CHARAKTERISIERUNG DES EINFLUSSES VON TGF-β1 AUF DIE KATHEPSIN-EXPRESSION IN MYELO-MONOZYTÄREN ZELLEN UND DER FUNKTIONELLEN BEDEUTUNG EINER VERÄNDERTEN KATHEPSIN B-EXPRESSION

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch
die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Biol. Anita Reisenauer

geb. am 25.05.1970 in Hermannstadt / Rumänien

Gutachter: PD Dr. F. Bühling
Prof. Dr. G. Reiser
Prof. Dr. A. Radbruch

Eingereicht am: 26.06.2005
Verteidigt am: 22.12.2005

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema „Charakterisierung des Einflusses von TGF-β1 auf die Kathepsin-Expression in myelo-monozytären Zellen und der funktionellen Bedeutung einer veränderten Kathepsin B-Expression“ selbständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Halle/Saale,

Meiner Familie

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn **Prof. Dr. S. Ansorge** für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit am Institut für Immunologie an der Otto-von-Guericke Universität durchführen zu können.

Weiterhin gilt mein ganz besonderer Dank Herrn **Dr. F. Bühling** für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des interessanten Themas und die exzellenten Arbeits- und Forschungsbedingungen. Seine intensive Betreuung und das beständige Interesse am Fortschritt der Arbeit („Und, gibt's was Neues?") sowie seine permanente Bereitschaft zu wissenschaftlichen Diskussionen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Promotion beigetragen. Auch Herrn **Dr. T. Welte** bin ich für seine andauernde Unterstützung zu großem Dank verpflichtet.

Herrn **Dr. O. Eickelberg** danke ich für die in seinem Labor durchgeführten PCR-Analysen und Frau **Prof. Dr. B. Sloane** für die Bereitstellung von Kathepsin B Promotorkonstrukten.

Frau **Yvonne Peter** danke ich dafür, dass sie durch ihre kompetente, experimentelle Unterstützung sehr zum schnelleren Fortschreiten der Arbeit beigetragen hat. Bei Frau **Dr. Aline Wille** bedanke ich mich für die Hilfe bei der TUNEL-Färbung und der FACS-Analyse apoptotischer Zellen.
Ich möchte weiterhin meinen Kolleginnen **Anke Heimburg** (Danke, Anke!!!), **Dr. Gudrun Koch**, **Yvonne Peter**, **Gabi Weitz** und **Dr. Aline Wille** ganz besonders herzlich dafür danken, dass sie immer für mich da waren wenn`s mal wieder gebrannt hat und ganz entscheidend dazu beigetragen haben, dass ich den gelegentlichen Widerstand von eigensinnigen biologischen Systemen und das daraus resultierende hohe Frustpotential überwinden konnte und niemals aufgehört habe an den Erfolg der Experimente und der Arbeit insgesamt zu glauben.

Ein ganz besonders großes Dankeschön geht an Frau **Dr. Annegret Gerber,** die es wie kaum jemand anders verstand, scheinbar unlösbare Probleme einfach in Luft aufzulösen.

Anita Posevitz-Fejfar, Vilmos Posevitz, Michal Smida, Uwe Kölsch, Dr. Ulrike Kühlmann und natürlich **Clemens Sauer** danke ich dafür, dass ihre Anwesenheit im Institut und ihre ständige geduldige Aufnahmebereitschaft von gelegentlich auftretenden, ungezähmten „Quassel-Attacken" meinerseits eine unvergleichlich offene und freundliche Atmosphäre verbreiteten die mir sehr geholfen hat die hin und wieder auftauchenden Widrigkeiten der wissenschaftlichen Forschung zu überwinden.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Institutes für Immunologie dafür, dass sie jederzeit bereit waren mir mit Rat und Tat beiseite zu stehen.

Zuletzt, dafür umso herzlicher, danke ich meiner Familie und Michael für ihre moralische Unterstützung. Sie gaben mir während der Promotionszeit den nötigen Rückhalt sowohl in den guten als auch den weniger guten Zeiten.

1 EINLEITUNG 1
1.1 Proteolyse und Proteasen 1
1.2 Die Zysteinproteasen 1
1.3 Kathepsin B 3
1.4 Die *Transforming Growth Factor-β*-Familie 7
1.4.1 Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1) 7
1.4.2 Die Signaltransduktionskaskaden von TGF-β- und BMP-Peptiden 10
1.5 Akute myeloische Leukämie (AML) 13
1.6 Zielstellung der vorliegenden Arbeit 15

2 METHODEN UND MATERIAL 16
2.1 Zellbiologische Methoden 16
2.1.1 Kultivierung der Zellen 16
2.1.1.1 Die myelo-monozytären Zelllinien MonoMac-1, MonoMac-6 und THP-1 16
2.1.1.2 Die Lungenepithelzelllinie A-549 16
2.1.2 Isolierung humaner peripherer Blutmonozyten durch Gegenstromelutriation 16
2.1.2.1 Separation von humanen peripheren mononukleären Blutzellen mittels Dichtegradient-Zentrifugation 17
2.1.2.2 Gegenstromelutriation 17
2.1.3 Proliferationsmessung von myelo-monozytären Zelllinien durch ^{3}H-Thymidin-Markierung 18
2.1.4 Migrations-/Invasionstest von THP-1-Zellen 18
2.1.5 Durchflusszytometrische Analysen 19
2.1.6 Analyse der Apoptose-Raten von THP-1-Zellen durch TUNEL-Färbung 20
2.1.7 Transiente Transfektion von THP-1-Zellen mit Promotorkonstrukten und Intronfragmenten des Kathepsin B-Gens und Messung der Luziferase-Aktivität . 21
2.2 Molekularbiologische Methoden 21
2.2.1 Quantitative RT-PCR-Analysen 21
2.2.1.1 Gesamt-RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung 22
2.2.1.2 Reverse Transkription 22
2.2.1.3 Amplifizierung und gleichzeitige Quantifizierung spezifischer cDNA-Produkte .. 23
2.2.2 Klonierung von Kathepsin B-Promotorfragmenten, des ersten Kathepsin B Introns und Intronfragmenten in den *Renilla*-Luziferasevektor pGL-3B 25
2.2.2.1 Isolierung genomischer DNA 25
2.2.2.2 Prinzip der Klonierung von spezifisch amplifizierten PCR-Produkten 25
2.2.2.3 Klonierung von Luc2,6 und Luc4,3 in den Luziferase-Reportergen-Vektor pGL-3B 27
2.2.2.4 Konstruktion des Plasmids pLuc7,35 27
2.2.2.5 Klonierung des ersten Introns sowie der Intronfragmente in den Luziferase-Reportergen-Vektor pGL-3B 29
2.2.3 Analyse der Kathepsin B mRNA-Stabilität und -Neusynthese 29
2.2.3.1 Analyse der Kathepsin B mRNA-Stabilität nach TGF-β1-Inkubation durch Behandlung mit Actinomycin D 29
2.2.3.2 Analyse der Kathepsin B mRNA-Neusynthese nach TGF-β1-Inkubation durch *nuclear runoff*-Analysen 30

2.3 Biochemische und immunochemische Proteinanalysen 31
2.3.1 Kathepsin B- und Kathepsin L-Aktivitätsmessungen in THP-1-Zellen (Barrett et al. [78]) 31
2.3.1.1 Anreicherung der lysosomalen/endosomalen Fraktion aus THP-1-Zellen zur Messung der Kathepsin B- und Kathepsin L-Aktivitäten 31
2.3.1.2 Aktivitätsmessungen von Kathepsin B und Kathepsin L in Endosomen/Lysosomen von THP-1-Zellen 31
2.3.2 Stimulation von THP-1-, MonoMac-1- und MonoMac-6-Zellen für Kathepsin L- und Kathepsin B-ELISA 32
2.3.3 Etablierung eines Kathepsin L-ELISA 33
2.3.3.1 Biotinylierung des monoklonalen Kathepsin L-Antikörpers 33/2 33
2.3.3.2 Kathepsin L-ELISA 33
2.3.4 Kathepsin B-ELISA 35
2.3.5 Identifizierung von Proteinen mittels Western-Blot-Analysen 35

3 ERGEBNISSE 39
3.1 Charakterisierung der Zelllinien THP-1, MonoMac-1 und MonoMac-6 39
3.1.1 CD14-Expression auf der Oberfläche der myelo-monozytären Zelllinien THP-1, MonoMac-1 und MonoMac-6 sowie auf humanen peripheren Blutmonozyten 39
3.1.2 Die Wirkung von TGF-β1 und LPS auf die Expression ihrer Rezeptoren in THP-1- und MonoMac-6-Zellen 40
3.1.3 Proliferationsverhalten der myelo-monozytären Zelllinien THP-1, MonoMac-1 und MonoMac-6 nach TGF-β1-Inkubation 43
3.2 Einfluss von LPS und TGF-β1 auf die Expression von Kathepsin L und Kathepsin B in myelo-monozytären Zelllinien 43
3.2.1 Die Kathepsin L-Expression in den Zelllinien THP-1 und MonoMac-1 nach LPS-Stimulation 44
3.2.2 Kathepsin L- und Kathepsin B-Expression nach TGF-β1-Inkubation und Koinkubation mit LPS in den Zelllinien THP-1, MonoMac-1 und MonoMac-6 47
3.2.2.1 THP-1-Zellen: Kathepsin L-Expression nach TGF-β1/LPS-Inkubation 47
3.2.2.2 THP-1-Zellen: Kathepsin B-Expression nach TGF-β1/LPS-Inkubation 48
3.2.2.3 MonoMac-1-Zellen: Kathepsin L-Expression nach TGF-β1/LPS-Inkubation 49
3.2.2.4 MonoMac-1-Zellen: Kathepsin B-Expression nach TGF-β1/LPS-Inkubation 50
3.2.2.5 MonoMac-6-Zellen: Kathepsin L-Expression nach TGF-β1/LPS-Inkubation 51
3.2.2.6 MonoMac-6-Zellen: Kathepsin B-Expression nach TGF-β1/LPS-Inkubation 52
3.2.3 Kathepsin B mRNA-Expression nach TGF-β1-Inkubation in humanen peripheren Blutmonozyten 53
3.3 Einfluss von LPS und TGF-β1 auf die Kathepsin K und Kathepsin S mRNA-Expression in myelo-monozytären Zelllinien 54
3.4 Analyse der Stabilität und Neusynthese der Kathepsin B-mRNA nach Inkubation mit TGF-β1 in THP-1- und MonoMac-6-Zellen 55
3.4.1 Kathepsin B mRNA-Stabilitätsanalyse in THP-1- und MonoMac-6-Zellen 55
3.4.2 Kathepsin B mRNA-Neusynthese in THP-1- und MonoMac-6-Zellen 56

3.5 Analyse der funktionellen Bedeutung der erhöhten Kathepsin B-Expression in THP-1-Zellen 57
3.5.1 Migrations- und Invasionsverhalten von THP-1-Zellen nach TGF-β1-Inkubation in Anwesenheit von E64 57
3.5.2 Enzymatische Aktivität von Kathepsin B und Kathepsin L in THP-1-Zellen nach TGF-β1-Inkubation in Anwesenheit des membrangängigen Kathepsin-Inhibitors E64d 58
3.5.3 Apoptose-Raten von THP-1-Zellen nach TGF-β1-Inkubation in Anwesenheit des membrangängigen Kathepsin-Inhibitors E64d 60
3.6 Analyse der TGF-β1-induzierten Signaltransduktionswege und deren Einfluss auf die Kathepsin B-Genregulation 61
3.6.1 Smad2-Phosphorylierung in THP-1-, MonoMac-6- und A-549-Zellen 62
3.6.2 Die Smad- und TGF-β1/BMP-Rezeptor-Expressionsmuster in den Zelllinien THP-1, MonoMac-6 und A-549 65
3.6.3 Kathepsin B mRNA-Expression in THP-1-, MonoMac-6- und A-549-Zellen nach BMP-2-Inkubation 66
3.7 Analyse der Aktivierung der MAP-Kinasen p38, ERK1/2 und JNK nach TGF-β1-Inkubation von THP-1-, MonoMac-6- und A-549-Zellen 67
3.7.1 Phosphorylierung der p38-Kinase in THP-1-, MonoMac-6- und A-549-Zellen 68
3.7.2 Phosphorylierung der ERK1/2-Kinase in THP-1-, MonoMac-6- und A-549-Zellen 71
3.7.3 JNK-Phosphorylierung in THP-1-, MonoMac-6- und A-549-Zellen 74
3.7.4 Einfluss der Inhibition von p38-, ERK1/2- und JNK-Kinasen auf die TGF-β1-induzierte Kathepsin B-mRNA-Expression in THP-1, MonoMac-6- und A-549-Zellen 77
3.7.4.1 Inhibition der MAP-Kinase p38 durch SB203580 77
3.7.4.2 Inhibition der MAP-Kinase ERK1/2 durch U0126 78
3.7.4.3 Inhibition der MAP-Kinase JNK durch Curcumin 79
3.8 Untersuchung der Regulation der Kathepsin B-Promotoraktivität durch TGF-β1 80
3.8.1 Analyse der Aktivität der einzelnen Promotorkonstrukte nach Inkubation mit TGF-β1 80
3.9 Analyse der Aktivität des ersten Introns des Kathepsin B-Gens nach Inkubation mit TGF-β1 82
3.9.1 Lokalisierung der TGF-β1-reaktiven Einheit auf dem ersten Kathepsin B-Intron 83

4 DISKUSSION 84
4.1 Charakterisierung des Differenzierungsstadiums von myelo-monozytären Zelllinien anhand der CD-14-Expression 84
4.2 Die Rolle von TGF-β1 in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen 85
4.3 TGF-β1-Einfluss auf die Proliferation von myelo-monozytären Zelllinien 85
4.4 Der Einfluss von TGF-β1 auf das proteolytische Potential von humanen Tumoren 86
4.5 Die Wirkung von TGF-β1 auf die Kathepsin-Expression in myelo-monozytären Zelllinien 87

4.6 Die Wirkung von Lipopolysaccharid/TGF-β1 auf die Kathepsin-Expression in myelo-monozytären Zelllinien 88
4.6.1 Die Wirkung von LPS und TGF-β1 auf die Expression ihrer Rezeptoren in den Zelllinien THP-1 und MonoMac-6 89
4.6.2 Die Wirkung von LPS/TGF-β1 auf die Kathepsin-Expression in den Zelllinien THP-1, MonoMac-1 und MonoMac-6 90
4.7 Funktionelle Rolle der TGF-β1-induzierten Kathepsin B-Überexpression in THP-1-Zellen 91
4.7.1 Analyse der Invasions-/Migrationsraten von THP-1-Zellen nach TGF-β1-Inkubation als funktionelle Folge einer erhöhten Kathepsin B-Sekretion 91
4.7.2 Funktionelle Analyse der intrazellulären Kathepsin B-Überexpression in THP-1-Zellen 92
4.7.2.1 Die Kathepsin B-Aktivität in THP-1-Zellen nach TGF-β1-Inkubation 92
4.7.2.2 Analyse der Apoptose-Raten in THP-1-Zellen nach TGF-β1-Behandlung und Kathepsin-Inhibition 93
4.8 Analyse der TGF-β1-Signaltransduktion 94
4.8.1 Die Smad-gekoppelte TGF-β1-Signaltransduktion 94
4.8.2 Die MAP-Kinase-vermittelte TGF-β1-Signaltransduktion 98
4.9 Analyse der TGF-β1-reaktiven regulatorischen Einheiten auf dem Kathepsin B-Promotor und dem ersten Intron des Kathepsin B-Gens 99
4.9.1 Der Kathepsin B-Promotor 99
4.9.2 Das erste Kathepsin B-Intron 100

5 ZUSAMMENFASSUNG 103

6 LITERATUR 104

LEBENSLAUF 114

ALK	*Activin Receptor-like Kinase*
AMC	*7-Amido-4-Methylcoumarin*
AML	Akute Myeloische Leukämie
ATF-2	*Activating transcription factor-2*
BMP	*Bone Morphogenetic Protein*
bp	Basenpaare
Cdk	*Cyclin dependend kinase*
cDNA	komplementäre DNA
CREB	*cAMP-responsive binding protein*
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	*Deoxyribonucleic Acid*
DNase-	*Deoxyribonuclease*
DTT	*D*ithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
ERK	*Extracellular Signal-Regulated Kinase*
FCS	*Fetal Calf Serum*
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	*Forward Scatter*
h	*hour* (Stunde)
ICAM-1	*Intercellular Adhesion Molecule-1*
IgG	Immunglobulin G
IMDM-FA	*Iscove`s modified Dulbecco`s Medium* mit *Fetal Calf Serum* und Antibiotika
JNK	*c-Jun N-terminal Kinase*
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LAP	*Latency-Associated Protein*
LFA-1	*Lymphocyte Function-Associated Antigen-1*
LPS	Lipopolysaccharid
MAP-Kinase	*Mitogen Activated Protein Kinase*
MCP-1	*Monocyte Chemoattractant Protein-1*
min	Minuten
MMPs	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	*messenger Ribonucleic Acid*
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMCs	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PJ	Propidiumjodid

RNA	*Ribonucleic acid*
RNase	*Ribonuclease*
RT-PCR	Reverse-Transkriptase *Polymerase Chain Reaction* (Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion)
SDS	*Sodiumdodecylsulfate* (Natriumdodecylsulfat)
SSC	*Side scatter*
TBS	*Tris Buffered Saline*
TGF-β1	*Transforming Growth Factor-β1*
TUNEL	*Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling*
U/min	Umdrehungen pro Minute
USF-1	*Upstream stimulatory factor-1*

1 EINLEITUNG

1.1 Proteolyse und Proteasen

Proteolyse ist ein irreversibler Mechanismus, der ubiquitär in allen Zellen sowie in Körperflüssigkeiten abläuft und an dem eine Vielzahl von Proteasen beteiligt sind. Eine ausgewogene Regulation der Proteolyse ist essentiell für die normale Homöostase eines Organismus. Der Umbau Extrazellulärer Matrix, die Blutgerinnung, die Verdauung aufgenommener Nährstoffe und die Reifung von Zytokinen und Prohormonen sowie der programmierte Zelltod sind Beispiele wichtiger physiologischer Prozesse, bei denen kontrollierte Proteindegradation eine entscheidende Rolle spielt. Zum einen wird durch Proteolyse die Funktion von Zielproteinen durch limitierten, gezielten Abbau aktiviert oder inaktiviert, zum anderen kann ein Protein durch Degradation zu freien Aminosäuren vollständig eliminiert werden. Ein erhöhter oder verminderter Gehalt an Proteasen kann schwerwiegende Auswirkungen auf die normale Funktion eines Organismus haben.

Proteasen katalysieren die Spaltung von Peptidbindungen zwischen einzelnen Aminosäuren eines Zielproteins, wobei ein nukleophiler Angriff auf den Karbonyl-Kohlenstoff der Peptidbindung zum Bruch der Bindung führt. Aufgrund unterschiedlicher Katalyse-Mechanismen werden Proteasen in die vier großen Enzymklassen der Zystein-, Glutamat-, Serin-, (Thiol-), Threonin-, Aspartat- und Metalloproteasen eingeteilt. Bei den beiden letztgenannten Enzymklassen vermitteln endogene Aspartatreste bzw. Metallionen die Polarisierung und Immobilisierung von H_2O-Molekülen, um sie anschließend in der unmittelbaren Nähe der zu spaltenden Bindung zu positionieren. Das nun stark nukleophile Elektronenpaar des Sauerstoffs führt den Angriff auf den Karbonyl-Kohlenstoff der Peptidbindung zwischen einzelnen Aminosäuren aus. Polarisierte OH- bzw. SH-Gruppen von Serin- und Zysteinresten führen in den aktiven Zentren von Serin- und Zysteinproteasen den nukleophilen Angriff auf eine Peptidbindung aus, wobei anschließend die Aktivierung eines H_2O-Moleküls zur Spaltung der Peptidbindung führt. Das zwischenzeitlich kovalent gebundene Proteinsubstrat wird gleichzeitig aus dem Enzym-Substratkomplex entlassen.

1.2 Die Zysteinproteasen

- **Klassifikation**

Zysteinproteasen werden derzeit in 59 Familien mit zahlreichen Subfamilien eingeteilt. Die Papain-Superfamilie wird weiterhin in die Familien der Bleomycin-Hydrolasen sowie die Papain-Familie unterteilt. Bleomycin-Hydrolasen sind im Zellzytoplasma lokalisiert und besitzen neben proteolytischen Funktionen auch DNA-bindende Fähigkeiten [1,2]. Papainproteasen bilden die umfangreichste und am längsten bekannte Zysteinprotease-Subfamilie. Sie umfasst Enzyme aus Bakterien, Pflanzen, Wirbellosen und Vertebraten, wobei die wichtigsten Vertreter dieser Klasse die bereits länger bekannten Kathepsine B, C, H, L, und S sind, sowie die erst in neuerer Zeit beschriebenen Kathepsine F, K, O, V, W und X [3]. Der Begriff „Kathepsine“ steht für „lysosomale proteolytische Enzyme“ unabhängig davon, welcher Enzymklasse sie angehören. So sind die Kathepsine A und G Serinproteasen, während Kathepsine D und E der Klasse der Aspartatproteasen zugeordnet werden [4].

- **Lokalisation und proteolytische Eigenschaften von Zysteinproteasen der Papain-Familie**

Lysosomale Zysteinproteasen werden als inaktive Präproformen mit einem 16 bis 18 Aminosäuren langen Signalpeptid und einem N-terminalen inhibitorischen Segment, das aus 62 bis 100 Aminosäuren besteht, synthetisiert. Sie entstehen am rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) und werden anschließend in das ER-Lumen transportiert. Nach Glykosylierung und Markierung mit Mannose-6-Phosphat im Golgi-Apparat werden sie durch Bindung an den Mannose-6-Phosphat Rezeptor dem endosomalen/lysosomalen Kompartiment zugeordnet, wo sie nach Abspaltung des inhibitorischen Segmentes proteolytisch aktiviert werden [5]. Die Zysteinproteasen können im endosomalen/lysosomalen Kompartiment verbleiben oder in die Zellperipherie als inaktive Pro-Formen oder aktive Proteasen (220-230 Aminosäuren) sekretiert werden [6,7].

Die Kathepsine B, L und H werden ubiquitär exprimiert und sind in vielen Säugern identifiziert und charakterisiert worden [5]. Im humanen Organismus variiert die Expressionsstärke von Gewebe zu Gewebe. So werden die Kathepsine B und L in der Lunge verstärkt in bronchialen Epithelzellen und Makrophagen exprimiert [4]. Diese Kathepsine sind an dem allumfassenden Proteinumbau und –abbau beteiligt.

Eine restriktivere Verteilung zeigt Kathepsin K. Diese Protease konnte bisher in Nieren, Leber und Pankreas sowie in Fibroblasten, Lungenepithelzellen, Brustkrebszellen und Riesenzellen detektiert werden [3,8]. In Osteoklasten wird Kathepsin K verstärkt exprimiert und ist dort an der Knochenresorption beteiligt [9]. Kathepsin S wird in antigenpräsentierenden Zellen exprimiert, während Kathepsin W in zytotoxischen T-Zellen nachgewiesen werden konnte [10-12].

Die meisten Zysteinproteasen sind Endopeptidasen wobei die Kathepsine B, C und H zusätzlich Exopeptidase-Aktivität aufweisen. Die Kathepsine C und H können Dipeptide bzw. einzelne Aminosäuren vom Aminoende eines Zielproteins abspalten, während Kathepsin B Dipeptidyl-Karboxypeptidase-Aktivität besitzt [13].

Die Enzyme der Papain-Familie im endosomalen/lysosomalen Kompartiment werden sowohl mit einer generellen, vollständigen Degradation intra- und extrazellulärer Proteine in Verbindung gebracht als auch mit limitierter Proteolyse im Rahmen von Antigenprozessierung, Spaltung der invarianten Kette, Proenzymaktivierung und Hormonreifung [14-17].

In einer Reihe von Arbeiten konnte gezeigt werden, dass einige Enzyme der Papain-Familie auch in die Zellperipherie sekretiert werden. In diesem Zusammenhang werden vor allem die Kathepsine B und L erwähnt, die an der Modifizierung der Extrazellulären Matrix beteiligt sind. Kollagen, Elastin, Fibronektin, Laminin sowie Proteoglykane, die Hauptkomponenten der Extrazellulären Matrix, werden durch diese Enzyme effizient degradiert [18-20].

Außerhalb des endosomalen/lysosomalen Kompartiments ist das proteolytische Potential von Zysteinproteasen abhängig von der Konzentration natürlicher Inhibitoren sowie vom pH-Wert der Umgebung. Im gesunden Zustand eines Organismus herrscht ein natürliches Gleichgewicht zwischen diesen Faktoren. Kommt es im Rahmen einer Erkrankung zu einer pathologisch erhöhten Expression der Zysteinproteasen und infolgedessen zu einer vermehrten Sekretion in

die Zellperipherie wird dieses Gleichgewicht zugunsten der Proteaseaktivität verschoben. Eine stark erhöhte extrazelluläre Zysteinproteaseaktivität korreliert mit verschiedenen pathophysiologischen Prozessen. Die Folge einer unkontrollierten Gewebsproteolyse bei erhöhtem Kathepsin L-Proteingehalt ist beispielsweise die Emphysembildung in der Lunge [21]. Weiterhin werden sekretierte Kathepsine mit der Entstehung der Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebracht [22]. Kathepsin B wurde verstärkt in der Gelenkflüssigkeit von Arthritis-Patienten gefunden, wo es entscheidend zur Zerstörung des Gewebes beiträgt [23].

1.3 Kathepsin B

Die Zysteinprotease Kathepsin B wird in Säugern in den meisten Geweben und Organen exprimiert. Sie ist hauptsächlich in dem lysosomalen/endosomalen Kompartiment der Zellen lokalisiert und an der intrazellulären Degradation von Proteinen beteiligt [24]. Kathepsin B kann jedoch von Makrophagen, Fibroblasten, Osteoklasten und Tumorzellen in die Zellperipherie sezerniert werden, wo dieses Enzym an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt ist [25].

- **Chromosomale Lokalisation und Genstruktur von Kathepsin B**

Das humane Kathepsin B-Gen umfasst auf einen Bereich von ca. 27 kb, ist auf dem Chromosom 8 lokalisiert und überspannt hier die Loci p22 bis p23.1 (Abb. 1 A, Gong et al. [26]). Es wurden bisher 14 Exons (E1, E2, E2a, E2b, E3-E12) mit 12 Introns (I1-I12) beschrieben, von denen lediglich die Exons 3 bis 11 translatiert werden und die Prä-Proform des Enzyms repräsentieren. Das Kathepsin B-Primärtranskript kann auf verschiedene Weise prozessiert werden (*splicing*), wobei unterschiedliche mRNA-Varianten im selben gesunden Gewebe zu finden sein können [27]. In Abbildung 1 B ist das Kathepsin B Primärtranskript und die daraus resultierende kürzeste, im normalen Gewebe häufigste mRNA-Variante mit ΔE2*, ΔE2a/2b* und ΔE12* dargestellt.

Die Exons 2a und 2b liegen hintereinander und sind nicht durch ein Intron getrennt. Sie wurden als letzte Exons 1995 identifiziert und aufgrund der Lokalisation in 3`-Richtung von Exon 2, 2a und 2b benannt.

In der 5`-Region werden die Exons 1, 2, 2a und 2b nicht translatiert (in weiß dargestellt). Exon 3 enthält eine 25 Basenpaare umfassende untranslatierte *Leader*-Region (graue Kennzeichnung). Die Exons 3 bis 11 (schwarze Bereiche) werden zum 339 Aminosäuren umfassenden Prä-Proprotein translatiert. Der 3`-untranslatierte Bereich ist in Grau dargestellt und umfasst einen Teil von Exon 11 sowie das gesamte Exon 12 [26,27].

Die basale Promotoraktivität wird durch ein 228 bp-Fragment am 5`-Ende des Gens vermittelt. Diese Promotorregion ist durch einen hohen GC-Gehalt gekennzeichnet und beinhaltet sechs SP1-, vier ETS-Bindestellen sowie eine E-Box die USF-Transkriptionsfaktoren binden kann [28].

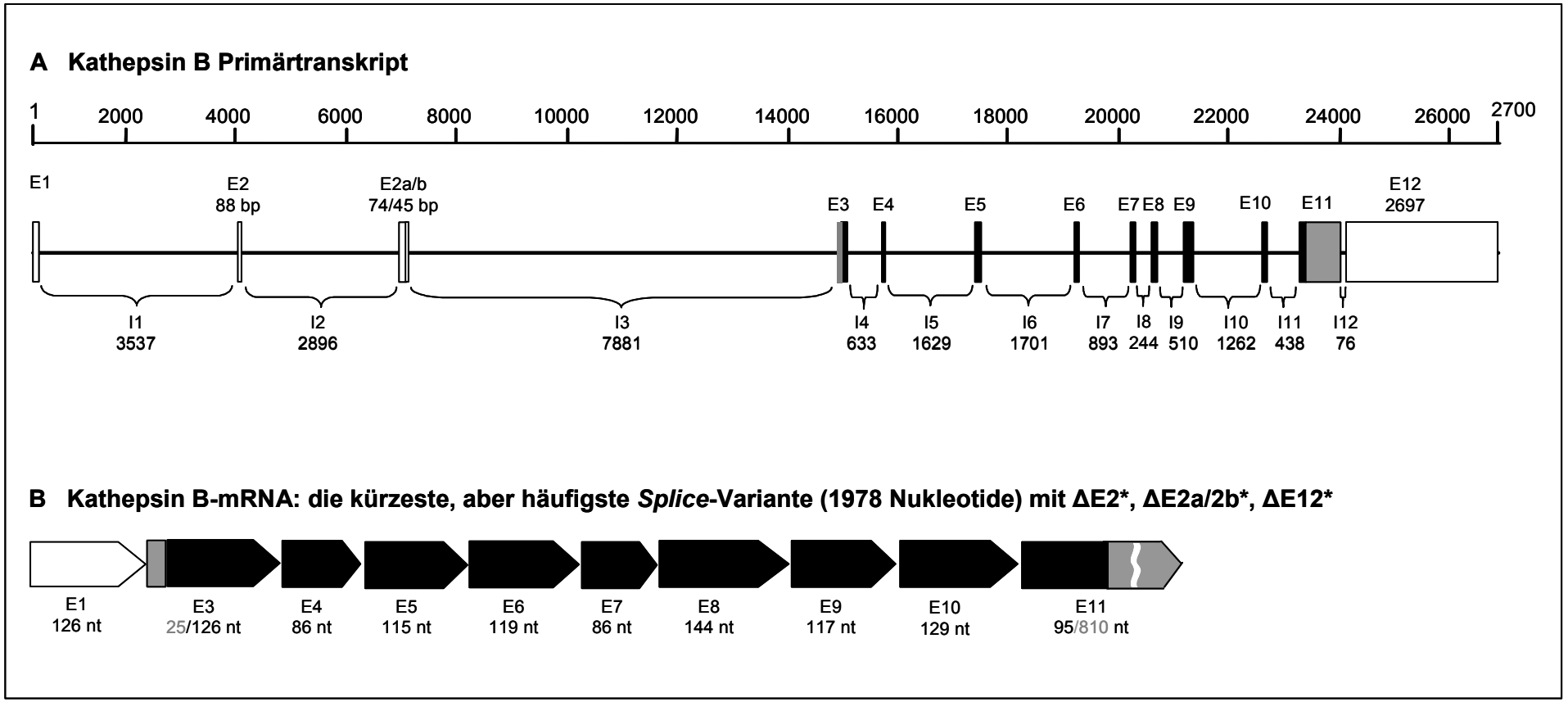

Abb. 1: Schematische Darstellung des Kathepsin B Primärtranskripts (A) sowie die daraus resultierende, kürzeste mRNA *Splice*-Variante (B), nach Gong et al. [26]. Die Größenverhältnisse der Exons und Introns sind maßstabsgetreu abgebildet. Untranslatierte Exons (E) sind weiß, translatierte Exons sind schwarz dargestellt. Graue Markierungen stellen untranslatierte Bereiche von translatierten Exons dar. Die Länge von Exons (E) und Introns (I) sind in Basenpaaren (bp) angegeben. *Δ: Deletierte Exons.

➢ **Die Kathepsin B-Proteinstruktur und sein katalytischer Mechanismus**

In Abbildung 2 ist die Reifung des inaktiven Kathepsin B Prä-Proproteins zur aktiven Form der Protease dargestellt. Das Kathepsin B-Protein wird als 46 kDa Prä-Proenzym synthetisiert. Durch das 17 Aminosäuren umfassende Signalpeptid erfolgt der gerichtete Transport des Vorläufermoleküls in die Lysosomen. Die Reifung der Kathepsin B-Vorläuferform erfolgt durch Autokatalyse oder durch die Spaltung anderer Proteasen wie Serinproteasen, Metalloproteasen, Pepsin oder die Aspartatprotease Kathepsin D [25,29-34]. Nach Abspaltung des Signalpeptides (SP), des inhibitorischen Propeptides (PP, Aminosäuren 17 bis 79) sowie eines C-terminalen Hexapeptides (CH) entsteht das reife, aktive Enzym. Es kann als 30 kDa Einzelkette oder, nach Abspaltung eines Dipeptides, als Doppelkette vorliegen, die aus einer kurzen und einer langen Kette (KK, 5 kDa und LK, 25 kDa) besteht, welche durch Disulfidbrücken verbunden sind.

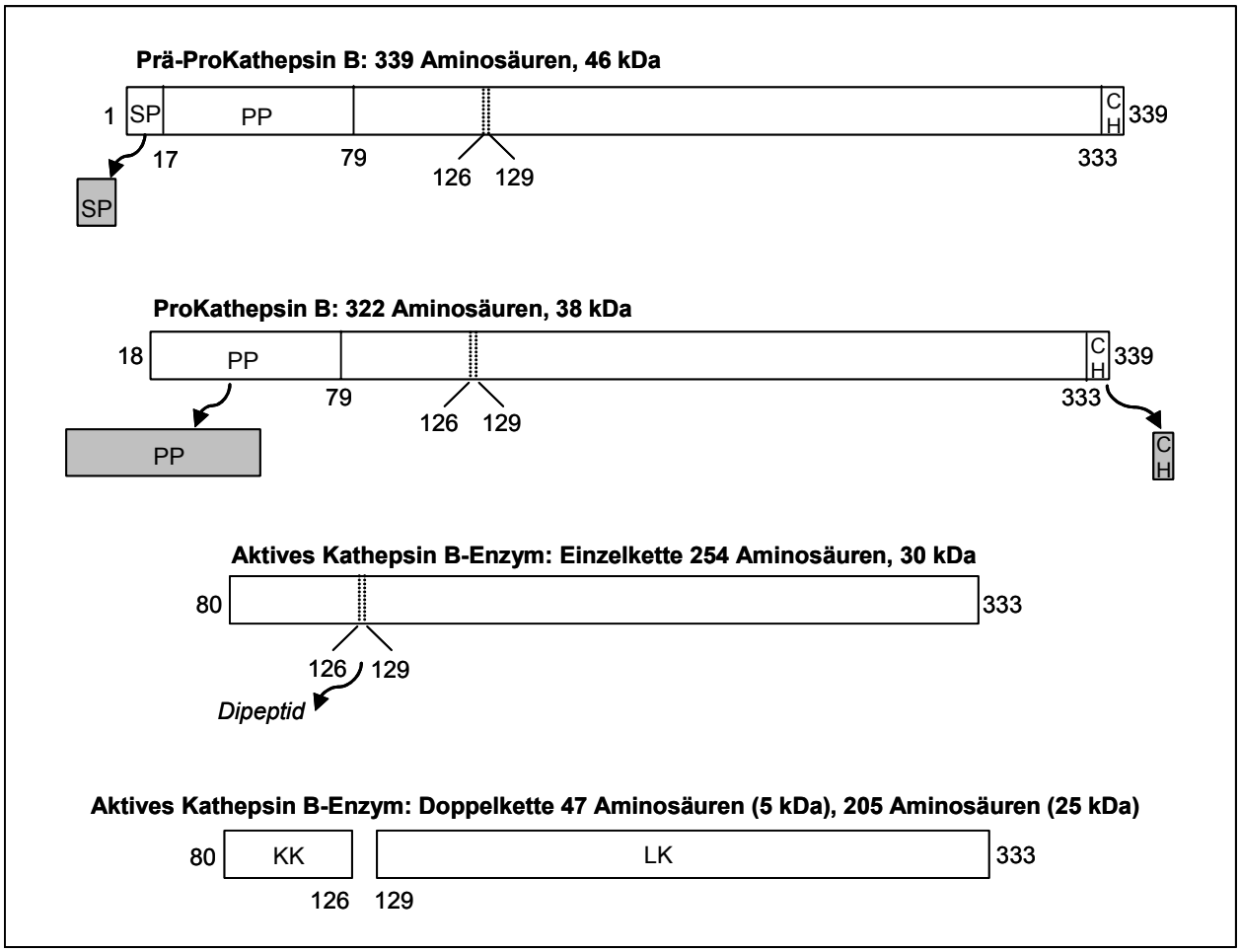

Abb. 2: Reifung des translatierten Kathepsin B-Vorläufermoleküls zur aktiven Form der Protease.
SP: Signalpeptid, PP: inhibitorisches Propeptid, CH: C-Terminales Hexapeptid, KK: Kurze Kette, SK: Schwere Kette.

Unter sauren pH-Bedingungen überwiegt die Dipeptidyl Karboxypeptidase-Aktivität von Kathepsin B [35]. Das aktive Zentrum des Enzyms ist eine katalytische Triade, bestehend aus den Aminosäureresten Asparagin$_{298}$, Histidin$_{278}$ und Zystein$_{108}$. Die Thiolatgruppe des Zysteins$_{108}$ wird durch den Imidazol-Ring des Histidins$_{278}$ deprotoniert, was zu einem nukleophilen Angriff

des Thiolatanions auf den Karbonylkohlenstoff des Substrates führt. Der Asparaginrest$_{298}$ stabilisiert während des katalytischen Vorgangs den protonierten Zustand des Histidins$_{278}$. Nach anschließender Spaltung eines Wassermoleküls erfolgen die Wiederherstellung des ursprünglichen Zustands des Enzyms sowie die Abspaltung des vorübergehend kovalent gebundenen Substrats. Dieser Mechanismus kann auch extrazellulär unter neutralen pH-Bedingungen ablaufen, wenn genügend Proteinsubstrat vorhanden ist. In diesem neutralen Mikroklima dominiert jedoch die Endopeptidase-Aktivität der Protease. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei neutralem pH-Wert Laminin, Fibronektin und Kollagen, die häufigsten Proteine der Extrazellulären Matrix, degradiert werden. Diese proteolytische Eigenschaft von Kathepsin B kann wesentlich zur Invasion und Metastasierung von Tumorzellen beitragen, die eine Überexpression und erhöhte Sekretion der Protease aufweisen [36].

- **Kathepsin B mRNA- und Proteinexpression in Tumoren**

In einer Reihe von malignen, invasiven Tumoren konnte bisher ein erhöhter Kathepsin B-Proteingehalt nachgewiesen werden, was auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen ist, die nachfolgend erläutert werden.

Der Gen-Lokus von Kathepsin B (8p22) ist eine Region, die bei Krebserkrankungen häufig Ziel allelischer Vervielfältigungen wird. Das Kathepsin B Gen selbst wurde bisher in Ösophagus- und Magenkarzinomen mit genomischen Amplifikationen in Verbindung gebracht, was erhöhte Kathepsin B mRNA- und Proteinexpressionen zur Folge hat [37,38].

Das Kathepsin B RNA-Primärtranskript unterliegt sowohl im normalen Gewebe als auch in Tumoren unterschiedlichen Prozessierungsmöglichkeiten. Im gesunden Gewebe aus Leber, Niere, Brust, Milz und Darm dominiert die in Abbildung 1 B dargestellte kürzeste Version mit fehlenden Exons 2, 2a/2b und 12. Gleichzeitig kann in diesen Geweben eine am 5`-Ende verlängerte Version detektiert werden, die das Exon 2 beinhaltet [26]. Im gesunden Prostata-Gewebe wurde eine Variante entdeckt, die zusätzlich das Exons 2a aufweist [28]. In den genannten gesunden Geweben beträgt das Verhältnis der am 5`-Ende verkürzten mRNA Variante zu der längeren Version ca. 2:1. In malignen Geweben aus Brust, Darm, Prostata und in Melanomen verschiebt sich dieses Verhältnis von 2:1 auf durchschnittlich ca. 16:1. Es konnte gezeigt werden, dass eine am 5`-Ende verkürzte mRNA-Version stärker translatiert wird als die längere Version, was zu einer verstärkten Kathepsin B-Proteinexpression in diesen Tumoren führt [26]. Bisher ist ungeklärt wie die Entstehung dieser mRNA-Formen reguliert wird.

Ein erhöhter Kathepsin B mRNA-Gehalt mit nachfolgend erhöhter Kathepsin B-Proteinexpression und -aktivität in Geweben von Kolonkarzinomen [39-41], Gehirntumoren [42] sowie bei Prostatakrebs [43] korreliert mit einer verstärkten Invasion und Metastasierung. Die Ursachen der erhöhten mRNA-Transkription in diesen Tumoren konnten bisher noch nicht genau bestimmt werden, eine Aktivierung des Kathepsin B-Promotors durch transaktivierende Transkriptionsfaktoren scheint jedoch wahrscheinlich [28].

Eine weitere Variante des Kathepsin B-Transkriptes in Tumoren entsteht durch Deletion der Exons 2 und 3 (Δ2/Δ3) und führt zur Synthese eines aberranten verkürzten Kathepsin B-

Moleküls. Es fehlen das aus 17 Aminosäuren bestehende Signalpeptid sowie 25 Aminosäuren des Propeptides. Weiterhin wird diskutiert, dass die Verwendung eines alternativen Promotors oberhalb von Exon 4 zu einem verkürzten Kathepsin B-Proprotein führen kann, dessen Translationsstart an einem internen Methionin-Rest, an Position 52 der regulären Proteinkette liegt. Diesem Protein fehlen sowohl das Signalpeptid als auch 34 Aminosäuren des Propeptides [26,44]. Das zugrunde liegende mRNA-Transkript führt im Vergleich zu Δ2, zu einer Verstärkung der Translationsrate. Diese aberranten Kathepsin B-Moleküle weisen aufgrund der fehlenden Signalpeptide eine veränderte Verteilung in der Zelle auf. Das verkürzte ProKathepsin B-Protein ist an der Membran des Zellkernes und an weiteren intrazellulären membranumgebenen Vesikeln sowie an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert [45].
Kathepsin B ist in normalen Zellen vorwiegend in Lysosomen lokalisiert, wo es an der Degradation von Proteinen beteiligt ist und den normalen Protein-Metabolismus aufrechterhält. Eine pathophysiologische Funktion von Kathepsin B entsteht, wenn beispielsweise in Tumoren Genamplifikationen, erhöhte Transkriptionsraten, Stabilisierung und erhöhte Translation von verschiedenen mRNA-Transkripten stattfinden und somit zu erhöhten Proteasekonzentrationen in den betroffenen Zellen sowie zu einer erhöhten Sekretion in die Zellperipherie führen. Dadurch wird Extrazelluläre Matrix verstärkt degradiert und dadurch werden die Invasion von Tumorzellen in umliegendes Gewebe sowie die Metastasierung deutlich gefördert [28].

1.4 Die *Transforming Growth Factor-β*-Familie

Die *Transforming Growth Factors-β*-Familie (TGF-β-Familie) umfasst mehr als 30 sezernierte Peptid-Zytokine mit ähnlicher Struktur und vielfältigen Funktionen. Zu dieser Familie gehören die TGF-β-Proteine, die ***B**one **M**orphogenetic **P**roteins* (BMPs), die Aktivine und die ***G**rowth and **D**ifferentiation **F**actors* (GDFs).
Die TGF-β-Gruppe besteht aus den drei Isoformen TGF-β1, TGF-β2 und TGF-β3, deren Gene auf den Chromosomen 19q13, 1q44 und 14q24 lokalisiert sind. Diese Zytokine werden als Proproteine synthetisiert, während der Sekretion gespalten und als Homodimere in die Zellperipherie sezerniert. Das abgespaltene Propeptid wird als ***L**atency-**A**ssociated **P**rotein* (LAP) bezeichnet und bleibt, nicht-kovalent gebunden, an den TGF-β-Homodimeren haften, wodurch die Bindung von TGF-β an die Rezeptoren verhindert wird. LAP kann durch Plasmin, Elastase oder Kathepsin D gespalten werden, was zur Freisetzung der biologisch aktiven 25 kDa TGF β-Homodimere führt [46,47].
BMPs spielen eine große Rolle während der frühen Embryonalentwicklung, beim Umbau von Knochengewebe und der Wundheilung. Bisher sind die BMPs 2-7 bekannt, deren Signalübermittlungswege eng mit denen von TGF-β-Peptiden verknüpft sind [48].

1.4.1 Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1)

TGF-β1 ist der häufigste und am besten charakterisierte Vertreter der TGF-β-Familie. Dieses Zytokin wird von Leukozyten, Fibroblasten, Keratinozyten, Blutplättchen und Endothelzellen sekretiert. Es kann in allen Geweben und im Blut detektiert werden, wobei in Knochen, Lunge,

Nieren und in der Plazenta ein erhöhter Gehalt nachgewiesen werden konnte [49].

TGF-β1 ist bekannt für seine vielfältige, oft gegensätzliche Wirkung auf das Verhalten von Zellen. Es reguliert zentrale biologische Funktionen wie die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose. Auch der Umbau Extrazellulärer Matrix, die Zellmigration und Angiogenese werden von TGF-β1 gesteuert.

In den Anfangsstadien inflammatorischer Prozesse fördert TGF-β1 die Immunantwort durch Induktion von Adhäsion, Rekrutierung und Aktivierung immunologischer Effektorzellen. In späteren Phasen überwiegt die immunsuppressive Wirkung von TGF-β1, was zur Auflösung der Immunantwort führt und Wundheilung induziert. Das Gleichgewicht zwischen diesen gegensätzlichen Aktivitäten ist entscheidend für die Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase eines Organismus [50].

Eine ausgewogene Regulation der biologischen Funktionen von TGF-β1 ist essentiell für das normale Wachstum und die Entwicklung von Zellen. Wird dieses empfindliche Gleichgewicht gestört, können exzessive Zellproliferation, unkontrollierter Umbau der Extrazellulären Matrix, erhöhte Zellmigration sowie Angioneogenese die Entstehung maligner Tumoren mit verstärkter Invasion und Metastasierung fördern [46,50,51].

- **TGF-β1 und die Zellproliferation**

Die Zellteilungsrate mesenchymaler Zelltypen wie beispielsweise Fibroblasten und Chondrocyten wird durch TGF-β1 erhöht, während die Proliferation von Epithel- und Endothelzellen in der G1-Phase blockiert wird.

Hämatopoietische Zellen stehen in frühen Entwicklungsstadien unter strikter Proliferationskontrolle durch TGF-β1, während Zellen späterer Differenzierungsphasen ihre Sensitivität gegenüber der TGF-β1-Inhibition verlieren [52].

Ein wichtiges Ziel der Proliferationshemmung ist das Retinoblastom-Protein, dessen Phosphorylierung durch ***c**yclin **d**ependend **k**inase* (cdk) essentiell für die Zellproliferation ist. TGF-β1 induziert die erhöhte Expression der cdk-Inhibitoren $p15^{INK4B}$ und $p21^{CIP1}$, wodurch die Phosphorylierung von Retinoblastom verhindert wird [46,50,53].

- **TGF-β1 und Adhäsion**

TGF-β1 verstärkt den interzellulären Kontakt und führt zu einer erhöhten Zell-Matrix-Bindung durch Induktion der Expression von Integrinen. Diese, durch TGF-β1 erhöhten, Integrin-vermittelten Zell-Zell- und Zell-Extrazelluläre Matrix-Interaktionen gelten als zentraler Ausgangspunkt für den Austritt von Monozyten und anderen Leukozyten aus der Blutbahn in umliegendes Gewebe [54-56].

- **TGF-β1 und der Umbau Extrazellulärer Matrix im Verlauf entzündlicher Prozesse**

TGF-β1 kontrolliert den geregelten Ablauf der Synthese und Degradation von Extrazellulärer Matrix. In den Anfangsstadien einer Entzündung induziert dieses Zytokin die Expression der Matrix-Metalloproteasen-2, -9 und -13 (MMP-2, MMP-9, MMP-13) in Monozyten, Fibroblasten

und Epithelzellen, was zur Translokation der Monozyten aus der Blutbahn in umliegendes Gewebe führt [55,57,58]. MMPs besitzen wie Kathepsine ein hohes Extrazelluläre Matrix-degradierendes Potential, sie übernehmen deshalb beim Extrazelluläre Matrix-Umbau eine wichtige Rolle.
Im späteren Verlauf der Inflammation ändert sich die Wirkung von TGF-β1 zugunsten einer Suppression der Immunantwort, die Wundheilung wird durch die verstärkte Bildung von Kollagen, Fibronektin, Laminin, Glukosaminoglykanen und MMP-Inhibitoren vorangetrieben [59].

- **Die Rolle von TGF-β1 in humanen Tumoren**

Die Antwort einer Zelle auf TGF-β1 verändert sich parallel zur Entwicklung des Zell-Phänotyps von einem nicht-neoplastisch, wachstumsregulierten Zustand zur vollständig malignen, proliferativen und invasiven Tumorzelle [60]. Die komplexen und multifunktionellen Aktivitäten von TGF-β1 können in Abhängigkeit von dem Stadium eines Tumors und der Reaktivität der betroffenen Zellen sowohl tumorsuppressorisch als auch –induzierend wirken. In frühen Phasen eines Tumors, wenn die pathologisch veränderten Zellen noch auf die proliferationsinhibitorische Wirkung von TGF-β1 reagieren, kann diesem Zytokin eine tumorsuppressorische Wirkung zugesprochen werden. In späteren Phasen nimmt die TGF-β1-Produktion in einer Reihe von Tumorgeweben stark zu. Die erhöhte TGF-β1-Konzentration führt in vielen Fällen zu Veränderungen des Mikroklimas welche die Vermehrung und Ausbreitung von Tumorzellen favorisiert. Die malignen Zellen reagieren auf den erhöhten TGF-β1-Gehalt mit einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen und Extrazelluläre Matrix-abbauenden Enzymen wie beispielsweise MMPs, was die Erhöhung der Invasion und Metastasierung in umliegendes Gewebe zur Folge hat. Weiterhin wird die Expression des ***V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor* (VEGF) durch TGF-β1 erhöht, es kommt somit im Bereich maligner Tumoren zu einer verstärkten Angioneogenese [46,60-62].
Eine erhöhte TGF-β1-Sekretion verändert das immunologische Mikroklima in der unmittelbaren Umgebung eines Tumors. Durch die immunstimulatorische Wirkung dieses Zytokins werden zunächst Leukozyten chemotaktisch angelockt. Anschließend führen jedoch die immunsupprimierenden Eigenschaften von TGF-β1 dazu, dass die Proliferation und funktionelle Differenzierung von B- und T-Lymphozyten, NK-Zellen, Neutrophilen und Makrophagen unterdrückt werden. Der immunologische Angriff auf die malignen Zellen kann nicht ausgeführt werden [46].
Hämatopoietische Vorläuferzellen und Epithelzellen teilen sich permanent, eine Eigenschaft die zu einem erhöhten Risiko genetischer Veränderungen führt, welche Zelltransformationen sowie Tumorentwicklung zur Folge haben können. Die daraus resultierenden Zellveränderungen sind nicht nur eine Folge von Oncogen-Aktivierung oder Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen sondern auch das Ergebnis einer veränderten Reaktion auf stimulatorische oder inhibitorische Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Unter diesen spielt TGF-β1 eine herausragende, duale Rolle und die signalübermittelnden Effektorproteine agieren als Schlüsseldeterminanten bei dem Verhalten von Tumorzellen [46].

1.4.2 Die Signaltransduktionskaskaden von TGF-β- und BMP-Peptiden

In Abbildung 4 sind die Signaltransduktionskaskaden von TGF-β und den BMPs dargestellt. TGF-β und die BMPs binden an zwei Rezeptoren, Typ II und Typ I, die beide eine intrazelluläre Serin/Threonin-Kinasedomäne besitzen. Der Typ II-Rezeptor ist konstitutiv phosphoryliert. Nach Ligandenbindung an den Typ II-Rezeptor entsteht ein Rezeptor/Liganden-Komplex mit dem Typ I-Rezeptor, worauf dieser durch den Typ II-Rezeptor phosphoryliert wird [63]. Bisher sind drei unterschiedliche Typ II- und sieben Typ I-Rezeptoren bekannt, die auch als ***A**ctivin Receptor-**L**ike **K**inase* (ALKs) bezeichnet werden und TGF-β bzw. BMPs binden können. Unterschiedliche Typ I- und Typ II-Rezeptor-Kombinationen binden jeweils ganz bestimmte Liganden (Tab. 1).

Tab. 1: Liganden/Rezeptorkombinationen und ihre aktivierten Signalübermittlungsproteine [47,64].

Ligand	Typ I-Rezeptor	Typ II-Rezeptor	Signalübermittler
TGF-β1, -β3	ALK-5	TβRII	Smad2/3
TGF-β1, -β2, -β3	ALK-5	TβRII-B	Smad2/3
TGF-β1	ALK-5-S	TβRII	Smad2/3
TGF-β1, -β3	ALK-1	TβRII	Smad1/5
TGF-β1	ALK-2	TβRII	Smad1/5
BMPs 2, 3, 4, 5, 6, 7	ALKs 2, 3, 6	BMPRII	Smad1/5/8

Nach Ausbildung des Rezeptor/Liganden-Komplexes wird die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade durch den Typ I-Rezeptor aktiviert, wobei vorwiegend Smad-Proteine die anschließende Signalübermittlung übernehmen. Neben diesem Weg werden alternative, Smad-unabhängige TGF-β-Signalübermittlungsketten aktiviert.

Der Name der Smad-Proteine leitet sich von den sie codierenden Genen ab, die in genetischen Studien an *Coenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* erstmals identifiziert wurden. Das *C. elegans*-Gen wird als Sma (**Sma**ll body size), das Gen in Drosophila als Mad (***M**others **a**gainst **D**ecapentaplegic*) bezeichnet. Die Kombination dieser beiden Bezeichnungen ergibt den Namen Smad. Die Smads werden in drei Gruppen der R-Smad, Co-Smads und I-Smads eingeteilt. Smad1, Smad2, Smad3, Smad5, und Smad8 sind rezeptorassoziierte Smads (R-Smads). Sie werden direkt vom Typ I-Rezeptor phosphoryliert und somit aktiviert. Smad2 und Smad3 werden nur von TGF-β-Peptiden rekrutiert und Smad8 ist dem BMP-Signalweg zugeordnet. Smad1 und Smad5 werden sowohl von TGF-β als auch von BMPs aktiviert. So entsteht eine Vernetzung der Signalwege beider Zytokingruppen (Abb. 4). Phosphorylierte R-Smads lagern sich einzeln oder als Homomere an das Co-Smad Smad4-Protein an, wobei anschließend eine Translokation dieses heteromeren Komplexes in den Zellkern stattfindet (Abb. 4). Hier erfolgt die Transkriptionsregulation von Zielgenen. Smads können die Transkription durch direkte Bindung an die DNA-Erkennungssequenz „CAGACA“ initiieren sowie mit Hilfe weiterer Transkriptionsfaktoren oder erst nach Anlagerung der akzessorischen Moleküle CBP/p300 [47,64].

Smad6 und Smad7 sind inhibitorische Smad-Proteine (I-Smads), die die Anlagerung von R-Smads an den Typ I-Rezeptor oder nach Phosphorylierung, die Heteromerisierung verhindern, wobei die Signalübermittlungskette unterbrochen wird.
Eine schematische Darstellung der R-Smads ist in Abbildung 3 zu sehen. Die N- und C-terminalen Domänen der Smad-Proteine sind hochkonservierte Bereiche, sie werden entsprechend ihrer Homologie zu den Mad-Proteinen aus *Drosophila melanogaster,* MH1 und MH2 genannt (**M**ad **H**omology domain). Bei R-Smads und Co-Smad4 beinhaltet die MH1-Domäne den DNA-Bindungsbereich während die MH2-Domäne den Protein-Protein-Interaktionsbereich darstellt und die Homo- und Heteromerisierung der Smad-Proteine vermittelt. Die Phosphorylierung von Smad2/3 durch den TGF-β1-Rezeptor Typ I erfolgt in der MH2-Domäne am C-Terminus im SSXS-Motiv. Die ERK1/2-Proteinkinase kann R-Smads ebenfalls phosphorylieren, die entsprechenden Phosphorylierungsstellen befinden sich Im *Linker*-Bereich zwischen den MH1- und MH2-Domänen [60].

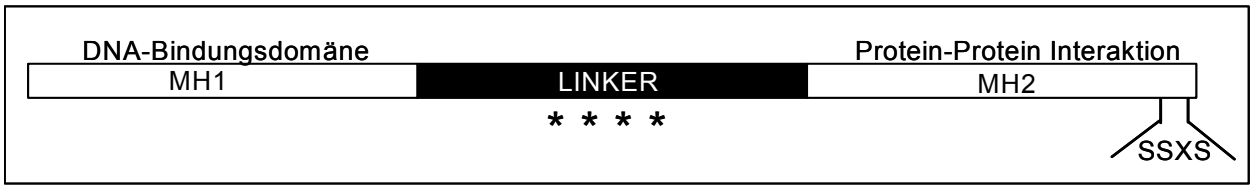

Abb. 3: Schematische Abbildung der R-Smads2/3 [60]. MH1: Mad homology domain1, DNA-Bindungsdomäne. MH2: Mad homology domain2, Protein-Protein-Interaktionsdomäne. * * *: Phosphorylierungsstellen durch ERK1/2.

Neben der Smad-vermittelten TGF-β Signaltransduktion werden durch dieses Zytokin auch die MAP-Kinasen (***M**itogen **A**ctivated **P**rotein Kinases*) aktiviert. MAP-Kinasen sind Enzyme, die kovalent Phosphatreste an spezifische Serin- oder Threonin-Reste von Zielproteinen binden. Die Phosphorylierung eines Proteins beeinflusst dessen Aktivität, die Lokalisation innerhalb der Zelle sowie die Interaktion mit anderen Proteinen oder DNA. MAP-Kinasen regulieren die Expression von Genen, die Mitose, den Stoffwechsel und steuern den programmierten Zelltod von Zellen. Die zelluläre Antwort auf Zytokine oder Stress wird ebenfalls durch MAP-Kinasen vermittelt. Substrate der MAP-Kinasen sind andere Protein-Kinasen, Transkriptionsfaktoren und die Proteine des Zytoskeletts. In vielzelligen Organismen existieren drei gut charakterisierte Unterfamilien von MAP-Kinasen: p38, ERK1/2 (***E**xtracellular Signal **R**egulated **K**inase*), und JNK (***J**un **N**-terminal **K**inase*). Diese Proteinkinasen sind die letzten Glieder in der Signaltransduktionskaskade und regulieren durch Phosphorylierung spezifischer Transkriptionsfaktoren unmittelbar die Expression von Zielgenen [65].
MAP-Kinasen können entweder R-Smads phosphorylieren und somit den Smad-Signalweg kreuzen oder eine Smad-unabhängige Signalübermittlungskaskade induzieren.
Im Zellkern können wiederum Interaktionen zwischen Smad-Komplexen und MAP-Kinase-spezifischen Transkriptionsfaktoren die Genregulation auf Transkriptionsebene beeinflussen [46,60,66-68].

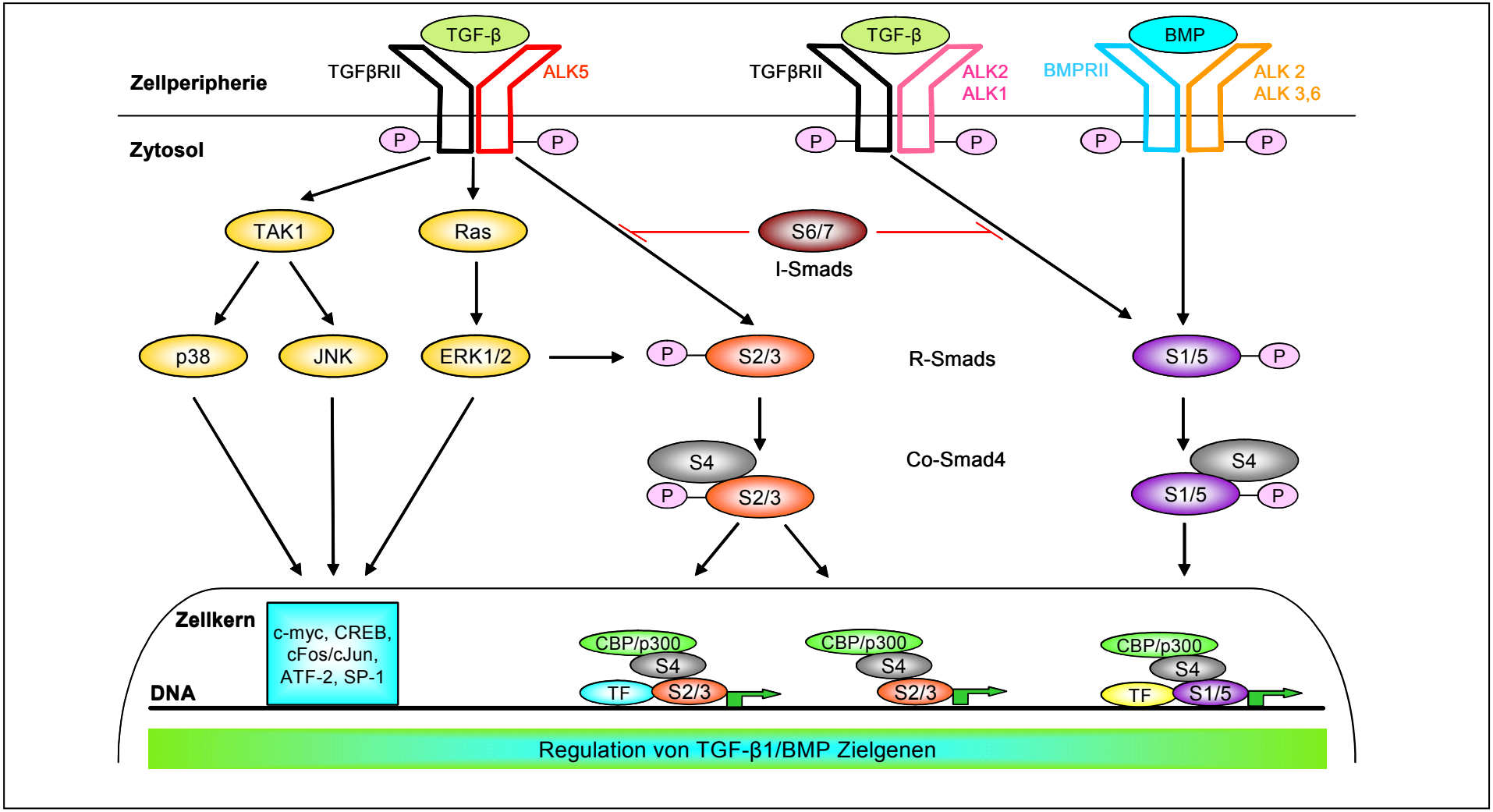

Abb. 4: Smad-abhängige und Smad-unabhängige Signaltransduktion [47,60]. S: Smad. c-myc, CREB, cFos/cJun, ATF-2, SP-1: durch die MAP-Kinasen p38, ERK1/2 und JNK aktivierte Transkriptionsfaktoren. TF: Transkriptionsfaktoren: c-myc, CREB, cFos/cJun, ATF-2 oder SP-1.

➢ **Veränderte TGF-β1-Signaltransduktion in verschiedenen humanen Tumoren**

Die Gene der TGF-β1-Rezeptoren und die Smad-Proteine sind häufig Ziel von Mutationen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die TGF-β1-Rezeptoren Typ II und Typ I in einer Reihe von Tumoren inaktivierende Mutationen aufweisen, was zur Unterbrechung der Signaltransduktion führt. Eine unterdrückte TGF-β1-Signaltransduktion kann je nach Typ und Entwicklungsstadium des Tumors sowohl zur Tumorinhibierung als auch zur Tumorprogression führen [46]. Die Inaktivierung der Smad2- und Smad4-Gene durch Deletionen, *nonsense* oder *missense* Mutationen sowie durch Verlust von größeren Gensegmenten in vielen Tumoren bewirkt eine veränderte TGF-β1-Signalkaskade. Smad2 und Smad4 sind tumorsuppressorische Proteine, deren Inaktivierung eine Verstärkung des Tumorwachstums zur Folge hat, weil die Proliferationshemmung durch TGF-β1 verhindert wird. Die TGF-β1-induzierte Expression verschiedenster Gene, welche die Tumorentwicklung fördern, erfolgt durch Smad-unabhängige Signalwege. Beispielsweise kann der Verlust von Smad4 die TGF-β1-Ras-vermittelte Signaltransduktion verstärken und somit die Progression undifferenzierter Tumoren induzieren [46].

1.5 Akute myeloische Leukämie (AML)

Monoblasten durchlaufen in ihrer Entwicklung zu reifen Monozyten eine Phase mit hoher Zellteilungsrate um anschließend, nach abgeschlossener Differenzierung, in der G0/G1-Phase des Zellteilungszyklus arretiert zu werden. Neoplastische Transformationen, die während der Phase erhöhter Zellteilung auftreten, können zur Unterbrechung der laufenden Differenzierung führen und mit unkontrolliertem Zellwachstum assoziiert sein.

Die akute myeloische Leukämie ist durch einen hohen Anteil an neoplastisch veränderten myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark sowie im peripheren Blut gekennzeichnet. Aufgrund der heterogenen Manifestation und der unterschiedlichen Entwicklungsstadien dieser Zellen werden spezifische morphologische Gruppen definiert, die nach der *French-American-British* (FAB) Klassifikation bestimmt werden und charakteristische chromosomale Aberrationen aufweisen. Die Einteilung erfolgt in neun Untergruppen von FAB M0 bis FAB M7 [54,69-71]. Die Tumorzellen sind in unterschiedlichen Differenzierungsstadien arretiert, sie proliferieren unkontrolliert und können, im Gegensatz zu gesunden Vorläuferzellen, aus dem Knochenmark in die Blutbahn übertreten. Eine Komplikation die im Vorfeld, während oder nach dieser Erkrankung häufig auftritt ist die leukämische Infiltration verschiedener Gewebe und Organe. Befallen werden die Leber, Milz, Lymphknoten, Knochen sowie das zentrale Nervensystem. Eine isolierte Masse leukämischer Blasten wird allgemein als „extramedulläre Leukämie“ oder „Granulozytisches Sarkom“ bezeichnet. Extramedulläre Leukämien treten häufiger in den myelo-monozytären oder monoblastischen Varianten der AML (FAB M4 und M5) auf als in anderen Untergruppen [69,72]. Die Voraussetzung für die Extravasation von AML-Blasten ist die Adhäsion an das Endothel sowie die Degradation Extrazellulärer Matrix. Ein erhöhter Blasten-Endothel-Kontakt wird durch eine erhöhte LFA-1- und ICAM-Expression auf den leukämischen Zellen erzielt. Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Adhäsion von myeloisch-

monozytären Tumorzellen (FAB M4, M5) an die Extrazelluläre Matrix, insbesondere an Laminin, durch den nicht-Integrin-Rezeptor 67LR (67-kDa Laminin-Rezeptor) vermittelt wird [54,73,74]. Die anschließende Extravasation erfolgt durch verstärkte Expression von Extrazelluläre Matrix-degradierenden Enzymen wie MMPs und Kathepsine [75,76].

Die in dieser Arbeit verwendeten myelo-monozytären Zelllinien THP-1, MonoMac-1 und MonoMac-6 stammen aus Patienten mit AML und werden der Untergruppe FAB M5 zugeordnet. Sie repräsentieren unterschiedliche myelo-monozytäre Differenzierungsstufen, die in definierten Entwicklungsstadien transformierenden Mutationen unterlagen und dadurch unbegrenztes Zellteilungsvermögen erlangten. Während bei THP-1-Zellen die neoplastischen Mutationen in einem frühen Differenzierungsstadium auftraten, ähnelt das Differenzierungsbild von MonoMac-6-Zellen sehr stark dem reifer Monozyten. Die Zelllinie MonoMac-1 nimmt die Position zwischen THP-1- und MonoMac-6-Zellen ein.

1.6 Zielstellung der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte analysiert werden, ob TGF-β1 in myelo-monozytären Zelllinien einen Anstieg der Expression von Kathepsinen auf mRNA- und Proteinebene verursachte. Diese Experimente sollten parallel zu Stimulationen mit bakteriellem Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) als Positivkontrolle durchgeführt werden.

Weiterhin sollten physiologische Auswirkungen einer veränderten Kathepsin-Expression charakterisiert werden. Dazu sollten funktionelle Eigenschaften wie die Migration/Invasion, die Enzymaktivitäten und das Apoptoseverhalten nach Inhibition der Kathepsine analysiert werden.

Anschließend sollte die TGF-β1-Signaltransduktion in myelo-monozytären Zelllinien untersucht werden um die beteiligten signalübermittelnden Proteine zu identifizieren und möglicherweise auftretende Veränderungen im Smad mRNA-Expressionsmuster zu detektieren.

Weiterhin sollte geklärt werden, wo die TGF-β1-reaktiven Einheiten des Kathepsin B-Gens lokalisiert sind.

2 METHODEN UND MATERIAL

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Kultivierung der Zellen

Für die Zellkulturexperimente wurden die myelo-monozytären, in Suspension wachsenden, Zelllinien THP-1, MonoMac-1 und MonoMac-6 sowie die adhärente Lungenepithelzelllinie A-549 verwendet. Sie wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) käuflich erworben. Die Kultivierung erfolgte in Iscove`s modifiziertem Dulbecco`s Medium (IMDM-Medium, Invitrogen) unter Zusatz von 10 % Fötalem Kälberserum (FCS, PAN) und 1 % Antibiotikum/Antimykotikum-Lösung (Sigma®), nachfolgend IMDM-FA-Medium genannt, bei 37 °C und 5 % CO_2-Sättigung.

2.1.1.1 Die myelo-monozytären Zelllinien MonoMac-1, MonoMac-6 und THP-1

Die myelo-monozytären Suspensions-Zelllinien wurden dreimal wöchentlich im Verhältnis 1:3 gesplittet (maximale Zelldichte: 1×10^6 Zellen/ml IMDM-FA-Medium). Sie wurden zur Erneuerung des Kulturmediums in 50 ml Röhrchen bei 300 x g abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment anschließend in 3 ml IMDM-FA-Medium resuspendiert und jeweils 1 ml in Zellkulturflaschen mit frischem Medium überführt. Die MonoMac-6 Zellen erhielten zusätzlich 10 µg/ml Insulin (Sigma®).

2.1.1.2 Die Lungenepithelzelllinie A-549

Die adhärent wachsende epitheliale A-549-Zelllinie wurde nach Verwerfen des verbrauchten Mediums 3 x mit Hank's-Salz-Lösung (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}, Biochrom) gewaschen. Durch Zugabe einer Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen) wurden die Zellen zur Ablösung vom Boden der Kulturflaschen 3-5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Neutralisation der Zell-Trypsin/EDTA-Suspension mit frischem IMDM-FA-Medium folgte ein 5-minütiger Zentrifugationsschritt bei 300 x g. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Zellen mit 4 ml frischem IMDM-FA-Medium resuspendiert. Jeweils 1 ml der Suspension wurde zur Weiterkultivierung in Kulturflaschen mit frischem Zellkultur-Medium ausgesät.

2.1.2 Isolierung humaner peripherer Blutmonozyten durch Gegenstromelutriation

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) wurden aus 200 ml venösem Blut von gesunden, freiwilligen Spendern isoliert. In einem ersten Schritt mussten die Leukozyten mittels einer Dichtegradientenzentrifugation von den Erythrozyten/Granulozyten separiert werden.

Die Monozytenseparation erfolgte anschließend in der Zentrifuge Avanti-J20 von Beckmann mit dem Elutriatorrotor JE 5.0. Die isolierten PBMCs wurden mittels einer Pumpe in die konisch geformte Elutriationskammer gespült und ordneten sich bei einer konstanten Umdrehungszahl des Rotors gemäß ihrer Größe in der Kammer an. Dabei sind zwei gegeneinander wirkende Kräfte von Bedeutung. Zum einen die nach außen gerichtete Zentrifugalkraft, die durch die Rotationsgeschwindigkeit des Elutriatorrotors bestimmt wird und zum anderen die Zentripetalkraft, die durch die Strömungsgeschwindigkeit des Mediums in Richtung der

Rotationsachse mittels einer geeichten Pumpe bestimmt wird. Befinden sich beide Kräfte im Gleichgewicht, können die Zellen einer bestimmten Größe und Dichte in der Elutriationskammer konzentriert werden, während die übrigen ausgewaschen werden. Dieser Vorgang wird sowohl von der eingestellten Fließgeschwindigkeit der Zellsuspension, der Dichte, der Temperatur, der Viskosität des Mediums und der Rotorgeschwindigkeit beeinflusst. So ist es möglich, durch Variation der Fließgeschwindigkeit bei gleichzeitiger Konstanz der übrigen Faktoren (Rotationsgeschwindigkeit) verschiedene Zellpopulationen entsprechend ihres Sedimentationskoeffizienten zu elutriieren. Durch Erhöhung der Durchflussgeschwindigkeit des Elutriationspuffers werden zunehmend größere Zellen ausgespült.

2.1.2.1 Separation von humanen peripheren mononukleären Blutzellen mittels Dichtegradient-Zentrifugation

Aus dem Blut lassen sich mittels Dichtegradient-Zentrifugation die mononukleären Zellen isolieren.

Es wurden jeweils 15 ml Ficoll®-400/Amidotrizoesäure-Lösung (Biocoll 1,077 g/ml, Biochrom) in 8 x 50 ml Röhrchen vorgelegt und vorsichtig mit 30 ml Blut überschichtet. Der erste Zentrifugationsschritt, 30 Minuten bei 500 x g und ausgeschalteter Bremse, trennte die mononukleäre Leukozytenpopulation von den restlichen Blutzellen. Lymphozyten und Monozyten sedimentieren langsam und sammeln sich dabei entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Überstand (Plasma/Thrombozyten) und Biocoll an. Das rote Zellsediment besteht aus aggregierten Erythrozyten und Granulozyten, die eine hohe Dichte besitzen.

Es wurden die weißen Ringe (Leukozyten-Fraktion) in der Interphase zwischen der klaren Schicht (Biocoll) und dem darüber-liegenden Plasma-Puffer-Gemisch vorsichtig abgenommen und wiederum in 8 Röhrchen (auf Eis vorgekühlt) verteilt. Für die nachfolgenden Waschschritte wurde der Elutionspuffer auf 4 °C vorgekühlt, die Zentrifugation erfolgte ebenfalls bei 4 °C. Die geernteten Zellen wurden in einem ersten Waschschritt mit Elutionspuffer resuspendiert, auf 50 ml aufgefüllt und 10 Minuten bei 500 x g pelletiert. Jeweils zwei Zellpellets wurden vereinigt und zwei weitere Waschschritte, 10 Minuten bei 500 x g und 300 x g durchgeführt, wobei die Zellsedimente nach dem zweiten Waschschritt auf zwei Pellets reduziert wurden. Nach der letzten Zentrifugation wurden die beiden Zellsedimente in 10 ml Elutionspuffer resuspendiert und bis zur Elutriation auf Eis aufbewahrt.

2.1.2.2 Gegenstromelutriation

Der Elutriatorrotor wurde gemäß der Anweisung des Herstellers zusammengebaut und auf 10°C abgekühlt. Um Sterilität zu gewährleisten wurde das System 10 Minuten mit 70 % Ethanol bei einer Pumpgeschwindigkeit von 20 ml/min erst gespült dann 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Ethanollösung mit sterilem PBS entfernt, welches dann durch Beschichtungspuffer ersetzt wurde um eine spätere Adhäsion der Zellen an das System zu verhindern. Nach einer Stunde wurde eine Drehzahl von 3000 U/min eingestellt und die PBMCs

bei ausgeschalteter Pumpe mittels einer Injektionsspritze in das System injiziert. Die Elutriation der Zellen begann bei einer Durchflussrate des Elutriationspuffers von 10 ml/min und wurde schrittweise auf 29 ml/min erhöht (bei Pumpeinstellung = 2,02). Bis zu dieser Durchflussgeschwindigkeit wurden noch eventuell vorhandene Erythrozyten und die Lymphozyten aus dem System gespült. Die Erhöhung der Pufferflussrate auf 36 ml/min (Pumpeinstellung = 2,5) verursachte die Elutriation der monozytären Fraktion. Diese Zellen wurden in insgesamt 5 x 50 ml Röhrchen aufgefangen und die Reinheit der einzelnen Fraktionen nach Anfärbung mit einem anti-CD14-Antikörper durchflusszytometrisch analysiert (Kap. 2.1.5). CD14 ist der Lipopolysaccharid-Rezeptor (LPS-Rezeptor) und wird innerhalb der Blutzellen spezifisch auf reifen Monozyten exprimiert. Die Monozytenpopulation in den gesammelten Fraktionen betrug 85 % bis 98 % wobei eine geringe Verunreinigung mit 2 % bis 15 % Lymphozyten toleriert wurde. Die aufgefangenen Fraktionen wurden 5 Minuten bei 400 x g und 4 °C zentrifugiert, die Zellsedimente vereinigt, 2 x in 50 ml PBS gewaschen, die Zellzahl bestimmt (nach Anfärben mit Trypanblau und Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer) und anschließend in IMDM-FA-Medium für die Weiterkultivierung aufgenommen.

2.1.3 Proliferationsmessung von myelo-monozytären Zelllinien durch ^{3}H-Thymidin-Markierung

Zur Analyse des Einflusses von TGF-β1 auf die Proliferationsrate der myelo-monozytären Zelllinien wurden 5 x 10^5 Zellen in 100 µl IMDM-FA Medium in 96-Loch-Platten ausgesät und 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend wurde serumhaltiges durch serumfreies Medium ersetzt und 20 ng/ml TGF-β1 zugefügt. Nach 24 h erfolgte die Zugabe von 0,5 µCi ^{3}H-Thymidin (Amersham) und nach weiteren 24 h Inkubation wurden die Zellen geerntet, mit H_2O_{dest} lysiert und auf Filter gesaugt (PerkinElmer Wallac GmbH). Die von den Zellen in die DNA eingebaute ^{3}H-Thymidin-Radioaktivität wurde nach Zugabe von Scintilatorflüssigkeit (PerkinElmer Wallac GmbH) gemessen (1450 MicroBeta Trilux, PerkinElmer Wallac GmbH).

2.1.4 Migrations-/Invasionstest von THP-1-Zellen

Der Migrations-/Invasionstest stellt ein Modell der Tumorzellinvasion durch die Basalmembran dar. Diese muss, um von den Tumorzellen passiert zu werden, durch deren sekretierte proteolytischen Enzyme degradiert werden.

Es kamen *Transwell*-Kammern mit einer Membranporengröße von 8 µm zum Einsatz, die in die Vertiefungen von 24-Loch-Platten platziert werden konnten (Cell Culture Inserts, Polycarbonate Membrane, Nunc™). Die Membranen der Einsätze wurden mit Matrigel® (BD Bioscience), einer Substanz die reich an extrazellulären Matrixproteinen, wie Laminin, Kollagen IV und Proteoglykanen ist, beschichtet. Dazu wurden 50 µl Matrigel® auf Eis aufgetaut und mit 300 µl eiskaltem IMDM-FA-Medium versetzt. Diese Mischung wurde auf die kalten Membranen der Einsätze mit vorgekühlten Pipettenspitzen aufgetragen und anschließend 2 h bei RT inkubiert um die Polymerisierung der Matrixpolymere zu induzieren. Danach wurde die überstehende Flüssigkeit vorsichtig, um eine Beschädigung der Beschichtung zu vermeiden, abgenommen.

Anschließend wurden in den Bereich unterhalb der Einsätze 500 µl IMDM-FA-Medium gegeben welches mit 50 ng/ml MCP-1 (Strathmann Biotech AG) versetzt wurde. Diese Substanz wirkt chemotaktisch auf myelo-monozytäre Zellen.

Zur Untersuchung der Migrations- und Invasionsfähigeit von THP-1-Zellen nach TGF-β1-Inkubation wurden sie wie folgt vorbehandelt: 0,5 x 10^6 Zellen wurden in den Kavitäten von 24-Loch-Platten (TPP) in 1 ml IMDM-FA-Medium 48 h ohne und mit 20 ng/ml TGF-β1 (Strathmann Biotech AG) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt, jeweils 0,4 x 10^6 Zellen abgenommen und steril aufbewahrt während die restlichen Zellen 5 Minuten bei 500 x g abzentrifugiert wurden. Der zellfreie, konditionierte Überstand wurde dazu verwendet die vorher abgetrennten 0,4 x 10^6 Zellen auf ein Volumen von 500 µl aufzufüllen. Zu diesen Zellsuspensionen wurde anschließend der Kathepsin-Inhibitor E64 (L-trans-Epoxysuccinyl-Leucyl-amido-(4-guanidino)-butylamide, Bachem) pipettiert. Die eingesetzten Konzentrationen sind in Kapitel 3.5.1 angegeben. Zu den unbehandelten Zellen und einer TGF-β1-behandelten Probe wurde kein E64 zugegeben (Kontrollproben).

Die Zellsuspensionen wurden auf die Matrigel®-beschichteten *Transwell*-Kammern aufgetragen und 24 h bei 37 °C in einem Zellkulturbrutschrank inkubiert. Danach wurden die *Transwell*-Kammern aus den Vertiefungen der 24-Loch-Platte entfernt und die Zellzahlen in dem Bereich unterhalb der Einsätze gezählt.

2.1.5 Durchflusszytometrische Analysen

Mit Hilfe eines Durchflusszytometers können einzelne Zellen hinsichtlich ihrer physikalischen Eigenschaften, wie Größe oder Granularität sowie ihrer Immunreaktivität nach Markierung der Zielantigene mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern charakterisiert werden. Die Zellen werden in einer Suspension mit Überdruck nacheinander durch eine Messkammer geleitet, in der sie von einem fokussierten Laserstrahl beleuchtet werden. Durchquert eine Zelle den Strahl, wird Laserstrahl abgelenkt und in verschiedene Richtungen gestreut (Streulicht). Gemessen wird das Streulicht in zwei Winkeln wobei eine Ablenkung bis zu 10° Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) genannt wird und Auskunft über die Größe der analysierten Zellen erteilt. Das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) wird etwa 90° zum Laserstrahl gemessen und liefert Informationen über die Granularität der Zellen.

Durch den Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe bzw. fluoreszenzmarkierter Antikörper, die durch Laserlicht angeregt werden, ist es möglich Protein-Antigene, Nukleinsäuren oder intrazelluläre Stoffwechselvorgänge zu detektieren. Diese zunächst optischen Signale werden in elektrische Pulse konvertiert, verstärkt und als digitale Messdaten im Computer verarbeitet. Die Auswertung der Messergebnisse ist in Form einer Einparameter- oder Zweiparameterdarstellung möglich. Die Zweiparameterdarstellung zeigt die Relation zweier Eigenschaften einer Zelle zueinander an, z.B. von FSC und SSC oder von Grün- und Rotfluoreszenz. So ist beispielsweise im Zweiparameter-Punkthistogramm von FSC und SSC die Differenzierung von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten möglich. Die einparametrische Histogramm-Analyse findet Anwendung in der DNA-Analyse und der Einfarbenimmunfluoreszenz.

- **CD14-Messung auf der Oberfläche von myelo-monozytären Zellen und humanen peripheren Blutmonozyten**

Lipo**p**oly**s**accharid (LPS, Endotoxin) ist ein Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien und verursacht im Menschen die Induktion der Entzündungskaskade. Der Lipopolysaccharid-Rezeptor (LPS-Rezeptor) CD14 wird auf myelo-monozytären Zelllinien unterschiedlich stark exprimiert, und unterliegt der Expressionsregulation durch LPS und Zytokine. Die CD14-Expression auf den Zelloberflächen der myelo-monozytären Zelllinien MonoMac-6 und THP-1 wurde mit Hilfe eines FITC-konjugierten (**F**luoresceinisothio**c**yanat) anti-human-CD14 Antikörpers durchflusszytometrisch untersucht. Hierfür wurden 2 x 10^6 Zellen/3 ml IMDM-FA-Medium in 6-Loch-Platten ausgesät, und 48 h (THP-1-Zellen) bzw. 72 h (MonoMac-1-Zellen) bei 37 °C und 5 % CO_2 mit 100 ng/ml LPS aus *E. coli* (O111:B4, Sigma®) und 20 ng/ml TGF-β1 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, 1 x 10^6 Zellen wurden 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert, das Zellpellet in 10 ml PBS/10 % FCS gewaschen, 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert, in 100 µl PBS resuspendiert und mit 15 µl FITC-konjugiertem anti-human-CD14 monoklonalen Antikörper (BD-Bioscience) 30 Minuten bei 4 °C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS/10 % FCS gewaschen, 10 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert und in 500 µl Fixativ (1 % Paraformaldehyd in 1X PBS) resuspendiert. Als Isotypkontrolle diente IgG1-FITC (BD Bioscience). Die Zellen wurden im Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm analysiert und ihre mittlere Fluoreszenzintensität (*mean*-Werte) ausgewertet.

2.1.6 Analyse der Apoptose-Raten von THP-1-Zellen durch TUNEL-Färbung

Beim programmierten Zelltod kommt es zur chromosomalen DNA-Fragmentierung. Das Prinzip der TUNEL-Färbung (***T**erminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-d**U**TP **N**ick **E**nd **L**abeling*) besteht in der enzymatischen Anlagerung von bromiertem Desoxyuridintriphosphat (Br-dUTP) an die freien 3´-OH-Enden der DNA-Strangbrüche durch die Terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT). Die so markierten DNA-Strangbrüche wurden mit einem FITC-markierten Anti-BrdU-mAK identifiziert, gleichzeitig wurde die Gesamt-DNA mit Propidiumjodid (PJ) gefärbt. Für diese Methode wurde der APO-BRDU™-Test der Firma BD Bioscience verwendet.

Für den Versuch wurden 1 x 10^6 THP-1-Zellen/3 ml IMDM-FA-Medium in 6-well-Platten ausgesät, und 48 h mit und ohne 20 ng/ml TGF-β1 sowie unter Abwesenheit bzw. Zugabe des membrangängigen Kathepsin-Inhibitors E64d inkubiert (Konzentrationsangaben in Kap. 3.5.3). Anschließend wurden jeweils 1 x 10^6 Zellen geerntet, abzentrifugiert (5 Minuten, 300 x g) in 0,5 ml PBS resuspendiert und nach den Angaben des Hersteller fixiert und markiert.

Im Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson) wurde die FITC-Fluoreszenz (bei 525 nm) als Indikator für den Anteil fragmentierter DNA sowie die PJ-Fluoreszenz (Propidiumjodid bei 623 nm) als Maß für die gesamte DNA bei einer Anregung durch 488 nm, analysiert.

2.1.7 Transiente Transfektion von THP-1-Zellen mit Promotorkonstrukten und Intronfragmenten des Kathepsin B-Gens und Messung der Luziferase-Aktivität

Um zu analysieren, ob die klonierten Promotor- und Intronbereiche des Kathepsin B-Gens nach TGF-β1-Behandlung die verstärkte Expression eines nachfolgenden Gens induzieren, wurden die Fragmente in den *Firefly*-Luziferase Reportergen-Vektor pGL-3B (Promega) vor den Reportergenabschnitt kloniert (Kap. 2.2.2) und in THP-1-Zellen transfiziert.

Zur Normierung der Transfektionseffizienz wurde in alle Proben auch der Kontrollvektor pRL-TK (Promega) transfiziert. Dieser Vektor exprimiert durch die permanente Aktivität des vorgeschalteten humanen Thymidinkinase-Promotors konstitutiv *Renilla*-Luziferase.

Die Fähigkeit der Test-Konstrukte die Transkription nachfolgender Gene zu induzieren, wurde hier durch die Aktivitätsintensität des Reporterproteins *Firefly*-Luziferase widergespiegelt.

Es wurden 0,3 x 10^6 Zellen in einem Volumen von 2 ml in die Vertiefungen einer 12-Loch Platte eingesät und 16 h (über Nacht) im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Je Testkonstrukt wurden für eine Inkubation mit und ohne TGF-β1 immer zwei Vertiefungen bestückt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Transfektionskomplex aus 50 µl FCS-freien IMDM-A Zellkulturmedium, 2,85 µg Testplasmid, 0,150 µg Vektor pRL-TK (insgesamt 3 µg DNA, im Verhältnis 20:1) sowie 15 µl Metafectene™-Transfektionsreagenz (Biontex) 6 h inkubiert. Die Zugabe, Mischung und Inkubation der Komponenten erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Biontex). Danach wurde das Transfektionsmedium durch frisches IMDM-FA Medium ersetzt und die Zellen zur Regeneration über Nacht im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Nach anschließender 12-stündiger TGF-β1-Inkubation wurden die Zellen geerntet, 1 x mit 1X PBS gewaschen und mit jeweils 250 µl PLB-Puffer (Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega) lysiert. Für die Lumineszenz-Messungen im Luminometer wurden jeweils 30 µl eingesetzt.

Die Analyse der Luziferase-Aktivitäten erfolgte durch Lumineszenz-Messungen im Luminometer Lumat LB 9507 von Berthold Technologies unter Verwendung des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems (Promega) nach den Angaben der Hersteller. Dabei wurde nacheinander das Substrat zur Messung der *Firefly*-Luziferase-Aktivität (Test-Vektoren) und, nach Messung der entstandenen Lumineszenz und gleichzeitigem Quenchen der *Firefly*-Luziferase-Lumineszenz, das Substrat der *Renilla*-Luziferase (Kontroll-Vektor) auf die Proben injiziert. Zur Normierung wurde das Verhältnis aus *Firefly*-Lumineszenz und *Renilla*-Lumineszenz errechnet.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Quantitative RT-PCR-Analysen

Um die Konzentration eines spezifischen mRNA-Transkriptes quantitativ zu bestimmen wurde in einem ersten Schritt der gesamte RNA-Pool einer Zellpopulation isoliert. Anschließend wurde eine reverse Transkriptionsreaktion durchgeführt, wobei Hexamer-Oligonukleotide (*Primer*) mit zufälliger Sequenz als *Primer* verwendet wurden. Sie banden zufällig an die RNA-Moleküle. So entstanden nach der reversen Transkriptionsreaktion mittels Reverser Transkriptase (RT), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, unterschiedlich lange komplementäre DNA-Produkte (cDNA) als Hybridmoleküle aus RNA und DNA. cDNA wurde anschließend zur quantitativen

Amplifizierung eines Zielmoleküls durch den Einsatz spezifischer Oligonukleotide in der PCR-Reaktion (***P**olymerase **C**hain **R**eaction*) verwendet. Quantitative RT-PCR-Analysen basieren auf der Detektion fluoreszierender Reportermoleküle deren Signale parallel zur zunehmenden Menge an Doppelstrang-DNA, mit jedem Amplifikationsschritt im Verlauf der PCR-Reaktion ansteigen. Mit Hilfe dieser Methode war es möglich, indirekt in zwei Schritten, nach reverser Transkription und quantitativer PCR-Analyse die mRNA-Menge eines Gens in einer Zellpopulation unter Mitführung von Standard-Vektoren zu quantifizieren. Standard-Vektoren enthielten das jeweilige Fragment, welches während der quantitativen PCR-Reaktion in den Test-Proben amplifiziert wurde. Es wurde vorher durch Verwendung der gleichen Oligonukleotide aus cDNA durch eine konventionelle PCR-Reaktion amplifiziert und anschließend in einen Klonierungsvektor ligiert.
Zur Quantifizierung wurden bekannte Ausgangskonzentrationen der Standard-Vektoren mit den zu amplifizierenden cDNA-Produkten zur automatischen Erstellung einer Eichkurve während der quantitativen RT-PCR-Reaktion mitgeführt.

2.2.1.1 Gesamt-RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllinien wurde der NucleoSpin®RNA II Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Es wurden jeweils 2 x 10^6 Zellen/3 ml in den Kavitäten von 6-Loch-Platten für die Vorbehandlung mit den jeweiligen Substanzen und als unbehandelte Kontrollproben eingesetzt. A-549-Zellen wurden 16 h im Zellkulturinkubator zur Adhäsion vorinkubiert. Die Vorbehandlung der Zellen mit den entsprechenden Substanzen ist im Ergebnisteil beschrieben. Die zu analysierenden Zellproben wurden geerntet und 1 x mit 5 ml PBS gewaschen. Das Zellsediment wurde mit 400 µl RLT-Puffer/0,1 % β-Mercaptoethanol lysiert. Die weitere Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers durch spezifische Bindung an eine Silikat-Säule, während DNA und Proteine ausgewaschen wurden. Durch die im Kit mitgelieferte DNase I konnten an die Säule gebundene DNA-Reste eliminiert werden. Die Elution der reinen RNA von der Säule erfolgte durch 30 µl DNase-/RNase-freies Wasser.
Die Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm mit dem GeneQuant™ *pro*-Spektrophotometer (Amersham Bioscience) gegen Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser in einer Quarzküvette. Das Verhältnis der optischen Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm gibt eine Aussage über die Proteinkontaminationen in der aufgereinigten RNA-Lösung. Die für die weiteren Untersuchungen verwendete reine RNA musste ein OD_{260}/OD_{280}-Verhältnis von 1,8-2,0 haben.

2.2.1.2 Reverse Transkription

Für Genexpressionsstudien wurde die isolierte RNA in komplementäre DNA (cDNA) revers transkribiert. Dazu benutzt man die ursprünglich aus Viren isolierte Reverse Transkriptase (RT), die im Gegensatz zu sämtlichen Säuger-Polymerasen RNA in DNA umschreiben kann.
Die reverse Transkriptionsreaktion (cDNA-Synthese) erfolgte mit der Moloney-Murine-Leukemia-Virus Reversen Transkriptase (M-MLV Reverse Transcriptase, Promega) unter

Verwendung von pd(N)$_6$ *Hexamer Random Primers* (Roche). Die Durchführung dieser Reaktion ist nachfolgend dargestellt.

Tab. 2: Stammlösungen, Volumina und Konzentrationen für die reverse Transkription von Gesamt-RNA.

Volumen/Menge Stammlösung	Konzentration Stammlösung	Konzentration/Menge im Ansatz
1 µg Gesamt-RNA	variabel	1 µg
0,5 µl pd(N)$_6$-*Primer*	1,3 µg/µl	24 ng/µl (0,6 µg)
ad 15 µl RNase freies H_2O	-	-

Die Mischung aus Gesamt-RNA und *Primer* wurde zur Aufschmelzung der RNA-Sekundärstrukturen 5 Minuten bei 70 °C inkubiert, anschließend auf Eis abgekühlt wobei die Rückbildung von RNA-Sekundärstrukturen verhindert und die Bindung der Oligonukleotide an RNA ermöglicht wurde. Anschließend wurden pro Ansatz 10 µl Master-Mix-Reaktionslösung, wie in Tabelle 3 gezeigt, hergestellt. Sämtliche Reagenzien wurden von der Firma Promega erworben.

Tab. 3: Stammlösungen, Volumina und Konzentrationen für die reverse Transkription von Gesamt-RNA.

Volumen Stammlösung	Konzentration Stammlösung	Konzentration/Menge im Ansatz
5 µl M-MLV Reaktionspuffer	5X	1X
2 µl PCR-Nucleotide Mix	10 mM	0,8 mM
0,6 µl RNasin® Ribonuclease Inhibitor	40 U/µl	25 U
1 µl M-MLV RT	200 U/µl	200 U
1,4 µl DNase-/RNase-freies H_2O	-	-

Die Master-Mix-Reaktionslösung wurde zur gekühlten RNA/*Primer*-Lösung pipettiert, gevortext und 1 h bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.3 Amplifizierung und gleichzeitige Quantifizierung spezifischer cDNA-Produkte

Für die spezifische Amplifizierung und quantitative Analyse von cDNA-Produkten wurde das ABI PRISM® 7000 *Sequence Detection System* von Applied Biosystems verwendet. Es wurden mRNA-Expressionsanalysen von Kathepsin B, Kathepsin L, Kathepsin K, Kathepsin S, TGF-β1-Rezeptor Typ II, TGF-β1-Rezeptor Typ I-ALK1, TGF-β1-Rezeptor Typ I-ALK2 und TGF-β1-Rezeptor Typ I-ALK5 durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sowie die Länge der entstandenen PCR-Produkte sind in Tabelle 4 dargestellt. Die *Primer* wurden so ausgewählt, dass die Endproduktlänge zwischen 200 bp und 700 bp lag und mehrere Exons überspannten. Zur Kontrolle, dass die reverse Transkription in allen Proben einheitlich verlief, wurde bei jeder Versuchsreihe β-Aktin als *housekeeping*-Gen analysiert.

Tab. 4: *Primer*-Sequenzen zur Amplifikation der Ziel-cDNA.

Ziel-cDNA	*Primer*-Sequenz	PCR-Produkt
Kathepsin B	**forward 5`-GCCTGCAAGCTTCGATGCAC-3`** **reverse 5`-ATCATCTCTCCGGTGACGTGT-3`**	584 bp
Kathepsin L	**forward 5`-CAGGCAGGTGATGAATGGCT-3`** **reverse 5`-CAGGCCTCCATTATCCTGAA-3`**	324 bp
Kathepsin K	**forward 5`-GAACCGGGGTATTGACTCT-3`** **reverse 5`-CAGGCGTTGTTCTTATTTC-3`**	381 bp
Kathepsin S	**forward 5`-CATGGATCTGAAATGTCAATA-3`** **reverse 5`-TGGATACAGCAGGAAAAAT-3`**	448 bp
TβRII	**forward 5`-ACAGCTTATCCTATGACAATG-3`** **reverse 5`-CTCCCTAAACACTACCAAAT-3`**	236 bp
TβRI-ALK1	**forward 5`-CACAGCGAGCTGGGAGAGTC-3`** **reverse 5`-GCGGACACAGCTAGCCTCAG-3`**	458 bp
TβRI-ALK2	**forward 5`-TTAAAAGGCGCAACCAAGA-3`** **reverse 5`-CGTACAACGATCCCATTTCA-3`**	432 bp
TβRI-ALK5	**forward 5`-AGATGGGCTCTGCTTTGTCT-3`** **reverse 5`-GACCTTTGCCAATGCTTTCT-3`**	494 bp
β-Aktin	**forward 5`-GGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3`** **reverse 5`-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG-3`**	661 bp

Für die quantitativen PCR-Analysen wurde der QuantiTect™ SYBR® Green PCR-Kit von Qiagen verwendet. Die 2X Master Mix Lösung dieses Kits besteht aus PCR-Puffer, dNTPs, HotStarTaq™ DNA Polymerase, QuantiTect SYBR® Green (fluoreszierender Reporterfarbstoff), ROX (passiver Referenz-Fluoreszenzfarbstoff) und $MgCl_2$. Die PCR-Ansätze wurden nach dem Schema in Tabelle 5 angesetzt.

Tab. 5: Stammlösungen, Konzentrationen und Volumina in den PCR-Ansätzen zur quantitativen PCR-Analyse von Ziel-cDNA.

Volumen Stammlösung	Konzentration Stammlösung	Konzentration im Ansatz
24,8 µl Quantitect SYBR® Green PCR Master Mix	2X	1X
2,9 µl forward-*Primer*	5 pmol/µl (µM)	0,3 pmol/µl (µM)
2,9 µl reverse-*Primer*	5 pmol/µl (µM)	0,3 pmol/µl (µM)
2,7 µl cDNA	-	-
16,4 µl DNase-/RNase-freies H_2O	-	-

Aus diesem Ansatz wurden 3 x je 15 µl in die Kavitäten einer 96-Loch-Platte (ABI PRISM™ *Optical 96-Well Reaction Plates*, Applied Biosystems) pipettiert und einer quantitativen PCR-Analyse unterzogen. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tab. 6: Zyklen, Dauer und Temperaturbedingungen zur quantitativen Amplifikation spezifischer cDNA-Produkte.

Zyklus	Dauer	Temperatur
Polymerase-Aktivierungsschritt	15 min	95 °C
Denaturierung	15 s	94 °C
Annealing	30 s	60 °C
Elongation	30 s	72 °C
Anzahl Zyklen	40	-

Zur Quantifizierung wurde in jedem RT-PCR-Lauf 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-5} und 10^{-6} µg/ml des jeweiligen Standard-Vektors zur Erstellung der Standardkurve mitgeführt. Die Messung der Fluoreszenz des DNA-spezifischen SYBR® Green und des Kontrollfluorochroms ROX erfolgte am Ende jedes Elongationszyklusses. Um kleinere Unregelmäßigkeiten zwischen einzelnen Kavitäten der Testplatte und bei der Probenvorbereitung auszugleichen, wurde die DNA-abhängige SYBR® Green-Fluzoreszenzintensität auf die Fluoreszenz-Intensität des Farbstoffes ROX normiert.
Die RT-PCR Produkte wurden immer in einem Agarose-Gel analysiert, um die korrekte Länge der Amplifikate zu überprüfen.

2.2.2 Klonierung von Kathepsin B-Promotorfragmenten, des ersten Kathepsin B-Introns und Intronfragmenten in den *Renilla*-Luziferasevektor pGL-3B

2.2.2.1 Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA wurde der NucleoSpin® Tissue-Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Es wurden 10 x 10^6 Zellen nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Die aufgereinigte, genomische DNA wurde in 500 µl DNase-/RNase-freiem H_2O aufgenommen und bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.2.2 Prinzip der Klonierung von spezifisch amplifizierten PCR-Produkten

Nach der spezifischen Amplifizierung genomischer Zielbereichen wurde die Größe der entstandenen PCR-Produkte durch Auftrennung in einem Agarose-Gel überprüft. Anschließend wurden die PCR-Produkte aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin® Extract-Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.
HotStarTaq® DNA-Polymerase fügt den Enden vollständig amplifizierter Fragmente einen Desoxyadenosin-Anhang hinzu. Dadurch konnten die Fragmente in die mit endständigen Desoxythymidin-Überhängen ausgestatteten Klonierungsvektoren pGEM®-T-Easy (3015 bp, Ampicillinresistenz, Promega), sowie pCR®II-TOPO® (4000 bp, Ampicillin- und Kanamycinresistenz, Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers ligiert werden. Anschließend wurden die Konstrukte in die chemisch kompetenten Bakterien *E. coli One Shot*® TOP10 (Invitrogen) nach den Hersteller-Protokollen transformiert und auf agarbeschichteten Petrischalen unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika über Nacht angezüchtet. Es wurden dann jeweils 20 Einzelkolonien mittels PCR-Reaktionen mit den entsprechenden

Oligonukleotiden auf die Anwesenheit des gewünschten Konstruktes analysiert. Von positiv reagierenden Klonen wurden 2 ml 16 h-Kulturen angezogen, Plasmid-Mini-Präparationen (NucleoSpin® Plasmid, Macherey Nagel) durchgeführt, die DNA-Konzentrationen photometrisch bestimmt und einer analytischen Restriktion durch entsprechende Restriktionsenzyme (Fermentas) unterzogen. Lieferte die Restriktion ein positives Ergebnis, wurden die Plasmide erneut durch Restriktion geschnitten, im Agarose-Gel aufgetrennt, die entsprechenden Fragmente ausgeschnitten, aufgereinigt in den durch die gleichen Restriktionsenzyme behandelten pGL-3B-Vektor nach Vorgaben des Herstellers ligiert (T4 DNA Ligase, Promega), und zur Sequenz-Analyse eingeschickt (Firma GATC). Anschließend wurden zur Endotoxinentfernung sowie zur Erzielung einer hohen Plasmid-Ausbeute Plasmid-Maxi-Präparationen (*EndoFree* Plasmid Maxi Kit, Qiagen) durchgeführt.
Zur Amplifizierung der gewünschten Promotorfragmente und Intronkonstrukte des Kathepsin B-Gens wurden PCR-Reaktionen mit entsprechenden spezifischen Oligonukleotiden (Tab. 7) auf genomischer DNA durchgeführt.

Tab. 7: *Primer*-Sequenzen zur Amplifikation der Promotorfragmente Luc2,6, Luc4,3, der Vorläuferfragmente für Luc7,35, des 1. Introns und der Fragmente Del-669bp und Del-1712bp. Restriktionsendonukleasen und deren Schnittstellen sind unterstrichen.

Fragment	*Primer*-Sequenz		PCR-Produkt
Luc2,6	**Fwd-Prom4** **Rev-KBProm1-Bgl II**	**5`-AAAGAGCTCGCAATGGCGTGATCTCGGCTCACTA-3`** **5`-AAAAGATCTCCCGGGTCCCCAGCACTCAC-3`**	2695 bp
Luc4,3	**Fwd-KBProm2** **Rev-KBProm1-Bgl II**	**5`-AAAGAGCTCTCACACCACAGAAAGGGAGCTGTCG-3`** **5`-AAAAGATCTCCCGGGTCCCCAGCACTCAC-3`**	4369 bp
3kb	**Fwd-KBProm-7,35** **Rev-KBProm-3kb1**	**5`-TCACAGACAGCGAAGTCAAATTTACTACCT-3`** **5`-CCTTCTTCTTCCTCCCGACAGCTCCCTTTC-3`**	3042 bp
4kb	**Fwd-KBProm2** **Rev-KBProm3-1**	**5`-TCACACCACAGAAAGGGAGCTGTCG-3`** **5`-GCCCCGGGTCCCCAGCACTCACC-3`**	4351 bp
3kb1-Mlu-Aat	**Fwd-KBProm7,35-Mlu I** **Rev-KBProm4243-Aat II**	**5`-AAAACGCGTTCACAGACAGCGAAGTCAAATTTACTACCT-3`** **5`-CCGACGTCTCCCTTTCTGTG**	3038 bp
4kb-Aat-Bgl	**Fwd-KBProm4240-Aat II** **Rev-KBProm3-Bgl II**	**5`-CACCACAGAAAGGGAGACGTC-3`** **5`-AAAAGATCTGCCCCGGGTCCCCAGCACTCACC-3`**	4358 bp
Intron1	**Fwd-KB-Ex1A-Mlu I** **Rev-KB-Ex2-Xho I**	**5`-AAAACGCGTGCTGGGCTGCAGGCTCTC-3`** **5`-AAACTCGAGTCGCTTACATCTGGGTGGCT-3`**	3648 bp
Del-669bp	**FWD-Intron-int1-Mlu I** **Rev-KB-Ex2-Xho I**	**5`-ACGCGTGCGAATGGGCGATTGGAT-3`** **5`-AAACTCGAGTCGCTTACATCTGGGTGGCT-3`**	2974 bp
Del-974bp	**FWD-Intron-int2-Mlu I** **Rev-KB-Ex2-Xho I**	**5`-*ACGCGT*GCCCCACACTCCTCCTCCTA-3`** **5`-AAACTCGAGTCGCTTACATCTGGGTGGCT-3`**	2670 bp
Del-1712bp	**FWD-Intron-int2a-Mlu I** **Rev-KB-Ex2-Xho I**	**5`-ACGCGTCAACTGGTTAGGCGGTGAGG-3`** **5`-AAACTCGAGTCGCTTACATCTGGGTGGCT-3`**	1932 bp

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen sind in den Tabellen 8 und 9 angegeben. Zur Amplifizierung der Zielfragmente mittels PCR wurde der HotStarTaq®-Kit von Qiagen verwendet.

Tab. 8: Stammlösungen, Konzentrationen und Volumina in den PCR-Ansätzen zur Amplifizierung der Promotorfragmente Luc2,6, Luc4,3, der Vorläuferfragmente für Luc7,35, des 1. Introns und der Fragmente Del-669bp und Del-1712bp.

Volumen/Menge Stammlösung	Konzentration Stammlösung	Konzentration/Menge im Ansatz
5 µl PCR-Puffer	10X	1X
10 µl Q-Lösung	5X	1X
1 µl dNTP-Mix	10 mM	200 µM
1 µl *forward- Primer*	50 pmol/µl (µM)	1 pmol/µl (µM)
1 µl *reverse- Primer*	50 pmol/µl (µM)	1 pmol/µl (µM)
0,5 µl HotStarTaq® DNA-Polymerase	250 U	2,5 U
3 µg genomische DNA	Variabel	3 µg
Ad 50 µl DNase-/RNase-freies H_2O	-	-

Tab. 9: Zyklen, Dauer und Temperaturbedingungen zur Amplifikation der Promotorfragmente Luc2,6, Luc4,3, der Vorläuferfragmente für Luc7,35, des 1. Introns und der Fragmente Del-669bp und Del-1712bp.

Zyklus	Dauer	Temperatur
Polymerase-Aktivierungsschritt	15 Minuten	95 °C
Denaturierung	30 s	94 °C
Annealing	30 s	60 °C
Elongation	1 min/kb DNA	72 °C
Anzahl Zyklen	35	-

2.2.2.3 Klonierung von Luc2,6 und Luc4,3 in den Luziferase-Reportergen-Vektor pGL-3B

Die Ziel-Promotorbereiche des Kathepsin B-Gens wurden durch die in Tabelle 7 angegebenen Oligonukleotide amplifiziert und in den Klonierungsvektor pGEM®-T-Easy (Promega) kloniert. Sie enthielten die Bereiche von -2531 bis +146 (Luc2,6) und -4205 bis +146 (Luc4,3) in Bezug auf den Transkriptionsstart (+1). Nach Doppel-Restriktion dieses Plasmids mit den Enzymen Mlu I (Schnittstelle im Vektor) und Bgl II (Schnittstelle im *reverse Primer*) wurden die Kathepsin B-Promotorfragmente in den mit den gleichen Enzymen behandelten Luziferase-Vektor pGL-3B ligiert um die Konstrukte pLuc2,6 und pLuc4,3 zu generieren.

2.2.2.4 Konstruktion des Plasmids pLuc7,35

Der 7353 bp lange Kathepsin B-Promotorbereich (bis +148) wurde aus zwei Konstrukten zusammengesetzt, die durch PCR-Reaktionen auf genomische DNA aus THP-1-Zellen amplifiziert wurden. Das *upstream* liegende Konstrukt („3kb“, 3042 bp) enthält den Bereich von -7207 bis -4166 in Bezug zum Transkriptionsstart. Der vorwärts-*Primer* des *downstream*-Konstruktes („4kb“, 4353 bp, -4205 bis +146) wurde so gewählt, dass sich die beiden Fragmente über einen Bereich von 40 bp überlappten (-4205 bis -4166). Die beiden Konstrukte wurden jeweils in den Vektor pGEM®-T-Easy ligiert. In Abbildung 5 sind die Überlappungsbereiche angegeben wobei die *Primer*-Sequenzen in Grossbuchstaben dargestellt sind.

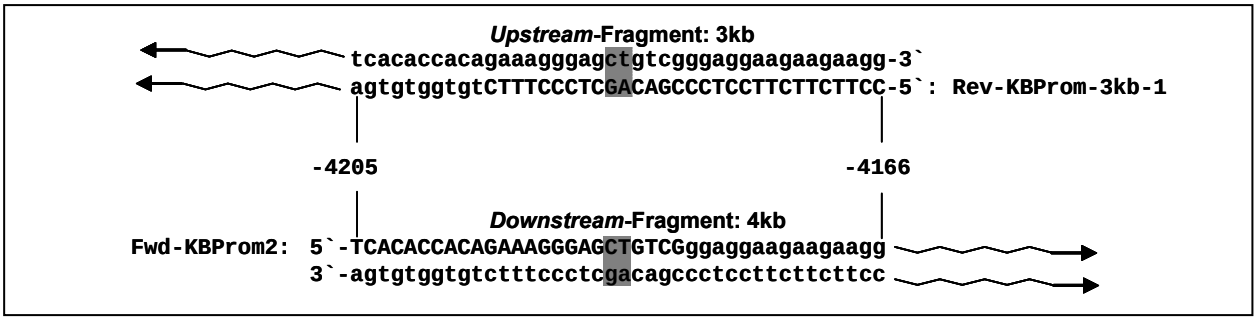

Abb. 5: Amplifizierung der Promotor-Teilstücke „3kb" und „4kb" zur Klonierung in den Vektor pGEM®-T-Easy. Abgebildet ist der Überlappungsbereich der beiden Teilstücke. Die *Primer*-Sequenzen sind in Großbuchstaben dargestellt. Grau unterlegt sind Nukleotide die mutiert werden mussten, um terminale Überlappungssequenzen (Aat II-Schnittstelle) zur Zusammenfügung der Teilkonstrukte zu erzeugen.

Für eine anschließende PCR-Reaktion auf die Plasmide wurden die Nukleotidsequenz der Oligonukleotide um zwei Basenpaare verändert, so dass im *upstream*-Fragment („3kb-Mlu-Aat") im 3`-Bereich und im *downstream*-Fragment („4kb-Aat-Bgl") im 5`-Bereich jeweils eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Aat II entstand (Abb. 5 und 6 grau unterlegt). Die Nukleotide „CT" sollten in die Nukleotidabfolge „AC" mutiert werden um die Aat II-Schnittstelle zu generieren. Das Fragment „3kb-Mlu-Aat" besaß am 5´-Ende eine Mlu I-Schnittstelle (im *Primer*) und wurde in den Vektor pCR®II-TOPO® ligiert während das „4kb-Aat-Bgl"-Promotorteilstück in den Vektor pGEM®-T-Easy kloniert wurde und am 3`-Ende eine Bgl II-Erkennungssequenz trug (im *Primer*).

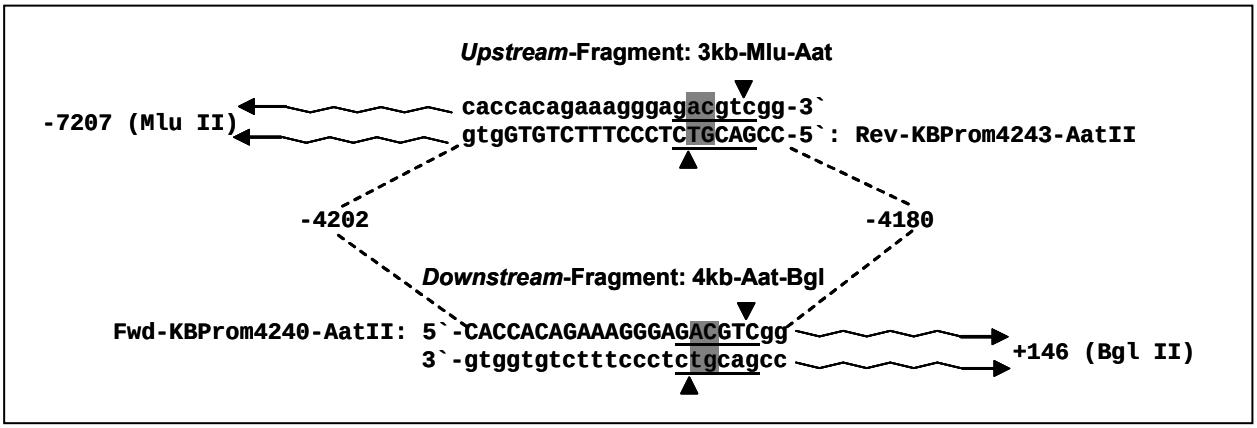

Abb. 6: Amplifizierung der Promotor-Teilstücke „3kb-Mlu-Aat" und „4kb-Aat-Bgl" zur Klonierung in die Vektoren pCR®II-TOPO® bzw. pGEM®-T-Easy. Abgebildet ist der Überlappungsbereich der beiden Teilstücke nach der Mutation der grau unterlegten Nukleotide von „CT" nach „AC" zur Generierung einer Aat II-Schnittstelle. Die *Primer*-Sequenzen sind in Großbuchstaben dargestellt. Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym Aat II ist unterstrichen, die Schnittstellen sind mit Pfeilen markiert.

Die beiden Plasmide p3kb-Mlu-Aat (im Vektor pCR®II-TOPO®) und p4kb-Aat-Bgl (im Vektor pGEM®-T-Easy) wurden mit den Restriktionsenzymen Mlu II/Aat II beziehungsweise Aat II/Bgl II geschnitten. Durch die Behandlung mit den Endonukleasen Mlu II/Bgl II erhielt auch der Luziferase-Vektor pGL-3B entsprechende terminale Überlappungssequenzen. Zur Generierung des vollständigen 7353 bp großen Promotorfragmentes wurden die beiden geschnittenen, aufgereinigten Teilstücke „3kb-Mlu-Aat" und „4kb-Aat-Bgl" sowie der entsprechend verdaute

Luziferase-Vektor pGL-3B in einen Ligationsansatz zusammengeführt. Das entstandene Plasmid pLuc7,35 wurde mittels Restriktion mit verschiedenen Endonukleasen sowie durch Sequenzierung charakterisiert. Anschließend erfolgte eine Plasmid-Maxi-Präparation mit der THP-1-Zellen transfiziert wurden um die Promotoraktivität zu analysieren (Kap. 2.1.7).

2.2.2.5 Klonierung des ersten Introns sowie der Intronfragmente in den Luziferase-Reportergen-Vektor pGL-3B

Zur Amplifizierung der ersten Kathepsin B-Intronfragmente wurden die in Tabelle 7, (Kap. 2.2.2.2) angegebenen *Primer* verwendet um PCR-Reaktionen auf genomische DNA von THP-1-Zellen durchzuführen. Das entstandene Fragment wurde zuerst in den Klonierungsvektor pGEM®-T-Easy ligiert und anschließen nach Restriktion mit Enzymen Mlu I und Xho I (Schnittstellen in den *Primer*) in den entsprechend behandelten pGL-3B umkloniert (pIntron1). Die Kathepsin B-Intronfragmente pDel-669bp, pDel-974bp und pDel-1712bp wurden durch PCR-Reaktionen auf pIntron1 unter Verwendung von den in Tabelle 7, (Kap. 2.2.2.2) angegebenen *Primer* erzeugt und erst in den Vektor pCR®II-TOPO® ligiert. Anschließend erfolgte wiederum die Umklonierung in den Luziferase-Vektor pGL-3B nach Restriktion der Fragmente und des Vektors mit den Restriktionsendonukleasen Mlu I und Xho I.

2.2.3 Analyse der Kathepsin B mRNA-Stabilität und -Neusynthese

Ein erhöhter mRNA-Spiegel eines bestimmten Gens nach Inkubation mit einem Stimulus kann sowohl durch erhöhte Stabilisierung des Transkriptes als auch durch erhöhte Neusynthese verursacht werden.

Zur Analyse der Kathepsin B mRNA-Stabilität wurde Actinomycin D eingesetzt. Diese Substanz wird aus Streptomyzeten isoliert und bindet spezifisch an doppelsträngige DNA wobei die Transkription verhindert wird. Actinomycin D wird deshalb als Inhibitor der RNA-Synthese in Eukaryotenzellen verwendet. Ab dem Applikationszeitpunkt kann keine Transkription mehr stattfinden. Durch quantitative RT-PCR können nur bereits synthetisierte mRNA-Moleküle detektiert werden.

Um die Transkriptionseffizienz eines Genes zu analysieren, werden intakte Kerne stimulierter sowie unbehandelter Zellen isoliert und eine *in vitro*-Transkription (*nuclear runoff*-Experimente) durchgeführt. Durch die anschließende quantitative RT-PCR-Analyse werden nur die neu synthetisierten mRNA-Moleküle erfasst.

2.2.3.1 Analyse der Kathepsin B mRNA-Stabilität nach TGF-β1-Inkubation durch Behandlung mit Actinomycin D

1 x 10^6 THP-1- und MonoMac-6-Zellen in 2 ml IMDM-FA-Medium wurden zwei bzw. drei Tage in den Kavitäten von 6-Loch-Platten mit 20 ng/ml TGF-β1 sowie ohne Stimulus inkubiert. Anschließend wurde 20 µg/ml Actinomycin D (Sigma®) zugesetzt. Zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 4 h, 6 h (nur THP-1-Zellen) und 8 h wurden die Zellen geerntet, gewaschen, pelletiert und die Gesamt-RNA isoliert (NucleoSpin®RNA II Kit, Macherey-Nagel).

1 µg Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und die Kathepsin B mRNA-Menge quantitativ

analysiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte, mit Actinomycin D behandelte Zellen und der Wert zum Zeitpunkt 0 h der Actinomycin D-Applikation wurde als Startwert gleich 100 % gesetzt.

2.2.3.2 Analyse der Kathepsin B mRNA-Neusynthese nach TGF-β1-Inkubation durch nuclear runoff-Analysen

Für diese Versuche wurden 10 x 10^6 THP-1- und MonoMac-6-Zellen in 20 ml IMDM-FA-Medium eingesät (25 cm^2 Zellkulturflaschen, Nunc™) und zwei Tage (THP-1-Zellen) bzw. drei Tage (MonoMac-6-Zellen) mit 20 ng/ml TGF-β1 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, die Zellkerne isoliert und die *nuclear runoff*-Experimente durchgeführt. Das zugrunde liegende Protokoll wurde von Greenberg et al. [77] entwickelt und hier mit einigen Modifikationen angewendet.

- **Isolierung intakter Zellkerne**
  - THP-1- und MonoMac-6-Zellen ernten
  - 5 Minuten bei 300 x g, 4 °C zentrifugieren und Zellkulturüberstand verwerfen
  - Zellpellet in eiskaltem PBS resuspendieren, auf 50 ml auffüllen und 5 Minuten bei 300 x g, 4 °C zentrifugieren (2 x)
  - Zellpellet durch vorsichtiges Vortexen auflockern
  - Zellpellet in 4 ml Lysepuffer resuspendieren (während der Pufferzugabe vorsichtig vortexen)
  - Lysat 5 Minuten auf Eis inkubieren
  - 5 Minuten zentrifugieren bei 4 °C, 300 x g, Überstand verwerfen (Zellkerne befinden sich im Pellet)
  - Pellet durch Vortexen in 4 ml eiskaltem Lysepuffer resuspendieren
  - 5 Minuten bei 4 °C, 300 x g zentrifugieren, Überstand verwerfen
  - Zellkerne in 50 µl eiskaltem Aufbewahrungspuffer aufnehmen.
  - 5 µl Kerne 1:10 in kaltem PBS verdünnen davon 20 µl mit Trypanblau (Sigma®) anfärben, zählen und jeweils 10 x 10^6 Kerne in 100 µl eiskaltem Aufbewahrungspuffer aufnehmen (Lagerung bei –80 °C möglich).

Die Unversehrtheit der Kerne wurde im Lichtmikroskop überprüft. Intakte Kerne verklumpen nicht und weisen keine zytoplasmatischen Strukturen auf. Das Verklumpen der Kerne deutet darauf hin, dass DNA austritt und die Kerne verklebt. Diese Kerne wurden für die *nuclear runoff*-Experimente nicht verwendet. Weiterhin wurde gewährleistet, dass die Kerne frei von zytoplasmatischen Strukturen sind, da diese den Eintritt der Nukleotide in den Zellkern verhindern.

- ***Nuclear runoff*-Experimente:**
  - 100 µl 2X Reaktionspuffer mit DTT in einer Endkonzentration von 5 mM und Nukleotiden (ATP, CTP, GTP, UTP, Amersham) je 1 mM Endkonzentration im Ansatz ergänzen
  - 10 x 10^6 Zellkerne (in 100 µl Aufbewahrungspuffer) zugeben
  - 30 Minuten bei 30 °C inkubieren und anschließend auf Eis stellen,
  - Gesamt-RNA-Isolierung (Kap. 2.2.1.1) und quantitative RT-PCR-Analyse (Kap. 2.2.1.3) nach Reverser Transkription (Kap. 2.2.1.2)

2.3 Biochemische und immunochemische Proteinanalysen

2.3.1 Kathepsin B- und Kathepsin L-Aktivitätsmessungen in THP-1-Zellen (Barrett et al. [78])

2.3.1.1 Anreicherung der lysosomalen/endosomalen Fraktion aus THP-1-Zellen zur Messung der Kathepsin B- und Kathepsin L-Aktivitäten

Für die Analyse der Enzymaktivitäten der Zysteinproteasen Kathepsin B und Kathepsin L in THP-1-Zellen wurde die lysosomale/endosomale Fraktion isoliert (Tournu et al. [79]). Dazu wurden 2 x 10^6 Zellen geerntet, in PBS gewaschen, in Lysepuffer für die Lysosomenaufarbeitung resuspendiert und 5 x durch eine 26-Gauge-Kanüle gezogen, um die Zellmembran mechanisch zu zerstören. Nach einem anschließenden 2-minütigen Zentrifugationsschritt bei 2000 x g wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und bei 70.000 x g 20 min / 4 °C zentrifugiert. Die Endosomen/Lysosomen im Zellsediment wurden danach vorsichtig in 250 µl 1:2,5 verdünntem Natriumacetatpuffer aufgenommen und einer Proteinbestimmung unterzogen (Micro BCA™ Protein Assay, Pierce Endogen).

2.3.1.2 Aktivitätsmessungen von Kathepsin B und Kathepsin L in Endosomen/Lysosomen von THP-1-Zellen

Für die Kathepsin B-Aktivitätsmessungen wurde das Substratdipeptid Z-Arg-Arg-AMC (N-benzyloxycarbonyl-Arginin-Arginin-7-Amido-4-Methylcoumarin, Bachem) eingesetzt. Zur Spezifitätskontrolle wurde die Aktivität in einem zusätzlichen Ansatz auch nach Zugabe von E64 (L-trans-epoxysuccinyl-leucyl-amido-(4-guanidino)-butane], Bachem), einem Kathepsin-Inhibitor, und CA-074 (L-3-trans-[Propylcarbamoyl]oxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline, Bachem), das die Kathepsin B-Aktivität hemmt, gemessen.

Die Bestimmung der Kathepsin L-Aktivität erfolgte durch Zugabe des Substrates Z-Phe-Arg-AMC (N-benzyloxycarbonyl-Phenylalanin-Arginin-7-Amido-4-Methylcoumarin, Bachem) wobei dieses Substrat auch von Kathepsin B gespalten werden kann. Deshalb wurde gleichzeitig Kathepsin B durch CA-074 inhibiert, so dass sichergestellt wurde, dass die gemessenen Aktivität auf Kathepsin L zurückzuführen war.

Durch die Spaltung der Substrate entsteht fluorogenes AMC (7-Amino-4-Methyl-Coumarin), dessen Fluoreszenz in schwarzen FluoroNunc™ Mikrotiterplatten bei 450 nm gemessen wurde.

- Proben, Substrate und Inhibitoren wurden in *Assay*-Puffer auf folgende Konzentrationen eingestellt:

  Proben: 50 µg/ml Protein
  Z-Arg-Arg-AMC: 5 µM
  Z-Phe-Arg-AMC: 15 µM
  E64: 15 µM
  CA 074-Me: 60 µM

Anschließend wurden jeweils 50 µl Probe, 50 µl Substrat und 50 µl des entsprechenden Inhibitors in die Kavitäten pipettiert. Proben deren Kathepsin B- und Kathepsin L-Aktivitäten ohne Inhibitor bestimmt werden sollten, wurden mit 50 µl *Assay*-Puffer aufgefüllt.
Als Positivkontrolle wurde der AMC-Standard (2,5 µM, 150 µl/well in *Assay*-Puffer), als Leerwerte die jeweiligen Substratlösungen (50 µl Substrat + 100 µl *Assay*-Puffer) sowie 150 µl *Assay*-Puffer allein mitgeführt. Von allen Ansätzen wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Nach 30 Minuten Inkubation im Dunkeln bei RT wurde die Fluoreszenzintensität des durch die Substrathydrolyse freigesetzten AMC bei einer Anregungswellenlänge von 410 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm im Fluorolite Mikroplattenreader 1000 (Dynatech) quantifiziert.

2.3.2 Stimulation von THP-1-, MonoMac-1- und MonoMac-6-Zellen für Kathepsin L- und Kathepsin B-ELISA

Pro Stimulationsansatz wurden jeweils 2 x 10^6 THP-1-, MonoMac-1-und MonoMac-6-Zellen in 3 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in die Vertiefungen von 6-Loch-Platten ausgesät. Anschließend wurden die jeweiligen Stimuli zugegeben und bei 37 °C und 5 % CO_2 im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Die Zellsuspensionen wurden dann jeweils in 15 ml Röhrchen (TPP) überführt, bei 250 x g zentrifugiert und die Zellkulturüberstände abgenommen. Die **Zellpellets** wurden in 10 ml PBS resuspendiert und wiederum zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen zur Lyse in 500 µl PBS/0,5 % TritonX-100 resuspendiert, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 1 h auf Eis inkubiert, wobei alle 20 Minuten resuspendiert wurde. Danach erfolgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt in einer Tischzentrifuge bei 13.000 U/min. Die Überstände wurden anschließend sorgfältig abgenommen und die Sedimente verworfen. Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentrationen (Micro BCA™ Protein Assay, Pierce Endogen) wurden die Zelllysate 1:5, 1:20 und 1:50 auf ein Endvolumen von 100 µl mit PBS verdünnt.
Die **Zellkulturüberstände** wurden 5 Minuten bei 500 x g abzentrifugiert und die ausfallenden Niederschläge verworfen. Für Kathepsin B ELISAs wurden zusätzlich jeweils 2 ml zellfreie Überstände über einem Proteinkonzentrations-Filter (Centrex® UF-2-Filter 30 kDa MWCO, Schleicher und Schuell) durch Zentrifugation bei 5000 x g auf ein Volumen von 300 µl im Verhältnis 1:6 eingeengt.

2.3.3 Etablierung eines Kathepsin L-ELISA

Für die quantitative Kathepsin L-Proteinbestimmung in Zelllysaten und Zellüberständen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein ELISA (***E**nzyme-**l**inked **I**mmuno**s**orbant **A**ssay*) etabliert. Als Fang- und Detektions-Antikörper dienten die beiden monoklonalen IgG1-anti-human Kathepsin L Antikörper mAK-33/1 und mAK-33/2, die freundlicherweise von Dr. E. Weber, Institut für Physiologische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle, zur Verfügung gestellt wurden (Weber et al. [80]). Die Epitope von mAk-33/1 überspannen auf dem reifen Kathepsin L-Protein die Bereiche zwischen dem $Glutamat_{91}$ bis $Alanin_{97}$ sowie $Phenylalanin_{241}$ bis $Glutamat_{244}$. Die antigene Determinante von mAk-33/2 erstreckt sich über sieben Aminosäuren von $Glycin_{169}$ bis $Threonin_{175}$. Als Kathepsin L-Standard diente rekombinantes humanes Kathepsin L aus der Hefe *Pichia pastoris*, welches von Prof. Dr. D. Brömme, Mt. Sinai Medical School zur Verfügung gestellt wurde.

2.3.3.1 Biotinylierung des monoklonalen Kathepsin L-Antikörpers 33/2

Der monoklonale Kathepsin L-Antikörper 33/2 (mAk-33/2, Dr. E. Weber, Institut für Physiologische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle) wurde zur Biotinylierung auf eine Konzentration von 3 mg/ml eingeengt und gleichzeitig in eine 100 mM $NaHCO_3$-Lösung umgepuffert. Dazu wurden die Zentrifugationsfilter Centrex® UF-2 von Schleicher&Schuell mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa verwendet.
Die Biotinylierung der Antikörper erfolgte mit dem FluoReporter® Mini-biotin-XX Protein Labeling Kit (Molecular Probes). Biotin wurde in 200 µl H_2O_{dest} resuspendiert. 30 µl dieser Lösung (10 µl/mg Antikörper) wurden zu 200 µl 33/2-Antikörper in 100 mM $NaHCO_3$-Lösung gegeben. Die weitere Aufarbeitung erfolgte laut Angaben des Kit-Herstellers.

2.3.3.2 Kathepsin L-ELISA

50 µl Zelllysate und 100 µl Überstände wurden 10 Minuten bei 60 °C erhitzt. Die Zelllysate wurden anschließend mit 50 µl PBS/0,1 % Tween-20 1:2 verdünnt. Der Kathepsin L-Standard wurde in Konzentrationen von 64 ng/ml bis 2 ng/ml in Verdünnungsschritten von 1:2 eingesetzt. Der Kathepsin L-ELISA wurde nach dem *Sandwich*-Modell entwickelt. Der Kathepsin L-spezifische mAk-33/1 wurde auf den Boden einer 96-Loch-Platte gekoppelt und diente so als „Fang-Antikörper“ für Kathepsin L-Protein in den getesteten Zelllysaten und Zellkulturüberständen. Zur Detektion des gebundenen Kathepsin L wurde der biotinylierte Antikörper mAk-33/2 eingesetzt (Kap. 2.3.3) an den Alkalische Phosphatase-gekoppeltes Streptavidin gebunden wurde. Die Spaltung des zugegebenen Alkalische Phosphatase-Substrates (SigmaFast™ p-Nitrophenyl *Phosphate Tablet Set*, Sigma®) führt zur Freisetzung eines chromogenen Farbstoffes, der durch Absorbtionsmessung bei 405 nm am Plattenreader Dynatech MR 500 nachgewiesen wurde. Der ELISA wurde nach folgendem, im Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Weber etabliertem Protokoll durchgeführt.

- **Kathepsin L-ELISA**
  - 10 µg/ml Kathepsin L mAK-33/1 in 100 µl 0,2 M Na-Carbonatpuffer (pH 9,4-9,7) wurde auf 96-Loch-Platten (*high binding* Platten von Costar) bei 4 °C über Nacht adsorbiert
  - 3x waschen mit 300 µl PBS/0,1 % Tween-20 (Sigma®)
  - Blocken mit 300 µl PBS/3 % BSA (*Albumin bovine Fraction V*, Serva), 1 h bei 37 °C
  - 3x waschen mit 300 µl PBS/0,1 % Tween-20
  - jeweils 100 µl Kathepsin L-Standards, Lysate und Kulturüberstände zupipettieren und 1 h bei 37 °C inkubieren
  - 3x waschen mit 300 µl PBS/0,1 % Tween-20
  - 100 µl Biotin-gekoppelter Kathepsin L mAK-33/2 (Konzentration: 1 µg/ml in PBS/3 % BSA), 1 h bei 37 °C
  - Waschen mit 300 µl PBS/0,1 % Tween-20
  - Inkubation mit 100 µl *ExtraAvidin-Alkaline-Phosphatase* Sigma® in einer 1:500-Verdünnung in PBS/3 % BSA, 1 h bei 37 °C
  - 3x waschen mit 300 µl PBS/0,1 % Tween-20
  - Entwicklung mit 100 µl Alkalische-Phosphatase-Substrat (SigmaFast™ p-Nitrophenyl *Phosphate Tablet Set*, Sigma®), 20 Minuten, dunkel bei RT
  - Stoppen der Enzymreaktion durch Zugabe von 100 µl 1 N NaOH
  - Absorptionsmessung bei 405 nm im Plattenreader (Dynatech MR 5000)

Die erhaltenen Konzentrationswerte wurden auf die jeweiligen Proteinkonzentrationen der Proben bezogen dargestellt.

Zur Charakterisierung des Messbereiches des Kathepsin L-ELISA wurde eine 8-fache Messung des Standardproteins als Antigen durchgeführt (Abb. 5). Rekombinantes Kathepsin L-Protein wurde in einer Konzentration von 160 ng/ml bis 0,05 ng/ml in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt. Die geringste messbare Konzentration lag bei 0,6 ng/ml Antigen, es folgte ein linearer, optimaler Messbereich bis 50 ng/ml und eine Plateaubildung ab 80 ng/ml wobei bis 160 ng/ml Kathepsin L-Protein nur noch ein leichter Anstieg der Kurve zu beobachten war.

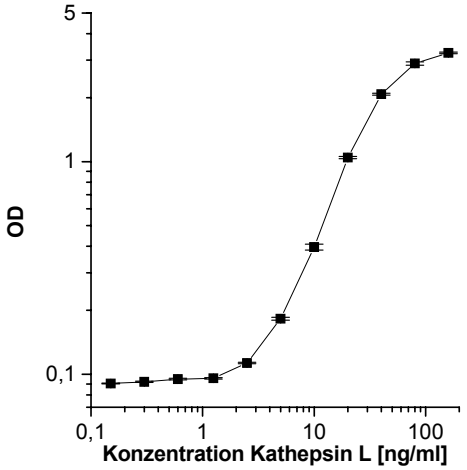

Abb. 7: Standardkurve des Kathepsin L-ELISA.

2.3.4 Kathepsin B-ELISA

Die Kathepsin B-Proteinquantifizierung erfolgte mit dem ELISA-Kit der Firma KRKA, dd Novo mesto, Slowenien. Dieser Test ist wie der Kathepsin L-ELISA nach dem *Sandwich*-Prinzip aufgebaut. Ein auf dem Boden von Mikrotiter-Streifen adsorbierter polyklonaler anti-Kathepsin B Antikörper bindet in den Testproben vorhandenes Kathepsin B-Protein, dessen Menge durch Zugabe eines zweiten, Meerrettichperoxidase-markierten Antikörpers nach Applikation einer Entwicklerlösung quantifiziert werden kann.

Die Aufarbeitung der Zelllysate erfolgte wie in Abschnitt 2.3.3.2. beschrieben. Es wurden 50 µl Zelllysate und eingeengte Zellkulturüberstände (Kap. 2.3.2) im mitgelieferten Probenpuffer 1:2 verdünnt und anschließend der ELISA-Test nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Absorbtionsmessungen erfolgten bei 450 nm im Plattenreader (Dynatech MR 5000). Die erhaltenen Konzentrationsangaben wurden in Relation zu den Gesamtproteinkonzentrationen der einzelnen Proben gesetzt und graphisch dargestellt.

2.3.5 Identifizierung von Proteinen mittels Western-Blot-Analysen

Zum semiquantitativen Nachweis von Proteinen wurden SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen (SDS-PAGE) mit anschließender Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran und Visualisierung der Zielproteine durch Immunfärbung mit monoklonalen Antikörpern durchgeführt (Western-Blot). Dazu wurden jeweils 1 x 10^6 Zellen in 1,5 ml IMDM-FA-Medium in Kavitäten von 12-Loch Platten mit und ohne 20 ng/ml TGF-β1 inkubiert. Die in Suspension wachsenden Zelllinien THP-1 und MonoMac-6 wurden anschließend durch 1-minütige Zentrifugation in einer gekühlten Tischzentrifuge bei 10.000 U/min sedimentiert und in 50 µl Lysepuffer aufgenommen. Auf die adhärent wachsenden A-549-Zellen wurden nach Absaugen des Inkubationsmediums 100 µl Lysepuffer pipettiert. Auf 30 Minuten Inkubation auf Eis folgten 20 Minuten Zentrifugation in einer gekühlten Tischzentrifuge bei 13.000 U/min. Der Überstand wurde abgenommen und einer Proteinbestimmung unterzogen (Micro BCA™ Protein Assay, Pierce Endogen). Für die SDS-PAGE wurden 30 µg Gesamtprotein in einer entsprechenden Menge 4X Roti-Load Puffer (Roth) 5 Minuten bei 99 °C aufgekocht. Nach dem Transfer der Proteine aus dem 12%-igen SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond™ ECL™, Amersham) wurde die Membran 2 h mit 5 % Trockenmilchpulver in TBS geblockt. Für die Immunfärbung folgte eine 16-stündige Inkubation mit dem jeweiligen Phospho-spezifischen Antikörper. Nach 3 Waschritten mit TBS/0,15 % Tween-20 erfolgte eine 1-stündige Inkubation mit dem entsprechenden Meerrettichperoxidase-markierten, sekundären Antikörper, der wiederum durch 3 x waschen mit TBS/0,15 % Tween-20 entfernt wurde. Nach Behandlung der Membran mit einem Substrat der Meerrettichperoxidase (ECL, Amersham) erfolgte die Visualisierung der spezifischen Proteinbanden durch Auflegen auf einen Chemolumineszenz-empfindlichen Röntgenfilm (Biomax, Kodak). Zur Kontrolle des Proteingehaltes erfolgte die Inkubation der gleichen Membran mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern mit Phosphorylierungs-unabhängiger Epitopspezifität. Dazu wurde die Membran zur Beseitigung bereits gebundener Antikörper vorher 60 Minuten bei 50 °C mit *Stripping*-Puffer behandelt und die Immunfärbung wie oben beschrieben wiederholt.

- **Verwendete Antikörper/Antiseren** (alle in TBS/0,15 % Tween-20/5 % Trockenmilchpulver verdünnt)
  - Anti-Phospho-Smad2: immunoaffinitätsgereinigte Kaninchen-IgG-Fraktion (Upstate), Verdünnung 1:1000,
    Anti-Smad2/3: immunoaffinitätsgereinigte Ziegen-IgG-Fraktion (Santa Cruz), Verdünnung1:200
  - Anti-Phospho-p38, Anti-p38: durch immunoaffinitätsgereinigte Kaninchen-IgG-Fraktion (Cell Signaling), Verdünnung 1:1000
  - Anti-Phospho-ERK1/2, Anti-ERK1/2: immunoaffinitätsgereinigte Kaninchen-IgG-Fraktion (Cell Signaling), Verdünnung 1:5000
  - Anti-Phospho-JNK: monoklonaler Maus-Antikörper (Sigma®), Verdünnung 1:250
    Anti-JNK: Kaninchen-Antiserum (Sigma®), Verdünnung 1:1000

- **Sekundärantikörper** (alle Meerettichperoxidase-markiert für Chemolumineszenz-Entwicklung, in TBS/0,15 % Tween-20/5 % Trockenmilchpulver verdünnt)
  - Ziege anti-Kaninchen-IgG: immunoaffinitätsgereinigt (Dianova), 1:5000
  - Esel anti-Ziege-IgG: immunoaffinitätsgereinigt (Dianova), 1:5000
  - Ziege anti-Maus-IgG: immunoaffinitätsgereinigt (Dianova), 1:5000

- **Verwendete Puffer**
  - **PBS:**
    10X-Konzentrat ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}, Invitrogen

  - **TBS 10X-Konzentrat:**
    750 mM NaCl
    100 mM Tris-Base
    pH 7,4-7,8

  - **Beschichtungspuffer für die Elutriation**
    1X PBS aus 10X-Konzentrat
    2 % FCS

  - **Elutriationspuffer**
    1X PBS aus 10X-Konzentrat
    2 mM EDTA
    2 % FCS

- **Lysepuffer zur Isolierung intakter Zellkerne**

  10 mM Tris-Cl
  3 mM $MgCl_2$
  10 mM NaCl
  0,1 % NP-40 für MonoMac-6-Zellen
  0,15 % NP-40 für THP-1-Zellen
  pH 7,4
  Vor Zugabe von NP-40 autoklavieren

- **Aufbewahrungspuffer für intakte Zellkerne**

  50 mM Tris-Cl,
  5 mM $MgCl_2$
  40 % Glycerin
  0,1 mM EDTA
  pH 8,3
  Autoklavieren

- **2X Reaktionspuffer für *nuclear runoff* -Experimente**

  10 mM Tris-Cl
  5 mM $MgCl_2$
  0,3 mM KCl
  pH 8,0
  Autoklavieren

- **Lysepuffer für die Lysosomenaufarbeitung**

  0,25 M Saccharose
  25 mM HEPES
  2 mM EDTA

- **Natriumacetatpuffer (100 mM)**

  100 mM NaOH
  0,6 % Essigsäure
  0,5 mM EDTA
  pH 5,5

- ***Assay*-Puffer für die Aktivitätsmessungen von Kathepsinen**

  50 mM Natriumacetatpuffer
  (100 mM Natriumacetatpuffer 1:2 verdünnt)
  5 mM DTT (Dithiothreitol)
  0,01 % Triton X-100

- **0,2 M Na-Carbonatpuffer**

  155 mM $NaHCO_3$

  45 mM Na_2CO_3

  pH 7,4 – pH 7,9

- **Lysepuffer zur Probenaufarbeitung für Western-Blots**

  20 mM HEPES

  50 mM NaF

  50 mM NaCl

  0,1 % Na-Orthovanadat

  1 Triton X-100

  1:100 *Protease Inhibitor Cocktail Set III* (Calbiochem®)

- ***Stripping*-Puffer**

  2 % SDS

  12 ml 4X UGB-Puffer

  0,7 % β-Mercaptoethanol

  ad 50 ml $H2O_{dest}$

- **4X UGB-Puffer**

  0,5 M Tris

  0,4 % SDS

  pH 6,8

3 ERGEBNISSE

Die nachfolgenden Experimente sollten zunächst die Frage klären, wie sich eine *in-vitro*-Inkubation von humanen myelo-monozytären Tumorzelllinien und humanen peripheren Blutmonozyten mit TGF-β1 auf die Expression und Sekretion der Kathepsine B, L, K und S auswirkt. Als Positivkontrolle wurden parallel Stimulationen mit LPS (**L**ipo**p**oly**s**accharid, Endotoxin) aus der Zellwand von *E. coli* durchgeführt, da LPS ein gut charakterisierter Stimulus für myelo-monozytäre Zellen ist.

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung einer veränderten Kathepsin-Sekretion nach TGF-β1-Inkubation erfolgte die Analyse der Invasion/Migration von THP-1-Zellen. Anschließend sollten Messungen der Apoptose-Rate von THP-1-Zellen nach Kathepsin-Inhibition die Rolle dieser Proteasen beim programmierten Zelltod beleuchten.

Abschließend wurden Veränderungen in der TGF-β1-Signaltransduktionskaskade am Beispiel der Regulation der Kathepin B-Genexpression untersucht und entsprechende regulatorische, TGF-β1-induzierbare Einheiten auf dem Promotor sowie dem ersten Intron des Kathepsin B-Gens analysiert.

3.1 Charakterisierung der Zelllinien THP-1, MonoMac-1 und MonoMac-6

Die Zelllinien THP-1, MonoMac-1 und MonoMac-6 wurden aus Patienten mit akuter myeloischer Leukämie isoliert und repräsentieren unterschiedliche Differenzierungsstadien der Entwicklung von Monoblasten zu reifen Monozyten. THP-1-Zellen repräsentieren das am geringsten differenzierte Stadium gefolgt von MonoMac-1- und MonoMac-6-Zellen.

Reife, humane periphere Blutmonozyten wurden wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, mittels Gegenstrom-Zentrifugalelutriation aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes isoliert.

3.1.1 CD14-Expression auf der Oberfläche der myelo-monozytären Zelllinien THP-1, MonoMac-1 und MonoMac-6 sowie auf humanen peripheren Blutmonozyten

Einer der wichtigsten Differenzierungsmarker myelo-monozytärer Zellen ist der LPS-Rezeptor CD14. Die Expression dieses Oberflächenmarkers nimmt mit fortschreitendem Differenzierungsgrad dieser Zellen zu.

Um die Entwicklungsstadien der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien zu bestätigen, wurden durchflusszytometrische Messungen nach Inkubation der Zellen mit FITC-markiertem anti-CD14-Antikörper durchgeführt.

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse dieser Messungen dargestellt. Der CD14-Gehalt betrug auf THP-1-Zellen 3 %, auf MonoMac-1 18 %, auf MonoMac-6 38 % und auf reifen Monozyten des peripheren Blutes 100 %.

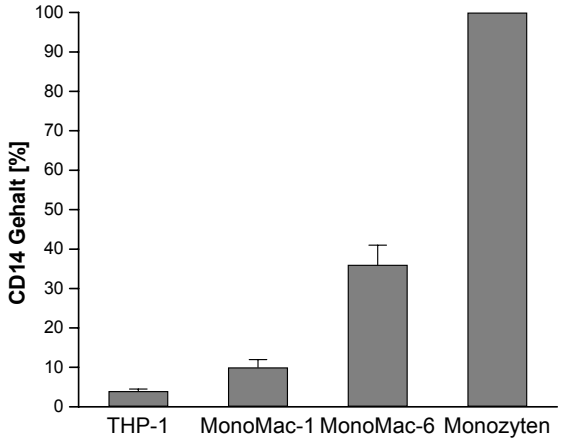

Abb. 8: CD14-Expression auf THP-1- MonoMac-1- und MonoMac-6-Zellen sowie auf reifen Monozyten (n=3). Die CD14-Expressionsrate wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Die am wenigsten differenzierte Zelllinie ist demnach THP-1 gefolgt von MonoMac-1 und MonoMac-6. Die in der Literatur angegebenen Werte für den CD14-Gehalt dieser Zellen konnten hier bestätigt werden.

3.1.2 Die Wirkung von TGF-β1 und LPS auf die Expression ihrer Rezeptoren in THP-1- und MonoMac-6-Zellen

Die Wirkung von Entzündungsmediatoren und Zytokinen wird initial über die entsprechenden Rezeptoren übertragen. Es wurden deshalb zuerst die Expressionsmuster des TGF-β1 Rezeptors Typ II und des LPS-Rezeptors CD14 nach Behandlung mit LPS und TGF-β1 überprüft. Für diese Versuche wurden die weniger differenzierten THP-1-Zellen und die stärker ausdifferenzierten MonoMac-6-Zellen ausgewählt.

Um zu testen wie sich die Inkubation von THP-1- und MonoMac-6-Zellen mit Endotoxin und TGF-β1 auf die Expression ihrer Rezeptoren auswirken, wurden 2×10^6 Zellen zwei und drei Tage mit LPS und TGF-β1 getrennt oder gemeinsam behandelt. LPS und TGF-β1 wurden in einer Konzentration von 100 ng/ml bzw. 20 ng/ml eingesetzt. Die Werte der unbehandelten Kontrollen wurden jeweils auf 100 % festgelegt (Ko, horizontale Funktionsgraphen) und die Werte der behandelten Proben relativ dazu berechnet.

➢ **CD14-Expression auf THP-1 und MonoMac-6-Zellen**

Zur Detektion des LPS Rezeptor-Gehaltes auf den Zellen wurden durchflusszytometrische Messungen mit einem FITC-markierten anti-CD14-Antikörper durchgeführt. In Abbildung 9 ist das Ergebnis dieser Versuche graphisch dargestellt. Die Werte der unbehandelten Kontrollen wurden auf 100 % festgelegt. LPS hatte in den weniger differenzierten Zellen THP-1 keine Auswirkung auf die Expressionsrate von CD14. Im Gegensatz dazu reagierten die differenzierteren MonoMac-6-Zellen mit einer fünffach stärkeren CD14-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen. TGF-β1 reduzierte in THP-1-Zellen die CD14-Expression auf 60 % des Ausgangswertes, während MonoMac-6-Zellen auf diesen Stimulus nicht ansprachen. Koinkubationen von TGF-β1 und LPS konnten die Wirkung der einzelnen Stimuli nicht verändern.

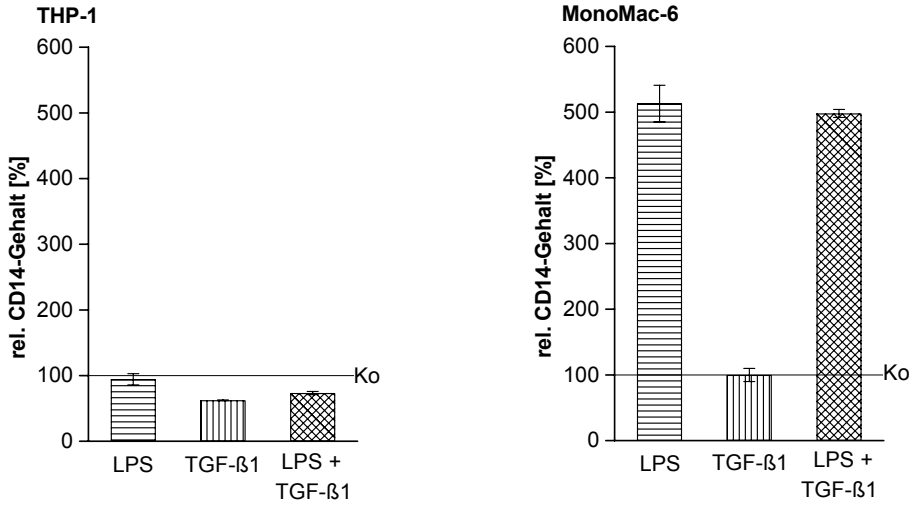

Abb. 9: CD14-Expression auf der Oberfläche von THP-1- und MonoMac-6-Zellen nach LPS- und TGF-β1-Behandlung (n=3). Die CD14-Expressionsrate wurde durch durchflusszytometrische Analysen bestimmt. Dargestellt ist der relative Gehalt bezogen auf unbehandelte Kontrollansätze (Ko, horizontale Funktionsgraphen), die auf 100 % gesetzt wurden (Mittelwert ± SEM). LPS und TGF-β1 wurden in Konzentrationen von 100 ng/ml bzw. 20 ng/ml eingesetzt.

Die CD14-Oberflächenexpression konnte durch LPS nur in MonoMac-6 erhöht werden. TGF-β1 erniedrigte in THP-1 die CD14-Expression.

➢ **TGF-β1-Rezeptor Typ II mRNA-Expression in THP-1- und MonoMac-6-Zellen**

Nach Inkubation der Zellen mit LPS und TGF-β1 wurde die TGF-β1-Rezeptor Typ II-Expression auf mRNA-Ebene untersucht. Zur Messung der TGF-β1-Rezeptor Typ II mRNA-Konzentration wurden quantitative Reverse Transkriptase PCR-Analysen (RT-PCR) durchgeführt, wie sie in Kapitel 2.2.1 beschrieben wurden. In Abbildung 10 sind die Ergebnisse der TGF-β1-Rezeptor Typ II mRNA-Konzentrationsbestimmungen in THP-1- und MonoMac-6-Zellen in graphischer Form dargestellt.

TGF-β1 erhöhte in THP-1-Zellen den mRNA-Gehalt des eigenen Rezeptors auf 230 %, während er in MonoMac-6-Zellen auf 330 % gesteigert wurde. LPS bewirkte in THP-1-Zellen keine Veränderung des TGF-β1-Rezeptors Typ II-Gehaltes. Aus diesem Grund wurden keine Koinkubationsstudien durchgeführt. MonoMac-6-Zellen erhöhten nach LPS-Stimulation die TGF-β1-Rezeptor Typ II-Konzentration auf 320 %. Eine additive Ergänzung der Stimuli nach Koinkubation fand nicht statt. Durch TGF-β1 wurde jeweils die Maximalinduktion der Rezeptor-mRNA erreicht.

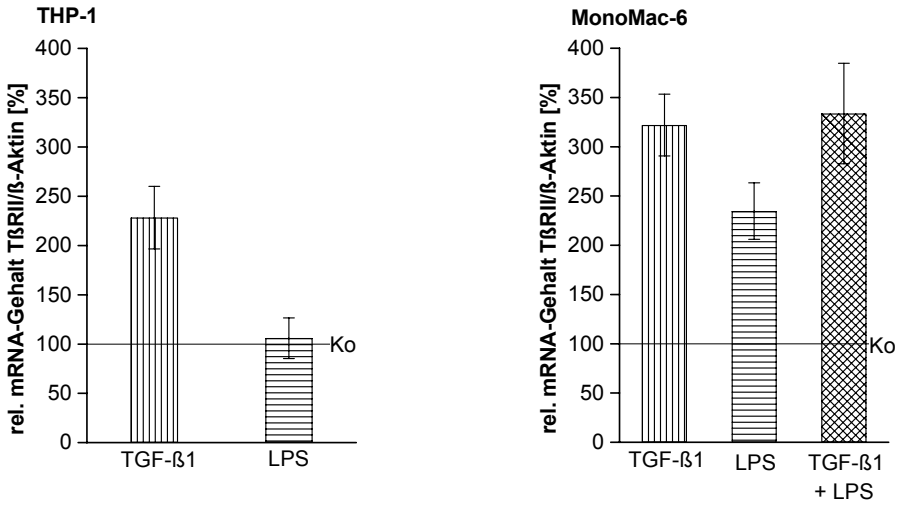

Abb. 10: TGF-β1-Rezeptor Typ II mRNA-Expression nach TGF-β-1- und LPS-Behandlung von THP-1- und MonoMac-6-Zellen (n=3). Der TGF-β1-Rezeptor Typ II mRNA-Gehalt wurde durch quantitative RT-PCR gemessen und mit Hilfe des β-Aktin mRNA-Gehaltes normiert. Dargestellt ist der relative Gehalt bezogen auf unbehandelte Kontrollansätze (horizontale Funktionsgraphen), die auf 100 % gesetzt wurden (Mittelwert ± SEM). TGF-β1 und LPS wurden in Konzentrationen von 20 ng/ml bzw. 100 ng/ml eingesetzt.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die weniger differenzierten myelo-monozytären THP-1-Zellen entsprechend ihres geringen Gehaltes an CD14 durch LPS nicht stimulierbar waren. Sie reagierten nach TGF-β1-Inkubation mit einer Erniedrigung des LPS-Rezeptors und einer gleichzeitigen Erhöhung der mRNA-Konzentration des TGF-β1-Rezeptors. Die stärker differenzierten MonoMac-6-Zellen erhöhten nach Behandlung mit LPS den Anteil beider Rezeptortypen, während TGF-β1 nur die verstärkte mRNA-Expression des eigenen Rezeptors induzierte.

3.1.3 Proliferationsverhalten der myelo-monozytären Zelllinien THP-1, MonoMac-1 und MonoMac-6 nach TGF-β1-Inkubation

Die bereits in der Einleitung erwähnte, duale Wirkung von TGF-β1 auf die Proliferation unterschiedlicher Zellen sollte im verwendeten Zellsystem analysiert werden (Abb. 11). Die Proliferationsraten wurden, wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, mittels ^{3}H-Thymidin-Einbau in Gegenwart von 0,5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml und 20 ng/ml TGF-β1 gemessen. TGF-β1 inhibierte die Proliferation der weniger differenzierten Zelllinien THP-1 und MonoMac-1 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollproben um 30 %. Die maximale Inhibition setzte hier bereits bei einer TGF-β1-Konzentration von 2,5 ng/ml ein. Die Proliferation der stärker ausdifferenzierten Zelllinie MonoMac-6 wurde um 18 % verringert.

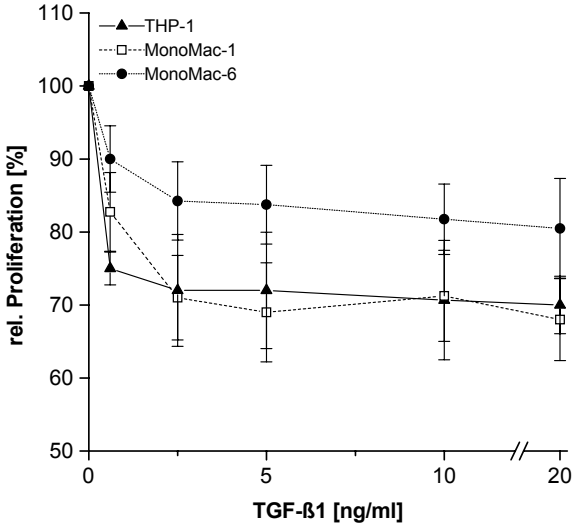

Abb. 11: Proliferation von THP-1-, MonoMac-1- und MonoMac-6-Zellen nach TGF-β1-Inkubation (n=3). Die Proliferationsraten wurden nach Inkubation mit ^{3}H-Thymidin gemessen. Dargestellt ist der relative Gehalt bezogen auf unbehandelte Kontrollansätze, die auf 100 % gesetzt wurden (Mittelwert ± SEM).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass TGF-β1 die Proliferation der am stärksten ausdifferenzierten MonoMac-6-Zellen nur leicht inhibiert, wobei die Wachstumsrate der weniger entwickelten THP-1- und MonoMac-1-Zellen deutlicher gehemmt wurden.

3.2 Einfluss von LPS und TGF-β1 auf die Expression von Kathepsin L und Kathepsin B in myelo-monozytären Zelllinien

Es ist bekannt, dass Kathepsine eine wichtige Rolle bei dem Umbau der Extrazellulären Matrix spielen. TGF-β1 führt in vielen Tumorgeweben nachweislich zu erhöhter Invasion/Migration und Metastasierung von Tumorzellen, was auf verstärkten Abbau der Extrazellulären Matrix zurückzuführen ist. Gleichzeitig inhibiert TGF-β1 die induzierte Synthese von MMPs unter proinflammatorischen Bedingungen in Makrophagen.

Bisher wurde der Effekt von TGF-β1 auf die Expression von Extrazellulären Matrix-modulierenden Kathepsinen in myelo-monozytären Tumorzellen und humanen peripheren Blutmonozyten nicht analysiert. Die nachfolgenden Ergebnisse sollten klären, ob TGF-β1 die Expressionsmuster von Kathepsin L, Kathepsin B, Kathepsin K und Kathepsin S in den myelo-

monozytären Zelllinien THP-1, MonoMac-1 und MonoMac-6 verändern und somit einen modulierenden Effekt auf das proteolytische Potential dieser Zellen ausüben kann.

Lipo**p**oly**s**accharid (LPS oder Endotoxin) aus *E. coli* ist bekannt für seine stimulatorische und differenzierende Wirkung auf Zelllinien myelo-monozytären Ursprungs. Dieser Mediator wurde aus diesem Grund als Positivkontrolle mitgeführt. Vor diesem Hintergrund wurde die wechselseitige Wirkung von TGF-β1 und LPS auf die Expression der Kathepsine L, B, K und S untersucht.

Die Proteinkonzentration der Kathepsine L und B wurden mit Hilfe von ELISAs und die mRNA-Konzentrationen der Kathepsine L, B, K und S durch quantitative mRNA-Bestimmung gemessen. Die quantitativen RT-PCR-Reaktionen und ELISAs wurden wie in Kapitel 2.2.1, 2.3.3 und 2.3.4 beschrieben, durchgeführt. Es wurden jeweils 2×10^6 Zellen als Kontrollen sowie für stimulierte Proben eingesetzt. Die Werte der unbehandelten Kontrollen wurden jeweils auf 100 % festgelegt (Ko, horizontale Funktionsgraphen bei Säulendiagrammen).

3.2.1 Die Kathepsin L-Expression in den Zelllinien THP-1 und MonoMac-1 nach LPS-Stimulation

Für die folgenden **Vorexperimente** wurden die Zelllinien myelo-monozytären Ursprungs THP-1 und MonoMac-1 mit bakteriellem Endotoxin aus *E. coli* als eindeutig positiv stimulierender, differenzierender Mediator in einer Konzentrationsreihe behandelt und der Einfluss dieses Stimulus zunächst nur auf die **Kathepsin L-Expression** analysiert. Die Wirkung von LPS auf MonoMac-6-Zellen wurde in einer weiter unten dargestellten Versuchsreihe analysiert.

LPS wurde in einer Konzentrationsreihe von 1×10^{-2} bis 1×10^5 ng/ml appliziert. THP-1-Zellen wurden nach ein, zwei und drei Tagen analysiert, MonoMac-1-Zellen nach zwei und drei Tagen.

➢ **THP-1-Zellen: Kathepsin L-Expression nach LPS-Stimulation**

In Abbildung 12 sind die Kathepsin L-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen, den Zelllysaten und auf mRNA Ebene nach LPS-Stimulation dargestellt.

Der Kathepsin L-Gehalt in den Zellkulturüberständen stieg an allen gemessenen Zeitpunkten nach Inkubation mit mehr als 100 ng/ml LPS leicht an. Eine Verdopplung der Kathepsin L-Konzentration wurde bei Zugabe von 100 µg/ml LPS nach zwei Tagen erreicht. In Zelllysaten und auf mRNA-Ebene war eine Erhöhung der Kathepsin L-Konzentration nach Inkubation mit LPS in einer Konzentration von mindestens 1 µg/ml zu beobachten. Hier wurde auf die Analyse des 24 h-Wertes verzichtet, da aufgrund der erzielten Ergebnisse aus der Analyse der Überstände und Zelllysate keine Änderung der Kathepsin L-mRNA zu erwarten war.

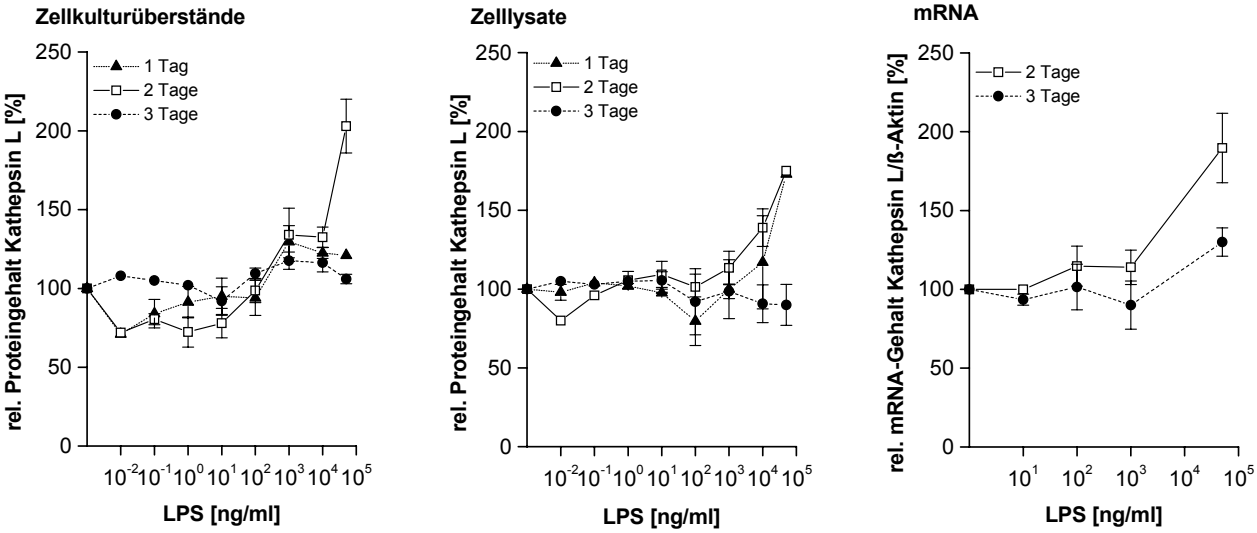

Abb. 12: Kathepsin L Expression nach LPS-Behandlung von THP-1 Zellen nach einer Inkubationszeit von ein, zwei oder drei Tagen (n=3). Die Kathepsin L-Proteinkonzentration in den Zellkulturüberständen und Zelllysaten wurde durch ELISA bestimmt. Der Kathepsin L mRNA-Gehalt wurde durch quantitative RT-PCR bestimmt und mit Hilfe des β-Aktin mRNA-Gehaltes normiert. Dargestellt ist der relative Gehalt bezogen auf unbehandelte Kontrollansätze die auf 100 % gesetzt wurden (Mittelwert ± SEM).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass der Einfluss von LPS auf die Kathepsin L-Expression in THP-1 Zellen gering war und dass LPS erst bei der höchsten eingesetzten Konzentration (100 µg/ml) nach ein bis zwei Tagen deutlich stimulatorisch wirkte.

➢ **MonoMac-1-Zellen: Kathepsin L-Expression nach LPS-Stimulation**

In Abbildung 13 sind die Kathepsin L Konzentrationen der MonoMac-1-Zellen in den Zellkulturüberständen, den Zelllysaten und auf mRNA-Ebene nach LPS-Stimulation in einer ansteigenden Konzentrationsreihe graphisch dargestellt. Der Kathepsin L-Gehalt stieg in den Zellkulturüberständen nach zwei Tagen Inkubation mit LPS-Konzentrationen über 100 ng/ml konzentrationsabhängig bis auf 200 %. Nach drei Tagen Inkubation begann die erhöhte LPS-induzierte Kathepsin L-Sekretion bereits bei Konzentrationen über 10 ng/ml und steigerte sich im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle dosisabhängig auf 350 %. In den Zelllysaten wurde nach zwei Tagen ein Anstieg der Kathepsin L-Konzentration bis auf 320 % bei 100 µg/ml LPS gemessen. Nach drei Tagen Inkubation war eine Erhöhung der Kathepsin L Protein- und mRNA-Konzentration bis auf 600 % bzw. 720 % nachweisbar. Auf die 48 h-Analyse der Kathepsin L-mRNA wurde verzichtet da in Zelllysaten und Zellkulturüberständen nach 3 Tagen die deutlichste Zunahme von Kathepsin L-Protein messbar war.

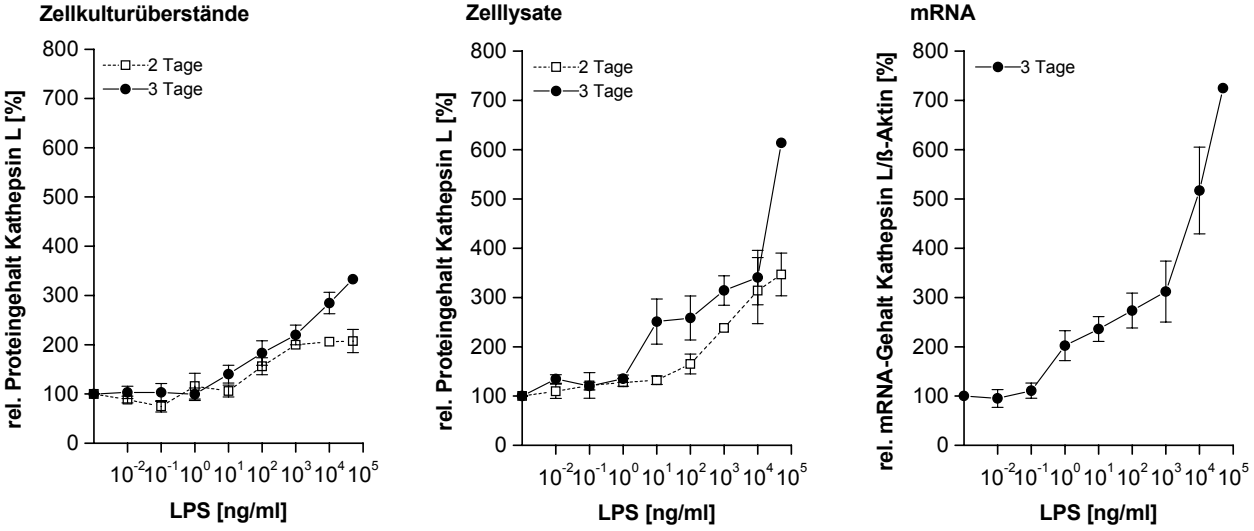

Abb. 13: Kathepsin L-Expression nach LPS-Stimulation von MonoMac-1-Zellen, für zwei und drei Tagen (n=3). Der Kathepsin L-Proteingehalt in den Zellkulturüberständen und Zelllysaten wurde durch ELISA bestimmt. Der Kathepsin L mRNA-Gehalt wurde durch quantitative RT-PCR gemessen und mit Hilfe des β-Aktin mRNA-Gehaltes normiert. Dargestellt ist der relative Gehalt bezogen auf unbehandelte Kontrollansätze, die auf 100 % gesetzt wurden (Mittelwert ± SEM).

LPS hatte in MonoMac-1-Zellen einen starken stimulatorischen Einfluss auf die Kathepsin L-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene. Dieser Effekt war dosisabhängig und erreichte nach drei Tagen eine maximale Wirkung. Im Gegensatz zu den weniger differenzierten THP-1-Zellen wurden MonoMac-1-Zellen durch LPS bereits bei niedrigen Konzentrationen (100 ng/ml) zur mRNA-Neusynthese, Speicherung und Sekretion von Kathepsin L angeregt.

3.2.2 Kathepsin L- und Kathepsin B-Expression nach TGF-β1-Inkubation und Koinkubation mit LPS in den Zelllinien THP-1, MonoMac-1 und MonoMac-6

In den nachfolgenden Experimenten wurde untersucht, ob sich TGF-β1 und LPS bezüglich ihrer Wirkung auf die Kathepsin L- und Kathepsin B-Expression beeinflussen.

LPS aktivierte in MonoMac-1-Zellen bereits bei einer Konzentration von 100 ng/ml deutlich die Synthese, Speicherung und Sekretion von Kathepsin L (Abb. 13). Aus diesem Grund wurde in den nachfolgenden Versuchen diese optimale Konzentration für die Stimulation mit LPS ausgewählt. TGF-β1 wurde aufgrund von Literaturhinweisen in einer Konzentration von 20 ng/ml oder zur Demonstration des spezifischen Effektes in einer Konzentrationsreihe appliziert.

3.2.2.1 THP-1-Zellen: Kathepsin L-Expression nach TGF-β1/LPS-Inkubation

In Abbildung 14 sind die Kathepsin L-Proteinkonzentrationen in den Zellkulturüberständen und Zelllysaten sowie auf mRNA Ebene nach zwei Tagen TGF-β1- und LPS-Inkubation dargestellt.

In THP-1-Zellen zeigten TGF-β1 oder LPS weder auf Proteinebene in Zellkulturüberständen und Zelllysaten noch auf mRNA-Ebene einen regulatorischen Einfluss auf den Kathepsin L-Gehalt. Koinkubationen von TGF-β1 und LPS wurden nicht durchgeführt, da die Substanzen jeweils einzeln verabreicht keine Veränderung der Kathepsin L-Expression verursachten.

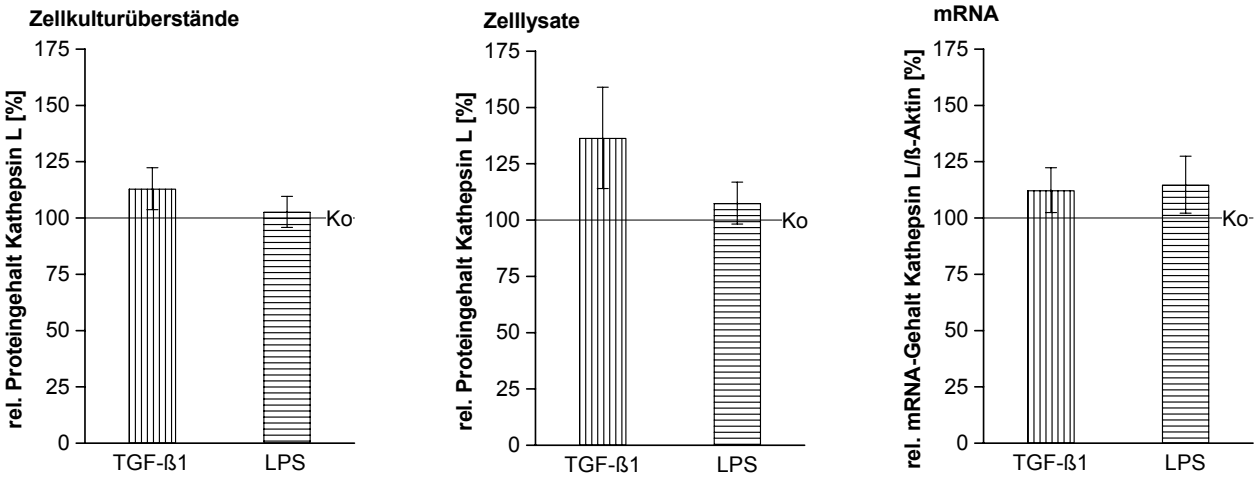

Abb. 14: Kathepsin L-Expression nach TGF-β1- und LPS-Inkubation von THP-1-Zellen nach zwei Tagen (n=3). Der Kathepsin L-Gehalt in den Zellkulturüberständen und Zelllysaten wurde durch ELISA bestimmt. Der Kathepsin L mRNA-Gehalt wurde durch quantitative RT-PCR bestimmt und mit Hilfe des β-Aktin mRNA-Gehaltes normiert. Dargestellt ist jeweils der relative Gehalt im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne Stimulus (horizontale Funktionsgraphen), deren Werte auf 100 % gesetzt wurden (Mittelwert ± SEM). Die TGF-β1- und LPS-Konzentrationen betrugen 20 ng/ml bzw. 100 ng/ml.

3.2.2.2 THP-1-Zellen: Kathepsin B-Expression nach TGF-β1/LPS-Inkubation

In Abbildung 15 sind die Kathepsin B-Proteinkonzentrationen von THP-1-Zellen in den Zellkulturüberständen, den Zelllysaten sowie auf mRNA Ebene nach TGF-β1- und LPS-Inkubation dargestellt. Die Kathepsin B-Expression wurde durch TGF-β1-Inkubation stark erhöht. Die Konzentration betrug in Zellkulturüberständen 340 %, in Zelllysaten 500 % und auf mRNA-Ebene 580 %. Die Expressionssteigerung durch LPS war nur in Zelllysaten und auf mRNA-Ebene mit 180 % und 210 % messbar. Es fand keine vermehrte Kathepsin B-Sekretion statt. LPS-Inkubation konnte die TGF-β1-induzierte Kathepsin B Protein- und mRNA-Erhöhung nicht verändern.

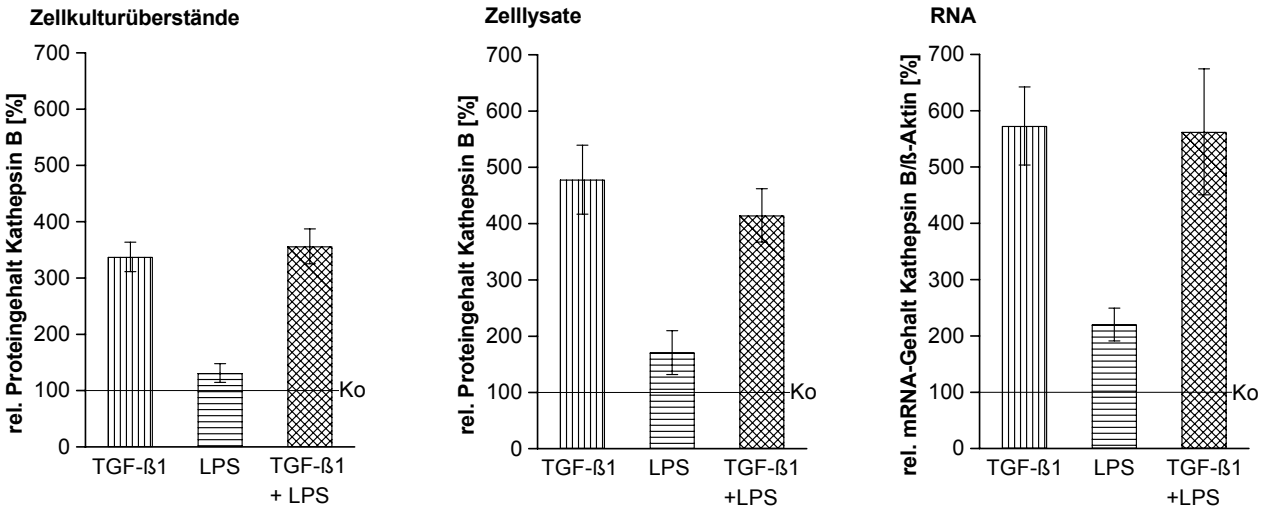

Abb. 15: Kathepsin B-Expression nach TGF-β1- und LPS-Inkubation von THP-1-Zellen nach zwei Tagen. (n=3). Der Kathepsin B-Proteingehalt in den Zellkulturüberständen und Zelllysaten wurde durch ELISA bestimmt. Der Kathepsin B mRNA-Gehalt wurde durch quantitative RT-PCR nach zwei Tagen bestimmt und mit Hilfe des β-Aktin mRNA-Gehaltes normiert. Dargestellt ist der relative Gehalt im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne Stimulus (horizontale Funktionsgraphen), deren Werte auf 100 % gesetzt wurden (Mittelwert ± SEM). TGF-β1 und LPS wurden in den Konzentrationen 20 ng/ml bzw. 100 ng/ml eingesetzt.

Es wurde festgestellt, dass TGF-β1 in THP-1-Zellen sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene einen starken, positiv regulatorischen Effekt auf die Kathepsin B-Expression ausübte, während die Wirkung von LPS wesentlich geringer war. Bei Koinkubationen der beiden Stimuli überwog der TGF-β1-Effekt und konnte durch LPS nicht verändert werden.

3.2.2.3 MonoMac-1-Zellen: Kathepsin L-Expression nach TGF-β1/LPS-Inkubation

In Abbildung 16 sind die Kathepsin L-Proteinkonzentrationen in den Zellkulturüberständen und Zelllysaten sowie auf mRNA-Ebene nach drei Tagen TGF-β1- und LPS-Inkubation sowie nach TGF-β1/LPS-Koinkubation dargestellt. TGF-β1 wurde in einer ansteigenden Konzentrationsreihe von 0,6 ng/ml bis 20 ng/ml appliziert.

Bereits 0,6 ng/ml TGF-β1 bewirkten einen Anstieg der Kathepsin L-Sekretion auf 130 % der sich dosisabhängig bis zu einer Verdoppelung bei 20 ng/ml steigerte.

100 ng/ml LPS verursachte eine Kathepsin L-Erhöhung in den Zellkulturüberständen auf 150 % (siehe auch Abb. 13). Bis 1,25 ng/ml TGF-β1 überlagerte der LPS-Effekt den Einfluss von TGF-β1 auf die Kathepsin L-Sekretion. Ab 1,25 ng/ml folgte die Koinkubationskurve der TGF-β1-Inkubationslinie. Die Kombination beider Stimuli führte zu keiner weiteren Steigerung der Einzelwirkungen.

In den Zelllysaten war bei 1,25 ng/ml TGF-β1 ein Kathepsin L-Anstieg auf 130 % zu beobachten, der mit zunehmender TGF-β1-Konzentration auf 175 % bei 20 ng/ml anstieg. LPS-Stimulation erhöhte den Kathepsin L-Gehalt ebenfalls auf 175 % (siehe auch Abb. 13). Die Koinkubation mit TGF-β1 veränderte diese erhöhte Expression nicht.

Der Kathepsin L mRNA-Gehalt wurde durch 1,25 ng/ml TGF-β1 bereits auf 175 % erhöht und stieg dosisabhängig auf 300 % bei 20 ng/ml. LPS verursachte einen Anstieg der Kathepsin L mRNA-Expression auf 330 % (siehe auch Abb. 13). Bei Koinkubation wurde dieses Expressionsniveau, unabhängig von der TGF-β1-Konzentration, beibehalten.

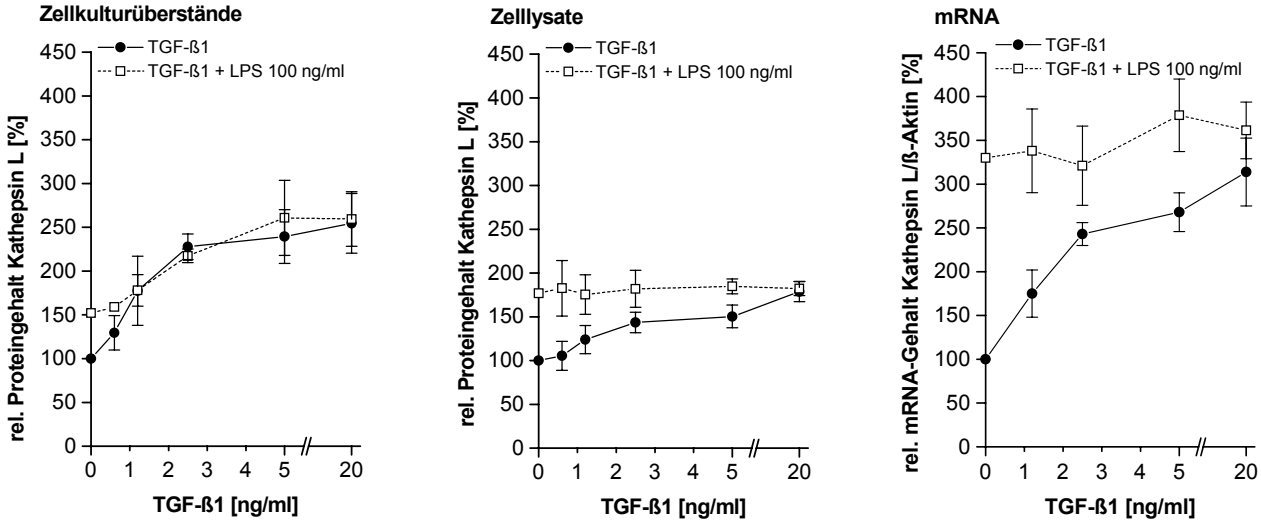

Abb. 16: Kathepsin L-Expression in MonoMac-1-Zellen nach TGF-β1- und LPS-Inkubation nach 3 Tagen (n=4). Der Kathepsin L-Gehalt in den Zellkulturüberständen und Zelllysaten wurde durch ELISA bestimmt. Der Kathepsin L mRNA-Gehalt wurde durch quantitative RT-PCR bestimmt und mit Hilfe des β-Aktin mRNA-Gehaltes normiert. Dargestellt ist der relative Gehalt im Vergleich zu unbehandelten Kontrollansätzen nach drei Tagen Inkubationszeit (Mittelwert ± SEM). Die Werte der unbehandelten Kontrollen wurden auf 100 % gesetzt. Die durchgehenden Linien repräsentieren die TGF-β1-Inkubation, die gestrichelten Linien die TGF-ß1/LPS-Koinkubation. Die LPS-Konzentration betrug konstant 100 ng/ml.

TGF-β1 verursachte in MonoMac-1-Zellen eine Steigerung der Kathepsin L-Expressionsrate sowohl auf Proteinebene in den Zellkulturüberständen und Zelllysaten als auch auf

mRNA-Ebene. Die Koinkubation von TGF-β1 und LPS bewirkte keine weitere Steigerung der Einzeleffekte. Im Vergleich zu den weniger differenzierten THP-1 Zellen, war hier eine starke Induktion der Kathepsin L-Expression durch TGF-β1 zu verzeichnen, die bereits bei 1,25 ng/ml TGF-β1 deutlich messbar war.

3.2.2.4 MonoMac-1-Zellen: Kathepsin B-Expression nach TGF-β1/LPS-Inkubation

In Abbildung 17 sind die Kathepsin B-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen, den Zelllysaten und auf mRNA-Ebene nach TGF-β1- und LPS-Inkubation sowie nach TGF-β1/LPS-Koinkubation gezeigt. Für die quantitativen mRNA-Messungen wurde TGF-β1 in einer ansteigenden Konzentrationsreihe von 0,6 ng/ml bis 20 ng/ml zugegeben.

Die TGF-β1-Inkubation führte zu einem Anstieg der Kathepsin B-Sekretion auf 400 %, der LPS-Effekt war nur halb so hoch. Koinkubationen der beiden Stimuli konnten die TGF-β1-Wirkung nicht verändern.

TGF-β1 erhöhte die Kathepsin B-Proteinkonzentration in den Zelllysaten auf 200 %. Durch LPS wurde der Kathepsin B-Gehalt auf 260 % erhöht und blieb nach Koinkubation mit TGF-β1 unverändert.

Auf mRNA-Ebene erhöhte TGF-β1 den Kathepsin B-Gehalt schrittweise auf das Fünffache der unbehandelten Kontrolle. LPS allein induzierte einen Anstieg auf 600 %, wobei Koinkubation mit TGF-β1 diesen Wert nicht modifizierte.

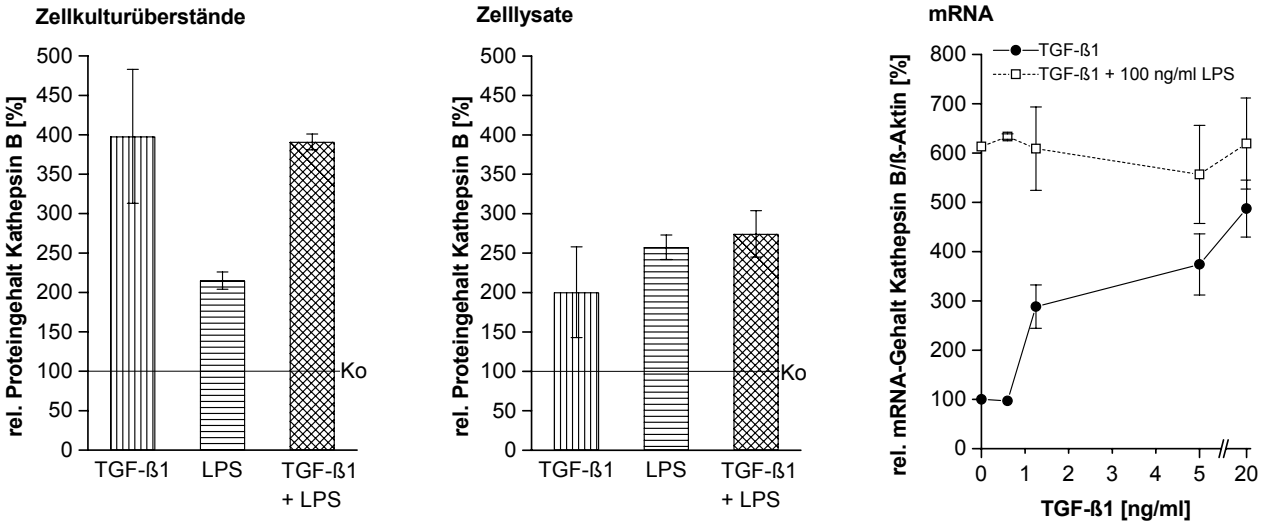

Abb. 17: Kathepsin B-Expression in der Zelllinie MonoMac-1 nach TGF-β1- und LPS-Inkubation nach drei Tagen (n=3). Der Kathepsin B-Gehalt in den Zellkulturüberständen und Zelllysaten wurde durch ELISA bestimmt. Der Kathepsin B mRNA-Gehalt wurde durch quantitative RT-PCR bestimmt und mit Hilfe des β-Aktin mRNA-Gehaltes normiert. Dargestellt ist der relative Gehalt im Vergleich zu den auf 100 % gesetzten (horizontale Funktionsgraphen) unbehandelten Kontrollansätzen (Mittelwert ± SEM). Überstände und Zelllysate wurden nach Zugabe von 20 ng/ml TGF-β1 analysiert. Im mRNA-Diagramm repräsentiert die durchgehende Linie die TGF-β1-Inkubation. Die gestrichelte Linie stellt die Ergebnisse der Koinkubation mit ansteigenden TGF-β1-Konzentrationen dar. Die LPS-Konzentration betrug in allen Ansätzen 100 ng/ml.

TGF-β1 verursachte auch in MonoMac-1-Zellen eine Erhöhung der Kathepsin B-Expression. Die stimulatorische Wirkung von LPS war vor allem auf der RNA-Ebene deutlich messbar. Bei Koinkubationen der beiden Stimuli konnten keine additiven Effekte festgestellt werden.

3.2.2.5 MonoMac-6-Zellen: Kathepsin L-Expression nach TGF-β1/LPS-Inkubation

In Abbildung 18 sind die Kathepsin L-Konzentrationen von MonoMac-6-Zellen in den Zellkulturüberständen, den Zelllysaten und auf mRNA Ebene nach TGF-β1- und LPS-Inkubation sowie nach TGF-β1/LPS-Koinkubation dargestellt. Die TGF-β1-Inkubation induzierte keine Änderung der Kathepsin L-Expression in MonoMac-6-Zellen. LPS verursachte eine Steigerung des Kathepsin L-Gehaltes in Zellkulturüberständen auf 320 % sowie in Zelllysaten auf 230%. Die Kathepsin L-mRNA wurde auf 350 % erhöht. Koinkubationen von TGF-β1 und LPS erzielten keine Veränderung der LPS-induzierten erhöhten Kathepsin L-Expression.

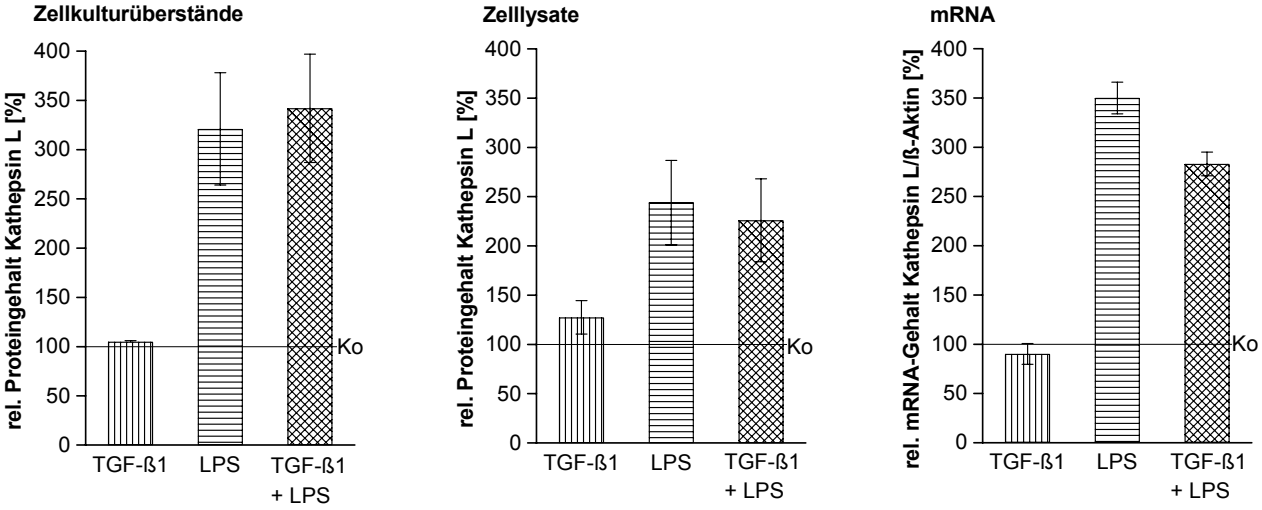

Abb. 18: Kathepsin L-Expression in MonoMac-6-Zellen nach TGF-β1- und LPS-Inkubation für drei Tage (n=3). Der Kathepsin L-Gehalt in den Zellkulturüberständen und Zelllysaten wurde durch ELISA bestimmt. Der Kathepsin L mRNA-Gehalt wurde durch quantitative RT-PCR bestimmt und mit Hilfe des β-Aktin mRNA-Gehaltes normiert. Dargestellt ist der relative Gehalt im Vergleich zu unbehandelten Kontrollansätzen (horizontale Funktionsgraphen), die auf 100 % gesetzten wurden (Mittelwert ± SEM). TGF-β1 und LPS wurden in Konzentrationen von 20 ng bzw. 100 ng/ml appliziert.

In MonoMac-6-Zellen konnte nur LPS die Kathepsin L-Expression erhöhen.

3.2.2.6 MonoMac-6-Zellen: Kathepsin B-Expression nach TGF-β1/LPS-Inkubation

In Abbildung 19 sind die Kathepsin B-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen, den Zelllysaten und auf mRNA-Ebene nach TGF-β1-, LPS-Inkubation und nach TGF-β1/LPS-Koinkubation dargestellt. Die TGF-β1-Inkubation steigerte die Kathepsin B-Expression in MonoMac-6 Zellkulturüberständen auf 250 %, in Zelllysaten auf 160 % sowie den mRNA-Gehalt auf 210 %.

Unter LPS-Einfluss war ein Anstieg des Kathepsin B-Gehaltes in Zellkulturüberständen auf 580 %, in Zelllysaten auf 270 % sowie des mRNA-Gehaltes auf 500 % nachweisbar.

Koinkubationen von TGF-β1 und LPS erzielten keine deutliche Veränderung der LPS-aufregulierten Kathepsin B-Expression.

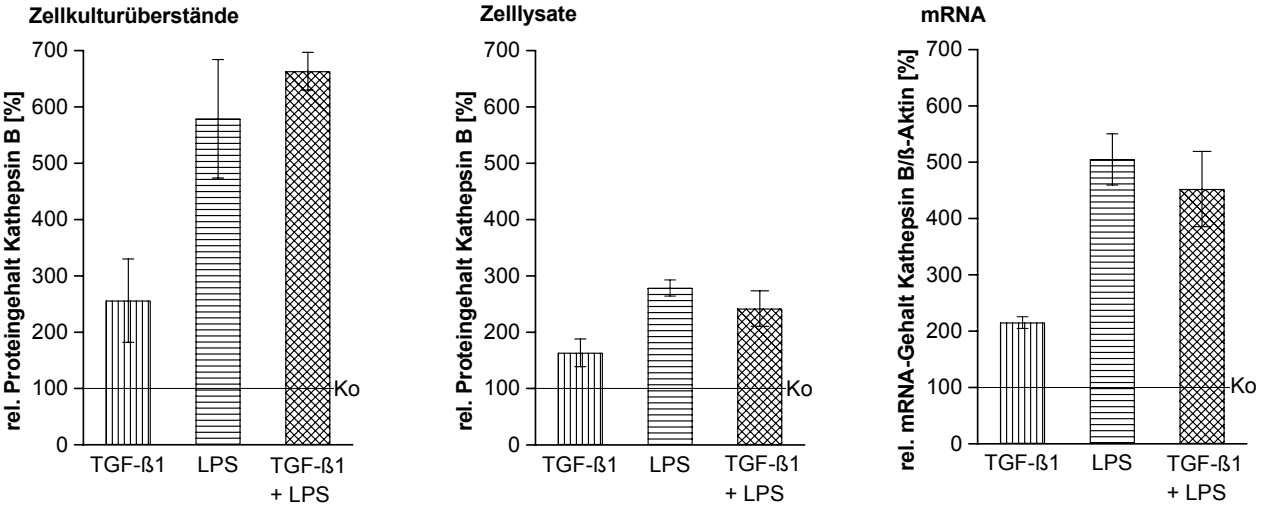

Abb. 19: Kathepsin B-Expression in MonoMac-6-Zellen nach TGF-β1- und LPS-Inkubation für drei Tage (n=3). Der Kathepsin B-Proteingehalt in den Zellkulturüberständen und Zelllysaten wurde durch ELISA bestimmt. Der Kathepsin B mRNA-Gehalt wurde durch quantitative RT-PCR bestimmt und mit Hilfe des β-Aktin mRNA-Gehaltes normiert. Dargestellt ist der relative Gehalt im Vergleich zu unstimulierten Kontrollansätzen (horizontale Funktionsgraphen), die auf 100 % gesetzt wurden (Mittelwert ± SEM). Die TGF-β1- und LPS-Konzentrationen lagen bei 20 ng/ml bzw. 100 ng/ml.

Zusammenfassend war festzustellen, dass TGF-β1 in myelo-monozytären Zelllinien die Kathepsin B-Expression erhöhte wobei THP-1-Zellen sowohl auf RNA-Ebene als auch in Zellkulturüberständen und Zelllysaten mit der höchsten Kathepsin B-Induzierbarkeit reagierten.

Eine Kathepsin L-Erhöhung durch TGF-β1 war nur in MonoMac-1-Zellen nachweisbar.

Die Kathepsin B- und L-Induzierbarkeit durch LPS stieg mit dem Differenzierungsgrad der Zellen, der anhand der CD14-Expression gemessen wurde. THP-1-Zellen reagierten nur schwach auf diesen Stimulus, gefolgt von den Zelllinien MonoMac-1 und MonoMac-6.

Koinkubationen von TGF-β1 mit LPS konnten die Effekte der Einzelinkubationen nicht modulieren.

In Tabelle 10 ist eine Übersicht der bisher erzielten Ergebnisse (Mittelwerte in % +/- SEM) dargestellt.

Tab. 10: Kathepsin L und Kathepsin B-Expression nach LPS und TGF-β1-Inkubation der Zelllinien THP-1, MonoMac-1 und MonoMac-6. Der Kathepsin Protein-Gehalt wurde durch ELISA gemessen, der mRNA-Spiegel wurde durch quantitative RT-PCR bestimmt.

➢ **Kathepsin L-Expression**

Stimulus	Zelllinie (Inkubationszeit)	Zellkulturüberstände (MW % +/- SEM)	Zelllysate (MW % +/- SEM)	mRNA (MW % +/- SEM)
LPS 100 ng/ml	THP-1 (2 Tage)	105 (+/-7)	110 (+/-9)	114 (+/-12)
	MonoMac-1 (3 Tage)	150 (+/-9)	175 (+/-11)	330 (+/-20)
	MonoMac-6 (3 Tage)	320 (+/-57)	230 (+/-42)	350 (+/-16)
TGF-β1 20 ng/ml	THP-1 (2 Tage)	113 (+/-9)	130 (+/-22)	112 (+/-10)
	MonoMac-1 (3 Tage)	250 (+/-34)	175 (+/-11)	300 (+/-38)
	MonoMac-6 (3 Tage)	105 (+/-2)	120 (+/-17)	90 (+/-10)

➢ **Kathepsin B-Expression**

Stimulus	Zelllinie	Zellkulturüberstände (MW % +/- SEM)	Zelllysate (MW % +/- SEM)	mRNA (MW % +/- SEM)
LPS 100 ng/ml	THP-1 (2 Tage)	131 (+/-16)	180 (+/-38	210 (+/-29)
	MonoMac-1 (3 Tage)	200 (+/-11)	260 (+/-15)	600 (+/-30)
	MonoMac-6 (3 Tage)	580 (+/-100)	270 (+/-14)	500 (+/-45)
TGF-β1 20 ng/ml	THP-1 (2 Tage)	340 (+/-26)	500 (+/-61)	580 (+/-70)
	MonoMac-1 (3 Tage)	400 (+/-80)	200 (+/-50)	500 (+/-50)
	MonoMac-6 (3 Tage)	250 (+/-70)	160 (+/-24)	210 (+/-10)

3.2.3 Kathepsin B mRNA-Expression nach TGF-β1-Inkubation in humanen peripheren Blutmonozyten

Aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse wurde der Fokus der Untersuchungen von humanen peripheren Blutmonozyten auf die Expression der Kathepsin B-mRNA als ein gutes Maß für die Kathepsinbildung nach TGF-β1-Inkubation gelegt. Die stimulatorische Wirkung von TGF-β1 auf die Kathepsin B mRNA-Expression nahm kontinuierlich mit zunehmendem Differenzierungsgrad der myelo-monozytären Zelllinien ab. Deshalb ergab sich als logische Schlussfolgerung, die Kathepsin B mRNA-Expression in reifen humanen peripheren Blutmonozyten zu untersuchen. Diese Zellen wurden mittels Gegenstrom-Zentrifugalelutriation isoliert (Kap. 2.1.2). Für die quantitativen mRNA-Analysen wurden jeweils 7×10^6 Zellen eingesetzt. TGF-β1 wurde in einer Konzentration von 20 ng/ml appliziert. Die Inkubationszeit lag bei drei Tagen. Die quantitativen RT-PCR-Reaktionen wurden wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben durchgeführt.

In Abbildung 20 ist die Kathepsin B-Konzentration auf mRNA-Ebene nach TGF-β1-Inkubation dargestellt. Nach Inkubation mit TGF-β1 erhöhte sich das Kathepsin B mRNA-Niveau in humanen peripheren Blutmonozyten leicht auf 120 %. Das Zytokin bewirkte somit keine deutliche Veränderung der Kathepsin B mRNA-Expression in humanen peripheren Blutmonozyten.

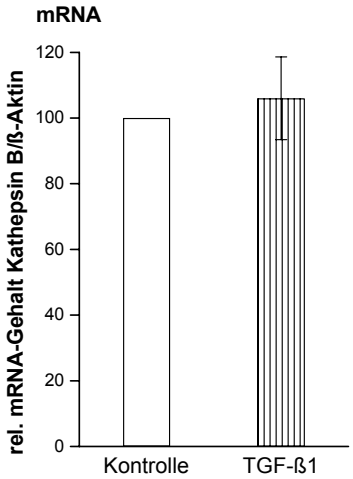

Abb. 20: Kathepsin B-mRNA-Expression in humanen peripheren Blutmonozyten nach TGF-β1-Inkubation für drei Tage (n=3). Der Kathepsin B mRNA-Gehalt wurde durch quantitative RT-PCR bestimmt und mit Hilfe des β-Aktin mRNA-Gehaltes normiert. Dargestellt ist der relative Gehalt im Vergleich zu unstimulierten Kontrollansätzen, die auf 100 % gesetzt wurden (Mittelwert ± SEM). Die TGF-β1-Konzentration lag bei 20 ng/ml.

3.3 Einfluss von LPS und TGF-β1 auf die Kathepsin K und Kathepsin S mRNA-Expression in myelo-monozytären Zelllinien

Um die Wirkung von TGF-β1 und LPS auf die Kathepsin K und Kathepsin S mRNA-Expression in den myelo-monozytären Zelllinien zu analysieren, wurden für die quantitativen mRNA-Analysen jeweils 2×10^6 Zellen eingesetzt. Die quantitativen RT-PCR-Reaktionen wurden wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben durchgeführt. TGF-β1 und LPS wurden in Konzentrationen von 20 ng/ml bzw. 100 ng/ml appliziert. Nach Inkubation der Zelllinien THP-1, MonoMac-1 und MonoMac-6 mit TGF-β1 und LPS konnte keine Veränderung der mRNA-Expression von Kathepsin K und Kathepsin S gemessen werden. Aus diesem Grund wurde auf die graphische Darstellung dieser Ergebnisse verzichtet.

3.4 Analyse der Stabilität und Neusynthese der Kathepsin B-mRNA nach Inkubation mit TGF-β1 in THP-1- und MonoMac-6-Zellen

TGF-β1 induzierte in den Zelllinien THP-1 und MonoMac-6 eine Erhöhung der Kathepsin B-mRNA Konzentration. Diese verstärkte Expression kann eine Folge erhöhter mRNA-Stabilisierung oder einer Steigerung der Neusynthese sein. Zur Analyse der Ursache der Kathepsin B-mRNA-Erhöhung wurde zunächst die Stabilität der Kathepsin B-mRNA unter Verwendung von Actinomycin D, einem potenten Inhibitor der Transkription, untersucht. Bei Inkubation der Zellen mit Actinomycin D erfolgt die Inhibition der mRNA-Neusynthese, wobei durch quantitative RT-PCR-Analysen nur bereits synthetisierte Transkripte detektiert werden. Diese sind den zellulären Abbaumechanismen unterworfen und je nach mRNA-Stabilität unterschiedlich lange in der Zelle nachweisbar.

Um den Anteil der neu synthetisierten Kathepsin B-mRNA in einer definierten Zeit zu bestimmen, wurden in einer zweiten Versuchsreihe intakte Zellkerne aus THP-1- und MonoMac-6-Zellen nach Inkubation mit und ohne TGF-β1 isoliert und einer *in vitro*-Transkriptionsreaktion (*nuclear runoff*-Experimente, Kap. 2.2.3.2) unterzogen. Im Laufe dieser Reaktion werden die durch Bindung von Transkriptionsfaktoren bereits initiierten Transkriptionsereignisse vollständig ausgeführt. Durch die anschließende quantitative RT-PCR-Analyse (Kap. 2.2.1) werden nur die neu synthetisierten mRNA-Moleküle erfasst, da die bereits in das Zytosol transportierten Transkripte durch die Zellkernisolierung entfernt wurden.

3.4.1 Kathepsin B mRNA-Stabilitätsanalyse in THP-1- und MonoMac-6-Zellen

1 x 10^6 THP-1 Zellen wurden 2 Tage und MonoMac-6-Zellen 3 Tage mit 20 ng/ml TGF-β1 oder ohne Stimulus inkubiert. Danach wurden 20 µg/ml Actinomycin D zugegeben und nach zwei bis acht Stunden geerntet (Kap. 2.2.3.1). Von diesen Proben wurden quantitative mRNA-Analysen durchgeführt, wie sie in Kapitel 2.2.2 erläutert wurden. In Abbildung 21 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt. Unbehandelte Proben wurden auf 100 % festgelegt.

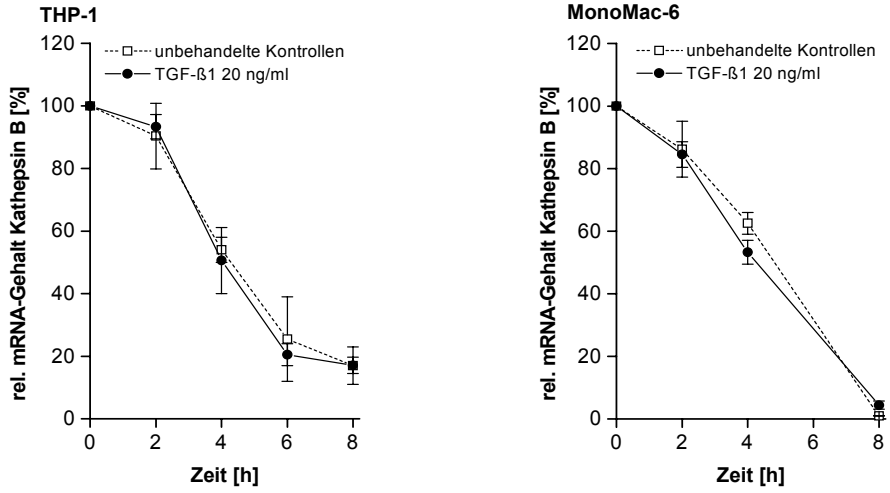

Abb. 21: Kathepsin B mRNA-Gehalt in TGF-β1-behandelten THP-1- und MonoMac-6-Zellen nach Transkriptionsinhibierung durch Actinomycin D (n=3). Der Kathepsin B mRNA-Gehalt wurde durch quantitative RT-PCR nach zwei Tagen in THP-1-Zellen und drei Tagen in MonoMac-6-Zellen bestimmt. Proben ohne Actinomycin D-Inkubation zum Zeitpunkt 0 h wurden auf 100 % gesetzt (Mittelwert ± SEM). Die applizierte Actinomycin D-Konzentration betrug 20 µg/ml.

Der Abbau der Kathepsin B-mRNA verlief in TGF-β1-behandelten Proben genauso schnell wie in unbehandelten Kontrollen. Es erfolgte keine Stabilisierung der Kathepsin B-mRNA nach TGF-β1-Inkubation.

3.4.2 Kathepsin B mRNA-Neusynthese in THP-1- und MonoMac-6-Zellen

Jeweils 20 x 10^6 THP-1- und MonoMac-6-Zellen wurden zwei und drei Tage mit 20 ng/ml TGF-β1 behandelt. Zum Nachweis der Kathepsin B mRNA-Neusynthese wurden intakte Zellkerne isoliert und *nuclear runoff*-Experimente durchgeführt, wie sie in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben wurden.

In Abbildung 22 sind die relativen Konzentrationen der neu synthetisierten Kathepsin B-Transkripte dargestellt. Unbehandelte Proben wurden auf 100 % (Ko, horizontaler Funktionsgraph) festgelegt.

In THP-1-Zellen wurde nach TGF-β1-Inkubation eine auf 680 % erhöhte mRNA-Neusynthese gemessen, während MonoMac-6-Zellen mit einer verdoppelten mRNA-Produktion auf diesen Stimulus reagierten.

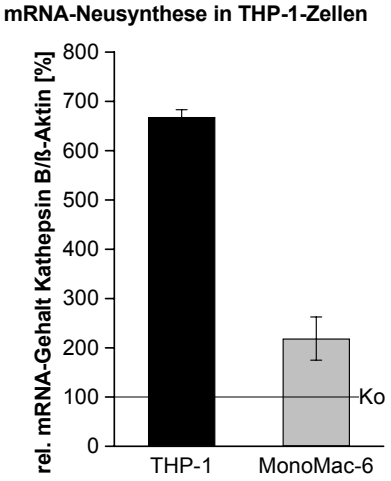

Abb. 22: Kathepsin B mRNA-Neusynthese nach TGF-β1-Inkubation von THP-1 und MonoMac-6-Zellen nach zwei und drei Tagen (n=3). Dargestellt ist der relative Gehalt im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne Stimulus (waagerechter Funktionsgraph), die auf 100 % gesetzt wurden (Mittelwert ± SEM). TGF-β1 wurde in einer Konzentration von 20 ng/ml eingesetzt.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die erhöhte mRNA-Expression in THP-1- und MonoMac-6-Zellen nach TGF-β1-Behandlung, eine Folge von verstärkter Neusynthese war und keine Konsequenz einer erhöhten mRNA-Stabilität.

3.5 Analyse der funktionellen Bedeutung der erhöhten Kathepsin B-Expression in THP-1-Zellen

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wird der Zysteinprotease Kathepsin B eine wichtige Funktion während der Tumorentstehung und –progression zugesprochen. In diesem Zusammenhang spielt die Migration und das Invasionsverhalten der Tumorzellen, sowie deren Fähigkeit dem programmierten Zelltod zu entgehen, eine herausragende Rolle.

Die nachfolgenden Experimente sollten die funktionellen Konsequenzen einer Kathepsin B-Überexpression nach TGF-β1-Inkubation bezüglich Migration/Invasion und Apoptose in dem ausgewählten Zellsystem beleuchten.

Aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse wurde der Schwerpunkt der weiteren Arbeiten auf die Kathepsin B-Expression nach TGF-β1-Induktion in THP-1-Zellen gelegt. Hier wurde die größte Veränderung der Kathepsin-Expression festgestellt. Die Sekretion von Kathepsin B stieg auf 340 %, der Gehalt in Zelllysaten wurde auf 500 % gesteigert und die mRNA-Konzentration erhöhte sich auf 580 %. Im Gegensatz dazu veränderte sich die Kathepsin L-Expression nur minimal (siehe auch Abb. 15 und Tab. 10).

Es wurden funktionelle Tests durchgeführt, um die physiologische Funktion der Kathepsin B-Überexpression in diesem Zellsystem sowohl extrazellulär als auch intrazellulär zu überprüfen. Als funktioneller Test von extrazellulär vorhandenem Kathepsin B wurden Migrations-/Invasionsversuche durchgeführt. Dieser Test repräsentiert das proteolytische Potential in Zellkulturüberständen. Anschließend wurde die intrazelluläre Aktivität dieser Protease mit und ohne TGF-β1-Induktion gemessen und die Auswirkung einer veränderten Kathepsin B-Aktivität auf den programmierten Tod von THP-1-Zellen analysiert. Dazu wurde der Kathepsin-Inhibitor E64 eingesetzt. E64 hemmt extrazellulär vorhandene Kathepsine während E64d, die membrangängige Form des Inhibitors, auch intrazelluläre Kathepsine inhibiert.

3.5.1 Migrations- und Invasionsverhalten von THP-1-Zellen nach TGF-β1-Inkubation in Anwesenheit von E64

In den nachfolgenden Experimenten sollte getestet werden, ob die Erhöhung der Kathepsin B-Sekretion durch TGF-β1 die Migration/Invasion von THP-1-Zellen verändert und welchen Einfluss der Kathepsin-Inhibitor E64 auf diese funktionelle Zelleigenschaft ausübt. Für diese Experimente wurde die nicht-membrangängige Form dieses Inhibitors eingesetzt, da nur der extrazelluläre Kathepsin-Anteil gehemmt werden sollte.

Zur Messung der Migration/Invasion wurden 0,5 x 10^6 THP-1-Zellen zwei Tage mit und ohne TGF-β1 inkubiert und anschließend je 0,4 x 10^6 Zellen mit und ohne E64-Zugabe in *Transwell*-Kammern gegeben. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach 24 Stunden Migration-/Invasionszeit wurden die Zellen im unteren Teil der Kammern gezählt. Die genaue Versuchsdurchführung wurde in Kapitel 2.1.4 erläutert.

Abbildung 23 zeigt die Migrations-/Invasionsrate der THP-1-Zellen nach Inkubation mit 20 ng/ml TGF-β1 und anschließender E64-Zugabe. E64 wurde in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe appliziert. Die Migrations-/Invasionsrate der unbehandelten Kontrollproben wurde auf 100 % gesetzt.

TGF-β1 erhöhte das Migrations- und Invasionsvermögen der Zellen auf 330 %. Diese Rate wurde schrittweise mit steigender E64-Konzentration gesenkt. Die höchste eingesetzte E64-Konzentration von 20 µM senkte die durch TGF-β1-induzierte erhöhte Migrations- und Invasionsrate von 330 % auf 210 %.

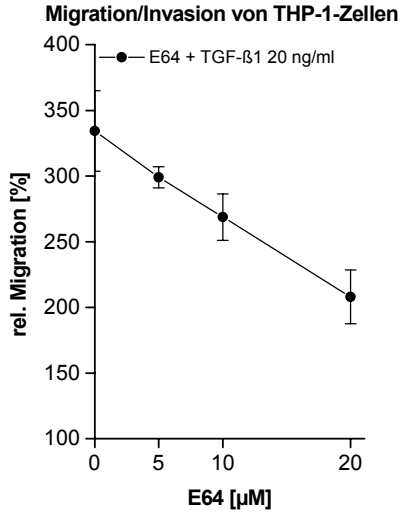

Abb. 23: Einfluss von E64 auf die TGF-β1-induzierte Migration von THP-1-Zellen (n=3). Die Migrationsrate wurde anhand der Zellzahl bestimmt, die durch Matrigel-beschichtete Membranen von Transwell-Kammern wanderten. Dargestellt ist die relative Migration im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne Stimulus (Start der Y-Achse), die auf 100 % gesetzt wurden (Mittelwert ± SEM).

TGF-β1 verursachte eine erhöhte Migrations- und Invasionsrate von THP-1-Zellen. E64 ein nicht membrangängiger Kathepsin-Inhibitor verminderte diese erhöhte Migrations/Invasionsrate dosisabhängig.

3.5.2 Enzymatische Aktivität von Kathepsin B und Kathepsin L in THP-1-Zellen nach TGF-β1-Inkubation in Anwesenheit des membrangängigen Kathepsin-Inhibitors E64d

Die folgenden Versuche sollten klären, ob die TGF-β1-induzierte erhöhte Kathepsin B-Proteinexpression zu einer verstärkten intrazellulären proteolytischen Aktivität dieses Enzyms führt und wie diese sich in Anwesenheit des membrangängigen Kathepsin-Inhibitors E64d verändert. Dazu wurden 2 x 10^6 THP-1-Zellen 2 Tage mit TGF-β1 und E64d getrennt und in Kombination behandelt. Zur Demonstration des spezifischen E64d-Effektes wurde der Inhibitor in einer ansteigenden Konzentrationsreihe appliziert. Die eingesetzte TGF-β1-Konzentration betrug 20 ng/ml. Die Werte der unbehandelten Kontrollproben wurden auf 100 % festgelegt.

Die Lysosomen/Endosomen dieser Zellen wurden isoliert (Kap. 2.3.1.1). Anschließend wurden die Kathepsin B- und Kathepsin L-Aktivitätsmessungen durchgeführt (Kap. 2.3.1.2).

➢ **Kathepsin B- und Kathepsin L-Aktivitäten in THP-1-Zellen**

Abbildung 24 dokumentiert die Kathepsin B- und Kathepsin L-Aktivitäten in Lysosomen nach Inkubation mit E64d und TGF-β1.

Die Inkubation mit E64d reduzierte die **Kathepsin B-Aktivität** konzentrationsabhängig auf 50 % bei der höchsten eingesetzten E64d-Konzentration von 10 µM.

TGF-β1-Inkubation (20 ng/ml) erhöhte die Kathepsin B-Aktivität auf 230 %. Sie fiel durch Inhibitor-Koinkubation auf 100 % bei 5 µM E64d. Dieser Wert entsprach der Kathepsin B-Basalaktivität. Die Aktivitätsrate lag hier jedoch deutlich oberhalb des Wertes der durch die alleinige Inkubation mit 5 µM E64 erzielt wurde (60 %).

Durch Koinkubation von TGF-β1 mit 10 µM E64d wurde die Kathepsin B-Aktivität auf 50 % des Basalwertes erniedrigt. Diese Inhibitor-Konzentration reduzierte die Kathepsin B-Aktivität auf das Niveau der Einzelinkubation mit 10 µM E64d.

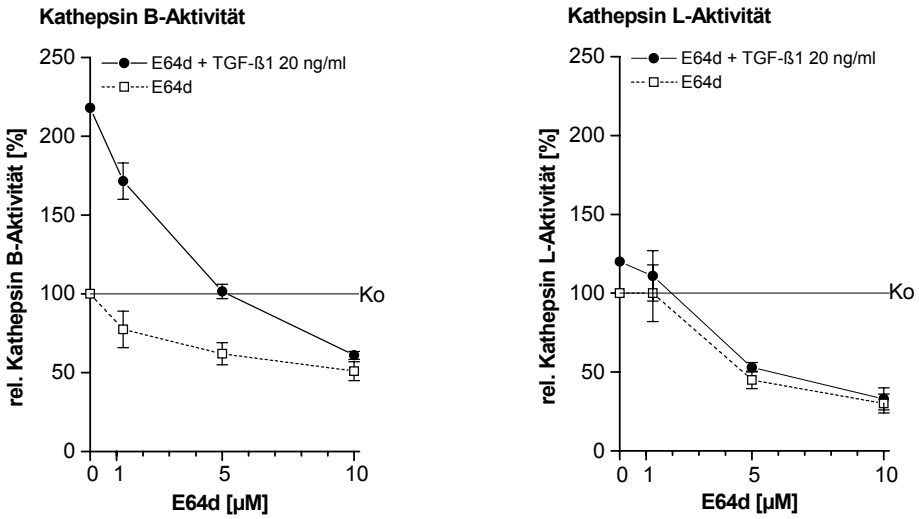

Abb. 24: Kathepsin B- und Kathepsin L-Aktivitäten in THP-1-Zellen nach E64d-Zugabe und TGF-β1-Inkubation sowie nach Koinkubation mit Inhibitor und Zytokin für zwei Tage (n=3). Die Kathepsin-Aktivitäten wurden durch die Spaltung spezifischer Substrate gemessen. Dargestellt ist die relative Aktivität im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne Stimulus, die auf 100 % gesetzt wurden (Mittelwert ± SEM). Die gestrichelten Linien repräsentieren die Aktivitäten nach E64d-Inkubation. Die durchgehenden Linien zeigen die Ergebnisse der Koinkubation mit ansteigenden E64d-Konzentrationen.

Zur Kontrolle, dass die Inkubation mit TGF-β1 selektiv die Kathepsin B-Aktivität aufregulierte, wurde auch die **Kathepsin L-Aktivität** überprüft. TGF-β1 hatte auf die mRNA- und Protein-Expression dieser Protease in THP-1-Zellen keinen modulierenden Einfluss.

Durch E64d-Zugabe wurde die basale Kathepsin L-Aktivität konzentrationsabhängig bis auf 30 % gehemmt. Die Kathepsin L-Aktivität wurde durch TGF-β1 minimal auf 120 % erhöht, passte sich aber nach E64d-Koinkubation den Werten derjenigen Proben an, die nur mit Inhibitor behandelt wurden.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die TGF-β1-induzierte Kathepsin B-Aktivität erst durch Zugabe von 5 µM E64d supprimiert werden konnte.

Die Aktivität von Kathepsin L konnte durch TGF-β1 nach Hemmung durch E64d nicht verändert werden.

3.5.3 Apoptose-Raten von THP-1-Zellen nach TGF-β1-Inkubation in Anwesenheit des membrangängigen Kathepsin-Inhibitors E64d

Die Frage nach dem Einfluss von Veränderungen in der Kathepsin B-Aktivität auf den programmierten Zelltod von THP-1-Zellen sollte durch die folgenden Experimente geklärt werden.

Im Verlauf der Apoptose kommt es in späteren Phasen zur Aktivierung von Endonukleasen, die die Chromatinstruktur des Zellkerns fragmentieren. Nach der TUNEL-Färbung (***T**erminal deoxynucleotidyl Transferase* Biotin-d**U**TP **N**ick **E**nd **L**abeling) können diese DNA-Fragmente mittels durchflusszytometrischen Analysen detektiert werden (Kap. 2.1.6).

Zur Bestimmung der Apoptose-Raten wurden 2×10^6 THP-1-Zellen drei Tage mit E64d und TGF-β1 getrennt sowie gemeinsam inkubiert. E64d wurde in einer Konzentrationsreihe appliziert. Die TGF-β1-Konzentration betrug konstant 20 ng/ml.

Die nachfolgende Abbildung 25 zeigt die Apoptose-Raten nach Inkubation der Zellen mit TGF-β1 sowie dem membrangängigen Kathepsin-Inhibitor E64d, getrennt und in Koinkubation. Die unbehandelte Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt (horizontaler Funktionsgraph, Ko).

E64d verursachte einen deutlichen konzentrationsabhängigen Apoptose-Anstieg, der bei 1 µM bereits 230 % betrug. Die Apoptose-Rate wurde durch 5 µM Inhibitor auf 390 % erhöht und stieg auf 470 % bei der höchsten eingesetzten Inhibitor-Konzentration (10 µM).

TGF-β1 alleine verringerte den Anteil apoptotischer Zellen auf 60 %.

Die Apoptose-Rate nach 5 µM E64d-Inkubation betrug 390 %, während das Niveau nach Koinkubation des Inhibitors mit TGF-β1 etwa auf den Basalwert von 100 % reduziert wurde. Die Apoptose-Induktion durch 5 µM E64d wurde somit durch 20 ng/ml TGF-β1-Zugabe vollständig aufgehoben.

Die Apoptose-Rate stieg nach Koinkubation von TGF-β1 mit 10 µM E64d auf 170 %. Sie war demnach im Vergleich zur 10 µM E64d-Einzelinkubation um den Faktor 2,7 erniedrigt.

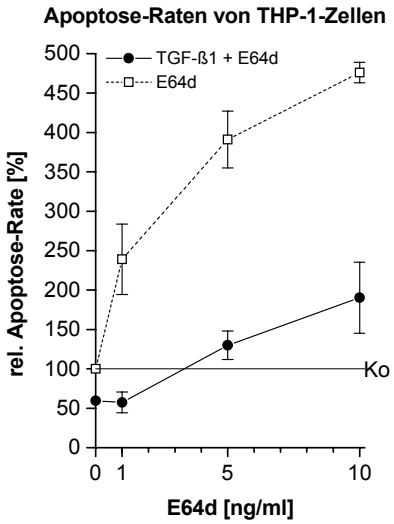

Abb. 25: Einfluss von E64d und TGF-β1, einzeln und in Kombination, auf die Apoptoseraten von THP-1-Zellen (n=3). Die Apoptose-Induktion wurde nach TUNEL-Färbung der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist die relative Apoptose-Rate im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne Stimulus, die auf 100 % gesetzt wurden (Mittelwert ± SEM). Die gestrichelte Linie repräsentiert die Apoptose-Rate nach E64d-Inkubation. Die durchgehende Linie zeigt die Ergebnisse der Koinkubation von TGF-β1 und E64d.

Diesen Ergebnissen zufolge spielt Kathepsin B in THP-1-Zellen eine antiapoptotische Rolle. Inhibition der Kathepsin-Aktivität durch E64d führte zu einer stark erhöhten Apoptose. Wurde die Kathepsin B-Expression durch TGF-β1-Zugabe gesteigert, so konnte während der Koinkubation von Stimulus und Inhibitor, der Effekt des Inhibitors aufgehoben, und die Apoptose-Rate wieder gesenkt werden.

3.6 Analyse der TGF-β1-induzierten Signaltransduktionswege und deren Einfluss auf die Kathepsin B-Genregulation

Bisher wurde die veränderte Kathepsin-Expression durch unterschiedliche Stimuli untersucht. TGF-β1 verursachte in myelo-monozytären Zelllinien eine Aufregulation von Kathepsin B. Im Folgenden sollte geklärt werden, welche TGF-β1-Signalwege für diese Kathepsin B-Aufregulation verantwortlich sind.

Die Regulation der Kathepsin B-Expression in myelo-monozytären Zelllinien wurde mit einer epthelialen Zelllinie verglichen. Dazu wurde die adhärent wachsende Lungenepithelzelllinie A-549 ausgewählt. Von diesen Zellen ist aus früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bekannt [81,82], dass TGF-β1 inhibitorisch auf die Kathepsin B-Expression wirkt.

Die TGF-β1-Rezeptor-vermittelte Signalübermittlungskette verläuft vorwiegend über Smad-Proteine. Es sind aber auch Smad-unabhängige Signaltransduktionskaskaden beschrieben worden, die die Proteinkinasen p38, ERK1/2 und JNK einbeziehen. Im Folgenden sollte geklärt werden, welche Signalwege in den analysierten Zellen durch TGF-β1 aktiviert werden und ob es Unterschiede zwischen THP-1-, MonoMac-6-, und A-549-Zellen gibt.

Dazu wurden jeweils 1 x 10^6 Zellen von 5 bis 360 Minuten mit 20 ng/ml TGF-β1 behandelt. Die Proben wurden wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben behandelt, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blotting auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die monoklonalen Phospho-spezifischen Antikörper gegen Phospho-Smad2, Phospho-p38, Phospho-ERK1/2 und Phospho-JNK dienten der semiquantitativen Darstellung aktivierter Signalmoleküle. Antikörper mit einer Phosphorylierungs-unabhängigen Epitopspezifität gegen die jeweiligen Proteine wurden zur Kontrolle des Proteingehaltes und der Normierung der Ergebnisse genutzt. Die Banden wurden densitometrisch vermessen, die numerischen Verhältnisse aus der Intensität der Phospho-Banden und nicht-Phospho-Banden wurden errechnet und graphisch dargestellt. Die Werte der unbehandelten Kontrollproben wurden auf 100 % gesetzt. In den Abbildungen ist jeweils ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

3.6.1 Smad2-Phosphorylierung in THP-1-, MonoMac-6- und A-549-Zellen

Durch die nachfolgenden Experimente sollte analysiert werden, ob das zentrale Signalmolekül Smad2 in den myelo-monozytären Zelllinien THP-1, MonoMac-6 und in der epithelialen Zelllinie A-549 phosphoryliert und somit in beiden Zelltypen durch TGF-β1 aktiviert wurde. Smad2 besitzt ein Molekulargewicht von 52,3 kDa und wird von dem TGF-β1-Rezeptor Typ I an den C-terminal liegenden Aminosäureresten $Serin_{465}$ und $Serin_{467}$ phosphoryliert.

➢ **Smad2-Phosphorylierung in THP-1-Zellen**

In Abbildung 26 sind die Ergebnisse der Smad2-Western-Blot-Analyse und die densitometrische Analyse der Banden in THP-1-Zellen dargestellt. Nach TGF-β1-Inkubation wurde Smad2 in diesen Zellen aktiviert, die phosphorylierte Form des Proteins war nach 60 Minuten deutlich sichtbar (Abb. 26 A). In Abbildung 26 B ist der gesamte Smad2-Gehalt in THP-1-Zellen dargestellt. Die densitometrische Auswertung stellt das numerische Verhältnis der Phospho-Banden zu nicht-Phospho-Banden dar und verdeutlicht die zeitabhängige zunehmende Aktivierung von Smad2 zu P-Smad2 beginnend mit 250 % nach 30 Minuten bis 780 % nach sechs Stunden (Abb. 26 C)

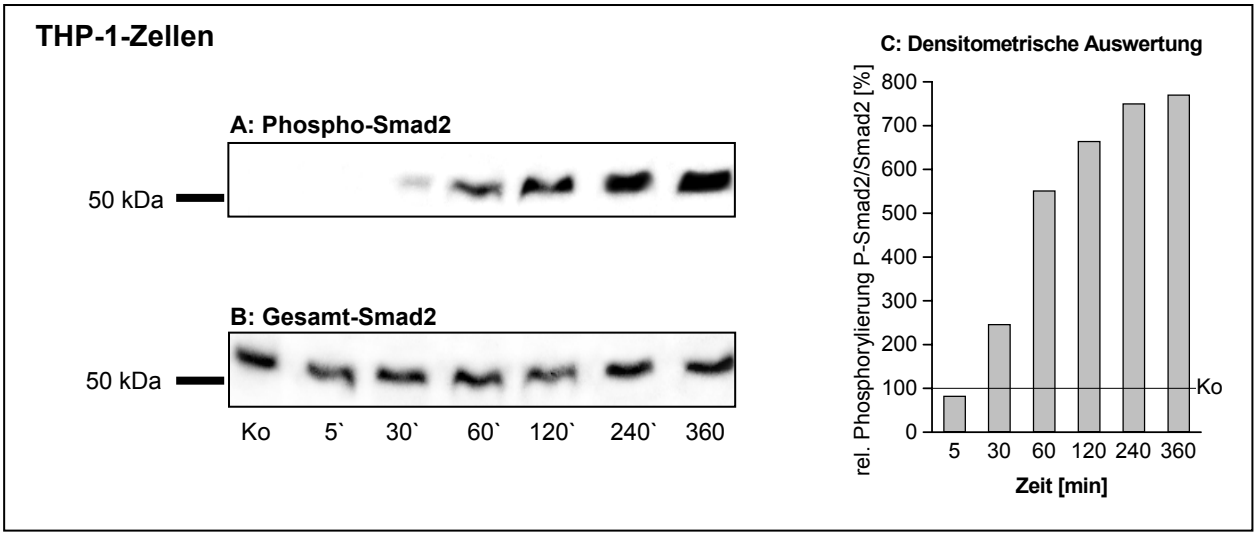

Abb. 26: Western-Blot-Analyse und densitometrische Auswertung der TGF-β1-induzierten zeitabhängigen Smad2-Phosphorylierung in THP-1 Zellen. Nach densitometrischer Vermessung der Signale wurde jeweils das numerische Verhältnis von Phospho-Banden (A) zu den Banden des gesamten Smad2-Gehaltes (B) berechnet und graphisch dargestellt (C). Kontrollproben wurden auf 100 % gesetzt (horizontaler Funktionsgraph). Die eingesetzte TGF-β1-Konzentration betrug 20 ng/ml.

Dieses Ergebnis zeigte, dass Smad2 in der myelo-monozytären Zelllinie THP-1 nach Inkubation mit TGF-β1 phosphoryliert wurde.

➢ **Smad2-Phosphorylierung in MonoMac-6-Zellen**

In Abbildung 27 sind die Ergebnisse der Smad2-Western-Blot-Analysen in MonoMac-6-Zellen dargestellt. Phospho-Smad2 wurde in diesen Zellen bereits nach 5 Minuten TGF-β1-Inkubation deutlich sichtbar, das Signalprotein wurde somit aktiviert (Abb. 27 A). Der gesamte Smad2-Proteingehalt der jeweiligen Proben ist in Abbildung 27 B dargestellt. Die densitometrische Auswertung stellt das numerische Verhältnis der Intensität der Phospho-Banden zu den entsprechenden Banden des gesamten Smad2-Proteingehaltes dar (Abb. 27 C). Die Aktivierung von Smad begann nach 5 Minuten mit 550 %, steigerte sich bis 1300 % nach zwei Stunden und sank nach drei Stunden auf 1000 %.

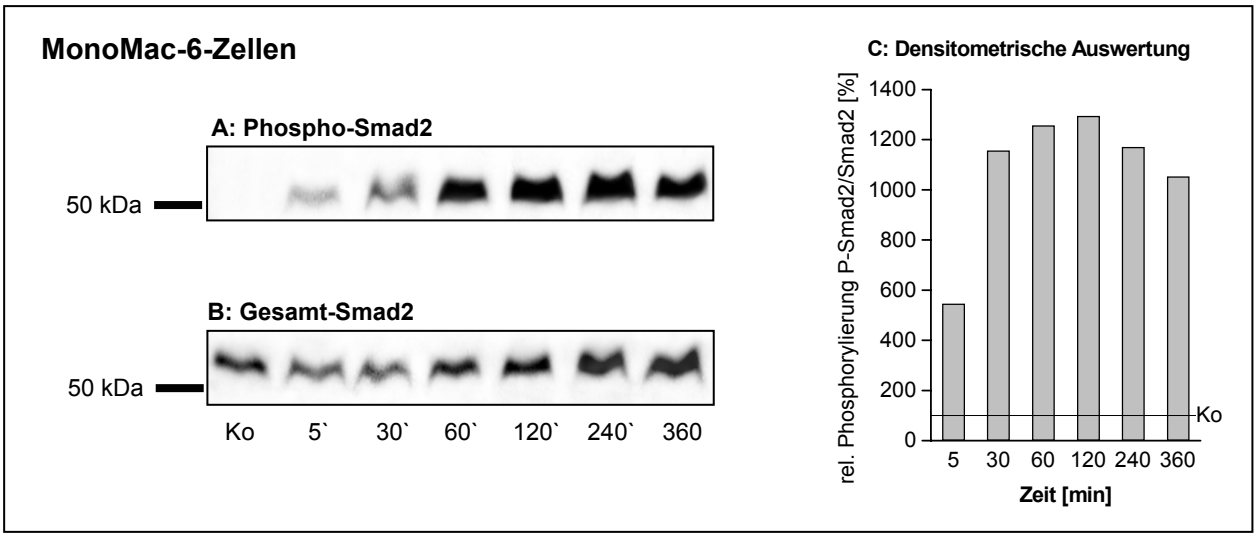

Abb. 27: Western-Blot-Analyse der TGF-β1-induzierten zeitabhängigen Smad2-Phosphorylierung. in MonoMac-6-Zellen. Nach densitometrischer Vermessung der Signale aus (A) und (B) wurde jeweils das numerische Verhältnis von Phospho-Banden zu den Banden des gesamten Smad2-Gehaltes berechnet und graphisch dargestellt (C). Kontrollproben wurden auf 100 % gesetzt (horizontaler Funktionsgraph). Die eingesetzte TGF-β1-Konzentration betrug 20 ng/ml.

Auch in MonoMac-6-Zellen wurde Smad2 sehr schnell und deutlich phosphoryliert. Es fand eine effiziente Induktion der Smad-abhängigen TGF-β1-Signaltransduktionskaskade durch die Rezeptoren statt.

➢ **Smad2-Phosphorylierung in A-549-Zellen**

In Abbildung 28 sind die Ergebnisse der Smad2-Western-Blot-Analysen in A-549-Zellen dargestellt.

Phosphoryliertes Smad2 war nach 5 Minuten TGF-β1-Inkubation nachweisbar (Abb. 28 A). Der gesamte Smad2-Proteingehalt ist in Abbildung 28 B dargestellt. Abbildung 28 C zeigt das numerische Verhältnis von phosphoryliertem Smad2-Proteinanteil zum gesamten Smad2-Proteingehalt nach densitometrischer Vermessung. Die Smad2-Phosphorylierungsrate stieg nach 5 Minuten auf 400 %, die maximale Aktivität wurde mit 13700 % nach zwei Stunden erreicht und nach drei Stunden fiel sie auf 3000 % zurück. In der epithelialen Zelllinie A-549 erfolgte demnach eine deutliche Smad2-Aktivierung nach TGF-β1-Inkubation.

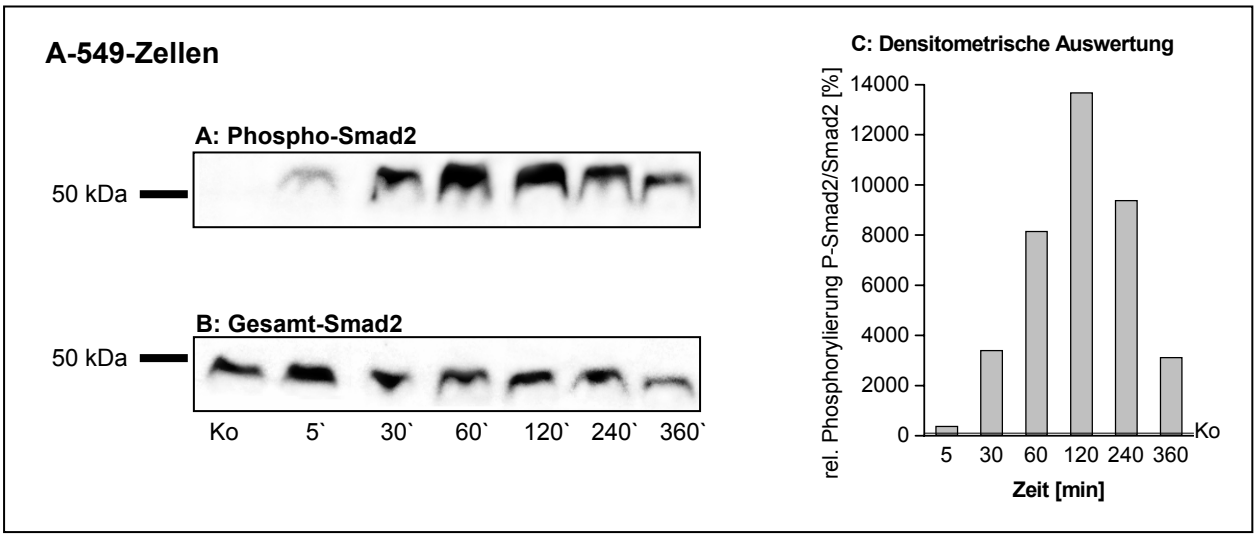

Abb. 28: Western-Blot-Analyse der TGF-β1-induzierten zeitabhängigen Smad2-Phosphorylierung in A-549-Zellen. Nach densitometrischer Vermessung der Signale aus (A) und (B) wurde jeweils das numerische Verhältnis von Phospho-Banden zu den Banden des gesamten Smad2-Gehaltes berechnet und graphisch dargestellt (C). Kontrollproben wurden auf 100 % gesetzt (Ko, horizontaler Funktionsgraph). Die eingesetzte TGF-β1-Konzentration betrug 20 ng/ml.

Insgesamt wurde gezeigt, dass Smad2 in THP-1, MonoMac-6- und A-549-Zellen aktiviert wurde, wobei die Phosphorylierungsintensität große Unterschiede aufwies. Die Aktivierungsrate war bei den sehr undifferenzierten myelo-monozytären THP-1-Zellen am geringsten, gefolgt von den reiferen MonoMac-6-Zellen und den epithelialen Zellen A-549, die mit einer Maximalintensität von 14000 % die stärkste Smad2-Phosphorylierung aufwiesen. Diese unterschiedlichen Aktivierungsraten von Smad2 konnten jedoch nicht die Ursache dafür sein, dass TGF-β1-Behandlung in monozytären Zellen zu einer Kathepsin B-Expressionsinduktion führte, während A-549-Zellen mit einer Kathepsin B-Expressionshemmung auf diesen Stimulus reagierten.

3.6.2 Die Smad- und TGF-β1/BMP-Rezeptor-Expressionsmuster in den Zelllinien THP-1, MonoMac-6 und A-549

Da die Ursache der unterschiedlichen Kathepsin B-Genregulation nicht in der Expression und Phosphorylierung von Smad2 lag, wurden in den folgenden Experimenten die Expression von Smad1, Smad2, Smad3, Smad4, Smad5, Smad6 und Smad7 sowie den TGF-β1/BMP-Rezeptoren in den monozytären Zelllinien MonoMac-6 und THP-1 im Vergleich zu der Epithelzelllinie A-549 untersucht. Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit dem Labor von Dr. O. Eickelberg in Giessen durchgeführt.

- **Smad-Expressionsmuster**

Die Smads2/3 vermitteln die TGF-β1-Signaltransduktion, Smad1 und Smad5 werden sowohl durch TGF-β1 als auch durch BMP aktiviert.

In Abbildung 29 sind die Ergebnisse von Smad-spezifischen RT-PCR-Reaktionen der Zelllinien A-549, THP-1 und MonoMac-6 (jeweils Spur 1, 2 und 3) dargestellt. Es gab deutliche Unterschiede bei der Expression von Smad1 zwischen der Epithelzelllinie und den myelo-monozytären Zellen. Dieses signalübermittelnde Protein kann sowohl durch TGF-β1 als auch durch BMP aktiviert werden. Während Smad1 auf dieser Ebene in A-549-Zellen deutlich nachweisbar war, fehlten die spezifischen Banden vollständig in MonoMac-6-Zellen, und in den THP-1 Zellproben ist sie nur sehr schwach sichtbar.

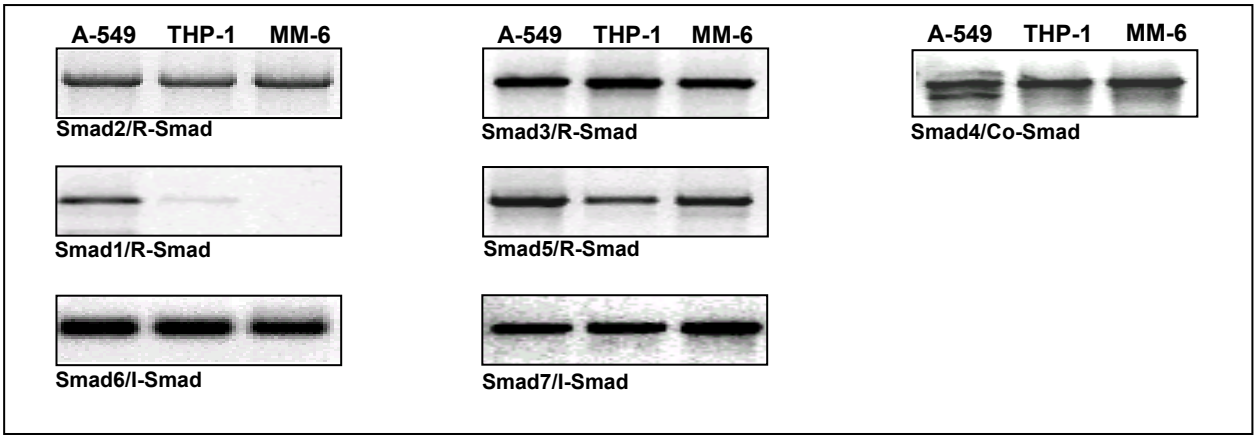

Abb. 29: RT-PCR-Analysen der Smad1-, Smad2-, Smad3-, Smad4-, Smad5-Smad6- und Smad7-Expression der Zelllinien A-549 (Spur 1), THP-1 (Spur 2) und MonoMac-6 (Spur3).

Der Befund, dass Smad1 eine unterschiedliche Expression in myelo-monozytären Zelllinien und der epitheliale Zelllinie A-549 aufweist, könnte auf einen wichtigen Unterschied in der TGF-β1- und BMP-vermittelten Signalkaskade zwischen den Zelllinientypen hindeuten.

➢ **TGF-β1/BMP Rezeptor-Expressionsmuster**

Abbildung 30 zeigt die Expression der TGF-β1/BMP Rezeptor-mRNA. Die Typ II-Rezeptoren für TGF-β1 und BMP (TβRII, BMPRII) werden in beiden Zelllinientypen auf mRNA-Ebene exprimiert. Der Typ I-Rezeptor für TGF-β1 (ALK5) wurde sowohl in myelo-monozytären Zelllinien als auch in der Epithelzelllinie A-549 nachgewiesen. Das gleiche gilt für die TGF-β1/BMP Typ I-Rezeptoren ALK1 und ALK2. Der BMP-spezifische Typ I-Rezeptor ALK3 wurde auf mRNA-Ebene ebenfalls in allen Zellen exprimiert.

Die Expression des BMP Rezeptors Typ II und BMP Rezeptors Typ I (ALK3) wurden in Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. O. Eickelberg in Giessen untersucht.

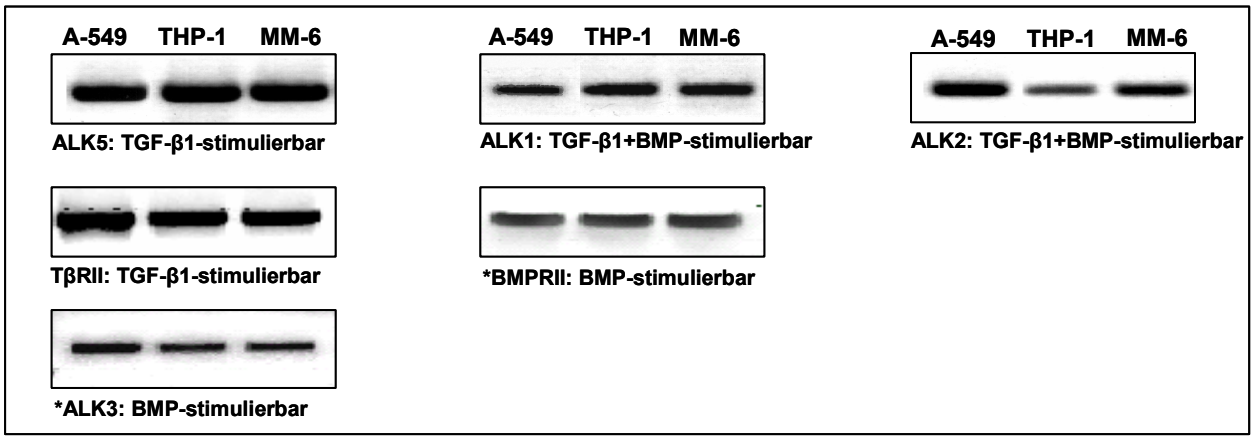

Abb. 30: RT-PCR-Analysen der TGF-β1/BMP Rezeptor-Expression in den Zelllinien A-549 (Spur 1), THP-1 (Spur 2) und MonoMac-6 (Spur3). Die mit (*)-markierten Rezeptoren wurden in Kooperation mit dem Labor von Dr. O. Eickelberg analysiert.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass sowohl in den myelo-monozytären Zelllinien THP-1 und MonoMac-6 als auch in der epithelialen Zelllinie A-549 die TGF-β1- und BMP-Rezeptoren exprimiert wurden.

3.6.3 Kathepsin B mRNA-Expression in THP-1-, MonoMac-6- und A-549-Zellen nach BMP-2-Inkubation

Smad1 ist ein Bindeglied zwischen den TGF-β1- und den BMP-induzierten Signalwegen (Abbildung. 4). Es kann durch beide Stimuli aktiviert werden. Smad1 wurde im Gegensatz zu den epithelialen A-549-Zellen, in MonoMac-6-Zellen nicht und in THP-1-Zellen nur sehr schwach exprimiert. Deshalb sollte analysiert werden, ob die Inkubation mit BMP in den untersuchten Zellen zu einer veränderten Kathepsin B mRNA-Expression führt.

Dazu wurden 2 x 10^6 THP-1-, MonoMac-6- und A-549-Zellen mit BMP-2 in einer ansteigenden Konzentrationsreihe von 5 ng/ml bis 200 ng/ml zwei und drei Tage stimuliert.

Die quantitativen RT-PCR-Reaktionen wurden wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben durchgeführt. Die Werte der unbehandelten Kontrollen wurden auf 100 % festgelegt.

Abbildung 31 zeigt die Expression von Kathepsin B-mRNA nach BMP-2-Inkubation. THP-1- und MonoMac-6-Zellen zeigten auch bei hohen BMP-2-Konzentrationen von 200 ng/ml und 100 ng/ml keine Veränderung der Kathepsin B mRNA-Expression. Im Gegensatz dazu erzielte die BMP-2-Inkubation in A-549-Zellen den gleichen Effekt wie TGF-β1. Die Kathepsin B mRNA-Expression wurde inhibiert.

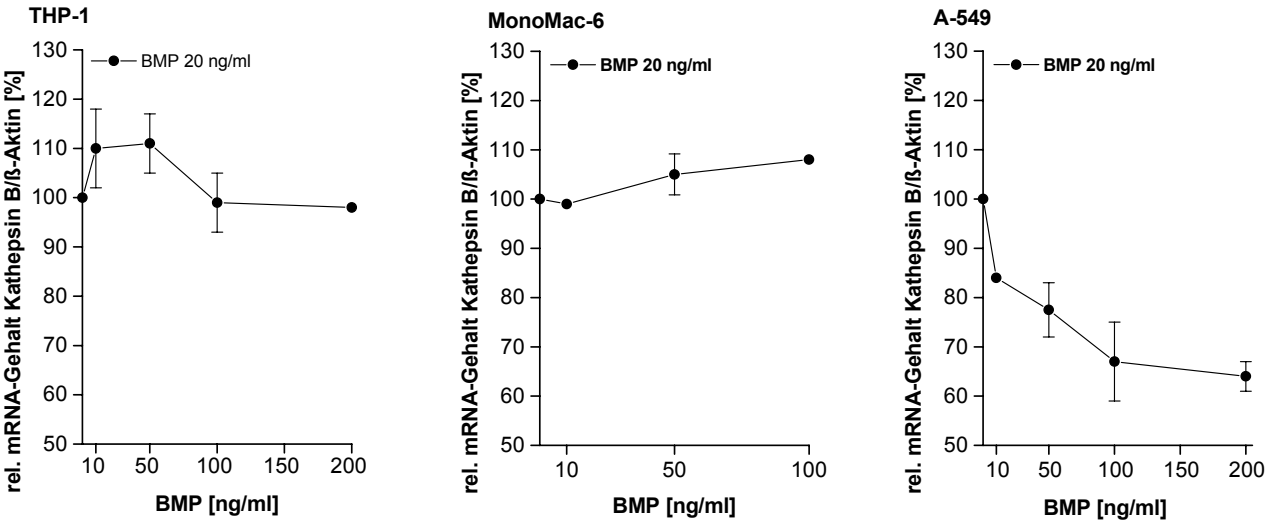

Abb. 31: BMP-2-Stimulation von THP-1-, MonoMac-6- und A-549-Zellen nach zwei und drei Tagen (n=3). Der Kathepsin B mRNA-Gehalt wurde durch quantitative RT-PCR gemessen und mit Hilfe des β-Aktin mRNA-Gehaltes normiert. Dargestellt ist der relative Kathepsin B mRNA-Gehalt bezogen auf unbehandelte Kontrollansätze die auf 100 % gesetzt wurden (Mittelwert ± SEM).

Die BMP-2-aktivierte Signalkaskade kann in den monozytären Zelllinien THP-1 und MonoMac-6 die Kathepsin B mRNA-Expression im Gegensatz zu TGF-β1 nicht modulieren. Dieser Befund könnte auf die fehlende Expression von Smad1 in den myelo-monozytären Zelllinien zurückzuführen sein und zeigt, dass Smad1 eine wichtige Rolle in der TGF-β1/BMP-induzierten Signalkaskade spielt.

3.7 Analyse der Aktivierung der MAP-Kinasen p38, ERK1/2 und JNK nach TGF-β1-Inkubation von THP-1-, MonoMac-6- und A-549-Zellen

Wie in der Einleitung erwähnt, können Smad-unabhängige Wege in die Signaltransduktionskette von TGF-β1 involviert sein. Dabei können die MAP-Kinasen (***m**itogen **a**ctivated **p**rotein kinases*) p38, ERK1/2 und JNK eine Rolle spielen.

Die Aktivierung dieser Kinasen in den myelo-monozytären Zelllinien THP-1 und MonoMac-6 sowie den epithelialen A-549-Zellen durch TGF-β1-Inkubation wurde mit Hilfe von Western-Blot-Analysen überprüft. Dazu wurden jeweils 1×10^6 Zellen in einem Zeitraum von 5 bis 360 Minuten mit 20 ng/ml TGF-β1 behandelt. Die Proben wurden wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben aufgearbeitet, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Western-Blots mit monoklonalen Phospho-spezifischen Antikörpern gegen Phospho-p38 (P-p38), Phospho-ERK1/2 (P-ERK1/2) und Phospho-JNK (P-JNK) unterzogen. Anschließend wurden zur Normalisierung Antikörper eingesetzt, die Phosphorylierungs-unabhängige Epitope der

genannten Proteine markierten und somit den Gesamtgehalt des jeweiligen Proteins sichtbar machten. Die resultierenden Banden wurden densitometrisch vermessen. Die numerischen Verhältnisse wurden graphisch dargestellt. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt, wobei eines repräsentativ dargestellt wurde.

3.7.1 Phosphorylierung der p38-Kinase in THP-1-, MonoMac-6- und A-549-Zellen

Das Molekulargewicht der p38-Kinase beträgt 38 kDa. Diese Kinase wird durch *upstream* liegende aktivierte Proteinkinasen an den Aminosäure-Resten $Threonin_{180}$ und $Tyrosin_{185}$ phosphoryliert.

Es sollte analysiert werden, ob p38 nach TGF-β1-Inkubation in den myelo-monozytären Zelllinien THP-1 und MonoMac-6 sowie in epithelialen A-549-Zellen phosphoryliert und folglich aktiviert wurde. Die Stimulation wurde in einem Zeitraum von 5 Minuten bis 240 Minuten durchgeführt.

- **p38-Phosphorylierung in THP-1-Zellen**

In Abbildung 32 sind die Ergebnisse der p38-Western-Blot-Analyse in THP-1-Zellen dargestellt. p38 wurde in diesen Zellen durch TGF-β1-Inkubation phosphoryliert und dadurch aktiviert (Abb. 32 A). In Abbildung 32 B ist der p38-Proteingehalt der Proben dargestellt. Eine Aktivierung von p38 war bereits nach 5 Minuten nachweisbar (175 %) und stieg dann bis auf 700 % nach zwei Stunden an. Nach vier Stunden war der Phosphorylierungsgrad wieder deutlich geringer (350 %, Abb. 32 C)

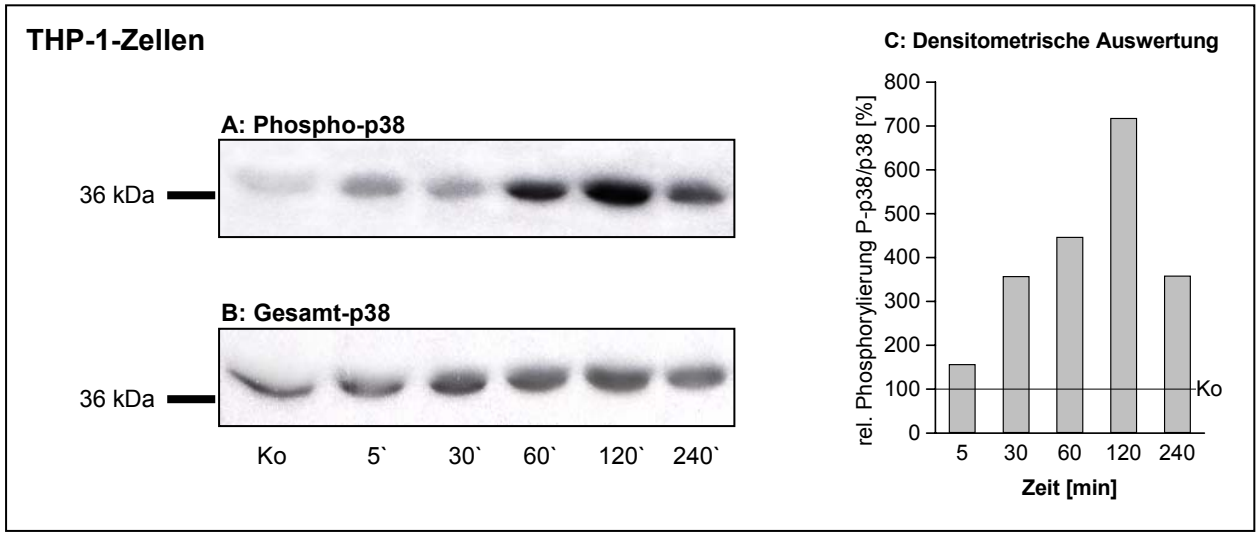

Abb. 32: Western-Blot-Analyse der TGF-β1-induzierten p38-Phosphorylierung in THP-1-Zellen. Nach densitometrischer Vermessung der Signale aus (A) und (B) wurde jeweils das numerische Verhältnis von phosphorylierter p38 zu Gesamt-p38 berechnet und graphisch dargestellt (C). Kontrollproben wurden auf 100 % gesetzt (Ko, horizontaler Funktionsgraph). Die eingesetzte TGF-β1-Konzentration betrug 20 ng/ml.

In THP-1-Zellen wurde die Proteinkinase p38 nach TGF-β1-Inkubation deutlich phosphoryliert. Neben dem primären Smad-abhängigen TGF-β1 Signalweg wird parallel auch diese alternative Signalübermittlung aktiviert.

➢ **p38-Phosphorylierung in MonoMac-6-Zellen**

Abbildung 33 stellt die Ergebnisse der p38-Western-Blot-Analyse in MonoMac-6-Zellen dar. p38 wurde in diesen Zellen nach 30 Minuten TGF-β1-Inkubation deutlich phosphoryliert (Abb. 33 A). In Abbildung 33 B wurde der gesamte p38-Proteingehalt der Proben bestimmt. Die densitometrische Auswertung stellt das Verhältnis der Bandenintensität von Phospho-p38-Protein zum gesamten p38-Proteingehalt dar und offenbarte die zunehmende Aktivierung von p38 was sich in einer Steigerung des Anteils von phosphoryliertem p38 auf 130 % nach 5 Minuten und auf 1700 % nach zwei Stunden widerspiegelte wobei die Ausbildung eines Plateaus zu beobachten war. Der Anteil der phosphorylierten p38 war auch nach vier Stunden nahezu unverändert (Abb. 33 C).

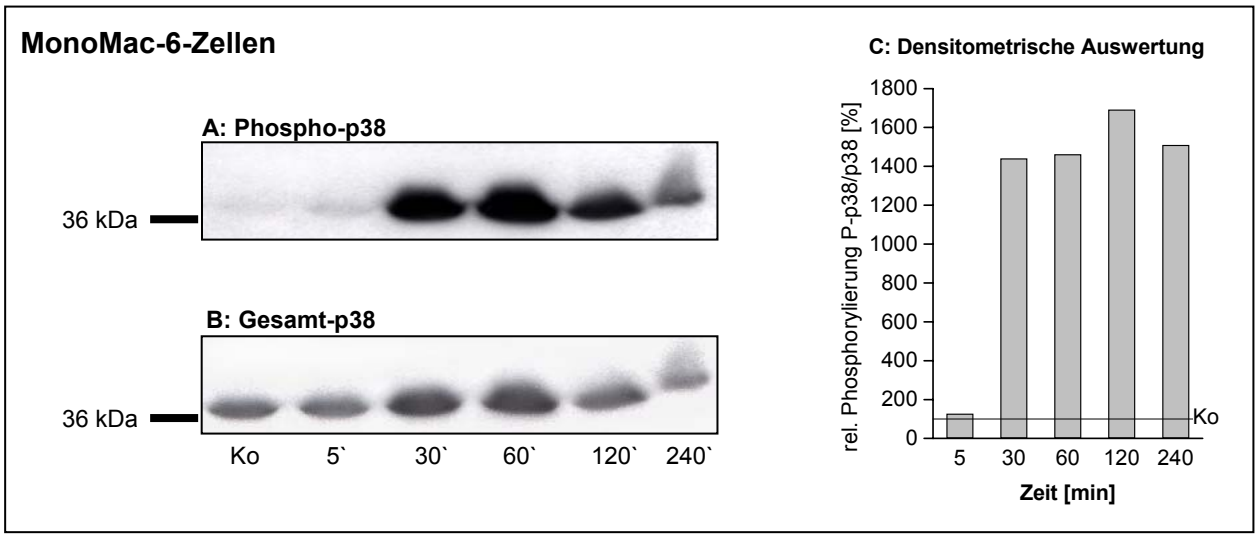

Abb. 33: Western-Blot-Analyse der TGF-β1-induzierten zeitabhängigen p38-Phosphorylierung in MonoMac-6-Zellen. Nach densitometrischer Vermessung der Bandenstärken in (A) und (B) wurde jeweils das numerische Verhältnis von Phospho-Banden zu den Banden des gesamten p38-Proteingehaltes berechnet und graphisch dargestellt (C). Kontrollproben wurden auf 100 % gesetzt (Ko, horizontaler Funktionsgraph). Die eingesetzte TGF-β1-Konzentration betrug 20 ng/ml.

Auch in den MonoMac-6-Zellen wurde der alternative, nicht Smad-abhängige TGF-β1 Signalweg nach Inkubation aktiviert.

➢ **p38-Phosphorylierung in A-549-Zellen**

In Abbildung 34 sind die Ergebnisse der p38-Western-Blot-Analyse in A-549-Zellen dargestellt. p38 wurde in A-549-Zellen zu Phospho-p38 phosphoryliert (Abb. 34 A). Der gesamte p38-Proteingehalt der Proben ist in Abbildung 34 B dargestellt. Die densitometrische Auswertung der Phospho-p38-Banden normalisiert auf die p38-Gesamtprotein-Signale ist im Diagramm dargestellt (Abb. 34 C). Sie verdeutlichte eine zunehmende Aktivierung von p38. Nach 5 Minuten lag der Anteil des phosphorylierten p38 bei 160 %. Er stieg dann kontinuierlich bis auf 400 % nach 240 Minuten an. Insgesamt war der Anstieg des Anteils von phosphorylierter p38 in A-549-Zellen im Vergleich zu THP-1- und MonoMac-6-Zellen geringer und zeitlich verzögert.

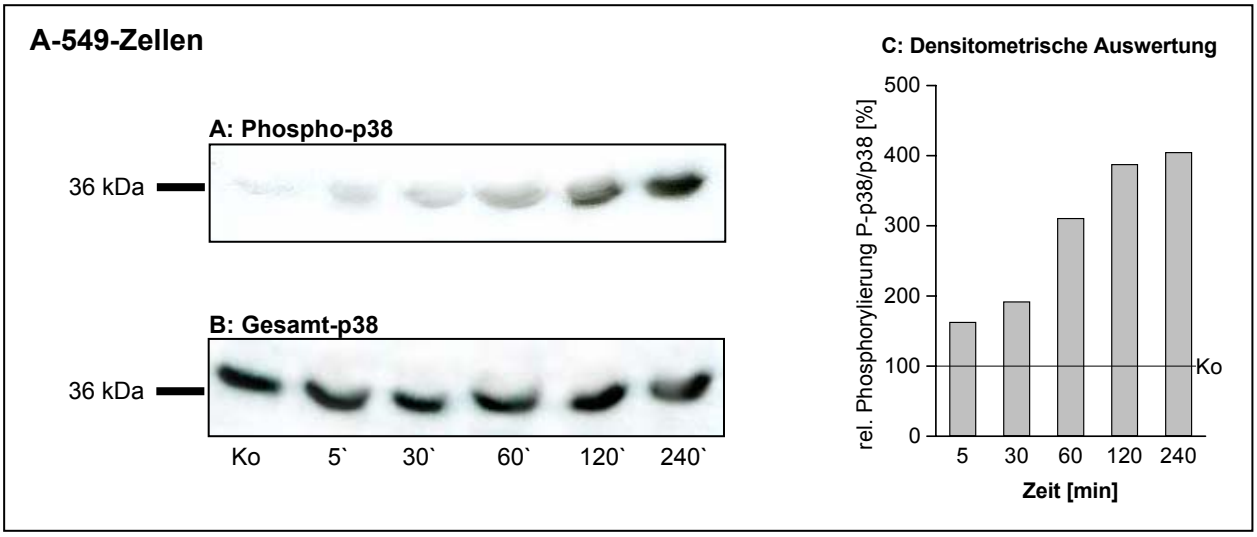

Abb. 34: Western-Blot-Analyse der TGF-β1-induzierten p38-Phosphorylierung in A-549-Zellen. Nach densitometrischer Vermessung der Signale in (A) und (B) wurde jeweils das numerische Verhältnis von Phospho-Banden zu den Banden des gesamten p38-Proteingehaltes berechnet und graphisch dargestellt (C). Kontrollproben wurden auf 100 % gesetzt (Ko, horizontaler Funktionsgraph). Die eingesetzte TGF-β1-Konzentration betrug 20 ng/ml.

Die MAP-Kinase p38 wird durch TGF-β1 sowohl in den monozytären Zelllinien THP-1 und MonoMac-6 als auch in den Zellen epithelialen Ursprungs (A-549) aktiviert. Im Zeitraum bis 240 Minuten war die Phosphorylierungsrate bei den monozytären MonoMac-6-Zellen am höchsten, gefolgt von THP-1-Zellen und der Epithelzelllinie A-549.

3.7.2 Phosphorylierung der ERK1/2-Kinase in THP-1-, MonoMac-6- und A-549-Zellen

Die MAP-Kinase ERK1/2 besteht aus zwei Isoformen von 42 kDa und 44 kDa. Sie werden an den Aminosäureresten $Threonin_{202}$ und $Tyrosin_{204}$ phosphoryliert. Die nachfolgenden Experimente sollten aufklären, ob ERK1/2 in den monozytären Zelllinien THP-1 und MonoMac-6 sowie in der Epithelzelllinie A-549 phosphoryliert und somit in beiden Zelllinien-Typen durch TGF-β1 aktiviert wird.

➢ **ERK1/2-Phosphorylierung in THP-1-Zellen**

In Abbildung 35 sind die Ergebnisse der ERK1/2-Western-Blot-Analysen in THP-1-Zellen dargestellt. Sowohl beim Nachweis der Phosphorylierung als auch bei der Analyse des ERK-Proteingehaltes konnte lediglich die 44 kDa-Isoform (ERK2) dieser Kinase detektiert werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass ERK1 sowohl in THP-1-Zellen als auch in anderen Zellsystemen nicht immer nachgewiesen werden kann, und dementsprechend fehlt oftmals auch die Phospho-ERK1-Bande [83-86]. ERK2 war bereits in der Kontrollprobe (Ko) phosphoryliert (Abb. 35 A) und somit konstitutiv aktiv. Nach densitometrischer Vermessung der Bandenintensitäten und Normalisierung der Phospho-ERK2 Werte auf den ERK2-Gesamt-Proteingehaltgehalt (Abb. 35 B) wurde in der graphischen Darstellung der Ergebnisse deutlich, dass diese Kinase durch TGF-β1 im Vergleich zur Kontrolle nicht zusätzlich aktiviert wurde (Abb. 35 C).

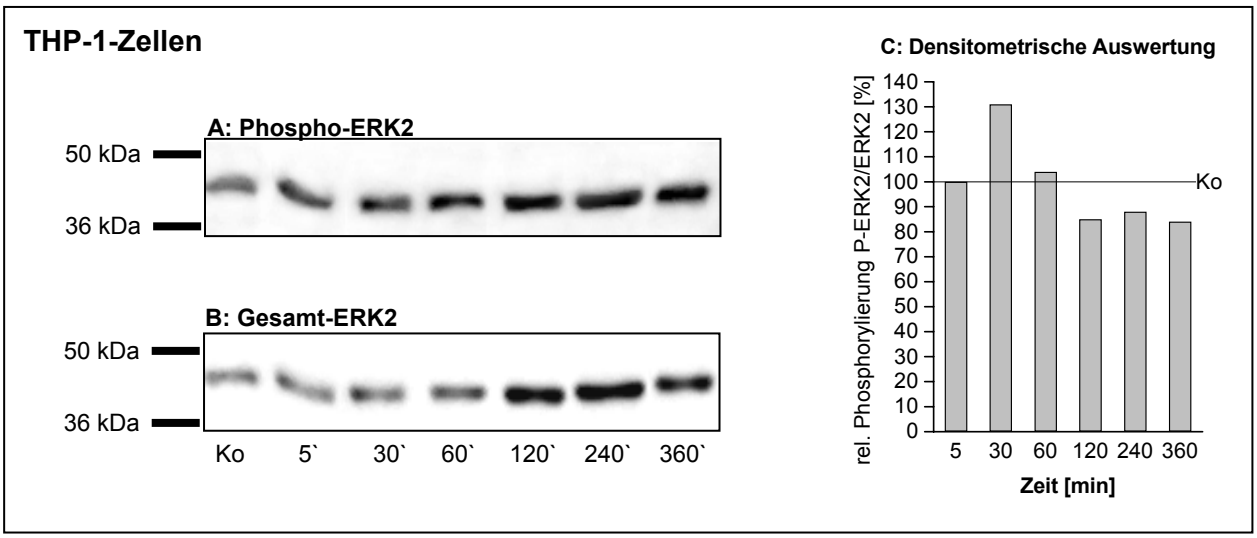

Abb. 35: Western-Blot-Analyse der TGF-β1-induzierten ERK2-Phosphorylierung in THP-1-Zellen. Nach densitometrischer Vermessung der Signale aus (A) und (B) wurde jeweils das numerische Verhältnis von Phospho-Banden zu den Banden des gesamten ERK2-Proteingehaltes berechnet und graphisch dargestellt (C). Kontrollproben wurden auf 100 % gesetzt (Ko, horizontaler Funktionsgraph). Die eingesetzte TGF-β1-Konzentration betrug 20 ng/ml.

➢ **ERK1/2-Phosphorylierung in MonoMac-6-Zellen**

Abbildung 36 zeigt die ERK1/2-Western-Blot-Analysen in MonoMac-6-Zellen.

ERK1/2 war in der Kontrollprobe (Ko), wie auch in THP-1-Zellen, deutlich phosphoryliert wobei TGF-β1 in MonoMac-6-Zellen den Aktivierungsgrad weiter steigern konnte (Abb. 36 A). Um die Phospho-ERK1/2-Banden zu normalisieren, wurde der gesamte ERK1/2-Proteingehalt der jeweiligen Proben analysiert (Abb. 36 B). Nach densitometrischer Vermessung der Bandenstärken und Normalisierung der Phospho-Signale auf das jeweils entsprechende, unphosphorylierte gesamte ERK1/2-Signal wurde deutlich, dass der Anteil von Phospho-Erk1/2 durch TGF-β1 bis auf 500 % nach 2 Stunden gesteigert wurde und nach 4 Stunden bzw. 6 Stunden noch 250 % betrug (Abb. 36 C).

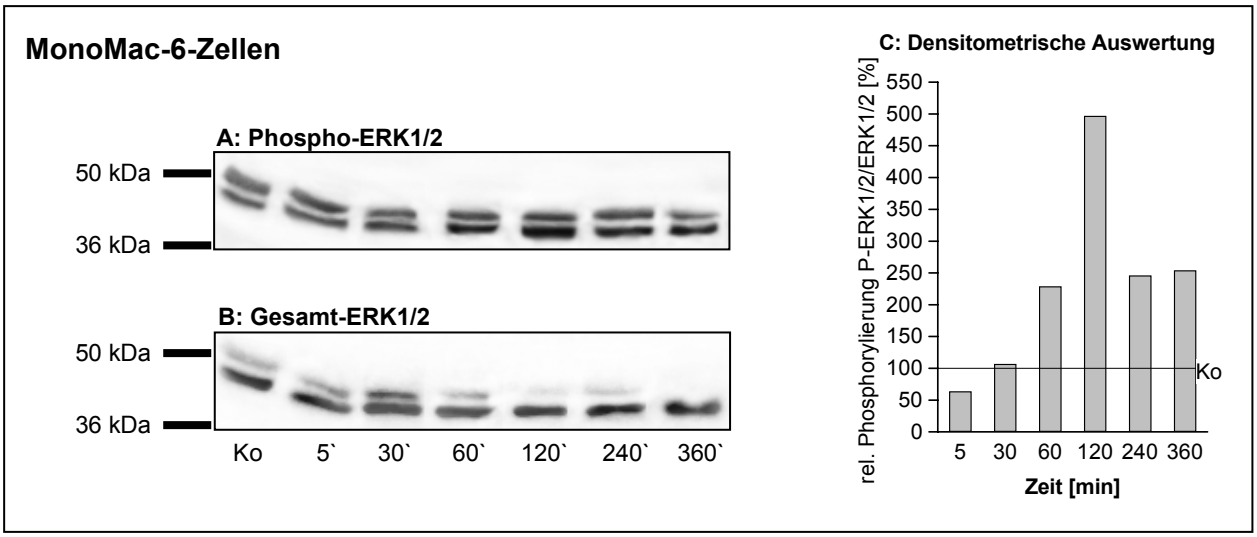

Abb. 36: Western-Blot-Analyse der TGF-β1-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung in MonoMac-6-Zellen. Die Bandenintensitäten in (A) und (B) wurden densitometrisch vermessen und anschließend das numerische Verhältnis aus Phospho-Banden und den entsprechenden Signalen des gesamten ERK1/2-Proteingehaltes berechnet und graphisch dargestellt (C). Kontrollproben wurden auf 100 % gesetzt (Ko, horizontaler Funktionsgraph). Die eingesetzte TGF-β1-Konzentration betrug 20 ng/ml.

Auch in dieser myelo-monozytären Zelllinie war die ERK1/2-Kinase konstitutiv phosphoryliert, der Phosphorylierungsgrad konnte durch TGF-β1-Inkubation erhöht werden.

➢ **ERK1/2-Phosphorylierung in A-549-Zellen**

Abbildung 37 zeigt die ERK1/2-Western-Blot-Analysen nach TGF-β1-Inkubation von A-549-Zellen. ERK1/2 war in der Kontrollprobe nicht aktiviert, wurde jedoch durch TGF-β1-Zugabe stark phosphoryliert (Abb. 37 A). Der Gesamtgehalt an ERK1/2-Protein ist in Abbildung 37 B dargestellt. Nach densitometrischer Vermessung der Bandenstärken und Normalisierung der Intensität der Phospho-Banden auf den unphosphorylierten ERK1/2 Protein-Gesamtanteil in den jeweiligen Proben konnte gezeigt werden, dass diese Kinase durch TGF-β1 zeitabhängig aktiviert wurde. Der Anteil von Phospho-ERK steigerte sich bis auf ein Maximum von 750 % nach 60 Minuten. Anschließend fiel der Phosphorylierungsgrad nach 60 Minuten wieder auf 300 % ab (Abb. 37 C).

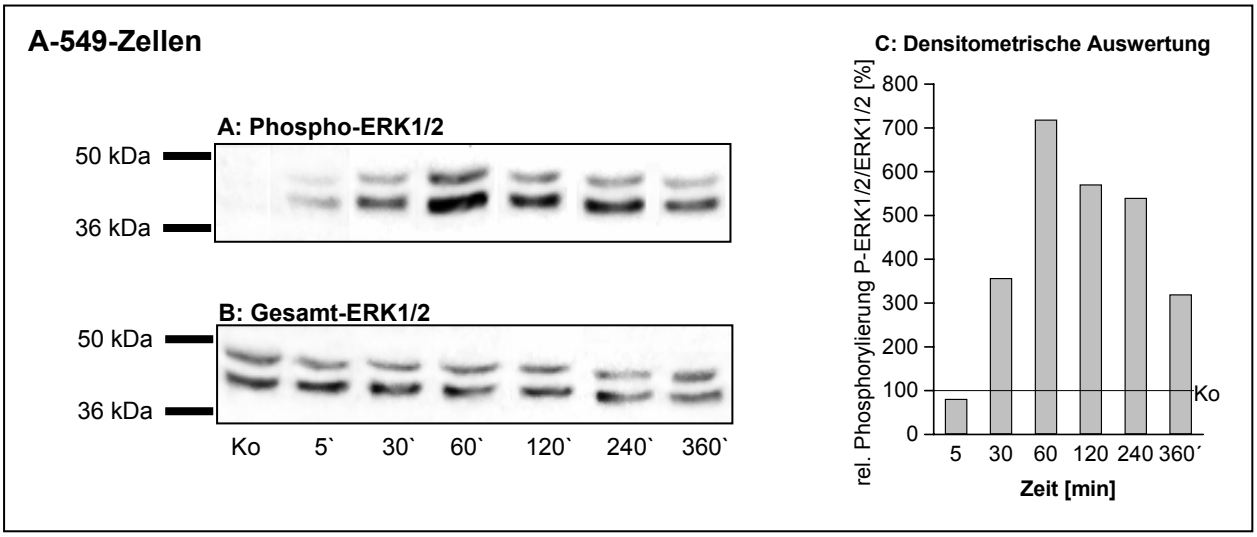

Abb. 37: Western-Blot-Analyse der TGF-β1-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung in A-549-Zellen. Die Bandenintensitäten wurden densitometrisch vermessen und anschließend das numerische Verhältnis aus Phospho-Banden (A) und den entsprechenden Signalen des gesamten ERK1/2-Gehaltes (B) berechnet und graphisch dargestellt (C). Kontrollproben wurden auf 100 % gesetzt (Ko, horizontaler Funktionsgraph). Die eingesetzte TGF-β1-Konzentration betrug 20 ng/ml.

In THP-1-Zellen konnte nur die 44 kDa-Isoform der ERK1/2-Kinase detektiert werden. Sie war konstitutiv phosphoryliert. TGF-β1 konnte keine zusätzliche Phosphorylierung induzieren. MonoMac-6-Zellen besitzen ebenfalls ein permanent aktives ERK1/2-Protein, wobei hier die Phosphorylierungsrate durch TGF-β1-Inkubation weiter gesteigert werden konnte. In A-549-Zellen lag keine basale Aktivität der Kinase vor. Sie wurde jedoch durch TGF-β1-Einfluss deutlich aktiviert.

3.7.3 JNK-Phosphorylierung in THP-1-, MonoMac-6- und A-549-Zellen

Von der JNK-Kinase existieren zwei Isoformen von 46 kDa und 55 kDa. Sie werden an den Aminosäureresten Threonin$_{183}$ und Tyrosin$_{185}$ phosphoryliert.

Die nachfolgend dargestellten Experimente analysierten die Phosphorylierung der Proteinkinase JNK durch TGF-β1 in den myelo-monozytären Zelllinien THP-1 und MonoMac-6 sowie in der Epithelzelllinie A-549.

- **JNK-Phosphorylierung in THP-1-Zellen**

In Abbildung 38 sind die Ergebnisse der JNK-Western-Blot-Analysen in THP-1-Zellen dargestellt. In Abbildung 38 A ist deutlich zu erkennen, dass die JNK-Kinase bereits in der Kontrollprobe (Ko) phosphoryliert und somit konstitutiv aktiv war. Nach densitometrischer Vermessung der Bandenintensitäten und Normalisierung der Phospho-JNK Werte auf den gesamten JNK-Proteingehaltgehalt (Abb. 38 B) wurde in der graphischen Auswertung der Ergebnisse deutlich, dass diese Kinase durch TGF-β1 im Vergleich zur Kontrolle nicht zusätzlich aktiviert wurde (Abb. 36 C).

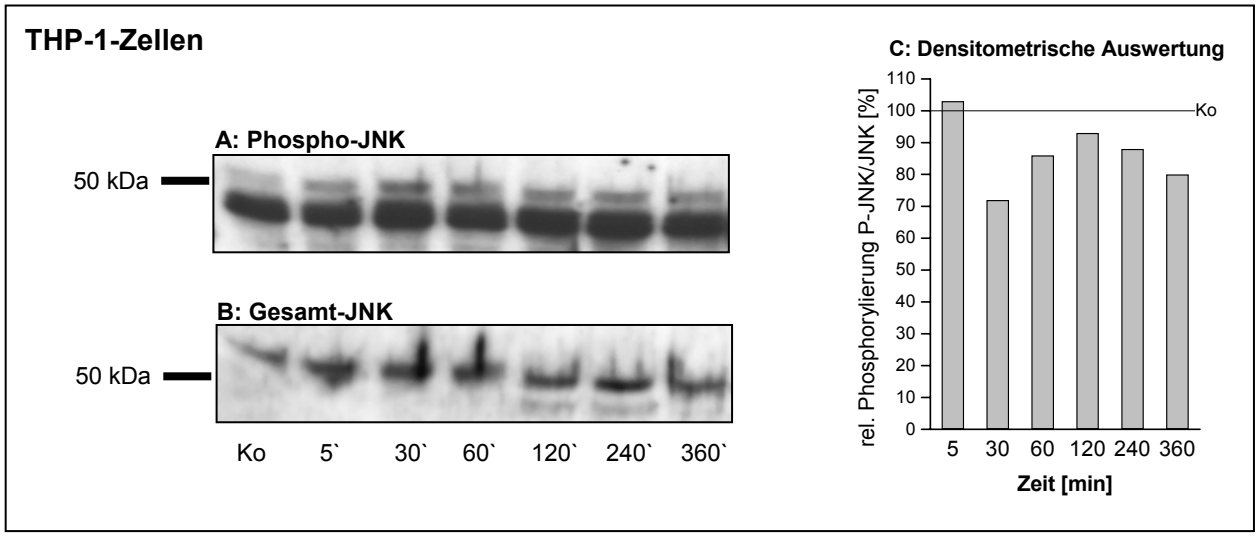

Abb. 38: Western-Blot-Analyse der TGF-β1-induzierten JNK-Phosphorylierung in THP-1-Zellen. Nach densitometrischer Vermessung der Signale aus (A) und (B) wurde jeweils das numerische Verhältnis von Phospho-Banden zu den Banden des gesamten JNK-Proteingehaltes berechnet und graphisch dargestellt (C). Kontrollproben wurden auf 100 % gesetzt (Ko, horizontaler Funktionsgraph). Die eingesetzte TGF-β1-Konzentration betrug 20 ng/ml.

➢ **JNK-Phosphorylierung in MonoMac-6-Zellen**

Abbildung 39 zeigt die Western-Blot-Analysen der JNK-Phosphorylierung in MonoMac-6-Zellen nach Inkubation mit TGF-β1. Auch hier ist deutlich zu erkennen, dass diese Proteinkinase bereits im Grundzustand (Ko) der Zellen phosphoryliert ist (Abb. 39 A). Nach Vermessung der Bandenintensitäten von Phospho-JNK und Normalisierung auf die Signalstärken des JNK-Gesamtproteins (Abb. 39 B) konnte festgestellt werden, dass in dieser myelo-monozytären Zelllinie eine Zunahme der JNK-Phosphorylierung stattfand (Abb. 39 C). Die Stimulation der Proteinkinase erreichte bereits nach 5 Minuten einen maximalen Wert von 900 % und fiel nach 360 Minuten wieder auf das Ausgangsniveau ab.

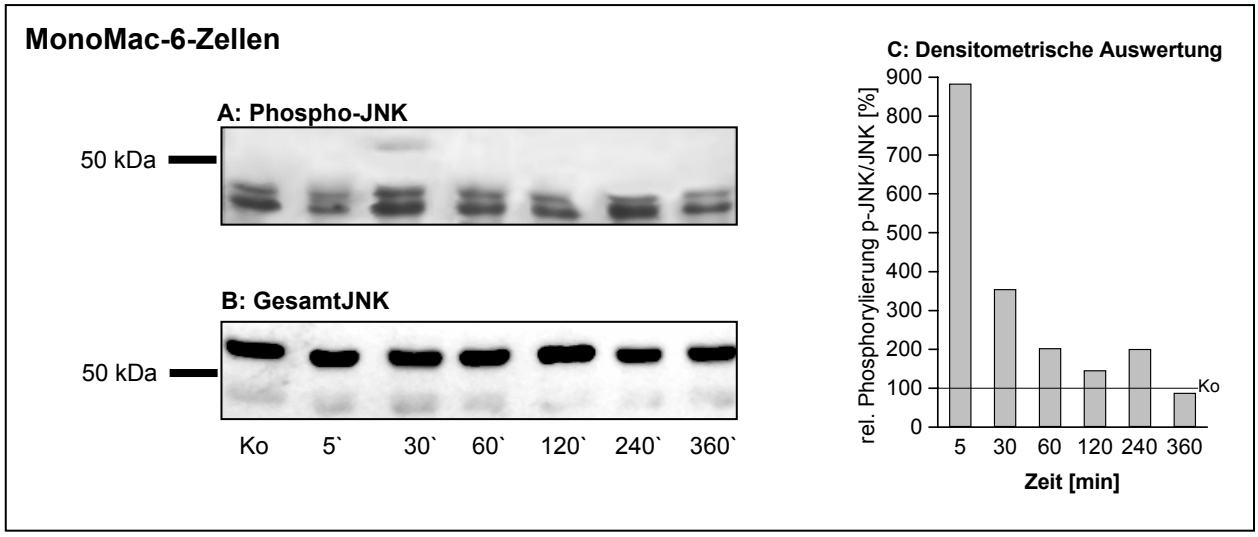

Abb. 39: Western-Blot-Analyse der TGF-β1-induzierten JNK-Phosphorylierung in MonoMac-6-Zellen. Nach densitometrischer Vermessung der Signale aus (A) und (B) wurde jeweils das numerische Verhältnis von Phospho-Banden zu den Banden des gesamten JNK-Proteingehaltes berechnet und graphisch dargestellt (C). Kontrollproben wurden auf 100 % gesetzt (Ko, horizontaler Funktionsgraph). Die eingesetzte TGF-β1-Konzentration betrug 20 ng/ml.

➢ **JNK-Phosphorylierung in A-549-Zellen**

In Abbildung 40 sind die Ergebnisse der JNK-Western-Blot-Analysen in der Zelllinie A-549 dargestellt. Diese Proteinkinase war in Kontrollproben (Ko) nicht phosphoryliert, und TGF-β1-Inkubation führte zu einem starken Anstieg des Phosphorylierungsgrades (Abb. 40 A). Die densitometrische Vermessung der Phospho-JNK Signale und deren Normierung auf die Bandenstärke des JNK Gesamtproteins (Abb. 38 B) ist in der graphischen Auswertung dargestellt (Abb. 40 C). Es ist zu erkennen, dass nach 30 Minuten eine deutliche Verstärkung der Phosphorylierungsrate stattfand, wobei eine maximale Aktivierung nach 60 Minuten mit 1100 % zu verzeichnen war. Nach 360 Minuten konnte ein deutlicher Rückgang der Aktivierungsrate auf 200 % beobachtet werden.

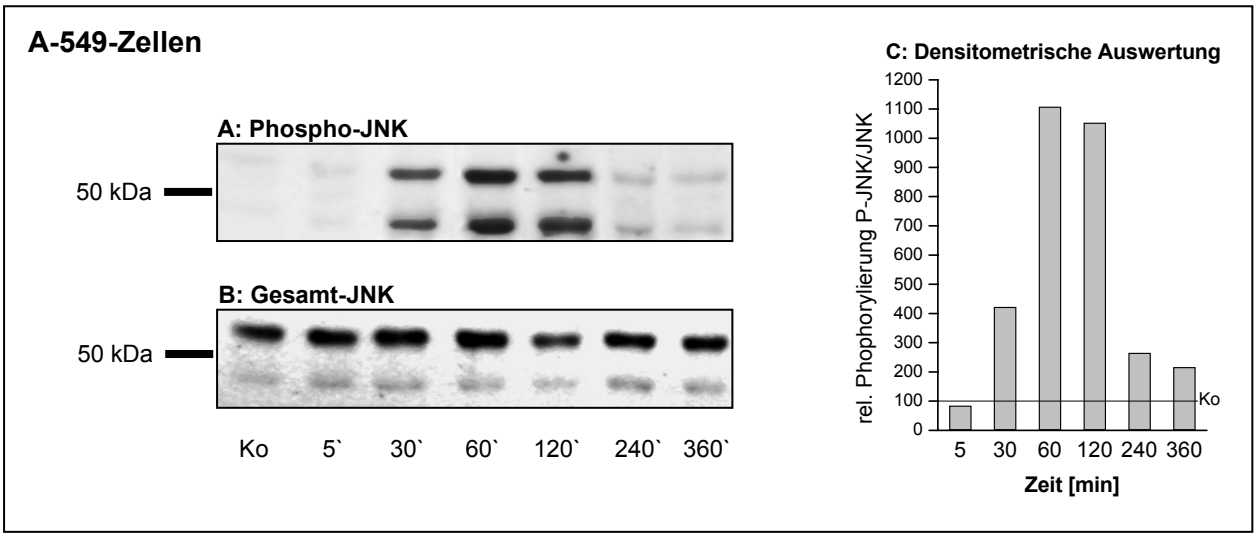

Abb. 40: Western-Blot-Analyse der TGF-β1-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung in A-549-Zellen. Die Bandenintensitäten wurden densitometrisch vermessen und anschließend das numerische Verhältnis aus Phospho-Banden (A) und den entsprechenden Signalen des gesamten ERK1/2-Gehaltes (B) berechnet und graphisch dargestellt (C). Kontrollproben wurden auf 100 % gesetzt (Ko, horizontaler Funktionsgraph). Die eingesetzte TGF-β1-Konzentration betrug 20 ng/ml.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die MAP-Kinase JNK in den Zellen myelo-monozytären Ursprungs THP-1 und MonoMac-6 im Gegensatz zu der Lungenepithelzelllinie A-549 konstitutiv phosphoryliert war. TGF-β1 konnte in THP-1-Zellen keine zusätzliche Phosphorylierung induzieren, während in MonoMac-6-Zellen die Phosphorylierungsrate durch TGF-β1-Inkubation weiter gesteigert wurde. A-549-Zellen wiesen keine basale Aktivität der Kinase auf, sie wurden jedoch durch TGF-β1-Einfluss deutlich aktiviert.

3.7.4 Einfluss der Inhibition von p38-, ERK1/2- und JNK-Kinasen auf die TGF-β1-induzierte Kathepsin B-mRNA-Expression in THP-1, MonoMac-6- und A-549-Zellen

Aufgrund der Beobachtung, dass TGF-β1 die Kinasen p38, ERK1/2 und JNK in den Zelllinien THP-1, MonoMac-6 und A-549 aktivierte sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss die Hemmung der einzelnen Kinasen auf die TGF-β1-induzierte Erhöhung der Kathepsin B mRNA-Expression hatte. Überprüft wurde, ob eine Unterbrechung des jeweiligen Signaltransduktionsweges die erhöhte Expression der Kathepsin B mRNA-Expression nach TGF-β1-Induktion verhindert. Dazu wurden jeweils 2×10^6 THP-1-, MonoMac-6- und A-549-Zellen mit dem jeweiligen spezifischen Proteinkinase-Inhibitor 3 h vorbehandelt und anschließend mit TGF-β1 inkubiert. Die Messung der Kathepsin B mRNA-Expression erfolgte, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, durch quantitative RT-PCR-Analysen.

3.7.4.1 Inhibition der MAP-Kinase p38 durch SB203580

Zur Aufklärung der Funktion der MAP-Kinase p38 bei der TGF-β1-induzierten Regulation der Kathepsin B mRNA-Expression wurde sie für die nachfolgenden Tests durch ihren spezifischen Inhibitor SB203580 gehemmt. Abbildung 41 zeigt die Kathepsin B mRNA-Expression in THP-1-, MonoMac-6- und A-549-Zellen nach Koinkubation mit TGF-β1 und SB203580. Der p38-Inhibitor veränderte die TGF-β1-bedingte Erhöhung des Kathepsin B mRNA-Gehaltes in THP-1- und MonoMac-6- sowie die Reduktion in A-549-Zellen nicht. Die Werte lagen im Bereich von 650 % (THP-1), 300 % (MonoMac-6) sowie 65 % (A-549). SB203580 allein verursachte in allen Zelllinien-Typen eine geringe Erhöhung der mRNA-Expression.

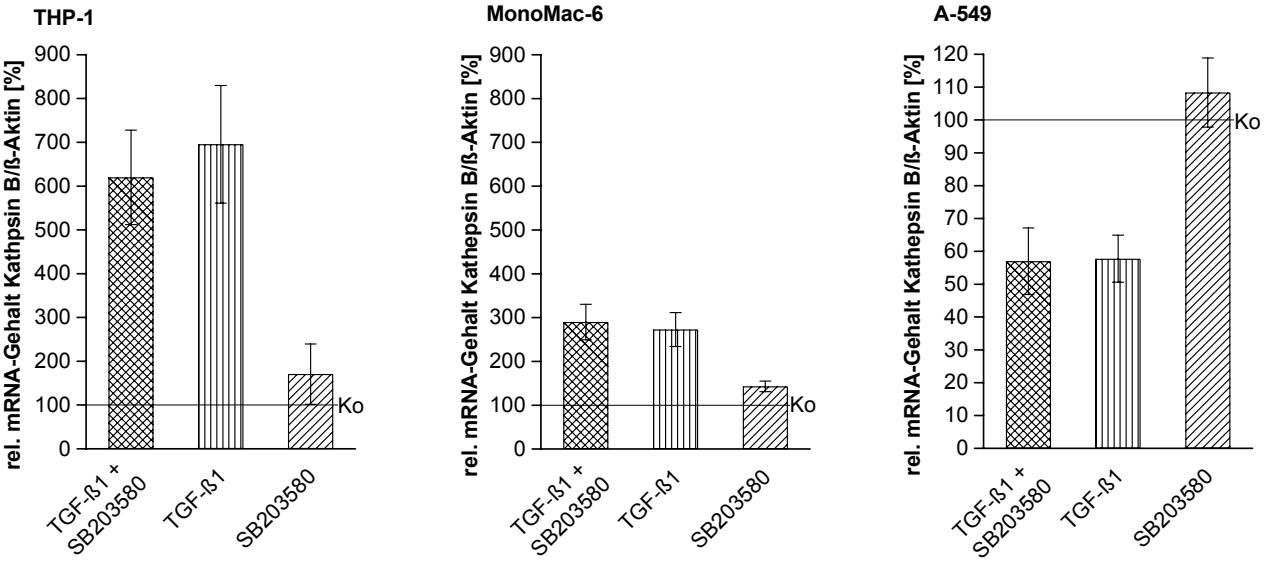

Abb. 41: Kathepsin B mRNA-Expression der Zelllinien THP-1, MonoMac-6 und A-549 nach Koinkubation mit TGF-β1 und dem p38-spezifischen Inhibitor SB203580 (n=4). Der Kathepsin B mRNA-Gehalt wurde durch quantitative RT-PCR bestimmt und mit Hilfe des β-Aktin mRNA-Gehaltes normiert. Dargestellt ist der relative Gehalt im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne Stimulus (horizontale Funktionsgraphen) deren Werte auf 100 % gesetzt wurden (Mittelwert ± SEM). TGF-β1 und SB203580 wurden in den Konzentrationen 20 ng/ml bzw. 10 µM eingesetzt.

3.7.4.2 Inhibition der MAP-Kinase ERK1/2 durch U0126

Um die Funktion der Proteinkinase ERK1/2 bei der Aufregulation der Kathepsin B-mRNA durch TGF-β1 zu beleuchten, wurde die Kinase in den nachfolgenden Exprimenten mit dem spezifischen Inhibitor U0126 gehemmt.

THP-1-, MonoMac-6- und A-549-Zellen wurden mit dem ERK1/2-spezifischen Inhibitor U0126 (10 µM) vorbehandelt und anschließend mit TGF-β1 inkubiert.

Abbildung 42 dokumentiert den Kathepsin B mRNA-Gehalt nach Inkubation mit TGF-β1 und U0126.

Der ERK1/2-Inhibitor verstärkte die TGF-β1-bedingte Erhöhung des Kathepsin B mRNA-Gehaltes in THP-1-Zellen um den Faktor 6,4 und in A-549-Zellen die inhibitorische Wirkung leicht von 60 % auf 45 %. U0126 allein verdoppelte die Kathepsin B-Expression in THP-1-Zellen während sie in der Epithelzelllinie A-549 leicht gesenkt wurde.

In MonoMac-6-Zellen beeinflusste der Inhibitor weder die TGF-β1-verursachte erhöhte Expression noch den basalen Gehalt des Kathepsin B-Transkriptes.

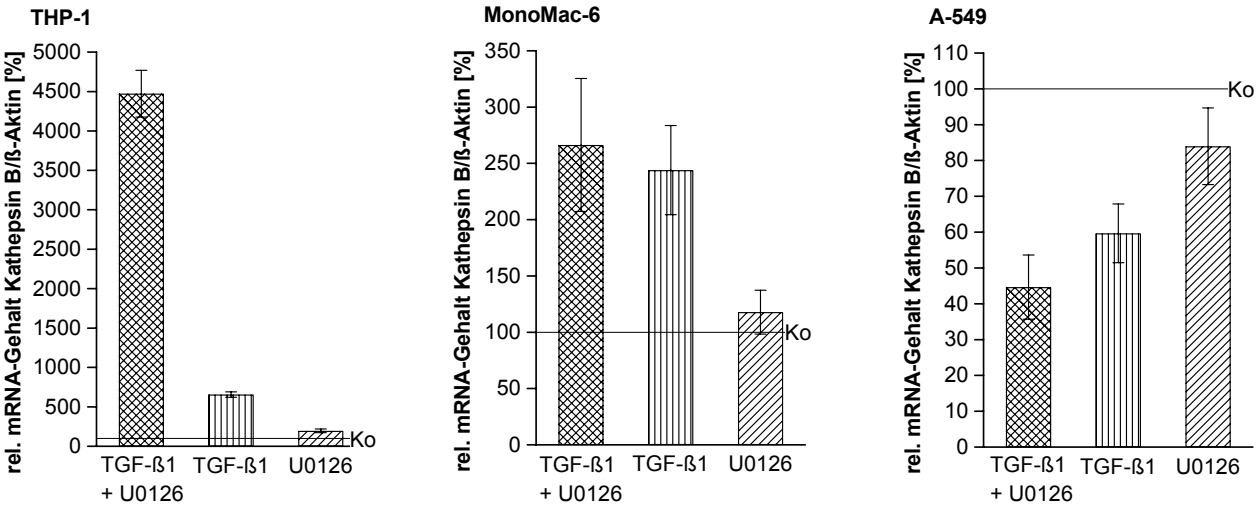

Abb. 42: Kathepsin B mRNA-Expression der Zelllinien THP-1, MonoMac-6 und A-549 nach Koinkubation mit TGF-β1 und dem ERK1/2-spezifischen Inhibitor U0126 (n=4). Der Kathepsin B mRNA-Gehalt wurde durch quantitative RT-PCR bestimmt und mit Hilfe des β-Aktin mRNA-Gehaltes normiert (Mittelwert ± SEM). Die unbehandelten Kontrollen (waagerechte Funktionsgraphen) wurden auf 100 % festgelegt. TGF-β1 und U0126 wurden in den Konzentrationen 20 ng/ml bzw. 10 µM eingesetzt.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Hemmung von der ERK1/2-Kinase eine zusätzliche Verstärkung des TGF-β1-Effektes auf die Kathepsin B mRNA-Expression in den myelo-monozytären THP-1-Zellen und in epithelialen A-549-Zellen verursachte. In den MonoMac-6-Zellen wurde die TGF-β1-gesteuerte erhöhte Expression der Kathepsin B-mRNA nicht verändert.

3.7.4.3 Inhibition der MAP-Kinase JNK durch Curcumin

Zur Klärung der Rolle der Proteinkinase JNK bei der TGF-β1-induzierten erhöhten Kathepsin B mRNA-Expression wurde der Inhibitor Curcumin eingesetzt.

THP-1-, MonoMac-6- und A-549-Zellen wurden mit Curcumin in einer Konzentration von 10 µM vorbehandelt und anschließend mit 20 ng/ml TGF-β1 inkubiert.

Abbildung 43 zeigt den Kathepsin B mRNA-Gehalt nach Inkubation mit TGF-β1 und Curcumin. Curcumin verdoppelte die TGF-β1-bedingte Erhöhung des Kathepsin B mRNA-Gehaltes in THP-1-Zellen. In A-549-Zellen wurde die inhibitorische Wirkung leicht von 75 % auf 60 % verstärkt**,** während in MonoMac-6-Zellen keine Veränderung zu verzeichnen war. Curcumin allein hatte keinen Einfluss auf die basale Expression der Kathepsin B-mRNA in den monozytären Zelllinien während sie in der Epithelzelllinie leicht verringert wurde.

Die Hemmung dieser Kinase durch Curcumin verursachte eine zusätzliche Verstärkung des TGF-β1-Effektes in THP-1 und A-549-Zellen, induzierte jedoch keine Veränderung in der Expression der Kathepsin B-mRNA in MonoMac-6-Zellen.

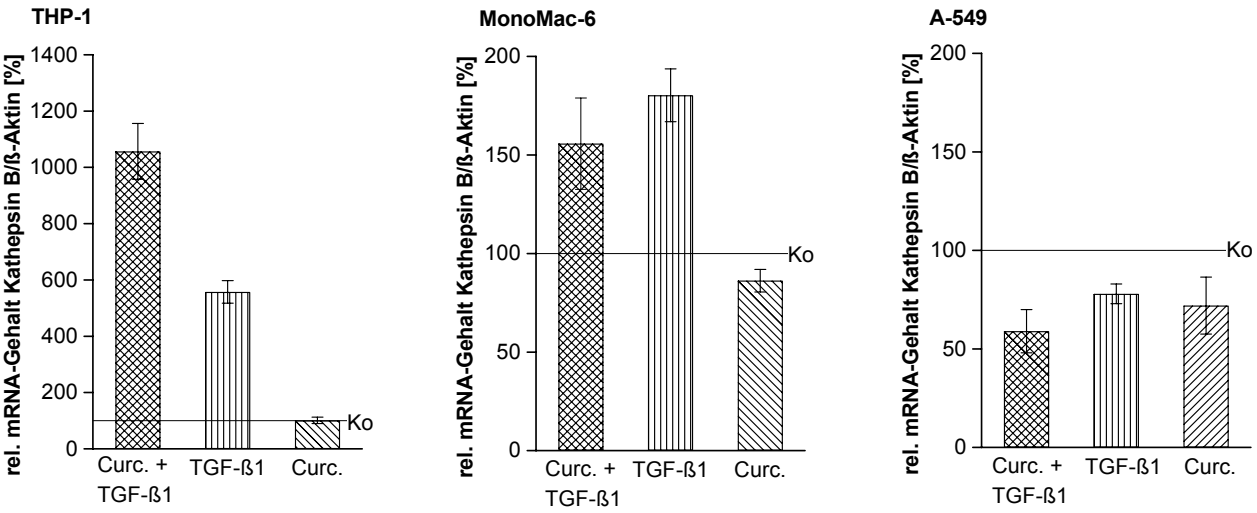

Abb. 43: Kathepsin B mRNA-Expression der Zelllinien THP-1 MonoMac-6 und A-549 nach Koinkubation mit TGF-β1 und dem JNK-Inhibitor Curcumin (n=4). Der Kathepsin B mRNA-Gehalt wurde durch quantitative RT-PCR bestimmt und mit Hilfe des β-Aktin mRNA-Gehaltes normiert. Die unbehandelten Kontrollen (waagerechte Funktionsgraphen) wurden auf 100 % festgelegt (Mittelwert ± SEM). TGF-β1 und Curcumin wurden in den Konzentrationen 20 ng/ml bzw. 10 µM eingesetzt.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die Inhibierung der Smad-unabhängigen TGF-β1-Signalwege in THP-1- und MonoMac-6-Zellen nicht zu einer Aufhebung der Induktion der Kathepsin B-Expression durch TGF-β1 führte.

3.8 Untersuchung der Regulation der Kathepsin B-Promotoraktivität durch TGF-β1

TGF-β1 verursachte eine erhöhte Kathepsin B-Genexpression in THP-1- und MonoMac-6-Zellen (Abb. 15, Kap. 3.2.2.2 und Abb. 19, Kap. 3.2.2.6.). Das Ziel der nachfolgenden Versuche war, die für die Wirkung von TGF-β1 verantwortlichen regulatorischen Einheiten auf dem Kathepsin B-Promotor zu identifizieren. Dazu wurden THP-1-Zellen mit unterschiedlichen Promotor-Konstrukten transfiziert, die in den Luziferase-Vektor pGL-3B integriert waren (Kap. 2.2.2). 10 Konstrukte wurden von Dr. Sloane aus Detroit, USA bezogen. Sie werden nachfolgend mit pSCB1 bis pSCB10 benannt und umfassen Promotor/Exonbereiche von Position -1774 bis +474 in Bezug zum Transkriptionsstart (Abb. 44, gestrichelte Konstrukte). Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere drei Konstrukte kloniert und in den Vektor pGL-3B ligiert. Die Klonierungsstrategien zur Herstellung der Plasmide sind in Kapitel 2.2.2.3 und 2.2.2.4 dargestellt. Diese Konstrukte werden pLuc2,6, pLuc4,2 und pLuc7,35 genannt und umfassen Promotor/Exonbereiche von -7207 bis +146 im Bezug zum Transkriptionsstartpunkt (durchgehende Linien in Abb. 44). Außerdem wurde das erste Intron des Kathepsin B-Gens und weitere drei Deletionskonstrukte des Introns kloniert.

3.8.1 Analyse der Aktivität der einzelnen Promotorkonstrukte nach Inkubation mit TGF-β1

Der Vektor pGL-3B, in den alle Promotorkonstrukte kloniert wurden, enthält als Reportergen die *Firefly*-Luziferase. Die gemessene Luziferase-Aktivität repräsentiert somit die Aktivität der unterschiedlichen Promotorkonstrukte. Zur Normierung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen gleichzeitig mit dem pRL-TK-Vektor transfiziert, der die konstitutive Expression der *Renilla*-Luziferase induzierte. Die Aktivitäten beider Luziferasen konnte in einem Ansatz gemessen werden, wobei die Expression der induzierbaren *Firefly*-Luziferase (Test-Konstrukte) auf die konstitutiv exprimierte *Renilla*-Luziferase normiert wurde. Die Versuchsdurchführung ist in Kapitel 2.1.7 beschrieben. Die Aktivitäten der klonierten Konstrukte wurden in unbehandelten Kontrollproben sowie nach TGF-β1-Inkubation gemessen. Abbildung 43 zeigt die Charakteristika und die Aktivitäten der untersuchten Kathepsin B Promotor-Konstrukte. Dargestellt sind die absoluten gemessenen, normierten Luziferase-Aktivitätsraten von TGF-β1-behandelten und -unbehandelten Zellen. Die Basalaktivität der Luziferase stieg anfänglich mit der Länge der klonierten Promotorteilstücke. Ein Maximum wurde mit dem Konstrukt pSCB6 (228 bp) mit einem Wert von 2,25 erreicht. Die Verlängerung der Promotorregion bis auf 2,25 kb führte wiederum zu einer Verringerung der Promotoraktivität, was auf die Existenz repressorischer Elemente in diesem Promotorbereich hindeutete. Weitere Bindungsstellen für induzierende Faktoren scheinen in der Region bis etwa -4.3 kb vom Transkriptionsstartpunkt lokalisiert zu sein. Diese führten zu einer Erhöhung der konstitutiven Expression des Reportergens. Das längste hergestellte Konstrukt, mit dem Promotorbereich von -7207 bis +146 (7,35 kb), wies eine verringerte Promotoraktivität auf. TGF-β1 hatte keinen Einfluss auf die Aktivität dieser Promotorkonstrukte. Demzufolge befinden sich die TGF-β1-reaktiven Einheiten, die zur induzierten Kathepsin B-mRNA-Erhöhung führten, nicht auf den getesteten Promotorbereichen.

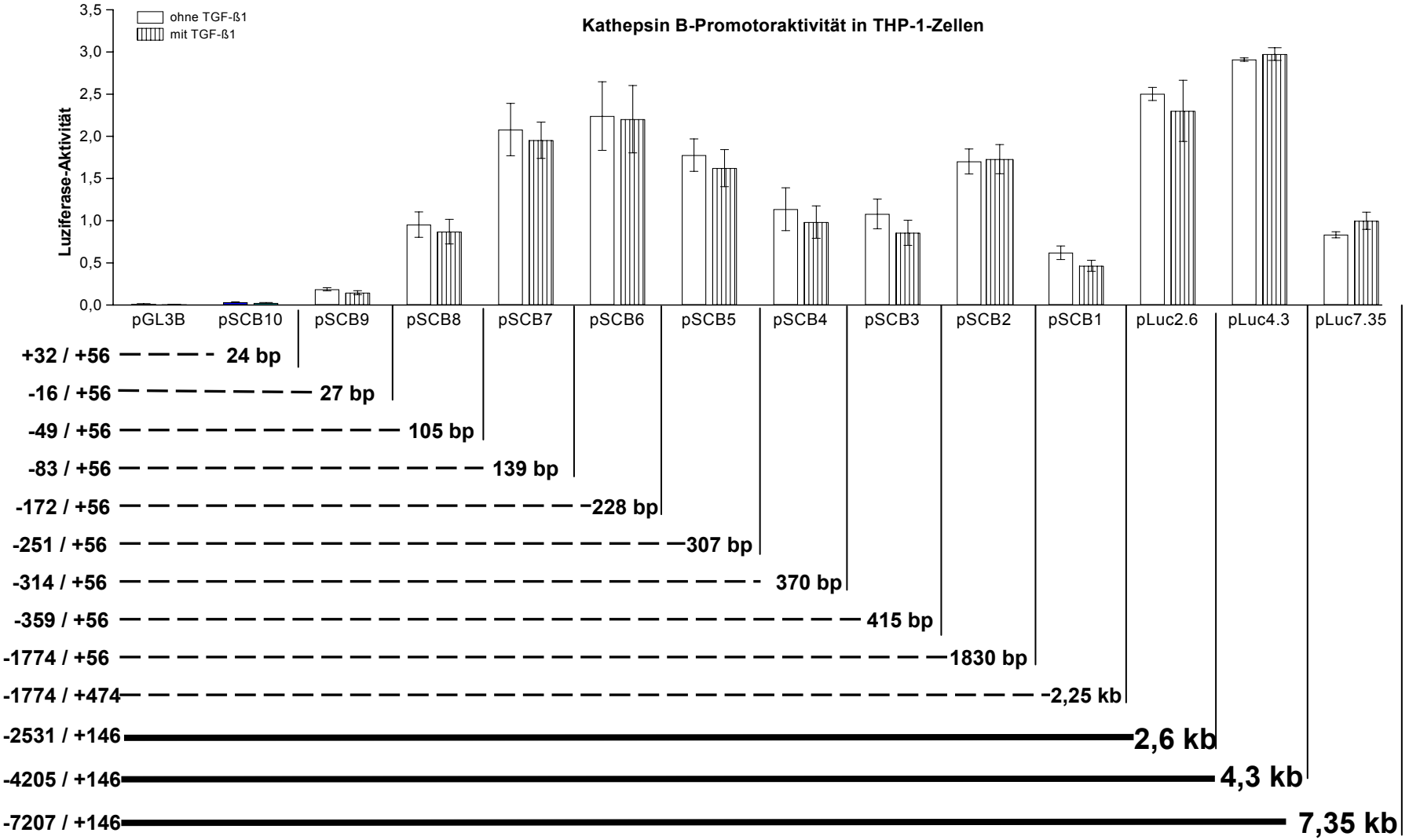

Abb. 44: Luziferase-Aktivitäten von Kathepsin B-Promotorkonstrukten nach Transfektion in THP-1-Zellen (n=3). Dargestellt ist die absolute Luziferase-Lumineszenz der Konstrukte. pGL3B ist der Kontrollvektor ohne Promotorinsert, die restlichen Konstrukte beinhalten Promotorbereiche deren Lage im Bezug zum Transkriptonsstart (+1) angegeben ist (Mittelwert ± SEM).

3.9 Analyse der Aktivität des ersten Introns des Kathepsin B-Gens nach Inkubation mit TGF-β1

Die wichtigsten TGF-β1-Signalübermittlungsproteine, R-Smad2 und R-Smad3, binden auf Promotorbereichen von Zielgenen die DNA-Sequenz „CAGACA“. Die Aktivierung der Transkription erfolgt anschließend entweder nach Bindung der Smad-Proteine alleine oder nach zusätzlicher Rekrutierung des akzessorischen Proteins p300 an seine spezifische DNA-Erkennungssequenz, die im Umfeld des Smad-Bindungselementes lokalisiert ist.

Smad-unabhängige Signalübermittlungswege führen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 der die DNA-Sequenz „TGAGTCA“ spezifisch erkennt. Da die oben beschriebenen Promotorkonstrukte keine regulatorischen Einheiten enthielten, die in den untersuchten Zellen für die Induktion der Kathepsin B-Genexpression durch TGF-β1 verantwortlich waren und eine weitere *upstream* Verlängerung des Promotorbereiches auf der Basis von Literaturdaten nicht sinnvoll erschien, wurde das erste Kathepsin B-Intron kloniert und in die Untersuchungen einbezogen.

Das erste Kathepsin B-Intron ist 3536 bp groß und beinhaltet eine SP1-Bindestelle, zwei putative Smad-Erkennungssequenzen sowie zwei Konsensusstellen für den Transkriptionsfaktor AP-1, der durch die Proteinkinasen ERK1/2 und JNK aktiviert werden kann (Abb. 48, Kap. 4.9.2, Diskussionsteil). Die Klonierung des Konstruktes wurde in Abschnitt 2.2.2.5 erläutert. Dieses Konstrukt und der Kontrollvektor pGL-3B wurden in THP-1 Zellen transfiziert, die anschließend mit 20 ng/ml TGF-β1 behandelt wurden. Parallel wurden zur Kontrolle unbehandelte transfizierte Zellen analysiert. In alle Proben wurde zur Normierung zusätzlich zu den Test-Konstrukten auch der konstitutiv *Renilla*-Luziferase-exprimierende Vektor pRL-TK-Vektor transfiziert (Kap. 2.1.7).

In Abbildung 45 sind die normierten Luziferase-Aktivitäten aus THP-1-Zellen dargestellt. Das Intron zeigte eine Basalaktivität von 0,8 die sich nach TGF-β1-Behandlung auf 1,6 verdoppelte. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass sich auf dem Intron regulatorische Einheiten befinden die nach TGF-β1-Inkubation aktiviert wurden.

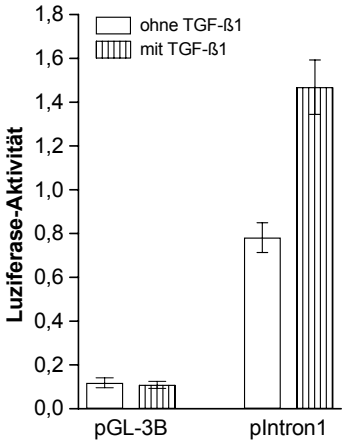

Abb. 45: Luziferase-Aktivitäten des ersten Kathepsin B-Introns nach Transfektion in THP-1-Zellen (n=5). Die Luziferase-Aktivität wurde durch Lumineszenzmessungen bestimmt (Mittelwert ± SEM). pGL3-B ist der Kontrollvektor ohne Promotor. TGF-β1 wurde in einer Konzentration von 20 ng/ml eingesetzt.

3.9.1 Lokalisierung der TGF-β1-reaktiven Einheit auf dem ersten Kathepsin B-Intron

Zur Lokalisierung der DNA-Bereiche, die für die basale Aktivität sowie für die induzierbare Aktivität des Introns verantwortlich waren, wurden drei Deletionskonstrukte kloniert, in den *Firefly*-Luziferase Reportergen-Vektor pGL-3B ligiert und die entstandenen Konstrukte in THP-1-Zellen transfiziert (Kap. 2.1.7 und 2.2.2.5). Die Deletion von 669 Basenpaaren vom 5`-Ende (pDel-669bp) führte zur Eliminierung der Bindungsstelle für den SP1-Transkriptionsaktor sowie der ersten Smad DNA-Erkennungssequenz. Dem zweiten Konstrukt (pDel-974bp) fehlten weitere 974 bp und durch die dritte Deletion (pDel-1712bp) wurde auch die zweite Smad-Konsensussequenz entfernt. In diesem kürzesten Konstrukt lag noch die zweite AP-1-Erkennungsstelle (Abb. 48).

Abbildung 46 zeigt die Aktivitäten der untersuchten Kathepsin B Intron1-Konstrukte. Die Luziferase-Aktivität des Introns verdoppelte sich nach TGF-β1-Behandlung. Die Deletion von 669 bp führte sowohl in TGF-β1-unbehandelten Kontrollproben als auch in den TGF-β1-induzierten Zellen zum Abfall der Aktivität auf das Niveau des Kontrollvektors. Die gleichen Werte waren auch mit dem pDel-974bp-Konstrukt messbar. Interessanterweise stieg die Luziferase-Aktivität in den Proben mit dem kürzesten Konstrukt (pDel-1712bp) wieder an. Sie konnte jedoch durch TGF-β1-Inkubation nicht weiter gesteigert werden.

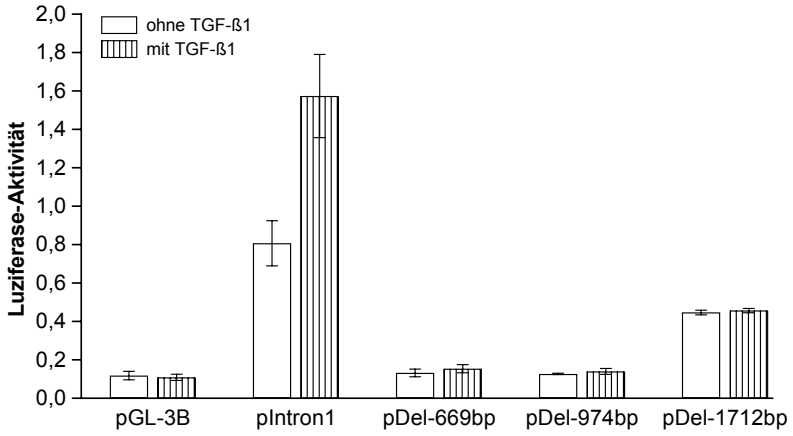

Abb. 46: Luziferase-Aktivitäten des ersten Kathepsin B-Introns und Intron1-Deletionskonstrukten nach Transfektion in THP-1-Zellen (n=5). Die Luziferase-Aktivität wurde durch Lumineszenzmessungen bestimmt (Mittelwert ± SEM). pGL3-B ist der Kontrollvektor ohne Promotor. TGF-β1 wurde in einer Konzentration von 20 ng/ml eingesetzt.

Aus den erhaltenen Ergebnissen konnte man schlussfolgern, dass die TGF-β1-Reaktivität des ersten Kathepsin B-Introns an die erste Smad-Konsensussequenz gekoppelt war. Nach Deletion dieses Bereiches konnte die Luziferase-Aktivität durch TGF-β1 im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollprobe nicht mehr erhöht werden.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung von TGF-β1 auf die Expression von Kathepsinen in myelo-monozytären Zelllinien, als Modell leukämischer Krebserkrankungen analysiert werden. Maligne Zellen einer akuten myeloischen Leukämie (AML) können an das Endothel der Blutbahnen adhärieren und anschließend, nach Degradation und Penetration der Extrazellulären Matrix in das Gewebe migrieren. Als Folge kommt es zur Ausbildung solider Tumore die als „Extramedulläre Leukämie“ oder „Granulozytisches Sarkom“ bezeichnet werden. Es wurde beschrieben, dass Extravasationen vor allem bei Leukämien der AML-Subklassen FAB M4 und M5 (myelo-monozytäre oder monoblastische Varianten) auftreten [69,72] wobei eine verstärkte Expression Extrazelluläre Matrix-degradierender Enzyme, wie MMPs und Kathepsine, eine wichtige Rolle spielen [75,76].

Die in dieser Arbeit verwendeten myelo-monozytären Zelllinien THP-1, MonoMac-1 und MonoMac-6 werden der AML-Subklasse M5 zugeordnet (DSMZ, Braunschweig) und stellen somit ein geeignetes Modell einer akuten myeloischen Leukämie dar, um tumorassoziierte Eigenschaften wie Kathepsin-Expression und die dadurch veränderte Invasion, Migration und Apoptoseverhalten der malignen Zellen zu untersuchen.

4.1 Charakterisierung des Differenzierungsstadiums von myelo-monozytären Zelllinien anhand der CD-14-Expression

Während der Entwicklung von Monoblasten zu ausdifferenzierten Monozyten durchlaufen die Zellen verschiedene Stadien, wobei eine ständige Zellteilung stattfindet. Zellen die im Laufe dieser Proliferations-/Differenzierungsphase neoplastischen Mutationen unterliegen, die eine Weiterentwicklung verhindern, teilen sich ungehemmt und sind unfähig ein fortgeschritteneres Differenzierungsstadium mit geringerer Teilungsrate zu erreichen. Die Folge sind Tumorerkrankungen wie die akute myeloische Leukämie (AML). Aus Patienten die an AML erkrankten sind drei verschiedene Zelltypen isoliert worden, die aufgrund morphologischer Charakteristika der Untergruppe FAB M5 zugeordnet wurden und drei verschiedene Entwicklungsstadien verkörpern.

Die verschiedenen Stadien der fortlaufenden Monoblasten-Entwicklung sind durch die Expression spezifischer Oberflächenmarker charakterisiert.

Der LPS-Rezeptor (Lipopolysaccharid-Rezeptor) CD14 ist ein wichtiger Differenzierungsmarker, der mit fortschreitender Entwicklung monozytärer Vorläuferzellen zunehmend exprimiert wird [87]. Er ist durch Glykosylphosphatidyl Inositol (GPI) in der Zellmembran verankert. LPS ist ein Bestandteil der bakteriellen Zellwand und verursacht nach Bindung an CD14 auf Monozyten/Makrophagen die Induktion der Entzündungskaskade in die auch die MAP-Kinasen p38, ERK1/2, und JNK involviert sind [88,89].

Die Zelllinie THP-1 ist dadurch charakterisiert, dass CD14 nur geringfügig auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden kann. Zusätzlich zeigen diese Zellen kaum Phagozytose, eine prominente Eigenschaft ausdifferenzierter Monozyten. Diese Charakteristika deuten auf ein Zell-Entwicklungsstadium hin, das dem undifferenzierter Monoblasten ähnelt. Der

Entwicklungsstatus von MonoMac-1-Zellen ist weiter fortgeschritten und das Erscheinungsbild von MonoMac-6-Zellen ähnelt deutlich dem reifer Monozyten. MonoMac-6-Zellen weisen eine hohe Phagozytoserate auf und exprimieren viel CD14-Protein auf der Zelloberfläche [90-92].
Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse des CD14-Gehaltes zur Charakterisierung der verwendeten THP-1-, MonoMac-1-, und MonoMac-6-Zellen konnte die in der Literatur angegebenen Werte bestätigen [87,91]. Die Zelllinie THP-1 wies als wenig differenzierte Zelllinie mit 3 % aller Zellen kaum CD14-Protein auf der Oberfläche auf, während der Gehalt auf MonoMac-1- und MonoMac-6-Zellen 8 % und 38 % betrug. Reife Monozyten exprimierten 100 % CD14 (Abb. 8, Kap. 3.1.1).

4.2 Die Rolle von TGF-β1 in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen

TGF-β1 reguliert wichtige biologische Prozesse wie Zellproliferation, Migration und Apoptose sowie die kontrollierte Synthese und Degradation der Extrazellulären Matrix [59]. Während der Oncogenese spielen die komplexen, multifunktionellen Eigenschaften dieses Zytokins eine duale Rolle. Je nach Stadium des Tumors und der spezifischen Reaktion von Tumorzellen auf TGF-β1 wird die Kanzerogenese supprimiert oder gefördert. Eine pathologisch veränderte Antwort von Tumorzellen auf TGF-β1 entsteht durch Veränderungen der Signaltransduktion auf verschiedenen Ebenen, wobei sowohl die Rezeptoren als auch die signalübermittelnden Proteine (Smads) betroffen sind [60].
In den folgenden Kapiteln wird der Einfluss von TGF-β1 auf die Proliferation und die Expression von Kathepsinen in myeloisch-monozytären Zelllinien diskutiert, sowie die daraus resultierenden Veränderung von biologischen Funktionen wie Invasion/Migration und Apoptose in der Zelllinie THP-1. Weiterhin wird die Signalkaskade dieses Zytokins in diesem Zellsystem beleuchtet.

4.3 TGF-β1-Einfluss auf die Proliferation von myelo-monozytären Zelllinien

Eine wichtige pathologische Charakteristik von Tumorzellen ist der Verlust der kontrollierten Proliferation. Zahlreiche Literaturdaten belegen, dass TGF-β1 die Proliferation beeinflussen kann. Aus diesem Grund wurde der Einfluss dieses Zytokins auf die Zellteilungsrate von THP-1, MonoMac-1 und MonoMac-6 analysiert.
Der Zellzyklus besteht aus zwei Hauptphasen, der DNA-Synthese (S) und der Mitose (M), die durch die G1- (*gap1*) und G2-Phase (*gap2*) getrennt sind. Der Übergang der Zellen von der G1- zur S-Phase ist ein kritischer Zeitpunkt der Proliferationsregulation. Wird dieser Punkt überschritten dann ist keine Umkehr mehr möglich. TGF-β1 entfaltet an diesem Punkt seine Wirkung. Die G1-Phase kann verlängert werden oder die Zelle bleibt vollständig in diesem Stadium arretiert. Weiterhin ist ein Austritt der Zelle aus dem Zellzyklus möglich wobei anschließend eine Ausdifferenzierung von Zellen unter TGF-β1-Einfluss stattfinden kann [62].
Der Zelltyp, das Differenzierungsstadium und die Wachstumsbedingungen von Zellen entscheiden ob TGF-β1 mitogen oder proliferationshemmend wirkt. Die Proliferationsrate von Zellen mesenchymalen Ursprungs (Fibroblasten, Osteoblasten) wird durch TGF-β1 im

Allgemeinen stimuliert, während Epithel- und Blutzellen im Wachstum gehemmt werden. Frühe, undifferenzierte hämatopoietische Vorläuferzellen unterliegen meist einer strikten Wachstumskontrolle durch TGF-β1 während die TGF-β1-Abhängigkeit bei Zellen eines späteren Differenzierungsstadiums reduziert ist [60,62]. Weiterhin existiert bezüglich des TGF-β1-Einflusses auf die Proliferation kein genereller Unterschied zwischen gesunden und malignen, aggressiven Zellen, da auch Tumorzellen nicht einheitlich auf TGF-β1 reagieren. Auch hier bestimmen der Zelltyp und die jeweilige Umgebung in der die Zellen wachsen das Proliferationsverhalten [93].

Die Daten der Proliferationsanalyse von THP-1, MonoMac-1, und MonoMac-6 nach TGF-β1-Inkubation zeigten, dass sich die getesteten Zelllinien ähnlich wie gesunde myelo-monozytäre Vorläuferzellen verhielten. Die weniger differenzierten Zelllinien THP-1- und MonoMac-1-Zellen unterlagen einer strikteren TGF-β1-Proliferationskontrolle als die weiter entwickelten MonoMac-6-Zellen.

Wie bereits erwähnt, sind MonoMac-6-Zellen im Gegensatz zu gesunden Zellen in einem definierten Differenzierungsstadium arretiert, und wie die meisten Tumorzelllinien durch andauerndes Zellwachstum charakterisiert. In diesem Zusammenhang könnte der zusätzliche Verlust der TGF-β1-Proliferationskontrolle auf ein verstärktes malignes Potential dieser Zellen hindeuten.

4.4 Der Einfluss von TGF-β1 auf das proteolytische Potential von humanen Tumoren

Maligne Tumoren repräsentieren eine der häufigsten Todesursachen in Ländern der nördlichen Hemisphäre. Um effektive Antitumor-Therapien zu entwickeln ist es essentiell die Vorgänge während der Tumorentwicklung zu charakterisieren [53]. Auf die bösartige Transformation gesunder Zellen folgen aggressives Wachstum und die Bildung von Metastasen. Dieser Vorgang erfordert Invasion in umliegendes Gewebe, aktive Migration in die Blutbahnen sowie effiziente Extravasation, was zu einer systemischen Verbreitung von Metastasen führt [94]. In dieser Phase einer Tumorentwicklung entsteht in der Tumor-Umgebung ein Mikroklima das Zellmigration und die Entstehung von Blutkapillaren begünstigt [46]. Als Voraussetzung für diese Vorgänge benötigen Krebszellen ein hohes proteolytisches Potential, das durch erhöhte Expression verschiedener Proteasen gewährleistet wird [95]. Viele proteolytische Enzyme werden mit diesen Prozessen in Verbindung gebracht. Zum Beispiel wird die Rolle von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und Kathepsine B und L diskutiert [96-98].

Bestimmte Tumoren produzieren verstärkt TGF-β1. Der erhöhte Spiegel dieses Zytokins kann das Mikroklima in der Umgebung eines Tumorherdes dahingehend verändern, dass eine Invasion in umliegendes Gewebe und Blutbahnen favorisiert wird [46,99]. Studien an Mammakarzinomen konnten belegen, dass eine erhöhte TGF-β1 mRNA-Expression mit einer schlechten Prognose korreliert [100]. Ebenso konnten diagnostische Untersuchungen an weiteren Tumoren zeigen, dass eine erhöhte TGF-β1-Konzentration im Plasma von Patienten ebenfalls zu erhöhter Mortalität führt [101-104].

Der Einfluss von TGF-β1 auf Extrazelluläre Matrix-degradierende und somit invasionsfördernde Metalloproteasen konnte in einer Reihe von Tumorzelllinien nachgewiesen werden wobei Inkubation mit TGF-β1 eine verstärkte Expression der Proteasen MMP-2, MMP-3, MMP-7 und MMP-9 verursachte [105-107]. Im Gegensatz dazu konnte jedoch gezeigt werden, dass TGF-β1 unter proinflammatorischen Bedingungen die induzierte Synthese von MMPs in Makrophagen und Fibroblasten inhibiert [108,109].

Während der Effekt von TGF-β1 auf die MMP-Expression in der Literatur häufig diskutiert wurde, erfolgten nur wenige Analysen der Wirkung dieses Zytokins auf die ebenfalls Matrix-degradierenden Proteasen der Kathepsin-Familie. Bisher konnte gezeigt werden, dass TGF-β1 in der epithelialen Lungenkarzinom-Zelllinie A-549 zu einer erniedrigten Expression Kathepsine B und L führt [81,82].

4.5 Die Wirkung von TGF-β1 auf die Kathepsin-Expression in myelo-monozytären Zelllinien

Der Einfluss von TGF-β1 auf die Kathepsin-Expression in myelo-monozytären Zelllinien wurde durch eine Reihe von Experimenten untersucht (Kap. 3.2.2).

- **Die Kathepsin L-Expression nach TGF-β1-Inkubation**

Innerhalb der myelo-monozytären Zelllinien konnte nach TGF-β1-Inkubation nur in MonoMac-1-Zellen eine erhöhte Kathepsin L-Expression auf mRNA- und Proteinebene gemessen werden (Abb. 16, Kap. 3.2.2.3). In Bezug auf die Progression maligner Tumorerkrankungen spielt auch Kathepsin L, wie Kathepsin B, eine bedeutende Rolle. Aus einer Reihe von Arbeiten geht hervor, dass die Expression und Aktivität von Kathepsin L in Tumorgeweben verstärkt ist [110-112]. Es gibt weitere Hinweise, dass Kathepsin L neben Kathepsin B und D an der Degradation der extrazellulären Matrix, bestehend aus Kollagenen, Glykoproteinen und Proteoglykanen, beteiligt ist [19,20].

Der Befund, dass nur MonoMac-1-Zellen auf TGF-β1 mit einer verstärkten Kathepsin L-Expression reagierten, könnte auf eine differenzierte Kathepsin L-Genregulation durch das Zytokin zurückzuführen sein, die nur in einem schmalen Zeitfenster der myelo-monozytären Entwicklung auftritt. Monozytäre Vorläuferzellen deren Differenzierung in diesem Zeitfenster unterbrochen wird, reagieren auf den TGF-β1-Stimulus mit einer erhöhten Kathepsin L-Expression, die aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften der Protease, zu einer erhöhten Malignität führen kann.

- **Die Kathepsin B-Expression nach TGF-β1-Inkubation**

In einer Reihe humaner Tumoren konnte ein erhöhter Kathepsin B mRNA-Spiegel detektiert werden, der immer eine verstärkte Proteinexpression und Kathepsin B-Aktivität verursacht und mit einer erhöhten Tumorinvasion korreliert [28,42,113]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine veränderte intrazelluläre Lokalisation von Kathepsin B zur Erhöhung der pathologischen Eigenschaften von metastasierenden Tumorzellen beiträgt [114].

Die in Kapitel 3.2.2.2, 3.2.2.4 und 3.2.2.6 (s. a. Tab. 10 in Kap. 3.2.2.6) dargestellten Ergebnisse zeigen, dass TGF-β1 in allen analysierten myelo-monozytären Zelllinien eine Erhöhung der Kathepsin B-Expression verursachte, wobei THP-1-Zellen am stärksten auf diesen Stimulus reagierten. Die intrazelluläre Expression der Protease war 5-fach erhöht, die Sekretion war 3,4-mal höher als in Kontrollzellen.

Zusätzlich konnte belegt werden, dass die gemessene 5,8-fache Steigerung des Kathepsin B mRNA-Gehaltes eine Folge erhöhter Transkription war und nicht durch verlängerte mRNA-Haltbarkeit verursacht wurde (Abb. 21, Kap. 3.4.1 und Abb. 22, Kap. 3.4.2). Ein erhöhter Kathepsin B mRNA-Gehalt in Kolorektal-Karzinomen korreliert mit dem fortschreitenden Stadium dieser Tumore [39]. Die Ursachen des gesteigerten mRNA-Spiegels wurden nicht geklärt, der Zusammenhang zwischen verstärkter Kathepsin B mRNA-Expression und Aggressivität dieser Tumoren kann jedoch deutlich belegt werden [40]. Ein möglicher Grund für die erhöhte Malignität von Kolorektal-Karzinomen könnte die unter TGF-β1-Einfluss verstärkte Kathepsin B-Expression sein, eine Hypothese die analysiert werden müsste.

Die Induktion eines erhöhten Kathepsin B-Gehaltes durch TGF-β1 in den myelo-monozytären Zellen steht im Gegensatz zu den Befunden unserer Arbeitsgruppe die zeigen, dass Fibroblasten und die epitheliale Zelllinie A-549 auf TGF-β1-Inkubation mit einer Erniedrigung der Kathepsin-Expression reagieren [81,82,115]. Die durch TGF-β1 verursachte verstärkte Kathepsin B-Produktion in myelo-monozytären Zelllinien spricht für eine spezifische Antwort dieser Zellen auf das Zytokin die sich im Rahmen der Kanzerogenese entwickelt hat und deshalb weiter untersucht werden sollte.

4.6 Die Wirkung von Lipopolysaccharid/TGF-β1 auf die Kathepsin-Expression in myelo-monozytären Zelllinien

Der Befund, dass TGF-β1 eine Aufregulation von Kathepsinen verursacht war überraschend, da in unserem Arbeitskreis gezeigt werden konnte, dass dieses Zytokin die Suppression von Kathepsin B und L in der Lungenepithelzelllinie A-549 bewirkt [81,82]. Um die Wirkung von TGF-β1 in den analysierten myeloisch-monozytären Zelllinien weiter zu evaluieren, wurden diese Zellen mit einem zweiten Stimulus behandelt.

Lipopolysaccharid (LPS, bakterielles Endotoxin) bindet an die Oberfläche von CD14-exprimierenden Monozyten/Makrophagen und stimuliert diese Zellen[116,117]. Es wurde gezeigt, dass im späteren Verlauf des inflammatorischen Prozesses TGF-β1 antagonistisch zu LPS wirkt und die Entzündungsreaktion beendet. Außerdem ist bekannt, dass LPS in einer Reihe von Zellsystemen die verstärkte Expression von Extrazellulärer Matrix-degradierenden MMPs induziert [118,119].

Es sollte nun untersucht werden, ob LPS in den in dieser Arbeit verwendeten myeloisch-monozytären Zelllinien ebenfalls eine Veränderung der Expression von Extrazellulärer Matrix-abbauenden Kathepsinen induzieret. Der Effekt von Endotoxin sollte der Wirkung einer TGF-β1-Inkubation gegenüber gestellt werden. Weiterhin sollte durch Koinkubation der beiden Substanzen analysiert werden, ob bezüglich der Kathepsin-Expression eine additive oder antagonistische Wirkung messbar ist.

4.6.1 Die Wirkung von LPS und TGF-β1 auf die Expression ihrer Rezeptoren in den Zelllinien THP-1 und MonoMac-6

Die Wirkung externer Liganden erfolgt über die Bindung an ihre Rezeptoren. Dabei wird eine Signalkaskade gestartet, die in der gezielten Regulation spezifischer Gene mündet. Da die TGF-β1- und Endotoxin-Rezeptoren bekannt sind, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst der Einfluss des Entzündungs-Stimulus und des Zytokins auf die Expression von CD14 sowie des TGF-β1-Rezeptors Typ II in THP-1- und MonoMac-6-Zellen analysiert.

- **CD14-Gehalt nach LPS- und TGF-β1-Inkubation**

Der CD14-Gehalt auf der Oberfläche von MonoMac-6-Zellen wurde durch LPS deutlich erhöht. Auf THP-1-Zellen blieb die Expression unverändert. Dieser Befund ist vermutlich auf den Differenzierungsstatus beider Zelltypen zurückzuführen (Abb. 9, Kap. 3.1.2). Da THP-1-Zellen sehr wenig CD14 exprimieren [89], können sie nur geringfügig darauf reagieren. Die CD14-Expression kann jedoch durch 1,23-Dihydroxy Vitamin D_3 induziert werden. Dabei findet eine Ausdifferenzierung der THP-1-Zellen und die Veränderung funktioneller Eigenschaften statt, so dass die Zellen differenzierten Monozyten/Makrophagen ähneln [120].

Im Gegensatz zu THP-1-Zellen reagierten die mit vielen CD14-Molekülen ausgestatteten MonoMac-6-Zellen auf den Endotoxin-Stimulus mit einer verstärkten Expression von Oberflächen-CD14. Es scheint hier ein direkter Zusammenhang zwischen der LPS-Wirkung und der Expression von CD14 zu existieren, der auch von Ziegler-Heitbrock et al. [121] bestätigt wurde.

Die Analyse des Zusammenhangs zwischen der Inkubation mit TGF-β1 und der CD14-Expression zeigte, dass das Zytokin in THP-1-Zellen den CD14-Gehalt um 40 % erniedrigte während in MonoMac-6-Zellen keine CD14-Modulation auftrat.

Der Einfluss von TGF-β1 auf die CD14-Expression scheint von dem Entwicklungsstadium der myelo-monozytären Zellen abhängig zu sein da Literaturdaten zeigen, dass ausdifferenzierte Monozyten wie die hier analysierten MonoMac-6-Zellen nicht mit einer Modulation des LPS-Rezeptors auf TGF-β1-Inkubation reagieren [122].

- **TGF-β1-Rezeptor Typ II-Gehalt nach TGF-β1- und LPS-Inkubation**

TGF-β1 erhöhte in beiden myelo-monozytären Zelllinien die mRNA-Expression des TGF-β1-Rezeptors Typ II (Abb. 10, Kap. 3.1.2). Der Effekt war in MonoMac-6-Zellen stärker ausgeprägt als in THP-1-Zellen. Dieser Befund spricht für eine erhöhte Sensibilisierung der MonoMac-6-Zellen für die unterschiedlichsten TGF-β1-Effekte. Demgegenüber stehen bereits diskutierte Ergebnisse die belegen, dass THP-1-Zellen trotz geringerer Erhöhung des TGF-β1 Typ II-Rezeptors nach TGF-β1-Inkubation sensitiver als MonoMac-6-Zellen auf das Zytokin reagierten. Die Proliferationsrate von THP-1-Zellen wurde durch TGF-β1 stärker inhibiert als diejenige von MonoMac-6-Zellen, und die Modulation der Kathepsin B-Expression in THP-1-Zellen war wesentlich stärker als in MonoMac-6-Zellen. Diese Befunde verdeutlichen, dass die Regulationsmechanismen von TGF-β1 nicht allein durch die Expression seines Typ II Rezeptors gesteuert, sondern sehr wahrscheinlich auch durch die in der Einleitung

aufgezeichneten Signaltransduktionswege beeinflusst werden. Veränderungen in der *downstream* Signalkaskade von TGF-β1 können, wie weiter unten dargestellt, die Antwort einer Zelle auf dieses Zytokin vermutlich unabhängig von der Expressionsstärke des TGF-β1-Rezeptors Typ II, maßgeblich modulieren.

MonoMac-6-Zellen reagierten auf LPS-Stimulation mit einer erhöhten Expression der TGF-β1-Rezeptor Typ II-mRNA, während die Expression in THP-1-Zellen nicht verändert wurde.

Die höhere LPS-Sensitivität von MonoMac-6-Zellen im Vergleich zu THP-1-Zellen wurde sowohl durch diesen Befund als auch bei der Modulation der Kathepsin B- und Kathepsin L-Expression bestätigt. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Wirkung von LPS auf die Expression verschiedener Proteine abhängig ist von der Höhe des CD14-Gehalts auf der Zelloberfläche, wobei wie bei der TGF-β1-Wirkung ein zusätzlicher Einfluss der LPS-Signaltransduktion auf die Genregulation wahrscheinlich ist.

4.6.2 Die Wirkung von LPS/TGF-β1 auf die Kathepsin-Expression in den Zelllinien THP-1, MonoMac-1 und MonoMac-6

- **Kathepsin L-Expression nach LPS-/TGF-β1-Inkubation**

MonoMac-1-Zellen reagierten auf den LPS-Stimulus mit einer Erhöhung der Kathepsin L-Expression wobei TGF-β1 die Sekretion der Protease stärker induzierte als Endotoxin (Abb. 16, Kap. 3.2.2.3).

In MonoMac-6-Zellen dominierte eindeutig der LPS-Effekt durch die Induktion der Kathepsin L mRNA- und der Proteinexpression (Abb. 18, Kap. 3.2.2.5).

Das Ausmaß der Kathepsin L Aufregulation durch LPS scheint an den CD14-Gehalt der Zellen gekoppelt zu sein, da THP-1-Zellen mit einem sehr geringen CD14-Anteil nicht auf den Stimulus reagierten (Abb. 14, Kap. 3.2.2.1). Die Zelllinien MonoMac-1 und MonoMac-6 mit höherem CD14-Gehalt steigerten sehr deutlich die Kathepsin L-Expression. Die Regulation der Kathepsin-Expression durch TGF-β1 war dadurch nicht beeinflusst. Auch die gleichzeitige Wirkung von LPS und TGF-β1 führte nicht zu einer zusätzlichen Veränderung des Kathepsin L-Gehaltes der Zellen im Vergleich zur Wirkung der einzelnen Stimuli. Das deutet auf unterschiedliche Mechanismen der Kathepsin L-Genregulation durch Endotoxin und TGF-β1 hin.

- **Kathepsin B-Expression nach LPS-/TGF-β1 -Inkubation**

Der Kathepsin B-Spiegel wurde durch bakterielles Endotoxin in THP-1-Zellen (Abb. 15, Kap. 3.2.2.2) weniger als in MonoMac-1- sowie MonoMac-6-Zellen erhöht (Abb. 17, Kap. 3.2.2.4, und Abb. 19, Kap. 3.2.2.6).

LPS induzierte mit zunehmender Differenzierung der myelo-monozytären Zellen eine Verstärkung der Kathepsin B-Expression, was vermutlich durch den höheren Endotoxin-Rezeptor-Gehalt in MonoMac-6- und MonoMac-1-Zellen im Vergleich zu THP-1-Zellen begründet werden kann.

Zusammenfassend konnte deutlich gezeigt werden, dass in myelo-monozytären Zelllinien eine durch LPS ausgelöste Signaltransduktion die Expression von Kathepsin B und L modulieren konnte.

4.7 Funktionelle Rolle der TGF-β1-induzierten Kathepsin B-Überexpression in THP-1-Zellen

4.7.1 Analyse der Invasions-/Migrationsraten von THP-1-Zellen nach TGF-β1-Inkubation als funktionelle Folge einer erhöhten Kathepsin B-Sekretion

Der Fokus der nachfolgenden Analysen wurde auf die TGF-β1-induzierte Kathepsin B-Expression in THP-1-Zellen gelegt, da in diesen myelo-monozytären Zellen die stärkste Aufregulation der Protease stattfand.

Die kontinuierliche Sekretion einer Extrazellulären Matrix-degradierenden Protease ist die Voraussetzung für den invasiven Phänotyp von Tumorzellen. In diesem Zusammenhang kann die Frage diskutiert werden, wie ein lysosomales Protein in die Zellperipherie gelangen könnte. Es gibt mehrere Literaturhinweise die sich mit dieser Fragestellung beschäftigten und die erhöhte Kathepsin B-Sekretion mit der verstärkten Aggressivität von Tumorzellen in Verbindung bringen. Keppler und Sloane [114] berichteten, dass lysosomale Vesikel in metastasierenden Melanomzellen in die Zellperipherie sowie an die Innenseite der Zellmembran wandern. Lysosomale Vesikel sind auch in spontan immortalisierten Ras-transfizierten MCF-10AneoT Brustepithelzellen an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert und es wird postuliert, dass aktives lysosomales Kathepsin B-Protein nach einer geringfügigen Ansäuerung des perizellulären Raumes sezerniert werden könnte. Des Weiteren wird angenommen, dass Karzinomzellen Kathepsin B in Vesikel, die zur Speicherung von unbenötigtem Material dienen, durch Fusion mit Lysosomen einschleusen können. Die entstehenden Granulae könnten anschließend, nach Umwandlung in sekretorische Vesikel, den Inhalt durch Exozytose nach außen sezernieren. Eine Fixierung von Kathepsin B im extrazellulären Raum könnte laut Mai et al. [123] durch Bindung an die leichte Kette des Annexin II-Heterotetramer an der Zell-Außenseite stattfinden.

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass TGF-β1 in THP-1-Zellen eine verstärkte Sekretion von Kathepsin B verursachte (Abb. 15, Kap. 3.2.2.2), wurden zur Untersuchung der Bedeutung dieses Befundes Invasions-/Migrationsversuche unter Verwendung des nicht membrangängigen Kathepsin-Inhibitors E64 durchgeführt. Aus Literaturdaten geht hervor, dass beispielsweise die erhöhte Invasionsfähigkeit von Pankreaskarzinomzellen mit der in diesen Zellen stattfindenden Kathepsin B-Überexpression in Verbindung gebracht werden kann und metastasierende Magenkarzinome einen höheren Gehalt dieser Protease exprimieren als die entsprechenden nicht-invasiven Tumoren [124,125]. Deshalb sollte untersucht werden, ob sich die Induktion der Kathepsin B Expression auf die Invasivität und das Migrationsverhalten von Tumorzellen auswirkt.

Matrigel-beschichtete *Transwell*-Kammern gelten als etabliertes Modell um das invasive Potential von Zellen zu untersuchen. Die Zellen müssen proteolytische Enzyme sezernieren um

das Matrigel lokal zu degradieren und anschließend durch den Filter in die Unterseite der Kammer zu migrieren.

Der Befund, dass die erhöhte Invasions-/Migrationsrate von TGF-β1-behandelten Zellen durch E64-Koinkubation von 330 % auf 210 % reduziert wurde, belegt die Beteiligung von Kathepsinen an diesem Prozess. Die Tatsache, dass die ebenfalls Extrazelluläre Matrix-degradierenden Kathepsine L, K und S durch TGF-β1 nicht aufreguliert werden, lässt die Schlussfolgerung zu, dass das proteolytische Potential von Kathepsin B eindeutig zur Invasion/Migration von THP-1-Zellen beiträgt. Dieses Ergebnis wird durch Literaturdaten bestätigt in denen klar gezeigt werden konnte, dass die Transfektion verschiedener Tumorzelllinien mit Kathepsin B-Antisense-Konstrukten sowie die Kathepsin-Inaktivierung durch spezifische Inhibitoren zu einer deutlichen Erniedrigung der Invasions-/Migrationsrate führten [126,127]. Die unvollständige Inhibierung der Invasion/Migration von THP-1-Zellen durch Kathepsin-Inhibitoren lässt die Vermutung zu, dass weitere Proteasen, beispielsweise MMPs, deren Aufregulation durch TGF-β1 ebenfalls dokumentiert ist, an diesem Prozess beteiligt sind.

4.7.2 Funktionelle Analyse der intrazellulären Kathepsin B-Überexpression in THP-1-Zellen

In Zelllysaten von THP-1-Zellen konnte mittels ELISA ein Anstieg des Proteasegehaltes auf 500 %, im Vergleich zu Kontrollproben gemessen werden (Abb. 15, Kap. 3.2.2.2). In den weiteren experimentellen Ansätzen wurde deshalb die funktionelle Bedeutung der intrazellulären Kathepsin B-Aktivität charakterisiert. Dazu wurde der zellgänge Kathepsin-Inhibitor E64d genutzt.

Zunächst musste gezeigt werden, dass die Inkubation der THP-1-Zellen mit TGF-β1 tatsächlich zu einer Erhöhung der lysosomalen Kathepsin B-Aktivität führt und das diese Aktivität durch E64d modulierbar ist. Danach wurde die funktionelle Bedeutung der Aktivität in Bezug auf die Apoptoseresistenz der Zellen näher untersucht.

4.7.2.1 Die Kathepsin B-Aktivität in THP-1-Zellen nach TGF-β1-Inkubation

Es konnte durch Verwendung des spezifischen Kathepsin B-Substrates Z-Arg-Arg-AMC gezeigt werden, dass die sich Aktivität dieser Protease in den Endosomen/Lysosomen aus THP-1-Zellen durch Inkubation mit TGF-β1 auf 230% erhöhte (Abb. 24, Kap. 3.5.2). In TGF-β1-unbehandelten Zellen wurde die Kathepsin B-Aktivität durch den membrangängigen Kathepsin-Inhibitor E64d bei einer Konzentration von 5 µM und 10 µM auf 50 % reduziert. In TGF-β1-behandelten Zellen führte die Inkubation mit 5 µM E64d zur Reduktion der Kathepsin B-Aktivität auf das Basalniveau (100 %).

4.7.2.2 Analyse der Apoptose-Raten in THP-1-Zellen nach TGF-β1-Behandlung und Kathepsin-Inhibition

Apoptose ist ein physiologischer Prozess, bei dem Zellen sich selbst eliminieren. Sie spielt eine große Rolle während der Embryonalentwicklung, bei der Lymphozytenreifung, bei der Immunsuppression nach einer Immunantwort und bei der Eliminierung entarteter, maligner körpereigener Zellen [128].

Der programmierte Zelltod ist ein für die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines Organismus lebenswichtiger Mechanismus. Nur wenn die Neubildung und Eliminierung der Zellen im Gleichgewicht stehen, bleibt der Organismus gesund. Gerät dieses Gleichgewicht außer Kontrolle, sind krankhafte Erscheinungen wie Tumoren die Folge.

Apoptose kann sowohl durch externe als auch interne Signale ausgelöst werden. Zu den externen Signalen gehören neben hohen Dosen von UV- oder Röntgenstrahlung auch die zytotoxischen Liganden TNF-α (Tumor-Nekrosefaktor-α) und CD-95L/FasL. Durch Bindung dieser Moleküle an die entsprechenden Todesrezeptoren (TNF-Rezeptor bzw. CD95/Fas-Rezeptor) wird Apoptose ausgelöst [129,130]. Die Aktivierung der Todesrezeptoren induziert eine proteolytische Kaskade in der Caspasen eine wichtige Rolle spielen und an deren Ende die Degradierung der DNA steht. Ein weiterer Weg der Apoptose-Induktion verläuft über die Mitochondrien wobei die Proteine Bid und Bax eine proapoptotische Rolle übernehmen und Bcl-2 und Bcl-XL antiapoptotisch wirken. Die Auslösung des Zelltodes verläuft dann über den Cytochrom c-Austritt aus den Mitochondrien und anschließend wiederum über den Caspase-Weg [131-137]. Die Apoptose ist charakterisiert durch das Schrumpfen der Zellen, die Degradierung der DNA durch Endonukleasen in definierte Fragmente und die Ausbildung von membranumschlossenen Vesikeln, die durch Makrophagen eliminiert werden.

Neben der Beteiligung von Caspasen als Effektorproteasen am Apoptose-Prozess wird in der Literatur zunehmend auch die Rolle von Kathepsinen bei diesem Vorgang analysiert wobei vor allem die Funktion von Kathepsin B kontrovers diskutiert wird. Eine proapoptotische Rolle von Kathepsinen wird beispielsweise von Cirman et al., Stoka et al., Eijk et al. erwähnt [138-140], die einen lysosomalen Signalweg zur Apoptose-Induktion postulieren in dessen Verlauf eine Schädigung der Lysosomen und somit die Freisetzung von Kathepsinen vorausgesetzt wird. Durch die proteolytischen Eigenschaften der Kathepsine gilt die Aktivierung von Caspasen sowie des proapoptotischen Proteins Bid mit anschließender Induktion der Apoptosekaskade als wahrscheinlich. Die Untersuchungen wurden in HeLa-Zellen [139], zellfreien Extrakten aus der humanen neuronalen Zelllinie NT2 [138] und in B-Zellen aus follikulären Reifungszentren der Tonsillen durchgeführt [140].

Roberts et al. [141] zeigten eine proapoptotische Rolle von Kathepsin B bei dem Gallensalz-induzieren Zelltod von Ratten-Hepatozyten und Foghsgaard et al. [142] konnten eine Beteiligung von Kathepsin B an einer TNF-α-induzierten, Caspase-unabhängigen Apoptose in der Zelllinie WEHI-S nachweisen. Im Vergleich dazu stehen Arbeiten von Shibata et al. [143] und Isahara et al. [144] die demonstrierten, dass Kathepsin B-Überexpression in PC-12-Zellen nach Serum-Entzug zu einer verringerten Apoptose-Rate führt. Durch die Inhibition von Kathepsin B

mittels CA-074 konnten die Apoptose-Raten wieder erhöht werden.
Aufgrund der erwähnten Literaturdaten kann geschlussfolgert werden, dass die Funktion von Kathepsin B in pro- oder antiapoptotischen Prozessen noch nicht abschließend geklärt ist.
Um die physiologische Funktion der erhöhten Kathepsin B-Aktivität im Apoptose-Verhalten TGF-β1-behandelter THP-1-Zellen zu beleuchten, wurde die Apoptose-Rate nach Zugabe des membrangängigen Kathepsin-Inhibitors E64d untersucht (Abb. 25, Kap. 3.5.3). E64d (5 µM) verursachte einen Apoptose-Anstieg auf 390 % der durch TGF-β1-Koinkubation parallel zur Kathepsin B-Aktivität auf Basalniveau gesenkt werden konnte. Bei der maximal eingesetzten Konzentration von 10 µM E64d bestand noch immer ein 2,7-facher Unterschied der Apoptose-Rate zwischen Proben mit alleiniger E64d-Inkubation und E64d/TGF-β1 Koinkubations-Proben. Die antiapoptotische Wirkung von Kathepsin B in THP-1-Zellen, konnte somit demonstriert werden.
Zusammenfassend wurde gezeigt, dass TGF-β1 in THP-1-Zellen zur verstärkten Kathepsin B-Expression sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene führte. Dadurch kam es zur erhöhten Sekretion dieser Protease in die Zellperipherie und zu einer Erhöhung der Invasion und Migration von THP-1-Zellen. Somit wurde das Verhalten der Zellen in Richtung einer erhöhten Malignität verschoben. In dieses Gesamtschema konnte auch der Befund der erniedrigten Apoptose-Rate in Kathepsin B-überexprimierenden THP-1-Zellen eingegliedert werden.

4.8 Analyse der TGF-β1-Signaltransduktion

4.8.1 Die Smad-gekoppelte TGF-β1-Signaltransduktion

Die Reaktion von Tumorzellen auf TGF-β1 kann durch genetische Modifikationen von Proteinen der Signaltransduktionskaskade so verändert werden, dass die Tumor-supprimierende Wirkung verloren geht und durch Tumor-fördernde Reaktionen ersetzt wird [60]. Dadurch könnte auch die unterschiedliche Wirkung von TGF-β1 auf die Kathepsin B-Expression in den myelo-monozytären Zelllinien THP-1 und MonoMac-6 im Vergleich zur Lungenepithelzelllinie A-549 erklärt werden.
Den in Kapitel 4.5 diskutierten Ergebnissen der erhöhten Kathepsin B-Expression in THP-1 und MonoMac-6-Zellen stehen Literaturdaten [81,82] und in dieser Arbeit reproduzierte Ergebnisse gegenüber die belegen, dass TGF-β1 in der Lungenepithelzelllinie A-549 zu einer Erniedrigung der Kathepsin B- und L-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene führt. Diese gegensätzliche Wirkung des Zytokins in verschiedenen Zellsystemen könnte auf eine unterschiedliche Kathepsin B und L-Gen-Regulation zurückzuführen sein, die auf einer veränderten TGF-β1-Signaltransduktionskaskade basiert. Aufgrund der in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Ergebnisse wurde der Schwerpunkt der nachfolgenden Untersuchungen auf die Regulation der Kathepsin B-Expression gelegt.
Durch Mutationen in den kodierenden Bereichen der TGF-β1-Rezeptoren können Rezeptormoleküle exprimiert werden, die nicht in der Lage sind die TGF-β1-Signalübermittlung zu initiieren [46]. In einer Reihe von Tumoren konnten solche inaktivierende Mutationen der

TGF-β1 Typ I- und Typ II-Rezeptoren nachgewiesen werden [145-149].

In dieser Arbeit wurde sowohl in den myelo-monozytären Zelllinien THP-1 und MonoMac-6 als auch in den epithelialen A-549-Zellen die Expression der mRNA für TGF-β1 Typ II-Rezeptoren und BMP-Rezeptoren nachgewiesen. Ebenso wurde die mRNA-Expression des TGF-β1-Rezeptors Typ I ALK5 sowie der TGF-β1/BMP-Rezeptoren Typ I ALK1 und ALK2 in allen getesteten Zelllinien mittels RT-PCR demonstriert (Abb. 30, Kap. 3.6.2). Es wurde somit auf Rezeptorebene kein Unterschied zwischen myelo-monozytären Zelllinien und der Lungenepithelzelllinie festgestellt.

Um die Funktionsfähigkeit der auf mRNA-Ebene nachweislich exprimierten TGF-β1-Rezeptoren in dem in dieser Arbeit verwendeten myelo-monozytären Zellsystem und vergleichend in A-549-Zellen zu analysieren, wurde die Phosphorylierung von Smad2 nach Inkubation mit TGF-β1 überprüft (Kap. 3.6.1).

Durch den Nachweis, dass das TGF-β1-Signalprotein Smad2 in allen getesteten Zelllinien phosphoryliert wurde konnte belegt werden, dass die TGF-β1-Rezeptortypen I und II durch den Liganden aktiviert wurden und somit in der Lage waren die Signalkaskade zu starten. Auf dieser Ebene konnte somit kein prinzipieller Unterschied zwischen myelo-monozytären und epithelialen Zelllinien detektiert werden.

Auffallend war jedoch, dass nach Inkubation mit TGF-β1 die Smad2-Phosphorylierungsstärke in THP-1-Zellen (Abb. 26, Kap. 3.6.1) gegenüber MonoMac-6-Zellen (Abb. 27, Kap. 3.6.1) und den epithelialen Zellen A-549 (Abb. 28, Kap. 3.6.1) zunimmt, während die Kathepsin B-Expression in dieser Reihenfolge, bis hin zur Hemmung in A-549-Zellen, abnimmt. Es kann also eine indirekte Korrelation zwischen dem Smad2-Phosphorylierungsstatus und der Kathepsin B-Expressionsrate festgestellt werden.

Dieser Befund spricht für eine komplexe Steuerung der Kathepsin B-Expression nach TGF-β1-Inkubation. Dazu gehört die Regulation des Smad-Signalweges durch inhibitorische Smad6 und Smad7 (I-Smads) die die Smad-Signaltransduktionskaskade modulieren können (Abb. 4, Kap. 1.4.2). Smad7 inhibiert den R-Smad-vermittelten Signalweg durch Bindung an die TGF-β1-Rezeptoren und verhindert die Phosphorylierung der R-Smads. Smad6 ist an den BMP-Signalweg gekoppelt und kann an bereits phosphorylierte BMP-R-Smads binden und die Assoziation an Smad4 und somit die Translokation in den Zellkern inhibieren [51]. Ein äquivalenter Mechanismus wäre für Smad7 denkbar. Eine weitere Regulationsebene für bereits phosphorylierte R-Smads besteht in ihrer Ubiquitinierung. Aktiviertes Smad2 kann im Zellkern durch Ubiquitinierung zur Degradation durch den Proteasomkomplex markiert werden [51]. Eine erhöhte Ubiquitinierung von phosphoryliertem Smad2 wurde im Fall kleinerer Deletionen, *frame-shifts*, *nonsense*- oder *missense*-Mutationen der MH2-Domäne beobachtet, die vor allem in Pankreas- und Darmtumoren gefunden wurden[150].

Auf diese möglichen, nicht notwendigerweise Phosphorylierungs-inhibitorischen Mutationen in Smad2 und Smad4 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden. Als Ausblick wäre es jedoch sinnvoll die kodierenden Fragmente der beiden Gene aus den getesteten Zelllinien zu klonieren und zur Detektion von eventuell vorhandenen Veränderungen

der Wildtyp-Nukleotidabfolge, einer Sequenzierung zu unterziehen

Die Regulation der Smad-Signaltransduktion kann außerdem durch die unten diskutierten MAP-Kinase-Signalwege beeinflusst werden.

Durch den Nachweis der Phosphorylierung von Smad 2 konnte gezeigt werden, dass dieses Protein in THP-1-Zellen keine Mutationen besitzt die eine Aktivierung verhindern. Dieser Befund ist von Bedeutung da es in der Literatur Hinweise gibt die belegen, dass in Tumoren eine Smad2-Mutation in der MH2-Domäne an Position Asp_{450} zu Glu_{450} in der Nähe der Phosphorylierungsstellen $Serin_{465}$ und $Serin_{467}$ die Aktivierung durch den TGF-β1 Rezeptor Typ I- verhindert [151,152].

In der Literatur ist das Auftreten größerer chromosomaler Deletionen dokumentiert, wodurch *Smad*-kodierende Bereiche eliminiert werden [153]. Aus diesem Grund wurde durch RT-PCR-Analysen kontrolliert, ob es in den myelo-monozytären Zelllinien THP-1 und MonoMac-6 einerseits sowie in den Lungenepithelzellen A-549 andererseits, Unterschiede in der mRNA-Expression einzelner Smad-Proteine gibt. Es konnte gezeigt werden, dass die Smad1-mRNA in MonoMac-6-Zellen nicht und in THP-1-Zellen nur sehr schwach exprimiert wird, während die Analyse der epithelialen A-549-Zellen ein sehr deutliches Signal lieferte (Abb. 29, Kap. 3.6.2). Dieses Ergebnis zeigt in Zelllinien myelo-monozytären Ursprungs im Vergleich zu Lungenepithelzellen eine unterschiedliche Expression eines Smad-Moleküls, das durch die Zusammenlagerung des TGF-β1-Rezeptors Typ II und der Typ I-Rezeptoren-ALK1 oder -ALK2 nach Ligandenbindung durch eine anschließende Phosphorylierungskaskade aktiviert werden kann. Smad1 bildet einen Heterokomplex mit Smad5 der, äquivalent zu Smad2/Smad3, nach Anlagerung an Co-Smad4 die Regulation von Zielgenen übernimmt (Abb. 4, Kap. 1.4.2).

Oh et al. [154] und Goumans et al. [155] konnten zeigen, dass die durch die TGF-β1-Rezeptorkombination TβRII/TβRI-ALK5 induzierte Signalkaskade und die daran gekoppelte Smad2/Smad3-Aktivierung die Expression bestimmter Zielgene erhöht während TβRII/TβRI-ALK1 und die anschließende Aktivierung des Smad1/Smad5-Komplexes auf die Expression derselben Gene inhibitorisch wirkt (Abb. 47). Das Gleichgewicht zwischen diesen beiden TGF-β1-Signalwegen ist demnach essentiell für eine ausgewogene Expression der Zielgene. Eine Unterbrechung der Smad1/Smad5-Signaltransduktionskaskade führt zur übermäßigen Expression bestimmter Gene mit pathologischen Folgen für den Organismus.

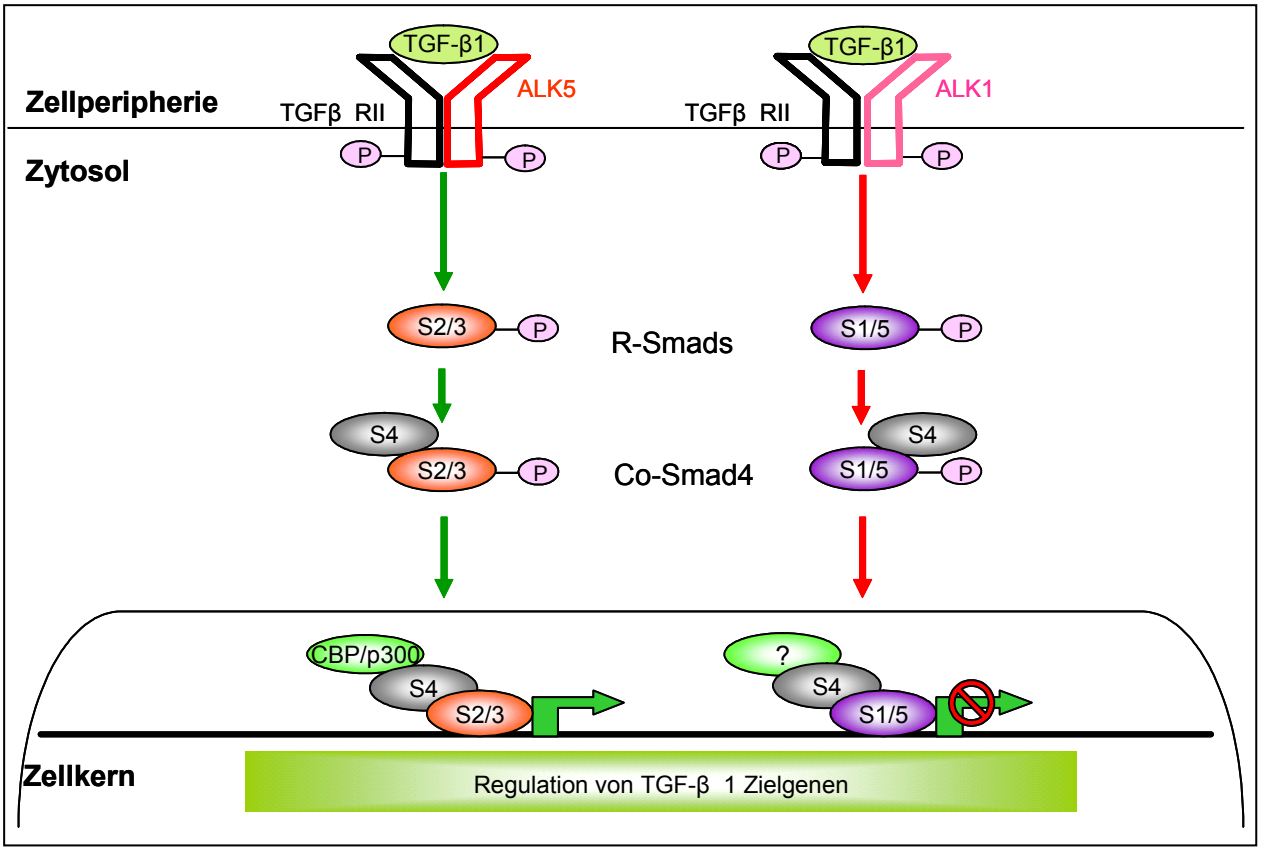

Abb. 47: Schematische Darstellung des gegensätzlicher Einflusses von Smad2/3 und Smad1/5 auf die Regulation von Zielgenen.

Die Deletion oder die erheblich verminderte Expression von Smad1 in myelo-monozytären Zelllinien könnte somit nach TGF-β1-Inkubation zu einer verstärkten Expression des *Kathepsin B*-Gens führen, da der inhibitorische Einfluss der Smad1/Smad5-Signalkaskade entfällt. Im Vergleich dazu kann die Erniedrigung der Kathepsin B-Genexpression in der epithelialen Zelllinie A-549 nach TGF-β1-Behandlung damit erklärt werden, dass hier ein intaktes Gleichgewicht zwischen den Smad2/Smad3- und Smad1/Smad5-Signalwegen besteht, wodurch eine Überexpression der Protease verhindert wird.

Zur Untermauerung dieser Hypothese zeigten wir, dass die Stimulation der A-549-Zellen mit BMP-2 (Kap. 3.6.3, Abb. 31), ebenso wie die Inkubation mit TGF-β1 zu einer Erniedrigung der Kathepsin B-Expression führt. BMP-2 induziert eine Signalkaskade, die durch die Rezeptorkombination BMP-Rezeptor Typ II/Typ I-ALK2 ausgelöst und durch Smad1/Smad5 weitergeleitet wird (Abb. 4, Kap. 1.4.2). Die Funktionsfähigkeit der Smad1/Smad5-Signalweges konnte somit bewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte eine BMP-Stimulation der myelo-monozytären Zelllinien THP-1 und MonoMac-6-Zellen keinerlei Auswirkung auf die Kathepsin B-Expression. Dieser Befund kann mit dem Fehlen bzw. der sehr niedrigen Expressionsrate von Smad1 in diesen Zelllinien erklärt werden.

Die erzielten Ergebnisse zeigen die zentrale Rolle von Smad1 in der TGF-β1- und BMP-induzierten Genregulation in den untersuchten Zellsystemen.

Zur erweiterten Analyse der TGF-β1-gekoppelten Smad1-Funktion in den verwendeten Zellsystemen, könnte in den myelo-monozytären Zelllinien durch Transfektion eine

Überexpression der Smad1-cDNA in einem geeigneten Expressionssystem durchgeführt werden. Der Einfluss einer Smad1-Überexpresion auf den Kathepsin B-Gehalt auf mRNA- und Protein-Ebene nach TGF-β1-Stimulation könnte so überprüft werden. Parallel sollte in A-549-Zellen eine Unterdrückung der Smad1-Exression, beispielsweise durch Transfektion der Zellen mit Smad1-siRNA bewirkt werden. Diese weiterführenden Experimente stellen einen interessanten Ausblick für zukünftige Untersuchungen dar.

4.8.2 Die MAP-Kinase-vermittelte TGF-β1-Signaltransduktion

TGF-β1 kann über Smad-unabhängige Signalwege die Expression verschiedener Gene regulieren. Diese Signaltransduktion verläuft über die Aktivierung der MAP-Kinasen p38, ERK1/2 und JNK (Abb. 4, Kap. 1.4.2). Die aktivierten Proteinkinasen können entweder den Smad-Signalweg durch Phosphorylierung der R-Smads2/3 beeinflussen oder direkt durch die Aktivierung entsprechender Transkriptionsfaktoren die Genexpression steuern [60]. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob p38, ERK1/2 und JNK in den getesteten Zellsystemen nach TGF-β1-Inkubation phosphoryliert und somit aktiviert wurden. Auch hier wurden die myelo-monozytären Zelllinien THP-1 und MonoMac-6 mit der Lungenepithelzelllinie A-549 verglichen.

Im Ergebnisteil, in Kapitel 3.7.1 wurde dargestellt, dass TGF-β1 p38 sowohl in THP-1- und MonoMac-6-Zellen sowie in A-549-Zellen aktiviert (Abb. 32, 33, 34). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der p38-Kinase Aktivierung und der Regulation der Kathepsin B Expression zu untersuchen, wurde die Kinaseaktivität mit Hilfe des Inhibitors SB203580 supprimiert. Die Kathepsin B mRNA-Expression wurde nach Inhibition der p38-Kinase in keiner der drei Zelllinien verändert (Abb. 41, Kap. 3.7.4.1). Aus diesen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass diese Proteinkinase nicht für die unterschiedliche Kathepsin B-Genexpression in den beiden Zelllinientypen verantwortlich ist.

Die beiden MAP-Kinasen ERK1/2 und JNK sind in THP-1- und MonoMac-6-Zellen bereits im Grundzustand der Zellen phosphoryliert und ERK1/2 lässt sich in MonoMac-6-Zellen durch TGF-β1 zusätzlich aktivieren (Kap. 3.7.2 und Kap. 3.7.3). Somit kann auch die Aktivierung dieser Kinasen nicht in einer direkten Verbindung zur Regulation der Kathepsin B-Expression stehen.

Die Koinkubation der THP-1 Zellen mit TGF-β1 und den ERK1/2- sowie JNK-Inhibitoren U0126 und Curcumin führt jedoch im Vergleich zur Inkubation mit TGF-β1 allein zu einer starken Erhöhung der Kathepsin B mRNA-Expression (Abb. 42, Kap. 3.7.4.2 und Abb. 43, Kap. 3.7.4.3). Dieser Befund kann mit einer möglichen Beeinflussung der Phosphorylierung der R-Smads im *Linker*-Bereich zwischen den MH-Domänen erklärt werden (Abb. 3, Kap. 1.4.2), die die Translokation der Smad2/3-Komplexe in den Zellkern verändert [60,156,157].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ERK1/2 und JNK in THP-1-Zellen konstitutiv phosphoryliert und bezüglich der Kathepsin B-Genregulation nicht in die TGF-β1-Signalübermittlung involviert sind. Stattdessen konnte belegt werden, dass die Proteinkinasen in diesen Zellen eine inhibitorische Wirkung auf den TGF-β1-Signalweg ausüben und die

TGF-β1-induzierte Kathepsin B mRNA-Expression partiell unterdrücken.
MonoMac-6-Zellen sind wie THP-1-Zellen myelo-monozytären Ursprungs, reagieren jedoch nach Inhibition von ERK1/2 und JNK bei gleichzeitiger TGF-β1-Gabe im Vergleich zur TGF-β1-Einzelinkubation nicht mit einer weiteren Erhöhung der Kathepsin B mRNA-Expression. Die beiden Proteinkinase-Signalwege werden zwar aktiviert, spielen jedoch bei der Kathepsin B-Genregulation in MonoMac-6-Zellen keine Rolle.
Ebenso erfolgt in A-549-Zellen keine wesentliche Veränderung des Kathepsin B mRNA-Gehaltes, die Expression bleibt auch unter dem Einfluss der Proteinkinase-Inhibitoren in Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert. Auf dieser Ebene, der MAP-Kinase-gekoppelten TGF-β1-Signaltransduktion kann somit aufgrund der erhaltenen Ergebnisse kein prinzipieller Unterschied zwischen myelo-monozytären Zelllinien und Lungenepithelzellen festgestellt werden.
Die erzielten Ergebnisse stehen im Einklang mit Literaturdaten wonach TGF-β1 in unterschiedlichen Zellsystemen eine differenzierte Genregulation induziert, die auf der Aktivierung unterschiedlicher Signalwege basiert. Die Aktivierung des Smad-Signalweges kann durch zusätzliche Induktion der Proteinkinase-Kaskade stimuliert oder inhibiert werden bzw. unverändert bleiben [60].

4.9 Analyse der TGF-β1-reaktiven regulatorischen Einheiten auf dem Kathepsin B-Promotor und dem ersten Intron des Kathepsin B-Gens

Die Bindung von Liganden an Rezeptormoleküle aktiviert eine Signaltransduktionskaskade die die Regulation der Gentranskription beeinflussen kann. Am Ende der Signalkaskade werden spezifische Transkriptionsfaktoren aktiviert, die an Konsensussequenzen in den Promotorbereichen binden und dadurch die Transkription starten. Promotoren sind regulatorische DNA-Sequenzen die unmittelbar am 5´-Ende der Transkriptionsstarts von Genen lokalisiert sind. Sie sind als die minimal notwendigen regulatorischen Einheiten zum Transkriptionsstart von Genen definiert. Der Transkriptionsstart kann durch einen Transkriptionsfaktor oder durch ein Zusammenspiel mehrerer verschiedener Faktoren initialisiert werden. Ebenso können weit vom Promotor abgelegene DNA-Sequenzen zur Transkriptionsaktivierung beitragen. Diese *enhancer* können sowohl *upstream* (in 5'-Richtung) als auch *downstream* (in 3'-Richtung) vom Transkriptionsstartpunkt lokalisiert sein [158].
Um den Regulationsmechanismus des Kathepsin B-Gens durch TGF-β1 näher zu charakterisieren, wurden der 7,35 kb umfassende Promotorbereich sowie das erste Intron des Kathepsin B-Gens kloniert und analysiert.

4.9.1 Der Kathepsin B-Promotor

Die basale Expression des Kathepsin B-Gens wird durch ein 228 bp-Fragment am 5´-Ende des Gens im Promotorbereich vermittelt [28]. Diese Region ist GC-reich und beinhaltet sechs Konsensussequenzen für die Transkriptionsfaktoren der SP1-Familie, vier Bindungsstellen an die sich ETS-Transkriptionsfaktoren anlagern können und eine E-Box für die Erkennung durch

USF-Transkriptionsfaktoren.

Die Klonierung von Promotorkonstrukten an das 5´-Ende des Luziferase-Gens stellt eine etablierte Methode für die Aktivitätsanalysen von Promotorbereichen dar. Wenn das 5´-Insert transkriptionsaktivierende Eigenschaften besitzt, wird die Expression des nachfolgenden Luziferase-Gens induziert und nach Zugabe von geeigneten Substraten Lumineszenz freigesetzt.

Nach Transfektion der Vektoren pSCB1 bis pSCB9 in THP-1-Zellen und deren anschließende Inkubation mit TGF-β1 konnte im Vergleich zu unbehandelten Proben keine Erhöhung der Luziferase-Aktivität gemessen werden (Abb. 44, Kap. 3.8.1). Demnach befinden sich auf der Kathepsin B-Promotorregion von -1774 bis +474 keine TGF-β1-reaktiven Bereiche. Die Charakteristika der basalen Promotor-Aktivität, die von Yan et al. [159] demonstriert wurde, konnten im Rahmen dieser Arbeit reproduziert werden. Die Lumineszenz stieg anfänglich mit zunehmender Länge der Promotorsequenz von +56 in 5´-Richtung bis -172 (pSCB6). Ab -172 bis -359 (pSCB3) nimmt die Luziferase-Aktivität wieder ab, was auf das Vorhandensein einer Repressor-Bindungsdomäne in diesem Bereich hindeutet. Das nächste Konstrukt, pSCB2 (-1774 bis +56) weist wieder eine gesteigerte Promotoraktivität auf wobei die offensichtlich repressorisch wirkenden Elemente vermutlich durch e*nhancer*-Aktivitäten in diesem Bereich wieder unterdrückt werden. Das 3´-verlängerte Konstrukt pSCB1 (-1774 bis +474) beinhaltet Exon1 des Kathepsin B-Gens sowie einen Teil von Intron1 und zeigt verringerte Luziferase-Aktivität, was wiederum die Existenz eines Repressors vermuten lässt [159].

Das 2,6 kb umfassende pLuc2,6-Promotorkonstrukt (-2531 bis +146) zeigte ebenso wie die Konstrukte pLuc4,3 (4,3 kb, -4205 bis +146) und pLuc7,35 (7,35 kb, -7207 bis +146) keine erhöhte Luziferase-Aktivität nach TGF-β1-Stimulation. Letztere enthalten eine bzw. zwei Smad-Erkennungssequenzen („GACAGA“), die jedoch nicht für die TGF-β1-induzierte Aufregulation der Kathepsin B mRNA-Expression verantwortlich waren.

Die basale Aktivität des längsten Promotor-Konstrukts (pLuc7,35) war im Vergleich zu den kürzeren Fragmenten, reduziert. Auch hier ist die Existenz von Repressor-Elementen denkbar.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die TGF-β1-abhängigen regulatorischen Bereiche nicht im untersuchten Promotorbereich liegen. Eine weitere Verlängerung des klonierten Promotors in 5´-Richtung ist nicht durchgeführt worden, stattdessen wurde aufgrund von Literaturhinweisen das erste Intron des Kathepsin B-Gens analysiert.

4.9.2 Das erste Kathepsin B-Intron

Enhancer können sich sowohl auf Exons als auch auf Introns von Genen befinden. Transkriptionsfaktoren können an diesen DNA-Sequenzen binden und die Transkriptionsinitiation zusammen mit Promotor-Strukturen übernehmen. Brooks et al. [146] und Yamada et al. [160] konnten nachweisen, dass die basale Transkription der Myeloperoxidase und von Apolipoprotein B durch Intron-*enhancer* reguliert werden kann. Weiterhin wurde von Major et al. [161] bestätigt, dass durch TGF-β1-Stimulation die Transkription des Proteins GADD45 nach Bindung von Smad3/4 im dritten Intron induziert wird.

Aktivierte Smad-Proteine können an „CAGACA“-DNA-Signalsequenzen binden und selbständig die Transkription von Genen initialisieren. In der Literatur wird weiterhin berichtet, dass Gene die durch den Transkriptionsfaktor AP-1 (bestehend aus c-Fos und c-Jun/JunB) aktiviert werden, nach TGF-β1-Stimulation auch durch Smads verstärkt transkribiert werden. Ein Luziferase-Vektor mit AP-1 Erkennungssequenzen aus dem Kollagenase-1-Promotor wurde sehr effizient durch TGF-β1 aktiviert, wobei gezeigt wurde, dass Smad2/3-Proteine die Reaktivität verstärkte. Es konnte eine direkte Interaktion zwischen Smads und AP-1 nachgewiesen werden [68]. Verrecchia et al. [162] postulierten ein Modell in dem Smad- und/oder AP-1-spezifische DNA-Sequenzen eine dynamische Regulation von TGF-β1-reaktiven Genen erlauben.

Des Weiteren sind Interaktionen von Smads mit den Transkriptionsfaktoren der SP1-Familie bei der TGF-β1-induzierten Transkription der $p15^{INK4}$- und der Kollagen I-Gene beschrieben worden. Dabei ist im Promotor der α2-Kette von Kollagen I (COL1A2) auch das akzessorische Protein p300 involviert. p300 besitzt keine DNA-bindende Eigenschaften. Dieses Protein vermittelt die Initialisierung der Genexpression durch Interaktionen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren [163-165].

Aufgrund der Literaturdaten und des Befundes, dass im ersten Kathepsin B-Intron zwei Smad-Erkennungssequenzen (Positionen 652 und 1658) und zwei AP-1-Bindestellen (Positionen 1417 und 3340) sowie eine Konsensussequenz der Transkriptionsfaktor-Familie SP1 (Position 199) lokalisiert sind (Abb. 48), wurde dieses Intron kloniert (pIntron1, 3629 bp) und transient in THP-1-Zellen transfiziert (Abb. 45, Kap. 3.9).

Die basale Luziferase-Aktivität von pIntron1 war etwa so hoch wie in den Promotor-Vektoren pSCB8, pSCB4 und pSCB3, während die TGF-β1-Stimulation die Aktivität von pIntron1 verdoppelte.

Die basale Aktivität von pIntron1 könnte durch die SP1-Bindestelle verursacht werden und die Verdopplung der Lumineszenzrate des Introns könnte die Folge eines Zusammenspiels von Smad-Proteinen, p300, SP1 oder AP-1 sein. Um diese Vermutungen zu bestätigen wurde zunächst das Deletionskonstrukt pDel-669bp analysiert aus dem die erste Smad-Erkennungssequenz$_{652}$ und die SP1-Region des Ursprungsplasmides pIntron1 eliminiert worden waren.

Das Absinken der basalen Luziferase-Aktivität in diesem Vektor (pDel-669bp) auf Kontrollvektor-Niveau deutet darauf hin, dass die SP-1-Bindestelle für die Basalaktivität des Introns mitverantwortlich ist (Abb. 46, Kap. 3.9.1).

Die Deletion der ersten Smad-Bindestelle an Position 652 verhinderte die TGF-β1-induzierte Erhöhung der Aktivität.

Die fehlende TGF-β1-Reaktivität des Konstruktes pDel-1712 deutet darauf hin, dass die beiden AP-1-Erkennungssequenzen in Positionen 1417 und 3340 allein bzw. zusammen mit der zweiten Smad-Bindestelle an Position 1658 die durch das Zytokin induzierte erhöhte Luziferase-Aktivität nicht verursachen.

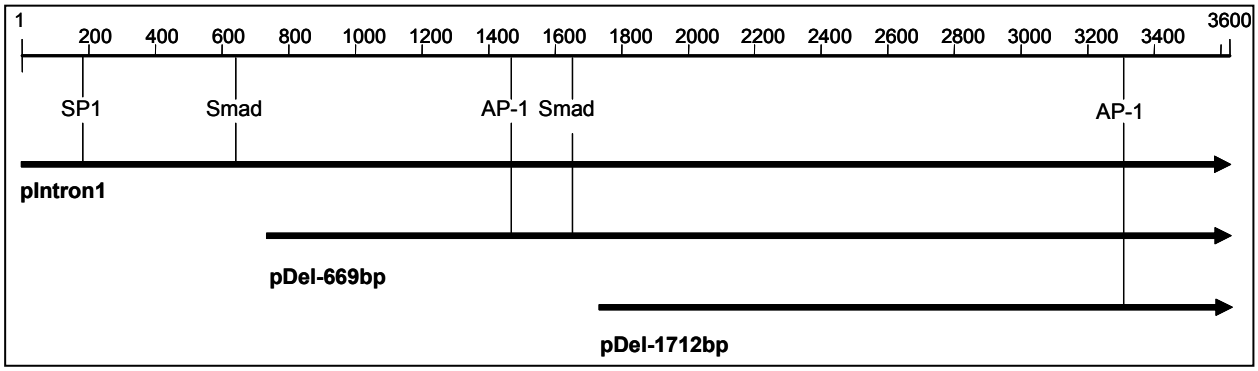

Abb. 48: Schematische Darstellung des ersten Kathepsin B-Introns und der klonierten Intron-Fragmente. Dargestellt sind die putativen Positionen von Transkriptionsfaktor- und Smad-Bindestellen

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die TGF-β1-reaktive DNA-Sequenz nicht auf dem untersuchten längsten Kathepsin B-Promotorkonstrukt lokalisiert ist. Eine Ursache der erhöhten Kathepsin B mRNA-Synthese nach TGF-β1-Inkubation kann die Smad-Erkennungssequenz im ersten Kathepsin B-Intron sein. Durch Andocken der Smad-Proteine an diese Bindestelle wird vermutlich die Erhöhung der Kathepsin B-Transkriptionsrate als Folge einer *enhancer*-Funktion verursacht. Die Existenz weiterer *enhancer* kann im Hinblick auf die Stärke des Lumineszenz-Signals angenommen werden. Eine Verdopplung der Luziferase-Aktivität entspricht vermutlich einer doppelten Transkriptionsrate infolge einer Smad-Bindung an die erste regulatorische Erkennungssequenz im Intron und ist möglicherweise nicht in der Lage den Kathepsin B mRNA-Spiegel infolge einer TGF-β1-Inkubation auf ein 5,8-fach erhöhtes Niveau zu steigern. Im Kathepsin B-Gen befinden sich im dritten und im vierten Intron jeweils eine, sowie im untranslatierten Bereich von Exon 11 zwei weitere Smad-Erkennungssequenzen, die als *enhancer* ebenfalls zur erhöhten Transkriptionsrate von Kathepsin B beitragen könnten. Weiterhin ist auch eine Beteiligung weiterer Transkriptionsfaktoren denkbar.

Zur weiteren Aufklärung der TGF-β1-vermittelten Aufregulation des Kathepsin B-Gens könnte ein pGL-3B-Vektorkonstrukt beitragen, das den bereits klonierten 7,35-kb großen Promotorbereich zusammen mit dem ersten Intron beinhaltet. Eine Interaktion des Promotors mit den Smad- und/oder AP-1/SP1-Bindestellen des ersten Introns könnte so nachgewiesen werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Pathophysiologische Bedingungen verursachen eine Erhöhung der Kathepsin B-Expression in einer Reihe von Tumoren, die mit einer erhöhten Invasivität und Metastasierung korreliert. Die TGF-β1-Produktion ist in vielen Tumorgeweben ebenfalls stark erhöht. Maligne Zellen reagieren auf dieses Zytokin mit einer verstärkten Expression von Matrix-abbauenden MMPs. Die Wirkung von TGF-β1 auf die Expression der ebenfalls Matrix-degradierenden Kathepsine und die damit verbundene Signaltransduktionskaskade wurde bisher kaum analysiert.

- **TGF-β1-Einfluss auf die Expression der Kathepsin B-mRNA, und die funktionelle Bedeutung einer veränderten Kathepsin B-Expression**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TGF-β1 in myelo-monozytären Tumor-Zelllinien eine Steigerung der Expression von Kathepsin B und L auf mRNA- und Proteinebene verursachte. Dabei war der Effekt auf Kathepsin B am stärksten. TGF-β1 führte in THP-1- und MonoMac-6-Zellen zu einer erhöhten *de novo* Transkription der Kathepsin B-mRNA und es erfolgte keine Stabilisierung des Transkriptes. Die TGF-β1-induzierte Migration von THP-1-Zellen konnte durch Zugabe des Kathepsin-Inhibitors E64 deutlich reduziert werden. Weiterhin verursachte E64d einen Apoptose-Anstieg in THP-1-Zellen der durch Koinkubation des Kathepsin-Inhibitors mit TGF-β1 und den dadurch induzierten Anstieg der Kathepsin B-Expression auf Basalniveau gegentitriert werden konnte. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Beteiligung der TGF-β1-induzierten Kathepsin B-Expression an der Migrations- und Invasionsfähigkeit von THP-1-Zellen und die antiapoptotische Wirkung der Protease, ein Befund der das Gesamtbild einer erhöhten Malignität von Kathepsin B-überexprimierenden Tumorzellen ergänzt.

- **Analyse der TGF-β1-induzierten Smad-vermittelten Signalkaskade und der TGF-β1-reaktiven Einheiten auf dem Kathepsin B-Promotor und dem ersten Intron**

Die TGF-β1-Signalkaskade kann über Smad-abhängige und/oder Smad-unabhängige MAP-Kinase-vermittelte Signalwege verlaufen. Die Smad2/3- und MAP-Kinase-abhängigen Signalwege wurden in allen Zelllinien aktiviert. Monozytäre Zelllinien zeigen eine sehr geringe/fehlende Smad1 mRNA-Expression im Vergleich zu der Lungenepithelzelllinie A-549. In diesen Zellen bewirkt TGF-β1 eine Erniedrigung der Kathepsin B-Expression. Smad1 ist vermutlich für die gegensätzliche, TGF-β1-verursachte Kathepsin B-Genregulation in den beiden Zelltypen verantwortlich.

Die Inhibition der Proteinkinasen ERK1/2 und JNK verstärkte in THP-1-Zellen die Kathepsin B mRNA-Expression. Demzufolge inhibieren diese Kinasen die TGF-β1-induzierte Kathepsin B mRNA-Expression.

In einem 7,35 kb umfassenden Promotorbereich des Kathepsin B-Gens wurden keine TGF-β1-reaktiven regulatorischen Elemente gefunden. Dagegen wurde im Bereich des 1. Introns eine Smad-Konsensussequenz identifiziert, die ursächlich an der Induktion der Kathepsin Genexpression durch TGF-β1 beteiligt war.

Die Ergebnisse zeigen, dass das erste Intron des Kathepsin B-Gens eine potentielle *enhancer*-Funktion für die Aufregulation der Kathepsin B-Expression in THP-1-Zellen nach TGF-β1-Inkubation übernehmen könnte.

6 LITERATUR

1. Joshua-Tor L, Xu HE, Johnston SA, Rees DC: Crystal structure of a conserved protease that binds DNA: the bleomycin hydrolase, Gal6. Science 1995, 269:945-950.
2. Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ: MEROPS: the peptidase database, 2004. Nucleic Acids Res 2004, 32:D160-D164.
3. Buhling F, Fengler A, Brandt W, Welte T, Ansorge S, Nagler DK: Review: novel cysteine proteases of the papain family. Adv Exp Med Biol 2000, 477:241-54..
4. Buhling F, Waldburg N, Reisenauer A, Heimburg A, Golpon H, Welte T: Lysosomal cysteine proteases in the lung: role in protein processing and immunoregulation. Eur Respir J 2004, 23:620-628.
5. Bohley P. SPO: Proteases and proteolysis in the lysosome. Experientia 1992,151-156.
6. McCormick D: Secretion of cathepsin B by human gliomas in vitro. Neuropathol Appl Neurobiol 1993, 19:146-151.
7. Felbor U, Dreier L, Bryant RA, Ploegh HL, Olsen BR, Mothes W: Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. EMBO J 2000, 19:1187-1194.
8. Nakase T, Takeuchi E, Sugamoto K, Kaneko M, Tomita T, Myoui A, Uchiyama Y, Ochi T, Yoshikawa H: Involvement of multinucleated giant cells synthesizing cathepsin K in calcified tendinitis of the rotator cuff tendons. Rheumatology (Oxford) 2000, 39:1074-1077.
9. Bromme D, Okamoto K, Wang BB, Biroc S: Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in Spodoptera frugiperda and characterization of the enzyme. J Biol Chem 1996, 271:2126-2132.
10. Pluger EB, Boes M, Alfonso C, Schroter CJ, Kalbacher H, Ploegh HL, Driessen C: Specific role for cathepsin S in the generation of antigenic peptides in vivo. Eur J Immunol 2002, 32:467-476.
11. Bania J, Gatti E, Lelouard H, David A, Cappello F, Weber E, Camosseto V, Pierre P: Human cathepsin S, but not cathepsin L, degrades efficiently MHC class II-associated invariant chain in nonprofessional APCs. Proc Natl Acad Sci U S A 2003, 100:6664-6669.
12. Wex T, Buhling F, Wex H, Gunther D, Malfertheiner P, Weber E, Bromme D: Human cathepsin W, a cysteine protease predominantly expressed in NK cells, is mainly localized in the endoplasmic reticulum. J Immunol 2001, 167:2172-2178.
13. McGrath ME: The lysosomal cysteine proteases. Annu Rev Biophys Biomol Struct 1999, 28:181-204.
14. Berg T, Gjoen T, Bakke O: Physiological functions of endosomal proteolysis. Biochem J 1995, 307:313-326.
15. Nakagawa TY, Rudensky AY: The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. Immunol Rev 1999, 172:121-9.
16. Samarel AM, Ferguson AG, Decker RS, Lesch M: Effects of cysteine protease inhibitors on rabbit cathepsin D maturation. Am J Physiol 1989, 257:C1069-C1079.
17. Docherty K, Carroll RJ, Steiner DF: Conversion of proinsulin to insulin: involvement of a 31,500 molecular weight thiol protease. Proc Natl Acad Sci U S A 1982, 79:4613-4617.
18. Reddy VY, Zhang QY, Weiss SJ: Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A 1995, 92:3849-3853.

19. Duffy MJ: Proteases as prognostic markers in cancer. Clin Cancer Res 1996, 2:613-618.

20. Guinec N, Dalet-Fumeron V, Pagano M: "In vitro" study of basement membrane degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B, B-like and L. Digestion of collagen IV, laminin, fibronectin, and release of gelatinase activities from basement membrane fibronectin. Biol Chem Hoppe Seyler 1993, 374:1135-1146.

21. Taggart CC, Lowe GJ, Greene CM, Mulgrew AT, O'Neill SJ, Levine RL, McElvaney NG: Cathepsin B, L, and S cleave and inactivate secretory leucoprotease inhibitor. J Biol Chem 2001, 276:33345-33352.

22. Lemere CA, Munger JS, Shi GP, Natkin L, Haass C, Chapman HA, Selkoe DJ: The lysosomal cysteine protease, cathepsin S, is increased in Alzheimer's disease and Down syndrome brain. An immunocytochemical study. Am J Pathol 1995, 146:848-860.

23. Mort JS, Recklies AD, Poole AR: Extracellular presence of the lysosomal proteinase cathepsin B in rheumatoid synovium and its activity at neutral pH. Arthritis Rheum 1984, 27:509-515.

24. Werle B, Ebert W, Klein W, Spiess E: Cathepsin B in tumors, normal tissue and isolated cells from the human lung. Anticancer Res 1994, 14:1169-1176.

25. Kirschke H, Barrett AJ, Rawlings ND: Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. Protein Profile 1995, 2:1581-1643.

26. Gong Q, Chan SJ, Bajkowski AS, Steiner DF, Frankfater A: Characterization of the cathepsin B gene and multiple mRNAs in human tissues: evidence for alternative splicing of cathepsin B pre-mRNA. DNA Cell Biol 1993, 12:299-309.

27. Berquin IM, Cao L, Fong D, Sloane BF: Identification of two new exons and multiple transcription start points in the 5'-untranslated region of the human cathepsin-B-encoding gene. Gene 1995, 159:143-149.

28. Yan S, Sloane BF: Molecular regulation of human cathepsin B: implication in pathologies. Biol Chem 2003, 384:845-854.

29. Buttle DJ, Abrahamson M, Burnett D, Mort JS, Barrett AJ, Dando PM, Hill SL: Human sputum cathepsin B degrades proteoglycan, is inhibited by alpha 2-macroglobulin and is modulated by neutrophil elastase cleavage of cathepsin B precursor and cystatin C. Biochem J 1991, 276:325-331.

30. Dalet-Fumeron V, Guinec N, Pagano M: In vitro activation of pro-cathepsin B by three serine proteinases: leucocyte elastase, cathepsin G, and the urokinase-type plasminogen activator. FEBS Lett 1993, 332:251-254.

31. Hara K, Kominami E, Katunuma N: Effect of proteinase inhibitors on intracellular processing of cathepsin B, H and L in rat macrophages. FEBS Lett 1988, 231:229-231.

32. Mach L, Schwihla H, Stuwe K, Rowan AD, Mort JS, Glossl J: Activation of procathepsin B in human hepatoma cells: the conversion into the mature enzyme relies on the action of cathepsin B itself. Biochem J 1993, 293:437-442.

33. Nishimura Y, Kawabata T, Kato K: Identification of latent procathepsins B and L in microsomal lumen: characterization of enzymatic activation and proteolytic processing in vitro. Arch Biochem Biophys 1988, 261:64-71.

34. Rowan AD, Mason P, Mach L, Mort JS: Rat procathepsin B. Proteolytic processing to the mature form in vitro. J Biol Chem 1992, 267:15993-15999.

35. Takahashi T, Dehdarani AH, Yonezawa S, Tang J: Porcine spleen cathepsin B is an exopeptidase. J Biol Chem 1986, 261:9375-9381.

36. Buck MR, Karustis DG, Day NA, Honn KV, Sloane BF: Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. Biochem J 1992, 282:273-278.

37. Hughes SJ, Glover TW, Zhu XX, Kuick R, Thoraval D, Orringer MB, Beer DG, Hanash S: A novel amplicon at 8p22-23 results in overexpression of cathepsin B in esophageal adenocarcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A 1998, 95:12410-12415.

38. Lin L, Aggarwal S, Glover TW, Orringer MB, Hanash S, Beer DG: A minimal critical region of the 8p22-23 amplicon in esophageal adenocarcinomas defined using sequence tagged site-amplification mapping and quantitative polymerase chain reaction includes the GATA-4 gene. Cancer Res 2000, 60:1341-1347.

39. Murnane MJ, Sheahan K, Ozdemirli M, Shuja S: Stage-specific increases in cathepsin B messenger RNA content in human colorectal carcinoma. Cancer Res 1991, 51:1137-1142.

40. Campo E, Munoz J, Miquel R, Palacin A, Cardesa A, Sloane BF, Emmert-Buck MR: Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlates with tumor progression and shortened patient survival. Am J Pathol 1994, 145:301-309.

41. Khan A, Krishna M, Baker SP, Banner BF: Cathepsin B and tumor-associated laminin expression in the progression of colorectal adenoma to carcinoma. Mod Pathol 1998, 11:704-708.

42. Rempel SA, Rosenblum ML, Mikkelsen T, Yan PS, Ellis KD, Golembieski WA, Sameni M, Rozhin J, Ziegler G, Sloane BF: Cathepsin B expression and localization in glioma progression and invasion. Cancer Res 1994, 54:6027-6031.

43. Sinha AA, Quast BJ, Korkowski JC, Wilson MJ, Reddy PK, Ewing SL, Sloane BF, Gleason DF: The relationship of cathepsin B and stefin A mRNA localization identifies a potentially aggressive variant of human prostate cancer within a Gleason histologic score. Anticancer Res 1999, 19:2821-2829.

44. Berquin IM, Sloane BF: Cathepsin B expression in human tumors. Adv Exp Med Biol 1996, 389:281-94.:281-294.

45. Mehtani S, Gong Q, Panella J, Subbiah S, Peffley DM, Frankfater A: In vivo expression of an alternatively spliced human tumor message that encodes a truncated form of cathepsin B. Subcellular distribution of the truncated enzyme in COS cells. J Biol Chem 1998, 273:13236-13244.

46. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A: TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. Nat Genet 2001, 29:117-129.

47. Lutz M, Knaus P: Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. Cell Signal 2002, 14:977-988.

48. von Bubnoff A, Cho KW: Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? Dev Biol 2001, 239:1-14.

49. Branton MH, Kopp JB: TGF-beta and fibrosis. Microbes Infect 1999, 1:1349-1365.

50. McCartney-Francis NL, Frazier-Jessen M, Wahl SM: TGF-beta: a balancing act. Int Rev Immunol 1998, 16:553-580.

51. ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S: Regulation of cell proliferation by Smad proteins. J Cell Physiol 2002, 191:1-16.

52. Keller JR, Jacobsen SE, Sill KT, Ellingsworth LR, Ruscetti FW: Stimulation of granulopoiesis by transforming growth factor beta: synergy with granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. Proc Natl Acad Sci U S A 1991, 88:7190-7194.

53. Hagedorn HG, Bachmeier BE, Nerlich AG: Synthesis and degradation of basement membranes and extracellular matrix and their regulation by TGF-beta in invasive carcinomas (Review). Int J Oncol 2001, 18:669-681.

54. Mustjoki S, Alitalo R, Elonen E, Carpen O, Gahmberg CG, Vaheri A: Intercellular adhesion molecule-1 in extravasation of normal mononuclear and leukaemia cells. Br J Haematol 2001, 113:989-1000.

55. Wahl SM, Allen JB, Weeks BS, Wong HL, Klotman PE: Transforming growth factor beta enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 1993, 90:4577-4581.

56. Letterio JJ, Roberts AB: Regulation of immune responses by TGF-beta. Annu Rev Immunol 1998, 16:137-61.

57. Ashcroft GS: Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta. Microbes Infect 1999, 1:1275-1282.

58. Leivonen SK, Chantry A, Hakkinen L, Han J, Kahari VM: Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression in human gingival fibroblasts. Evidence for cross-talk between Smad3 and p38 signaling pathways. J Biol Chem 2002, 277:46338-46346.

59. Wahl SM: Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a cause and a cure. J Clin Immunol 1992, 12:61-74.

60. Piek E, Roberts AB: Suppressor and oncogenic roles of transforming growth factor-beta and its signaling pathways in tumorigenesis. Adv Cancer Res 2001, 83:1-54.

61. Norgaard P, Hougaard S, Poulsen HS, Spang-Thomsen M: Transforming growth factor beta and cancer. Cancer Treat Rev 1995, 21:367-403.

62. Rooke HM, Crosier KE: The smad proteins and TGFbeta signalling: uncovering a pathway critical in cancer. Pathology 2001, 33:73-84.

63. Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H: Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling, 2001. J Cell Physiol 2001, 187:265-276.

64. Derynck R, Zhang YE: Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling, 2003. Nature 2003, 425:577-584.

65. Johnson GL, Lapadat R: Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science 2002, 298:1911-1912.

66. Hanafusa H, Ninomiya-Tsuji J, Masuyama N, Nishita M, Fujisawa J, Shibuya H, Matsumoto K, Nishida E: Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. J Biol Chem 1999, 274:27161-27167.

67. Sano Y, Harada J, Tashiro S, Gotoh-Mandeville R, Maekawa T, Ishii S: ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling. J Biol Chem 1999, 274:8949-8957.

68. Zhang Y, Feng XH, Derynck R: Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. Nature 1998, 394:909-913.

69. Bisschop MM, Revesz T, Bierings M, van Weerden JF, van Wering ER, Hahlen K, van der Does-van den Berg: Extramedullary infiltrates at diagnosis have no prognostic significance in children with acute myeloid leukaemia. Leukemia 2001, 15:46-49.

70. Landis DM, Aboulafia DM: Granulocytic sarcoma: an unusual complication of aleukemic myeloid leukemia causing spinal cord compression. A case report and literature review. Leuk Lymphoma 2003, 44:1753-1760.

71. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A: Acute myeloid leukemia. N Engl J Med 1999, 341:1051-1062.

72. Voermans C, van Heese WP, de J, I, Gerritsen WR, Der Schoot CE: Migratory behavior of leukemic cells from acute myeloid leukemia patients. Leukemia 2002, 16:650-657.

73. Kawada H, Fukuda R, Yoshida M, Takei M, Kobayashi N, Masumoto A, Ogawa Y, Sasao T, Kubota N, Watanabe S, Umeda Y, Yamauchi K, Yonekura S, Ichikawa Y: Clinical significance of LEA-1 expression in adult acute myeloid leukemia. Leuk Res 1996, 20:327-332.

74. Montuori N, Selleri C, Risitano AM, Raiola AM, Ragno P, Del Vecchio L, Rotoli B, Rossi G: Expression of the 67-kDa laminin receptor in acute myeloid leukemia cells mediates adhesion to laminin and is frequently associated with monocytic differentiation. Clin Cancer Res 1999, 5:1465-1472.

75. Janowska-Wieczorek A, Marquez LA, Matsuzaki A, Hashmi HR, Larratt LM, Boshkov LM, Turner AR, Zhang MC, Edwards DR, Kossakowska AE: Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and -2) in acute myelogenous leukaemia blasts: comparison with normal bone marrow cells. Br J Haematol 1999, 105:402-411.

76. Matsuzaki A, Janowska-Wieczorek A: Unstimulated human acute myelogenous leukemia blasts secrete matrix metalloproteinases. J Cancer Res Clin Oncol 1997, 123:100-106.

77. Greenberg ME, Bender TP: Identification of newly transcribed RNA. In: FM Ausubel, R Brent, RE Kingston, DD Moore, JG Seidman, JA Smith, and K Struhl (ed), Current protocols in molecular biology John Wiley &Sons, Inc , New York, N Y 1997,4.10.1-4.10.11.

78. Barrett AJ, Kirschke H: Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. Methods Enzymol 1981, 80:535-561.

79. Tournu C, Obled A, Roux MP, Deval C, Ferrara M, Bechet DM: Glucose controls cathepsin expression in Ras-transformed fibroblasts. Arch Biochem Biophys 1998, 360:15-24.

80. Weber E, Gunther D, Laube F, Wiederanders B, Kirschke H: Hybridoma cells producing antibodies to cathepsin L have greatly reduced potential for tumour growth. J Cancer Res Clin Oncol 1994, 120:564-567.

81. Gerber A, Welte T, Ansorge S, Bühling F: Expression of cathepsins B and L in human lung epithelial cells is regulated by cytokines. Adv Exp Med Biol 2000, 477:287-292.

82. Gerber A, Wille A, Welte T, Ansorge S, Buhling F: Interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 control expression of cathepsins b and l in human lung epithelial cells. J Interferon Cytokine Res 2001, 21:11-19.

83. Kurosawa M, Numazawa S, Tani Y, Yoshida T: ERK signaling mediates the induction of inflammatory cytokines by bufalin in human monocytic cells. Am J Physiol Cell Physiol 2000, 278:C500-C508.

84. Munshi HG, Wu YI, Mukhopadhyay S, Ottaviano AJ, Sassano A, Koblinski JE, Platanias LC, Stack MS: Differential regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase activity by ERK 1/2- and p38 MAPK-modulated tissue inhibitor of metalloproteinases 2 expression controls transforming growth factor-beta1-induced pericellular collagenolysis. J Biol Chem 2004, 279:39042-39050.

85. Takahashi A, Day NK, Luangwedchakarn V, Good RA, Haraguchi S: A retroviral-derived immunosuppressive peptide activates mitogen-activated protein kinases. J Immunol 2001, 166:6771-6775.

86. Andersson K, Sundler R: Signalling to translational activation of tumour necrosis factor-alpha expression in human THP-1 cells. Cytokine 2000, 12:1784-1787.

87. Abrink M, Gobl AE, Huang R, Nilsson K, Hellman L: Human cell lines U-937, THP-1 and Mono Mac 6 represent relatively immature cells of the monocyte-macrophage cell lineage. Leukemia 1994, 8:1579-1584.

88. Hambleton J, Weinstein SL, Lem L, DeFranco AL: Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A 1996, 93:2774-2778.

89. Poussin C, Foti M, Carpentier JL, Pugin J: CD14-dependent endotoxin internalization via a macropinocytic pathway. J Biol Chem 1998, 273:20285-20291.

90. Koren HS, Anderson SJ, Larrick JW: In vitro activation of a human macrophage-like cell line. Nature 1979, 279:328-331.

91. Steube KG, Teepe D, Meyer C, Zaborski M, Drexler HG: A model system in haematology and immunology: the human monocytic cell line MONO-MAC-1. Leuk Res 1997, 21:327-335.

92. Ziegler-Heitbrock HW, Thiel E, Futterer A, Herzog V, Wirtz A, Riethmuller G: Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. Int J Cancer 1988, 41:456-461.

93. Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB: Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. Proc Natl Acad Sci U S A 1985, 82:119-123.

94. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. Cell 2000, 100:57-70.

95. Hoffmann O: Zelluläre und molekulare Mechanismen der Tumormetastasierung in den Knochen. Journal für Mineralstoffwechsel 2003, 10:12-15.

96. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG: Metalloproteinases and cancer invasion. Semin Cancer Biol 1990, 1:99-106.

97. Sloane BF, Moin K, Krepela E, Rozhin J: Cathepsin B and its endogenous inhibitors: the role in tumor malignancy. Cancer Metastasis Rev 1990, 9:333-352.

98. Kane SE, Gottesman MM: The role of cathepsin L in malignant transformation. Semin Cancer Biol 1990, 1:127-136.

99. Akhurst RJ, Derynck R: TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. Trends Cell Biol 2001, 11: S44-S51.

100. de Jong JS, van Diest PJ, van d, V, Baak JP: Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II: Correlations with proliferation and angiogenesis. J Pathol 1998, 184:53-57.

101. Ito N, Kawata S, Tamura S, Shirai Y, Kiso S, Tsushima H, Matsuzawa Y: Positive correlation of plasma transforming growth factor-beta 1 levels with tumor vascularity in hepatocellular carcinoma. Cancer Lett 1995, 89:45-48.

102. Ivanovic V, Melman A, Davis-Joseph B, Valcic M, Geliebter J: Elevated plasma levels of TGF-beta 1 in patients with invasive prostate cancer. Nat Med 1995, 1:282-284.

103. Junker U, Haufe CC, Nuske K, Rebstock K, Steiner T, Wunderlich H, Junker K, Reinhold D: Elevated plasma TGF-beta1 in renal diseases: cause or consequence? Cytokine 2000, 12:1084-1091.

104. Wikstrom P, Stattin P, Franck-Lissbrant I, Damber JE, Bergh A: Transforming growth factor beta1 is associated with angiogenesis, metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer. Prostate 1998, 37:19-29.

105. Sehgal I, Thompson TC: Novel regulation of type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9 and -2) activities by transforming growth factor-beta1 in human prostate cancer cell lines. Mol Biol Cell 1999, 10:407-16.

106. Duivenvoorden WC, Hirte HW, Singh G: Transforming growth factor beta1 acts as an inducer of matrix metalloproteinase expression and activity in human bone-metastasizing cancer cells. Clin Exp Metastasis 1999, 17:27-34.

107. Nakano A, Tani E, Miyazaki K, Furuyama J, Matsumoto T: Expressions of matrilysin and stromelysin in human glioma cells. Biochem Biophys Res Commun 1993, 192:999-1003.

108. Feinberg MW, Jain MK, Werner F, Sibinga NE, Wiesel P, Wang H, Topper JN, Perrella MA, Lee ME: Transforming growth factor-beta 1 inhibits cytokine-mediated induction of human metalloelastase in macrophages. J Biol Chem 2000, 275:25766-25773.

109. Yuan W, Varga J: Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3. J Biol Chem 2001, 276:38502-38510.

110. Chauhan SS, Goldstein LJ, Gottesman MM: Expression of cathepsin L in human tumors. Cancer Res 1991, 51:1478-1481.

111. Thomssen C, Schmitt M, Goretzki L, Oppelt P, Pache L, Dettmar P, Janicke F, Graeff H: Prognostic value of the cysteine proteases cathepsins B and cathepsin L in human breast cancer. Clin Cancer Res 1995, 1:741-746.

112. Ledakis P, Tester WT, Rosenberg N, Romero-Fischmann D, Daskal I, Lah TT: Cathepsins D, B, and L in malignant human lung tissue. Clin Cancer Res 1996, 2:561-568.

113. Sivaparvathi M, Sawaya R, Wang SW, Rayford A, Yamamoto M, Liotta LA, Nicolson GL, Rao JS: Overexpression and localization of cathepsin B during the progression of human gliomas. Clin Exp Metastasis 1995, 13:49-56.

114. Keppler D, Sloane BF: Cathepsin B: multiple enzyme forms from a single gene and their relation to cancer. Enzyme Protein 1996, 49:94-105.

115. Buhling F, Waldburg N, Gerber A, Hackel C, Kruger S, Reinhold D, Bromme D, Weber E, Ansorge S, Welte T: Cathepsin K expression in human lung. Adv Exp Med Biol 2000, 477:281-286.

116. Adams DO, Hamilton TA: The cell biology of macrophage activation. Annu Rev Immunol 1984, 2:283-318.

117. Morrison DC, Ryan JL: Endotoxins and disease mechanisms. Annu Rev Med 1987, 38:417-32..

118. Lai WC, Zhou M, Shankavaram U, Peng G, Wahl LM: Differential regulation of lipopolysaccharide-induced monocyte matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 by p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. J Immunol 2003, 170:6244-6249.

119. Machein U, Conca W: Expression of several matrix metalloproteinase genes in human monocytic cells. Adv Exp Med Biol 1997, 421:247-251.

120. Hmama Z, Knutson KL, Herrera-Velit P, Nandan D, Reiner NE: Monocyte adherence induced by lipopolysaccharide involves CD14, LFA-1, and cytohesin-1. Regulation by Rho and phosphatidylinositol 3-kinase. J Biol Chem 1999, 274:1050-1057.

121. Ziegler-Heitbrock HW, Wedel A, Schraut W, Strobel M, Wendelgass P, Sternsdorf T, Bauerle PA, Haas JG, Riethmuller G: Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers. J Biol Chem 1994, 269:17001-17004.

122. Landmann R, Wesp M, Obrecht JP: Cytokine regulation of the myeloid glycoprotein CD14. Pathobiology 1991, 59:131-135.

123. Mai J, Finley RL, Jr., Waisman DM, Sloane BF: Human procathepsin B interacts with the annexin II tetramer on the surface of tumor cells. J Biol Chem 2000, 275:12806-12812.

124. Ohta T, Terada T, Nagakawa T, Tajima H, Itoh H, Fonseca L, Miyazaki I: Pancreatic trypsinogen and cathepsin B in human pancreatic carcinomas and associated metastatic lesions. Br J Cancer 1994, 69:152-156.

125. Plebani M, Herszenyi L, Cardin R, Roveroni G, Carraro P, Paoli MD, Rugge M, Grigioni WF, Nitti D, Naccarato R, .: Cysteine and serine proteases in gastric cancer. Cancer 1995, 76:367-375.

126. Kolkhorst V, Sturzebecher J, Wiederanders B: Inhibition of tumour cell invasion by protease inhibitors: correlation with the protease profile. J Cancer Res Clin Oncol 1998, 124:598-606.

127. Krueger S, Haeckel C, Buehling F, Roessner A: Inhibitory effects of antisense cathepsin B cDNA transfection on invasion and motility in a human osteosarcoma cell line. Cancer Res 1999, 59:6010-6014.

128. Ashkenazi A, Dixit VM: Death receptors: signaling and modulation. Science 1998, 281:1305-1308.

129. Hongo T, Morimoto Y, Iwagaki H, Kobashi K, Yoshii M, Urushihara N, Hizuta A, Tanaka N: Functional expression of Fas and Fas ligand on human colonic intraepithelial T lymphocytes. J Int Med Res 2000, 28:132-142.

130. Kuwano K, Hagimoto N, Kawasaki M, Yatomi T, Nakamura N, Nagata S, Suda T, Kunitake R, Maeyama T, Miyazaki H, Hara N: Essential roles of the Fas-Fas ligand pathway in the development of pulmonary fibrosis. J Clin Invest 1999, 104:13-19.

131. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S: A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature 1998, 391:43-50.

132. Green DR, Reed JC: Mitochondria and apoptosis. Science 1998, 281:1309-1312.

133. Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ: Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. J Biol Chem 1999, 274:1156-1163.

134. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD: The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science 1997, 275:1132-1136.

135. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell 1997, 91:479-489.

136. Mancini M, Nicholson DW, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA, Rosen A: The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. J Cell Biol 1998, 140:1485-1495.

137. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G: Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature 1999, 397:441-446.

138. Stoka V, Turk B, Schendel SL, Kim TH, Cirman T, Snipas SJ, Ellerby LM, Bredesen D, Freeze H, Abrahamson M, Bromme D, Krajewski S, Reed JC, Yin XM, Turk V, Salvesen GS: Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. J Biol Chem 2001, 276:3149-3157.

139. Cirman T, Oresic K, Mazovec GD, Turk V, Reed JC, Myers RM, Salvesen GS, Turk B: Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. J Biol Chem 2004, 279:3578-3587.

140. van Eijk M, de Groot C: Germinal center B cell apoptosis requires both caspase and cathepsin activity. J Immunol 1999, 163:2478-2482.

141. Roberts LR, Kurosawa H, Bronk SF, Fesmier PJ, Agellon LB, Leung WY, Mao F, Gores GJ: Cathepsin B contributes to bile salt-induced apoptosis of rat hepatocytes. Gastroenterology 1997, 113:1714-1726.

142. Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, Lademann U, Bastholm L, Boes M, Elling F, Leist M, Jaattela M: Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. J Cell Biol 2001, 153:999-1010.

143. Shibata M, Kanamori S, Isahara K, Ohsawa Y, Konishi A, Kametaka S, Watanabe T, Ebisu S, Ishido K, Kominami E, Uchiyama Y: Participation of cathepsins B and D in apoptosis of PC12 cells following serum deprivation. Biochem Biophys Res Commun 1998, 251:199-203.

144. Isahara K, Ohsawa Y, Kanamori S, Shibata M, Waguri S, Sato N, Gotow T, Watanabe T, Momoi T, Urase K, Kominami E, Uchiyama Y: Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases. Neuroscience 1999, 91:233-249.

145. Myeroff LL, Parsons R, Kim SJ, Hedrick L, Cho KR, Orth K, Mathis M, Kinzler KW, Lutterbaugh J, Park K: A transforming growth factor beta receptor type II gene mutation common in colon and gastric but rare in endometrial cancers with microsatellite instability. Cancer Res 1995, 55:5545-5547.

146. Vincent F, Nagashima M, Takenoshita S, Khan MA, Gemma A, Hagiwara K, Bennett WP: Mutation analysis of the transforming growth factor-beta type II receptor in human cell lines resistant to growth inhibition by transforming growth factor-beta. Oncogene 1997, 15:117-122.

147. Chen T, Carter D, Garrigue-Antar L, Reiss M: Transforming growth factor beta type I receptor kinase mutant associated with metastatic breast cancer. Cancer Res 1998, 58:4805-4810.

148. Goggins M, Shekher M, Turnacioglu K, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE: Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. Cancer Res 1998, 58:5329-5332.

149. Schiemann WP, Pfeifer WM, Levi E, Kadin ME, Lodish HF: A deletion in the gene for transforming growth factor beta type I receptor abolishes growth regulation by transforming growth factor beta in a cutaneous T-cell lymphoma. Blood 1999, 94:2854-2861.

150. Xu J, Attisano L: Mutations in the tumor suppressors Smad2 and Smad4 inactivate transforming growth factor beta signaling by targeting Smads to the ubiquitin-proteasome pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 2000, 97:4820-4825.

151. Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H, Tsui LC, Bapat B, Gallinger S, Andrulis IL, Thomsen GH, Wrana JL, Attisano L: MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. Cell 1996, 86:543-552.

152. Kondo M, Suzuki H, Takehara K, Miyazono K, Kato M: Transforming growth factor-beta signaling is differentially inhibited by Smad2D450E and Smad3D407E. Cancer Sci 2004, 95:12-17.

153. Massague J, Blain SW, Lo RS: TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. Cell 2000, 103:295-309.

154. Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, Li L, Miyazono K, ten Dijke P, Kim S, Li E: Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 2000, 97:2626-2631.

155. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P: Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. EMBO J 2002, 21:1743-1753.

156. Engel ME, McDonnell MA, Law BK, Moses HL: Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. J Biol Chem 1999, 274:37413-37420.

157. Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I, Massague J: A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. Genes Dev 1999, 13:804-816.

158. Brooks AR, Blackhart BD, Haubold K, Levy-Wilson B: Characterization of tissue-specific enhancer elements in the second intron of the human apolipoprotein B gene. J Biol Chem 1991, 266:7848-7859.

159. Yan S, Berquin IM, Troen BR, Sloane BF: Transcription of human cathepsin B is mediated by Sp1 and Ets family factors in glioma. DNA Cell Biol 2000, 19:79-91.

160. Yamada M, Yoshida M, Hashinaka K: Identification of transcriptional cis-elements in introns 7 and 9 of the myeloperoxidase gene. J Biol Chem 1993, 268:13479-13485.

161. Major MB, Jones DA: Identification of a gadd45beta 3' enhancer that mediates SMAD3- and SMAD4-dependent transcriptional induction by transforming growth factor beta. J Biol Chem 2004, 279:5278-5287.

162. Verrecchia F, Vindevoghel L, Lechleider RJ, Uitto J, Roberts AB, Mauviel A: Smad3/AP-1 interactions control transcriptional responses to TGF-beta in a promoter-specific manner. Oncogene 2001, 20:3332-3340.

163. Ghosh AK, Yuan W, Mori Y, Varga J: Smad-dependent stimulation of type I collagen gene expression in human skin fibroblasts by TGF-beta involves functional cooperation with p300/CBP transcriptional coactivators. Oncogene 2000, 19:3546-3555.

164. Li JM, Nichols MA, Chandrasekharan S, Xiong Y, Wang XF: Transforming growth factor beta activates the promoter of cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4B through an Sp1 consensus site. J Biol Chem 1995, 270:26750-26753.

165. Poncelet AC, Schnaper HW: Sp1 and Smad proteins cooperate to mediate transforming growth factor-beta 1-induced alpha 2(I) collagen expression in human glomerular mesangial cells. J Biol Chem 2001, 276:6983-6992.

Persönliche Daten

Dipl.-Biol. Anita Reisenauer
geboren am 25.05.1970
Hermannstadt / Rumänien
ledig

Schulausbildung

1976 - 1985	Grundschulausbildung in Hermannstadt / Rumänien
1985	Aussiedlung aus Rumänien
1985 - 1990	Besuch des Paul-Klee Gymnasiums in Gersthofen bei Augsburg
1990	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

1992 - 1999	**Biologiestudium** an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg Schwerpunkte: Mikrobiologie / Immunologie Biochemie Genetik Molekulare Pflanzenphysiologie
24.07.1998	**Diplomprüfung** an der Bayerischen-Julius-Maximilians-Universität Würzburg
01.08.1998 - 31.07.1999	**Diplomarbeit** am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Bayerischen-Julius-Maximilians-Universität Würzburg **Thema**: „Charakterisierung der Invasionsdeterminante aus *Citrobacter freundii 3009* und des korrespondierenden eukaryontischen Internalisierungsrezeptors“ **Diplom-Abschlussnote**: „sehr gut“

Berufliche Tätigkeit

01.10.1999 - 14.06.2004	**Promotionsarbeit** im Institut für Immunologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Seit 15.06.2004	**Wissenschaftliche Angestellte** bei der probiodrug AG, Halle/Saale

Halle/Saale, 26.06.2005