

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

Zellysate unterschiedlicher Tumorzelllinien wurden nach ihrer DPPIV/CD26-Expression im Western-Blot auf einem nicht-denaturierenden Acrylamidgel analysiert (Abbildung 4.1, Tabelle 4.1). Bei den Zelllinien HT29, HepG2, Caco-2, HUH7, Bon und LS180 zeigten sich positive Banden unterschiedlicher Intensität der nativen DPPIV/CD26 scheinbar bei 180 kDa. Dagegen konnte bei MelOH und Mel2A, sowie MCF-7, K562, U937, QGP-1, SW620 keine Detektion der nativen DPPIV/CD26 nachgewiesen werden.

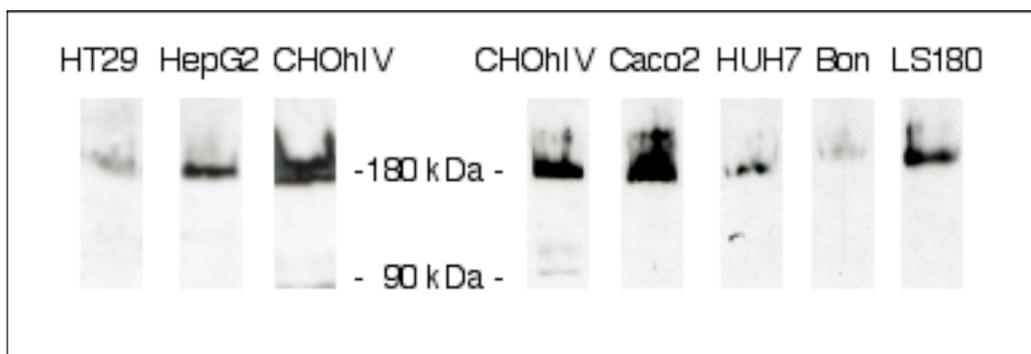


Abbildung 4.1: Western-Blot der hDPPIV/CD26 aus verschiedenen humanen Tumorzellen auf einem nicht-denaturierten Gel

Als Positivkontrolle dienten Lysate aus stabil transfizierten CHO-hDPPIV/CD26-Zellen, sowie als Negativkontrolle DPPIV/CD26-negative CHO-Zellen. Zur Auftrennung der Proteine wurde ein 7,5% nicht-denaturierendes Gel verwendet. Zur quantitativen Analyse wurden gleiche Proteinmengen von 30 µg aufgetragen. Die Erkennung der hDPPIV/CD26 erfolgte mit dem polyklonalen anti-DPPIV-Antikörper (α -Pig Thori), welcher nur native aber keine denaturierte DPPIV/CD26 erkennt. Als zweiter Antikörper wurde ein Peroxidase-gekoppeltes anti-Kaninchen-IgG eingesetzt und der Blot mittels Lumineszenz entwickelt.

Humane Zelllinien	Vorkommen	Western Blot
CHO-hDPPIV/CD26	Fibroblasten-Linie	+++
CHO	Fibroblasten-Linie	-
MelOH	Primärtumor Melanom	-
Mel2A	Metastase Melanom	-
MCF-7	Mammakarzinom	-
K562	lymphatische Zellen	-
HT29	Kolonkarzinom	+
U937	monozytäre Zellen	-
QGP-1	Pankreaskarzinom	-
HUH7	hepatozelluläres Karzinom	+
SW620	Adenokarzinom Kolon	-
LS180	Kolonkarzinom	++
HepG2	Hepatomzellen	++
Bon	neuroendokrines Pankreaskarzinoid	+
Caco-2	Adenokarzinom Kolon	+++

Tabelle 4.1: Übersicht der hDPPIV/CD26 Expression in humanen Tumorzellen nach der Intensität im Western-Blot

Die untersuchten Tumorzelllinien sind nach ihrer DPPIV-Expression im Western-Blot aufgelistet. CHO-hDPPIV/CD26 wurde als Positivkontrolle und CHO als Negativkontrolle eingesetzt. Die Intensität der Banden wird beschrieben durch: – keine Erkennung; + schwache Erkennung; ++ starke Erkennung und +++ sehr starke Erkennung.

4.1.2 Enzymaktivität der DPPIV/CD26 in humanen Tumorzelllinien

Die DPPIV/CD26-Serinproteaseaktivität der untersuchten Tumorzelllinien (Abbildung 4.2) zeigte eine weitgehende Übereinstimmung mit der Intensität der jeweiligen DPPIV/CD26-Expression im Western-Blot. Analog wurden CHO-hDPPIV/CD26-Zellen als Positivkontrolle, sowie CHO-Zellen ohne DPPIV/CD26-Aktivität als Negativkontrolle verwendet. Die Zelllinie Caco-2 zeigte die größte Aktivität, weiterhin positiv waren Bon, HepG2, LS180, HUH7 und HT29. Bei MelOH und Mel2A, sowie MCF-7, K562, U937, QGP-1, Panc-1, HTB26-Zellen konnte keine DPPIV/CD26-Serinproteaseaktivität nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der Proteinexpression im semiquantitativen Assay der Western-Blot-Analyse überein.

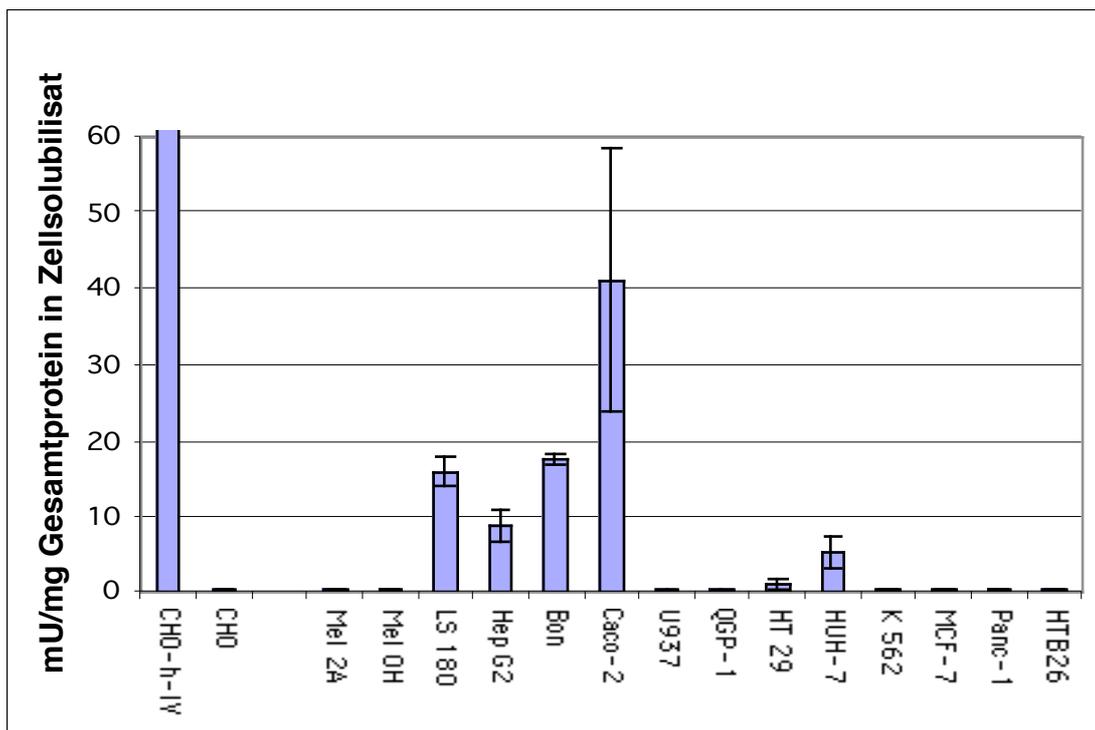


Abbildung 4.2: Enzymaktivität der DPPIV/CD26 in humanen Tumorzelllinien

Aus zwei getrennt aufgearbeiteten Solubilisaten wurden die Mittelwerte der Enzymaktivitäten der humanen Tumorzelllinien in mU/mg aufgetragen. Die Positivkontrolle wurde von CHO-hDPPIV/CD26 gebildet, während CHO als Negativkontrolle diente. Die Ergebnisse stammen aus mindestens zwei unterschiedlichen Solubilisaten mit insgesamt 6 Messungen.

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

Nach Elektroporator-Transfektion und vierwöchiger Kultivierung in Selektionsmedium konnte in transfizierten Mel2A-Zellen (Mel2A-rDPPIV/CD26) eine deutliche membranäre Expression der rDPPIV/CD26 in der Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden (Abbildung 4.3

A+B). Trotz der Selektion ließen sich nicht alle Zellen positiv darstellen, sodaß von einer gemischt-positiven Population ausgegangen wurde.

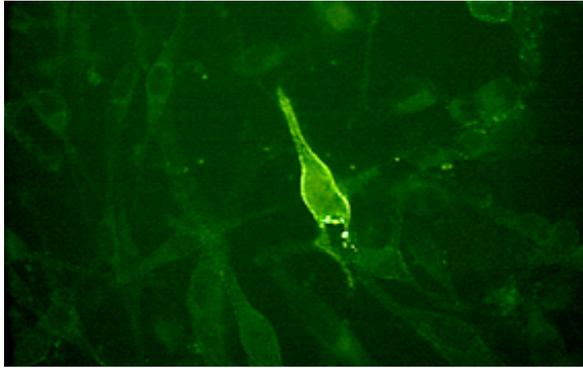
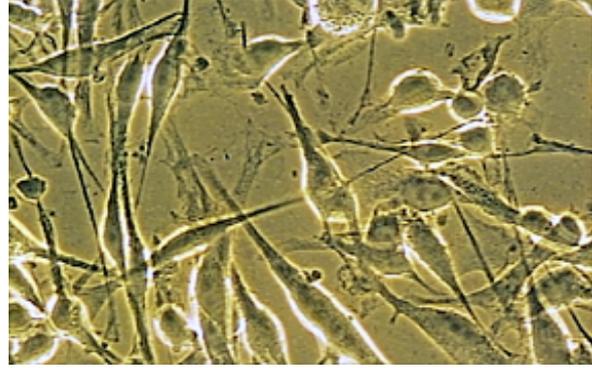
A**B**

Abbildung 4.3: Immunfluoreszenzmikroskopie der rDPPIV/CD26 auf der Zelloberfläche einer nicht-permeabilisierten, transfizierten Mel2A-rDPPIV/CD26

Die rDPPIV/CD26-Zelloberflächenexpression konnte in nicht-permeabilisierten Mel2A-rDPPIV/CD26 mittels polyklonalem anti-rDPPIV/CD26-Antikörper (AS₃ K₇) und FITC-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG dargestellt werden. Abbildung **A** zeigt die Ansicht unter UV-Licht, während die Zellen in Abbildung **B** als Kontrolle bei Taglicht zu sehen sind.

4.2.2 Nachweis der rDPPIV/CD26 in transfizierten Mel2A-rDPPIV/CD26 mittels FACScan-Analyse

Ein weiterer Nachweis der r-DPPIV/CD26-Expression in transfizierten Mel2A-rDPPIV/CD26 erfolgte mittels FACScan-Analyse. Im Gegensatz zu parentalen Mel2A konnte bei transfizierten Mel2A-Zellen eine deutliche DPPIV/CD26-positive Population dargestellt werden (Abbildung 4.4). Dieser Befund war ein weiterer Hinweis, daß es sich zwar um eine relativ stabile, jedoch gemischt-positive Population handelte.

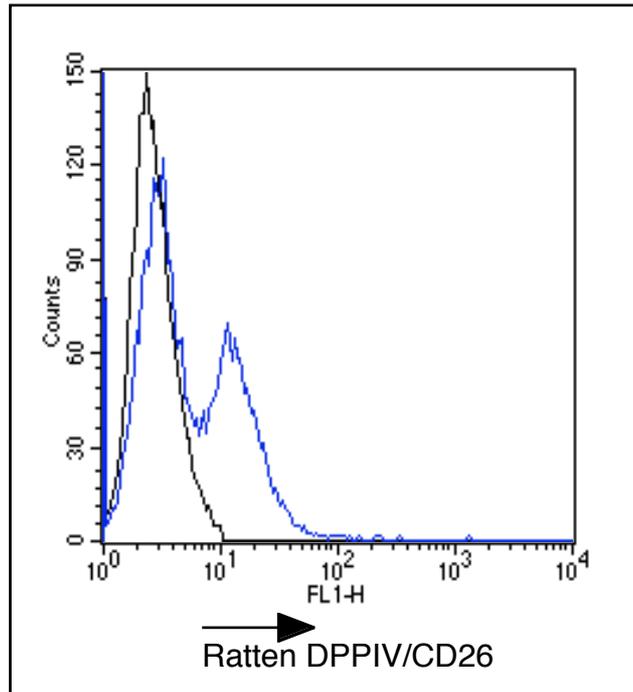


Abbildung 4.4: FACScan-Analyse der rDPPIV/CD26-Expression in transfizierten Mel2A-rDPPIV/CD26

Die parentalen Zellen bilden den ersten schwarzen Pik, während der blaue Doppelpik Mel2A-rDPPIV/CD26 darstellt. Die rDPPIV/CD26-positiven Zellen (Mel2A-rDPPIV/CD26) erscheinen nach rechts verschoben als zweiter Pik. Die Zellen wurden zuerst mit anti-rDPPIV-Antikörper (AS₃ K₇) und dann mit FITC-gekoppelten anti-Kaninchen-Immunglobulin inkubiert.

4.3 Klonierung der transfizierten Mel2A-rDPPIV/CD26

Aufgrund der gemischt-positiven DPPIV/CD26-Population wurden die Mel2A-rDPPIV/CD26 unter stetigem Selektionsdruck kloniert.

4.3.1 Nachweis der DPPIV/CD26 - Expression nach Klonierung der Mel2A-rDPPIV/CD26-Transfektanten mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Nach Selektionsdruck wurden von 73 Ansätzen 14 Klone in der Immunfluoreszenzmikroskopie als DPPIV/CD26-positiv identifiziert. Obwohl innerhalb eines Klones sich nicht alle Zellen

gleichmäßig positiv darstellten, zeigten jedoch diese Klone eine deutlich häufigere und höhere DPPIV/CD26-Expression. Beispielhaft ist die DPPIV/CD26-Expression anhand eines Klones dargestellt (Abbildung 4.5 A+B).

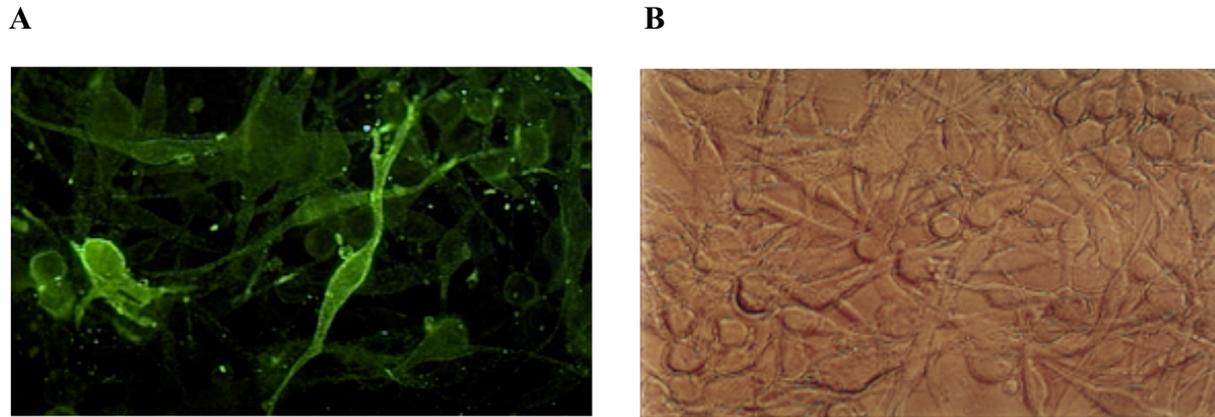


Abbildung 4.5: Nachweis der DPPIV/CD26-Expression nach Klonierung der Mel2A-rDPPIV/CD26-Transfektanten in der Immunfluoreszenzmikroskopie

Am Beispiel eines Klones konnte die DPPIV/CD26-Expression nach Klonierung in der Immunfluoreszenz dargestellt werden. Die Zellen wurden zuerst mit anti-DPPIV-Antikörper (α -Pig Thori) und dann mit FITC-gekoppeltem anti-Kaninchen-IgG inkubiert. Abbildung **A** zeigt DPPIV/CD26-positive Zellen unter UV-Licht, Abbildung **B** zeigt als Kontrolle die gleiche Ansicht bei Taglicht.

4.3.2 DPPIV/CD26 - Expression nach Klonierung der Mel2A-rDPPIV/CD26-Transfektanten in der FACScan - Analyse

Zu den Klonen mit der höchsten DPPIV/CD26-Expression gehörten Mel2A-rDPPIV/CD26-Klone E12, E7 und G5. In der FACScan-Analyse ließ sich eine quantitativ unterschiedliche DPPIV/CD26-Expression der Klone nachweisen. Nach dreimonatiger Kultivierung in Selektionsmedium fiel auf, daß sich eine Expressionsabnahme der DPPIV/CD26 vor allem in den beiden Klonen E12 und E7 mit der anfangs größten DPPIV/CD26-Positivität zeigte. Darüberhinaus stellte sich keine einheitliche positive Population mehr dar. Dieses Verhalten führte zu der Annahme, daß rDPPIV/CD26 einen Einfluß auf das Wachstum der Zellen hat und zu einer Selektion (Aussortieren) der DPPIV/CD26-positiven Zellen führt (Abbildung 4.6 A+B).

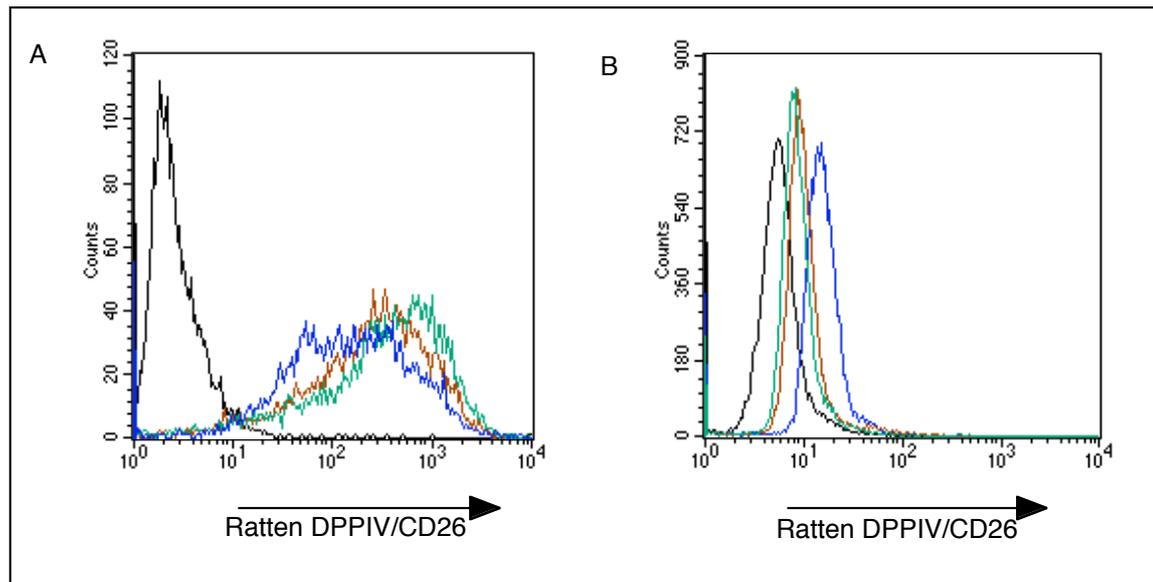


Abbildung 4.6: FACS-Analyse mit quantitativem Nachweis der DPPIV/CD26-Expression der Mel2A-rDPPIV/CD26-Klone

In der FACS-Analyse wurde die quantitative DPPIV/CD26-Expression der DPPIV/CD26-positiven Klone bestimmt. In Abbildung 4.6. **A** sind die besten Mel2A-rDPPIV/CD26-Klone von links nach rechts G5 (blau), E7 (braun) und E12 (grün) dargestellt. In Abbildung **B** zeigt sich die quantitative DPPIV/CD26-Expression der selben Klone nach drei Monaten Kultivierung in Selektionsmedium. Die Zellen wurden in beiden Abbildungen mit polyklonalem anti-DPPIV-Antikörper (α -Pig Thori) und PE-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG vorbehandelt.

4.4 Ratten – DPPIV/CD26 vermittelte Apoptose der Mel2A-rDPPIV/CD26

In Kultur wurde bei Mel2A-rDPPIV/CD26 ein geringeres Wachstum gegenüber den parentalen Zellen beobachtet. Darüberhinaus kam es über einen dreimonatigen Zeitraum zu einer DPPIV/CD26-Expressionsabnahme. Diese Befunde unterstützten die Vermutung, daß rDPPIV/CD26 am Wachstum oder an der Apoptose der Zellen beteiligt ist. In einem Vorversuch zeigte sich nach Serumentzug ein noch stärker verringertes Wachstum und die Ausbildung von Apoptosekörperchen innerhalb von nur 2 bis 4 Tagen. In folgenden Untersuchungen wurde überprüft, ob rDPPIV/CD26 die Apoptose der Zellen vermittelt.

4.4.1 Nachweis der vorzeitigen Apoptose nach Serumentzug der Mel2A-rDPPIV/CD26 mittels Annexin V-Analyse

Sobald die Zellen in Apoptose treten, wird Phosphatidylserin, auf der Innenseite der Zellmembran gelegen, nach außen gekehrt. FITC-gekoppeltes Annexin V bindet das Phosphatidylserin. Somit dient die Messung des Annexin V im FACScan als Nachweis der Apoptose.

Nach vier Tagen Serumentzug zeigten parentale Mel2A keine positive Färbung von Annexin V. Im Gegensatz zu parentalen Zellen konnte bei Mel2A-rDPPIV/CD26-Klon G5 bereits am zweiten Tag und bei den Klonen E7 und E12 am vierten Tag nach Serumentzug eine deutliche Anfärbung mit FITC-konjugiertem Annexin V nachgewiesen werden (Abbildung 4.7 A bis D).

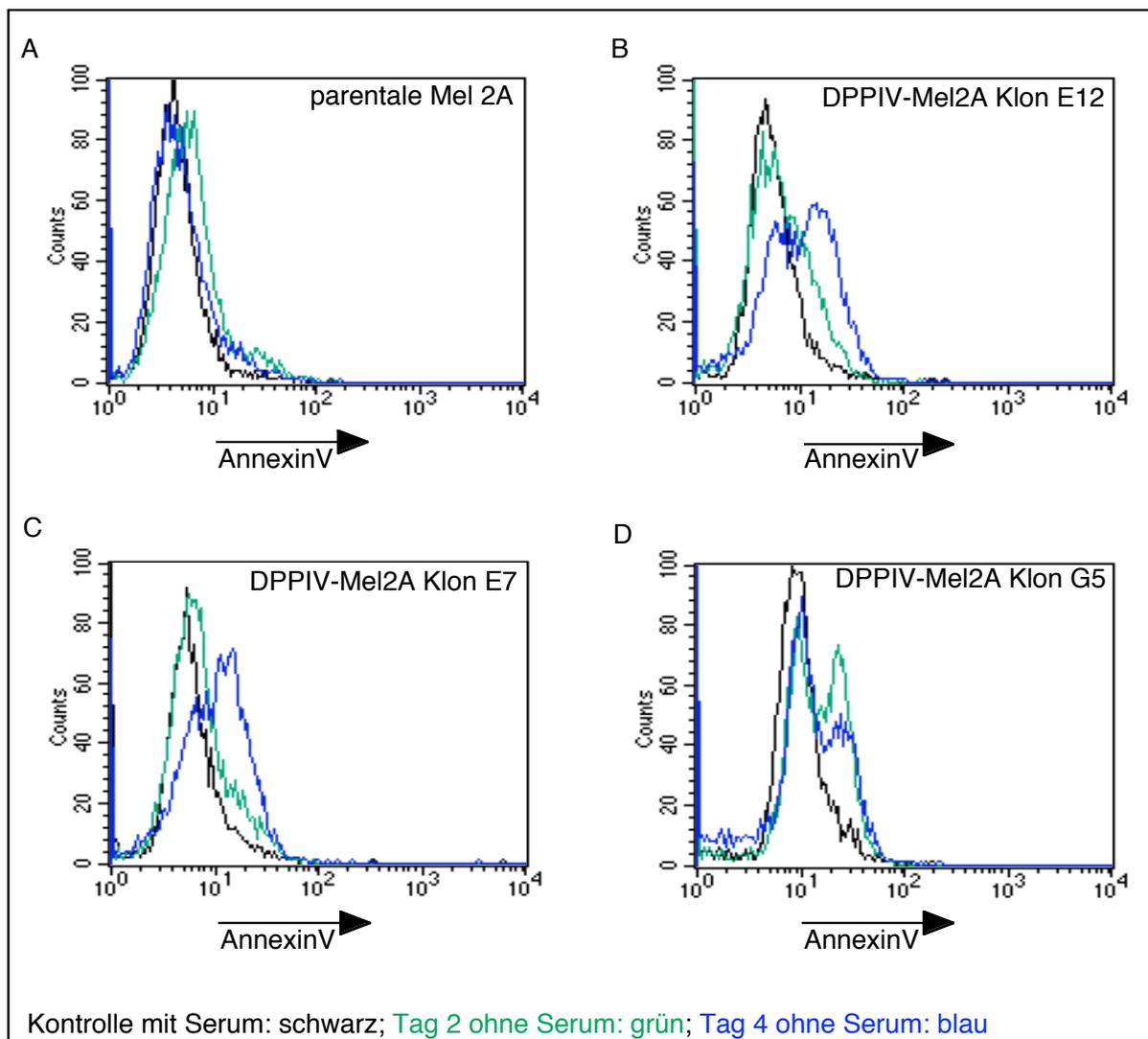


Abbildung 4.7: Nachweis der rDPPIV/CD26 vermittelten Apoptose nach Serumentzug durch Inkubation mit Annexin V-FITC

Nach zwei und vier Tagen Kultivierung in serumfreien Medium erfolgte die Anfärbung der Zellen mit FITC-gekoppeltem Annexin V. Als Kontrolle dienten Zellen nach viertägiger Kultivierung in serumhaltigen Medium und gleichsamer Anfärbung. Farblich ist die Kontrolle schwarz, und nach Serumentzug der zweite Tag grün und der vierte Tag blau zu erkennen. Es sind in Bild: **A**–parentale Mel2A, folgend die Mel2A-rDPPIV/CD26-Klone in Bild: **B**-Klon E12; **C**–Klon E7 und **D**–Klon G5 dargestellt.

4.4.2 Nachweis der Apoptose der Mel2A-rDPPIV/CD26 mittels Propidiumjodid

In der Spätphase der Apoptose kommt es zu einer DNA-Fragmentierung. Propidiumjodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher in permeabilisierten Zellen durch die Kernmembran gelangt und sich dort an die DNA anlagert. Somit läßt sich die Apoptose und die entsprechende Zellzyklusverteilung mit Propidiumjodid in der FACScan-Analyse quantitativ nachweisen.

4.4.2.1 Apoptoserate der Mel2A-rDPPIV/CD26 mittels Propidiumjodid in der FACScan-Analyse

Es wurden sowohl parentale Mel2A, als auch Mel2A-rDPPIV/CD26-Klone G5, E7 und E12 mit Propidiumjodid angefärbt und im FACS gemessen. Im Vergleich zu parentalen Mel2A mit 2% wurden bei Mel2A-rDPPIV/CD26-Klon G5 mit 6%, E7 mit 13%, E12 mit 13,5% jeweils deutlich höhere Apoptoseraten nachgewiesen (Abbildung 4.8). Die alleinige Expression der rDPPIV/CD26 führte zu einer erhöhten Apoptoserate. Somit konnte eine Korrelation zwischen rDPPIV/CD26-Expression und Apoptose gezeigt werden.

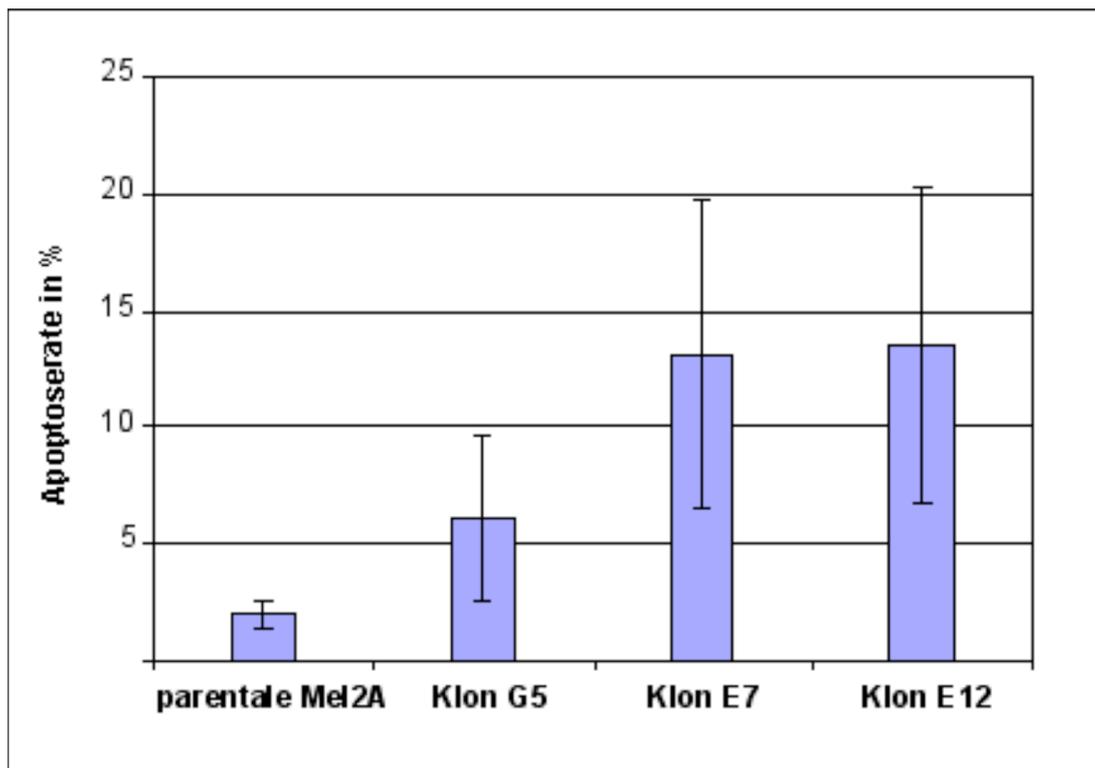


Abbildung 4.8: Apoptoseraten der Mel2A-rDPPIV/CD26-Klone G5, E7 und E12 im Vergleich zu Mel2A in serumhaltigem Medium (n = 3)

4.4.2.2 Apoptoseraten der Mel2A-rDPPIV/CD26 nach Kultivierung in serumfreiem Medium

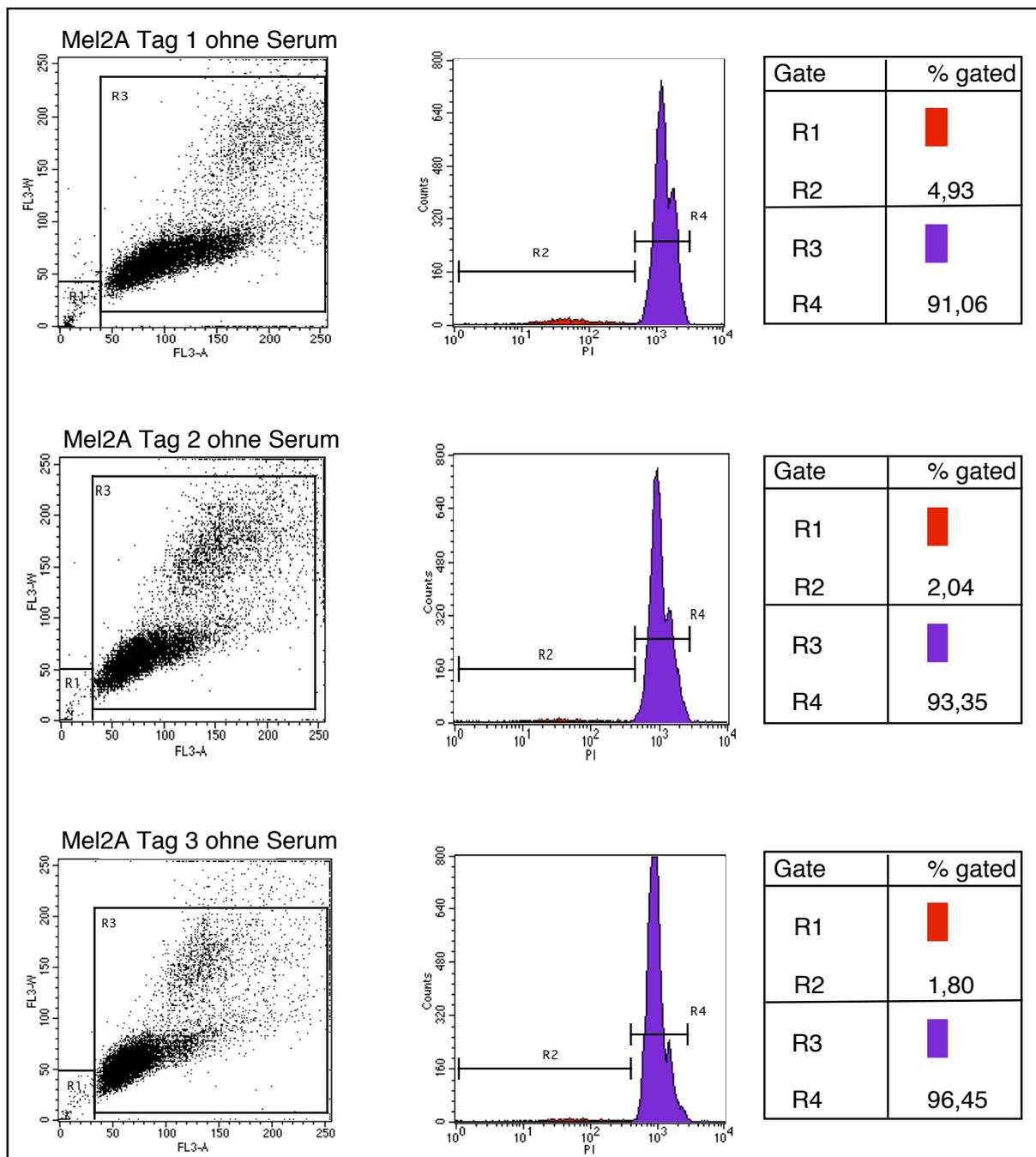
Der Mel2A-rDPPIV/CD26-Klon G5 zeigte die stabilste rDPPIV/CD26-Expression und wurde infolge für weitere Versuche der Apoptoserate in serumfreiem Medium untersucht. Sowohl parentale Mel2A, als auch Mel2A-rDPPIV/CD26-Klon G5 wurden unter selben Bedingungen in serumfreiem und serumhaltigen Medium kultiviert. Die Apoptoseraten der parentalen Mel2A blieben über einen Versuchszeitraum von 4 Tagen im wesentlichen unverändert. Im Gegensatz dazu konnte bei Mel2A-rDPPIV/CD26-Klon G5 eine zeitabhängige Zunahme der Apoptoserate nachgewiesen werden.

Folgend sind die Apoptoseverläufe von Mel2A und Mel2A-rDPPIV/CD26-Klon G5 dargestellt. Im beispielhaften Verlauf in Abbildung 4.9 betragen die Apoptoseraten von Mel2A nach ein bis drei Tagen Serumentzug weniger als 5%. Dagegen stieg die Apoptoserate bei Mel2A-rDPPIV/CD26-Klon G5 am ersten Tag auf 17,16%; am zweiten Tag auf 19,56% und am dritten

Tag auf 38% an. Hiermit wurde eine rDPPIV/CD26 vermittelte Apoptose in Melanomzellen nachgewiesen.

In Tabelle 4.2 bestätigt der Vergleich unterschiedlicher Versuchsansätze nach Serumentzug die Tendenz einer Zunahme der Apoptoserate von Mel2A-rDPPIV/CD26 Klon G5 im zeitlichen Verlauf. Die dennoch reduzierte Apoptoserate nach Versuchswiederholung in Tabelle 4.2 II ist mit einer Abnahme der rDPPIV/CD26-Expression zu erklären (siehe auch Abbildung 4.6).

A



B

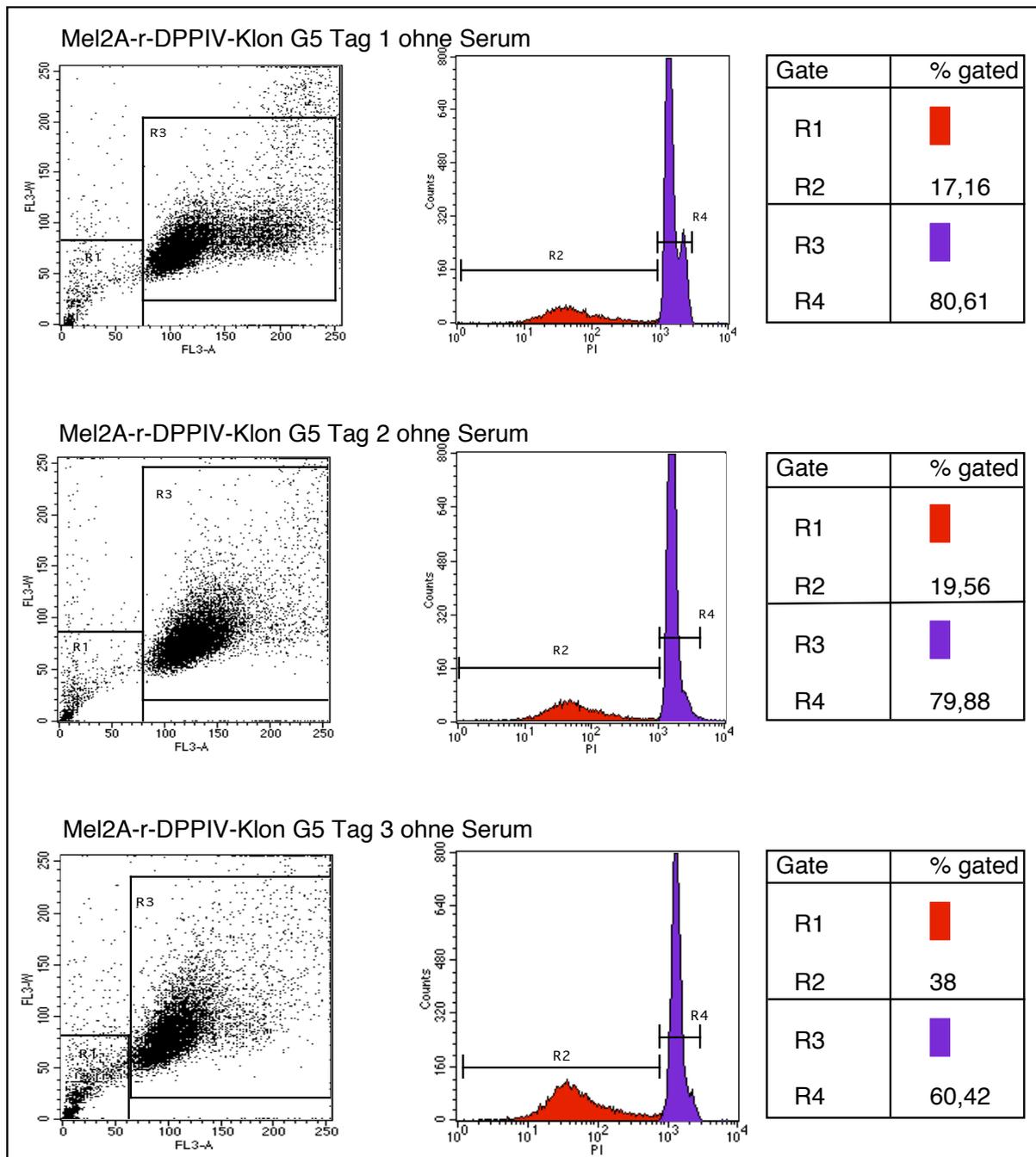


Abbildung 4.9: Nachweis der rDPPiV/CD26 vermittelten Apoptose der Melanomzellen nach Serumentzug mittels Propidiumjodid-FACS-Analyse

Dargestellt sind die Apoptoseraten von Mel2A in Abb. 4.9 A und von Mel2A-rDPPiV/CD26-Klon G5 in Abb. 4.9 B nach einem bis drei Tagen Serumentzug unter gleichen Startbedingungen. Die Messung erfolgte nach Färbung mit Propidiumjodid im FACSscan. Apoptotische Zellen sind rot dargestellt und Gate R2 zeigt die prozentuale Apoptoserate in Relation zu nicht-apoptischen Zellen lila dargestellt in Gate R4.

I

Apoptoseraten in % nach Serumentzug				
Zeitraum nach Serumentzug	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3
parentale Mel2A	4,95	4,93	2,04	1,80
Mel2A-rDPPIV/CD26-Klon G5	9,82	17,16	19,56	38

II

Apoptoseraten in % nach Serumentzug				
Zeitraum nach Serumentzug	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3
parentale Mel2A	2,89	2,63	1,62	1,03
Mel2A-rDPPIV/CD26-Klon G5	4,14	7,61	7,39	16,4

Tabelle 4.2: Prozentuale Apoptoseraten nach Serumentzug

Dargestellt sind die prozentualen Apoptoseraten der Versuche **I** und **II** nach Serumentzug sowohl von parentalen Mel2A, als auch Mel2A-rDPPIV/CD26-Klon G5. Die Zellen wurden mit Propidiumjodid gefärbt und im FACSscan quantitativ analysiert.

4.4.2.4 Zellzyklus - Analyse der Mel2A-rDPPIV/CD26 nach Apoptoseinduktion mittels Färbung mit Propidiumjodid und FACS-Analyse

Aus obigen FACS-Messungen mit Propidiumjodid wurden Zellzyklusveränderungen während der Apoptoseinduktion mit serumfreien Medium analysiert. Parentale Mel2A zeigten weder in Kulturmedium mit Serum noch zwischen zweitem und viertem Tag nach Serumentzug eine maßgebliche Veränderung in der Zellzyklusphasenverteilung. Im Gegensatz dazu wurde bei Mel2A-rDPPIV/CD26-Klon G5 zwischen zwei bis vier Tagen nach Serumentzug eine Abnahme der G2/M und S-Phase beobachtet mit relativer Zunahme der G1/G0-Phase (Abbildung 4.10). Anhand der Befunde wurde nachgewiesen, daß es nach Serumentzug rDPPIV/CD26-vermittelt zu einem Zellzyklusarrest und einer Abnahme der Mitoserate der Mel2A-Melanomzellen kommt.

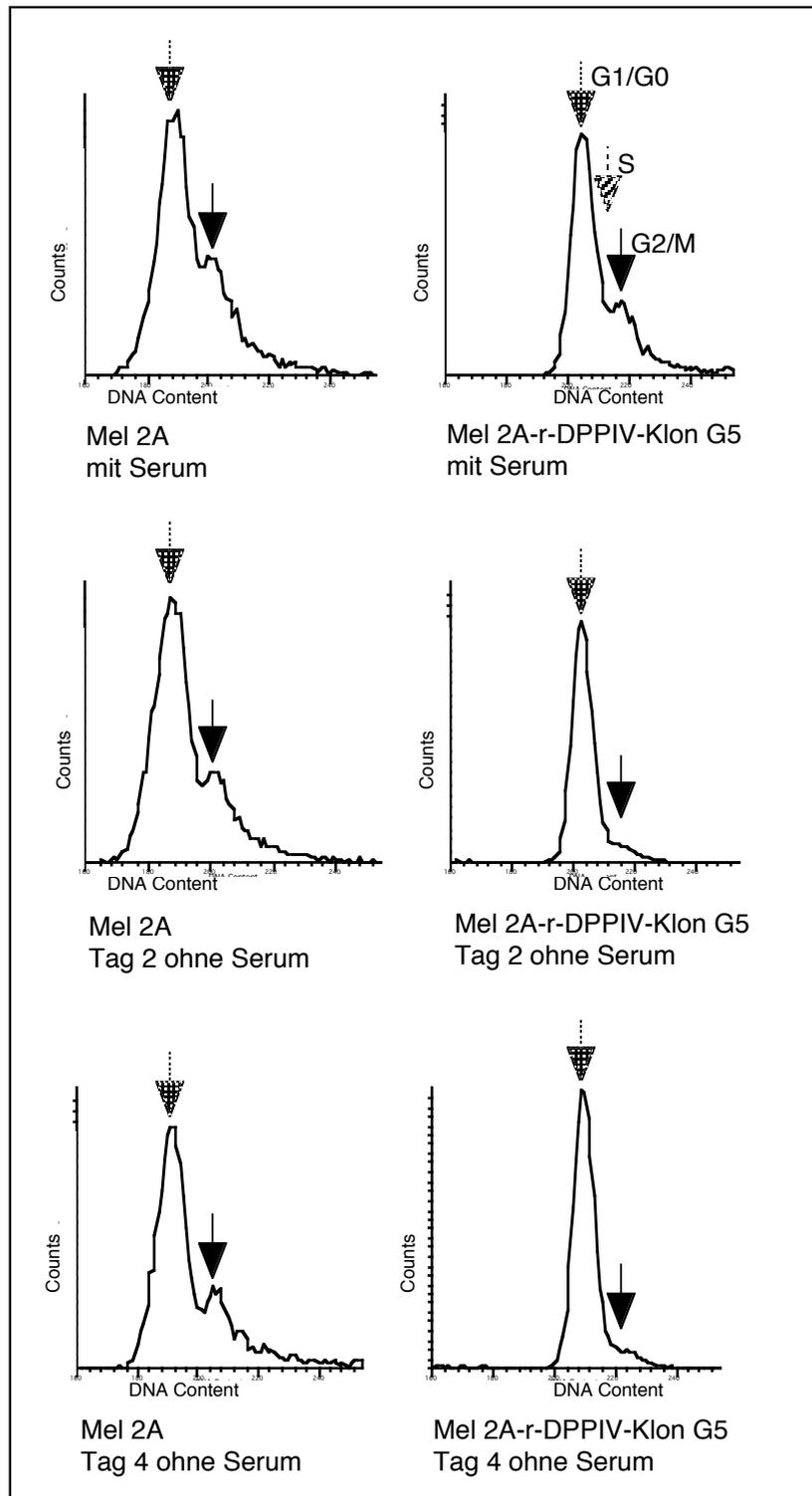


Abbildung 4.10: Analyse des rDPPiV/CD26 vermittelten Zellzyklusarrests mittels Färbung mit Propidiumjodid und Messung im FACScan

Dargestellt ist der DNA-Gehalt nach Kultivierung von Mel2A und Mel2A-rDPPiV/CD26-Klon G5 in Serum und nach zwei bis vier Tagen in serumfreiem Medium.

4.5 Etablierung und Regulation der Human-DPPIV/CD26 - Expression in 303AG7 - Melanomzellen

In vorherigen Versuchen mit Mel2A-Melanomzellen wurde nachgewiesen, daß es nach Transfektion mit Ratten-DPPIV/CD26 zu einer erhöhten Apoptoserate der Melanomzellen kommt. Die rDPPIV/CD26 vermittelte Apoptose führte allerdings auch bei Kultivierung in serumhaltigem Medium zu einer Verringerung der DPPIV/CD26 exprimierenden Zellen. Um die DPPIV/CD26-Expression zu steuern, wurde die cDNA der hDPPIV/CD26 in ein rekombinantes, Tetrazyklin-regulierbares Tet-On Gen-Expressionssystem (Clontech) integriert. Das System besteht aus dem Regulationsplasmid Tet-On, sowie aus dem rekombinierbaren Antwortplasmid pTRE2 mit der Zielsequenz. Als Zelllinie wurden 303AG7 aus der Arbeitsgruppe Prof. C. Geilen verwendet. Bei 303AG7 handelt es sich um Bro-Melanomzellen, welche mit dem Tet-On-Regulationsplasmid bereits transfiziert und subkloniert wurden. Humane 303AG7 sind schnellwachsende, undifferenzierte maligne Melanomzellen (Lockshin et al., 1985 (136)).

4.5.1 Analyse der DPPIV/CD26 - Expression in 303AG7 mittels FACScan

303AG7-Melanomzellen wurden zunächst in der FACScan-Analyse auf eine DPPIV/CD26-Expression hin untersucht (Abbildung 4.11). Sowohl im Histogramm, als auch im Dot-Blot konnte nur eine Zellpopulation dargestellt werden, sodaß eine DPPIV/CD26-Expression in Mel303AG7 ausgeschlossen wurde.

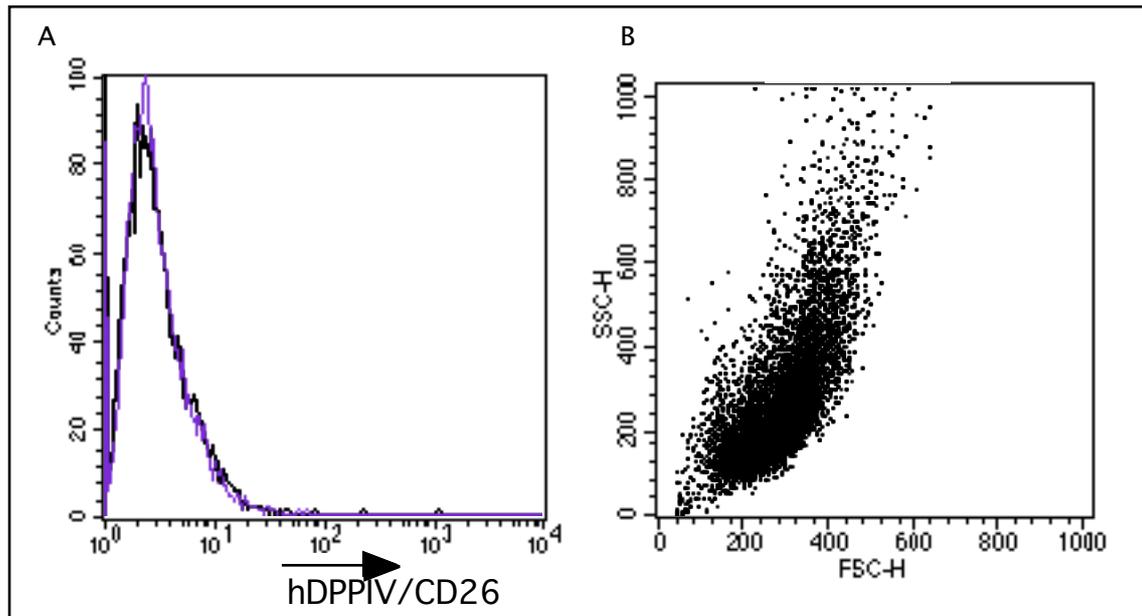


Abbildung 4.11: FACS-Analyse mit Ausschluß einer DPPIV/CD26-Expression in 303AG7

Dargestellt ist der Ausschluß einer DPPIV/CD26-Expression in 303AG7 mittels FACS-Analyse. In Abbildung 4.11 A unterscheidet sich die Kontrolle (schwarz) nicht von den mit Antikörpern vorbehandelten Zellen (lila). Die Färbung der Zellen erfolgte zuerst mit dem polyklonalen anti-Human-DPPIV-Antikörper (R3/2) und danach mit FITC-gekoppeltem anti-Kaninchen-IgG. Abbildung 4.11 B zeigt den Dot-Plot der gefärbten 303AG7.

4.5.2 Analyse der DPPIV/CD26-Expression in 303AG7 durch Immunpräzipitation und SDS-Page

Nach Immunpräzipitation und Auftrennung im SDS-Page mit anschließender Silberfärbung wurde hDPPIV/CD26 in CHO-hDPPIV/CD26 dargestellt. Weder in der Negativkontrolle, CHO-Zellen, noch in 303AG7 konnte eine DPPIV/CD26-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 4.12). Zusammen mit den Ergebnissen aus 4.5.1 kann eine DPPIV/CD26-Expression in 303AG7-Melanomzellen ausgeschlossen werden.

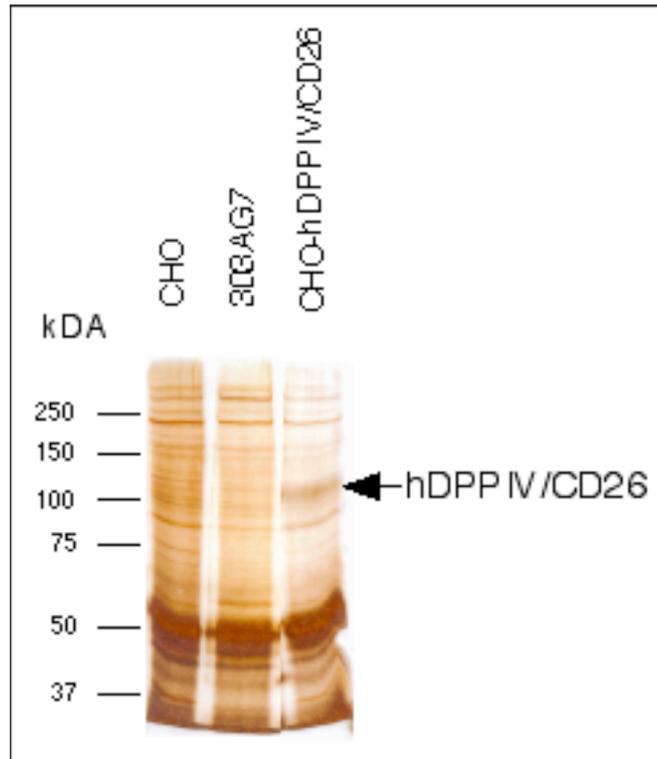


Abbildung 4.12: Silbernitratfärbung nach Immunpräzipitation mit Ausschluß einer DPPIV/CD26-Expression in 303AG7

Dargestellt ist der Ausschluß einer DPPIV/CD26-Expression in 303AG7 mittels SDS-Page und Silbernitratfärbung nach Immunpräzipitation. Als Positivkontrolle sind CHO-hDPPIV/CD26, sowie als Negativkontrolle CHO-Zellen dargestellt. Die Zellsolubilisate wurden mit spezifischen anti-hDPPIV-Antikörper (IgG 9/5)-Protein-A-Sepharose präzipitiert, denaturiert und nach Auftrennung im SDS-Page mit Silbernitrat gefärbt.

4.5.3 Integration der cDNA von hDPPIV/CD26 in das Tet-regulierbare Gen-Expressionssystem

Die Funktionsweise des Tet-On-Gen-Expressionssystems ist detailliert unter Methoden beschrieben. Im Folgenden wird die Integration der hDPPIV/CD26-cDNA in den rekombinierbaren Antwortvektor pTRE2 dargestellt (Abbildung 4.13). Das fertige Plasmid mit pTRE2 und hDPPIV/CD26 wurde als F202 bezeichnet.

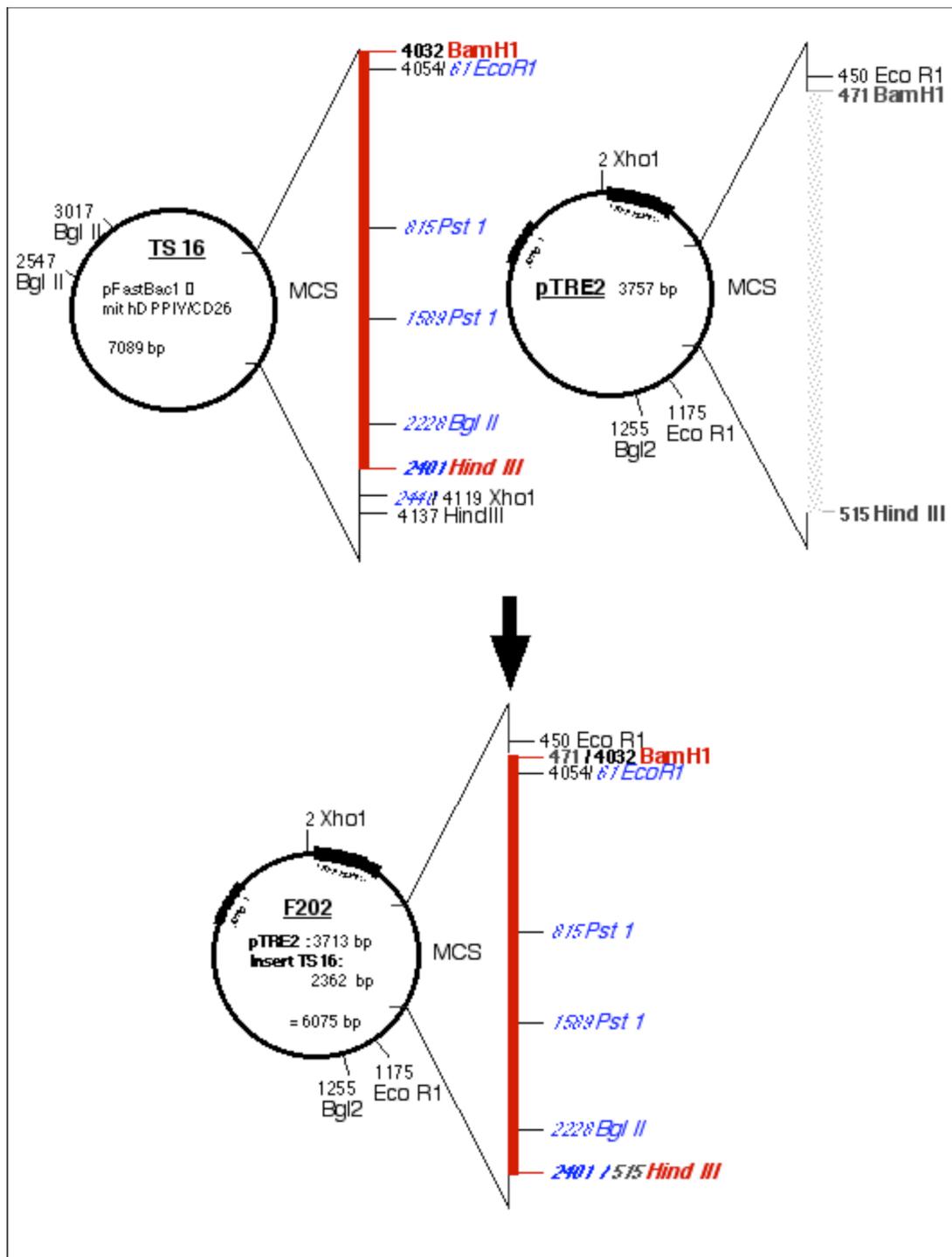


Abbildung 4.13: Konstruktion des rekombinierten Expressionsplasmids F202 mit hDPPIV/CD26-cDNA

Die cDNA der hDPPIV/CD26 wurde aus dem Plasmid TS16 (aus der Arbeitsgruppe Dr. H. Fan) von BamHI bis HindIII herausgespalten und an den Positionen zwischen BamHI⁴⁷¹

und HindIII⁵¹⁵ in die MCS des Plasmidvektors pTRE2 integriert. Das Konstrukt aus pTRE2-Vektor und hDPPIV/CD26-Insert wurde als F202 bezeichnet.

4.5.3.1 Herstellung des hDPPIV/CD26-Inserts und pTRE2-Vektors nach Restriktionsverdau

Die cDNA des hDPPIV/CD26-Inserts bestand aus 2379 bp (Position 61-2440) und wurde aus dem rekombinierten Plasmid TS16 mit 7089 bp herausgespalten. Die Spaltung von TS16 mit HindIII²⁴⁰¹ ergab ein lineares Fragment von 7032 bp (Abbildung 4.14 A). Nach weiterer Spaltung mit BamHI⁴⁰³² konnte das hDPPIV/CD26-Insert mit einer Länge von 2362 bp vom Plasmidvektor herausgeschnitten werden. Die unterschiedlichen Spaltprodukte wurden durch Agarose-Gel-Elektrophorese getrennt und das hDPPIV/CD26-Insert aus dem Gel eluiert (Abbildung 4.14 B).

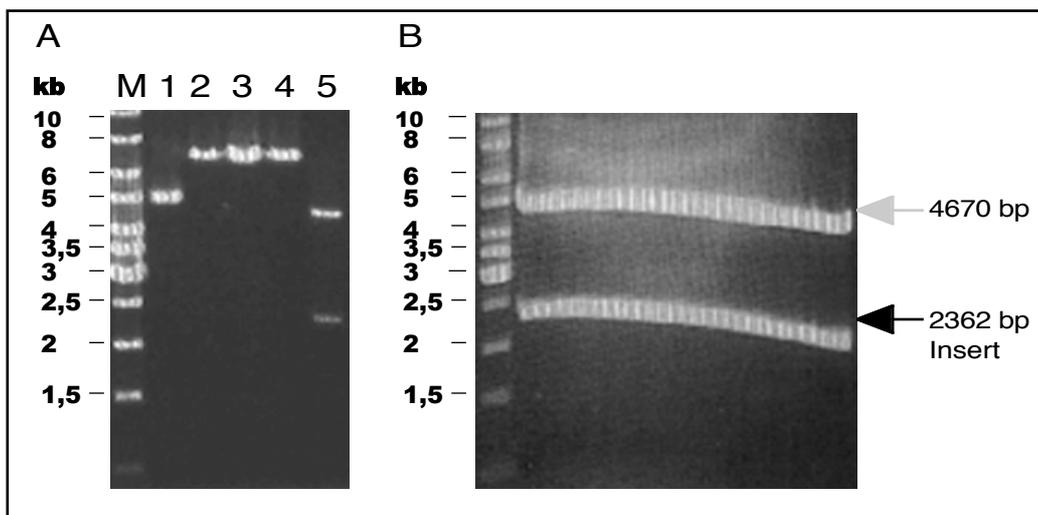


Abbildung 4.14: Restriktionsverdau von TS16 mit Isolierung des hDPPIV/CD26-Inserts

Als Kontrolle der vollständigen Spaltung wurde TS16 sowohl ungespalten, als auch einzeln mit HindIII oder BamHI und nach Doppelspaltung verglichen. Bild A zeigt in Spur 1: TS16 ungespalten: supercoiled; Spur 2: Analysespaltung von TS16 mit Hind III: 7032 bp, (Überhang 57 bp); Spur 3: Präparative Spaltung von TS16 mit Hind III: 7032 bp, (Überhang 57 bp); Spur 4: Analysespaltung von TS16 mit BamHI: 7089bp; Spur 5: Präparative Spaltung von TS16 mit HindIII und BamHI: 4670 bp, 2362 bp, (Überhang 57 bp). Bild B zeigt die Trennung des Inserts,

2362 bp, nach präparativem Verdau des TS16-Plasmides mit HindIII²⁴⁰¹ und BamH1⁴⁰³² und nach Elektrophorese.

Die Spaltung des Vektors pTRE2 (Clontech) mit HindIII⁵¹⁵ ergab ein lineares Fragment von 3757 bp (Abbildung 4.15). Die Schnittstellen für HindIII⁵¹⁵ und BamH1⁴⁷¹ waren sehr nahe gelegen. Nach Gelextraktion des linearisierten Vektors durch Abspaltung von HindIII wurde die präparative Spaltung mit BamH1 weiter durchgeführt.

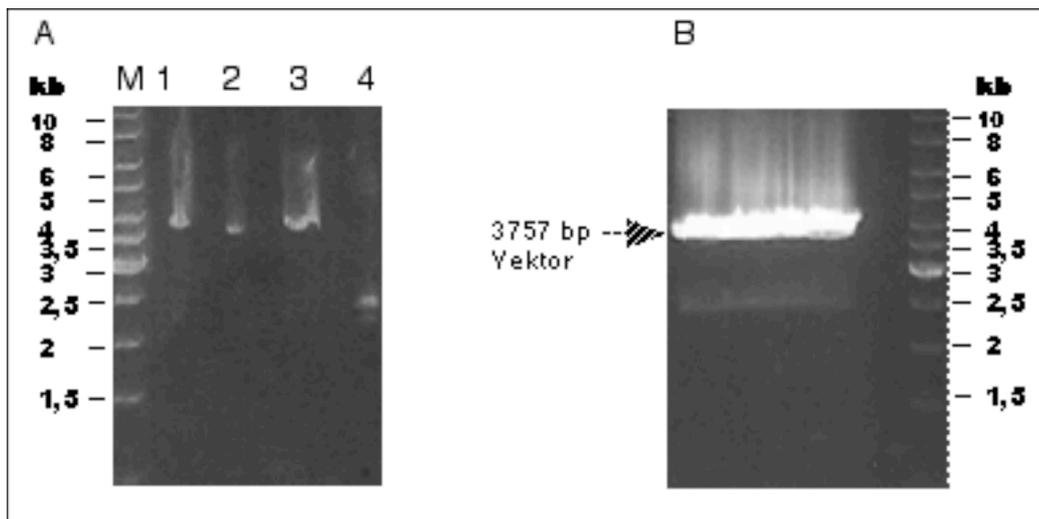


Abbildung 4.15 A + B: Restriktionsverdau von pTRE2 mit Isolierung des linearen Vektors nach Spaltung mit HindIII⁵¹⁵

Als Kontrolle des präparativen Verdau zeigt Bild A in Spur 1: Analysespaltung von pTRE2 mit Hind III: linear 3757 bp; Spur 2: präparative Spaltung von pTRE2 mit Hind III: s.o.; Spur 3: Analysespaltung von pTRE2 mit BamH1: linear 3757 bp; Spur 4: pTRE2 ungespalten mit Restriktionsenzym Puffer: supercoiled. In Bild B ist bei 3757 bp das Spaltprodukt aus pTRE2 mit Hind III auf einem präparativen Agarosegel 0,8% dargestellt.

4.5.3.2 Ligation von pTRE2-Vektor und hDPPIV/CD26-Insert

Für die Ligation ist es von Bedeutung, daß die eingesetzte Menge des Inserts die des Vektors überwiegt. Der direkte Mengenvergleich auf dem Agarosegel der DNAs zwischen pTRE2-Vektor und hDPPIV/CD26-Insert ergab ein Übergewicht seitens des Vektors (Abbildung 4.16), sodaß im Ligationsansatz hDPPIV/CD26-Insert im Volumenverhältnis 5:1 eingesetzt wurde.

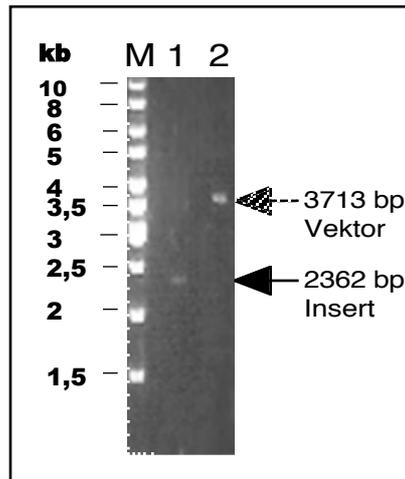


Abbildung 4.16: Mengenvergleich von pTRE2-Vektor und h-DPPIV-Insert cDNA
Dargestellt ist der Mengenvergleich nach Isolierung von Vektor und Insert: Spur 1: hDPPIV/CD26-Insert 2401 bp; Spur 2: pTRE2-Vektor: 3713 bp. Es wurden jeweils 1 μ l/50 μ l eingesetzt.

4.5.3.3 Nachweis des rekombinierten pTRE2-hDPPIV/CD26-Klons (F202) nach Endonukleaseverdau

Nach Transformation des Ligationsansatzes (4.5.3.2) und anschließender Klonierung wurden 19 F202-Klone mittels Minilysat-Methode aufbereitet. Die korrekte Konstruktion wurde an vier F202-Klonen im enzymatischen Verdau mit XhoI, EcoRI, EcoRI mit Bgl II, sowie BamHI mit HindIII in der Gelelektrophorese nachgewiesen. Beispielfhaft in Abbildung 4.17 dargestellt ergab die Spaltung zweier F202-Klone mit XhoI ein lineares Fragment von 6075 bp und die Spaltung mit EcoRI ein lineares Fragment von 3075 bp und 3000 bp.

Der für weitere Versuche verwendete F202 Klon wurde nach einer Maxi-pDNA-Aufbereitung zusätzlich noch mit EcoRI zusammen mit Bgl II und BamHI mit HindIII analysiert. Beispielfhaft in Abbildung 4.18 ergab der Verdau mit den Enzymen HindIII und BamHI die Fragmente 3713 bp, 2362 bp, sowie mit EcoRI und Bgl II die Fragmente 2995 bp, 2167 bp, 833 bp und 80 bp (Überhang). Eine Zusammenfassung der Fragmentlängen nach enzymatischer Spaltung ist in Tabelle 4.3 zu sehen.

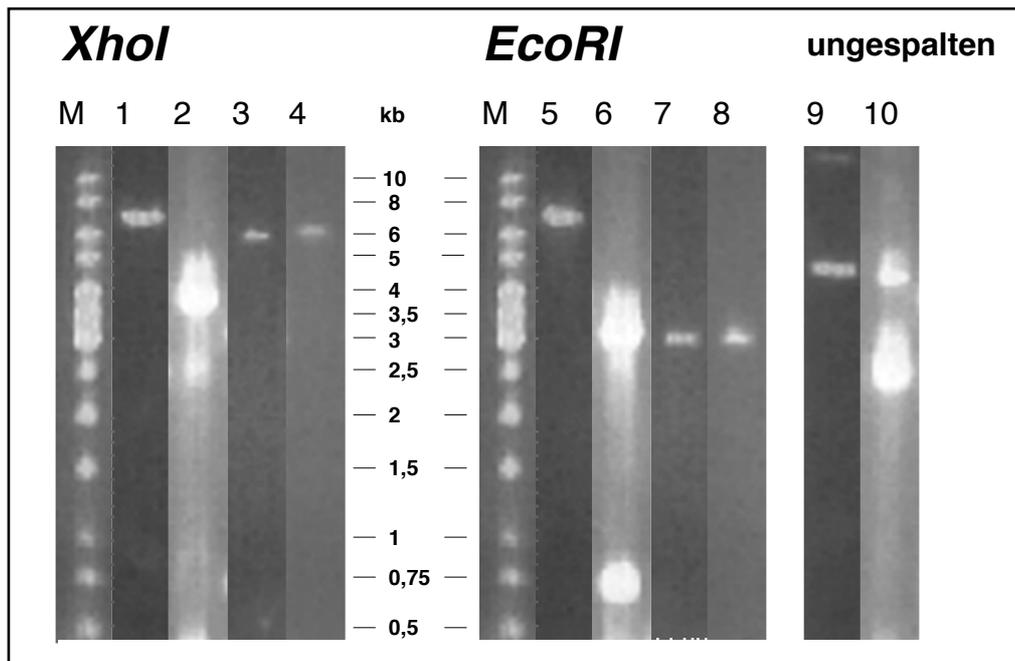


Abbildung 4.17: Analyse des rekombinierten pTRE2-hDPPiV/CD26 (F202) durch Endonukleaseverdau

Dargestellt ist die Gel-Elektrophorese mit Nachweis der korrekten Konstruktion von F202 am Beispiel zweier Klone mittels Analysespaltung mit XhoI und EcoRI. Links ist die Analysespaltung mit XhoI dargestellt: Spur 1: TS16 als Kontrolle: linear 7089 bp; Spur 2: pTRE2 als Kontrolle: linear 3757 bp; Spur 3 und 4: F202 Klon 1 und Klon 21: linear 6075 bp. Rechts dargestellt ist die Analysespaltung mit EcoRI in Spur 5: TS16 als Kontrolle: 7089 bp; Spur 6: pTRE2 als Kontrolle: 3032 bp, 725 bp; Spur 7 und 8: F202 Klon 1 und Klon 21: 3075 bp, 3000 bp; anschließend ungespalten als Kontrolle in Spur 9: TS16 und in Spur 10: pTRE2.

Abbildung 4.18: Nachweis von pTRE2-hDPPiV/CD26 (F202) durch Endonukleaseverdau mit HindIII und BamHI, sowie EcoRI und Bgl II

Als Nachweis der korrekten Konstruktion von F202 Klon 1 wurde die Plasmid-DNA aus dem Maxi-Lysat nach Doppelspaltung, HindIII mit BamHI und EcoRI mit Bgl II, in der Gelelektrophorese dargestellt. Als Kontrollen wurden pTRE2 und TS16 parallel analysiert und alle Plasmide auch ungespalten dargestellt. Die Fragmentlängen sind aus Tabelle 4.3 zu entnehmen.

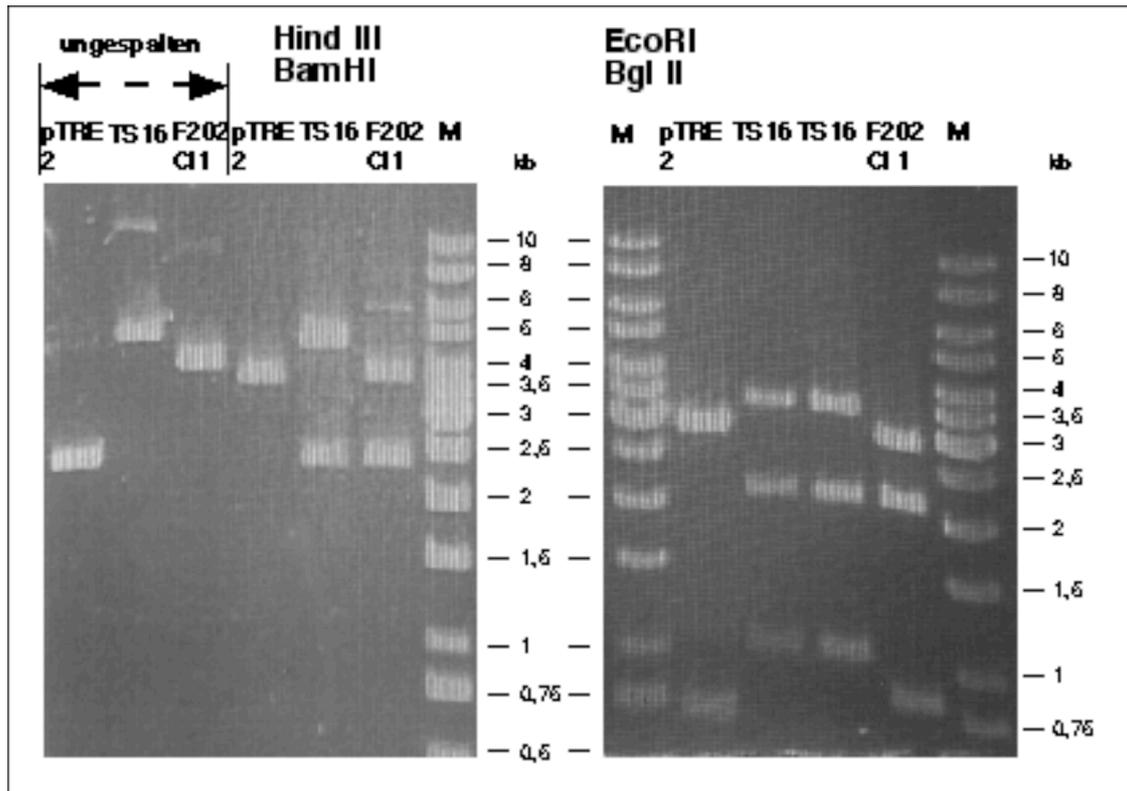


Abbildung 4.18: Nachweis von pTRE2-hDPPiV/CD26 (F202) durch Endonukleaseverdau mit HindIII und BamHI, sowie EcoRI und Bgl II

Als Nachweis der korrekten Konstruktion von F202 Klon 1 wurde die plasmid-DNA aus dem Maxi-Lysat nach Doppelspaltung, HindIII mit BamHI und EcoRI mit Bgl II, in der Gelelektrophorese dargestellt. Als Kontrollen wurden pTRE2 und TS16 parallel analysiert und alle Plasmide auch ungespalten dargestellt. Die Fragmentlängen sind aus Tabelle 4.3 zu entnehmen.

	TS 16 (7089 bp)			pTRE2 (3757 bp)			F202 (6075 bp) (pTRE2-hDPPIV/CD26)		
Enzyme	Position	Anzahl	Länge bp	Position	Anzahl	Länge bp	Position	Anzahl	Länge bp
XhoI	2440	linear	7089	2	linear	3757	2	linear	6075
EcoRI	61	linear	7089	450 1175	2	3032 725	61 1175(V)	2	3075 3000
XhoI + PstI	2440 815 1589	3	5464 851 774	2	linear	3757	2 815 1589	3	4056 1245 774
EcoRI + Bgl II	61 2547 3017 2228	4	3415 2167 1037 470	450 1175 1255	3	2952 725 80	61 1175(V) 2228 1255	4	2995 2167 833 80
BamHI + HindIII	4032 4137 2401	3	4670 2362 57	471 515	2	3713 44	4032 2401	2	3713 2362

(V) Schnittstelle aus einem Anteil des Plasmidvektors pFastBac aus TS16

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der enzymatischen Spaltprodukte der verwendeten Plasmide

4.5.4 Transfektion des Plasmids F202 und hDPPIV/CD26-Expression in 303AG7 - Melanomzellen

Das rekombinante Plasmidkonstrukt F202 wurde transient in 303AG7 transfiziert. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pTRE2 transfiziert. Die Positivkontrolle bildete ein rekombinantes pTRE2/GFP-rDPPIV/CD26-Konstrukt (aus der AG PD Dr. rer. nat. Hua Fan), welches in der Lage ist, ein eigenfluoreszierendes GFP-rDPPIV/CD26-Fusionsprotein zu exprimieren.

4.5.4.1 Nachweis von GFP-rDPPIV/CD26 – Fusionsprotein als Indikator der Expression nach Tet-Induktion mittels Fluoreszenzmikroskopie (Pilotexpression)

Der Erfolg der Transfektion und der optimalen Induktion der Expression wurde nach Tet-Induktion anhand der Fluoreszenz des exprimierten GFP-rDPPIV/CD26-Fusionsproteins unter dem UV-Mikroskop beurteilt (Abbildung 4.20). Zwischen 18 h und 42 h nach der Transfektion mit Doxyzyklin-Induktion nahm sowohl die Zahl der positiven Zellen, als auch die Intensität der Fluoreszenz zu. Die Expression des GFP-rDPPIV/CD26-Fusionsproteins korreliert mit der rDPPIV/CD26-Expression. Nach r-DPPIV/CD26 Re-Expression ist sowohl eine Größenzunahme, als auch eine Veränderung der Morphologie von einem bipolaren zu einem polygonalen Zelltypus zu erkennen (Abbildung 4.20).

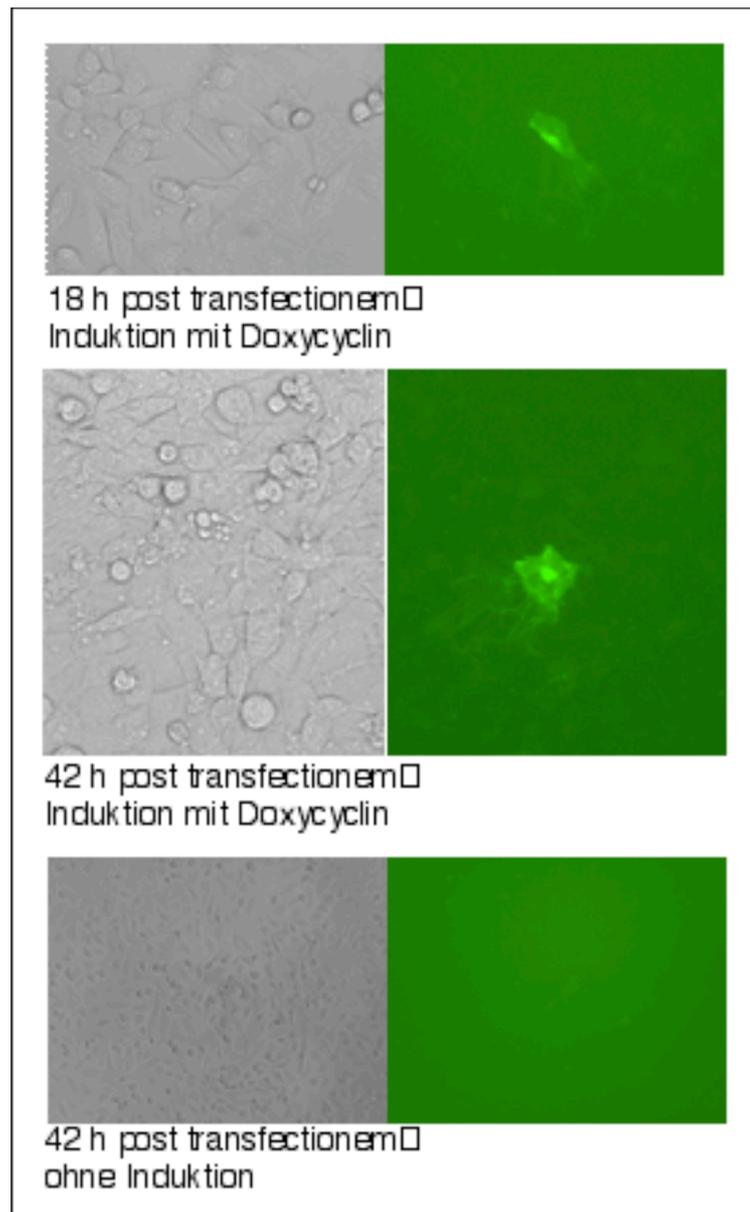


Abb. 4.20: Nachweis der Eigenfluoreszenz des GFP-rDPPIV/CD26-Fusionsproteins nach Induktion im Zeitverlauf

Dargestellt ist der Nachweis der GFP-rDPPIV/CD26-Proteinexpression in 303AG7 18 h und 48 h nach Transfektion mit anschließender Doxyzyklin-Induktion. Die Doxyzyklin-Induktion erfolgte 4 h nach der Transfektion.

4.5.4.2 Nachweis der induzierten hDPPIV/CD26-Expression (F202) in 303AG7 - Melanomzellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde 48 h nach der Transfektion und nach maximaler Tet-Induktion durchgeführt. Nach Induktion mit Doxycyclin konnte weder bei 303AG7, noch bei Leervektor-transfizierten-303AG7 eine Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Hingegen zeigten 303AG7-hDPPIV/CD26 eine deutliche Fluoreszenz als Nachweis einer membranären hDPPIV/CD26-Expression. Nach hDPPIV/CD26-Expression fiel gegenüber hDPPIV/CD26-negativen Zellen eine morphologische Größenzunahme und eine stärkere Ausbildung von Zellfortsätzen auf (Abbildung 4.21).

A

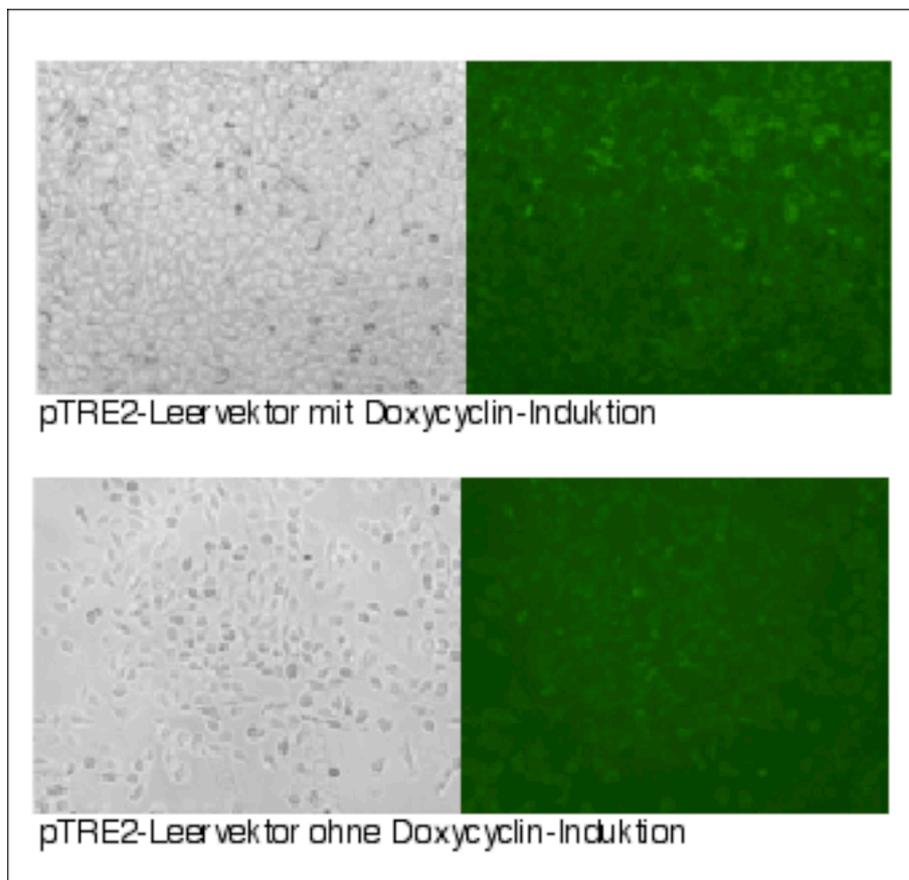
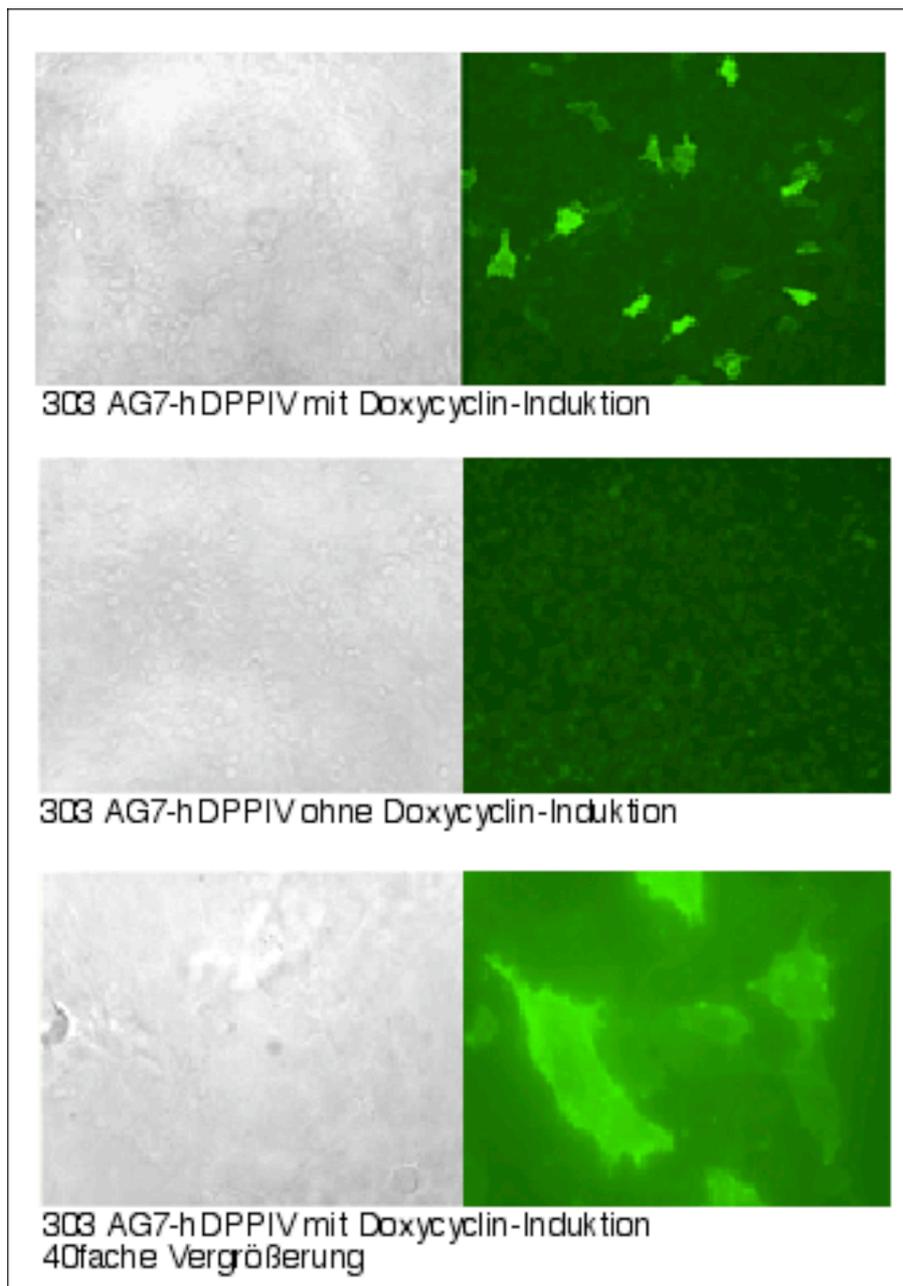


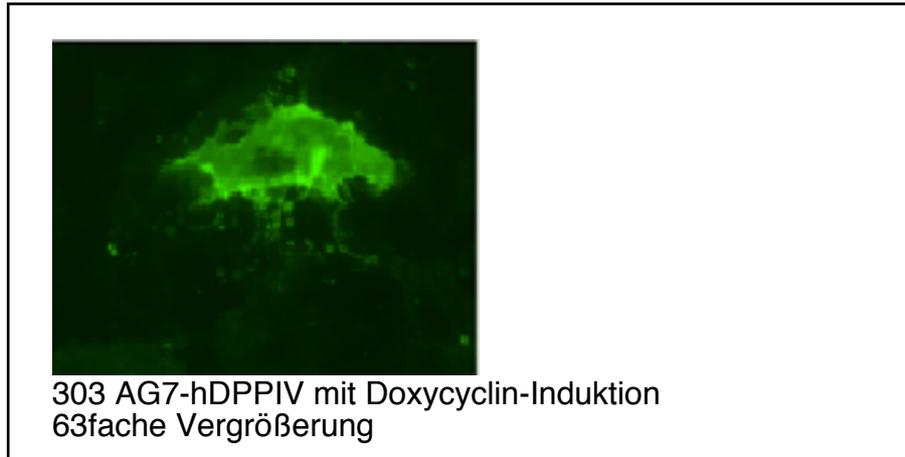
Abbildung 4.21: Immunfluoreszenzmikroskopie mit Nachweis der hDPPIV/CD26-Expression in 303 AG7

Dargestellt ist die Immunfluoreszenz der mit pTRE2-Leervektor transfizierten 303AG7 in Abbildung 4.21 A, sowie mit hDPPIV transfizierte 303AG7 in Abbildung 4.21 B und C sowohl

nach Doxycyclin-Induktion, als auch ohne Induktion. Die Färbung der nicht-permeabilisierten Zellen erfolgte mit dem spezifischen anti-hDPPIV-Antikörper (R3/2) und mit FITC-gekoppeltem anti-Kaninchen-IgG. In Abbildung 4.21 **B** und **C** sind jeweils die gleichen Zellen in unterschiedlicher Vergrößerung dargestellt. Abbildung **C** zeigt die Morphologie einer 303AG7-hDPPIV/CD26-Zelle bei 63facher Vergrößerung.

B

C



4.5.4.3 hDPPIV/CD26 und rDPPIV/CD26 - Enzymaktivität nach transienter Transfektion in 303AG7

Im Folgenden wurde die Enzymaktivität sowohl der hDPPIV/CD26 (F202), als auch der rDPPIV/CD26 (pTRE2/GFP-rDPPIV/CD26) nach transienter Transfektion in 303AG7 in Relation zu CHO-hDPPIV/CD26 beurteilt. Als Negativkontrollen wurden CHO-Zellen ohne DPPIV/CD26-Aktivität, 303AG7 und alle Transfektanten, pTRE2, hDPPIV/CD26, rDPPIV/CD26, ohne Tet-Induktion gewertet. In Relation zu CHO-hDPPIV/CD26 zeigten nach Tet-Induktion 303AG7-hDPPIV/CD26 eine deutliche positive Enzymaktivität (Abbildung 4.22).

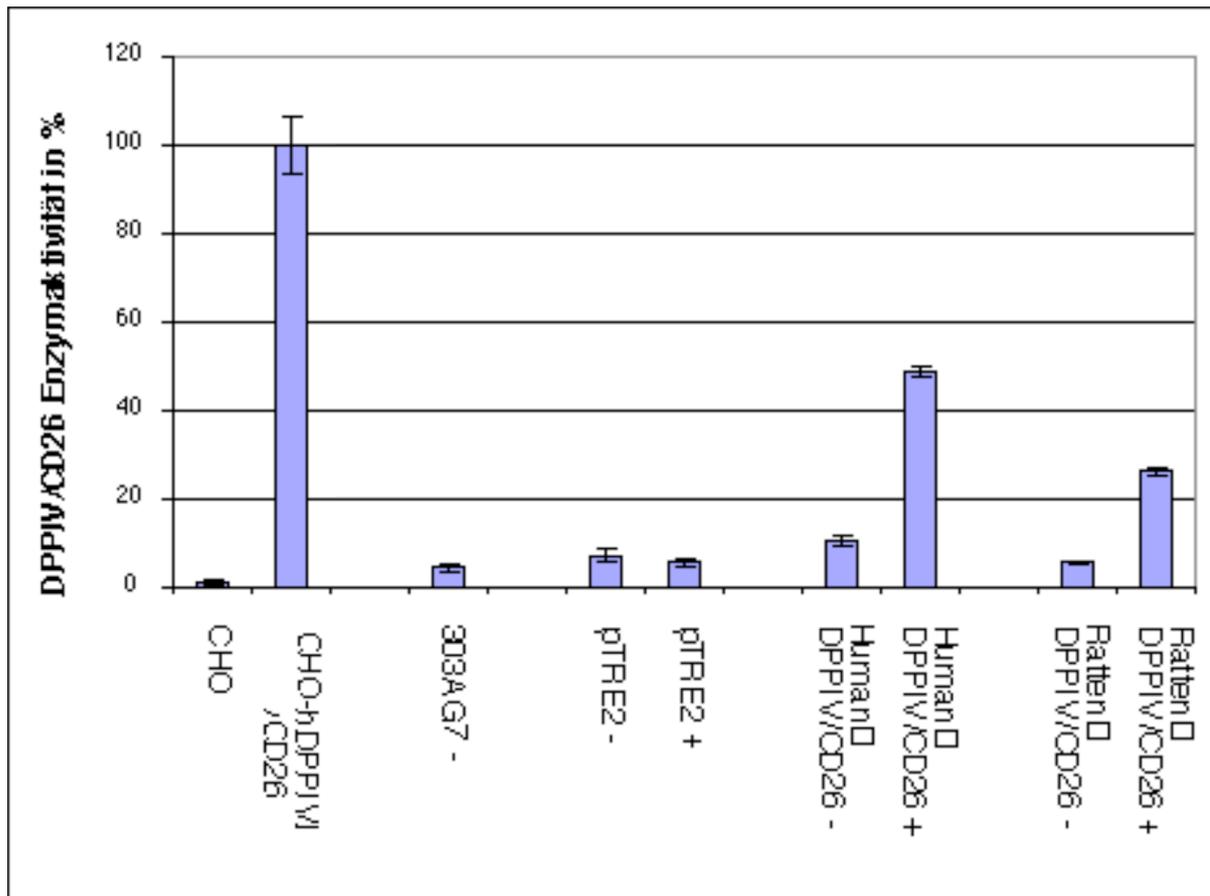


Abbildung 4.22: Nachweis der DPPIV/CD26-Enzymaktivität in 303AG7
 Dargestellt ist die Enzymaktivität von hDPPIV/CD26 und rDPPIV/CD26 in 303AG7 in Relation zu CHO-hDPPIV/CD26-Zellen. Ferner wird unterschieden zwischen (+) nach Doxycyclin-Induktion und (-) ohne Induktion.

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

Im Folgenden wurde der Einfluß der hDPPIV/CD26 auf das Adhäsionsverhalten der 303AG7-Melanomzellen auf den Matrixproteinen Fibronectin, Kollagen I und Kollagen IV untersucht. Als Kontrollen dienten mit Leervektor transfizierte, sowie untransfizierte 303AG7. Alle Zelllinien wurden gleichermaßen mit Doxycyclin induziert. Das Ergebnis war ein erhöhtes Adhäsionsverhalten der 303AG7-hDPPIV/CD26 gegenüber dem Leervektor. Die hDPPIV/CD26 vermittelte Zunahme der Adhäsion war auf Kollagen I stärker ausgeprägt, als auf Kollagen IV und Fibronectin. Hiermit wurde nachgewiesen, daß hDPPIV/CD26 sowohl

die Adhäsion auf Kollagen I und Kollagen IV steigert, als auch Fibronektin bindet.

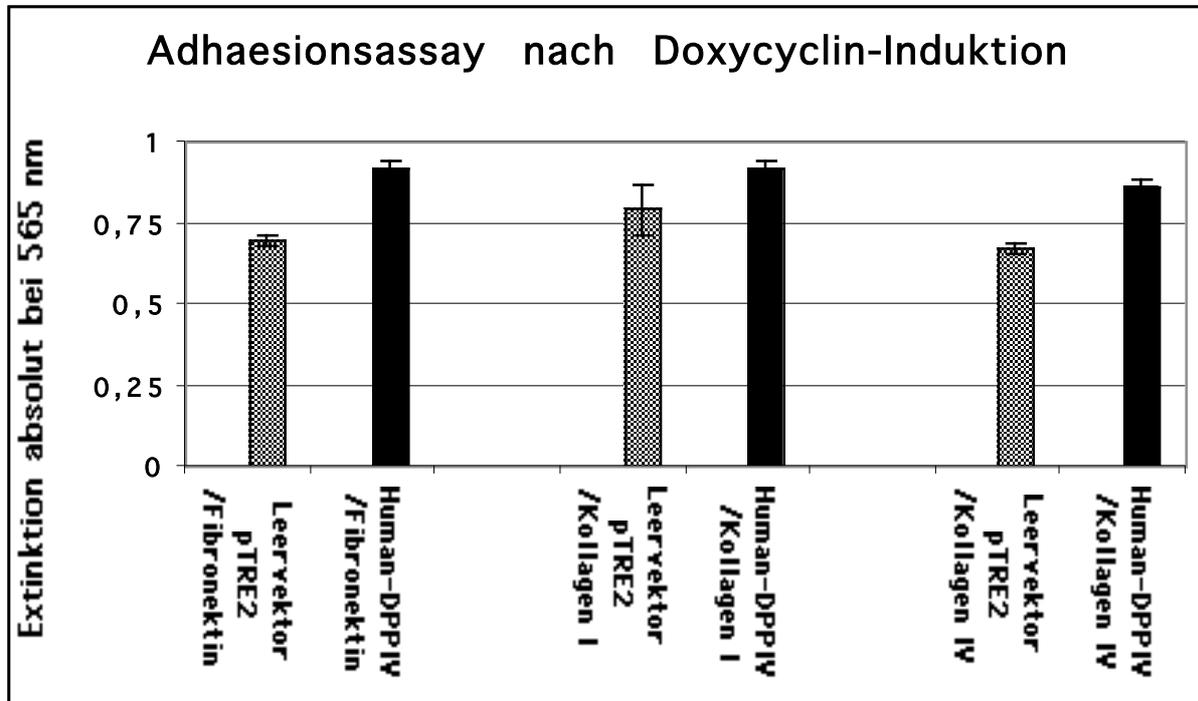


Abbildung 4.23: hDPPIV/CD26 vermitteltes Adhäsionsverhalten auf Matrixproteinen

Beispielhaft ist das Adhäsionsverhalten zwischen 303AG7-pTRE2-Leervektor und 303AG7-hDPPIV/CD26 60 h nach Transfektion und Induktion mit Doxycyclin dargestellt. Es wurden für die Matrixproteine folgende Konzentrationen verwendet: Fibronektin (20 $\mu\text{g/ml}$), Kollagen I (100 $\mu\text{g/ml}$) und Kollagen IV (100 $\mu\text{g/ml}$).