

**Rolle von transmembranen Ektoenzymen wie
Aminopeptidase N und Autotaxin beim Schilddrüsenkarzinom bezüglich
ihres Einflusses auf Dedifferenzierung, Invasivität und Transformation**

Kumulative Habilitationsschrift

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

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
und der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Dr. rer. nat. Astrid Kehlen
geboren am 07.03.1964 in Halle/Saale

Gutachter:

1. Prof. Dr. K. Neubert, Universität Halle
2. Prof. Dr. J. Langner, Universität Halle
3. Prof. Dr. J. Köhrle, Charite Berlin

Datum der Verteidigung: 10.5.2006

Datum der Beschlussfassung: 30.11.2006

urn:nbn:de:gbv:3-000011182

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011182>]

Referat

Einleitung und Zielsetzung: Ektoenzymen wird eine essentielle Rolle im Tumorgeschehen hinsichtlich der Beeinflussung von Transformation, Wachstum, Tumorzellmotilität und Metastasierung zugeschrieben. Aminopeptidase N (APN)/CD13 (EC 3.4.11.2) ist eine Ektopeptidase mit einem Zink-abhängigen aktiven Zentrum, die im Tumorgeschehen mit Tumoringression, Metastasierung und Angiogenese in Zusammenhang gebracht wird. Autotaxin (ATX) ist ein Membran-Ektoenzym, das ursprünglich als Motilitäts-steigerndes Protein beim Melanom beschrieben wurde. ATX besitzt neben Phosphodiesterase I/Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität auch Lysophospholipase-D-Aktivität und kann Lysophosphatidylcholin zu Lysophosphatidsäure spalten. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit sollten die Ektoenzyme APN/CD13 und ATX hinsichtlich ihrer Expression, Regulation und Funktion im Schilddrüsenkarzinom untersucht werden.

Wesentliche Ergebnisse: Quantifizierungen der APN/CD13-mRNA-Expression in Geweben von Patienten mit Schilddrüsenkarzinom bzw. Struma nodosa zeigten die verstärkte APN/CD13-mRNA-Expression in undifferenzierten vs. differenzierten Karzinomgeweben bzw. Schilddrüsenkarzinomzelllinien. Zellen der follikulären Zelllinie FTC-133, die stabil ein APN-GFP-Fusionskonstrukt exprimieren, wiesen eine höhere Motilität und die verstärkte Fähigkeit zum „anchorage-independent“ Wachstum auf im Vergleich zu den Kontrollzellen, die mit einem GFP-Kontrollvektor transfiziert wurden. Untersuchungen der differentiellen Genexpression nach Überexpression von APN/CD13 mittels Microarray (Affymetrix-Chip U133A) ergaben eine Vielzahl von veränderten Genen. Für ATX konnte wie für APN/CD13 gezeigt werden, dass dieses Molekül verstärkt in undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen exprimiert ist. Überexpression von ATX in FTC-133-Zellen resultierte in einer erhöhten Proliferation, einer Verstärkung der autokrinen und parakrinen Motilität von Tumorzellen und ist ebenfalls mit differentieller Genexpression verknüpft. Erstmals konnten gemeinsame APN/CD13- und ATX-Targetgene wie der schilddrüsen-spezifische Transkriptionsfaktor TTF-1, das GPI-verankerte Protein Contactin-6, das Zelladhäsionsmolekül Lumican, das Kalzium-bindende Protein S100 A3 und der Cytokin Rezeptor-Like Factor identifiziert werden. Besonders interessant ist Contactin-6, da dessen Expression im Gewebematerial von Patienten mit Schilddrüsenkarzinom deutlich verringert ist im Vergleich zum Kontrollgewebe von Patienten mit Struma nodosa. Somit kann Contactin-6 als neuer Marker beim Schilddrüsenkarzinom diskutiert werden.

Schlussfolgerungen: Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass sowohl APN/CD13 als auch ATX als Marker der Dedifferenzierung beim Schilddrüsenkarzinom diskutiert werden müssen. Beide Ektoenzyme sind mit einer Tumoringression assoziiert. Die vorliegenden Analysen zeigen die funktionelle Bedeutung der Ektoenzyme APN/CD13 und ATX hinsichtlich der Pathogenese beim Schilddrüsenkarzinom. Offen sind aber noch Fragen hinsichtlich der endogenen Substrate von APN/CD13, der Signalweiterleitung von der Zellmembran zum Zellkern sowie der Regulation der Ektoenzymexpression beim Schilddrüsenkarzinom.

Kehlen, Astrid: Rolle von transmembranen Ektoenzymen wie Aminopeptidase N und Autotaxin beim Schilddrüsenkarzinom bezüglich ihres Einflusses auf Proliferation, Dedifferenzierung und Invasivität
Halle, Univ., Med. Fak., Habl., 95 Seiten, 2004

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung und Fragestellung	1
1.1. Vorbemerkungen	1
1.2. Schilddrüsenkarzinom	1
1.3. Aminopeptidase N/CD13	2
1.4. Autotaxin/Lysophospholipase D	6
1.5. Dipeptidylpeptidase IV/CD26	10
1.6. Fragestellung	12
2. Zusammenfassung der eigenen Ergebnisse zur Rolle von Ektoenzymen in Karzinomen der humanen Schilddrüse	13
2.1. Aminopeptidase N/CD13 beim Schilddrüsenkarzinom	13
2.1.1. Expression und Regulation von APN/CD13 beim Schilddrüsenkarzinom	13
2.1.2. Funktion von APN/CD13 beim Schilddrüsenkarzinom	14
2.2. Autotaxin beim Schilddrüsenkarzinom	21
2.2.1. Expression und Regulation von Autotaxin beim Schilddrüsenkarzinom	21
2.2.2. Funktion von Autotaxin beim Schilddrüsenkarzinom	22
2.3. APN/CD13- und ATX-spezifische Targetgene im Schilddrüsenkarzinom	26
3. Diskussion	31
4. Zusammenfassung	37
5. Literatur	39
6. Anlagen	47

Abkürzungsverzeichnis

ADA	Adenosindeaminase
APN	Aminopeptidase N
ATX	Autotaxin
BAGE	B-Melanom-Antigen
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BrdU	5' Brom-2'deoxyuridin
CD	Cluster of differentiation (Nomenklatur für monoklonale Antikörper)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CT	Cancer/Testis-Antigen
C-Zellen	Kalzitonin-produzierende Zellen
DPIV	Dipeptidylpeptidase IV
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFP	verstärktes GFP
E-NPP	Ekto-Nukleotidpyrophosphatase/Phosphodiesterase
FACS	fluoreszenzaktivierter Zellsorter
FCS	fötale Kälberserum
FTC	follikuläres Schilddrüsenkarzinom
G418	Geneticin 418
GAGE	G-Antigen
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LPA	Lysophosphatidsäure
LPC	Lysophosphatidylcholin
LysoPLD	Lysophospholipase D
MAGE	Melanom-Antigen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTC	medulläres Schilddrüsenkarzinom
NPP	Nukleotidpyrophosphatase/Phosphodiesterase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PE	Phycoerythrin
pEGFP	Expressionsplasmid für das grün-fluoreszierende Protein
PTC	papilläres Schilddrüsenkarzinom
sAPN	lösliche Aminopeptidase N
SFC	Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten
SPC	Spingosylphosphorylcholin
T3	Trijodthyronin
T4	Tetrajodthyronin
Tag-L6	humanes Tumorantigen L6
TGF	Tumor-Wachstumsfaktor (tumor growth factor)
TRH	Thyreoidea Releasing-Hormon
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
UTC	undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom
wt	Wildtyp

Für meinen leider zu früh verstorbenen Vater Prof. Dr. H. Kehlen

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Vorbemerkungen

Zell-Zell-Wechselwirkungen im Normal- und im Tumorgewebe werden maßgeblich - neben der Sekretion von Botenstoffen und der Zell-Substrat-Kontakte - durch die in der Zellmembran verankerten Proteine bewirkt. Neben der großen Zahl von durch direkte molekulare Wechselwirkungen aktiven Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin, Integrine, Tetraspanine u. v. a. spielen auch membranständige Enzyme eine Rolle, die wegen der Lokalisation ihres aktiven Zentrums auf der Zelloberfläche als Ektoenzyme bezeichnet werden. Obwohl die biologische Funktion und insbesondere die physiologischen Substrate der meisten Ektoenzyme noch unbekannt sind, wird ihnen eine essentielle Rolle im Tumorgeschehen hinsichtlich der Beeinflussung von Transformation, Wachstum, Tumorzellmotilität und Metastasierung zugeschrieben. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit haben wir uns mit den Ektopeptidasen Aminopeptidase N(APN)/CD13, Dipeptidylpeptidase IV(DPIV)/CD26 sowie der Phosphodiesterase/Lysophospholipase D Autotaxin (ATX) im Schilddrüsenkarzinom beschäftigt. Für diese Ektoenzyme waren bereits einige Beziehungen zu Tumorgenese, Tumorwachstum und Metastasierung in Karzinomen aufgefunden worden, aber es gab noch keine Untersuchungen über ihre Expression, Regulation und Funktion im Schilddrüsenkarzinom.

1.2. Schilddrüsenkarzinom

Das Schilddrüsenkarzinom ist der häufigste maligne endokrine Tumor, jedoch mit einem Anteil von ca. 1 % aller bösartigen Tumoren insgesamt eher selten. In Deutschland erkranken pro Jahr etwa drei Personen auf 100.000 Einwohner an einem Schilddrüsenkarzinom. Bei den Schilddrüsenkarzinomen unterscheidet man einerseits die von den Thyreozyten abgeleiteten differenzierten bzw. undifferenzierten Karzinome und andererseits die von den parafollikulären C-Zellen abgeleiteten medullären Schilddrüsenkarzinome (MTC). Die hier vorgelegten Untersuchungen befassen sich mit der Expression von Ektoenzymen in den von den epithelialen Zellen der Schilddrüse abgeleiteten differenzierten Karzinomen (unterteilbar in follikuläre (FTC) und papilläre Karzinome (PTC)) sowie den undifferenzierten, anaplastischen Karzinomen (UTC).

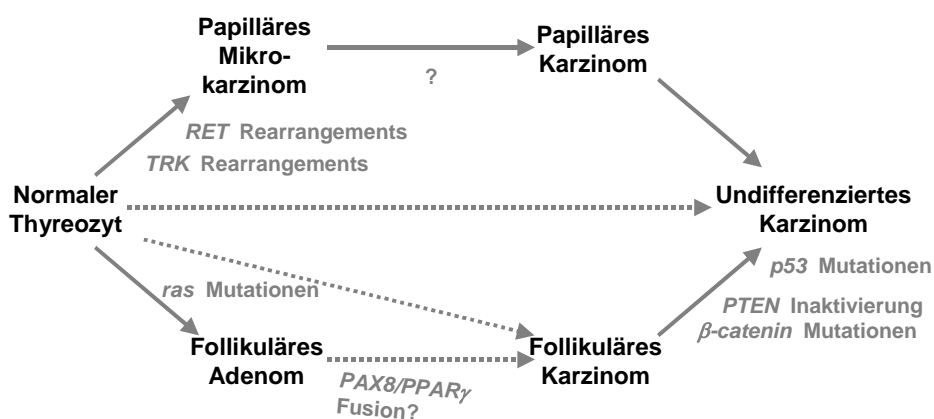


Abb. 1: Modell der Schilddrüsenkarzinogenese mit bekannten beteiligten Genen¹

PTC metastasieren vorzugsweise lymphogen, FTC hämatogen und UTC lokal invasiv und hämatogen. Aus diesem unterschiedlichen Metastatisierungsverhalten kann geschlussfolgert werden, dass wahrscheinlich auch unterschiedliche Mechanismen wie Mutationen, Deletionen, Methylierungsstatus, Änderungen der Gen- bzw. Proteinexpression, die zu den genannten Tumorentitäten führen, vorliegen (Abb. 1). Ein einheitliches Konzept der Schilddrüsenkarzinogenese ist bis jetzt nicht etabliert. Unsere Untersuchungen sollten einen Beitrag zur Klärung der Rolle von Ektoenzymen wie APN/CD13 oder ATX im Prozess der Schilddrüsenkarzinogenese liefern.

Diese Analysen sollen Hinweise auf die funktionelle Bedeutung von Aminopeptidase N/CD13 und Autotaxin beim Schilddrüsenkarzinom geben, was langfristig für das Verständnis der Biologie und Behandlung dieser Erkrankung eine Rolle spielen und die Beteiligung von Ektoenzymen an der Entstehung und Progression von Tumoren anderen Ursprungs umfassender verstehen lassen kann.

1.3. Aminopeptidase N/CD13

Aminopeptidase N (APN)/CD13 (EC 3.4.11.2) ist eine Metallopeptidase mit einem Zink-abhängigen aktiven Zentrum und gehört zur Familie der Gluzincine². Sequenzvergleiche der geklonten cDNA zeigten, dass APN und CD13 identisch sind³. APN/CD13 ist ein Homodimer mit in jedem Monomer einer einzelnen helikalen transmembranen Region und einer kurzen N-terminalen, zytoplasmatischen Domäne (Abb. 2).

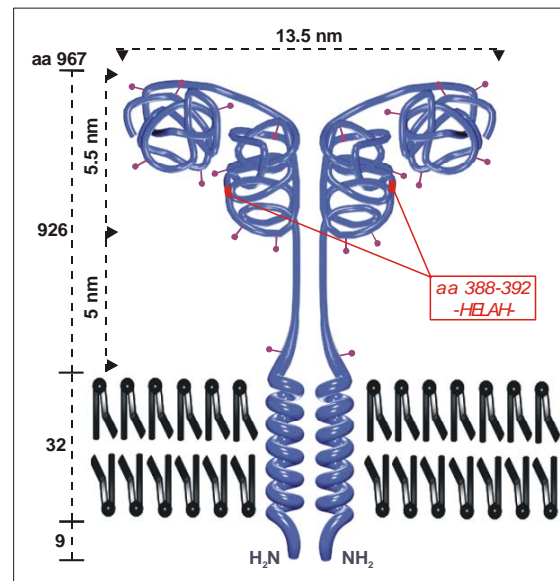


Abb. 2: Modell der APN⁴. Das aktive Zentrum mit seinem HELAH-Motiv (Aminosäuren 388-392) ist gekennzeichnet.

Etwa 95 % der Polypeptidketten befinden sich extrazellulär, und tragen je 9 oder 10 Oligosaccharidketten. Das Enzym kann ein breites Spektrum von Oligopeptiden spalten, wobei bevorzugt neutrale Aminosäuren von einem unsubstituierten N-Terminus (Tab. 1) freigesetzt werden. APN/CD13 ist im Organismus ubiquitär verbreitet und galt lange als myeloischer Differenzierungsmarker, da nur Monozyten/Makrophagen, aber nicht Lymphozyten des peripheren Blutes APN/CD13 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die Expression von APN/CD13 konnte auf B- und T-Zellvorstufen^{5,6}, in leukämischen T-Zelllinien^{7,8}, auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL)⁹ und auf synovialen T-Zellen¹⁰ gezeigt werden.

Die Kontrolle der Regulation der Expression des APN/CD13-Gens erfolgt durch zwei Promotoren, von denen der entferntere „myeloischer“ Promotor genannt wird und der nahe dem Transkriptionsstart liegende „epithelialer“ Promotor heißt (Abb. 3),

entsprechend ihren Zelltyp-spezifischen Aktivitäten^{11,12}. Zwischen beiden Promotoren befindet sich ein Enhancer, der sowohl mit dem „myeloischen“ als auch dem „epithelialen“ Promoter interagieren kann^{13,14}.

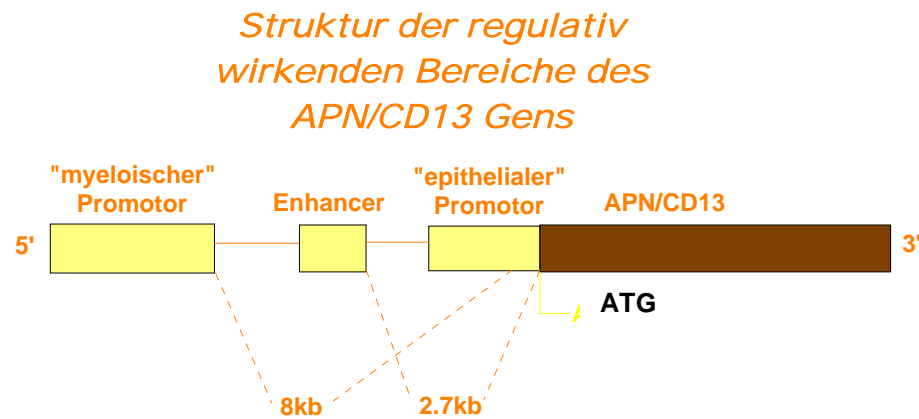


Abb. 3: Struktur des 5'-Bereiches des APN/CD13-Gens

Die Funktion von APN/CD13 scheint abhängig vom Ort der Expression zu sein. So wird neben dem Abbau von Peptiden (wie z. B. im Darm und in der Niere), von Signalpeptiden im Gehirn, der Metabolisierung von vasoaktiven Peptiden wie Angiotensin III der APN/CD13 auch eine Rolle in der Antigenpräsentation beim Trimmen von Peptiden zugesprochen¹⁵⁻¹⁷ (Tab. 1).

APN/CD13 wirkt als Rezeptor für Viren wie Coronavirus 229 und Cytomegalovirus^{18,19}. Dabei ist die enzymatische Aktivität von APN/CD13 nicht notwendig, da die Bindungsstelle für die Viren außerhalb des aktiven Zentrums liegt. Neueste Untersuchungen diskutieren APN/CD13 auch als möglichen Rezeptor für das SARS-Virus^{20,21}

Tab. 1: Eigenschaften und Funktion von APN/CD13

Name und Synonyme	Protease Familie/ Substratspezifität	Expression	Endogene Substrate
APN (CD13) EC 3.4.11.2 Alanin-Aminopeptidase Mikrosomale Aminopeptidase Aminopeptidase M Aminopeptidase N Amino-Oligopeptidase	Familie M1 ↓ H - Xaa - Xaa - Ala Phe Tyr	ubiquitär; hoch in: Epithelzellen der proximalen Tubuli der Niere, Dünndarm, Plazenta, Leber, Fibroblasten, Endothelzellen, Monozyten, dendritische Zellen, Granulozyten	MCP-1, Leu- und Met-Enkephalin, Somatostatin, MSH, Neurokinin A, Tuftsin, Kallidin, Angiotensin III, Angiotensin IV

In soliden Tumoren wird APN/CD13 eine Rolle bei Prozessen wie Proliferation und Metastasierung zugeschrieben. Bei Kolonkarzinompatienten zeigte sich eine Assoziation zwischen APN/CD13-Expression und Tumorstadium. Außerdem scheint dort APN/CD13 ein prognostischer Marker zu sein, da die APN/CD13-Expression negativ mit der krankheitsfreien Überlebenszeit der Patienten korrelierte²². Ebenfalls als prognostischer Faktor wird APN/CD13 beim Pankreaskarzinom diskutiert: eine hohe APN/CD13-Expression ging einher mit einer schlechteren Prognose²³. Bei Patienten mit einem Prostatakarzinom konnte gezeigt werden, dass die APN/CD13-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe verstärkt ist²⁴. Im Gegensatz dazu ist eine APN/CD13-Expression beim Nierenzellkarzinom mit einer guten Prognose assoziiert²⁵. Über die genaue Funktion oder physiologische Mechanismen, in die APN/CD13 bei soliden Tumoren involviert sein könnte, herrscht noch Unklarheit. Es wird eine Rolle bei der Zelladhäsion sowie beim Zell-Zellkontakt bzw. Zell-Extrazellulärmatrix-Interaktion angenommen. So hemmt der APN/CD13-spezifische Antikörper WM15 konzentrationsabhängig den Abbau von Kollagen IV durch Tumorzellen²⁶. APN/CD13-spezifische Antikörper sowie APN-Inhibitoren (Bestatin, Amastatin) hemmen die Invasion einer APN/CD13⁺-Melanomzelllinie in Matrigel²⁷. Überexpression von APN/CD13 in einer Melanomzelllinie verstärken Invasivität und das metastasierende Potential dieser Zellen²⁸. Diese Daten sprechen für eine Rolle von APN/CD13 in der *Tumorinvasion*. Neuere Befunde zeigen eine Funktion von APN/CD13 in der *Angiogene*se, da APN/CD13 auf Endothelzellen während der Kapillarbildung und durch Angiogene

konnte durch Hemmung der APN/CD13 via Inhibierung der Angiogenese auch das Tumorwachstum unterdrückt bzw. durch an APN/CD13-bindende Zyklopeptide (CNGRC) ein Tumor-gerichtetes Targeting erzielt werden³¹. Über die Expression, Regulation und Funktion von APN/CD13 bei Schilddrüsenkarzinomen gab es zu Beginn unserer Untersuchungen noch keine publizierten Daten.

1.4 Autotaxin/Lysophospholipase D

Autotaxin (ATX) ist ein Membran-Ektoenzym mit Phosphodiesterase I/Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität und wie neueste Untersuchungen zeigen auch mit Lysophospholipase D- Aktivität. Es gehört strukturell zu einer bisher nur mit wenigen Vertretern bekannten Proteinfamilie, der u. a. auch das als Plasmazellmarker entdeckte PC-1 angehört. ATX (125 kD) wurde erstmals als Motilität-steigerndes Protein aus Überständen der humanen Melanomzelllinie A2058 isoliert und stimuliert sowohl die zufällige als auch die gerichtete Beweglichkeit der produzierenden Zellen³².

Auf dem „Second International Workshop on Ecto-ATPases and Related Ectonucleotidases“, Diepenbeek, Belgien, 1999, wurde folgende Nomenklatur für die Ekto-Phosphodiesterasen vorgeschlagen:

E-NPP Familie (ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family):

- NPP-1 PC-1 (Plasmazell-Glykoprotein-1)
- NPP-2 Autotaxin, PD-I α
- NPP-3 gp130^{RB13-6}, PD-I β , B10

Diese Enzyme sind Typ-II-Membranproteine (Abb. 4). Es sind lösliche Varianten beschrieben worden, und sie können Phosphodiesterbindungen von Nukleotiden und Nukleinsäuren sowie Pyrophosphatbindungen von Nukleotiden und Nukleosiden hydrolysieren wie z. B. 3',5'-cAMP zu AMP, ATP zu AMP und P_i, ADP zu AMP und P_i oder NAD⁺ zu AMP und Nicotinamidmononucleotid³³.

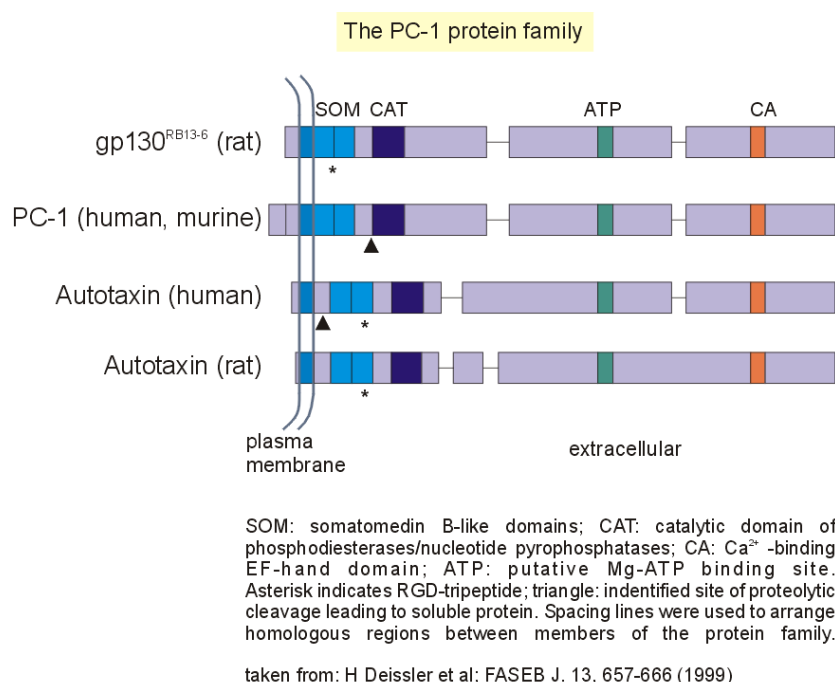


Abb. 4: Struktur von Mitgliedern der E-NPP-Familie

Die kurzen intrazellulären Domänen von ATX und PC-1 sind deutlicher verschieden als der sonstige gesamte Molekülaufbau. Nur gp130^{RB13-6} hat hier eine KKDSLKR-Sequenz, die einen potentiellen Serin-Phosphorylierungsort trägt, was die Beteiligung an der Signalübertragung vermittelt durch eine cAMP-abhängigen Proteinkinase möglich erscheinen lässt. Somatomedin-B-Domänen finden sich auch in Molekülen wie Vitronektin, einem Zell-Substratum-Adhäsionsvermittler. Die Wechselwirkungen erfolgen über die RGD-Sequenz der Somatomedin-B-Domänen und Integrinen. Die durch die EF-Schleife möglicherweise sich ergebende Ca²⁺-Bindungsfähigkeit ist für ATX bisher nicht nachgewiesen worden.

ATX kann in 2 Splicevarianten vorkommen: als Splicevariante ATX^{TER} und als um 52 Aminosäuren längere ATX^{MEL}-Variante. ATX^{TER} zeigt 94 % Homologie zu ATX^{MEL}. Expressionsanalysen mittels Northernblots ergaben ein Vorkommen von ATX in Tumorzellen (Melanom, Teratokarzinom), aber auch in Normalgewebe wie Hirn, Plazenta, Ovar und Dünndarm. Geringere Expression war zu verzeichnen in Niere, Prostata, Testis, Pankreas, Kolon, Lunge. Dagegen war die ATX-Expression in Leber, Herz, Milz, Thymus nur schwach³⁴.

Die Aminosäure Threonin 210 im katalytischen Zentrum ist essentiell sowohl für die Phosphodiesteraseaktivität als auch für die Stimulierung der Motilität³⁵. Deissler und Mitarbeiter beschrieben 1999, dass nach Transfektion von gp130^{RB13-6}, einem Mitglied der NPP-3-Familie, in NIH-3T3-Fibroblasten und in andere Zellen zytologische Änderungen nachweisbar waren und dass gliale Markerproteine exprimiert wurden. Transfizierte Zellen verhielten sich invasiver als Kontrollzellen³⁶. Des Weiteren wurde die Autotaxin-Expression in humanen Bronchialepithelzellen und in Non-Small-Cell-Lungenkarzinomen mittels RT-PCR, Northern Blotting und in situ-Hybridisierung nachgewiesen. 58 % der Karzinomzellen zeigten eine Überexpression von ATX-mRNA³⁷. Yang et al. beschrieben die verstärkte ATX-mRNA-Expression besonders in undifferenzierten Bronchialkarzinomen und konnten ATX-mRNA in B-Lymphozyten nachweisen. Sie postulieren eine Rolle von ATX bei neoplastischer Transformation und Tumorprogression. Besonders interessant sind die Ergebnisse von Nam et al., die Autotaxin als *Tumormotogen* beschreiben und zeigen, dass in ras-transformierten und ATX-exprimierenden Fibroblasten eine Verstärkung der tumorähnlichen Eigenschaften sowie des metastasierenden Potentials erfolgt³⁸. Untersuchungen der Arbeitsgruppe um M. Stracke beschreiben ATX zusätzlich als *Angiogenese-stimulierenden Faktor*³⁹. Die funktionelle Bedeutung von ATX als Tumormotogen und Angiogenese-stimulierender Faktor fand 2002 eine Erklärung durch die Entdeckung, dass ATX zusätzlich zur Phosphodiesterase/Nukleotidaseaktivität eine Lysophospholipase D-Aktivität besitzt. Das als Substrat dienende Lysophosphatidylcholin (LPC) wird durch ATX zum lange bekannten bioaktiven Phospholipid-Mediator Lysophosphatidsäure (LPA) gespalten^{40,41}, wobei LPA nach Bindung an entsprechende Rezeptoren Chemotaxis, Reorganisation des Zytoskeletts und Zellproliferation beeinflusst^{42,43} (Abb. 5).

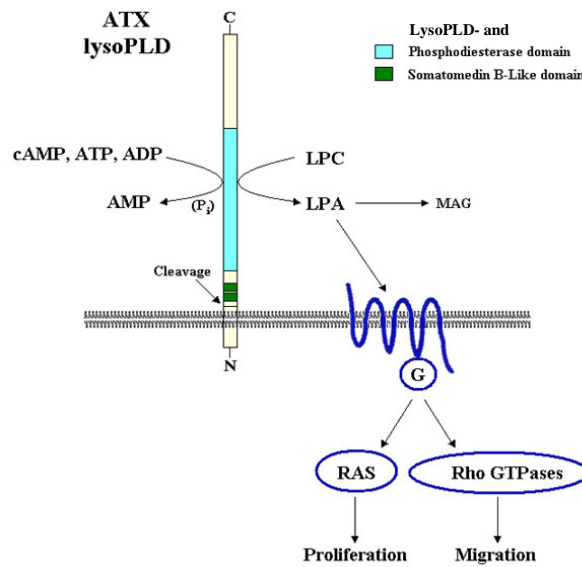


Abb. 5: Mögliche Funktionen von ATX

Auf der Basis dieser Erkenntnisse kann angenommen werden, dass ATX über die autokrine und parakrine Produktion von LPA zu Tumormotilität, Invasivität und Proliferation beiträgt. Neueste Untersuchungen ergaben außerdem, dass ATX mit der Hydrolyse von Spingosylphosphorylcholin (SPC) zu Spingosinphosphat die Spaltung eines negativen Regulators der Migration katalysieren kann⁴⁴. Für beide Enzymaktivitäten (LysoPLD bzw. PDE) ist **ein** katalytisches Zentrum mit T210, H316, H360 und H475 als essentiellen Aminosäuren verantwortlich, während die Histidine H243, H298, H453 sowie H587 für die LysoPLD-Aktivität keine Rolle spielen (Abb. 6)⁴⁵. Außerdem zeigten Gijsbers et al., dass im Gegensatz zu den NPP1- und NPP3-Familienmitgliedern, die eine verstärkte Nukleotidase/Pyrophosphataseaktivität aufweisen, ausschließlich ATX als Mitglied der NPP2-Familie eine hohe LysoPLD-Aktivität besitzt⁴⁶.

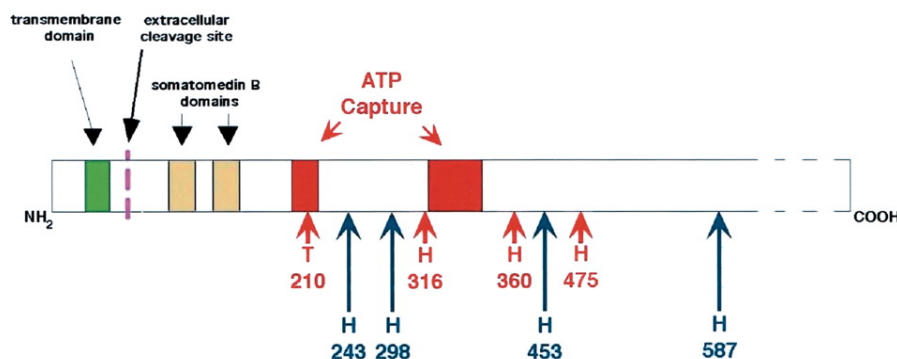


Abb. 6: Schematischer Aufbau der bekannten ATX Domänen⁴⁷

Wie in Abb. 5 und 6 dargestellt ist, gibt es nahe der Zellmembran eine Spaltstelle, an der ATX durch eine bisher unbekannte Protease abgespalten und dadurch als lösliches ATX im Zellkulturüberstand gefunden wird⁴⁸.

Neben der oben erwähnten Expression im Melanom, Bronchial- und Non-Small-Cell-Lungenkarzinom ist eine Autotaxinexpression im Nieren-, Leber-, Mammakarzinom beschrieben⁴⁹⁻⁵². Über die Expression, Regulation und Funktion von ATX beim Schilddrüsenkarzinom gab es zu Beginn unserer Untersuchungen keine publizierten Daten.

1.5 Dipeptidylpeptidase IV/CD26

Dipeptidylpeptidase IV (DPIV)/CD26 (EC 3.4.14.5) ist eine Ektopeptidase, die die Freisetzung von N-terminalen Dipeptiden aus Oligo- und Polypeptiden bevorzugt mit Prolin, Hydroxyprolin oder mit einer geringeren Effizienz Alanin in der vorletzten Position katalysiert^{53,54}. Die DPIV/CD26-cDNA kodiert ein Protein mit 766 Aminosäuren und 9 potentiellen Glykosylierungsstellen. Abbot et al. untersuchten die detaillierte genomische Organisation des DPIV/CD26-Gens mit der Lokalisation auf Chromosom 2q24.3 und der Zusammensetzung aus 26 kleinen Exonen⁵⁵. Untersuchungen zur Expression von DPIV/CD26 ergaben die ubiquitäre Verteilung mit einer starken Expression in Dünndarm, Niere und Leber⁵⁶. DPIV ist identisch mit dem Leukozyten-Differenzierungsantigen CD26^{57,58}. Im hämatopoetischen System ist DPIV/CD26 auf T-Zellen, aktivierten B- und NK-Zellen zu finden. Innerhalb des gastrointestinalen Systems scheint die Hauptfunktion von DPIV/CD26 die Freisetzung

von Prolin-haltigen Dipeptiden zu sein⁵⁹. Pauly et al. zeigten auch die enzymatische Aktivität von DPIV/CD26 gegenüber Mitgliedern der Glukagon-Peptid-Familie⁶⁰. Inhibierung der DPIV-Aktivität verstärkt die Insulinsekretion und verbessert die Glukosetoleranz in verschiedenen Tiermodellen für den Typ II-Diabetes⁶¹. Neue Studien zur Suche nach Substraten von DPIV/CD26 zeigten auch DPIV-Aktivitäten gegenüber Chemokinen (z.B. RANTES, Eotaxin, SDF- α), Wachstumsfaktoren oder Neuropeptiden^{62,63}. Auf Grund der Fähigkeit von DPIV/CD26 zur Bindung an extrazelluläre Matrixproteine (ECM), wie Fibronectin, Kollagen I und III, spielt es eine Rolle bei Zell-Zell- und Zell-ECM-Interaktionen⁶⁴⁻⁶⁷. In Lymphozyten kann CD26 als ein kostimulatorisches Molekül fungieren durch die Interaktion mit der Proteintyrosinphosphatase CD45⁶⁸. 1993 wurde die Interaktion von DPIV/CD26 mit der Adenosindeaminase (ADA) identifiziert, einem Enzym, das die Umwandlung von Adenosin und Deoxyadenosin zu Inosin bzw. Deoxyinosin katalysiert und während der malignen Transformation von Melanozyten verringert exprimiert wird⁶⁹. Auf Lungenepithelzellen exprimierte DPIV/CD26 ist via Fibronectin als Ligand für die Adhäsion und damit den Metastasierungsprozess von Brusttumorzellen verantwortlich⁷⁰. Dieser Prozess ist durch lösliche DPIV/CD26 und durch Antikörper gegen DPIV/CD26 bzw. Fibronectin hemmbar. Im Kontext der malignen Transformation beim Melanom scheint die Rolle von DPIV/CD26 zweiseitig zu sein: auf der einen Seite wurde gezeigt, dass die maligne Transformation von Melanozyten zum Melanom mit dem Verlust von DPIV/CD26 einhergeht⁷¹, auf der anderen Seite erfolgte nach Überexpression von DPIV/CD26 in Melanomzellen die Unterdrückung des malignen Phänotyps⁷²⁻⁷³. Beim kleinzelligen Lungenkarzinom wird DPIV/CD26 mit Tumorsuppression in Verbindung gebracht⁷⁴. In Prostatakarzinomen ist die Expression von DPIV/CD26 im Vergleich zur benignen Prostatahyperplasie erhöht⁷⁵. In Tumoren scheint DPIV/CD26 generell ein Differenzierungsmarker zu sein, da frühe und differenzierte Tumoren eine starke DPIV/CD26-Expression bzw. DPIV-Aktivität zeigen, aber die Tumorprogression mit einem DPIV/CD26-Verlust wie z. B. bei Gliomen⁷⁶ oder Schilddrüsentumoren einhergeht. Normale Schilddrüsen exprimieren DPIV/CD26 nicht, dagegen zeigen differenzierte Schilddrüsentumoren, wie follikuläre und papilläre Karzinome oder Hürthel-Zellen, eine starke DPIV/CD26-Expression, anaplastische Schilddrüsentumoren wiederum verlieren die Fähigkeit zur DPIV/CD26-Expression⁷⁷⁻⁸⁰. DPIV/CD26 wird wie auch Thyroidperoxidase als diagnostischer Marker für FTC empfohlen⁸¹.

1.6 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Forschungsarbeiten war neben der Untersuchung der basalen Expression der Ektoenzyme APN/CD13 und ATX im Schilddrüsenkarzinom die Beantwortung der folgenden Fragen:

- Gibt es eine Korrelation der basalen Expression von APN/CD13 und ATX mit dem Differenzierungsgrad beim Schilddrüsenkarzinom?
- Kann die Expression von APN/CD13 sowie von ATX durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren in Schilddrüsenkarzinomzelllinien reguliert werden?
- Hat die Expression von APN/CD13 bzw. ATX funktionelle Bedeutung hinsichtlich der Beeinflussung von Proliferation, Motilität und Invasivität?
- Welche Gene sind nach Expression von APN/CD13 und ATX reguliert?
- Gibt es Zielgene, die durch APN/CD13 und ATX gemeinsam in ihrer Expression verändert werden?
- Wie sieht die Expression der gemeinsamen APN/CD13- und ATX-Targetgene im Gewebematerial von Schilddrüsenkarzinompatienten aus?

2. Zusammenfassung der eigenen Ergebnisse zur Rolle von Ektoenzymen in Karzinomen der humanen Schilddrüse

2.1 Aminopeptidase N/CD13 beim Schilddrüsenkarzinom

2.1.1 Expression und Regulation von APN/CD13 beim Schilddrüsenkarzinom

Erste Daten über die Expression von APN/CD13 wurden an Schilddrüsenkarzinomzelllinien gewonnen. Es wurden die follikulären Zelllinien FTC-133, FTC-236, FTC-238 sowie die papilläre Zelllinie BCPAP als differenzierte Zellen als auch die den undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen zuzuordnenden Linien SW1736, C643, Hth74 hinsichtlich der APN/CD13- als auch der DPIV/CD26-Expression auf mRNA-Ebene mittels Real-Time RT-PCR sowie auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es zeigte sich, dass differenzierte Schilddrüsenkarzinomzellen eine starke DPIV/CD26-Expression aber eine geringe oder keine APN/CD13-Expression aufweisen, während dagegen undifferenzierte Schilddrüsenkarzinomzellen sich durch eine starke APN/CD13- und eine geringe DPIV/CD26-Expression auszeichnen. Dieses Expressionsverhalten konnte sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene beobachtet werden⁸².

Um die Ergebnisse der Untersuchungen mit Schilddrüsenkarzinomzelllinien zu verifizieren, wurde der mRNA-Gehalt von APN/CD13 sowie DPIV/CD26 in Gewebematerial (je n = 10) von Patienten mit follikulären, papillären bzw. undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen und als Vergleich mit Struma nodosa quantifiziert. Es konnte das an Zelllinien gewonnene Ergebnis bestätigt werden: die APN/CD13-mRNA-Expression ist in undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen stärker als in differenzierten Karzinomen und im Vergleichsmaterial Struma nodosa. DPIV/CD26 zeigte dagegen ein umgekehrtes Verhalten⁸². Aus diesen Daten kann spekuliert werden, dass es sich bei *APN/CD13* um einen *Marker der Dedifferenzierung* beim Schilddrüsenkarzinom handelt, dessen Expression mit einer Tumorprogression einhergeht (Abb. 7).

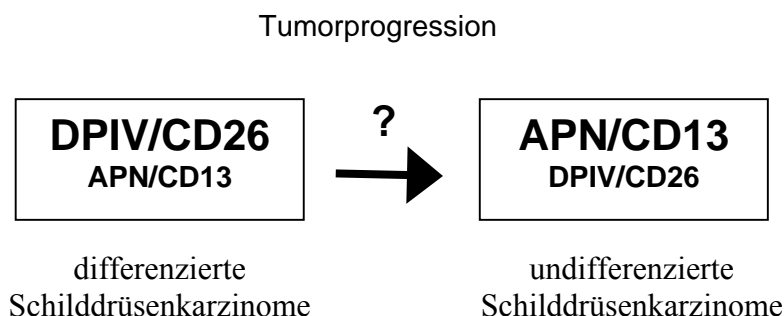


Abb. 7: Modell des Expressionsverhaltens der Ektopeptidasen APN/CD13 und DPIV/CD26 beim Schilddrüsenkarzinom

Um Informationen über die Regulation von APN/CD13 zu bekommen, wurde die undifferenzierte Schilddrüsenkarzinomzelllinie SW1736 mit Zytokinen (IL-1 β , IL-4, IL-6, TGF- β , TNF- α) und Wachstumsfaktoren (EGF, bFGF, FCS) behandelt. Nach 24 h zeigte sich eine Verstärkung der APN/CD13-mRNA-Expression durch die Zytokine IL-6, TNF- α und IL-4. EGF und bFGF konnten ebenfalls die APN/CD13-mRNA-Menge erhöhen, während die Zugabe von 10 % FCS eine Inhibierung der Expression verursachte⁸².

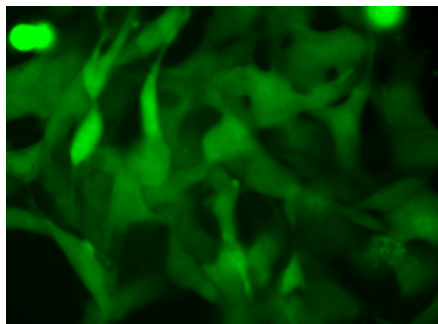
Untersuchungen der APN/CD13-Promotoraktivität ergaben, dass wie erwartet in Schilddrüsenkarzinomzellen der epitheliale Promotor aktiv ist und dass der Enhancer die Aktivität verstärken kann. In der Zelllinie 1736 konnte mittels Dual-Luciferase-Assay gezeigt werden, dass sowohl IL-6 als auch EGF eine Erhöhung der Promotoraktivität bewirken. Daraus kann geschlossen werden, dass der erhöhte mRNA-APN/CD13-Gehalt nach Stimulation mit IL-6 bzw. EGF in einer verstärkten transkriptionellen Aktivität begründet ist⁸².

2.1.2 Funktion von APN/CD13 beim Schilddrüsenkarzinom

Für die funktionellen Studien wurde die Zelllinie FTC-133 ausgewählt, da diese Zellen auf ein primäres FTC zurückzuführen sind und sie sich durch eine geringe endogene APN/CD13-Expression auszeichnen. APN/CD13 wurde in den pEGFP-Vektor kloniert und in FTC-133-Zellen transfiziert. Mittels Verdünnungstechnik und G418-Selektion wurden stabil APN/CD13 exprimierende Zellen, die als FTC-133 APN-GFP bezeichnet

wurden, erhalten. Als Kontrollzellen (FTC-133 GFP) wurden Transfektanten mit dem Leervektorkonstrukt generiert (Abb. 8).

FTC-133 GFP



FTC-133 APN-GFP

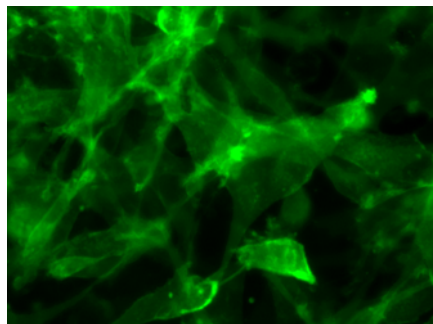


Abb. 8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der stabilen Transfektanten. FTC-133 GFP Kontrollzellen zeigen eine homogene grüne Färbung. Die APN/CD13-exprimierende Zellen des Klons FTC-133 APN-GFP exprimieren APN/CD13 als Fusionsprotein mit dem Grünen-Fluoreszierenden-Protein (GFP) und zeigen eine bevorzugt membranständige Fluoreszenz.

Untersuchungen der Motilität der APN/CD13-überexprimierenden FTC-133-Zellen zeigten, dass sie schneller in einem Transwell-Migrations-Assay durch eine 8 μm große Poren tragende Membran wandern können als die GFP-exprimierenden Kontrollzellen. Die Migration war durch Bestatin, einen kompetitiven Inhibitor der Enzymaktivität als auch durch einen Antikörper (WM15), der das aktive Zentrum von APN/CD13 blockiert, hemmbar⁸².

Mit Hilfe eines Koloniebildungs-Assays konnten Aussagen über das Wachstumsverhalten der transfizierten Zellen im Soft-Agar gewonnen werden. Untransfizierte FTC-133-Zellen bildeten nach vier Wochen Kolonien von ca. 50 μm Durchmesser, GFP-Kontrolltransfektanten von ca. 100 μm , aber APN-überexprimierende Zellen von 200 - 500 μm Durchmesser (Abb. 9). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass APN/CD13 das „anchorage-independent“ Wachstum der Schilddrüsenkarzinomzellen verstärkt.

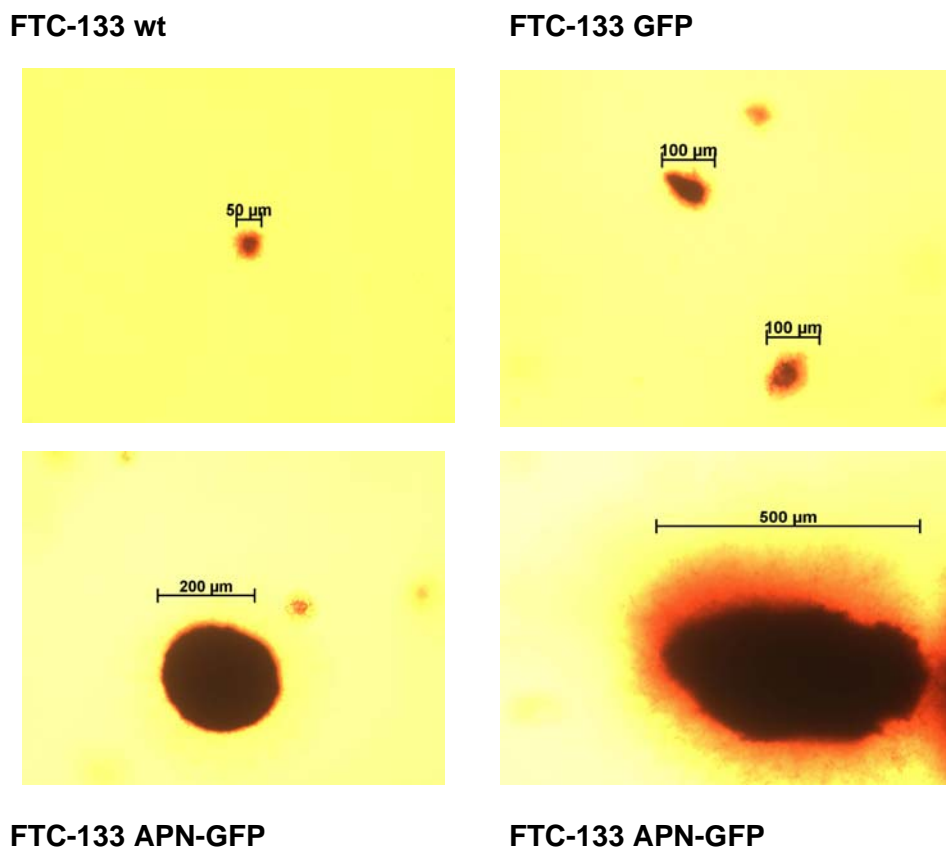


Abb. 9: Analyse des Koloniebildungsverhaltens der transfizierten FTC133-Zellen mittels Soft-Agar-Assays. Die untransfizierten Zellen (FTC-133 wt) sowie die Klone FTC-133 GFP als auch FTC-133 APN-GFP wurden im Soft-Agar eingesät, nach 4 Wochen mittels Iod-Nitro-Tetrazoliumchlorid angefärbt und mikroskopisch aufgenommen und vermessen.

Nach diesen Erkenntnissen, dass APN/CD13 mit einer erhöhten Motilität als auch Invasivität assoziiert ist, sollten Gene identifiziert werden, die in ihrem Expressionsverhalten nach APN/CD13-Transfektion verändert sind. Als Screening-Methode wurde eine Microarray-Analyse (Chip U133A) mittels Affymetrix-Chip-Technik am Institut für Immunologie der Universität Rostock durch Herrn Dr. Koczan durchgeführt.

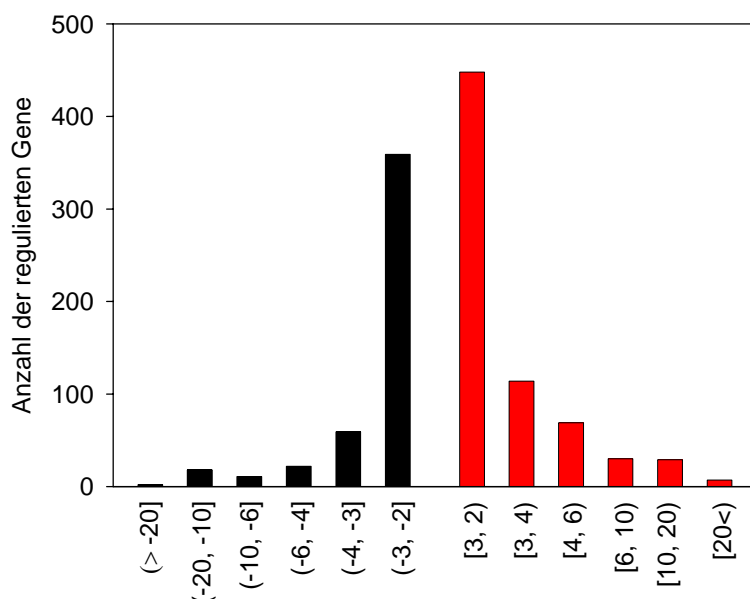


Abb. 10: Untersuchung der differentiellen Genexpression zwischen GFP-transfizierten und APN/CD13-transfizierten FTC-133-Zellen (Array-Analyse mittels Affymetrix-Chip U133A): Verteilung der Anzahl der nach APN/CD13-Überexpression regulierten Gene. Schwarz dargestellt sind herunterregulierte Gene, dagegen sind hochregulierte Gene rot dargestellt. Der Schwellenwert wurde bei einer zweifachen Veränderung der Expression gesetzt.

Wie in Abb. 10 dargestellt, gibt es 807 zweifach bis vierfach, aber auch neun über zwanzigfach in ihrer Expression veränderte Gene. Unter den stark hochregulierten Genen befindet sich aber nicht APN/CD13, obwohl die APN/CD13-mRNA im Klon FTC-133 APN-GFP ungefähr 800mal stärker exprimiert ist als in den Kontrollzellen. Der Grund dafür liegt in der Auswahl der für die Hybridisierung auf den Chip aufgebrauchten Oligonukleotide, die bevorzugt im 3' untranslatierten Bereich des Genes liegen und im zur Transfektion verwendeten Expressionsvektor nicht vorhanden sind.

Die Microarray-Methode wurde als Screening-Verfahren benutzt, um aus über 22.000 Genen und Expressed Sequence Tags die nach APN/CD13-Überexpression differentiell regulierten Gene zu identifizieren. Die differentielle Genexpression wurde mit zusätzlichen Methoden wie Real-Time RT-PCR, FACS-Analyse oder Western Blotting in den hergestellten Transfektanten hinsichtlich ihrer endogenen Expression in Schilddrüsenkarzinomzelllinien oder Patientenmaterial verifiziert.

Unter 2.1.1 wurde dargestellt, dass in undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen die APN/CD13-Expression stärker ist als in den differenzierten Schilddrüsenkarzinomen, aber DPIV/CD26 ein umgekehrtes Verhalten zeigt. Die Microarray-Analyse ergab, dass in den APN/CD13-überexprimierenden Transfektanten die DPIV/CD26-Expression (0,3fach) im Vergleich zum FTC-133 wt (1,0fach) erniedrigt ist. Transfektion einer siRNA spezifisch für APN/CD13 in C643-Zellen, die eine hohe endogene APN/CD13-Expression aufweisen, erniedrigte die Expression von APN/CD13 und war in der Lage, die DPIV/CD26-mRNA-Expression zu erhöhen⁸². Abb. 11 zeigt die Silencingwirkung der ausgewählten für APN/CD13-spezifischen siRNA am Beispiel der APN/CD13-Transfektanten.

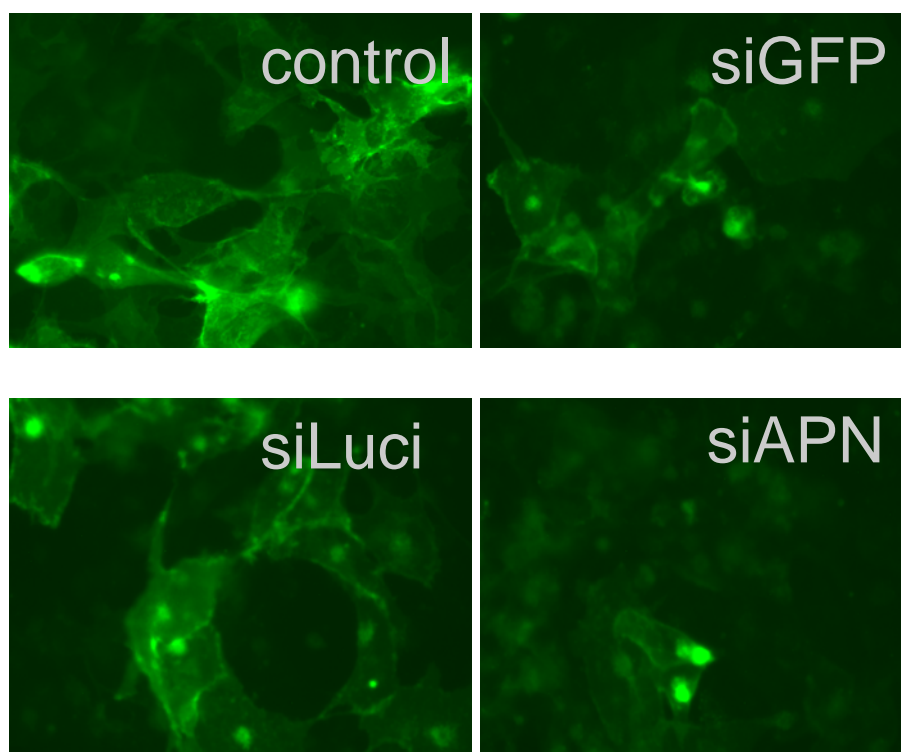


Abb. 11: Transfektion von siRNA spezifisch für Luciferase (siLuci; als Kontrolle mitgeführt), für GFP (siGFP) sowie für APN/CD13 in FTC-133 APN-GFP-Zellen. Die Kontrolltransfektion (control) erfolgte nur mit den Reagenzien aber ohne siRNA-Zugabe. In der Kontrolle wie auch nach Transfektion von Luciferase-spezifischer siRNA sieht man deutlich die membranständige APN/CD13-Färbung. Die siRNA spezifisch für GFP zeigt wie die siAPN-RNA einen Silencing-Effekt, da APN/CD13 als Fusionsprotein mit dem GFP exprimiert wird. Bei beiden siRNAs ist die membranständige APN/CD13-Expression schwächer, was mittels FACS-Analyse bestätigt werden konnte.

Des Weiteren wurden Gene verifiziert, die mit Steigerung/Inhibierung von Proliferation und Differenzierung in Beziehung gebracht werden. Mittels Real-Time RT-PCR konnte

bestätigt werden, dass in APN/CD13-transfizierten FTC-133-Zellen ME491/CD63 (0,37fach) bzw. NDRG1 (0,68fach) in ihrer Expression im Vergleich zur nicht transfizierten Kontrolle (1,0fach) erniedrigt sind⁸². Das Melanoma-assoziierte Antigen ME491/CD63 gehört zur Familie der Tetraspanine, kann mit Integrinen in Wechselwirkung treten und wird in Zusammenhang mit der Suppression von Tumorprogression und Metastasierung gebracht⁸³⁻⁸⁶. Das N-myc-Downstream-Regulated Gene-1 (NDRG-1) wurde ursprünglich als Gen identifiziert, das bei der zellulären Differenzierung exprimiert wird. In Tumoren ist die NDRG-1-Expression oft erniedrigt⁸⁷⁻⁹⁰. Transfektion einer APN/CD13-spezifischen siRNA bewirkte wie bei DPIV/CD26 schon beobachtet, die Steigerung der ME491/CD63- als auch der NDRG-1-mRNA-Expression in C643-Zellen. Die APN/CD13-assoziierte Erniedrigung der Expression von ME491/CD63 wie auch von NDRG-1 unterstützen die Hypothese, dass die APN/CD13-Expression bei der Schilddrüse mit Tumorprogression in Zusammenhang gebracht werden muss.

Nach APN/CD13-Überexpression differentiell-exprimierte Gene, die in der Microarray-Analyse detektiert und mit zusätzlichen Methoden verifiziert werden konnten, sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Nr.	Symbol	Name	Acc.-Nr.	Chip	QPCR	FACS/ West. Blot	Bemerkung
1	DPIV/ CD26	Dipeptidyl- peptidase IV	M80536	-14,7	0,31	0,65	Serin-Protease
2	Seprase	Fibroblast activation protein- α Seprase	U76833	-7,4	0,23	n.d.	Serin-Protease
3	Adlican	Adlican	AF245505	-4,1	0,1	n.d.	Zelladhäsions- protein
4	NDRG1	N-myc down- regulated gene-1	NM 006096	-2	0,68	n.d.	Differen- zierungs- marker
5	TAAL6	Tumor- assoziiertes Antigen L6	M90657	-4,5	0,30	n.d.	Transmembran 4 Superfamilie
6	ME491/ CD63	melanoma 1 antigen	NM 001780	-2	0,37	0,8	Transmembran 4 Superfamilie
7	BDKRB2	Bradykinin- rezeptor B2	NM 000623	27	12	↑	Signal- Transduktion
8	CD33	CD33 Antigen	NM 001772	18,2	4,4	2,13	Myeloisches Differen- zierungs- antigen
9	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	NM 005532	15,4	22,1	n.d.	Proliferations- marker
10	ALK	anaplastic lymphoma kinase	NM 004304	7,8	8,8	n.d.	Tyrosinkinase

Tab.2: Ausgewählte differentiell-exprimierte Gene nach APN/CD13-Überexpression in FTC 133-Zellen im Vergleich zu GFP-transfizierten Kontrollzellen.

Die Daten der Chip-Analyse zeigen die Änderungen der Fluoreszenzintensität der APN/CD13-Transfektanten zu den GFP-Transfektanten. Die Daten der Spalte Q-PCR stehen für Real-time-RT-PCR-Messungen, die die Änderungen der RNA-Expression des jeweiligen Gens im Vergleich zu wt FTC-133-Zellen (1,0) zeigen. Die Verifizierungen erfolgten in verschiedenen Klonen zu unterschiedlichen Kultivierungszeiten. Die Daten der FACS-Analyse stehen für Änderungen der mittleren Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolltransfektante. Ergebnisse der Western Blot-Analyse wurden mit einem Pfeil dargestellt.

Hinweis: Gene, die sowohl durch APN/CD13 als auch durch ATX reguliert werden, sind in Tab. 3 zusammengestellt.

Unter den APN/CD13-Targetgenen befindet sich eine Reihe von Genen, die mit Tumorprogression in Verbindung gebracht werden. Das Interferon- α -induzierbare Protein 27 (IFI-27) spielt eine Rolle bei der epithelialen Proliferation⁹¹, die Rezeptor-Tyrosin-Kinase ALK ist in Siganltransduktion, Proliferation und Apoptoseinhibition involviert⁹², der Bradykininrezeptor B2 kann das Tumorstadium modulieren⁹³, Adhican hat eine Funktion in der Zelladhäsion⁹⁴ und das Tumor-assoziierte Antigen L6 verstärkt die Invasivität⁹⁵.

Diese genannten Gene konnten erstmalig als APN/CD13-Targetgene identifiziert werden. Des Weiteren ist für diese APN/CD13-Zielgene noch keine Assoziation mit dem Schilddrüsenkarzinom beschrieben worden.

2.2 Autotaxin beim Schilddrüsenkarzinom

2.2.1 Expression und Regulation von Autotaxin beim Schilddrüsenkarzinom

Wie bei den Untersuchungen zur Expression von APN/CD13 wurden sowohl die follikulären Zelllinien FTC-133, FTC-236, FTC-238 sowie die papilläre Zelllinie BCPAP als differenzierte Zellen als auch die den undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen zuzuordnenden Linien SW1736, C643, 8305, 8505C hinsichtlich der ATX-mRNA-Expression mittels Real-Time RT-PCR analysiert. Es konnte in allen untersuchten Zelllinien ATX-mRNA nachgewiesen werden, wobei die undifferenzierten Zelllinien SW1736, C643 sowie 8505 die höchsten ATX-mRNA-Mengen aufwiesen. Quantifizierung der ATX-mRNA-Expression im Gewebematerial (je n = 10) von Patienten mit FTC, PTC bzw. UTC und als Vergleich mit Struma nodosa zeigte die höchsten ATX-Transkriptmengen in UTC, gefolgt von PTC und FTC. Die geringsten ATX-mRNA-Gehalte wurden im Strumen-Material gemessen⁹⁶. Hier fallen Parallelitäten zwischen der APN/CD13- und der ATX-Expression auf: beide Ektoenzyme können als *Marker der Dedifferenzierung* beim Schilddrüsenkarzinom diskutiert werden.

Untersuchungen der Regulation der ATX-Expression wurden mit der undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomzelllinie SW1736 durchgeführt. Die Zytokine IL-1 β , IL-4 und TGF- β bewirkten eine verringerte ATX-mRNA-Expression. Dagegen konnten EGF und bFGF die ATX-Transkription steigern⁹⁶.

2.2.2 Funktion von Autotaxin beim Schilddrüsenkarzinom

Um Informationen über die Funktion von ATX beim Schilddrüsenkarzinom zu bekommen, wurde die Zelllinie FTC-133 mit einem ATX-Expressionsvektor (pcDNA 3.1 V5-His) stabil transfiziert. Wie in der Einleitung dargelegt, wird ATX membranständig exprimiert, aber durch proteolytische Spaltung extrazellulär freigesetzt. So konnte in den ATX-überexprimierenden FTC-133-Transfektanten (FTC-133 ATX) das ATX-Protein im konzentrierten Zellkulturüberstand mittels Western Blotting mit einem ATX-spezifischen Antikörper (von Frau Dr. M. Stracke, Bethesda, USA zur Verfügung gestellt) detektiert werden. FTC-133 ATX-Zellen zeigten auch eine höhere LysoPLD-Aktivität, die mittels zweistufigen Enzymtests gemessen wurde, im Vergleich zu FTC-133 GFP-Kontroll-Transfektanten. Im konzentrierten Überstand wird erst LPC zu LPA und Cholin gespalten, das dann in der zweiten Stufe mittels Cholinoxidase/ Peroxidase in ein photometrisch detektierbares Chinonimin umgesetzt wird⁹⁶. Mittels Messung des Bromdesoxyuridin-Einbaus wurde die Proliferation der transfizierten Zellen über einen Zeitraum von 6 Tagen verfolgt. Es zeigte sich eine höhere Proliferationsrate bei den ATX-überexprimierenden FTC-133-Zellen im Vergleich zu den Kontrolltransfektanten⁹⁶.

ATX wurde ursprünglich als motilitätssteigerndes Molekül beim Melanoma identifiziert. Mittels Transwell-Migrationsassays wurde die Motilität der Transfektanten durch eine Membran mit einer Porengröße von 8 μm gemessen (Abb. 12). Die FTC-133 ATX-Zellen waren ca. 3mal schneller als die FTC-133 GFP-Kontrollzellen. Das bedeutet, dass ATX die autokrine Motilität steigert. Des Weiteren wurde die parakrine Wirkung von ATX auf verschiedene Target-Zellen getestet. ATX ist in der Lage, sowohl die Motilität der Zellen der Zelllinien FTC-133, -236 und -238 als auch der undifferenzierten Linie SW1736 zu steigern⁹⁶. Somit hat ATX nicht nur eine autokrine sondern auch eine parakrine Wirkung auf die Zellmotilität der Schilddrüsenkarzinomzellen.

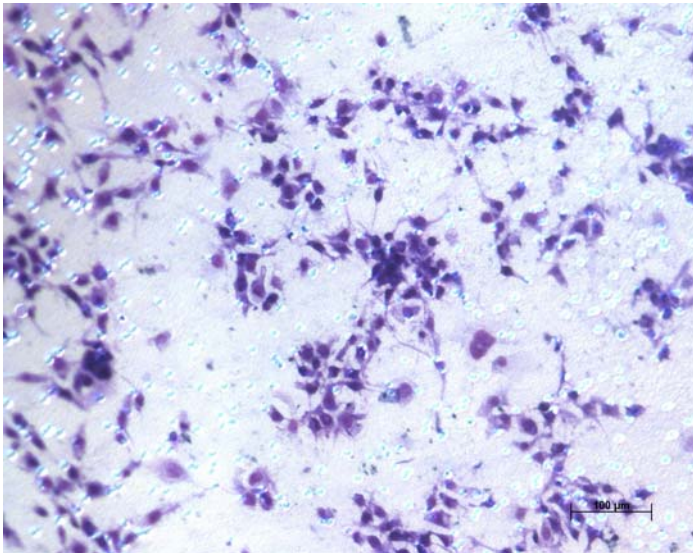


Abb. 12: Transwell-Migrationsassay: die Zellen wurden auf der Oberseite des Transwells eingesät und nach 24 h mittels Toluidinblau-Färbung auf der Unterseite der Membran angefärbt. Die 8 µm Poren der Membran sind als kleine hellblaue Löcher zu sehen.

Auch für ATX sollten Gene identifiziert werden, die in ihrem Expressionsverhalten nach Transfektion eines ATX-Expressionsvektors in die Zelllinie FTC-133 verändert sind. Als Screening-Methode wurde wie für APN/CD13 die unter 2.1.2 beschriebene Microarray-Analyse (Chip U133A) mittels Affymetrix-Technik durchgeführt.

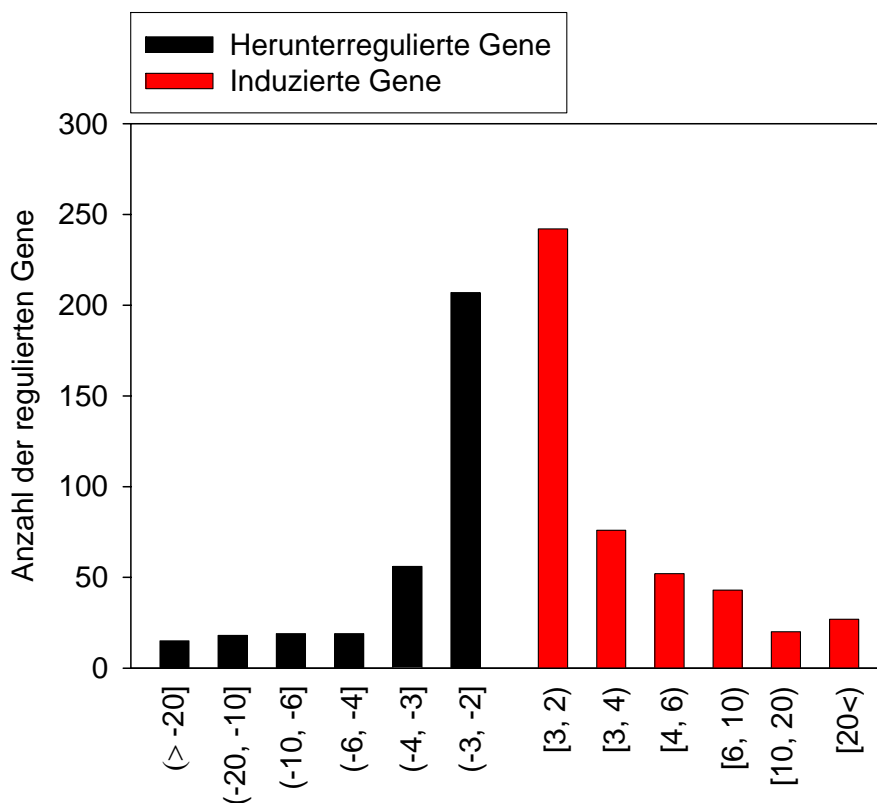


Abb. 13: Untersuchung der differentiellen Genexpression zwischen GFP-transfizierten und ATX-transfizierten FTC-133-Zellen (Array-Analyse mittels Affymetrix-Chip U133A): Verteilung der Anzahl der nach ATX-Überexpression regulierten Gene. Schwarz dargestellt sind herunterregulierte Gene, dagegen sind hochregulierte Gene rot dargestellt. Der Schwellenwert wurde bei einer zweifachen Veränderung der Expression gesetzt.

Die Überexpression von ATX induziert zahlreiche Veränderungen im Genexpressionsmuster im Vergleich zur Kontrolle. Es konnten 449 schwach regulierte Gene (Expressionsveränderung zwei- bis vierfach) sowie 42 stark regulierte Gene (über zwanzigfach) detektiert werden (Abb. 13). Nach den Ergebnissen der Chip-Analyse ist in den FTC-133 ATX-Transfektanten die ATX-mRNA sechsfach mehr vorhanden als in den FTC-133 GFP-Transfektanten. Quantifizierung der ATX-mRNA in den FTC-133-ATX-Zellen zu verschiedenen Zeiten in unterschiedlichen Klonen mittels Real-time RT-PCR ergaben eine Überexpression von 5- bis 20fach im Vergleich zu den Kontrolltransfektanten bzw. den wt FTC-133-Zellen.

Die Mikroarraydaten zeigten, dass ATX Veränderungen in der Expression von Interleukin (IL)-8 sowie von ICAM-1/CD54 hervorruft⁹⁶. Mittels quantitativer RT-PCR konnte bestätigt werden, dass in den ATX-überexprimierenden Zellen die mRNA-Menge

des Chemokins IL-8 2,5fach stärker ist als in den Kontrollzellen. Die erhöhte IL-8-Genaktivität könnte in der erhöhten LysoPLD-Aktivität begründet sein, da das LPC-Spaltprodukt LPA die Genexpression von pro-angiogenen Faktoren wie IL-8 oder VEGF aktivieren kann. Das „intercellular adhesion molecule“ ICAM-1/CD54 ist durch ATX in seiner Genaktivität erniedrigt (0,37fach) im Vergleich zur Kontrolle. Das Zelloberflächen-Glykoprotein ICAM-1/CD54 ist ein Adhäsionsmolekül und spielt bei Zell-Zell-Interaktionen eine Rolle. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass nach ATX-Transfektion in die FTC-133-Zellen, die Expression von Molekülen der Cancer-Testis-Antigen (CTA)-Familie GAGE verringert wird (Abb. 14).

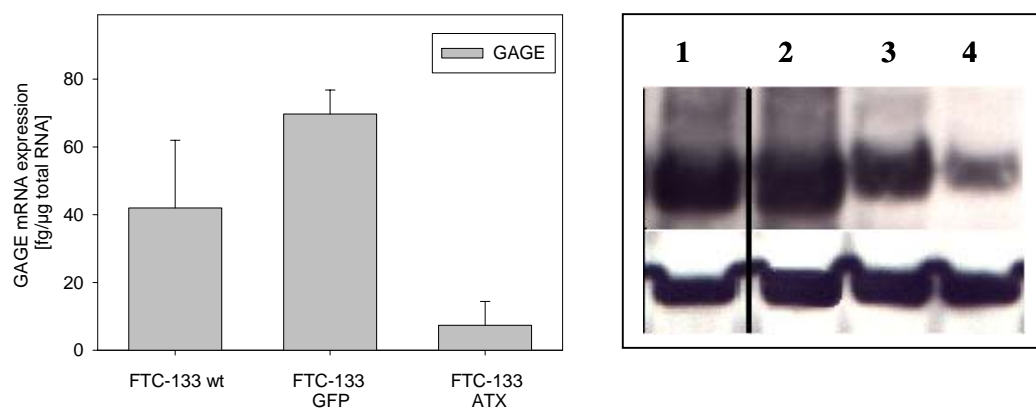


Abb. 14: Verringerung der Expression des Tumor-assoziierten Antigens GAGE nach ATX-Überexpression. *Linke Seite:* Messung der GAGE-mRNA-Expression mittels Real-Time RT-PCR in FTC-133 wt-Zellen sowie den transfizierten Zellen FTC-133 GFP und FTC-133 ATX. *Rechte Seite oben:* Zelllysate der myeloischen Kontrollzellen K562 (Spur 1), der FTC-133 wt-Zellen (Spur 2), der FTC-133 GFP-Kontrolltransfektanten und der FTC-133 ATX-Zellen wurde in einem 4-12%igen PAA-Gel aufgetrennt und mittels GAGE-7B-spezifischem Antikörper entwickelt. *Rechte Seite unten:* Detektion der Aktin-Expression als Nachweis der gleichen Gelbeladungsmengen.

Wie in Abb. 14 gezeigt, ist in FTC-133 wt-Zellen die Expression von GAGE auf RNA- und auf Proteinebene nachweisbar. Mit ATX-Überexpression und damit Zunahme von Proliferation, Motilität und Invasivität der FTC-133-Zellen wird die GAGE-Expression inhibiert. Die Funktion von den GAGE-Familienmitgliedern ist nicht bekannt, aber sie können als CTA durch autologe zytotoxische T-Zellen erkannt werden. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass ATX-exprimierende FTC-133-Zellen schlechter durch das Immunsystem erkennbar sind.

2.3 Gemeinsame APN/CD13- und ATX-spezifische Targetgene im Schilddrüsenkarzinom

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass beide Ektoenzyme sowohl APN/CD13 als auch ATX ein ähnliches Expressionsverhalten wie auch bei Überexpression ähnliche Wirkungen zeigen. Beide sind im UTC stärker exprimiert als im FTC oder PTC und beide zeigen nach Transfektion in die Zelllinie FTC-133, dass sie mit einer erhöhten Motilität und Invasivität assoziiert sind. Deshalb sollten Targetgene gefunden werden, die durch beide Ektoenzyme gemeinsam in ihrer Genaktivität verändert sind. Dazu wurden die Daten der Microarray-Analysen mit Hilfe der Software „Eva“ (Evaluierung von Affymetrix-Daten) miteinander verglichen. Die Software „Eva“ wurde in meiner Arbeitsgruppe von den Bioinformatikern I. Pöschl, S. Bongard, A. Groß und D. Esser im Rahmen mehrerer Praktika entwickelt. Nach ATX-Überexpression (794 ATX-regulierte Gene) sind weniger Gene insgesamt in ihrer Expression im Vergleich zu APN/CD13 (1168 APN/CD13-regulierte Gene) verändert. Gemeinsame APN/CD13- und ATX-Targetgene wurden mittel Real-Time-RT-PCR verifiziert. In die Verifizierung wurden zusätzlich stabile Transfektanten der Zelllinie FTC-133, die mit einem pTej-Expressionsvektor für lösliche APN/CD13 (sAPN; freundlicherweise von L. Vogel, Kopenhagen, Dänemark zur Verfügung gestellt)⁹⁷, einbezogen. Die erhaltenen FTC-133 sAPN-Zellen exprimieren APN/CD13 ohne die zytoplasmatische und die Membranverankerungsdomäne (Abb. 15).

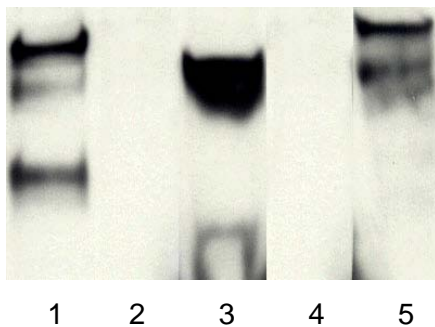


Abb. 15: Nachweis der Expression von membranständiger sowie von löslicher APN/CD13 mittels Western Blottings. Das Zelllysate der transfizierten Zellen FTC-133 APN-GFP sowie des konzentrierten Überstandes der Zellen FTC-133 sAPN wurde in einem 7 %igen PAA-Gel aufgetrennt und mittels APN/CD13-spezifischem Antikörper (Klon B-F10, Neomarkers) entwickelt. Spur 1, 5: Zelllysate von zwei unterschiedlichen APN/CD13-Klonen; Spur 2, 4: Zelllysate der FTC-133-GFP-Kontrollzellen; Spur 3: zehnfach konzentrierter Überstand der FTC-133 sAPN-Zellen. Die Expression des membranständigen APN/CD13-Proteins erfolgt in mehreren Glykosylierungsvarianten.

Die Untersuchungen mit den FTC-133 sAPN-Zellen sollten Einblicke in die möglichen Signalwege von APN/CD13 geben, nämlich ob die enzymatische Aktivität von APN/CD13 oder die membranverankerte Expression des Moleküls für die differentielle Genexpression verantwortlich sind. In Tab. 3 sind die verifizierten gemeinsamen APN/CD13- und ATX-Targetgene zusammengestellt.

Tab. 3: Ausgewählte gemeinsame APN/CD13- und ATX-Targetgene

Nr	Symbol	Name	Acc.-Nr.	Chip APN	Chip ATX	QPCR APN	QPCR sAPN	QPCR ATX	Bemerkung
1	TFF	Thyroid transcriptional factor-1	D50740	-2,37	-2,65	0,70	1,02	0,38	Transkriptionsfaktor Differenzierungs- marker
2	CNTN-6	Contactin-6	NM 014461	-14,5	-2,2	0,33	1,06	0,7	GPI-verankertes Protein, Zelladhäsion
3	LUM	Lumican	NM 002345	-17	-4,4	0,19	2,51	0,27	Proteoglykan, Interaktion mit Kollagen
4	S100	S100A3	NM 002960	-12	-10	0,55	0,54	0,34	Kalziumbindendes Protein
5	CRLF-1	Cytokine receptor-like factor	NM 004750	187	179	6,6	1,2	4,2	Signaltransduktion

Die Tabelle zeigt ausgewählte differentiiell exprimierte Gene, die sowohl nach APN/CD13- als auch nach ATX-Überexpression in FTC-133-Zellen im Vergleich zu GFP-transfizierten Kontrollzellen reguliert werden. Die Daten der Chip-Analyse zeigen die Änderungen der Fluoreszenzintensität der APN/CD13- bzw. ATX-Transfektanten zu den GFP-Transfektanten. Die Daten der Spalte Q-PCR stehen für Real-Time-PCR-Messungen, die die Änderungen der RNA-Expression des jeweiligen Gens in APN/CD13-Transfektanten, Transfektanten mit löslicher APN/CD13 (sAPN) und in ATX-Transfektanten im Vergleich zu FTC-133 GFP-Zellen (1,0) zeigen. Die Verifizierungen erfolgten in verschiedenen Klonen zu unterschiedlichen Kultivierungszeiten.

Als gemeinsames schilddrüsenpezifisches Targetgen, das sowohl nach APN/CD13 als auch nach ATX-Überexpression in seiner Expression verringert ist, konnte der schilddrüsenpezifische Transkriptionsfaktor (Thyroid transcriptional factor-1, TTF-1) detektiert werden. TTF-1 gilt neben Pax-8 als Hauptregulator der Schilddrüsendifferenzierung⁹⁸. Die Verringerung der TTF-1-Expression geht mit der Dedifferenzierung beim Schilddrüsenkarzinom einher. Im UTC ist TTF-1 oft nicht mehr

nachweisbar^{99,100}. Quantifizierungen der TTF-1-mRNA-Expression in Patientenmaterial bestätigten die geringe TTF-1-Genexpression (Abb. 16). Somit könnten APN/CD13 und ATX über die Inhibierung der TTF-1-Expression zur Dedifferenzierung beim Schilddrüsenkarzinom beitragen. Für die APN/CD13-vermittelte Änderung der Expression von TTF-1 scheint die enzymatische Aktivität von APN/CD13 nicht nötig zu sein, da Transfektion der löslichen APN/CD13 keine Änderung der TTF-1-mRNA-Menge hervorruft.

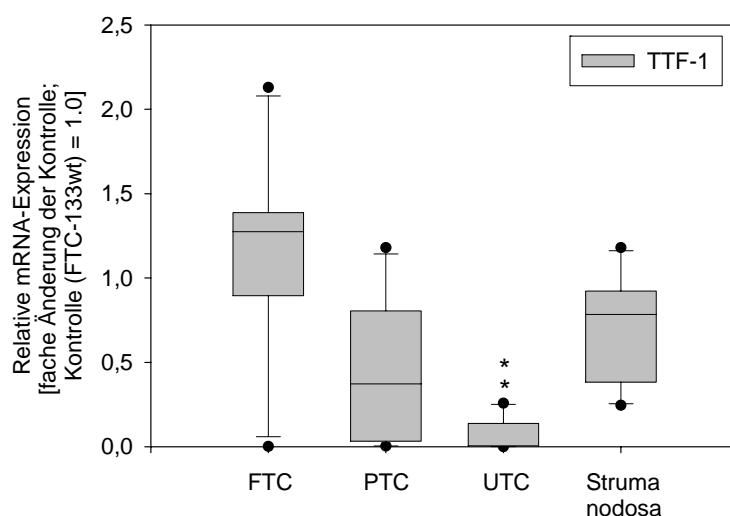


Abb. 16: Relative Quantifizierungen der TTF-1-mRNA-Expression in Patientenmaterial (FTC n = 8; PTC, UTC, Struma nodosa je n = 10) mittels Real-Time-PCR. Es werden die Änderungen der TTF-1-mRNA-Expression im Vergleich zur Zelllinie FTC-133 (1,0) angegeben. (** P < 0,01 im Vergleich zum Kontrollgewebe von Patienten mit Struma nodosa)

Als nicht-schilddrüsenspezifische Gene, aber sowohl durch APN/CD13 als auch durch ATX in ihrer Genaktivität regulierbar und in Zelladhäsions- und Interaktionsprozesse eingebunden, wurden Contactin-6 und Lumican verifiziert. Beide Moleküle sind nach Überexpression von APN/CD13 oder ATX in FTC-133-Zellen in ihrem RNA-Gehalt erniedrigt. Contactin-6 ist ein GPI-verankertes Membranprotein, das als neurales Adhäsionsmolekül beschrieben wurde¹⁰¹. Transfektion der löslichen APN/CD13 verursacht im Gegensatz zur membranständigen Variante keine Veränderung der Contactin-6-mRNA-Expression.

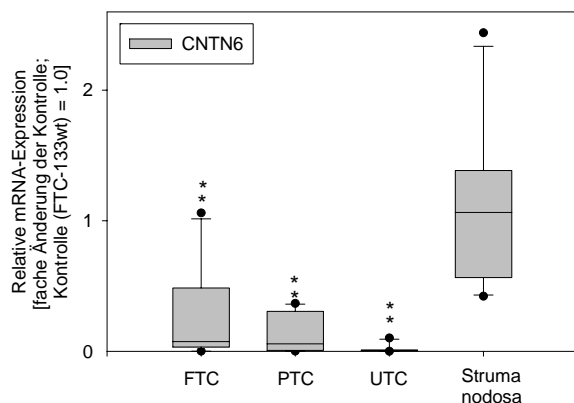


Abb.17: Relative Quantifizierungen der Contactin 6-mRNA-Expression in Patientenmaterial (je n = 10) mittels Real-time RT-PCR. Es werden die Änderungen der Contactin 6-mRNA-Expression im Vergleich zur Zelllinie FTC-133 (1,0) angegeben. (* P < 0,05; ** P < 0,01 im Vergleich zum Kontrollgewebe von Patienten mit Struma nodosa)

Erstmalig konnten wir zeigen, dass der Contactin 6-mRNA-Gehalt in Geweben von Patienten mit Schilddrüsenkarzinomen deutlich verringert ist im Vergleich zum Kontrollgewebe von Patienten mit Struma nodosa (Abb. 17). Des Weiteren ist die Contactin-mRNA-Expression im UTC signifikant geringer als die Expression in FTC und PTC. Somit könnte Contactin-6, erstmalig identifiziert als gemeinsames APN/CD13- und ATX-Targetgen, als neuer Marker für Schilddrüsenkarzinome diskutiert werden.

Lumican gehört zur Familie der kleinen Leuzin-reichen Proteoglykane. Eine verringerte Lumican-Expression im Tumor geht mit einer schlechteren Prognose einher^{102,103}. Transfektion der löslichen APN/CD13 verursacht im Gegensatz zur membranständigen Variante eine Erhöhung der Lumican-mRNA-Expression. Quantifizierungen der Lumican-mRNA-Expression in Patientenmaterial zeigten eine geringere Lumican-Genexpression im Kontrollgewebe Struma nodosa im Vergleich zum Patientenmaterial aus FTC, PTC und UTC. Diese Expressionsänderungen sind aber nicht signifikant und zeigen eine breite Streuung (Abb. 18).

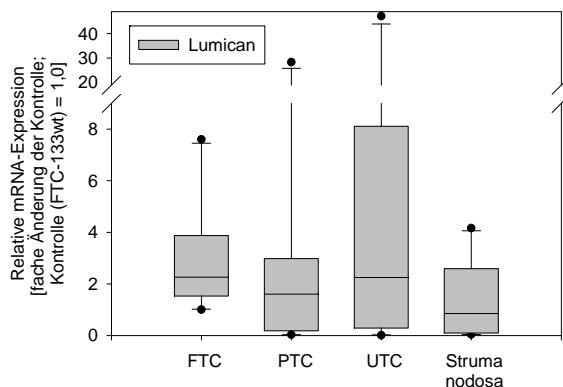


Abb.18: Relative Quantifizierungen der Lumican-mRNA-Expression in Patientenmaterial (je n = 10) mittels Real-time RT-PCR. Es werden die Änderungen der Lumican-mRNA-Expression im Vergleich zur Zelllinie FTC-133 (1,0) angegeben.

S100A3, ein Kalzium-bindendes Protein mit einem hohen Cystein-Anteil (10 von 101 Aminosäuren), ist ein weiteres gemeinsames APN/CD13- und ATX-Targetgen in FTC-133-Zellen, das in seiner Expression gegenüber den FTC-133 wt verringert wird. Interessanterweise scheint für die Regulation von S100A3 die enzymatische APN/CD13-Aktivität wichtig zu sein, da sowohl die membranständige Form von APN/CD13 als auch die lösliche Variante die S100A3-mRNA-Expression verringern. Über die S100A3-Funktion im Tumorgeschehen gibt es nur wenig Informationen. S100A3 ist im Astrozytom exprimiert¹⁰⁴ und zeigt eine inverse Korrelation zur Tumorprogression beim Mammakarzinom¹⁰⁵. Die Quantifizierung der S100A3-mRNA-Expression im Patientenmaterial zeigte eine erhöhte Expression in FTCs und UTCs (Abb. 19).

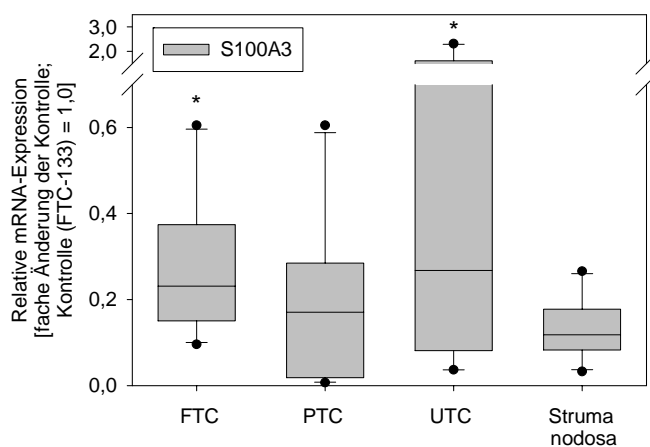


Abb.19: Relative Quantifizierungen der S100A3-mRNA-Expression in Patientenmaterial (je n = 10) mittels Real-time RT-PCR. Es werden die Änderungen der S100A3-mRNA-Expression im Vergleich zur Zelllinie FTC-133 (1,0) angegeben. (* P < 0,05 im Vergleich zum Kontrollgewebe von Patienten mit Struma nodosa)

Der „Cytokine receptor-like factor“ (CRLF1) konnte als einziges APN/CD13- und ATX-Targetgen, das in seiner Expression gegenüber den nicht transfizierten Kontrollzellen erhöht ist, detektiert werden. CRLF1 ist ein sezerniertes Protein, das Homologie zu den Zytokin-Typ-I-Rezeptoren zeigt. Rekombinantes CRLF zeigt die Tendenz zur Bildung von kovalent verbundenen Di- und Tetrameren, so dass eine Funktion als löslicher Rezeptor oder Teil eines Rezeptorkomplexes diskutiert wird¹⁰⁶. Es gibt bis jetzt keine Hinweise in der Literatur auf eine Funktion von CRLF1 im Tumorgeschehen. Wie in Abb. 20 dargestellt ist die CRLF1-mRNA-Expression in Geweben von Patienten mit FTC und UTC niedriger exprimiert als in PTC und im Kontrollgewebe. Die Daten zeigen allerdings eine breite Streuung, so dass für weiterführende Aussagen ein größeres Patientenkollektiv untersucht werden müsste.

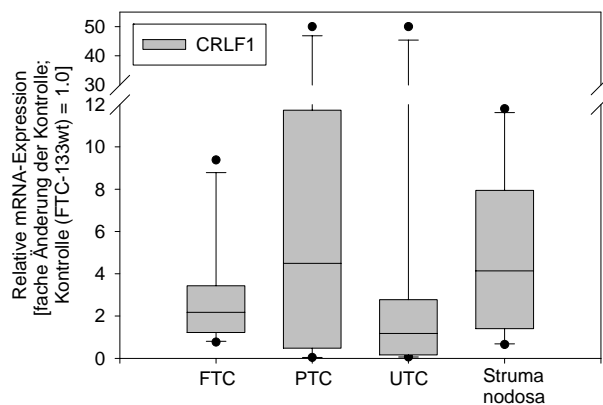


Abb. 20: Relative Quantifizierungen der CRLF1-mRNA-Expression in Patientenmaterial (je n = 10) mittels Real-time RT-PCR. Es werden die Änderungen der CRLF1-mRNA-Expression im Vergleich zur Zelllinie FTC-133 (1,0) angegeben.

3. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Ektoenzymen APN/CD13 und ATX hinsichtlich ihres Einflusses auf Dedifferenzierung, Invasivität und Transformation beim Schilddrüsenkarzinom. Unsere Untersuchungen sollten einen Beitrag zur Klärung der Rolle dieser Ektoenzyme im Prozess der Schilddrüsenkarzinogenese liefern. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl APN/CD13 als auch ATX in undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomzelllinien stärker exprimiert sind als in differenzierten Zelllinien. Ähnliche Daten wurden für die mRNA-Expression in Patientengewebe gewonnen. Dagegen zeigte die Ektopeptidase DPIV/CD26 ein umgekehrtes Verhalten. Für DPIV/CD26 war aus der Literatur bekannt und konnte durch eigene Daten bestätigt werden, dass sie in PTC und FTC stärker als in UTC und dem Kontrollgewebe Struma nodosa exprimiert ist. Aus diesen Ergebnissen wurde postuliert, dass es sich bei APN/CD13 und ATX um Marker der Dedifferenzierung beim Schilddrüsenkarzinom handelt und ihre Expression mit einer Tumorprogression einhergeht (Abb. 21).

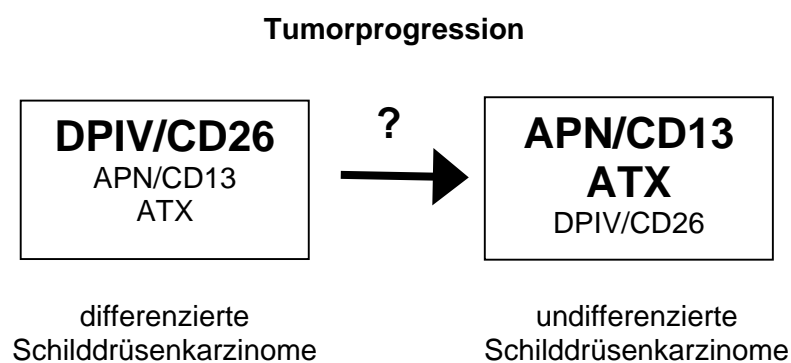


Abb. 21: Modell der Ektoenzym-Expression beim Schilddrüsenkarzinom.

Um Informationen über die Funktion von APN/CD13 und ATX im Schilddrüsenkarzinom zu gewinnen, wurden stabile Transfektanten der Zelllinie FTC-133, die sich durch einen geringen endogenen Gehalt der beiden Ektoenzyme auszeichnet, hergestellt. Nach Überexpression von APN/CD13 verhalten sich die Zellen motiler und invasiver, sind aber in ihrem Proliferationsverhalten nicht verändert. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass die APN/CD13-Überexpression mit einer veränderten Expression von Zelladhäsionsmolekülen (Adhican), Tetraspaninen (CD63, TAAL6) oder Differenzierungs- und Proliferationsmarkern (NDRG-1, IFI27) u. a. (siehe Tab. 2) assoziiert ist. Für alle diese Moleküle sind bisher in der Literatur noch keine Funktionen im Schilddrüsenkarzinom beschrieben. Interessanterweise konnte das Modell

in Abb. 21 bestätigt werden, denn die Überexpression von APN/CD13 geht mit einer Verringerung der DPIV/CD26-Genaktivität einher. FAP/Seprase, ebenfalls ein Mitglied der DPIV/CD26-Serin-Proteasefamilie, ist auch in seiner Expression erniedrigt. Zu Beginn unserer Untersuchungen ist bekannt gewesen, dass DPIV/CD26 in den differenzierten Formen des Schilddrüsenkarzinoms stark exprimiert ist. Über die Expression von FAP/Seprase im Schilddrüsenkarzinom gab es keine Daten. Bei der Migration von Fibroblasten sind DPIV/CD26 und FAP/Seprase in einem Komplex in den Invadopodien organisiert¹⁰⁷. Beim Mammakarzinom fördert FAP/Seprase das Wachstum der Zellen und verstärkt die Bildung von Gefäßen¹⁰⁸. Für APN/CD13 gibt es auch widersprüchliche Aussagen in der Literatur hinsichtlich ihrer Rolle im Tumorgeschehen. Beim Schilddrüsen-, Kolon-, Pankreas-, und Prostatakarzinom ist APN/CD13 mit Tumorprogression verbunden, wohingegen beim Ovarialkarzinom die Überexpression von APN/CD13 die Invasion in Matrigel unabhängig von der enzymatischen Aktivität inhibiert¹⁰⁹. Es liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die Funktion der entsprechenden Ektopeptidasen vom jeweiligen Zelltyp und wahrscheinlich auch vom Umgebungsmilieu beeinflusst wird. So ist APN/CD13 auf aktivierten Endothelzellen bei der Tumervaskularisierung stark exprimiert, dagegen auf ruhenden Endothelzellen nicht. Die endotheliale APN/CD13-Expression kann die Invasion und Morphogenese der exprimierenden Zellen beeinflussen^{30,110}.

Im Tumor ist die Inhibierung der Genexpression, also das Stilllegen von Genen, oft mit einer Hypermethylierung der CpG-Inseln im entsprechenden Promotor verbunden¹¹¹. Für DPIV/CD26 konnte kürzlich gezeigt werden, dass das Gen dieser Ektopeptidase in der Brustkrebszelllinie MCF-7 und auch in Tumormaterial von Patienten mit Brustkrebs hypermethyliert vorkommen kann. Behandlung der MCF-7-Zellen mit dem Demethylierungsmittel 5-Aza-2'-Deoxycytidin bewirkte die Reexpression von DPIV/CD26¹¹². Wie oben gezeigt ist beim Schilddrüsenkarzinom mit zunehmender Dedifferenzierung die Expression von DPIV/CD26 verringert. Eigene unveröffentlichte Daten zeigen, dass bei der undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomzelllinie Hth74 CpG-Inseln im DPIV/CD26-Promotor hypermethyliert sind und deshalb die DPIV/CD26-Expression verringert ist. Nach Behandlung der Hth74-Zellen mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin konnte eine sechs- bis neunfache Steigerung der DPIV/CD26-mRNA-Expression quantifiziert werden. Somit gibt es Hinweise, dass die verringerte DPIV/CD26-Expression beim UTC durch eine Hypermethylierung im Promotor begründet sein kann.

Bei Überexpression von ATX in der Zelllinie FTC-133 zeigten die Transfektanten wie die APN/CD13-Transfektanten eine höhere Invasivität, eine verstärkte Proliferation, und ATX stimulierte die autokrine und parakrine Motilität von Tumorzellen. ATX ist wie APN/CD13 in die differentielle Genexpression von bisher funktionell nicht mit dem Schilddrüsenkarzinom assoziierten Genen involviert, wobei die bekannt gewordenen Funktionen des Genprodukts in jedem Fall für das Tumorwachstums- oder Metastasierungsverhalten von Bedeutung sind. So ist die Expression des Chemokins IL-8 erhöht, aber die des Adhäsionsmoleküls ICAM1/CD54 erniedrigt. Ebenfalls verringert ist die Genexpression von Mitgliedern der GAGE-Familie (GAGE2-7), die zu den Tumor-assoziierten Antigenen gehören und durch autologe zytotoxische T-Zellen erkannt werden können und deshalb tumor-immunologisch gesehen interessante Moleküle darstellen. Untersuchungen von Anja Seifert aus meiner Arbeitsgruppe zeigten, dass die Überexpression von ATX in der Zelllinie FTC-238 zu einer Erhöhung der GAGE-Expression führt. Bei FTC-133 handelt es sich um Zellen eines Patienten mit einem primären FTC, bei FTC-238 um eine Lungenmetastase des rezidierten Tumors des gleichen Patienten. Andere Tumor-assoziierte Antigene wie MAGE-A1 und BAGE sind nach ATX-Transfektion in FTC-238 auch erhöht (A.S., unveröffentlicht). Offensichtlich gibt es funktionelle Unterschiede von ATX in der Primärzelllinie FTC-133 und ihrer Metastase FTC-238 hinsichtlich der Regulation von Tumor-assoziierten Antigenen. Die unterschiedliche Expression von Cancer-Testis-Antigenen wie MAGE, GAGE und BAGE könnte Konsequenzen für die Therapie haben. Für MAGE und GAGE konnte gezeigt werden, dass ihre Überexpression mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika wie Paclitaxel und Doxorubicin verbunden ist, dagegen trat bei Topotecan und Cisplatin kein Resistenzphänomen auf¹³.

Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen war es, gemeinsame Zielgene von APN/CD13 und ATX beim Schilddrüsenkarzinom zu identifizieren, um die Pathogenese dieser Erkrankung besser verstehen zu können. Als gemeinsame APN/CD13 und ATX-Targetgene konnten der schilddrüsen-spezifische Transkriptionsfaktor TTF1, das GPI-verankerte Contactin-6, das Adhäsionsmolekül Lumican, das Kalzium-bindende Protein S100A3 sowie der Cytokin receptor-like Factor identifiziert und verifiziert werden. Nur für TTF-1 gibt es unter den APN/CD13- und ATX-Targetgenen bis jetzt eine Beschreibung in der Pathogenese des Schilddrüsenkarzinoms. TTF-1 ist ein 38 kDa

großes nukleäres Protein, das die Transkription von schilddrüsen-spezifischen Genen wie Thyreoglobulin und Thyroperoxidase aktiviert. TTF-1 spielt bei der frühen Differenzierung und Morphogenese der sich entwickelnden Lunge und Schilddrüse eine Rolle und gilt als Marker beim Lungenkarzinom, da eine starke TTF-1-Expression mit einer besseren Prognose korreliert^{114,115}. Die Überexpression von APN/CD13 sowie von ATX verursacht eine Inhibierung der TTF-1-Expression, die dann die verringerte Expression schilddrüsenspezifischer Gene zur Folge hat. Über diesen mehrstufigen Prozess könnten APN/CD13 und ATX zu Dedifferenzierung und Tumorprogression beim Schilddrüsenkarzinom beitragen (Abb. 22).

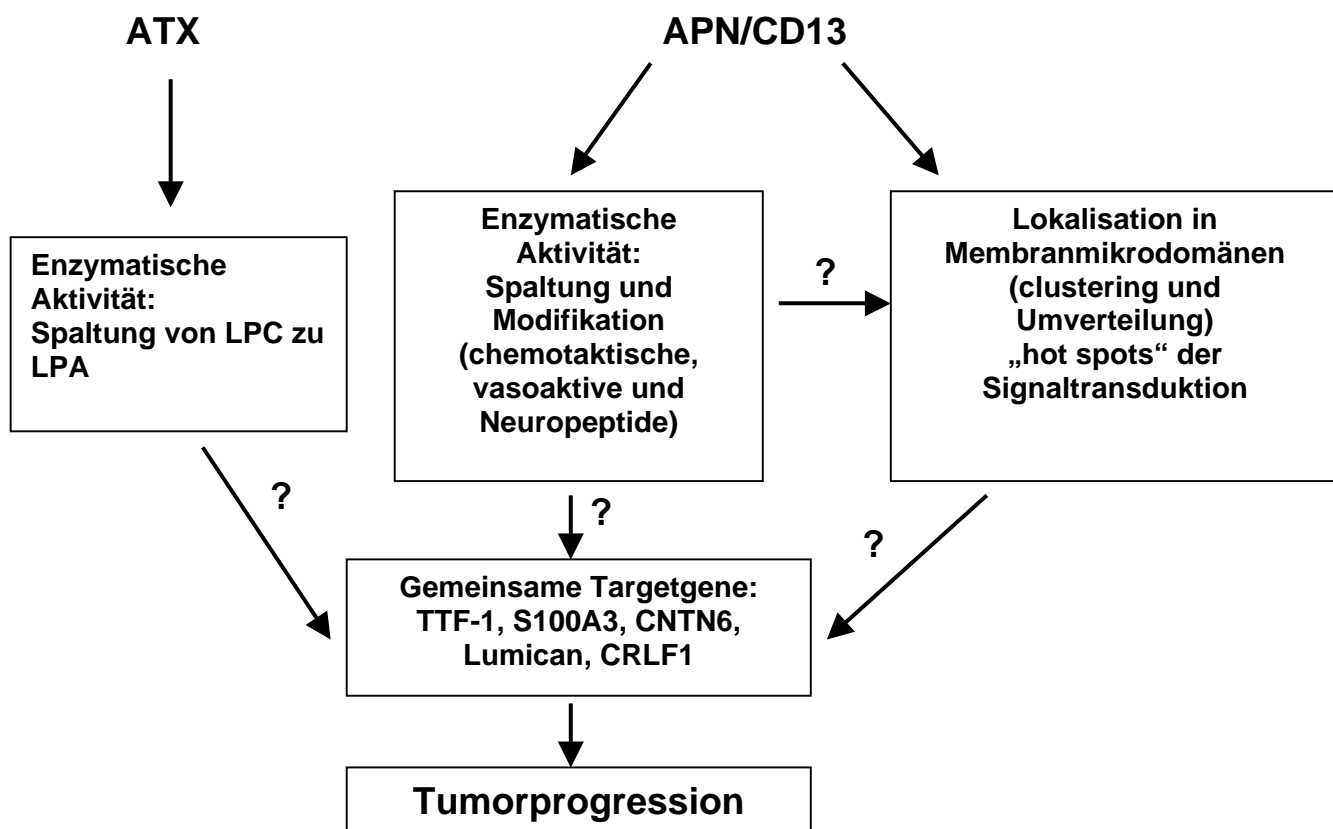


Abb. 22: Modell der Funktion von APN/CD13 und ATX beim Schilddrüsenkarzinom

Ektoenzyme können auf mindestens zwei Wegen in die Regulation von Signalprozessen und Genaktivität eingreifen. Auf der einen Seite kann das durch ihre enzymatische Aktivität erfolgen, die die Spaltung und Modifikation von Substraten bewirkt. Auf der anderen Seite kann eine direkte Signaltransduktion über die Ektoenzyme vermittelt werden. Für APN/CD13 könnten beide Seiten, wie in Abb. 22 dargestellt, in Betracht

gezogen werden. Die enzymatische Aktivität von APN/CD13 scheint für die differentielle Expression von S100A3 wichtig zu sein, da sowohl die membranständige als auch die lösliche APN/CD13 nach Transfektion in FTC-133-Zellen die Herunterregulation des Targetgens bewirken. Eine direkte Signalwirkung könnte durch die Lokalisation des Ektoenzym in Membranmikrodomänen erfolgen. Membranmikrodomänen zeichnen sich durch eine selektive Anreicherung von Glykosphingolipiden, Sphingomyelin und Cholesterol aus. Außerdem zeigen sie eine Anreicherung von GPI-verankerten Membranmolekülen, Molekülen der Signaltransduktionskaskaden sowie Kalziumkanälen und sind somit an der Organisation und Kompartimentierung von Signalwegen beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass Contactin/F3 als GPI-verankertes Glykoprotein mit Membranmikrodomänen assoziiert ist¹¹⁶. Contactin-6, ebenfalls ein GPI-verankertes Molekül und aus der gleichen Familie stammend, ist ein Targetgen von APN/CD13. Für APN/CD13 konnte eine Assoziation mit Membranmikrodomänen bei Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten und Monozyten nachgewiesen werden^{117,118}. In Monozyten bewirken APN/CD13-spezifische Antikörper eine Freisetzung von intrazellulärem Kalzium sowie die Phosphorylierung von MAP-Kinasen¹¹⁹. Da APN/CD13 nur einen kurzen intrazellulären Teil aus acht Aminosäuren mit einem Tyrosin an fünfter Stelle enthält, ist die direkte Verbindung von APN/CD13 und Signaltransduktion nur über einen „cross talk“ in den Membranmikrodomänen denkbar. Als ein spezifisches APN/CD13-Targetgen konnte der Bradykininrezeptor B2 mit einer verstärkten Expression in FTC-133 APN-GFP-Zellen detektiert werden (Tab. 2). Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Bradykininrezeptors bewirkt eine Lokalisation in Membranmikrodomänen sowie induziert Signalantworten wie die Aktivierung der PLC γ und die Freisetzung von Kalzium-Ionen, die über den EGF-Rezeptor vermittelt werden. Als Adaptor zwischen Bradykininrezeptor und EGF-Rezeptor fungiert die Src-Kinase¹²⁰. Somit spielen Membranmikrodomänen, in denen auch Ektoenzyme wie APN/CD13 lokalisiert sein können, bei der Organisation von Signalkomplexen eine essentielle Rolle. Für ATX gibt es bis jetzt keinen Hinweis, dass dieses Ektoenzym in Membranmikrodomänen lokalisiert sein kann. Anja Seifert aus meiner Arbeitsgruppe hat die Expression von ATX nach stabiler Transfektion in die Zelllinie FTC-238 untersucht. Sie wies nach, dass zwar Flotillin-2 als Markermolekül in den Membranmikrodomänen zu finden ist, aber ATX nicht. Damit ist wahrscheinlich ATX nach Transfektion in die Zelllinie FTC-133 auch nicht mit Membranmikrodomänen

assoziiert. Es wird deshalb vermutet, dass Veränderungen in der Genexpression nach ATX-Überexpression über die enzymatische Aktivität erfolgen (Abb. 22).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Ektoenzyme APN/CD13 und ATX zeigen ebenfalls nach Überexpression eine Beeinflussung von Zellmotilität und differentieller Genexpression. Dieses Wissen um neu identifizierte Zielgene, die in der Pathogenese des Schilddrüsenkarzinoms eine Rolle spielen, könnte zur Entwicklung eines Schilddrüsenkarzinom-spezifischen Microarrays genutzt werden. Diese Microarrays oder Biochips könnten auf der einen Seite bei der Karzinom-Klassifizierung und auf der anderen Seite bei der Pharmakogenomik Anwendung finden. Die Analyse von Genexpressionsmustern könnte mit dem Ansprechen oder Nichtansprechen auf eine Therapie korreliert werden und damit individuelle Reaktionen auf Therapeutika beurteilt werden. Auf diese Weise wäre es möglich, Forschungsergebnisse in klinisch relevante Informationen zu verwandeln.

4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Ektoenzyme Aminopeptidase N und Autotaxin hinsichtlich ihres Einflusses auf Dedifferenzierung, Invasivität und Transformation beim Schilddrüsenkarzinom untersucht. **Aminopeptidase N (APN)/CD13 (EC 3.4.11.2)** ist eine Ektopeptidase mit einem Zink-abhängigen aktiven Zentrum, die im Tumorgeschehen mit Tumorinvasion, Metastasierung und Angiogenese in Zusammenhang gebracht wird. Durch APN/CD13 ist bei Endothelzellen ein Tumor-gerichtetes Targeting möglich. Die enzymatische Aktivität löslicher APN/CD13 ist u.a. im Serum von Tumorpatienten erhöht. Über die Rolle von APN/CD13 beim Schilddrüsenkarzinom gab es keinerlei Informationen vor den hier vorgelegten Untersuchungen. **Autotaxin (ATX)** ist ein Membran-Ektoenzym, das ursprünglich als Motilitäts-steigerndes Protein beim Melanom beschrieben wurde. ATX besitzt neben Phosphodiesterase I/Nukleotidpyrophosphatase-Aktivität auch Lysophospholipase-D-Aktivität und kann Lysophosphatidylcholin (LPC) zu Lysophosphatidsäure (LPA) spalten. Über die Expression, Regulation und Funktion von ATX bei Schilddrüsenkarzinomen existierten zu Beginn der Arbeit ebenfalls keine Daten.

Eigene Untersuchungen mit kultivierten differenzierten Schilddrüsenkarzinomzelllinien (FTC-133, -236, -238) ergaben, dass diese Zellen kaum APN/CD13 exprimieren. Ein umgekehrtes Verhalten zeigen die undifferenzierten Linien C643, SW1736, die eine sehr starke Expression von APN/CD13 aufweisen. Untersuchungen der APN/CD13-mRNA-Expression in Geweben von Patienten mit Schilddrüsenkarzinom bzw. Struma nodosa bestätigen die verstärkte APN/CD13-mRNA-Expression in undifferenzierten vs. differenzierten Karzinomgeweben. FTC-133 Zellen, die stabil ein APN-GFP-Fusionskonstrukt exprimieren, zeigen eine höhere Motilität und die verstärkte Fähigkeit zum „anchorage-independent“ Wachstum im Vergleich zu den Kontrollzellen, die mit einem GFP-Kontrollvektor transfiziert wurden. Untersuchungen der differentiellen Genexpression nach Überexpression von APN/CD13 mittels Microarray (Affymetrix-Chip U133A) ergaben eine Vielzahl von Genen, die sowohl in ihrer Expression verstärkt als auch erniedrigt werden u.a. Ektoproteasen (Dipeptidylpeptidase IV/CD26, Seprase), Tumor-assoziierte Antigene (Tumorassoziiertes Antigen L6), Zelladhäsionsmoleküle (Adhican), Marker der Differenzierung (NDRG-1, CD33), Signaltransduktionsmoleküle

(Bradykininrezeptor B2, Anaplastische Lymphomkinase). Knock-down der endogenen APN/CD13-Expression mittels siRNA in C643-Zellen, die eine hohe endogene APN/CD13-Expression aufweisen, führt zu einer erhöhten Expression von DPIV/CD26, CD63 und NDRG-1.

Für ATX konnte wie für APN/CD13 gezeigt werden, dass dieses Molekül verstärkt in undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen exprimiert ist. Überexpression von ATX in FTC-133-Zellen resultiert in einer erhöhten Proliferation, einer Verstärkung der autokrinen und parakrinen Motilität von Tumorzellen und ist ebenfalls mit differentieller Genexpression verknüpft. ATX-Überexpression verursacht die mRNA-Erhöhung des chemotaktisch wirkenden und Angiogenese-stimulierenden Zytokins IL-8, dagegen ist die Expression des Adhäsionsmoleküls CD54/ICAM vermindert.

Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass sowohl APN/CD13 als auch ATX als Marker der Dedifferenzierung beim Schilddrüsenkarzinom diskutiert werden müssen. Beide Ektoenzyme sind mit einer Tumorprogression assoziiert. Diese Schlussfolgerungen werden durch das erstmalige Auffinden und Verifizieren gemeinsamer APN/CD13- und ATX-Targetgene wie das GPI-verankerte Protein Contactin-6, das Zelladhäsionsmolekül Lumican, das Kalzium-bindende Protein S100 A3 und der Cytokin Rezeptor-Like Factor gestützt. Besonders interessant ist Contactin-6, da dessen Expression im Gewebematerial von Patienten mit Schilddrüsenkarzinom deutlich verringert ist im Vergleich zum Kontrollgewebe von Patienten mit Struma nodosa. Somit kann Contactin-6 als neuer Marker beim Schilddrüsenkarzinom diskutiert werden. Als gemeinsames Zielgen konnte ebenfalls der schilddrüsenspezifische Transkriptionsfaktor TTF-1 identifiziert werden, der nach Überexpression von APN/CD13 sowie von ATX verringert exprimiert wird. Über TTF-1 könnten APN/CD13 und ATX in einem mehrstufigen Prozess der Schilddrüsenkarzinogenese zu Dedifferenzierung und Tumorprogression beim Schilddrüsenkarzinom beitragen.

Die vorliegenden Analysen zeigen die funktionelle Bedeutung von Ektoenzymen wie APN/CD13 und ATX hinsichtlich der Pathogenese beim Schilddrüsenkarzinom. Offen sind aber noch Fragen hinsichtlich der endogenen Substrate von APN/CD13, der Signalweiterleitung von der Zellmembran zum Zellkern sowie der Regulation der Ektoenzymexpression beim Schilddrüsenkarzinom.

5. Literatur

1. Gimm, O. Thyroid cancer. *Cancer Lett.*, 163: 143-156, 2001.
2. Hooper, N. M. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.*, 354: 1-6, 1994.
3. Look, A. T., Ashmun, R. A., Shapiro, L. H., and Peiper, S. C. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J.Clin.Invest*, 83: 1299-1307, 1989.
4. Riemann, D., Kehlen, A., and Langner, J. CD13--not just a marker in leukemia typing. *Immunol.Today*, 20: 83-88, 1999.
5. Syrjala, M., Ruutu, T., and Jansson, S. E. A flow cytometric assay of CD34-positive cell populations in the bone marrow. *Br.J.Haematol.*, 88: 679-684, 1994.
6. Spits, H., Lanier, L. L., and Phillips, J. H. Development of human T and natural killer cells. *Blood*, 85: 2654-2670, 1995.
7. Lendeckel, U., Wex, T., Reinhold, D., Kahne, T., Frank, K., Faust, J., Neubert, K., and Ansorge, S. Induction of the membrane alanyl aminopeptidase gene and surface expression in human T-cells by mitogenic activation. *Biochem.J.*, 319 (Pt 3): 817-821, 1996.
8. Lendeckel, U., Wex, T., Kahne, T., Frank, K., Reinhold, D., and Ansorge, S. Expression of the aminopeptidase N (CD13) gene in the human T cell lines HuT78 and H9. *Cell Immunol.*, 153: 214-226, 1994.
9. Riemann, D., Gohring, B., and Langner, J. Expression of aminopeptidase N/CD13 in tumour-infiltrating lymphocytes from human renal cell carcinoma. *Immunol.Lett.*, 42: 19-23, 1994.
10. Riemann, D., Schwachula, A., Hentschel, M., and Langner, J. Demonstration of CD13/aminopeptidase N on synovial fluid T cells from patients with different forms of joint effusions. *Immunobiology*, 187: 24-35, 1993.
11. Shapiro, L. H., Ashmun, R. A., Roberts, W. M., and Look, A. T. Separate promoters control transcription of the human aminopeptidase N gene in myeloid and intestinal epithelial cells. *J.Biol.Chem.*, 266: 11999-12007, 1991.
12. Olsen, J., Laustsen, L., Karnstrom, U., Sjostrom, H., and Noren, O. Tissue-specific interactions between nuclear proteins and the aminopeptidase N promoter. *J.Biol.Chem.*, 266: 18089-18096, 1991.
13. Kehlen, A., Olsen, J., Langner, J., and Riemann, D. Increased lymphocytic aminopeptidase N/CD13 promoter activity after cell-cell contact. *J.Cell Biochem.*, 80: 115-123, 2000.
14. Olsen, J., Kokholm, K., Troelsen, J. T., and Laustsen, L. An enhancer with cell-type dependent activity is located between the myeloid and epithelial aminopeptidase N (CD 13) promoters. *Biochem.J.*, 322 (Pt 3): 899-908, 1997.
15. Larsen, S. L., Pedersen, L. O., Buus, S., and Stryhn, A. T cell responses affected by aminopeptidase N (CD13)-mediated trimming of major histocompatibility complex class II-bound peptides. *J.Exp.Med.*, 184: 183-189, 1996.
16. Mizutani, S., Goto, K., Nomura, S., Ino, K., Goto, S., Kikkawa, F., Kurauchi, O., Goldstein, G., and Tomoda, Y. Possible action of human placental aminopeptidase N in feto-placental unit. *Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol.*, 82: 65-80, 1993.
17. Reaux, A., de Mota, N., Zini, S., Cadel, S., Fournie-Zaluski, M. C., Roques, B. P., Corvol, P., and Llorens-Cortes, C. PC18, a specific aminopeptidase N inhibitor, induces vasopressin release by increasing the half-life of brain angiotensin III. *Neuroendocrinology*, 69: 370-376, 1999.
18. Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L. K., Sjostrom, H., Noren, O., and Laude, H. Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature*, 357: 417-420, 1992.

19. Yeager, C. L., Ashmun, R. A., Williams, R. K., Cardellicchio, C. B., Shapiro, L. H., Look, A. T., and Holmes, K. V. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*, *357*: 420-422, 1992.
20. Kontoyiannis, D. P., Pasqualini, R., and Arap, W. Aminopeptidase N inhibitors and SARS. *Lancet*, *361*: 1558, 2003.
21. Yu, X. J., Luo, C., Lin, J. C., Hao, P., He, Y. Y., Guo, Z. M., Qin, L., Su, J., Liu, B. S., Huang, Y., Nan, P., Li, C. S., Xiong, B., Luo, X. M., Zhao, G. P., Pei, G., Chen, K. X., Shen, X., Shen, J. H., Zou, J. P., He, W. Z., Shi, T. L., Zhong, Y., Jiang, H. L., and Li, Y. X. Putative hAPN receptor binding sites in SARS_CoV spike protein. *Acta Pharmacol.Sin.*, *24*: 481-488, 2003.
22. Hashida, H., Takabayashi, A., Kanai, M., Adachi, M., Kondo, K., Kohno, N., Yamaoka, Y., and Miyake, M. Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterology*, *122*: 376-386, 2002.
23. Ikeda, N., Nakajima, Y., Tokuhara, T., Hattori, N., Sho, M., Kanehiro, H., and Miyake, M. Clinical significance of aminopeptidase N/CD13 expression in human pancreatic carcinoma. *Clin.Cancer Res.*, *9*: 1503-1508, 2003.
24. Ishii, K., Usui, S., Sugimura, Y., Yoshida, S., Hioki, T., Tatematsu, M., Yamamoto, H., and Hirano, K. Aminopeptidase N regulated by zinc in human prostate participates in tumor cell invasion. *Int.J.Cancer*, *92*: 49-54, 2001.
25. Ishii, K., Usui, S., Yamamoto, H., Sugimura, Y., Tatematsu, M., and Hirano, K. Decreases of metallothionein and aminopeptidase N in renal cancer tissues. *J.Biochem.(Tokyo)*, *129*: 253-258, 2001.
26. Saiki, I., Fujii, H., Yoneda, J., Abe, F., Nakajima, M., Tsuruo, T., and Azuma, I. Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. *Int.J.Cancer*, *54*: 137-143, 1993.
27. Menrad, A., Speicher, D., Wacker, J., and Herlyn, M. Biochemical and functional characterization of aminopeptidase N expressed by human melanoma cells. *Cancer Res.*, *53*: 1450-1455, 1993.
28. Fujii, H., Nakajima, M., Saiki, I., Yoneda, J., Azuma, I., and Tsuruo, T. Human melanoma invasion and metastasis enhancement by high expression of aminopeptidase N/CD13. *Clin.Exp.Metastasis*, *13*: 337-344, 1995.
29. Pasqualini, R., Koivunen, E., Kain, R., Lahdenranta, J., Sakamoto, M., Stryhn, A., Ashmun, R. A., Shapiro, L. H., Arap, W., and Ruoslahti, E. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.*, *60*: 722-727, 2000.
30. Bhagwat, S. V., Lahdenranta, J., Giordano, R., Arap, W., Pasqualini, R., and Shapiro, L. H. CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood*, *97*: 652-659, 2001.
31. Curnis, F., Sacchi, A., Borgna, L., Magni, F., Gasparri, A., and Corti, A. Enhancement of tumor necrosis factor alpha antitumor immunotherapeutic properties by targeted delivery to aminopeptidase N (CD13). *Nat Biotechnol*, *18*: 1185-1190, 2000.
32. Stracke, M. L., Krutzsch, H. C., Unsworth, E. J., Arestad, A., Cioce, V., Schiffmann, E., and Liotta, L. A. Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J.Biol.Chem.*, *267*: 2524-2529, 1992.
33. Goding, J. W., Terkeltaub, R., Maurice, M., Deterre, P., Sali, A., and Belli, S. I. Ecto-phosphodiesterase/pyrophosphatase of lymphocytes and non-lymphoid cells: structure and function of the PC-1 family. *Immunol.Rev.*, *161*: 11-26, 1998.

34. Lee, H. Y., Murata, J., Clair, T., Polymeropoulos, M. H., Torres, R., Manrow, R. E., Liotta, L. A., and Stracke, M. L. Cloning, chromosomal localization, and tissue expression of autotaxin from human teratocarcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *218*: 714-719, 1996.
35. Lee, H. Y., Clair, T., Mulvaney, P. T., Woodhouse, E. C., Aznavoorian, S., Liotta, L. A., and Stracke, M. L. Stimulation of tumor cell motility linked to phosphodiesterase catalytic site of autotaxin. *J.Biol.Chem.*, *271*: 24408-24412, 1996.
36. Deissler, H., Blass-Kampmann, S., Bruyneel, E., Mareel, M., and Rajewsky, M. F. Neural cell surface differentiation antigen gp130(RB13-6) induces fibroblasts and glioma cells to express astroglial proteins and invasive properties. *FASEB J.*, *13*: 657-666, 1999.
37. Yang, Y., Mou, L., Liu, N., and Tsao, M. S. Autotaxin expression in non-small-cell lung cancer. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, *21*: 216-222, 1999.
38. Nam, S. W., Clair, T., Campo, C. K., Lee, H. Y., Liotta, L. A., and Stracke, M. L. Autotaxin (ATX), a potent tumor motogen, augments invasive and metastatic potential of ras-transformed cells. *Oncogene*, *19*: 241-247, 2000.
39. Nam, S. W., Clair, T., Kim, Y. S., McMarlin, A., Schiffmann, E., Liotta, L. A., and Stracke, M. L. Autotaxin (NPP-2), a metastasis-enhancing motogen, is an angiogenic factor. *Cancer Res*, *61*: 6938-6944, 2001.
40. Umezu-Goto, M., Kishi, Y., Taira, A., Hama, K., Dohmae, N., Takio, K., Yamori, T., Mills, G. B., Inoue, K., Aoki, J., and Arai, H. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J.Cell Biol.*, *158*: 227-233, 2002.
41. Tokumura, A., Majima, E., Kariya, Y., Tominaga, K., Kogure, K., Yasuda, K., and Fukuzawa, K. Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J.Biol.Chem.*, *277*: 39436-39442, 2002.
42. Moolenaar, W. H. Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp.Cell Res*, *253*: 230-238, 1999.
43. Contos, J. J., Ishii, I., and Chun, J. Lysophosphatidic acid receptors. *Mol.Pharmacol.*, *58*: 1188-1196, 2000.
44. Clair, T., Aoki, J., Koh, E., Bandle, R. W., Nam, S. W., Ptaszynska, M. M., Mills, G. B., Schiffmann, E., Liotta, L. A., and Stracke, M. L. Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate. *Cancer Res.*, *63*: 5446-5453, 2003.
45. Koh, E., Clair, T., Woodhouse, E. C., Schiffmann, E., Liotta, L., and Stracke, M. Site-directed mutations in the tumor-associated cytokine, autotaxin, eliminate nucleotide phosphodiesterase, lysophospholipase D, and motogenic activities. *Cancer Res.*, *63*: 2042-2045, 2003.
46. Gijbers, R., Aoki, J., Arai, H., and Bollen, M. The hydrolysis of lysophospholipids and nucleotides by autotaxin (NPP2) involves a single catalytic site. *FEBS Lett.*, *538*: 60-64, 2003.
47. Koh, E., Clair, T., Woodhouse, E. C., Schiffmann, E., Liotta, L., and Stracke, M. Site-directed mutations in the tumor-associated cytokine, autotaxin, eliminate nucleotide phosphodiesterase, lysophospholipase D, and motogenic activities. *Cancer Res.*, *63*: 2042-2045, 2003.
48. Gijbers, R., Aoki, J., Arai, H., and Bollen, M. The hydrolysis of lysophospholipids and nucleotides by autotaxin (NPP2) involves a single catalytic site. *FEBS Lett.*, *538*: 60-64, 2003.

49. Zhang, G., Zhao, Z., Xu, S., Ni, L., and Wang, X. Expression of autotaxin mRNA in human hepatocellular carcinoma. *Chin Med.J.(Engl.)*, 112: 330-332, 1999.
50. Yang, S. Y., Lee, J., Park, C. G., Kim, S., Hong, S., Chung, H. C., Min, S. K., Han, J. W., Lee, H. W., and Lee, H. Y. Expression of autotaxin (NPP-2) is closely linked to invasiveness of breast cancer cells. *Clin.Exp.Metastasis*, 19: 603-608, 2002.
51. Euer, N., Schwirzke, M., Evtimova, V., Burtscher, H., Jarsch, M., Tarin, D., and Weidle, U. H. Identification of genes associated with metastasis of mammary carcinoma in metastatic versus non-metastatic cell lines. *Anticancer Res.*, 22: 733-740, 2002.
52. Stassar, M. J., Devitt, G., Brosius, M., Rinnab, L., Prang, J., Schradin, T., Simon, J., Petersen, S., Kopp-Schneider, A., and Zoller, M. Identification of human renal cell carcinoma associated genes by suppression subtractive hybridization. *Br.J.Cancer*, 85: 1372-1382, 2001.
53. Vanhoof, G., Goossens, F., De, M., I, Hendriks, D., and Scharpe, S. Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB J.*, 9: 736-744, 1995.
54. Yaron, A. and Naider, F. Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol.*, 28: 31-81, 1993.
55. Abbott, C. A., Baker, E., Sutherland, G. R., and McCaughan, G. W. Genomic organization, exact localization, and tissue expression of the human CD26 (dipeptidyl peptidase IV) gene. *Immunogenetics*, 40: 331-338, 1994.
56. Fleischer, B. CD26: a surface protease involved in T-cell activation. *Immunol.Today*, 15: 180-184, 1994.
57. Hegen, M., Niedobitek, G., Klein, C. E., Stein, H., and Fleischer, B. The T cell triggering molecule Tp103 is associated with dipeptidyl aminopeptidase IV activity. *J.Immunol.*, 144: 2908-2914, 1990.
58. Ulmer, A. J., Mattern, T., Feller, A. C., Heymann, E., and Flad, H. D. CD26 antigen is a surface dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) as characterized by monoclonal antibodies clone TII-19-4-7 and 4EL1C7. *Scand.J.Immunol.*, 31: 429-435, 1990.
59. Tiruppathi, C., Miyamoto, Y., Ganapathy, V., and Leibach, F. H. Genetic evidence for role of DPP IV in intestinal hydrolysis and assimilation of prolyl peptides. *Am.J.Physiol*, 265: G81-G89, 1993.
60. Pauly, R. P., Rosche, F., Wermann, M., McIntosh, C. H., Pederson, R. A., and Demuth, H. U. Investigation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide-(1-42) and glucagon-like peptide-1-(7-36) degradation in vitro by dipeptidyl peptidase IV using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. A novel kinetic approach. *J.Biol.Chem.*, 271: 23222-23229, 1996.
61. Holst, J. J., Deacon, C., Toft-Nielsen, M. B., and Bjerre-Knudsen, L. On the treatment of diabetes mellitus with glucagon-like peptide-1. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 865: 336-343, 1998.
62. De, Meesters., I, Korom, S., Van Damme, J., and Scharpe, S. CD26, let it cut or cut it down. *Immunol.Today*, 20: 367-375, 1999.
63. Van Damme, J., Struyf, S., Wuyts, A., Van Coillie, E., Menten, P., Schols, D., Sozzani, S., De, Meesters., I, and Proost, P. The role of CD26/DPP IV in chemokine processing. *Chem.Immunol.*, 72: 42-56, 1999.
64. Dang, N. H., Torimoto, Y., Schlossman, S. F., and Morimoto, C. Human CD4 helper T cell activation: functional involvement of two distinct collagen receptors, 1F7 and VLA integrin family. *J.Exp.Med.*, 172: 649-652, 1990.
65. Hanski, C., Huhle, T., and Reutter, W. Involvement of plasma membrane dipeptidyl peptidase IV in fibronectin- mediated adhesion of cells on collagen. *Biol.Chem.Hoppe Seyler*, 366: 1169-1176, 1985.

66. Hanski, C., Huhle, T., Gossrau, R., and Reutter, W. Direct evidence for the binding of rat liver DPP IV to collagen in vitro. *Exp.Cell Res.*, *178*: 64-72, 1988.
67. Loster, K., Zeilinger, K., Schuppan, D., and Reutter, W. The cysteine-rich region of dipeptidyl peptidase IV (CD 26) is the collagen-binding site. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, *217*: 341-348, 1995.
68. Morimoto, C. and Schlossman, S. F. The structure and function of CD26 in the T-cell immune response. *Immunol.Rev.*, *161*: 55-70, 1998.
69. Morrison, M. E., Vijayasaradhi, S., Engelstein, D., Albino, A. P., and Houghton, A. N. A marker for neoplastic progression of human melanocytes is a cell surface ectopeptidase. *J.Exp.Med.*, *177*: 1135-1143, 1993.
70. Cheng, H. C., Abedl-Ghany, M., Elble, R. C., and Pauli, B. U. Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV promotes adhesion and metastasis of rat breast cancer cells via tumor cell surface-associated fibronectin. *J.Biol.Chem.*, *273*: 24207-24215, 1998.
71. Morrison, M. E., Vijayasaradhi, S., Engelstein, D., Albino, A. P., and Houghton, A. N. A marker for neoplastic progression of human melanocytes is a cell surface ectopeptidase. *J.Exp.Med.*, *177*: 1135-1143, 1993.
72. Iwata, S. and Morimoto, C. CD26/dipeptidyl peptidase IV in context. The different roles of a multifunctional ectoenzyme in malignant transformation. *J.Exp.Med.*, *190*: 301-306, 1999.
73. Wesley, U. V., Albino, A. P., Tiwari, S., and Houghton, A. N. A role for dipeptidyl peptidase IV in suppressing the malignant phenotype of melanocytic cells. *J.Exp.Med.*, *190*: 311-322, 1999.
74. Wesley, U. V., Tiwari, S., and Houghton, A. N. Role for dipeptidyl peptidase IV in tumor suppression of human non small cell lung carcinoma cells. *Int.J.Cancer*, *109*: 855-866, 2004.
75. Wilson, M. J., Ruhland, A. R., Quast, B. J., Reddy, P. K., Ewing, S. L., and Sinha, A. A. Dipeptidylpeptidase IV activities are elevated in prostate cancers and adjacent benign hyperplastic glands. *J Andrology*, *21*: 220-226, 2000.
76. Sedo, A., Malik, R., and Krepela, E. Dipeptidyl peptidase IV in C6 rat glioma cell line differentiation. *Biol Chem*, *379*: 39-44, 1998.
77. Iwabuchi, H., Toriya, K., Mimura, T., Tamai, S., Ito, K., and Kato, H. Staining for dipeptidyl aminopeptidase IV activity in nodular thyroid diseases. *Acta Cytol*, *40*: 158-163, 1996.
78. Kotani, T., Aratake, Y., Ogata, Y., Umeki, K., Araki, Y., Hirai, K., Kuma, K., and Ohtaki, S. Expression of dipeptidyl aminopeptidase IV activity in thyroid carcinoma. *Cancer Lett*, *57*: 203-208, 1991.
79. Kotani, T., Kawano, J., Sukanuma, T., Hirai, K., Umeki, K., Aratake, Y., Konoe, K., and Ohtaki, S. Immunohistochemical localization of dipeptidyl aminopeptidase IV in thyroid papillary carcinoma. *Int J Exp Pathol*, *73*: 215-222, 1992.
80. Umeki, K., Tanaka, T., Yamamoto, I., Aratake, Y., Kotani, T., Sakamoto, F., Noguchi, S., and Ohtaki, S. Differential expression of dipeptidyl peptidase IV (CD26) and thyroid peroxidase in neoplastic thyroid tissues. *Endocr.J.*, *43*: 53-60, 1996.
81. Kholova, I., Ludvikova, M., Ryska, A., Topolcan, O., Pikner, R., Pecen, L., Cap, J., and Holubec, L., Jr. Diagnostic role of markers dipeptidyl peptidase IV and thyroid peroxidase in thyroid tumors. *Anticancer Res.*, *23*: 871-875, 2003.
82. Kehlen, A., Lendeckel, U., Dralle, H., Langner, J., and Hoang-Vu, C. Biological significance of aminopeptidase N/CD13 in thyroid carcinomas. *Cancer Res.*, *63*: 8500-8506, 2003.

83. Hotta, H., Hara, I., Miyamoto, H., and Homma, M. Overexpression of the human melanoma-associated antigen ME491 partially suppresses in vivo malignant phenotypes of H-ras-transformed NIH3T3 cells in athymic nude mice. *Melanoma Res*, 1: 125-132, 1991.
84. Kondoh, M., Ueda, M., Ichihashi, M., and Mishima, Y. Decreased expression of human melanoma-associated antigen ME491 along the progression of melanoma pre-canceroses to invasive and metastatic melanomas. *Melanoma Res*, 3: 241-245, 1993.
85. Radford, K. J., Mallesch, J., and Hersey, P. Suppression of human melanoma cell growth and metastasis by the melanoma-associated antigen CD63 (ME491). *Int.J.Cancer*, 62: 631-635, 1995.
86. Sordat, I., Decraene, C., Silvestre, T., Petermann, O., Auffray, C., Pietu, G., and Sordat, B. Complementary DNA arrays identify CD63 tetraspanin and alpha3 integrin chain as differentially expressed in low and high metastatic human colon carcinoma cells. *Lab Invest*, 82: 1715-1724, 2002.
87. Guan, R. J., Ford, H. L., Fu, Y., Li, Y., Shaw, L. M., and Pardee, A. B. Drg-1 as a differentiation-related, putative metastatic suppressor gene in human colon cancer. *Cancer Res*, 60: 749-755, 2000.
88. Piquemal, D., Joulia, D., Balaguer, P., Basset, A., Marti, J., and Commes, T. Differential expression of the RTP/Drg1/Ndr1 gene product in proliferating and growth arrested cells. *Biochim.Biophys.Acta*, 1450: 364-373, 1999.
89. van Belzen, N., Dinjens, W. N., Diesveld, M. P., Groen, N. A., van der Made, A. C., Nozawa, Y., Vlietstra, R., Trapman, J., and Bosman, F. T. A novel gene which is up-regulated during colon epithelial cell differentiation and down-regulated in colorectal neoplasms. *Lab Invest*, 77: 85-92, 1997.
90. van Belzen, N., Dinjens, W. N., Eussen, B. H., and Bosman, F. T. Expression of differentiation-related genes in colorectal cancer: possible implications for prognosis. *Histol.Histopathol.*, 13: 1233-1242, 1998.
91. Suomela, S., Cao, L., Bowcock, A., and Saarialho-Kere, U. Interferon alpha-inducible protein 27 (IFI27) is upregulated in psoriatic skin and certain epithelial cancers. *J.Invest Dermatol.*, 122: 717-721, 2004.
92. Pulford, K., Morris, S. W., and Turturro, F. Anaplastic lymphoma kinase proteins in growth control and cancer. *J.Cell Physiol*, 199: 330-358, 2004.
93. Wu, J., Akaike, T., Hayashida, K., Miyamoto, Y., Nakagawa, T., Miyakawa, K., Muller-Esterl, W., and Maeda, H. Identification of bradykinin receptors in clinical cancer specimens and murine tumor tissues. *Int.J.Cancer*, 98: 29-35, 2002.
94. Zou, T. T., Selaru, F. M., Xu, Y., Shustova, V., Yin, J., Mori, Y., Shibata, D., Sato, F., Wang, S., Oлару, A., Deacu, E., Liu, T. C., Abraham, J. M., and Meltzer, S. J. Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon. *Oncogene*, 21: 4855-4862, 2002.
95. Kao, Y. R., Shih, J. Y., Wen, W. C., Ko, Y. P., Chen, B. M., Chan, Y. L., Chu, Y. W., Yang, P. C., Wu, C. W., and Roffler, S. R. Tumor-associated antigen L6 and the invasion of human lung cancer cells. *Clin.Cancer Res.*, 9: 2807-2816, 2003.
96. Kehlen, A., Englert, N., Seifert, A., Klonisch, T., Dralle, H., Langner, J., and Hoang-Vu, C. Expression, regulation and function of autotaxin in thyroid carcinomas. *Int.J.Cancer*, 109: 833-838, 2004.
97. Thiele, K., Riemann, D., Kehlen, A., Lohn, M., Vogel, L. K., and Langner, J. Two transfected endothelial cell lines expressing high levels of membrane bound or soluble aminopeptidase N. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 421: 81-84, 1997.

98. Heldin, N. E. and Westermark, B. The molecular biology of the human anaplastic thyroid carcinoma cell. *Thyroidology.*, 3: 127-131, 1991.
99. Fabbro, D., Di Loreto, C., Beltrami, C. A., Belfiore, A., Di Lauro, R., and Damante, G. Expression of thyroid-specific transcription factors TTF-1 and PAX-8 in human thyroid neoplasms. *Cancer Res.*, 54: 4744-4749, 1994.
100. Ros, P., Rossi, D. L., Acebron, A., and Santisteban, P. Thyroid-specific gene expression in the multi-step process of thyroid carcinogenesis. *Biochimie*, 81: 389-396, 1999.
101. Ogawa, J., Kaneko, H., Masuda, T., Nagata, S., Hosoya, H., and Watanabe, K. Novel neural adhesion molecules in the Contactin/F3 subgroup of the immunoglobulin superfamily: isolation and characterization of cDNAs from rat brain. *Neurosci.Lett.*, 218: 173-176, 1996.
102. Troup, S., Njue, C., Kliewer, E. V., Parisien, M., Roskelley, C., Chakravarti, S., Roughley, P. J., Murphy, L. C., and Watson, P. H. Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer. *Clin.Cancer Res.*, 9: 207-214, 2003.
103. Vuillermoz, B., Khoruzhenko, A., D'Onofrio, M. F., Ramont, L., Venteo, L., Perreau, C., Antonicelli, F., Maquart, F. X., and Wegrowski, Y. The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression. *Exp.Cell Res.*, 296: 294-306, 2004.
104. Camby, I., Lefranc, F., Titeca, G., Neuci, S., Fastrez, M., Dedecken, L., Schafer, B. W., Brotchi, J., Heizmann, C. W., Pochet, R., Salmon, I., Kiss, R., and Decaestecker, C. Differential expression of S100 calcium-binding proteins characterizes distinct clinical entities in both WHO grade II and III astrocytic tumours. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.*, 26: 76-90, 2000.
105. Lloyd, B. H., Ruddell, C., Rudland, P. S., and Barraclough, R. S100A3 mRNA expression displays an inverse correlation to breast cancer progression. *Biochem.Soc.Trans.*, 24: 340S, 1996.
106. Elson, G. C., Graber, P., Losberger, C., Herren, S., Gretener, D., Menoud, L. N., Wells, T. N., Kosco-Vilbois, M. H., and Gauchat, J. F. Cytokine-like factor-1, a novel soluble protein, shares homology with members of the cytokine type I receptor family. *J.Immunol.*, 161: 1371-1379, 1998.
107. Gherzi, G., Dong, H., Goldstein, L. A., Yeh, Y., Hakkinen, L., Larjava, H. S., and Chen, W. T. Regulation of fibroblast migration on collagenous matrix by a cell surface peptidase complex. *J.Biol.Chem.*, 277: 29231-29241, 2002.
108. Huang, Y., Wang, S., and Kelly, T. Seprase promotes rapid tumor growth and increased microvessel density in a mouse model of human breast cancer. *Cancer Res.*, 64: 2712-2716, 2004.
109. van Hensbergen, Y., Broxterman, H. J., Rana, S., van Diest, P. J., Duyndam, M. C., Hoekman, K., Pinedo, H. M., and Boven, E. Reduced growth, increased vascular area, and reduced response to cisplatin in CD13-overexpressing human ovarian cancer xenografts. *Clin.Cancer Res.*, 10: 1180-1191, 2004.
110. Pasqualini, R., Koivunen, E., Kain, R., Lahdenranta, J., Sakamoto, M., Stryhn, A., Ashmun, R. A., Shapiro, L. H., Arap, W., and Ruoslahti, E. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.*, 60: 722-727, 2000.
111. Herman, J. G. and Baylin, S. B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N.Engl.J.Med.*, 349: 2042-2054, 2003.
112. Ballestar, E., Paz, M. F., Valle, L., Wei, S., Fraga, M. F., Espada, J., Cigudosa, J. C., Huang, T. H., and Esteller, M. Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer. *EMBO J.*, 22: 6335-6345, 2003.

113. Duan, Z., Duan, Y., Lamendola, D. E., Yusuf, R. Z., Naeem, R., Penson, R. T., and Seiden, M. V. Overexpression of MAGE/GAGE genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant human cancer cell lines. *Clin.Cancer Res.*, *9*: 2778-2785, 2003.
114. Haque, A. K., Syed, S., Lele, S. M., Freeman, D. H., and Adegboyega, P. A. Immunohistochemical study of thyroid transcription factor-1 and HER2/neu in non-small cell lung cancer: strong thyroid transcription factor-1 expression predicts better survival. *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.*, *10*: 103-109, 2002.
115. Moldvay, J., Jackel, M., Bogos, K., Soltesz, I., Agocs, L., Kovacs, G., and Schaff, Z. The Role of TTF-1 in Differentiating Primary and Metastatic Lung Adenocarcinomas. *Pathol.Oncol.Res.*, *10*: 85-88, 2004.
116. Olive, S., Dubois, C., Schachner, M., and Rougon, G. The F3 neuronal glycosylphosphatidylinositol-linked molecule is localized to glycolipid-enriched membrane subdomains and interacts with L1 and fyn kinase in cerebellum. *J.Neurochem.*, *65*: 2307-2317, 1995.
117. Navarrete, S. A., Roentsch, J., Danielsen, E. M., Langner, J., and Riemann, D. Aminopeptidase N/CD13 is associated with raft membrane microdomains in monocytes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, *269*: 143-148, 2000.
118. Riemann, D., Hansen, G. H., Niels-Christiansen, L., Thorsen, E., Immerdal, L., Santos, A. N., Kehlen, A., Langner, J., and Danielsen, E. M. Caveolae/lipid rafts in fibroblast-like synoviocytes: ectopeptidase-rich membrane microdomains. *Biochem.J.*, *354*: 47-55, 2001.
119. Santos, A. N., Langner, J., Herrmann, M., and Riemann, D. Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. *Cell Immunol.*, *201*: 22-32, 2000.
120. Hur, E. M., Park, Y. S., Lee, B. D., Jang, I. H., Kim, H. S., Kim, T. D., Suh, P. G., Ryu, S. H., and Kim, K. T. Sensitization of epidermal growth factor-induced signaling by bradykinin is mediated by c-Src. Implications for a role of lipid microdomains. *J.Biol.Chem.*, *279*: 5852-5860, 2004.

6. Anlagen

6.1 Thematisch relevante eigene Publikationen

1. **Kehlen, A.**, Englert, N., Seifert, A., Klonisch, T., Dralle, H., Langner, J., and Hoang-Vu C. Expression, regulation and function of autotaxin in thyroid carcinomas. *Int.J.Cancer.* 109:833-838, 2004.
2. **Kehlen, A.**, Geisler, M., Olsen, J., Sablotzki, A., Langner, J., Riemann, D. IL-10 and TGF- β differ in their regulation of aminopeptidase N/CD13 expression in monocytes. *Int. J. Mol. Med.* 13: 877-882, 2004.
3. **Kehlen, A.**, Lendeckel, U., Dralle, H., Langner, J., and Hoang-Vu, C. Biological significance of aminopeptidase N /CD13 in thyroid carcinomas. *Cancer Res.* 63:8500-8506, 2003.
4. **Kehlen, A.**, Gebert, I., Thiele, K., Fischer, K., Riemann, D., and Langner, J. Increased expression of interleukin-8 and aminopeptidase N by cell-cell contact: interleukin-8 is resistant to degradation by aminopeptidase N/CD13. *Eur.Cytokine Netw.*, 12: 316-324, 2001.
5. Riemann, D., Hansen, G. H., Niels-Christiansen, L., Thorsen, E., Immerdal, L., Santos, A. N., **Kehlen, A.**, Langner, J., and Danielsen, E. M. Caveolae/lipid rafts in fibroblast-like synoviocytes: ectopeptidase-rich membrane microdomains. *Biochem.J.*, 354: 47-55, 2001.
6. **Kehlen, A.**, Lauterbach, R., Santos, A. N., Thiele, K., Kabisch, U., Weber, E., Riemann, D., and Langner, J. IL-1 beta- and IL-4-induced down-regulation of autotaxin mRNA and PC-1 in fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin.Exp.Immunol.*, 123: 147-154, 2001.
7. **Kehlen, A.**, Olsen, J., Langner, J., and Riemann, D. Increased lymphocytic aminopeptidase N/CD13 promoter activity after cell-cell contact. *J.Cell Biochem.*, 80: 115-123, 2000.
8. Riemann, D., **Kehlen, A.**, and Langner, J. CD13--not just a marker in leukemia typing. *Immunol.Today*, 20: 83-88, 1999.
9. **Kehlen, A.**, Gohring, B., Langner, J., and Riemann, D. Regulation of the expression of aminopeptidase A, aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 in renal carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by cytokines and cAMP-increasing mediators. *Clin.Exp.Immunol.*, 111: 435-441, 1998.

10. Riemann, D., **Kehlen, A.**, Thiele, K., Lohn, M., and Langner, J. Induction of aminopeptidase N/CD13 on human lymphocytes after adhesion to fibroblast-like synoviocytes, endothelial cells, epithelial cells, and monocytes/macrophages. *J. Immunol.*, *158*: 3425-3432, 1997.
11. Santos, A. N., Riemann, D., Santos, A. N., **Kehlen, A.**, Thiele, K., and Langner, J. Treatment of fibroblast-like synoviocytes with IFN-gamma results in the down-regulation of autotaxin mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *229*: 419-424, 1996.
12. Riemann, D., **Kehlen, A.**, and Langner, J. Stimulation of the expression and the enzyme activity of aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 on human renal cell carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by T cell-derived cytokines, such as IL-4 and IL-13. *Clin. Exp. Immunol.*, *100*: 277-283, 1995.

Die Originalarbeiten Nr. 1, 2, 3, 6, 7 und 9 sind im Anhang beigelegt.

6.2 Erklärungen

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Ein Habilitationsverfahren wurde bislang an einer anderen Fakultät oder Universität weder eröffnet noch beantragt. Frühere Habilitationsverfahren an der Martin-Luther-Universität sind meinerseits nicht unternommen worden.

Halle, den 31.8.2004

Dr. rer. nat. Astrid Kehlen

6.3 Danksagung

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Langner, Direktor der Institutes für Medizinische Immunologie bis Mitte 2004, ohne dessen Förderung, Unterstützung und ständigem Interesse diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. „Lieber Chef“ DANKE für die schöne Zeit in der Immunologie.

Bei Frau Prof. B. Seliger, Direktorin der Institutes für Medizinische Immunologie, möchte ich mich für ihre Unterstützung bei der Fortführung meiner Arbeit bedanken.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität (auch den vielen ehemaligen) sei für ihre Unterstützung und ständige Hilfe gedankt. Besonders erwähnen möchte ich die fleißigen „Zwei-Tages-MTAs“ Ivonne Peters, Christine Hamann, Sandra Fuhrmann sowie Michaela Kirstein. Mein Dank gilt weiterhin meinen zahlreichen Diplomanden und Doktoranden, von denen ich stellvertretend Anja Seifert, Katja Thiele, Sascha Bandulik, Rene Keil, Mabruk Erhuma nennen möchte: Danke für die nette und fruchtbare Zusammenarbeit! Des Weiteren danke ich Frau PD Dr. D. Riemann für die langjährige gemeinsame erfolgreiche Forschungstätigkeit. Unserer „Chefsekretärin“ Frau C. Walcker möchte ich für umfangreiche Hilfe bei den Korrekturen und die vielen lieben aufmunternden Worte danken.

Herrn PD Dr. C. Hoang-Vu, Leiter des Labors für experimentelle und chirurgische Onkologie der Universitäts- und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie in Halle, und seiner Mitarbeiterin Kathrin Hammje gilt mein Dank für ihr Engagement, mich bei allen Arbeiten zu unterstützen, die Bereitstellung der Zelllinien und des Patientenmaterials sowie den zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen. Mein Dank gilt auch den Herrn PD Dr. O. Gimm und T. Mustafa aus der gleichen Klinik für den netten wissenschaftlichen Gedankenaustausch.

Bei Prof. Dr. T. Klonisch und Frau Dr. S. Hombach-Klonisch (jetzt University of Manitoba, Winnipeg, Canada) möchte ich mich für die fruchtbare Zusammenarbeit und die vielen wissenschaftlichen Diskussionen bedanken.

Lebenslauf

Name: Astrid Kehlen
geb.: 7.3.1964
in: Halle (Saale)

Schulausbildung

1970-1978 Polytechnische Oberschule
1978-1982 Erweiterte Oberschule; Abitur

Studium und Berufsweg

09/1982-08/1987 Biochemie-Studium an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
09/1987-09/1991 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemie
der Pflanzen der Akademie der Wissenschaften in Halle
09/1990-12/1990 Arbeitsaufenthalt an der Ruhr-Universität Bochum
1992 Promotion
seit 10/1991 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für
Medizinische Immunologie der Martin-Luther-
Universität
02/1994-07/1994 Arbeitsaufenthalt an den Panum Instituten in
Kopenhagen, Dänemark

Preise

1994 Leopoldina-Förderpreis der Deutschen Akademie der
Naturforscher „Leopoldina“
2003 Verleihung des Merck European Thyroid Von-Basedow-
Forschungspreises der Deutschen Gesellschaft für
Endokrinologie für die Arbeit mit dem Thema:
„Biological significance of aminopeptidase N/CD13 in
thyroid carcinomas“