

Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Aus dem
Institut für Biochemie und Molekularbiologie
Geschäftsführender Direktor
Prof. Dr. med. W. Reutter

Induktion der Apoptose der Melanomzellen
nach
Dipeptidylpeptidase IV / CD26 - Expression

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Jörn Mikko Richter
aus Hamburg

Referent: Prof. Dr. med. W. Reutter

Korreferent: Prof. Dr. med. P. T. Daniel

Gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 15.12.2006

1. Einleitung

1.1 Dipeptidylpeptidase IV

1.1.1 Vorkommen

1.1.2 Struktur

1.1.3 Biologische Funktionen der DPPIV/CD26

1.1.4 Exopeptidase-Aktivität und Substrate

1.1.5 Rolle der DPPIV/CD26 in Adipositas und Diabetes mellitus

1.1.6 DPPIV/CD26 als Rezeptor der Adenosin-Desaminase (ADA)

1.1.7 DPPIV/CD26 als Zelladhäsionsmolekül auf extrazellulärer Matrix (ECM)

1.1.8 Rolle der DPPIV/CD26 in Malignomen

1.1.9 DPPIV/CD26-Expression in T-Zell Malignomen

1.1.10 DPPIV/CD26 im Immunsystem

1.1.11 DPPIV/CD26 in der HIV-Infektion

1.2 Induzierbares Tet-On Gen - Expressionsystem (Clontech)

2. Zielsetzung der Arbeit

3. Material und Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Präparation von Plasmid-DNA (Mini-Lysat-Methode)

3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA (Maxi-Lysat-Methode, Qiagen)

3.1.3 Fällung von DNA

3.1.4 Photospektrometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.1.5 Analytischer DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

3.1.6 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

3.1.7 Präparativer DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

3.1.8 Präparatives Agarosegel

3.1.9 DNA-Gelextraktion (Qiaquick Gel Extraction Kit)

3.1.10 Dephosphorylierung der Vektor-DNA-Fragmentenden

3.1.11 Phenol-Chloroform-Extraktion zur Reinigung der DNA-Fragmente

3.1.12 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

3.1.13 Transformation von Ligationsansätzen in kompetente *E. coli* - Zellen HB101

3.2 Zellkulturmethoden

3.2.1 Kultivierung von Zellen

- 3.2.1.1 CHO-Zellen (Chinese-Hamster-Ovary)
 - 3.2.1.2 Mel2A – Melanomzellen
 - 3.2.1.3 Mel303AG7 – Melanomzellen
 - 3.2.2 Transfektion von DNA in Melanomzellen
 - 3.2.2.1 Transfektion mittels Elektroporation (Eppendorf-Multiporator)
 - 3.2.2.2 Stabile Transfektion mittels Superfect-Reagenz (Qiagen)
 - 3.2.2.3 Transiente und stabile Transfektion mittels DMRIE-C Reagenz (Invitrogen)
 - 3.2.3 Selektion von stabil transfizierten Zellen durch Klonierung
 - 3.2.4 Anlegen von Zellstocks
 - 3.3 *Proteinchemische und immunologische Methoden*
 - 3.3.1 Immunfluoreszenz permeabilisierter und nicht permeabilisierter Zellen
 - 3.3.2 Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)
 - 3.3.3 Solubilisierung von Zellen
 - 3.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Methode, Pierce)
 - 3.3.5 Bestimmung der DPPIV/CD26-Enzymaktivität in Lösung
 - 3.3.6 Immunopräzipitation von DPPIV/CD26
 - 3.3.7 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
 - 3.3.8 Western-Protein-Blotting
 - 3.3.9 Ponceau-Rot-Färbung
 - 3.3.10 Immunologische Detektion auf Blotmembranen
 - 3.3.11 Silberfärbung von Proteinen auf der Blotmembran
 - 3.4 *Apoptoseinduktion*
 - 3.4.1 Messung der Apoptose durch Annexin V
 - 3.4.2 Messung der Apoptose und Zellzyklusanalysen durch Propidiumjodid im FACScan
 - 3.5 *Adhäsionstest*
- 4. Ergebnisse**
- 4.1 *Analyse der Expression der DPPIV/CD26 in verschiedenen Tumorzelllinien*
 - 4.1.1 Analyse der DPPIV/CD26 – Expression in humanen Tumorzellen mittels Western-Blot
 - 4.1.2 Enzymaktivität der DPPIV/CD26 in humanen Tumorzelllinien
 - 4.2 *Transfektion von Ratten - DPPIV/CD26 in humane Mel2A – Melanomzellen*
 - 4.2.1 Nachweis der rDPPIV/CD26 in transfizierten Mel2A-rDPPIV/CD26 mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

- 4.2.2 Nachweis der rDPPIV/CD26 in transfizierten Mel2A-rDPPIV/CD26 mittels FACScan-Analyse
- 4.3 *Klonierung der transfizierten Mel2A-rDPPIV/CD26*
 - 4.3.1 Nachweis der DPPIV/CD26 - Expression nach Subklonierung der Mel2A-rDPPIV/CD26-Transfektanten mittels Immunfluoreszenzmikroskopie
 - 4.3.2 DPPIV/CD26 - Expression nach Subklonierung der Mel2A-rDPPIV/CD26-Transfektanten in der FACScan – Analyse
- 4.4 *Ratten – DPPIV/CD26 vermittelte Apoptose der Mel2A-rDPPIV/CD26*
 - 4.4.1 Nachweis der vorzeitigen Apoptose nach Serumentzug der Mel2A-rDPPIV/CD26 mittels Annexin V-Analyse
 - 4.4.2 Nachweis der Apoptose der Mel2A-rDPPIV/CD26 mittels Propidiumjodid
 - 4.4.2.1 Apoptoserate der Mel2A-rDPPIV/CD26 mittels Propidiumjodid in der FACScan-Analyse
 - 4.4.2.2 Apoptoseraten der Mel2A-rDPPIV/CD26 nach Kultivierung in serumfreiem Medium
 - 4.4.2.3 Zellzyklus - Analyse der Mel2A-rDPPIV/CD26 nach Apoptoseinduktion mittels Färbung mit Propidiumjodid und FACS-Analyse
- 4.5 *Etablierung und Regulation der Human-DPPIV/CD26 - Expression in 303AG7-Melanomzellen*
 - 4.5.1 Analyse der DPPIV/CD26 - Expression in 303AG7 mittels FACScan
 - 4.5.2 Analyse der DPPIV/CD26-Expression in 303AG7 durch Immunopräzipitation und SDS-Page
 - 4.5.3 Integration der cDNA von hDPPIV/CD26 in das Tet-regulierbare Gen-Expressionssystem
 - 4.5.3.1 Herstellung des hDPPIV/CD26-Inserts und pTRE2-Vektors nach Restriktionsverdau
 - 4.5.3.2 Ligation von pTRE2-Vektor und hDPPIV/CD26-Insert
 - 4.5.3.3 Nachweis des rekombinierten pTRE2-hDPPIV/CD26-Klons (F202) nach Endonukleaseverdau
 - 4.5.4 Transfektion des Plasmids F202 und hDPPIV/CD26-Expression in 303AG7 – Melanomzellen
 - 4.5.4.1 Nachweis von GFP-rDPPIV/CD26 – Fusionsprotein als Indikator der Expression nach Tet-Induktion mittels Fluoreszenzmikroskopie (Pilotexpression)
 - 4.5.4.2 Nachweis der induzierten hDPPIV/CD26-Expression (F202) in 303AG7 – Melanomzellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie
 - 4.5.4.3 hDPPIV/CD26 und rDPPIV/CD26 - Enzymaktivität nach transienter Transfektion in 303AG7

4.6 *hDPPIV/CD26 - vermittelte Adhäsion auf Matrixproteinen in 303AG7*

5. Diskussion

6. Zusammenfassung

7. Ausblick

8. Anhang

8.1 Abkürzungen

8.2 Literatur

8.3 Veröffentlichungen

Curriculum vitae

Danksagung

8.1 Abkürzungen

bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence-Activated-Cell-Scanning
FAP- α	Fibroblast Activation Protein α
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
MCS	multi-cloning site
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ssDNA	Einzelstrang-DNA

8.3 Veröffentlichungen

Teilnahme an der Wissenschaftswoche 2003 am Campus Benjamin Franklin, CUB

Dipeptidylpeptidase IV und Apoptoseinduktion in Mel 2A -Melanomzellen

J. Mikko Richter¹, Hua Fan¹, Jürgen Eberle², Christoph Geilen², Werner Reutter¹
CUB, Campus Benjamin Franklin, ¹Institut für Molekularbiologie und Biochemie, Arnimallee
22, 14195 Berlin-Dahlem, ²Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Fabeckstr. 60-62, 14195
Berlin-Dahlem

Meeting Abstract

7th International Dahlem Symposium on "Cellular Signal Recognition and Transduction" 2001
Significance of N-glycosylation and processing of GABA transporter
Cai, G.Q.; Schülein, R.; **Richter, J.M.**; Niedergesäss, A. ; Reutter, W.; Schwarz, W.; Fan, H.

Curriculum Vitae

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich aufrichtig bei Herrn Prof. Dr. med. Werner Reutter. Seine fortwährende herzliche Unterstützung und sein Interesse haben mir Motivation und Mittel zur Fertigstellung meiner Arbeit gegeben.

Einen herzlichen Dank an Frau PD Dr. rer. nat. Hua Fan für ihre Betreuung meiner Arbeit innerhalb ihres Teilprojektes DPPIV/CD26 und fachlichen Diskussionen, welche mir mit zum Gelingen der Arbeit verholfen haben.

Prof. Dr. med. C. Geilen und PD Dr. rer. nat. J. Eberle danke ich für die materielle Unterstützung und Bereitschaft zur wissenschaftlichen Auseinandersetzung.

Und selbstverständlich danke ich der gesamten Arbeitsgruppe, darunter vor allem Markus Berger, Darius Ghaderi, Stephan Hinderlich, Qingjiu Tang und Shuling Yan, Melanie Leddermann, Sabine Stehling und Christiane Kilian für die Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima mit den vielen freudigen Momenten.

Zuletzt ein großes Dankeschön an meine Eltern und Aaro und Tuula Pekonen für Ihren Rückhalt und Ihr Vertrauen.

Erklärung

„Ich, Jörn Mikko Richter, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Induktion der Apoptose der Melanomzellen nach Dipeptidylpeptidase IV / CD26 – Expression selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift