

## 5. Diskussion

Die Expression der Ratten-DPPIV/CD26 führte zu einer erhöhten Apoptoserate der Mel2A-Melanomzellen in Kultur. Nach Serumentzug konnte die Apoptose der rDPPIV/CD26-positiven Melanomzellen im Vergleich zu parentalen DPPIV/CD26-negativen Zellen innerhalb weniger Tage deutlich gesteigert werden. Die Apoptoserate für Mel2A-rDPPIV/CD26 wurde von 4 % auf 38 % am dritten Tag nach Serumentzug gesteigert. Übereinstimmend kam es gleichzeitig nach Serumentzug zu einer Abnahme der G2/Mitose-Phase, sowie S-Phase. Weiterhin spricht die relative Zunahme der G1/G0-Phase für den Eintritt der rDPPIV/CD26-Melanomzellen in einen Zellzyklusarrest.

Die nicht zu verhindernde Abnahme der rDPPIV/CD26-positiven Melanomzellen in Kultur infolge Apoptose hat die Erhaltung stabiler Transfektanten methodisch schwierig gestaltet.

Die gewonnenen Befunde dieser Arbeit stehen im Einklang mit Untersuchungen von Wesley et al. (1999). Er beschreibt ein ähnliches Apoptoseverhalten der Melanomzellen nach Re-Expression humaner DPPIV/CD26 ohne Serinproteaseaktivität in serumfreien Medium und erklärt dieses mit einer Wiederabhängigkeit von Wachstumsfaktoren (211). Den mit der Apoptose einhergehenden Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase konnte Wesley nicht eindeutig der Serinproteaseaktivität zuordnen, sondern vermutete anstelle der Serinproteaseaktivität eine mögliche Interaktion mit Bindungspartnern der hDPPIV/CD26 (211), wie z.B. FAP $\alpha$ . Inwieweit die Ko-Expression von FAP $\alpha$  in diesen Mechanismus integriert ist, wird noch diskutiert (170, 211).

Pethiyagoda et al. (2001) und Wesley et al. (1999) bestätigten eine nach hDPPIV/CD26-Re-Expression in Melanomzellen einsetzende phänotypische Veränderung und Differenzierung ähnlich normaler Melanozyten (170, 211), welche auch bei Mel2A-hDPPIV/CD26 in Kultur beobachtet wurde.

Beide Autoren beschreiben eine mit hDPPIV/CD26 einhergehende Abnahme des ungehemmten Koloniewachstums (170, 211). Pethiyagoda et al. (2001) konnten die Reduktion der ungehemmten Koloniebildung jedoch nicht für alle Melanomzelllinien bestätigen (170).

Die morphologische Differenzierung als auch die Hemmung der Koloniebildung wurde nicht von der zytoplasmatischen Domäne, Membrananker oder proximalen extrazellulären Anteil vermittelt (170). Stattdessen wird eine Beteiligung der Serinprotease hinsichtlich der phänotypischen Veränderung vermutet (211).

Im Gegensatz zu Pethiyagoda beschreiben Wesley et al. (1999) ein Serinprotease-abhängiges vermindertes Zellwachstum *in vitro* und führen dieses auf den späteren Eintritt der Zellen in die logarithmische Wachstumsphase, sowie auf die Wachstumshemmung bei zunehmender Konfluenz zurück (211). Pethiyagoda et al. (2001) begründeten die gegensätzlichen Einflüsse der DPPIV/CD26 auf das Koloniewachstum beziehungsweise die Wachstumsraten *in vitro* mit einem unterschiedlichen Melanomzelltyp mit jeweils unterschiedlicher Differenzierung (170). Weiterhin wurde ein vermindertes Tumorwachstum humaner Melanomzellen in Nacktmäusen nach Transduktion humaner DPPIV/CD26-cDNA mit Serinprotease-Abhängigkeit beschrieben (211). Pethiyagoda et al. (2001) zeigen nach wiederhergestellter hDPPIV/CD26-Expression eine Reduktion der Invasivität maligner Melanomzellen *in vitro* um 75 %, welche weder von der Proteaseaktivität, noch von der zytoplasmatischen Domäne der hDPPIV/CD26 abhängig zu sein schien (170).

Ergebnisse von Wesley et al. (2004) zeigen ein ähnliches tumor-suppressives Verhalten nach DPPIV/CD26-Re-Expression in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen. Im Gegensatz zu normalen Lungenepithelzellen war die DPPIV/CD26-Expression auf Protein und mRNA-Ebene auf nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen deutlich verringert bzw. nicht vorhanden. Eine DPPIV/CD26-Re-Expression führte sowohl zu morphologischen Veränderungen, Hemmung des ungehemmten Wachstums und *in-vitro*- Zellmigration und Tumorgenität, als auch zu einer erhöhten Apoptoserate mit Nachweis erhöhter p21-Expression und G1-Zellzyklusarrest. Begleitend zu den Veränderungen wurden eine erhöhte FAP $\alpha$  und CD44 Expression nachgewiesen (212).

Aus vorherigen oben genannten Arbeiten wird ersichtlich, daß die nach DPPIV/CD26-Re-Expression auftretende Apoptose, Zellzyklusarrest und die um 75 % verringerte Invasivität Serinprotease-unabhängig sind, während die Differenzierung, als auch die Hemmung des Tumorwachstums *in vitro* und *in vivo* eine Serinproteaseaktivität voraussetzen. Weitere Anzeichen sprechen dafür, daß lösliche hDPPIV/CD26 sowohl Einfluß auf die Differenzierung und Koloniebildung, als auch auf die Hemmung der Invasivität hat (170, 211).

In Tumorzellen mit der Fähigkeit des ungehemmten Koloniewachstums wird ein vergleichbares *in vivo*-Metastasierungspotential (34) vermutet, sodaß umgekehrt Gene, welche das ungehemmte Wachstum beeinflussen, auch meist zu einer Beeinflussung des Metastasierungspotentials führen sollten (135).

Im Folgenden werden mögliche Mechanismen der DPPIV/CD26 im Zuge der Tumorgenese und Apoptose diskutiert:

Apoptose ist der programmierte Zelltod einer einzelnen Zelle durch zelleigene proteolytische Enzyme mit Abbau der DNA durch Endonukleasen. In der Initialphase unterscheidet man den extrinsischen Weg durch Ligandenbindung an einen transmembranären Rezeptor, CD95/Fas-Rezeptor, von einem intrinsischen Aktivierungsmechanismus mit Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien ausgelöst durch proapoptische Faktoren, z.B. der Bcl-2 Familie, oder Chemotherapeutika. Beide Aktivierungswege führen zur Freisetzung von Cytochrom C mit Aktivierung weiterer Caspasen.

Raisova et al. (2000) konnten in 5/11 Melanomzelllinien (u.a. Bro ) eine CD95/Fas-Rezeptor und Ceramid-vermittelte Apoptoseaktivierung mit anschließender Cytochrom C Freisetzung und Caspase-3-Aktivierung nachweisen. Demgegenüber zeigte sich in den restlichen untersuchten 6/11 Melanomzelllinien, darunter Mel2A, eine Apoptoseresistenz (174 b). Chemotherapeutika mit direktem Einfluß auf den mitochondrialen Apoptoseweg führten dennoch bei allen untersuchten Melanomzelllinien zur Cytochrom C-Freisetzung. Die obigen Ergebnisse führten daher zu der Annahme, daß es sich bei der Apoptoseresistenz um eine Dysregulation der Aktivierungskette der Bcl-2 Familie (z.B. Bax/Bcl-2) oberhalb der mitochondrialen Cytochrom C-Freisetzung handeln könnte. Weitere Untersuchungen bestätigten ein Mißverhältnis zwischen proapoptotischem Bax und relativ erhöhtem apoptosehemmenden Bcl-2 in apoptoseresistenten Melanomzelllinien (174 c).

Sato et al. (2003) publizierten eine Korrelation zwischen DPPIV/CD26-Enzymaktivität in Jurkat-Zellen und einer vermehrten Expression der Topoisomerase II alpha. Nach gleichzeitiger Applikation von Topoisomeraseinhibitoren, z.B. Doxorubicin, konnte eine erhöhte mitochondrial aktivierte Apoptoserate festgestellt werden (181 b, 216 b).

Eine direkte oder indirekte Beteiligung der DPPIV/CD26 am Apoptosemechanismus ist bis zum jetzigen Zeitpunkt dennoch nicht nachgewiesen worden.

Ein Bindungspartner der humanen DPPIV/CD26 ist die Adenosindesaminase, deren Substrat Adenosin ist. In Kolonkarzinomzellen ist die DPPIV/CD26-Expression bei niedrigerem Differenzierungsgrad vermindert (47, 218). Die DPPIV/CD26-Expression gilt als ein prognostisch günstiger Marker (38). Nach Tan et al. (2004) führt die Zugabe von Adenosin zu humanen HT-29-Kolonkarzinomzellen zu einer Herunterregulation der DPPIV/CD26, welche somit eine mögliche Rolle in der Tumorgenese spielen könnte (194).

In dieser Arbeit wurde Ratten-DPPIV/CD26 verwendet. Die Ratten-DPPIV/CD26 unterscheidet sich von der Human-DPPIV/CD26 darin, daß sie nicht in der Lage ist, die Adenosindesaminase zu binden. Dies führt zu dem Schluß, daß ADA, als auch die Interaktion ADA-Human-DPPIV/CD26 an einem möglichen Mechanismus der Retrodifferenzierung nicht beteiligt sein kann.

Ein möglicher Mechanismus der Retrodifferenzierung wird z.B. in Prostatakarzinomzellen beschrieben, wonach autokrine Wachstumsfaktoren durch eine Zelloberflächen-Metallopeptidase (neutral endopeptidase 24.11, NEP) inaktiviert werden (168). Weitere Untersuchungen belegten, daß die Re-Expression der NEP die Zellen in einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase führte und die Apoptose der Zellen auslöste (40).

Da die hDPPIV/CD26-Re-Expression vermittelte Apoptose nicht der Serinprotease-Aktivität zugeordnet werden konnte (211), wird ein funktionaler Bindungspartner außerhalb des aktiven Zentrums vermutet, welcher autokrine Wachstumsfaktoren inaktivieren könnte.

Van den Oord et al. (1998) konnten DPPIV/CD26 vor allem in der radiären Ausbreitungszone verschiedener Melanomläsionen detektieren, während DPPIV/CD26 kaum in der vertikalen Tiefe beziehungsweise gar nicht in malignen Melanom-Metastasen gefunden wurde (202). Dies führte zu der Annahme, daß DPPIV/CD26 sowohl an der Bindung und dem Verdau extrazellulärer Matrix, als auch an der Inaktivierung regulatorischer Peptide einschließlich Wachstumsfaktoren regulatorisch beteiligt ist (202).

Diese sich teilweise gegenüberstehenden Wechselwirkungen der DPPIV/CD26, einerseits die Beteiligung in der Unterdrückung eines malignen Phenotyps transformierter Zellen (211) und das Vorkommen in differenzierten Melanomzellen, andererseits der direkte oder indirekte Einfluß auf Zellmatrixproteine (17, 76, 78, 202), werden mit der Bindung eines Liganden versucht zu erklären (170).

Bermpohl et al. (1998) konnten eine schwache DPPIV-Endopeptidase-Aktivität denaturierten Kollagens nachweisen, deren physiologische Relevanz jedoch in Verbindung mit weiteren Kollagenasen gesehen wird (17). Möglicherweise könnten mit Hilfe der DPPIV/CD26 verborgene Kollagensequenzen (collagen-like RGD, DGEA) zur Erkennung von Integrinrezeptoren ( $\alpha_2/\beta_1$ ,  $\alpha_3/\beta_1$ ,  $\alpha_5/\beta_1$ ) demaskiert werden (17, 216).

Zu den möglichen Liganden oder Interaktionspartnern zählt FAP $\alpha$  (fibroblast activation protein  $\alpha$ , Seprase), mit großer Ähnlichkeit zur DPPIV/CD26, aus der Gruppe der Serinproteasen (77, 170, 211). Das Enzym besteht in seiner aktiven Form aus einem Homodimer

und besitzt eine Gelatinaseaktivität (11, 76, 172). FAP $\alpha$  zeigt eine Oberflächenexpression, z.B. auf den Invadopodien invasiver maligner Melanomzellen, und soll im Zusammenspiel mit anderen Proteasen, z.B. Gelatinase A (171), und Integrinen ( $\beta$ 1) (11, 153), am Abbau der extrazellulären Matrix und der Tumorinvasion beteiligt sein (148, 172).

Vollständigkeitshalber muß in diesem Zusammenhang erwähnt werden, daß Ghersi et al. (2002) einen Seprase-DPPIV/CD26-Komplex mit der Fähigkeit zur Gelatinbindung und Gelatinaseaktivität zeigten, dessen Expression jedoch begrenzt auf migratorische Fibroblasten und Zellen mit Teilnahme am Prozeß der Wundheilung war, jedoch nicht in differenzierten Zellen gefunden wurde (76). Dennoch konnten Huber et al. (2003) in Melanomzellen von primären und metastatischen Melanoma keine FAP $\alpha$ -Expression nachweisen (102).

Nach Rettig et al. (1993) zeigt die FAP $\alpha$ -Expression eine umgekehrte Korrelation mit dem Auftreten von Wachstumsfaktor-Unabhängigkeit und ungehemmten Wachstum in transformierten Melanozyten (178). Dieses Verhalten, sowie die korrelative Re-Expression von DPPIV/CD26 und FAP $\alpha$ , konnte in Melanomzellen von Wesley et al. nachgewiesen werden (211). Pethiyagoda et al. (2001) behaupten, daß der Verlust der DPPIV/CD26-Expression zu einer pro-invasiven FAP $\alpha$ -Homodimerbildung führt (170). Diese Befunde führten zu der Vermutung, daß FAP $\alpha$  als heteromerer Zelloberflächenrezeptor eine Rolle in der Modulation extrinsischer Wachstumsfaktoren besitzt, und hierbei DPPIV/CD26 als heteromerer Interaktionspartner eine essentielle Rolle spielen könnte (178, 211). Untersuchungen mit alleiniger Blockierung der FAP $\alpha$  in DPPIV/CD26-negativen Melanomzellen ergaben eine Suppression der zellulären Invasion, ähnlich wie nach DPPIV/CD26-Re-Expression (170). Der anti-invasive Phänotyp nach DPPIV/CD26-Re-Expression entsteht demzufolge durch Inaktivierung der FAP $\alpha$  durch die Heterodimerbindung zu DPPIV/CD26 (170).

Gaetaniello et al. (1998) beobachteten in humanen Hepatokarzinomzellen (PLC/ PRF/ 5 und Hep G2-Zellen) nach Applikation von DPPIV/CD26-Antikörpern eine Tyrosinkinase-vermittelte Apoptose der Zellen, wobei die Blockierung der Tyrosinphosphatase CD45 diesen Effekt noch verstärkte (73). Dieser Befund steht im Widerspruch zum protektiven Effekt der DPPIV/CD26 gegenüber Apoptose in Jurkat-Zellen und läßt daher eine unterschiedliche Funktion der DPPIV/CD26 abhängig vom Zelltyp vermuten (73). Der Zusammenhang der DPPIV/CD26-

induzierten Apoptose und die Rolle funktioneller intrazytoplasmatischer Anteile wurden zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht untersucht.

Die Proteolyse extrazellulärer Matrix kann, aufgrund des Verlustes der zum Überleben notwendigen Adhäsion, vor allem in epithelialen Geweben zur Apoptose führen (210). Werb et al. (1997) machen den Verlust der durch proteolytische Enzyme induzierten Apoptose für die Immortalität der Zellen in deren früher neoplastischen Transformation verantwortlich (210). Wie oben beschrieben, nimmt im Verlauf der Transformation von Melanozyten die DPPIV/CD26-Expression ab (7, 152).

Ungeklärt ist die Frage, inwieweit die re-exprimierte Human-DPPIV/CD26 mit extrazellulärer Matrix interagiert, beziehungsweise am Verdau extrazellulärer Matrix beteiligt ist und die Zellen dadurch in Apoptose führt. In dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang der hDPPIV/CD26-Re-Expression mit einer gesteigerten Adhäsionsfähigkeit der 303AG7-hDPPIV/CD26-Melanomzellen auf Matrixproteinen nachgewiesen werden.

Um die methodischen Schwierigkeiten, verbunden mit der Ausselektion der DPPIV/CD26-positiven Mel2A-Melanomzellen zu umgehen, wurde humane DPPIV/CD26 in ein Tetrazyklinsteuerbares Vektorsystem integriert. Verwendet wurden Mel303AG7-Melanomzellen, als Derivat von Bro-Melanomzellen, die mit Tet-On stabil transfiziert und subkloniert worden waren (Arbeitsgruppe Prof. C. Geilen). In Mel303AG7 konnte keine DPPIV/CD26-Expression nachgewiesen werden, sodaß sowohl der Leervektor, als auch humane DPPIV/CD26 (F202) transient transfiziert wurden. Nach Induktion der Zellen konnte als positiver Nachweis der transienten Transfektion neben der Immunfluoreszenz eine deutliche Enzymaktivität der hDPPIV/CD26 nachgewiesen werden. Die hDPPIV/CD26-Re-Expression führte zu einer Steigerung der Adhäsionsfähigkeit auf den Matrixproteinen, nacheinander zunehmend, Kollagen IV, Fibronectin und am besten auf Kollagen I.

Die Human-DPPIV/CD26 vermittelte Zelladhäsion auf Kollagen I und IV bestätigen die Tendenz vorheriger, mit Ratten-DPPIV/CD26 durchgeführter, Untersuchungen (86, 137, 171). Während mit Ratten-DPPIV/CD26 die Adhäsion auf Fibronectin kontrovers diskutiert wurde (4, 31, 32, 33, 137, 171), zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit erstmalig eine gesteigerte Adhäsion der Human-DPPIV/CD26-Melanomzellen auf Fibronectin gegenüber mit Leervektor transfizierten Melanomzellen.

Gestützt wird die hDPPIV/CD26 vermittelte Adhäsion auf Fibronectin von Kikkawa et al. (2003), welche das Adhäsionsverhalten ovarieller Karzinomzellen auf mesothelialen Zellen untersuchten. Nach Restauration von Human-DPPIV/CD26 in Ovarialkarzinomzellen wurde gegenüber der Kontrolle eine signifikant höhere Adhäsion sowohl auf Fibronectin beschichteten Platten, als auch auf mesothelialen Zellen beobachtet (120).

Trotzdem ist die Frage ungeklärt, inwieweit es sich bei dieser Interaktion zwischen hDPPIV/CD26 und Fibronectin um eine direkte Bindung, wie von Piazza et al. (1989) postuliert, oder um eine indirekte Bindung handelt. Weiterhin ist nicht bekannt, welche mögliche Rolle Integrine (17, 216) in einer indirekten hDPPIV/CD26 vermittelten Zelladhäsion spielen.