIA) vermutet werden. Zudem bedingt die IL-4-vermittelte Steigerung der Expression von Fc γ -RIIB eine Zunahme der Expression von HLA-II und HLA-I-Molekülen [Nimmerjahn and Ravetch, 2008].

Somit scheint APN eine antiinflammatorische Rolle zu spielen, indem es die aktivierende Rezeptoren verlässt und die inhibierenden stimuliert. Im Bezug auf das Zusammenspiel zwischen APN und HLA-DR lassen sich keine direkte Einflüsse ableiten.

5.6.4 Stimulation von U937-Zellen mit TPA

TPA ist ein Phorbolster. Durch die Stimulation mit TPA kann eine unreife monozytäre Zelllinie, wie U937, in Richtung der reifen Monozyten differenziert werden [Nilsson et al., 1980].

In unseren Experimenten haben wir auf U937-Zellen eine signifikante Zunahme der Expression von APN nach der Stimulation mit TPA gezeigt.

Wenn man das Expressions-Niveau von CD13 vor und nach TPA-Stimulation mit der Expression von CD13 auf anderen Zellen vergleicht, so kommt man in den Bereich der peripheren Blut-Monozyten bzw. Perikard-Makrophagen. Die Steigerung der Expression von APN kann Folge der TPA-vermittelten Ausreifung der U937-Zellen zu M Φ -ähnlichen Zellen sein. Die Expression von Fc γ -Rezeptor II bleibt von der Stimulation mit TPA unbeeinflusst. In der Literatur ist eine durch TPA-Stimulation vermittelte Herunterregulation der Expression von CD64 auf der myelo-monozytären Zelllinie HL-60 beschrieben [White et al., 2005].

In unseren Experimenten war die Expression von CD64 niedrig, jedoch deutlich von der Isotyp-Kontrolle zu trennen. Nach Stimulation mit TPA steigt die Expression von CD64 an und erreicht das Expressions-Niveau, das wir von peripheren Blutmonozyten kennen. Eine mögliche Erklärung könnte eine weitere initiale Ausreifung von U937 (Monozyt/Makrophage) sein.

Die Stimulation mit TPA auf U937-Zellen führt zur Steigerung der Expression von APN und HLA-DR.

Frühere Arbeiten [Bianchi-Scarrá et al., 1993] über den Einfluss von TPA auf das Expressionsverhalten von HLA-DR und APN haben gezeigt, dass die Expression von HLA-DR um 13,6 % zunimmt, während die Expression von CD13 um 10,7 % abnimmt. Auch in unseren Experimenten war die Zunahme der Expression von HLA-DR um 8,1 %. Im Bezug auf APN war in unseren Experimenten eine Steigerung um 260 % zu verzeichnen.

In der Arbeit von Bianchi-Scarrá et al. [1993] wurde mit TPA in der Dosierung von 10^{-7} mol/l über 24 Std. inkubiert, während in unserer Arbeit, bei gleicher Dosierung, die Dauer der Stimulation 48 Stunden betrug.

Die Arbeiten von [Hatanaka et al., 2002] und [Liu et al., 2012] auf einer unreifen monozytären Zelllinie HL-60 bestätigen unsere Ergebnisse. Die Steigerung der FRET-Effizienz zwischen HLA-DR und APN nach der Stimulation mit TPA lässt vermuten, dass die durch TPA induzierten Wachstums-/Differenzierungsvorgänge eine engere räumliche Nähe zwischen APN und HLA-DR notwendig machen. Biologisch könnte die Interaktion bedeuten, dass APN und HLA-DR an gleichen Signaltransduktionswegen beteiligt sind, die während der Differenzierung von U937-Zellen zu Monozyten/M Φ aktiviert werden. Ob es dadurch zu einer Steigerung der intrazellulären Ca²⁺-Freisetzung kommt, lässt sich sicherlich anhand der FRET-Messungen nicht belegen. Hierzu sind weiterführende Experimente notwendig.

5.6.5 Interaktion zwischen APN/CD13, NEP/CD10, DPPIV/CD26 und CXCR4

Sowohl CXCR4 als auch APN/CD13 [Mina-Osorio et al., 2008], DPPIV/CD26 [Herlihy et al., 2013] und NEP [Roques et al., 1993] sind an der Chemotaxis beteiligt. Durch die enzymatische Aktivität können die Metallopeptidasen chemotaktisch wirksame Peptide inaktivieren und so die Chemotaxis steuern. CXCR4 ist der einzige bekannte Rezeptor für das Chemokin SDF-1 α . Strukturell gehört CXCR4 zur Klasse der transmembranären G-Protein-gekoppelten 7-Transmembranproteine. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor führt zur Chemotaxis von Zellen zum Ort der SDF-1 α -Freisetzung. Die DPPIV ist in der Lage, SDF-1 α enzymatisch zu spalten und dadurch die Bindung an CXCR4 zu verhindern. CXCR4 wurde wie APN in den «lipid rafts» gefunden

[Chinni et al., 2008]. Es ist nicht klar ob die Interaktion zwischen CXCR4 und Metallopeptidasen nur enzymabhängig abläuft. Denkbar wäre eine intrazelluläre Steuerung der Empfindlichkeit von CXCR4. Hierfür wird eine räumliche Nähe vorausgesetzt. Durch die FRET-Untersuchungen sollte geprüft werden, ob die enge räumliche Nähe zwischen Metallopeptidasen und CXCR4, als Hinweis für eine mögliche nicht-enzymatische Interaktion vorliegt.

Anhand der Befunde der FRET-Untersuchungen konnte keine räumliche Nähe zwischen APN, NEP und DPPIV gezeigt werden. Ob eine räumliche Nähe nur unter bestimmten Voraussetzungen (wie z.B. Stimulation mit Liganden; bestimmte Aktivierungsprozesse wie Wachstum, Differenzierung, Infektion etc.) zu Stande kommt, kann diese Arbeit nicht beantworten. In der Arbeit von [Wulfänger et al., 2008] konnte eine enzymabhängig Modulation von CXCR4 vermittelter Chemotaxis durch APN gezeigt werden. Eine enzymunabhängige, rezeptor-vermittelte Interaktion konnte für diesen Prozess nicht bewiesen werden.

6 Zusammenfassung

Die Metallopeptidasen APN, NEP und DPPIV sind ubiquitär verbreitet. Die Funktion der Proteine ist komplex und noch nicht ganz verstanden. So haben die Proteine auch enzymunabhängige Funktionen in der Membran und sind Bestandteile von Membranmikrodomänen.

Mittels durchflusszytometrischer FRET-Messung führten wir eine Studie der Kollokalisierung der Membranproteine APN, NEP und DPPIV mit andern Membranproteinen auf Immunzellen durch. Wir verwendeten dabei mit Fluorochromen Phycoerythrin und Cyanin 5 markierte Antikörper. Es zeigte sich eine enge räumliche Beziehung zwischen APN und Fc- γ -Rezeptoren-I und -II auf den monozytären Zellen U937 und THP-1. Die Beziehung konnte mit Koimmunopräzipitation und im Rahmen der Zusammenarbeit mit Panum-Institut Kopenhagen mit Immungold-Elektronen-Mikroskopie bestätigt werden [Riemann et al., 2005].

Zur Kalibrierung des Systems wurde eine Positiv- und eine Negativkontrolle etabliert. Bei Positivkontrolle wurde FRET zwischen 2 APN-Monomeren, oder zwischen HLA-Typ-I und β 2-Mikroglobulin gemessen.

Die FRET-Messung zwischen APN/CD13 und Siglec-3/CD33 wurde auf den myeloischen Zellen als Negativkontrolle etabliert.

Wir konnten zeigen wie die Stimulation mit TPA zur signifikanten Steigerung der Expression von APN/CD13 und CD64 auf der monozytären Zelllinie U937, jedoch zu keiner Veränderung der Abstände zwischen Fc-Rezeptor-II und -I und APN führt. Nach Stimulation mit IL-4 konnte eine Steigerung der Expression von APN gesehen werden. Zudem zeigten wir wie APN von CD64 weg und zu CD32 hin rückt. Zudem konnten wir zeigen, dass APN mit HLA-DR auf U937-kollokalisiert ist. Nach Stimulation mit TPA nimmt die räumliche Nähe zwischen APN und HLA-DR zu.

Auf THP-1 Zellen fanden wir eine enge räumliche Beziehung zwischen APN/CD13 mit den Integrinen CD11b/CD18.

Die durchflusszytometrische FRET-Messung erwies sich als eine probate Methode zur flächenhaften Untersuchung der intermolekularen Beziehungen auf der Zelloberfläche.

7 Literaturverzeichnis

- ABBOTT, C. A. ; BAKER, E. ; SUTHERLAND, G. R. ; MCCAUGHAN, G. W.: Genomic organization, exact localization, and tissue expression of the human CD26 (dipeptidyl peptidase IV) gene. In: *Immunogenetics* 40 (1994), Nr. 5, S. 331–8
- ALIAKBARI, J. ; SREEDHARAN, S. P. ; TURCK, C. W. ; GOETZL, E. J.: Selective localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in human eosinophils. In: *Biochem Biophys Res Commun* 148 (1987), Nov, Nr. 3, S. 1440–1445
- 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. In: *Blood* 79 (1992), Nr. 12, S. 3344–9
- BAKER, Kristi ; RATH, Timo ; LENCER, Wayne I. ; FIEBIGER, Edda ; BLUMBERG, Richard S.: Cross-presentation of IgG-containing immune complexes. In: *Cell Mol Life Sci* 70 (2013), Apr, Nr. 8, 1319–1334. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-012-1100-8>. – DOI 10.1007/s00018-012-1100-8
- BARKER, P. E. ; SHIPP, M. A. ; D'ADAMIO, L. ; MASTELLER, E. L. ; REINHERZ, E. L.: The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3 (q21-q27). In: *J Immunol* 142 (1989), Nr. 1, S. 283–7
- BAUVOIS, Brigitte: Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis? In: *Oncogene* 23 (2004), Nr. 2, S. 317–329
- BEAUMONT, A. ; BROUET, J. C. ; ROQUES, B. P.: Neutral endopeptidase 24.11 and angiotensin converting enzyme like activity in CALLA positive and CALLA negative lymphoid cells. In: *Biochem Biophys Res Commun* 160 (1989), Nr. 3, S. 1323–9
- BECTON, Dickinson ; COMPANY: *BD FACSCalibur Instructions For Use*. Becton&Dickinson, 11 2007. http://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSCalibur_instructions.pdf
- BENE, M. C.: Immunophenotyping of acute leukaemias. In: *Immunol Lett* 98 (2005), Nr. 1, S. 9–21
- BEUTLER, Bruce ; RIETSCHEL, Ernst T.: Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. In: *Nat Rev Immunol* 3 (2003), Feb, Nr. 2, 169–176. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1004>. – DOI 10.1038/nri1004
- BIANCHI-SCARRÁ, G. ; MUSSO, M. ; CUTRONA, G. ; FIORENTINI, P. ; ZARCONE, D. ; PISTOIA, V. ; GARRÉ, C.: H and L ferritin gene expression in U937 cells induced to macrophage differentiation. In: *Leuk Lymphoma* 12 (1993), Dec, Nr. 1-2, 109–115. <http://dx.doi.org/10.3109/10428199309059578>. – DOI 10.3109/10428199309059578
- BLANCO, J. ; MARIÉ, I. ; CALLEBAUT, C. ; JACOTOT, E. ; KRUST, B. ; HOVANESSIAN, A. G.: Specific binding of adenosine deaminase but not HIV-1 transactivator protein Tat to human CD26. In: *Exp Cell Res* 225 (1996), May, Nr. 1, 102–111. <http://dx.doi.org/10.1006/excr.1996.0161>. – DOI 10.1006/excr.1996.0161

- BOLTZ-NITULESCU, G. ; WILLHEIM, M. ; SPITTLER, A. ; LEUTMEZER, F. ; TEMPFER, C. ; WINKLER, S.: Modulation of IgA, IgE, and IgG Fc receptor expression on human mononuclear phagocytes by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and cytokines. In: *J Leukoc Biol* 58 (1995), Nr. 2, S. 256–62
- BOURNAZOS, Stylianos ; HART, Simon P. ; CHAMBERLAIN, Luke H. ; GLENNIE, Martin J. ; DRANSFIELD, Ian: Association of FcγRIIa (CD32a) with lipid rafts regulates ligand binding activity. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (2009), Juni, S. 8026–8036. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0900107>. – DOI 10.4049/jimmunol.0900107. – ISSN 1550–6606
- BRISTOL, L. A. ; SAKAGUCHI, K. ; APPELLA, E. ; DOYLE, D. ; TAKACS, L.: Thymocyte costimulating antigen is CD26 (dipeptidyl-peptidase IV). Costimulation of granulocyte, macrophage, and T lineage cell proliferation via CD26. In: *J Immunol* 149 (1992), Nr. 2, S. 367–72
- BHLING, F. ; KUNZ, D. ; REINHOLD, D. ; ULMER, A. J. ; ERNST, M. ; FLAD, H. D. ; ANSORGE, S.: Expression and functional role of dipeptidyl peptidase IV (CD26) on human natural killer cells. In: *Nat Immun* 13 (1994), Nr. 5, S. 270–9
- CASCALES, E. Bachelard ; CHAPELLIER, M. ; DELAY, E. ; POCHON, G. ; VOELTZEL, T. ; PUISIEUX, A. ; FROMENTEL, C. Caron d. ; MAGUER-SATTA, V.: The CD10 enzyme is a key player to identify and regulate human mammary stem cells. In: *Stem Cells* 28 (2010), Nr. 6, S. 1081–8
- CATTARUZZA, Fiore ; POOLE, Daniel P. ; BUNNETT, Nigel W.: Arresting inflammation: contributions of plasma membrane and endosomal signalling to neuropeptide-driven inflammatory disease. In: *Biochem Soc Trans* 41 (2013), Feb, Nr. 1, 137–143. <http://dx.doi.org/10.1042/BST20120343>. – DOI 10.1042/BST20120343
- CHEN, L. ; LIN, Y. L. ; PENG, G. ; LI, F.: Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase N. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (2012), Nr. 44, S. 17966–71
- CHINNI, S. R. ; YAMAMOTO, H. ; DONG, Z. ; SABBOTA, A. ; BONFIL, R. D. ; CHER, M. L.: CXCL12/CXCR4 transactivates HER2 in lipid rafts of prostate cancer cells and promotes growth of metastatic deposits in bone. In: *Mol Cancer Res* 6 (2008), Nr. 3, S. 446–57
- D'ADAMIO, L. ; SHIPP, M. A. ; MASTELLER, E. L. ; REINHERZ, E. L.: Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple minixons and separate 5' untranslated regions. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989), Nr. 18, S. 7103–7
- DANIELSEN, E. M.: Perturbation of intestinal microvillar enzyme biosynthesis by amino acid analogs. Evidence that dimerization is required for the transport of aminopeptidase N out of the endoplasmic reticulum. In: *J Biol Chem* 265 (1990), Aug, Nr. 24, S. 14566–14571
- DANIELSEN, E. M.: Involvement of detergent-insoluble complexes in the intracellular transport of intestinal brush border enzymes. In: *Biochemistry* 34 (1995), Feb, Nr. 5, S. 1596–1605
- DANZIGER, R. S.: Aminopeptidase N in arterial hypertension. In: *Heart Fail Rev* 13 (2008), Nr. 3, S. 293–8

- DAVIS, Trisha N. ; MULLER, Eric G.: Measuring the Proximity of Proteins in Living Cells by Fluorescence Resonance Energy Transfer between CFP and YFP. In: STARK, Ian Stansfield & Michael J. (Hrsg.): *Yeast Gene Analysis* Bd. 36. Second. Academic Press in an import of Elsevier, 2007, Kapitel 12, S. 269–280
- DAVOODI, Jamshid ; KELLY, John ; GENDRON, Nathalie H. ; MACKENZIE, Alex E.: The Simpson-Golabi-Behmel syndrome causative Glypican-3, binds to and inhibits the dipeptidyl peptidase activity of CD26. In: *PROTEOMICS* 7 (2007), Nr. 13, 2300–2310. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200600654>. – DOI 10.1002/pmic.200600654. – ISSN 1615–9861
- DE MEESTER, I. ; KOROM, S. ; VAN DAMME, J. ; SCHARPE, S.: CD26, let it cut or cut it down. In: *Immunol Today* 20 (1999), Nr. 8, S. 367–75
- 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. In: *Nature* 357 (1992), Nr. 6377, S. 417–20
- DEVAULT, A. ; LAZURE, C. ; NAULT, C. ; LE MOUAL, H. ; SEIDAH, N. G. ; CHRETIEN, M. ; KAHN, P. ; POWELL, J. ; MALLET, J. ; BEAUMONT, A. ; AL. et: Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) deduced from a complementary DNA. In: *EMBO J* 6 (1987), Nr. 5, S. 1317–22
- ELGHETANY, M T.: Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. In: *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 28 (2002), Nr. 2, S. 260–274
- FAIDLEY, TD ; LEITING, B ; PRYOR, KD ; LYONS, K ; HICKEY, GJ ; THOMPSON, DR: Inhibition of dipeptidyl-peptidase IV does not increase circulating IGF-1 concentrations in growing pigs. In: *Experimental Biology and Medicine* 231 (2006), Nr. 8, S. 1373–1378
- FRERKER, Nadine ; WAGNER, Leona ; WOLF, Raik ; HEISER, Ulrich ; HOFFMANN, Torsten ; RAHFELD, Jens-Ulrich ; SCHADE, Jutta ; KARL, Tim ; NAIM, Hassan Y. ; ALFALAH, Marwan ; DEMUTH, Hans-Ulrich ; HÖRSTEN, Stephan von: Neuropeptide Y (NPY) cleaving enzymes: Structural and functional homologues of dipeptidyl peptidase 4. In: *Peptides* 28 (2007), Nr. 2, 257 - 268. <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.09.027>. – DOI <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.09.027>. – ISSN 0196–9781. – NPY AND COHORTS IN HUMAN DISEASE
- FRUEHAUF, S. ; TOPALY, A. ; WILMES, A. ; HO, A.D.: *Onkologie*. Ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co. KG, 2001. – 1–32 S. – Zeller, W.J. and ZurHausen H.
- FULCHER, I. S. ; KENNY, A. J.: Proteins of the kidney microvillar membrane. The amphipathic forms of endopeptidase purified from pig kidneys. In: *Biochem J* 211 (1983), Nr. 3, S. 743–53
- FUTOSI, Krisztina ; FODOR, Szabina ; MÓCSAI, Attila: Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. In: *Int Immunopharmacol* 17 (2013), Dec, Nr. 4, 1185–1197. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2013.11.010>. – DOI 10.1016/j.intimp.2013.11.010

- GHOSH, Mallika ; SUBRAMANI, Jaganathan ; RAHMAN, M M. ; SHAPIRO, Linda H.: CD13 restricts TLR4 endocytic signal transduction in inflammation. In: *J Immunol* 194 (2015), May, Nr. 9, 4466–4476. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1403133>. – DOI 10.4049/jimmunol.1403133
- GLAZER, A. N. ; STRYER, L.: Fluorescent tandem phycobiliprotein conjugates. Emission wavelength shifting by energy transfer. In: *Biophys J* 43 (1983), Sep, Nr. 3, 383–386. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(83\)84361-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(83)84361-6). – DOI 10.1016/S0006-3495(83)84361-6
- GLIDDON, D. R. ; HOWARD, C. J.: CD26 is expressed on a restricted subpopulation of dendritic cells in vivo. In: *Eur J Immunol* 32 (2002), Nr. 5, S. 1472–81
- GORDON, S.: Alternative activation of macrophages. In: *Nat Rev Immunol* 3 (2003), Nr. 1, S. 23–35
- GREEN, JM ; SCHREIBER, AD ; BROWN, EJ: Role for a glycan phosphoinositol anchor in Fc gamma receptor synergy. In: *J Cell Biol* 139 (1997), Dec, Nr. 5, S. 1209–1217
- GRIMM, Marcus O W. ; METT, Janine ; STAHLMANN, Christoph P. ; HAUPENTHAL, Viola J. ; ZIMMER, Valerie C. ; HARTMANN, Tobias: Neprilysin and $A\beta$ Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease. In: *Front Aging Neurosci* 5 (2013), 98. <http://dx.doi.org/10.3389/fnagi.2013.00098>. – DOI 10.3389/fnagi.2013.00098
- HAL, P. T. ; HOPSTAKEN-BROOS, J. P. ; PRINS, A. ; FAVALORO, E. J. ; HUIJBENS, R. J. ; HILVERING, C. ; FIGDOR, C. G. ; HOOGSTEDEN, H. C.: Potential indirect anti-inflammatory effects of IL-4. Stimulation of human monocytes, macrophages, and endothelial cells by IL-4 increases aminopeptidase-N activity (CD13; EC 3.4.11.2). In: *J Immunol* 153 (1994), Nr. 6, S. 2718–28
- HATANAKA, Y. ; ASHIDA, H. ; HASHIZUME, K. ; FUKUDA, I. ; SANO, T. ; YAMAGUCHI, Y. ; ENDO, T. ; TANI, Y. ; SUZUKIA, K. ; DANNO, G.: Up-regulation of CD13/aminopeptidase N induced by phorbol ester is involved in redox regulation and tumor necrosis factor alpha production in HL-60 cells. In: *Inflammation* 26 (2002), Nr. 4, S. 175–81
- HEGEN, M. ; KAMEOKA, J. ; DONG, R. P. ; SCHLOSSMAN, S. F. ; MORIMOTO, C.: Cross-linking of CD26 by antibody induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase. In: *Immunology* 90 (1997), Nr. 2, S. 257–64
- HERLIHY, Sarah E. ; PILLING, Darrell ; MAHARJAN, Anu S. ; GOMER, Richard H.: Dipeptidyl peptidase IV is a human and murine neutrophil chemorepellent. In: *J Immunol* 190 (2013), Jun, Nr. 12, 6468–6477. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1202583>. – DOI 10.4049/jimmunol.1202583
- HILDEBRANDT, M. ; REUTTER, W. ; ARCK, P. ; ROSE, M. ; KLAPP, B. F.: A guardian angel: the involvement of dipeptidyl peptidase IV in psychoneuroendocrine function, nutrition and immune defence. In: *Clin Sci (Lond)* 99 (2000), Nr. 2, S. 93–104
- HILLMEN, P. ; RICHARDS, S. J.: Implications of recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. In: *Br J Haematol* 108 (2000), Mar, Nr. 3, S. 470–479
- HO, W. Z. ; LAI, J. P. ; ZHU, X. H. ; UVAYDOVA, M. ; DOUGLAS, S. D.: Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. In: *J Immunol* 159 (1997), Dec, Nr. 11, S. 5654–5660

- HOFMAN, P. ; SELVA, E. ; LE NEGRATE, G. ; D'ANDREA, L. ; GUERIN, S. ; ROSSI, B. ; AUBERGER, P.:
CD10 inhibitors increase f-Met-Leu-Phe-induced neutrophil transmigration. In: *J Leukoc Biol*
63 (1998), Nr. 3, S. 312–20
- HOOPER, N. M.: Families of zinc metalloproteases. In: *FEBS Lett* 354 (1994), Nr. 1, S. 1–6
- HOPUSU-HAVU, V. K. ; GLENNER, G. G.: A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-
prolyl-beta-naphthylamide. In: *Histochemie* 7 (1966), Nr. 3, S. 197–201
- HUHN, J. ; EHRlich, S. ; FLEISCHER, B. ; BONIN, A. von: Molecular analysis of CD26-mediated
signal transduction in T cells. In: *Immunol Lett* 72 (2000), Nr. 2, S. 127–32
- HUSCHAK, G. ; ZUR NIEDEN, K. ; STUTTMANN, R. ; RIEMANN, D.: Changes in monocytic expression
of aminopeptidase N/CD13 after major trauma. In: *Clin Exp Immunol* 134 (2003), Dec, Nr. 3, S.
491–496
- IWASE, Akira ; SHEN, Ruoqian ; NAVARRO, Daniel ; NANUS, David M.: Direct binding of neutral
endopeptidase 24.11 to ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins competes with the interaction of
CD44 with ERM proteins. In: *J Biol Chem* 279 (2004), Mar, Nr. 12, 11898–11905. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M212737200>. – DOI 10.1074/jbc.M212737200
- JACKMAN, H. L. ; TAN, F. ; SCHRAUFNAGEL, D. ; DRAGOVIC, T. ; DEZSO, B. ; BECKER, R. P. ; ERDOS,
E. G.: Plasma membrane-bound and lysosomal peptidases in human alveolar macrophages.
In: *Am J Respir Cell Mol Biol* 13 (1995), Nr. 2, S. 196–204
- JENKE, Alexander ; WILK, Sabrina ; POLLER, Wolfgang ; ERIKSSON, Urs ; VALAPERTI, Alan ; RAUCH,
Bernhard H. ; STROUX, Andrea ; LIU, Peter ; SCHULTHEISS, Heinz-Peter ; SCHEIBENBOGEN, Car-
men ; SKURK, Carsten: Adiponectin protects against Toll-like receptor 4-mediated cardiac in-
flammation and injury. In: *Cardiovasc Res* 99 (2013), Aug, Nr. 3, 422–431. <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvt118>. – DOI 10.1093/cvr/cvt118
- JOO, H. G. ; GOEDEGEBUURE, P. S. ; SADANAGA, N. ; NAGOSHI, M. ; VON BERNSTORFF, W. ; EBER-
LEIN, T. J.: Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in acti-
vated T lymphocytes. In: *J Leukoc Biol* 69 (2001), Apr, Nr. 4, S. 555–564
- KAROOR, Vijaya ; OKA, Masahiko ; WALCHAK, Sandra J. ; HERSH, Louis B. ; MILLER, York E. ;
DEMPSEY, Edward C.: Nepriylisin regulates pulmonary artery smooth muscle cell phenotype
through a platelet-derived growth factor receptor-dependent mechanism. In: *Hypertension* 61
(2013), Apr, Nr. 4, 921–930. <http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.199588>. – DOI
10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.199588
- KEANE, Fiona M. ; NADVI, Naveed A. ; YAO, Tsun-Wen ; GORRELL, Mark D.: Neuropeptide Y, B-
type natriuretic peptide, substance P and peptide YY are novel substrates of fibroblast activa-
tion protein-Alpha. In: *FEBS Journal* 278 (2011), Nr. 8, 1316–1332. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08051.x>. – DOI 10.1111/j.1742-4658.2011.08051.x. – ISSN 1742–4658
- KEHLEN, A. ; GEISLER, M. ; OLSEN, J. ; SABLITZKI, A. ; LANGNER, J. ; RIEMANN, D.: IL-10 and TGF-
beta differ in their regulation of aminopeptidase N/CD13 expression in monocytes. In: *Int J Mol
Med* 13 (2004), Nr. 6, S. 877–82

- KEHLEN, A. ; GÖHRING, 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. In: *Clin Exp Immunol* 111 (1998), Feb, Nr. 2, S. 435–441
- KEHLEN, A. ; OLSEN, J. ; LANGNER, J. ; RIEMANN, D.: Increased lymphocytic aminopeptidase N/CD13 promoter activity after cell-cell contact. In: *J Cell Biochem* 80 (2000), Sep, Nr. 1, S. 115–123
- KENNY, A. J. ; STEPHENSON, S. L.: Role of endopeptidase-24.11 in the inactivation of atrial natriuretic peptide. In: *FEBS Lett* 232 (1988), Nr. 1, S. 1–8
- KERR, M. A. ; KENNY, A. J.: The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. In: *Biochem J* 137 (1974), Nr. 3, S. 477–88
- KLEMANN, Christian ; WAGNER, Leona ; STEPHAN, Michael ; HÖRSTEN, Stephan von: Cut to the chase: a review of CD26/dipeptidyl peptidase-4's (DPP4) entanglement in the immune system. In: *Clinical & Experimental Immunology* 185 (2016), Nr. 1, S. 1–21
- KONIG, M. ; ZIMMER, A. M. ; STEINER, H. ; HOLMES, P. V. ; CRAWLEY, J. N. ; BROWNSTEIN, M. J. ; ZIMMER, A.: Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in pre-proenkephalin. In: *Nature* 383 (1996), Nr. 6600, S. 535–8
- KUNII, R. ; NEMOTO, E. ; KANAYA, S. ; TSUBAHARA, T. ; SHIMAUCHI, H.: Expression of CD13/aminopeptidase N on human gingival fibroblasts and up-regulation upon stimulation with interleukin-4 and interleukin-13. In: *J Periodontal Res* 40 (2005), Nr. 2, S. 138–46
- LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), Aug, Nr. 5259, S. 680–685
- LAI, J. P. ; DOUGLAS, S. D. ; HO, W. Z.: Human lymphocytes express substance P and its receptor. In: *J Neuroimmunol* 86 (1998), Jun, Nr. 1, S. 80–86
- LAI, J. P. ; DOUGLAS, S. D. ; ZHAO, M. ; HO, W. Z.: Quantification of substance P mRNA in human mononuclear phagocytes and lymphocytes using a mimic-based RT-PCR. In: *J Immunol Methods* 230 (1999), Nov, Nr. 1-2, S. 149–157
- LAMBEIR, A. M. ; DURINX, C. ; SCHARPE, S. ; DE MEESTER, I.: Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. In: *Crit Rev Clin Lab Sci* 40 (2003), Nr. 3, S. 209–94
- LAOUAR, A. ; WIETZERBIN, J. ; BAUVOIS, B.: Divergent regulation of cell surface protease expression in HL-60 cells differentiated into macrophages with granulocyte macrophage colony stimulating factor or neutrophils with retinoic acid. In: *Int Immunol* 5 (1993), Nr. 8, S. 965–73
- 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. In: *J Exp Med* 184 (1996), Nr. 1, S. 183–9

- LENDECKEL, U. ; KAHNE, T. ; RIEMANN, D. ; NEUBERT, K. ; ARNDT, M. ; REINHOLD, D.: Review: the role of membrane peptidases in immune functions. In: *Adv Exp Med Biol* 477 (2000), S. 1–24
- LERCHE, C. ; VOGEL, L. K. ; SHAPIRO, L. H. ; NOREN, O. ; SJOSTROM, H.: Human aminopeptidase N is encoded by 20 exons. In: *Mamm Genome* 7 (1996), Nr. 9, S. 712–3
- LETARTE, M. ; VERA, S. ; TRAN, R. ; ADDIS, J. B. ; ONIZUKA, R. J. ; QUACKENBUSH, E. J. ; JONGENEEL, C. V. ; MCINNES, R. R.: Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. In: *J Exp Med* 168 (1988), Nr. 4, S. 1247–53
- LIU, F. T. ; HSU, D. K. ; ZUBERI, R. I. ; KUWABARA, I. ; CHI, E. Y. ; HENDERSON, WR Jr: Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. In: *Am J Pathol* 147 (1995), Oct, Nr. 4, S. 1016–1028
- LIU, Yu-Hong ; GAO, Xue-Mei ; GE, Fan-Mei ; WANG, Zhe ; WANG, Wen-Qing ; LI, Xiao-Yong: PB-K/TOPK expression during TPA-induced HL-60 leukemic cell differentiation. In: *Asian Pac J Cancer Prev* 13 (2012), Nr. 5, S. 2145–2148
- LOJDA, Z.: Studies on glycyl-proline naphthylamidase. I. Lymphocytes. In: *Histochemistry* 54 (1977), Nr. 4, S. 299–309
- LOOK, A. T. ; ASHMUN, R. A. ; SHAPIRO, L. H. ; PEIPER, S. C.: Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. In: *J Clin Invest* 83 (1989), Nr. 4, S. 1299–307
- LOURA, Luís M S.: Simple estimation of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) orientation factor distribution in membranes. In: *International journal of molecular sciences* 13 (2012), November, S. 15252–15270. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms131115252>. – DOI 10.3390/ijms131115252. – ISSN 1422–0067. – Original DateCompleted: 20121204
- LYCK, Ruth ; ENZMANN, Gaby: The physiological roles of ICAM-1 and ICAM-2 in neutrophil migration into tissues. In: *Curr Opin Hematol* 22 (2015), Jan, Nr. 1, 53–59. <http://dx.doi.org/10.1097/MOH.000000000000103>. – DOI 10.1097/MOH.000000000000103
- MACINTYRE, E. A. ; ROBERTS, P. J. ; JONES, M. ; VAN DER SCHOOT, C. E. ; FAVALARO, E. J. ; TIDMAN, N. ; LINCH, D. C.: Activation of human monocytes occurs on cross-linking monocytic antigens to an Fc receptor. In: *J Immunol* 142 (1989), Apr, Nr. 7, S. 2377–2383
- MAGUER-SATTA, V. ; BESANCON, R. ; BACHELARD-CASCALES, E.: Concise review: neutral endopeptidase (CD10): a multifaceted environment actor in stem cells, physiological mechanisms, and cancer. In: *Stem Cells* 29 (2011), Nr. 3, S. 389–96
- MALFROY, B. ; KUANG, W. J. ; SEEBURG, P. H. ; MASON, A. J. ; SCHOFIELD, P. R.: Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). In: *FEBS Lett* 229 (1988), Nr. 1, S. 206–10
- MALFROY, B. ; SWERTS, J. P. ; GUYON, A. ; ROQUES, B. P. ; SCHWARTZ, J. C.: High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine. In: *Nature* 276 (1978), Nr. 5687, S. 523–6

- MENTLEIN, R. ; SCHUMANN, M. ; HEYMANN, E.: Comparative chemical and immunological characterization of five lipolytic enzymes (carboxylesterases) from rat liver microsomes. In: *Arch Biochem Biophys* 234 (1984), Nr. 2, S. 612–21
- MINA-OSORIO, P.: The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. In: *Trends Mol Med* 14 (2008), Nr. 8, S. 361–71
- MINA-OSORIO, P. ; ORTEGA, E.: Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcγR3 in human monocytes. In: *J Leukoc Biol* 77 (2005), Nr. 6, S. 1008–17
- MINA-OSORIO, P. ; WINNICKA, B. ; O'CONNOR, C. ; GRANT, C. L. ; VOGEL, L. K. ; RODRIGUEZ-PINTO, D. ; HOLMES, K. V. ; ORTEGA, E. ; SHAPIRO, L. H.: CD13 is a novel mediator of monocytic/endothelial cell adhesion. In: *J Leukoc Biol* 84 (2008), Nr. 2, S. 448–59
- MINA-OSORIO, Paola ; SHAPIRO, Linda H. ; ORTEGA, Enrique: CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells. In: *J Leukoc Biol* 79 (2006), Apr, Nr. 4, 719–730. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0705425>. – DOI 10.1189/jlb.0705425
- MINA-OSORIO, Paola ; SOTO-CRUZ, Isabel ; ORTEGA, Enrique: A role for galectin-3 in CD13-mediated homotypic aggregation of monocytes. In: *Biochem Biophys Res Commun* 353 (2007), Feb, Nr. 3, 605–610. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.081>. – DOI 10.1016/j.bbrc.2006.12.081
- MORIMOTO, C. ; SCHLOSSMAN, S. F.: The structure and function of CD26 in the T-cell immune response. In: *Immunol Rev* 161 (1998), S. 55–70
- MOSHKOVITS, Itay ; KARO-ATAR, Danielle ; ITAN, Michal ; REICHMAN, Hadar ; ROZENBERG, Perri ; MORGENSTERN-BEN-BARUCH, Netali ; SHIK, Dana ; EJARQUE-ORTIZ, Aroa ; HERSHKO, Alon Y. ; TIAN, Linjie ; COLIGAN, John E. ; SAYÓS, Joan ; MUNITZ, Ariel: CD300f associates with IL-4 receptor and amplifies IL-4-induced immune cell responses. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (2015), Juli, S. 8708–8713. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1507625112>. – DOI 10.1073/pnas.1507625112. – ISSN 1091–6490
- NAGY, Péter ; VEREB, György ; DAMJANOVICH, Sándor ; MÁTYUS, László ; SZÖLLÖSI, János: Measuring FRET in flow cytometry and microscopy. In: *Curr Protoc Cytom* Chapter 12 (2006), Nov, Unit 12.8. <http://dx.doi.org/10.1002/0471142956.cy1208s38>. – DOI 10.1002/0471142956.cy1208s38
- NAVARRETE SANTOS, A. ; LANGNER, J. ; HERRMANN, M. ; RIEMANN, D.: Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. In: *Cell Immunol* 201 (2000), Apr, Nr. 1, 22–32. <http://dx.doi.org/10.1006/cimm.2000.1629>. – DOI 10.1006/cimm.2000.1629
- NAVARRETE SANTOS, A. ; ROENTSCH, J. ; DANIELSEN, E. M. ; LANGNER, J. ; RIEMANN, D.: Aminopeptidase N/CD13 is associated with raft membrane microdomains in monocytes. In: *Biochem Biophys Res Commun* 269 (2000), Nr. 1, S. 143–8
- NEMOTO, E. ; SUGAWARA, S. ; TAKADA, H. ; SHOJI, S. ; HORIUCH, H.: Increase of CD26/dipeptidyl peptidase IV expression on human gingival fibroblasts upon stimulation with cytokines and bacterial components. In: *Infect Immun* 67 (1999), Dec, Nr. 12, S. 6225–6233

- NILSSON, K. ; ANDERSSON, Lc ; GAHMBERG, C. G. : Cell surface characteristics of human histiocytic lymphoma lines–I. Surface glycoprotein patterns. In: *Leuk Res* 4 (1980), Nr. 3, S. 271–277
- NIMMERJAHN, F. ; RAVETCH, J. V.: Fcγ receptors as regulators of immune responses. In: *Nat Rev Immunol* 8 (2008), Nr. 1, S. 34–47
- NOREN, K. ; HANSEN, G. H. ; CLAUSEN, H. ; NOREN, O. ; SJOSTROM, H. ; VOGEL, L. K.: Defectively N-glycosylated and non-O-glycosylated aminopeptidase N (CD13) is normally expressed at the cell surface and has full enzymatic activity. In: *Exp Cell Res* 231 (1997), Nr. 1, S. 112–8
- OHNUMA, Kei ; YAMOCHI, Tadanori ; UCHIYAMA, Masahiko ; NISHIBASHI, Kunika ; IWATA, Satoshi ; HOSONO, Osamu ; KAWASAKI, Hiroshi ; TANAKA, Hirotohi ; DANG, Nam H. ; MORIMOTO, Chikao: CD26 mediates dissociation of Tollip and IRAK-1 from caveolin-1 and induces upregulation of CD86 on antigen-presenting cells. In: *Mol Cell Biol* 25 (2005), Sep, Nr. 17, 7743–7757. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.25.17.7743-7757.2005>. – DOI 10.1128/MCB.25.17.7743–7757.2005
- OLSEN, J. ; COWELL, G. M. ; KONIGSHOFER, E. ; DANIELSEN, E. M. ; MOLLER, J. ; LAUSTSEN, L. ; HANSEN, O. C. ; WELINDER, K. G. ; ENGBERG, J. ; HUNZIKER, W. ; AL. et: Complete amino acid sequence of human intestinal aminopeptidase N as deduced from cloned cDNA. In: *FEBS Lett* 238 (1988), Nr. 2, S. 307–14
- PFEIFFER, A. ; BOTTCHE, A. ; ORSO, E. ; KAPINSKY, M. ; NAGY, P. ; BODNAR, A. ; SPREITZER, I. ; LIEBISCH, G. ; DROBNIK, W. ; GEMPEL, K. ; HORN, M. ; HOLMER, S. ; HARTUNG, T. ; MULTHOFF, G. ; SCHUTZ, G. ; SCHINDLER, H. ; ULMER, A. J. ; HEINE, H. ; STELTER, F. ; SCHUTT, C. ; ROTHE, G. ; SZÖLLÖSI, J. ; DAMJANOVICH, S. ; SCHMITZ, G.: Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. In: *Eur J Immunol* 31 (2001), Nr. 11, S. 3153–64
- PILLING, D. ; FAN, T. ; HUANG, D. ; KAUL, B. ; GOMER, R. H.: Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. In: *PLoS One* 4 (2009), Nr. 10, S. e7475
- PINCETIC, Andrew ; BOURNAZOS, Stylianos ; DILILLO, David J. ; MAAMARY, Jad ; WANG, Taia T. ; DAHAN, Rony ; FIEBIGER, Benjamin-Maximillian ; RAVETCH, Jeffrey V.: Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. In: *Nat Immunol* 15 (2014), Aug, Nr. 8, 707–716. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2939>. – DOI 10.1038/ni.2939
- PÉREZ-OLIVA, Ana B. ; MARTÍNEZ-ESPARZA, María ; VICENTE-FERNÁNDEZ, José J. ; CORRAL-SAN MIGUEL, Rubén ; GARCÍA-PEÑARRUBIA, Pilar ; HERNÁNDEZ-CASELLES, Trinidad: Epitope mapping, expression and post-translational modifications of two isoforms of CD33 (CD33M and CD33m) on lymphoid and myeloid human cells. In: *Glycobiology* 21 (2011), Juni, S. 757–770. <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwq220>. – DOI 10.1093/glycob/cwq220. – ISSN 1460–2423
- RASMUSSEN, H. B. ; BRANNER, S. ; WIBERG, F. C. ; WAGTMANN, N.: Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV/CD26 in complex with a substrate analog. In: *Nat Struct Biol* 10 (2003), Nr. 1, S. 19–25

- RIEMANN, D.: *Arbeiten zum Vorkommen und zur Regulation von Aminopeptidase N/CD13 mit besonderer Berücksichtigung ihres Vorkommens auf T-Lymphozyten*. 2002 <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/habil-online/02/02H182/habil.pdf>
- RIEMANN, D. ; GOHRING, B. ; LANGNER, J.: Expression of aminopeptidase N/CD13 in tumour-infiltrating lymphocytes from human renal cell carcinoma. In: *Immunol Lett* 42 (1994), Nr. 1-2, S. 19–23
- RIEMANN, D. ; HANSEN, G. H. ; NIELS-CHRISTIANSEN, L. ; THORSEN, E. ; IMMERDAL, L. ; SANTOS, A. N. ; KEHLEN, A. ; LANGNER, J. ; DANIELSEN, E. M.: Caveolae/lipid rafts in fibroblast-like synoviocytes: ectopeptidase-rich membrane microdomains. In: *Biochem J* 354 (2001), Nr. Pt 1, S. 47–55
- RIEMANN, D. ; KEHLEN, A. ; LANGNER, J.: Stimulation of the expression and the enzyme activity of aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 on human renal cell carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by T cell-derived cytokines, such as IL-4 and IL-13. In: *Clin Exp Immunol* 100 (1995), Nr. 2, S. 277–83
- RIEMANN, D. ; KEHLEN, A. ; LANGNER, J.: CD13—not just a marker in leukemia typing. In: *Immunol Today* 20 (1999), Nr. 2, S. 83–8
- 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. In: *J Immunol* 158 (1997), Nr. 7, S. 3425–32
- 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. In: *Immunobiology* 187 (1993), Nr. 1-2, S. 24–35
- 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. In: *Int Arch Allergy Immunol* 104 (1994), Nr. 1, S. 48–56
- RIEMANN, Dagmar ; TCHERKES, Anatolij ; HANSEN, Gert H. ; WULFAENGER, Jens ; BLOSZ, Tanja ; DANIELSEN, E M.: Functional co-localization of monocytic aminopeptidase N/CD13 with the Fc gamma receptors CD32 and CD64. In: *Biochem Biophys Res Commun* 331 (2005), Jun, Nr. 4, 1408–1412. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.061>. – DOI 10.1016/j.bbrc.2005.04.061
- ROQUES, B. P. ; NOBLE, F. ; DAUGE, V. ; FOURNIE-ZALUSKI, M. C. ; BEAUMONT, A.: Neutral endopeptidase 24.II: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. In: *Pharmacol Rev* 45 (1993), Nr. 1, S. 87–146
- SAMBROOK, Joseph ; RUSSELL, Dawid W.: *Molecular Cloning a laboratory manual*. 3. New York : Gold Spring Harbor Laboratory Press, Gold Spring Harbor, 2001
- SATO, Morihito ; SANO, Hitomi ; IWAKI, Daisuke ; KUDO, Kazumi ; KONISHI, Masanori ; TAKAHASHI, Hiroki ; TAKAHASHI, Toru ; IMAIZUMI, Hitoshi ; ASAI, Yasufumi ; KUROKI, Yoshio: Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and

- TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. In: *J Immunol* 171 (2003), Jul, Nr. 1, S. 417–425
- SCHIEHMANN, Matthias. ; BUSCH, Dirk-Hans.: Auswahl und Kombination von Fluoreszenzfarbstoffen. In: *Sack, U. Tárnok, A. Rothe, G. Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Karger, 2007, S. 83–119
- SEBESTYEN, Z. ; NAGY, P. ; HORVATH, G. ; VÁMOSI, G. ; DEBETS, R. ; GRATAMA, J. W. ; ALEXANDER, D. R. ; SZÖLLŐSI, J.: Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer. In: *Cytometry* 48 (2002), Nr. 3, S. 124–35
- SHRESTHA, Dilip ; JENEI, Attila ; NAGY, Péter ; VEREB, György ; SZÖLLŐSI, János: Understanding FRET as a research tool for cellular studies. In: *International journal of molecular sciences* 16 (2015), Nr. 4, S. 6718–6756
- SMITH, P. K. ; KROHN, R. I. ; HERMANSON, G. T. ; MALLIA, A. K. ; GARTNER, F. H. ; PROVENZANO, M. D. ; FUJIMOTO, E. K. ; GOEKE, N. M. ; OLSON, B. J. ; KLENK, D. C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Anal Biochem* 150 (1985), Nr. 1, S. 76–85
- SMITH, R. E. ; TALHOUK, J. W. ; BROWN, E. E. ; EDGAR, S. E.: The significance of hypersialylation of dipeptidyl peptidase IV (CD26) in the inhibition of its activity by Tat and other cationic peptides. CD26: a subverted adhesion molecule for HIV peptide binding. In: *AIDS Res Hum Retroviruses* 14 (1998), Nr. 10, S. 851–68
- SORRELL, J. M. ; BRINON, Laure ; BABER, Marilyn A. ; CAPLAN, Arnold I.: Cytokines and glucocorticoids differentially regulate APN/CD13 and DPPIV/CD26 enzyme activities in cultured human dermal fibroblasts. In: *Arch Dermatol Res* 295 (2003), Aug, Nr. 4, 160–168. <http://dx.doi.org/10.1007/s00403-003-0417-4>. – DOI 10.1007/s00403-003-0417-4
- SPRENGER, Richard R. ; FONTIJN, Ruud D. ; VAN MARLE, Jan ; PANNEKOEK, Hans ; HORREVOETS, Anton J. G.: Spatial segregation of transport and signalling functions between human endothelial caveolae and lipid raft proteomes. In: *Biochem J* 400 (2006), Dec, Nr. 3, 401–410. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20060355>. – DOI 10.1042/BJ20060355
- SUBRAMANI, Jaganathan ; GHOSH, Mallika ; RAHMAN, M. M. ; CAROMILE, Leslie A. ; GERBER, Claire ; REZAUL, Karim ; HAN, David K. ; SHAPIRO, Linda H.: Tyrosine phosphorylation of CD13 regulates inflammatory cell-cell adhesion and monocyte trafficking. In: *J Immunol* 191 (2013), Oct, Nr. 7, 3905–3912. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1301348>. – DOI 10.4049/jimmunol.1301348
- SUMITOMO, M. ; SHEN, R. ; NANUS, D. M.: Involvement of neutral endopeptidase in neoplastic progression. In: *Biochim Biophys Acta* 1751 (2005), Nr. 1, S. 52–9
- SYRJALA, M. ; RUUTU, T. ; JANSOON, S. E.: A flow cytometric assay of CD34-positive cell populations in the bone marrow. In: *Br J Haematol* 88 (1994), Nr. 4, S. 679–84
- SZALÓKI, Nikoletta ; DOAN-XUAN, Quang M. ; SZÖLLŐSI, János ; TÓTH, Katalin ; VÁMOSI, György ; BACSÓ, Zsolt: High throughput FRET analysis of protein-protein interactions by slide-based

- imaging laser scanning cytometry. In: *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology* 83 (2013), September, S. 818–829. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.22315>. – DOI 10.1002/cyto.a.22315. – ISSN 1552–4930
- SZÖLLŐSI, János ; DAMJANOVICH, Sándor ; MÁTYUS, László: Principles of resonance energy transfer. In: *Current Protocols in Cytometry* 9 (1999), Nr. 1, S. 1–12
- SZÖLLŐSI, János ; DAMJANOVICH, Sándor ; MULHERN, Sally A. ; TRÓN, Lajos: Fluorescence energy transfer and membrane potential measurements monitor dynamic properties of cell membranes: a critical review. In: *Progress in biophysics and molecular biology* 49 (1987), Nr. 2-3, S. 65–87
- SZÖLLŐSI, J. ; DAMJANOVICH, S. ; NAGY, P. ; VEREB, G. ; MATYUS, L.: Principles of resonance energy transfer. In: *Curr Protoc Cytom* Chapter 1 (2006), S. Unit1 12
- TAM, L. T. ; ENGELBRECHT, S. ; TALENT, J. M. ; GRACY, R. W. ; ERDOS, E. G.: The importance of disulfide bridges in human endopeptidase (enkephalinase) after proteolytic cleavage. In: *Biochem Biophys Res Commun* 133 (1985), Nr. 3, S. 1187–92
- TANAKA, M. ; KRUTZIK, S. R. ; SIELING, P. A. ; LEE, D. J. ; REA, T. H. ; MODLIN, R. L.: Activation of Fc gamma RI on monocytes triggers differentiation into immature dendritic cells that induce autoreactive T cell responses. In: *J Immunol* 183 (2009), Nr. 4, S. 2349–55
- TERSTAPPEN, L. W. ; HOLLANDER, Z. ; MEINERS, H. ; LOKEN, M. R.: Quantitative comparison of myeloid antigens on five lineages of mature peripheral blood cells. In: *J Leukoc Biol* 48 (1990), Aug, Nr. 2, S. 138–148
- THERMO-SCIENTIFIC: *Immunoprecipitation (IP) technical guide and protocols*. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TRO064-Immunoprecipitation-guide.pdf>, 2009. – 9 S. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TRO064-Immunoprecipitation-guide.pdf>
- TOWBIN, H. ; STAEGELIN, T. ; GORDON, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (1979), Nr. 9, S. 4350–4
- VÁMOSI, György ; VEREB, György ; BODNÁR, Andrea. ; TÓTH, Katalin. ; BAUDENDISTEL, Nina. ; DAMJANOVICH, Sándor. ; SZÖLLŐSI, János: Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET). In: *Sack, U. and Tárnok, A. and Rothe, G. Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie* Bd. Technischen und methodischen Grundlagen. Basel : Karger, 2007. – 120-138
- VANHOOF, G. ; DE MEESTER, I. ; SANDE, M. van ; SCHARPE, S. ; YARON, A.: Distribution of proline-specific aminopeptidases in human tissues and body fluids. In: *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 30 (1992), Nr. 6, S. 333–8
- VANHOOF, G. ; GOOSSENS, F. ; DE MEESTER, I. ; HENDRIKS, D. ; SCHARPE, S.: Proline motifs in peptides and their biological processing. In: *FASEB J* 9 (1995), Nr. 9, S. 736–44

- VEIKKOLA, T. ; KARKKAINEN, M. ; CLAESSION-WELSH, L. ; ALITALO, K.: Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. In: *Cancer Res* 60 (2000), Jan, Nr. 2, S. 203–212
- VILLASEÑOR-CARDOSO, Mónica I ; FRAUSTO-DEL-RÍO, Dulce A. ; ORTEGA, Enrique: Aminopeptidase N (CD13) Is Involved in Phagocytic Processes in Human Dendritic Cells and Macrophages. In: *BioMed research international 2013* (2013). <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/562984/abs/>
- WALLNER, Stefan ; GRANDL, Margot ; LIEBISCH, Gerhard ; PEER, Markus ; ORSÓ, Evelyn ; SIGRÜNER, Alexander ; SOBOTA, Andrzej ; SCHMITZ, Gerd: oxLDL and eLDL Induced Membrane Microdomains in Human Macrophages. In: *PloS one* 11 (2016), S. e0166798. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0166798>. – DOI 10.1371/journal.pone.0166798. – ISSN 1932–6203
- WATT, V. M. ; WILLARD, H. F.: The human aminopeptidase N gene: isolation, chromosome localization, and DNA polymorphism analysis. In: *Hum Genet* 85 (1990), Nr. 6, S. 651–4
- WAUMANS, Yannick ; BAERTS, Lesley ; KEHOE, Kaat ; LAMBEIR, Anne-Marie ; DE MEESTER, Ingrid: The dipeptidyl peptidase family, prolyl oligopeptidase and prolyl carboxypeptidase in the immune system and inflammatory disease, including atherosclerosis. In: *Frontiers in immunology* 6 (2015), S. 387
- WEIHOFFEN, Wilhelm A. ; LIU, Jianguo ; REUTTER, Werner ; SAENGER, Wolfram ; FAN, Hua: Crystal structures of HIV-1 Tat-derived nonapeptides Tat-(1-9) and Trp2-Tat-(1-9) bound to the active site of dipeptidyl-peptidase IV (CD26). In: *J Biol Chem* 280 (2005), Apr, Nr. 15, 14911–14917. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M413400200>. – DOI 10.1074/jbc.M413400200
- WHITE, S. L. ; BELOV, L. ; BARBER, N. ; HODGKIN, P. D. ; CHRISTOPHERSON, R. I.: Immunophenotypic changes induced on human HL60 leukaemia cells by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. In: *Leuk Res* 29 (2005), Nr. 10, S. 1141–51
- WILLHEIM, M. ; EBNER, C. ; BAIER, K. ; KERN, W. ; SCHRATTBAUER, K. ; THIEN, R. ; KRAFT, D. ; BREITENEDER, H. ; REINISCH, W. ; SCHEINER, O.: Cell surface characterization of T lymphocytes and allergen-specific T cell clones: correlation of CD26 expression with T(H1) subsets. In: *J Allergy Clin Immunol* 100 (1997), Nr. 3, S. 348–55
- WILSON, C. M.: Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures. In: *Methods Enzymol* 91 (1983), S. 236–47
- WULFÄNGER, J. ; NIEDLING, S. ; RIEMANN, D. ; SELIGER, B.: Aminopeptidase N (APN)/CD13-dependent CXCR4 downregulation is associated with diminished cell migration, proliferation and invasion. In: *Mol Membr Biol* 25 (2008), Nr. 1, S. 72–82
- XIAO, Kai ; FANG, Zhenhua ; GAO, Xinfeng ; ZHAO, Jingjing ; HUANG, Ruokun ; XIE, Ming: Membrane complement regulatory protein reduces the damage of transplanting autologous bone marrow mesenchymal stem cells by suppressing the activation of complement. In: *Injury* 48 (2017), Oktober, S. 2089–2094. <http://dx.doi.org/10.1016/j.injury.2017.08.008>. – DOI 10.1016/j.injury.2017.08.008. – ISSN 1879–0267

- XIAO, Lei ; LIU, Yahan ; WANG, Nanping: New paradigms in inflammatory signaling in vascular endothelial cells. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306 (2014), Feb, Nr. 3, H317–H325. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00182.2013>. – DOI 10.1152/ajpheart.00182.2013
- XU, Y. ; WELLNER, D. ; SCHEINBERG, D. A.: Substance P and bradykinin are natural inhibitors of CD13/aminopeptidase N. In: *Biochem Biophys Res Commun* 208 (1995), Nr. 2, S. 664–74
- YEAGER, C. L. ; ASHMUN, R. A. ; WILLIAMS, R. K. ; CARDELLICHIO, C. B. ; SHAPIRO, L. H. ; LOOK, A. T. ; HOLMES, K. V.: Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. In: *Nature* 357 (1992), Nr. 6377, S. 420–2
- ZHENG, R. ; IWASE, A. ; SHEN, R. ; GOODMAN, Jr. O. B. O. B. ; SUGIMOTO, N. ; TAKUWA, Y. ; LERNER, D. J. ; NANUS, D. M.: Neuropeptide-stimulated cell migration in prostate cancer cells is mediated by RhoA kinase signaling and inhibited by neutral endopeptidase. In: *Oncogene* 25 (2006), Nr. 44, S. 5942–52

8 Thesen

1. Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) lässt sich am Durchflusszytometer mit dem Donor-Akzeptor-Paar Phycoerythrin und Cyanin 5 messen. Die Grenze der Energietransfer-Effizienz (ETp) für FRET liegt bei 10
2. Die FRET-Messung zwischen 2 APN-Monomeren oder zwischen der schweren Kette der Klasse-I-MHC-Moleküle und β 2-Mikroglobulin ist als Positivkontrolle für eine durchflusszytometrische FRET-Messung geeignet.
3. Durch die FRET-Messung zwischen APN/CD13 und Siglec-3/CD33 kann eine Negativkontrolle etabliert werden. Die ETp-Werte liegen zwischen 4,9 und 6,3.
4. Mittels durchflusszytometrischer FRET-Messung konnte auf hämatopoetischen Zellen eine enge räumliche Beziehung zwischen APN und den Fc γ -Rezeptoren-I und-II gezeigt werden. Die Ergebnisse wurden verifiziert durch Koimmunopräzipitation und mit Immungold-Elektronenmikroskopie
5. Stimulation mit TPA führt auf der monozytären Zelllinie U937 zur signifikanten Steigerung der Expression von APN/CD13 und CD64 und zur signifikanten Verringerung des Abstandes zwischen Fc γ -Rezeptor-II/CD32 und APN.
6. Nach Stimulation von Perikardmakrophagen mit IL-4 nimmt die APN-Expression signifikant zu. Die Expression von CD64 nimmt ab, verbunden mit einem Wegrücken von CD64 von APN.
7. Nach Stimulation der monozytären Zelllinie THP-1 mit LPS kommt es zur signifikanten Abnahme der Expression von Fc γ -Rezeptor-II/CD32, ohne Veränderung des FRET-Wertes zwischen den APN und Fc- γ -Rezeptoren-I und -II.
8. Nach Stimulation mit TPA nimmt die räumliche Nähe zwischen APN und HLA-DR tendenziell zu.
9. Die Stimulation von THP-1-Zellen mit Substanz P, einem Inhibitor der enzymatischen Aktivität von APN, hatte in unseren Versuchen keinen Einfluss auf Expression und auf die räumliche Verteilung zwischen APN und den Fc γ -Rezeptoren-I und -II.
10. APN/CD13 ist mit den Integrinen CD11b/CD18 in THP-1-Zellen eng assoziiert. In der direkten Messung ergab sich Energietransfer-Effizienz für FRET von $11,5 \pm 0,6$.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt, nicht anderweitig zu Prüfungszwecken vorgelegt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Sämtliche wissentlich verwendete Textausschnitte, Zitate oder Inhalte anderer Verfasser wurden ausdrücklich als solche gekennzeichnet.

Wettin-Löbejün/OT Löbejün, 11. November 2019

Anatolij Tcherkes

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich versichere, dass von mir, Anatolij Tcherkes, keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind. Es wurde nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht.

Wettin-Löbejün/OT Löbejün, 11. November 2019

Anatolij Tcherkes

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anatolij, Tcherkes
Geburtsdatum: 12.08.1980
Familienstand: Verheiratet
Kinder: Agatha Tcherkes, *06.11.2015
Jakob Tcherkes, *14.03.2018

Schulbildung

06/1986-04/1996 Gesamtschule Nr. 7, Belzy (Rep. Moldova)
08/1996-08/2000 Gymnasium im Bildungszentrum, Halle (Saale)
Abiturbuchpreis für Fach Chemie

Studium

10/2000-11/2006 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
09/2001 Physikum
08/2003 1. Staatsexamen
09/2005 2. Staatsexamen
11/2006 3. Staatsexamen

Beruf

03/2007-03/2016 Assistenzarzt in der Klinik für Innere Medizin IV (Hämatologie/ Onkologie) an der Universitätsklinikum Halle, Direktor Prof. Dr. H. - J. Schmoll, Prof. Dr. C. Müller-Tidow
ab 03/2016 Zentrale Notaufnahme UKH (Ärztlicher Leiter OA Dipl.-Med. M. Amoury)
08/2018 Facharzt für Innere Medizin

Promotion

11/2002-05/2005 Praktischer Teil der Dissertation am Institut für Medizinische Immunologie an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg unter Leitung von Frau PD. Dr.med. D. Riemann

Publikationen **Functional co-localization of monocytic aminopeptidase N/CD13 with the Fc gamma receptors CD32 and CD64.**

Riemann D, Tcherkes A, Hansen GH, Wulfaenger J, Blosz T, Danielsen EM.
Biochem Biophys Res Commun. 2005 Jun 17;331(4):1408-12.

Intramuscular plasmacytoma.

Surov A, Tcherkes A, Meier F.

Skeletal Radiol. 2014 Nov;43(11):1561-5.

Non-osseous incidental findings in low-dose whole-body CT in patients with multiple myeloma.

Surov A, Bach AG, Tcherkes A, Schramm D.

Br J Radiol. 2014 Sep;87(1041):20140185.

Danksagung

Prof. Dr. Langner und Frau PD Dr. Dagmar Riemann danke ich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas.

Mein besonder Dank gilt Frau PD Dr. Dagmar Riemann für eine exzellente Betreuung, die mich in den Jahren ermutigt hat, weiter zu machen.

Frau Dr. rer. nat. Tanja Bloß und Herrn Dr. rer. nat. Jens Wulfänger danke ich für die Unterstützung in der Proteinbiochemie, ein offenes Ohr und eine präzise Erklärung in allen biochemischen Fragestellungen.

Prof. Dr. János Szöllösi Universität Debrecen, biophysische Fakultät und Frau Dr. Claudia Pfeifer und Frau Dr. Simone Diermeyer, Universität Regensburg, danke ich für die Unterstützung der durchflußzytometrischen FRET-Versuche.

Meinen Eltern und insbesondere meiner Tante Eleonora Tubensleak danke herzlich ich für ihre fortwährende Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit.

Meiner Frau Anna Tcherkes danke ich von ganzem Herzen für ihre unermüdliche Unterstützung, ihre Liebe und Motivation.