

**Untersuchungen des Einflusses der *antisense*-Inhibierung
von Kathepsin L auf die funktionelle Aktivität von
Lungenepithelzellen**

DISSERTATION

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

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Dipl.-Ökotroph. (FH) Aline Wille
geb. am 25. August 1970 in Ribnitz-Damgarten

Gutachter:

1. Prof. Dr. S. Ansorge
2. Prof. Dr. K. Neubert
3. Prof. Dr. E. Spieß

Magdeburg, den 09.12.2001

verteidigt am 02.05.2002

urn:nbn:de:gbv:3-000003515

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003515>]

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	4
1.1	Proteolyse	4
1.2	Proteasen und Proteolyse im lysosomalen Kompartiment	5
1.3	Lysosomale Cysteinproteasen der Papainfamilie	7
1.4	Zielstellung der vorliegenden Arbeit	13
2	<i>Methoden</i>	14
2.1	Zellkulturarbeiten	14
2.1.1	Kultivierung der A549-Zelllinie	14
2.1.2	Einfrieren von Zellen	14
2.1.3	Auftauen und Revitalisieren von Zellen	15
2.1.4	Bestimmung der zytotoxischen G418-Konzentration für A549-Zellen	15
2.1.5	Stabile Transfektion der A549-Zellen	16
2.1.6	Selektion von G418-resistenten A549-Klonen	17
2.1.7	Kontrolle der Transfektionseffizienz	18
2.1.8	Kultivierung stabil transfizierter A549-Klone	18
2.2	Molekularbiologische Methoden	19
2.2.1	Nukleinsäure-Analytik	19
2.2.1.1	Isolierung von Gesamt-RNS aus A549-Zellen und A549-Klonen	19
2.2.1.2	Isolierung genomischer DNS aus A549-Klonen	20
2.2.1.3	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	20
2.2.1.4	Reverse Transkription	21
2.2.1.5	PCR-Reaktionen zur Amplifikation von cDNS und Gesamt-DNS	21
2.2.1.6	Amplifikation von cDNS durch quantitative Echtzeit-PCR	24
2.2.1.7	Agarosegel-Elektrophorese	26
2.2.2	Herstellung von Vektorkonstrukten	27
2.2.2.1	Klonierung von cDNS-Fragmenten in Plasmid-Vektor pCR3.1	27
2.2.2.2	Transformation von E.coli mit Plasmid-DNS	28
2.2.2.3	Minipreparation von Plasmid-DNS	28
2.2.2.4	Reinigung der Plasmid-DNS	29
2.2.2.5	Spaltung von Plasmid-DNS mit Restriktionsendonukleasen	30
2.2.2.6	Sequenzierung von Plasmid-DNS und integrierten cDNS-Fragmenten	31
2.3	Biochemische Methoden	31
2.3.1	Proteinbestimmung	31
2.3.2	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	32
2.3.2.1	Kathepsin L-ELISA 1	32

2.3.2.2	Kathepsin L-ELISA 2	32
2.3.2.3	ELISA´s zum Nachweis verschiedener Zytokine	34
2.3.3	Polyakrylamidgel-Elektrophorese von Proteinen	35
2.3.4	Proteintransfer mittels Western Blot	37
2.3.5	Immunfärbung	37
2.3.6	Bestimmung von Enzymaktivitäten	38
2.3.6.1	Anreicherung der lysosomalen/endosomalen Fraktion von A549-Zellklonen	38
2.3.6.2	Bestimmung der Kathepsin L-Aktivität	39
2.3.6.3	Bestimmung der Kathepsin D-Aktivität	40
2.3.6.4	EnzChek™ Protease-Assay	41
2.3.6.5	EnzChek™ Protease-Assay mit Inhibitoreinsatz	41
2.3.6.6	Bestimmung der Caspase 3-Aktivität	42
2.3.7	Proliferationstest	42
2.3.8	Migrationstest	43
2.3.9	Invasionstest	43
2.3.10	Durchflußzytometrische Analysen	44
2.3.10.1	Analysieren im Durchflußzytometer	44
2.3.10.2	Nachweis des Fas/Apo-1-Antigens (CD 95)	45
2.3.10.3	Nachweis des Fas/Apo-1-Antigens (CD95) nach IFN- γ -Inkubation	46
2.3.10.4	Apoptoseinduktionsmodell	46
2.3.10.5	Nachweis des Membranproteins 7A6	47
2.3.10.6	TUNEL-Färbung	47
3	<i>Ergebnisse</i>	50
3.1	Herstellung von Kathepsin L-<i>antisense</i>-Klonen	50
3.1.1	Ermittlung der zytotoxischen G418-Konzentration für A549-Zellen	50
3.1.2	Herstellung der Kathepsin L- <i>antisense</i> -Konstrukte	51
3.1.3	Transfektion und Selektion stabiler Klone	54
3.2	Charakterisierung der Kathepsin L-<i>antisense</i>-Klone	56
3.2.1	Stabiler Einbau der Kathepsin L- <i>antisense</i> -Konstrukte in A549-Zellen	56
3.2.2	Quantitativer Nachweis eines Kathepsin L-Defizits in <i>antisense</i> -Klonen	58
3.3	Funktionelle Untersuchungen an den Kathepsin L-<i>antisense</i>-Klonen	60
3.3.1	Proliferationsverhalten der Kathepsin L- <i>antisense</i> -Klone	61
3.3.2	Apoptoseverhalten der Kathepsin L- <i>antisense</i> -Klone	61
3.3.2.1	Detektion von Fas/Apo-1 (CD95)	62
3.3.2.2	Messung der Caspase 3-Aktivität	64
3.3.2.3	Bestimmung der DNS-Fragmentierung mit Hilfe der TUNEL-Färbung	65
3.3.2.4	Nachweis des Membranproteins 7A6	67
3.3.3	Invasions- und Migrationsverhalten der Kathepsin L- <i>antisense</i> -Klone	69
3.3.4	Proteolytische Aktivität der Kathepsin L- <i>antisense</i> -Klone	71

Inhaltsverzeichnis	3
3.3.4.1 Bestimmung der proteolytischen Aktivität mit dem Substrat Casein	71
3.3.4.2 Messung der spezifischen Kathepsin D-Aktivität	73
3.3.4.3 Analyse der Kathepsin D-Expression durch Western Blot	74
3.3.5 Zytokinsekretion der Kathepsin L- <i>antisense</i> -Klone	76
4 Diskussion	78
4.1 Gegenstand der vorliegenden Arbeit	78
4.2 Etablierung und Charakterisierung der Kathepsin L-<i>antisense</i>-Klone	79
4.3 Funktionelle Untersuchungen an Kathepsin L-defizienten A549-Klonen	82
4.3.1 Verringerung der Proliferation	82
4.3.2 Erhöhung der Apoptoseempfindlichkeit	84
4.3.3 Erhöhte Kathepsin D-Expression	86
4.3.4 Erhöhte Invasion	87
4.3.5 Veränderte Zytokinsekretion - Erhöhte Migration	88
5 Zusammenfassung	95
6 Literatur	99

Abkürzungsverzeichnis

AB/AM	Antibiotikum/ Antimykotikum
A. d.	Aqua destillata
Amp	Ampicillin
AK	Antikörper
AMC	7-Amino-4-Methyl-Cumarin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninic Acid
Cat B	Cathepsin B
Cat D	Cathepsin D
Cat L	Cathepsin L
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	„copy“ Desoxyribonukleinsäure
CMV	Cytomegalovirus
CXCR	CXC-Rezeptor
DEAE	Diethyldiaminoethanol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetal Calf Serum

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G418	G418-Sulfat, Geneticin [®]
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modifiziertes Dulbecco's Medium
IPTG	Isopropylthio- β -D-galaktosid
Kan	Kanamycin
kD	Kilo Dalton
LacZ	β -Galaktosidase-Gen
LB	Luria-Bertani
mAK	monoklonaler Antikörper
ME	Mercaptoethanol
MHC	Major Histocompatibility Complex
MPOD	Meerrettich-Peroxidase
MCP-1	Monozyten-Chemotaktisches-Peptid
MMP	Matrixmetalloproteinasen
Neo	Neomycin
OD	Optische Dichte
OPA	Orthophenanthrolin
Pep A	Pepstatin A
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PC5	Phycoerythrin Cyanin 5.1
PI	Propidiumjodid
PMA	Phorbol 12-Myristat-13-Acetat
rpm	rolls per minute
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
RSA	Rinderserumalbumin
SDF-1	Stroma-Derived Factor
RNase	Ribonuklease
SDS	Sodiumdodecylsulfat

TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl Transferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor Necrosis Factor - α
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling
U	Units
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

Verwendete Puffer und Reagenzien

Transferpuffer ^a	3,03 g Tris
	14,40 g Glycine
	200,00 ml Methanol
	Ad 1000,00 ml A.d.
Transferpuffer ^b	5,00 ml NuPage Transferpuffer
	100,00 µl Antioxidant
	20,00 ml Ethanol
	Ad 75,00 ml A.d.
0,25 M Saccharosepuffer	8,50 g Saccharose
	2,50 ml HEPES
	2,00 mM EDTA
	Ad 100,00 ml A.d.
100 mM Na-Acetatpuffer (pH 5,5)	6,00 ml Essigsäure
	4,00 g NaOH
	145,00 mg EDTA
	Ad 1000,00 ml A.d.
AP-Puffer (pH 9,5)	12,10 g Tris
	5,84 g NaCl
	1,02 g MgCl ₂ x 6H ₂ O
	Ad 1000,00 ml
4 x Trenngelbuffer (LGB, pH 8,8)	90,75 g Tris
	10,00 ml 20 % SDS
	Ad 500,00 ml

4 x Sammelgelpuffer (UGB, pH 6,8)	60,50 g Tris
	10,00 ml 20 % SDS
	Ad 500,00 ml A.d.
Verdünnungspuffer (pH 7,5)	10,00 ml RPMI
	0,10 g NaN ₃
	1,00 % RSA
	Ad 100,00 ml A. d.
Lysepuffer (Inhibitoren)	0,40 ml 20 mM HEPES pH 7,7
	1,00 ml 50 mM NaF
	0,40 ml 50 mM NaCl
	20,00 µl 0,1 % Na-Orthovanadat
	200,00 µl 1 % Triton X-100
	50,00 µl 0,5 mM PMSF
	200,00 µl 10 µg/ml Aprotinin
	200,00 µl 10 µg/ml Leupeptin
0,2 M Na-Carbonatpuffer (Coating-Puffer, pH 9,6)	21,20 g Na ₂ CO ₃
	16,80 g NaHCO ₃
	Ad 1000,00 ml A.d.
Blocking-Puffer (für TGF-β-ELISA)	8,76 g 1,5 M NaCl
	15,06 g 1,0 M Tris-HCl (pH 7,5)
	1,00 % RSA
	Ad 100,00 ml A.d.
AK-Puffer (für TGF-β-ELISA)	8,76 g 1,5 M NaCl
	15,06 g 1,0 M Tris-HCl (pH 7,5)
	1,00 % RSA
	0,05 % Tween 20

	Ad 100,00 ml A.d.
Glycin-HCl-Puffer (pH 3,8)	1,50 g 200 mM Glycin-HCL
	Ad 100,00 ml A.d.
50 x TAE (pH 8,0)	242,00 g Tris
	57,10 ml Eisessig
	18,60 g EDTA
	Ad 1000,00 ml A.d.
Fixativ	PBS + 1,00 % Paraformaldehyd
PBS-Tween (Waschpuffer)	PBS + 0,10 % Tween 20
PBS-FCS (Waschpuffer)	PBS + 2,50 – 10,00 % FCS
Blocking-Puffer (PBS-BSA)	PBS + 3,00 % BSA
Lysepuffer (pH 7,2)	0,50 % Triton X-100/PBS
Lysepuffer (pH 5,5)	0,50 % Triton X-100/ Na-Acetat 50 mM

1 Einleitung

1.1 Proteolyse

Proteolyse findet in vielzelligen Organismen sowohl intrazellulär als auch extrazellulär statt. Die intrazelluläre Proteolyse läuft im Zytosol sowie in nahezu allen Kompartimenten der Zelle ab. Insbesondere das endosomale/lysosomale Kompartiment enthält eine Reihe proteolytischer Enzyme, die für einen vollständigen Abbau oder einen limitierten Umbau von Proteinen verantwortlich sind. Bei der zytoplasmatischen Proteolyse erfolgt der Proteinabbau über das Proteasom, einen Proteasekomplex.

Beim Proteinabbau handelt es sich beispielsweise um langlebige Strukturproteine, die Bestandteil dauerhaften Gewebes, wie Knochen oder Muskulatur sind, Stoffwechsellenzyme oder Regulatorproteine, die z.B. den Zellzyklus regulieren und eine kurze Lebensdauer haben, sowie um Nahrungsproteine.

Während bei der vollständigen Proteolyse die Proteine zu freien Aminosäuren abgebaut werden, die dann für die Proteinneusynthese oder zur Energiegewinnung zur Verfügung stehen, werden bei der limitierten Proteolyse bestimmte Peptidbindungen selektiv gespalten, was zur biologischen Aktivierung oder Inaktivierung eines Zielproteins führen kann, z.B. zur Aktivierung eines Prohormons zum Hormon. Ob ein Substratprotein vollständig degradiert wird oder durch limitierte Proteolyse modifiziert wird, ist einerseits vom Substrat selbst abhängig, andererseits von seiner Lokalisation in der Zelle sowie der Ausstattung des jeweiligen Kompartiments mit proteolytischen Enzymen (Barrett, 1992). Im endosomalen/lysosomalen Kompartiment wird der Hauptteil der zellulären Proteine hydrolysiert (Bohley et al., 1992). Schätzungsweise werden hier mehr als 90 % der langlebigen Proteine und ein großer Teil kurzlebiger Proteine von Proteasen degradiert (Bohley et al., 1992).

1.2 Proteasen und Proteolyse im lysosomalen Kompartiment

Nach der Nomenklatur des Enzymkomitees (EC) der Internationalen Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (Barrett, 1997) zählen die Proteasen (Peptidasen, EC 3.4) zur Enzymhauptklasse der Hydrolasen (EC 3). Die Proteasen lassen sich in zwei Klassen unterteilen. Exopeptidasen hydrolysieren Peptidbindungen vom amino- oder carboxyterminalem Ende. Dabei spalten z. B. Aminopeptidasen einzelne Aminosäuren, Dipeptidasen Dipeptide und Dipeptidyl-/Tripeptidylpeptidasen Di- und Tripeptide vom N-Terminus ab. Peptidyl-dipeptidasen und Carboxypeptidasen spalten dagegen Dipeptide oder einzelne Aminosäuren vom C-Terminus.

Endopeptidasen, auch Proteinasen genannt, hydrolysieren Peptidbindungen im Inneren eines Polypeptidsubstrates. Die unspezifische, vollständige Proteolyse wird im lysosomalen Kompartiment durch die Endopeptidasen eingeleitet. Exopeptidasen bewirken den weiteren Abbau zu Dipeptiden und Aminosäuren (Bohley et al., 1992). Freigesetzte Dipeptide und Aminosäuren werden durch die lysosomale Membran ins Zytosol transportiert. Zytosolische Exopeptidasen sind in der Lage, die restlichen Dipeptide zu spalten. Somit können die freien Aminosäuren in den anabolen oder katabolen Stoffwechsel eintreten (Bohley et al., 1992). Endopeptidasen werden aufgrund ihres katalytischen Mechanismus in fünf Klassen unterteilt. Nach den charakteristischen Aminosäureresten im katalytischen Zentrum unterscheidet man Serin-, Cystein-, Aspartat-, Metallo-, Threoninpeptidasen und Peptidasen mit unbekanntem katalytischen Mechanismus.

Innerhalb einer Enzymklasse werden Enzyme, die in ihrem evolutionären Ursprung verwandt sind, in Familien eingeteilt (z.B. Papainfamilie innerhalb Cysteinproteasen). Diese Familien beschreiben eine Enzymgruppe, deren Mitglieder eine relativ hohe

Übereinstimmung in der gesamten Aminosäuresequenz besitzen oder deren Sequenzgleichheit das katalytische Zentrum betrifft (Barrett et al., 1991).

Während Serin- und Metalloproteinasen hauptsächlich im Zytosol und im Extrazellulärraum anzutreffen sind, können bestimmte Cystein- und Aspartatproteinasen vor allem dem lysosomalen Kompartiment zugeordnet

werden (Uchiyama et al., 1994), in dem der größte Teil der zellulären Proteine hydrolysiert wird.

Lysosomen sind mit einer Vielzahl von hydrolytischen Enzymen gefüllte, membranumhüllte Vesikel, die neben Proteasen auch Nukleasen, Glykosidasen, Phosphatasen, Sulfatasen, Lipasen und Phospholipasen beinhalten, die die entsprechenden Makromoleküle spalten. Sie haben ein pH-Optimum im sauren Bereich (pH 5). Durch membrangebundene Protonenpumpen wird im Lumen der Lysosomen der saure pH-Wert aufrechterhalten, sodass die lysosomalen Enzyme ihre maximale Aktivität entfalten können.

Lysosomale Enzyme werden als Vorstufenproteine am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und aufgrund einer aminoterminalen Signalsequenz ins ER-Lumen transferiert. Hier erfolgt die Abspaltung der Signalsequenz und die Glykosylierung an spezifischen Asparaginsäureresten. Im Golgi-Apparat wird die Prozessierung fortgesetzt. Das Glykoprotein, das zur Auslieferung an die Lysosomen bestimmt ist, erhält im cis-Kompartiment des Golgi-Komplexes eine Mannose-6-Phosphat-Markierung. Der Golgi-Apparat enthält membrangebundene Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren, die die markierten Proteine erkennen und binden. Vesikel mit diesem Protein-Rezeptor-Komplex schnüren sich von den Rändern des trans-Golgi-Komplexes ab und verschmelzen mit prälysosomalen Vesikeln, die saurer als der Golgi-Apparat sind. Der erniedrigte pH-Wert führt zu einer Dissoziation des markierten Glykoproteins von seinem Rezeptor. Während der Rezeptor zum Golgi-Apparat zurückkehrt, reifen die Prälysosomen durch Verschmelzung mit Lysosomen und die bislang inaktiven Vorstufenenzyme werden durch limitierte Proteolyse zu reifen Enzymen prozessiert.

Verschiedene Wege des intrazellulären und extrazellulären Transports führen in das Lysosom. Extrazellulär lokalisierte Makromoleküle werden durch Phagozytose (z. B. Bakterien) oder rezeptorvermittelte Endozytose über frühe und späte Endosomen in das Lysosom transportiert. Intrazelluläre Bestandteile, wie z. B. alte und verbrauchte Zellkompartimente, werden in Autophagosomen gehüllt und ebenfalls ins lysosomale Kompartiment transportiert.

1.3 Lysosomale Cysteinproteasen der Papainfamilie

Klassifikation

Die Papainsuperfamilie ist die größte und am besten untersuchte Gruppe innerhalb der Klasse der Cysteinproteasen. Sie ist nochmals unterteilt in die Gruppe der Calpaine, der Bleomycin-Hydrolasen und der Papaine (Chapman et al., 1997; McGrath et al., 1999). Letztere umfasst lysosomale Kathepsine wie Kathepsin B, C, H, L und S sowie die erst kürzlich beschriebenen Kathepsine F, K, O, V, W und X (Bühling et al., 1999). Kathepsin B und H haben neben Endopeptidaseaktivität auch Carboxy- und Aminopeptidaseaktivität. Weiterhin ist Kathepsin C zwar ein typisches Papainenzym, besitzt aber ausschließlich Aminopeptidaseaktivität. Kathepsin X dagegen zeigt Carboxypeptidaseaktivität (Bühling et al., 1999). Innerhalb einer Spezies zeigen Kathepsine Sequenzhomologien von 30-60 % auf Proteinebene, die auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung schließen lassen (Bühling et al., 1999). So beträgt z.B. die Homologie auf Proteinebene zwischen Kathepsin F und W 58 %, zwischen Kathepsin F und der Kathepsine L, K, S, H und O ca. 43 % (Wang et al., 1998).

Weiterhin können die Kathepsine der Papainfamilie in zwei funktionale Gruppen eingeteilt werden. Die eine Gruppe fasst die ubiquitär exprimierten, intrazellulären "housekeeping"-Proteasen, wie Kathepsin L, B, H und wahrscheinlich O zusammen, die für den üblichen, allumfassenden Proteinabbau zuständig sind. Die andere Gruppe ist durch ein gewebespezifisches Expressionsmuster charakterisiert und durch eine spezifische Funktion, die mit der Gewebeverteilung korreliert (Wang et al., 1998). Kathepsin S ist beispielsweise die erste beschriebene gewebespezifische Cysteinproteinase, die primär im lymphatischen Gewebe exprimiert wird und hier die invariante Kette des MHC-Klasse-II-Komplexes spezifisch degradiert (Riese et al., 1996).

Kathepsin K wird beispielsweise in Osteoklasten exprimiert und ist dort an der Knochenresorption beteiligt. Das Krankheitsbild der Pyknodysostosis ist eine lysosomale Erkrankung, die auf ein Kathepsin K-Defizit in den Osteoklasten zurückzuführen ist (Bromme et al., 1996; Gelb et al., 1996). Weiterhin wurde Kathepsin K auch in Fibroblasten, Brustkrebszellen, Riesenzellen, glatten Muskelzellen und Lungenepithelzellen beschrieben (Bühling et al., 1999; Nakase et al., 2000).

Alle gegenwärtig beschriebenen thiolabhängigen Kathepsine besitzen ähnliche Proteinstrukturen mit einer Signalsequenz von 16-18 Aminosäuren, einem Propeptid mit 62-100 Aminosäureresten und einer katalytisch aktiven und reifen Enzymregion mit ca. 220-230 Aminosäuren (Wang et al., 1998). Die Signalsequenz ist für den Transport des Proteins aus dem ER über den Golgi-Komplex in das endosomale/lysosomale Kompartiment verantwortlich. Die Proregion hat Bedeutung für die korrekte Faltung des neusynthetisierten Proteins und seine Stabilisierung gegen Denaturierung bei neutralem oder leicht alkalischem pH-Wert (Tao et al., 1994).

Katalytischer Mechanismus

Das reife Enzym besitzt die katalytische Triade, bestehend aus den drei Aminosäuren Cystein, Histidin und Asparagin. Die Enzyme sind in zwei globuläre Domänen gefaltet, die in ihrer Mitte einen Spalt, das aktive Zentrum bilden. Nach Substrateintritt ins aktive Zentrum kommt es durch das unter sauren pH-Wert-Bedingungen (pH 5) reduzierte Thiolatanion des Cysteins zu einem nukleophilen Angriff auf den Carbonylkohlenstoff der Amidbindung des Substrates. Gleichzeitig wird das Thiolatanion durch eine Ionenpaarbindung zur benachbarten basischen Aminosäure Histidin stabilisiert (Chapman et al., 1997; Wang et al., 1998). Charakteristisch ist die bevorzugte Katalyse von synthetischen Substraten mit Arginin, einer Aminosäure mit basischer Seitenkette, in P1-Position. In der Spezifität hinsichtlich der P2-Position unterscheiden sich die Kathepsine. So hat Kathepsin L z.B. eine hohe Affinität zu Substraten mit Phenylalanin (unpolare Seitenkette) in der P2-Position. Kathepsin S dagegen bevorzugt in derselben Position Aminosäuren mit verzweigten hydrophoben Resten.

Physiologische und pathologische Funktionen

Die Hauptfunktion der Cysteinproteasen der Papainfamilie in vivo ist die lysosomale Degradation von intra- und extrazellulären Proteinen sowie ihre Beteiligung an der limitierten Proteolyse, wie z.B. der Proenzymaktivierung (Samarel et al., 1989), der Antigenprozessing (Riese et al., 1996) und der Hormonreifung (Docherty et al., 1982). Zahlreiche Beweise belegen, dass die inaktiven Vorstufen der Cysteinproteasen von Zellen wie Makrophagen,

Fibroblasen oder transformierten Zellen, in den extrazellulären Raum sekretiert werden und hier nicht nur physiologische sondern auch pathologische Prozesse steuern. Die Proteolyse durch Cysteinproteinasen außerhalb der Lysosomen wird durch den physiologischen pH-Wert und natürliche Inhibitoren reguliert (Kirschke et al., 1995). Eine Veränderung innerhalb dieses Gleichgewichts führt zu einer unkontrollierten Proteolyse, die in Form von Inflammation, Arthritis (Mort et al., 1984), Tumorinvasion und Metastasierung (Sloane et al., 1984) oder Alzheimer-Erkrankungen (Lemere et al., 1995) in Erscheinung tritt.

Struktur von Kathepsin L

Kathepsin L wurde erstmals 1974 und 1977 von der Arbeitsgruppe Kirschke et al. als Endopeptidase aus Rattenleber-Lysosomen isoliert und beschrieben (Kirschke et al., 1977). Diese lysosomale Cysteinprotease wird ubiquitär in vielen Zelltypen exprimiert und ist wesentlich am intrazellulären Proteinabbau und -umbau beteiligt (Troen et al., 1987).

Das humane Kathepsin L-Gen ist auf Chromosom 9q21-22 lokalisiert (Chauhan et al., 1993), weist 8 Exons und 7 Introns und eine Länge von 5100 bp auf. Der Transkriptionsstart befindet sich im zweiten Exon.

Das humane Prokathepsin L ist ein aus 331 Aminosäuren bestehendes lysosomales Enzym mit einem Molekulargewicht von 38 kD. Dabei umfasst das Signalpeptid 17, das N-Propeptid 95 und das reife Enzym 219 Aminosäurereste. Das reife Enzym hat ein Molekulargewicht von 28 kD (Chauhan et al., 1993; Kirschke, 1995; Chauhan et al., 1993) und wird in den Lysosomen durch Abspaltung der Proregion mittels limitierter Proteolyse oder Autokatalyse hergestellt. Es kann als einkettige Form mit einem Molekulargewicht von 28 kD oder als zweikettige Form, bestehend aus zwei Polypeptiden von 24 kD und 4 kD Größe, vorliegen. Die zweikettige Polypeptidform wird in einem weiteren Prozessierungsschritt aus der einkettigen Form generiert und ist über Disulfidbrücken verknüpft. Das katalytische Zentrum wird von den Aminosäuren Cys-138, His-276 und Asn-300 gebildet. Weiterhin besitzt Kathepsin L zwei Glykosylierungsstellen an den Positionen 221 und 268 (Chauhan et al., 1993; Kirschke, 1995; Chauhan et al., 1993).

Biochemische Charakteristika von Kathepsin L

Kathepsin L zählt zu den Endopeptidasen, degradiert, aktiviert und inaktiviert verschiedene Proteine (Tabelle 1 zusammengestellt nach (Kirschke et al., 1995; Chauhan et al., 1993)).

Tabelle 1 : Degradation und Modifikation von Proteinen durch Kathepsin L

Degradation/Modifikation durch Kathepsin L	Protein
Degradation	Actin, Myosin, Albumin, Angiotensin I, Azocasein, Kollagen (löslich und unlöslich), Elastin, Fibronectin, Laminin, Proteoglykane, Zytosolproteine, Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor, Glucagon, Haemoglobin,
Aktivierung	Plasminogenaktivator
Inaktivierung	Angiotensin II, Bradykinin, Fruktose-1,6-bisphosphataldolase, Glukose-6-phosphatdehydrogenase

Kathepsin L benötigt für die Hydrolyse hydrophobe Aminosäurereste in P2- und P3-Position. Das Enzym hat eingeschränkte Spezifität in der Hydrolyse von synthetischen Substraten. Es spaltet einige Substrate mit Arginin in P1-Position und hydrophoben Resten in P2- und P3-Position bei pH 5-6.

Die bekannten Kathepsin L-Substrate (z. B. Z-Phe-Arg-AMC oder Z-Lys-OphNO₂) sind von Kathepsin L aber auch von Kathepsin B, S oder F spaltbar (Barrett et al., 1981; Kirschke et al., 1995).

Die optimale Aktivität von Kathepsin L liegt bei einem pH-Wert von 5,5-6,0, der in neugebildeten Lysosomen anzutreffen ist. Mit zunehmender Reifung der Lysosomen sinkt der pH-Wert auf einen Wert von 3,8, bei dem Kathepsin L langsam, aber irreversibel denaturiert und somit inaktiviert wird. Weiterhin ist Kathepsin L auch sehr instabil gegenüber neutralen oder leicht alkalischen pH-Bedingungen (Turk et al., 1999).

Die wichtigsten natürlichen Inhibitoren für die Cysteinproteasen sind die Cystatine. Ihre Funktion besteht in der Inhibierung aktiver Enzyme, die dem endosomalen/lysosomalen System entkommen. Das Zytoplasma und der extrazelluläre Raum sind mit diesen Cysteinproteinaseinhibitoren ausgestattet und zwar im stöchiometrischem Überschuss gegenüber dem Enzym. Es werden die Cystatine A und B, die intrazellulär lokalisiert sind, das extrazelluläre Cystatin C und das zirkulierende Kininogen unterschieden. Ihre Bindung an das Enzym über multiple Bindungsstellen ist irreversibel und soll Zellen und Gewebe vor einer unkontrollierten proteolytischen Degradation schützen (Chapman et al., 1997).

Expression von Kathepsin L sowie physiologische und pathologische Funktionen

Kathepsin L wird ubiquitär und konstitutiv exprimiert. Die Expression variiert innerhalb der Gewebetypen und wurde bislang in Geweben wie Niere, Milz, Leber, Lunge oder Gehirn nachgewiesen. Weiterhin wurde Kathepsin L in Lysosomen von alveolären und bronchialen Epithelzellen sowie in Alveolarmakrophagen nachgewiesen. Die Protease wurde außerdem als sezernierte Proform in der bronchoalveolaren Lavage gefunden (Ishii et al., 1991). Die Hauptfunktion von Kathepsin L ist die Proteindegredation in den Lysosomen. Darüber hinaus wird Prokathepsin L in den extrazellulären Raum von normalen Zellen, wie Makrophagen, Fibroblasten, Osteoklasten aber auch von maligne transformierten Zellen sekretiert. Neben der Hauptfunktion im intrazellulären Proteinkatabolismus wird Kathepsin L auch eine spezifische Bedeutung bei Knochenresorptionsvorgängen zugeschrieben. Dabei wird Prokathepsin L von den Osteoklasten in den Extrazellulärraum sekretiert. Dort, unmittelbar an der Zelloberfläche, in den sog. Howshipschen Lakunen, vermittelt es den Abbau organischen Knochenmaterials (Kollagen) unter sauren pH-Bedingungen (Tagami et al., 1994; Kakegawa et al., 1995).

Weiterhin wurde bewiesen, dass Kathepsin L, neben anderen Kathepsinen, an proteolytischen Prozessierungsprozessen im Rahmen der Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-II beteiligt ist. Einerseits scheint Kathepsin L an der limitierten Proteolyse der durch Endozytose aufgenommenen Antigene in antigene Peptidfragmente beteiligt zu sein. Andererseits wurde eine Beteiligung an der Prozessierung der invarianten Kette nachgewiesen, die anfangs der Stabilisierung der MHC-Moleküle dient und im Prozess der Reifung bzw.

Antigenbeladung und -präsentation an der Zelloberfläche degradiert werden muß (Chapman, 1998). Beispielsweise bewirkt das Fehlen von Kathepsin L in kortikalen Thymusepithelzellen eine Verminderung der Antigenpräsentation, was eine Einschränkung der positiven Selektion der T-Zellen zur Folge hat (Nakagawa et al., 1998).

Kathepsin L ist auch an pathologischen Prozessen beteiligt, wie z.B. der myofibrillären Nekrose bei Myopathien (Kominami et al., 1987) oder bei der myokardialen Ischämie (Tsuchida et al., 1986).

Eine große Bedeutung wird Kathepsin L bei der Progression maligner Tumoren beigemessen. Bei invasiven Prozessen werden das interstitielle Stroma, die extrazelluläre Matrix und die Basalmembran von Epithelien lokal degradiert. Dadurch wird der Einbruch maligner Zellen in angrenzende Gewebe und in die Blutbahn ermöglicht. Es gibt Hinweise, dass Kathepsin L neben Kathepsin B und Kathepsin B-ähnlichen Cysteinproteasen sowie der Aspartatprotease Kathepsin D an der Degradation der extrazellulären Matrix, bestehend aus Kollagenen, Glykoproteinen und Proteoglykanen, beteiligt ist (Duffy, 1996; Guinec et al., 1993). Weiterhin sind an der Invasion und Metastasierung auch Proteasen wie der Urokinase-Plasminogenaktivator oder Metalloproteasen beteiligt (Duffy, 1996). Aus zahlreichen Arbeiten geht hervor, dass die Expression und Aktivität von Kathepsin L, B und D in Tumorgeweben verstärkt ist (Duffy, 1996; Thomssen et al., 1995; Ledakis et al., 1996; Keppler et al., 1996; Yan et al., 1998; Rochefort et al., 2000; Chauhan et al., 1991).

Rolle der Kathepsine bei Lungenerkrankungen

Kathepsine spielen im Prozess der Gewebedestruktion bei entzündlichen Lungenerkrankungen eine Rolle. Erkrankungen wie bakterielle Infektionen (Pneumonien), Asthma oder zystische Fibrosen sind mit einer Aktivierung und Zerstörung von Lungenepithelzellen und extrazellulärer Matrix verbunden (Devalia et al., 1990). An der Zerstörung der Zell- und Bindegewebsstrukturen sind freigesetzte Proteasen beteiligt, die aus den eingewanderten Granulozyten oder Makrophagen, aber auch aus den Lungenepithelzellen stammen. Bei diesen Proteasen handelt es sich um Elastase, Metallomatrixproteasen und um Kathepsine. Epithelzellen sind dabei nachweislich in der Lage, biologisch aktive Substanzen zu produzieren und in diesen Prozess aktiv einzugreifen.

1.4 Zielstellung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die physiologische Bedeutung der Cysteinproteinase Kathepsin L in Lungenepithelzellen aufzuklären. Dabei galt es die Fragestellung zu beantworten, wie sich eine Inaktivierung dieser Protease auf funktionelle zelluläre Prozesse auswirkt.

Mit Hilfe der *antisense*-mRNS-Technik sollte die Kathepsin L-defiziente Lungenepithelzelllinie A549 etabliert werden. Diese Zelllinie sollte im Anschluß hinsichtlich ihres Kathepsin L-Gehalts auf mRNS-, Protein- und Aktivitätsebene charakterisiert werden, wobei Kathepsin L-defizienten Zellklone mit Kontrollzellen verglichen werden sollten.

Die charakterisierte Kathepsin L-supprimierte Zelllinie sollte hinsichtlich ihres Proliferations- und Apoptoseverhaltens, ihrer Migrations- und Invasionsfähigkeit sowie ihrer Sekretion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, wie IL-8, MCP-1, IL-6, IL-18, TGF- β 1 und - β 2, untersucht werden.

2 Methoden

2.1 Zellkulturarbeiten

2.1.1 Kultivierung der A549-Zelllinie

Für die Zellkulturarbeiten wurde die humane Lungenkarzinomzelllinie A549, erhalten aus der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) verwendet. Die adhärent wachsenden Epithelzellen wurden kultiviert in IMDM (Iscove's Modifiziertes Dulbecco's Medium, Biochrom) unter Zusatz von 10 % FCS (Fetal Calf Serum, Biochrom) und 1 % AB/AM-Lösung (Antibiotikum/Antimykotikum, Sigma) bei 37 °C und 5 % CO₂ - Sättigung. Die konfluente Zellkultur wurde ca. 1:5 alle drei Tage gesplittet. Dabei wurde das verbrauchte Kulturmedium verworfen, die Zellen 2 bis 3 mal mit Hank's Salz-Lösung (ohne Ca²⁺/ Mg²⁺, Biochrom) gewaschen, um das Kulturmedium vollständig zu entfernen. Die adhärenen Zellen wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung (Life Technology) vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Dazu wurden sie 3 min bei 37 °C bis zur Abrundung inkubiert. Nach Neutralisation der Zell-Trypsin-Suspension mit IMDM und 5-minütiger Zentrifugation bei 280 x g wurden die Zellen in frischem IMDM resuspendiert, die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt (nur bei Versuchsansatz mit definierter Zellzahl) und erneut in Kulturflaschen ausgesät.

2.1.2 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden trypsiniert, in IMDM neutralisiert und bei 280 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 1 ml kaltem Einfriermedium (10 % DMSO/FCS) resuspendiert und in vorgekühlte Kryoröhrchen (0 °C) überführt. Die Zellen wurden in einem isopropanolgefüllten Einfriercontainer (Nalgene™ Cryo 1 °C Freezing Container) auf -80 °C, bei einer Kühlungsrate von -1 °C/min, eingefroren. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

2.1.3 Auftauen und Revitalisieren von Zellen

Nach Entnahme des Kryoröhrchens aus dem Stickstoffbehälter wurde es bei 37 °C aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern vorhanden war. Die Zellsuspension wurde in Kulturflaschen überführt, die 37 °C vorgewärmtes IMDM enthielten. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um Reste von DMSO zu entfernen.

2.1.4 Bestimmung der zytotoxischen G418-Konzentration für A549-Zellen

Im Vorfeld der Transfektionen musste für die A549-Zelllinie die zytotoxische G418 Konzentration ermittelt werden. Hierfür wurden 2000 A549-Zellen in Mikrotiterplatten (96-well-Platten, TPP) ausgesät, bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, und gleichzeitig einer G418-Konzentration von 2, 1, 0,5, 0,25, 0,12, 0,06, 0,03 und 0,015 mg/ml ausgesetzt. Nach 3, 5, 7 und 10 Tagen wurde mit dem CyQUANT[®] Zell-Proliferations-Assay der Firma Molecular Probes die Zelldichte bestimmt. Die Methode beruht auf Bindung eines grün fluoreszierenden Farbstoffes an die Nukleinsäure nach Zelllyse. Durch Einwirkung des zytotoxischen Antibiotikums sterben die Zellen ab und werden durch die der Färbung vorangehenden Waschschriffe entfernt. Der fluoreszierende Farbstoff bindet an die Nukleinsäure der noch verbliebenen Zellen und ist ein Maß für die Zellzahl.

Dazu wurde das Selektionsmedium aus der Platte ausgeschlagen und die Zellen bei -70 °C in der Platte eingefroren. Anschließend wurden 200 µl eines Gemisches aus Lysepuffer und CyQUANT GR-Farbstoff in jedes well pipettiert, leicht geschüttelt und 5 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Fluoreszenz der Zellproben wurde im Mikroplatten-Reader mit einem Anregungsfilter für 480 nm und einem Emissionsfilter für 520 nm gemessen.

2.1.5 Stabile Transfektion der A549-Zellen

Die A549-Zellen wurden mit der einzubringenden Plasmid-DNS stabil transfiziert. Hierfür wurde Lipofektin[®]-Reagenz (Life Technologies), das aus einem kationischen Lipid (N[1-(2,3-dioleoyl-oxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid, DOTMA) und einem ungeladenen Helferlipid (L-Dioleoylphosphatidylethanolamin, DOPE) besteht verwendet. Für die Transfektionseffizienz ist das Lipid:DNS-Verhältnis entscheidend. Das positiv geladene Lipofektin sollte im Überschuß zur negativ geladenen DNS stehen, sodass sich ein Lipid-DNS-Komplex bilden kann. In dessen Inneren ist die negativ geladene DNS lokalisiert, eingeschlossen von den positiv geladenen Liposomen. Dieser Komplex hat nach außen eine positive Nettoladung und fusioniert mit der negativ geladenen Zellmembran (vgl. Abb. 1).

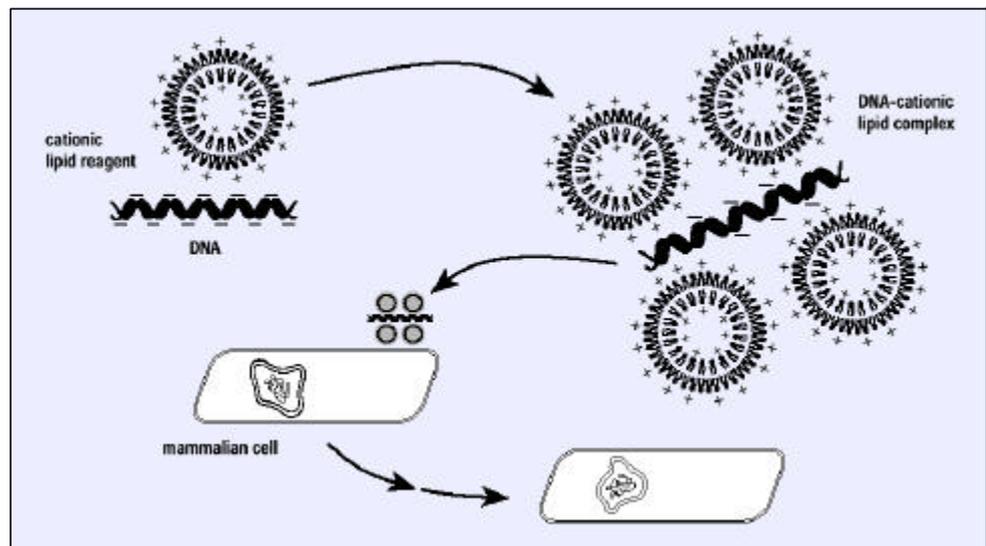


Abb. 1: Transfektion von Mammaliazellen mit Hilfe eines kationischen DNS-Lipidkomplexes (Felgner et al., 1987; Felgner et al., 1989)

Nach folgendem Protokoll wurde die Plasmid-DNS in A549-Zellen transfiziert:

- Aussaat von 2×10^5 A549-Zellen in 6 cm Zellkulturschalen in FCS-, AB/AM-haltigem IMDM
- Kultivierung bis zu einer 30-50 %igen Konfluenz (18-24 h)

- Lösung A (pro Transfektionsansatz): 2 µg Plasmid-DNS in 100 µl serumfreiem OPTI-MEM I-Medium (Life Technologie) verdünnt, bei RT 10-15 min inkubiert
- Lösung B (pro Transfektionsansatz): 10 µg Lipofektin[®]-Reagenz in 100 µl serumfreiem OPTI-MEM I-Medium verdünnt, 30-45 min bei RT inkubiert
- Lösung A und B gemischt und 10-15 min bei RT inkubiert zur Ausbildung des Lipid-DNS-Komplexes
- Zellen 1 x mit serum- und antibiotikafreiem Medium gewaschen
- Zum Transfektionsansatz (Mix aus Lösung A und B) 1,8 ml serumfreies Wachstumsmedium gegeben, gemischt und auf die gespülten Zellen pipettiert
- Zellen 12 h bei 37 °C und 5 % CO₂ mit dem Lipid-DNS-Komplex inkubiert
- Nach Absaugen des Transfektionsmediums Zugabe von serum- und antibiotikahaltigem IMDM
- Kultivierung für 4 Tage unter normalen Zellkulturbedingungen
- Am 5. Tag Zellen 1:3 gesplittet und Selektionsdruck (1 mg/ml G418) ausgesetzt

2.1.6 Selektion von G418-resistenten A549-Klonen

Die G418-Selektion wird ermöglicht durch das Aminoglykosid-Phosphotransferasegen (APH) auf dem Plasmid-Vektor, auch als Kanamycin/Neomycin-Resistenzgen (Kan/Neo) bezeichnet. Für untransfizierte Zellen ist G418 toxisch, da es die Proteinbiosynthese blockiert. Das APH-Resistenzgen phosphoryliert G418 und unterbindet somit dessen zytotoxische Wirkung. Auf diese Weise überlebten die mit dem Plasmid-Vektor transfizierten Zellen.

Für die klonale Selektion wurden die transfizierten Zellen aus den 6 cm-Kulturschalen in 96-well-Platten überführt und durch "limiting dilution" auf eine Zelle pro well vereinzelt. Die Selektionsdauer betrug 4-5 Wochen. Das G418-Selektionsmedium wurde alle 3 Tage gewechselt. Ein einzelner Zellklon wuchs zu einer genetisch einheitlichen Zellkolonie heran, wurde schrittweise auf 48-, 24-, 12- und 6-well-Platten und schließlich in 50- und 300 ml-Zellkulturflaschen vermehrt. Von den A549-Klonen wurden Zellkonserven sowie

Zellpellets hergestellt, die in flüssigem Stickstoff bzw. bei -80 °C für spätere Untersuchungen gelagert wurden.

2.1.7 Kontrolle der Transfektionseffizienz

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde der Plasmid-Vektor pcDNS3.1/His/LacZ (Invitrogen) in die A549-Zellen transfiziert. Das LacZ-Gen ist bakteriellen Ursprungs und codiert für die β -Galaktosidase, die in zellulären Lysaten gegenüber proteolytischen Abbau resistent ist. Die β -Galaktosidaseaktivität ist leicht meßbar durch Zugabe des Galaktosids X-Gal. Blau gefärbte Zellen sind anschließend unter dem Mikroskop zu visualisieren.

Unter Verwendung konstanter Plasmid-DNS von $2\text{ }\mu\text{g}$ wurden 2 verschiedene Lipofektinkonzentrationen (5 und $10\text{ }\mu\text{g}$) sowie 2 verschiedene Inkubationszeiten (5 und 12 h) getestet. Die positiv transfizierten Zellen waren blau gefärbt und konnten lichtmikroskopisch ausgewertet werden. 48 h nach Transfektionsbeginn wurden die Zellen der folgenden X-Gal Färbung (Invitrogen) unterzogen:

- Entfernung des Wachstumsmediums von transfizierten Zellen, 1 x mit $2,5\text{ ml}$ PBS gewaschen
- Zellen mit 3 ml 1 x Fixativ 10 min bei RT inkubiert und anschließend 2 x mit $2,5\text{ ml}$ PBS gewaschen
- Zellen mit $2,5\text{ ml}$ Färbelösung (20 mg/ml X-Gal in DMF) bei 37 °C für $0,5$ - $2,0\text{ h}$ gefärbt
- Zellen während der Färbung bei 200facher Vergrößerung mikroskopiert
- Gesamtzellzahl und Anteil der blauen Zellen in 5 Gesichtsfeldern ausgezählt, Mittelwert berechnet, um die Transfektionseffizienz zu ermitteln (%)

2.1.8 Kultivierung stabil transfizierter A549-Klone

Die Kultivierung der A549-Klone geschah analog der A549-Zelllinie. Der wesentliche Unterschied bestand in der Verwendung von IMDM mit 1 mg/ml G418-Zusatz. Die Klone wurden aufgrund einer verlangsamten Proliferation alle 3 Tage in einem Verhältnis von $1:2$ bis $1:3$ gesplittet.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Nukleinsäure-Analytik

2.2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNS aus A549-Zellen und A549-Klonen

Für die Isolierung der Gesamt-RNS aus A549-Zellen oder aus A549-Klonen wurden die konfluenten Zellen vom Boden der Kulturflasche abgelöst und zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde mit 1 x PBS (PAA) gewaschen.

Die RNS-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen. Prinzipiell wurden die Zellen hier mit einem guanidinisothiocyanat- und β -Mercaptoethanolhaltigen (β -ME) Puffer lysiert, wobei die Proteine denaturiert und RNasen inaktiviert wurden. Das Lysat wurde über eine QIAshredder-Säule homogenisiert. Durch Zugabe von 70%igem Ethanol zum homogenisierten Lysat wurden die Nukleinsäuren gefällt. Nach Bindung der RNS auf der Quarzmembran wurden Kontaminationen mittels Waschpuffer entfernt und die RNS in RNase-freiem Wasser eluiert.

Protokoll:

- Lyse von bis zu 5×10^6 Zellen mit 350 μ l RLT-Puffer (14,5 M β -ME)
- Lysat auf QIAshredder-Säule pipettiert und 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert
- Durchlauf (Homogenat) mit 350 μ l 70%igem Ethanol gemischt (Präzipitat)
- Präzipitat auf RNeasy-Säule pipettiert und 15 s bei 8000 x g zentrifugiert
- Säule mit 700 μ l RW1-Waschpuffer beladen und 15 s bei 8000 x g zentrifugiert
- Säule mit 500 μ l RPE-Waschpuffer beladen und 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert
- RNS von der Säule mit 30-50 μ l RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation bei 8000 x g (1 min) eluiert

2.2.1.2 Isolierung genomischer DNS aus A549-Klonen

Zur Isolierung genomischer DNS wurde der QIAamp[®] DNS Mini Kit (Qiagen) verwendet. Hierfür wurden $1-5 \times 10^6$ Zellen in 200 μ l PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 20 μ l Qiagen Protease sowie 20 μ l RNase A (20 mg/ml) und 10 minütiger Inkubation bei RT wurden 200 μ l Lysepuffer AL zum Ansatz gegeben und dieser 15 s gut geschüttelt. Die Proben wurden 10 min bei 56 °C inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert. Nach Zugabe von 200 μ l 96%igem Ethanol wurden die Proben 15 s geschüttelt, kurz zentrifugiert und auf eine Quarzsäule pipettiert. Es wurde 1 min bei 6000 x g zentrifugiert, das Filtrat verworfen und die Quarzsäule in ein neues Sammelgefäß gesetzt. Die Säule wurde 1 x gewaschen mit 500 μ l AW1, anschließend 1 min bei 6000 x g zentrifugiert, und nochmals mit 500 μ l AW2 gewaschen und 3 min bei 20 000 x g zentrifugiert. Schließlich wurde die Quarzsäule auf ein sauberes Sammelgefäß platziert und die gebundenen DNS mit 200 μ l AE-Puffer eluiert. Der Elutionspuffer wirkte 1-5 min bei RT auf die Säule ein, bevor die Säule 1 min bei 6000 x g zentrifugiert wurde.

2.2.1.3 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNS und DNS erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm mit dem GeneQuant *pro*-Spektrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech) gegen DEPC-Wasser in einer Quarzküvette.

Grundsätzlich kann Nukleinsäure bei einer UV-Wellenlänge von 260 nm photometrisch quantifiziert werden. RNS oder DNS haben bei einer optischen Dichte von 1 ($OD_{260}=1$), und einer Schichtdicke der Quarzküvette von 10 mm eine Konzentration von 40 bzw. 50 μ g/ml. Das Verhältnis der optischen Dichte bei 260 und 280 nm gibt eine Aussage über die Proteinkontaminationen in der Lösung. Reine RNS und DNS haben ein OD_{260}/OD_{280} -Verhältnis von 1,8-2,0.

2.2.1.4 Reverse Transkription

Die aus den Zellen extrahierte Gesamt-RNS wurde in cDNS umgeschrieben, die als Ausgangsmaterial für nachfolgende PCR-Reaktionen diente. Die reverse Transkription erfolgte mit Hilfe von pd(N)₆-Primern (Amersham Pharmacia Biotech) und der Reversen Transkriptase (RT) aus dem Moloney-Murine-Leukemia-Virus (MMLV-RT) von der Firma Promega. Der MMLV-5x-Reaktionspuffer, die RNase-Inhibitoren und die Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP) stammten ebenfalls von der Firma Promega.

Im Ansatz wurde 1 µg RNS mit 0,1 µg pd(N)₆-Primer pipettiert und auf 70 °C für 5 min erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNS aufzuschmelzen. Ein langsames Abkühlen auf 4 °C verhinderte die Neubildung der RNS-Sekundärstruktur und ermöglichte die Hybridisierung der Primer, die als Random-Hexamerprimer zufällig irgendwo an der RNS binden. Danach wurden 5 µl MMLV-5x-Reaktionspuffer, 2 µl 10 mM dNTP, 25 Einheiten RNase-Inhibitor und 200 Einheiten MMLV-RT zum Ansatz pipettiert und auf ein Endvolumen von 15 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert. Im Ergebnis der reversen Transkription entstand ein Doppelstrang aus RNS und cDNS. In der folgenden PCR-Reaktion wurde der RNS/cDNS-Doppelstrang hitzedenaturiert. Der cDNS-Strang diente als Template für die Polymerisation.

2.2.1.5 PCR-Reaktionen zur Amplifikation von cDNS und Gesamt-DNS

Amplifikation von Kathepsin L-cDNS-Fragmenten:

Es wurden 3 Kathepsin L-cDNS-Fragmente in folgender Basenpaarlänge (bp) mit den entsprechenden Primerpaaren (Tabelle 2) amplifiziert:

- Kathepsin L-g / Kodierende Sequenz, 1-1002 bp
- Kathepsin L-a / Kodierenden Sequenz, 1-588 bp
- Kathepsin L-e / Kodierenden Sequenz, 264-1002 bp

Tabelle 2: Primersequenzen zur Amplifikation der 1002, 588 und 738 bp großen Kathepsin L-cDNS-Fragmente

Kathepsin L cDNS-Fragmente	Primersequenzen
Kathepsin L-g sense/antisense	5'-ATG AAT CCT ACA CTC ATC CTT GC-3' 5'-TCA CAC AGT GGG GTA GCT G-3'
Kathepsin L-a sense/antisense	5'-ATG AAT CCT ACA CTC ATC CTT GC-3' 5'-CAG GCC TCC ATT ATC CTG AA-3'
Kathepsin L-e sense/antisense	5'-CAG GCA GGT GAT GAA TGG CT-3' 5'-TCA CAC AGT GGG GTA GCT G-3'

Die Primer wurden von der Firma BioTeZ Berlin Buch GmbH oder Life Technology synthetisiert. Der 10 x NH₄-Reaktionspuffer (pH 8,8), das 50 mM MgCl₂ und die 5 U/ml *Taq*-DNS-Polymerase stammten von der Firma InViTek. Wir verwendeten die 10 mM dNTP der Firma Promega. Die PCR-Reaktionsgemische sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Stammlösungen, Konzentrationen und Volumina im PCR-Ansatz zur Amplifikation der 1002, 588 und 738 bp großen Kathepsin L cDNS-Konstrukte

Stammlösungen	Konzentrationen/ Volumen im Ansatz
NH ₄ -Reaktionspuffer	1 x
MgCl ₂	1 mM
dNTP	0,2 mM
<i>Taq</i> -DNS-Polymerase	1,25 U
Primer, sense	1 pmol/μl
Primer, antisense	1 pmol/μl
cDNS	1 μl
Aqua destillata (A.d.)	ad 50 μl

Die Kathepsin L-Transkripte wurden unter folgenden Bedingungen amplifiziert (Tabelle 4).

Tabelle 4: Temperaturbedingungen zur Amplifikation der spezifischen Kathepsin L-Transkripte (Mastercycler personal, Eppendorf)

Zyklus	Kathepsin L-g	Kathepsin L-a	Kathepsin L-e
Denaturierung	94 °C, 3 min	94 °C, 3 min	94 °C, 3 min
Denaturierung	94 °C, 1 min	94 °C, 30 sec	94 °C, 1 min
Annealing	52 °C, 1 min	56 °C, 30 sec	52 °C, 1 min
Elongation	72 °C, 1 min	72 °C, 1 min	72 °C, 1 min
	30-35 Wiederholungen	30-35 Wiederholungen	30-35 Wiederholungen
Elongation	72 °C, 5 min	72 °C, 5 min	72 °C, 5 min

Amplifikation von Kathepsin L- und Neomycin (neo)-Fragmenten auf Gesamt-DNS:

Auf Gesamt-DNS wurde ein 324 bp großes Kathepsin L-Fragment sowie ein 397 bp großes neo-Fragment amplifiziert. Bei dem neo-Fragment handelte es sich um ein Resistenzgen, das auf dem Plasmid-Vektor pCR3.1 lokalisiert ist. Die für die Synthese dieser DNS-Fragmente benötigten Primersequenzen gehen aus Tabelle 5 hervor. Der PCR-Ansatz entspricht hinsichtlich der verwendeten Stammlösungen und Konzentrationen dem in Tabelle 3 dargestellten Ansatz. Die Zyklusbedingungen zur Amplifikation der Kathepsin L- und neo-Fragmente sind in den Tabellen 6 und 7 dargestellt.

Tabelle 5: Primersequenzen zur Amplifikation des 324 bp großen Kathepsin L- und 397 bp großen neo-Fragmentes

DNS-Fragmente	Primersequenzen
Kathepsin L	5`-CAG GCA GGT GAT GAA TGG CT-3`
sense/antisense	5`-CAG GCC TCC ATT ATC CTG AA-3`
neo sense/antisense	5` - GAT GCC GCC GTG TTC C-3`
	5` - GCC CCT GAT GCT CTT CGT C-3`

Tabelle 6: Temperaturbedingungen für die Amplifikation des 324 bp großen Kathepsin L-Fragmentes

Zyklus	Kathepsin L-324 bp
Denaturierung	94 °C, 30 s
Annealing	60 °C, 30 s Temperaturerniedrigung um 0,5 °C/Zyklus
Elongation	72 °C, 30 s
Reproduktion	19 Wiederholungen
Denaturierung	94 °C, 30 s
Annealing	50 °C, 30 s
Elongation	72 °C, 30 s
	Zeitverlängerung um +0,01 s/Zyklus
Reproduktion	19 Wiederholungen

Tabelle 7: Temperaturbedingungen für die Amplifikation des 397 bp großen neo-Fragmentes

Zyklus	neo-397 bp
Denaturierung	94 °C, 3 min
Denaturierung	94 °C, 30 s
Annealing	60 °C, 30 s
Elongation	72 °C, 1 min
	35 Wiederholungen
Elongation	72 °C, 5 min

2.2.1.6 Amplifikation von cDNS durch quantitative Echtzeit-PCR

Die Amplifikation der Kathepsin L-cDNS wurde im Light Cycler (Idaho Technology) mit den oben erwähnten Primerpaaren (vgl. Tabelle 5) für das 324 bp große Fragment durchgeführt. Als ein externer Standard wurde das "housekeeping"-Gen β -Actin, das in Zellen in konstanten Konzentrationen exprimiert wird, verwendet. Die β -Actin-spezifischen Primerpaare (sense 5' TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA 3', antisense 5' CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT GGA GGG 3') amplifizierten ein 661 bp großes cDNS-Fragment. Der PCR-Ansatz für den Light Cycler geht aus Tabelle 8 hervor.

Tabelle 8: Stammlösungen, Konzentrationen und Volumina im PCR-Ansatz zur Amplifikation des 324 bp großen Kathepsin L-cDNS-Konstruktes

Stammlösungen	Konzentrationen/Volumen im Ansatz
SYBR [®] Green	0,4 x
dNTP	0,2 mM
MgCl ₂	3 mM
Taq-DNS-Polymerase	0,4 U
Primer for	0,5 pmol/μl
Primer rev	0,5 pmol/μl
cDNS	2,5 μl
A.d.	ad 25 μl

Der PCR-Ansatz für β -Actin entsprach dem des Kathepsin L-Ansatzes. Es kamen hier die entsprechenden β -Actin-Primerpaare zum Einsatz. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Hierfür wurden je 10 μ l des PCR-Ansatzes in Glaskapillaren pipettiert, kurz zentrifugiert und in das 24 Proben fassende Karussell der Light Cycler-Temperaturkammer positioniert. Die spezifischen Zyklusbedingungen für die Amplifikation des Kathepsin L- und β -Actin-Fragmentes sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Temperaturbedingungen für die Amplifikation des 324 bp großen Kathepsin L- und des 661 bp großen β -Actinfragmentes

Zyklus	Kathepsin L-324 bp	β-Actin-661 bp
Denaturierung	95 °C, 30 s	95 °C, 15 s
Denaturierung	95 °C, 0 s	95 °C, 0 s
Annealing	66 °C, 3 s	64 °C, 3 s
Elongation	72 °C, 13 s	72 °C, 20 s
Meßpunkt	80 °C, 0 s	86 °C, 0 s
	40 Wiederholungen	40 Wiederholungen
Schmelzen	95 °C, 0 s	95 °C, 0 s

In jedem Light Cycler Lauf wurden 3 bekannte Ausgangskonzentrationen des jeweilig zu amplifizierenden cDNS-Fragmentes (Kathepsin L oder β -Actin) zur Erstellung einer internen Standardkurve mitgeführt. Bei diesem als Standard

definiertem Ausgangsmaterial handelte es sich um Plasmid-DNS mit integriertem Kathepsin L- (324 bp) bzw. β -Actin-Fragment (661 bp). Diese Standards wurden auf folgende Konzentrationen eingestellt.

- Kathepsin L-Standard 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} $\mu\text{g/ml}$
- β -Actin-Standard 10^0 , 10^{-2} , 10^{-4} $\mu\text{g/ml}$

Da SYBR[®]Green an jegliche Doppelstrang-DNS bindet, unabhängig ob es ein spezifisches oder unspezifisches Produkt ist, wurden die PCR-Produkte nach 40 Zyklen bei 95 °C geschmolzen. Bei der Temperaturerhöhung auf 95 °C sinkt die Fluoreszenzintensität des SYBER[®]Greens zunächst linear. Ist die für das DNS-Produkt spezifische Schmelztemperatur erreicht (87 °C für Kathepsin L-Fragment), kommt es zu einem steilen Fluoreszenzabbruch. Das DNS-Produkt denaturiert zum Einzelstrang und setzt den gesamten Fluoreszenzfarbstoff frei. Unspezifische Produkte und Primerdimere schmelzen unterhalb dieser spezifischen Schmelztemperaturen und können auf diese Weise detektiert werden. Letztendlich diente die Schmelzkurve der Kontrolle, um die Spezifität der amplifizierten Produkte nachzuweisen. Es wurden die Kathepsin L- und β -Actinkonzentrationen anhand der internen Standardkonzentrationen bestimmt sowie ihre Produktgrößen mittels Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert.

2.2.1.7 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden Agarosegele (Peq Gold Universal Agarose, Peqlab) in entsprechenden Konzentrationen verwendet. Für die Auftrennung von 0,2 bis 0,7 kb großen Fragmenten verwendeten wir 1,2 % Agarose, für 1 bis 5 kb große Fragmente eine Agarosekonzentration von 0,7 %. Die erforderliche Agarosemenge wurde in 200 μl 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle bis zur Transparenz erhitzt. Nach Abkühlen auf ca. 55 °C wurde die Agarose in einen Gelträger zum Aushärten gegossen. Das bei RT erstarrte Gel wurde für 5-10 min in 2 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid gefärbt und in die Elektrophoresekammer überführt. Die Proben wurden mit Blau/Orange-6x-Ladefarbstoff (Promega) gemischt und in die vorgeformten Geltaschen gefüllt. Es wurde zur Identifikation der DNS-Fragmente eine entsprechender Längenstandard mitgeführt (z.B.100 Basenpaar-Leiter, Promega). Bei einer angelegten Spannung

von 80-100 Volt migrierte die negativ geladene DNS zur Anode. Durch den DNS-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid wurden die DNS-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die DNS-Fragmente wurden über Videokamera aufgenommen und mit Hilfe des computergestützten E.A.S.Y.-Dokumentationssystem der Firma Herolab bearbeitet und gespeichert.

2.2.2 Herstellung von Vektorkonstrukten

2.2.2.1 Klonierung von cDNS-Fragmenten in Plasmid-Vektor pCR3.1

Für die Klonierung von cDNS-Fragmenten wurde der pCR3.1-Vektor aus dem Eukarioten-TA-Klonierungskit der Firma Invitrogen verwendet. Der pCR3.1-Vektor ist linearisiert und hat überhängende 3'-Desoxythymidinreste. Da *Taq*-DNS-Polymerase an die 3'-Enden von PCR-Produkten Desoxyadenosinreste knüpft, ist eine Ligation der PCR-Produkte mit dem Vektor möglich.

Die wesentlichen Bestandteile des Vektors sind der CMV-Promotor (Cytomegalovirus), der ColE1-Replikationsursprung, der für eine hohe Kopiezahl pro Zelle in *E.coli* sorgt (über 500 Kopien), die Ampicillin/Kanamycin- bzw. Neomycinresistenzgene, zur Selektion in *E.coli* und Mammalia Zelllinien sowie die multiple Klonierungsstelle.

Es wurden die 3 Kathepsin L-cDNS-Fragmente, die unter Punkt 2. 2. 1. 5 amplifiziert worden kloniert. Der Klonierungsansatz geht aus Tab. 10 hervor und wurde bei 14 °C über Nacht (ü.N.) inkubiert:

Tabelle 10: Klonierungsansatz der Kathepsin L-Fragmente in den Plasmid-Vektor pCR3.1 sowie Klonierungsansatz des Plasmid-Vektors pCR3.1 ohne Insert

Reagentien	cDNS-Fragment (Kathepsin L)	pCR3.1-Vektor
PCR-Produkt	1 µl	∅
10x Ligationspuffer	1 µl	1 µl
PCR3.1-Vektor (30 ng/µl)	2 µl	2 µl
T4-DNS-Ligase (4 U/µl)	1 µl	1 µl
Steriles A.d.	5 µl	6 µl

2.2.2.2 Transformation von E.coli mit Plasmid-DNS

Für die Transformationen wurden kommerziell gefertigte kompetente E. coli-Zellen des Stammes TOP10F' (Invitrogen) verwendet. Auf 50 µl kompetente Zellen wurden 2 µl 0,5 M β-ME pipettiert und gemixt. 2 µl des Ligationsansatzes wurden auf die kompetenten Zellen pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad wurde der Ansatz auf Eis gestellt, mit 250 µl SOC-Medium versehen und 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 225 rpm inkubiert. Anschließend wurden 50-200 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die 25 µg/ml Kanamycin enthielten zur Selektion der E.coli Kolonien mit integriertem pCR3.1-Plasmid. Die LB-Agarplatten wurden über Nacht (12-16 h) bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.3 Minipreparation von Plasmid-DNS

10 bis 12 transformierte E.coli-Kolonien wurden in eine 3 ml LB-Boullion mit 50 µg/ml Kanamycin überimpft und 10-12 h im Schüttelinkubator bei 225 rpm und 37 °C inkubiert. Daran schloß sich die Plasmidisolierung nach der Miniprep-Methode der Firma Qiagen an.

Ein Teil der Bakterienkultur wurde zum Glycerin-Stock verarbeitet, um eine Langzeitlagerung bei -80 °C zu ermöglichen. Hierfür wurden $150\text{ }\mu\text{l}$ Bakterienkultur mit $850\text{ }\mu\text{l}$ Glycerinlösung (68 %) gemischt.

2 ml der Bakteriensuspension wurden bei $13\ 000\text{ rpm}$ 2 min zentrifugiert und das Pellet in $250\text{ }\mu\text{l}$ P1-Puffer lysiert. Nach Zugabe von $250\text{ }\mu\text{l}$ P2-Puffer wurde das Lysat gemischt sowie nach Zugabe von $350\text{ }\mu\text{l}$ N3-Puffer. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurde der Überstand auf eine Quarzsäule pipettiert. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurde die Säule zweimal mit PE-Puffer gewaschen. Die Plasmid-DNS wurde mit $50\text{ }\mu\text{l}$ MilliQ-Wasser durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit von der Säule eluiert.

Das Prinzip der Plasmidisolierung beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterien durch NaOH/SDS-haltigen Puffer (P2) in Gegenwart von RNase A (P1). SDS löst Phospholipide und Proteinkomponente der Zellmembran und führt zur Lyse und Freisetzung des Zellinhaltes. NaOH denaturiert die chromosomale und Plasmid-DNS sowie die Proteine. Die Lysate werden mit einem hochkonzentrierten Salzpuffer neutralisiert (N3), der eine Präzipitation der denaturierten Proteine, der chromosomalen DNS, der zellulären Bruchstücke und des SDS bewirkt. Die wesentlich kleinere Plasmid-DNS bleibt dabei in Lösung und sammelt sich während eines Zentrifugationsschrittes im Überstand. Dieser wird auf eine Quarzmembran pipettiert, die durch Zentrifugation die Plasmid-DNS adsorbiert. Die Membran wird mit Waschpuffer (PE) gewaschen und die Plasmid-DNS in MilliQ-Wasser eluiert.

2.2.2.4 Reinigung der Plasmid-DNS

Zur Reinigung der Plasmid-DNS kam der EndoFree-Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen zum Einsatz. Ausgehend von den transformierten E.coli-Kolonien oder den Glycerinstocks wurden kanamycinhaltige (Kan) LB-Agarplatten mit Plasmid-DNS-positiven E. coli frisch beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelkolonien wurden in 3 ml kanamycinhaltige LB-Flüssigkultur überimpft und 8 h bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Diese Vorkultur wurde erneut 1:500

verdünnt in 100 ml LB-Medium und 10-12 h bei 37 °C und 300 rpm geschüttelt. Aus dieser 100 ml-Starterkultur wurde Plasmid-DNS isoliert.

Das Prinzip der EndoFree-Plasmidisolierung ähnelt dem der Miniprep-Isolierung. Das Bakterienpellet wird alkalisch lysiert und anschließend mit saurem Kaliumacetatpuffer neutralisiert. Im Gegensatz zur Miniprep-Plasmidisolierung wird das Lysat hier durch Filtration über spezielle Säulen von den präzipitierten Zellbestandteilen (SDS-Präzipitat, denaturierte DNS und Proteine) geklärt. Es schließt sich ein Endotoxin-Eliminierungsschritt an, der durch Zugabe eines speziellen ER-Puffers verhindert, dass LPS-Moleküle an der QIAGEN Anion-Austausch-Resinmembran binden. An der positiv geladenen Resinmembran (Quarzkügelchen, beschichtet mit positiv geladenen Diethylaminoethanolgruppen, DEAE) können negativ geladene Phosphate der DNS-Struktur binden. Bestimmte Salzkonzentrationen (1,0-1,25 M NaCl) und pH-Bedingungen der nachfolgenden Waschpuffer bewirken die Elution von unerwünschten RNS- und DNS-Bestandteilen. Plasmid-DNS bleibt über einen größeren Bereich verschiedener niedermolekularer Salzgehalte und pH-Werte an den DEAE-Gruppen der Resinmembran gebunden. Mit einer 1,6 M NaCl-Konzentration wird Plasmid-DNS schließlich eluiert. Die eluierte Plasmid-DNS wird durch Isopropanolpräzipitation konzentriert und in endotoxinfreiem, 70%igen Ethanol von Salz- und Isopropanolresten gereinigt. Schließlich wird sie luftgetrocknet und in 200-500 µl endotoxinfreiem TE-Puffer oder Ampuwa[®]-Wasser (Fresenius) aufgenommen.

Die Plasmid-DNS-Konzentrationen wurde photometrisch bestimmt (Ultraspec 3000 Pharmacia Biotech).

2.2.2.5 Spaltung von Plasmid-DNS mit Restriktionsendonukleasen

Die isolierte Plasmid-DNS wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen (BamH I, Hinc II, Bgl II) zur Kontrolle der integrierten cDNS-Fragmente geschnitten. Dazu wurde entsprechend der Herstellervorgaben ein 10 µl Restriktionsenzym-Ansatz hergestellt, bestehend aus Endonuklease (1,5-3,0 U), 10 x OPA-Puffer *PLUS* (Pharmacia Biotech), 1-2 µg Plasmid-DNS und DEPC-Wasser.

Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und in einem 0,7%igem Agarosegel in TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Identifizierung der Fragmentgrößen diente die peQGOLD 1 kb-DNS-Leiter (PeqLab).

2.2.2.6 Sequenzierung von Plasmid-DNS und integrierten cDNS-Fragmenten

Die Sequenzierung der integrierten cDNS-Fragmente erfolgte durch die Firma SEQLAB (Sequence Laboratories Göttingen GmbH). Die Plasmid-DNS-Proben wurden auf eine Konzentration von 200 ng/μl in einem Volumen von 30 μl eingestellt und verschickt.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Micro BCA™ Protein Assay der Firma Pierce Endogen. Hierfür wurden $1-4 \times 10^6$ Zellen in 0,25-1,0 ml Lysepuffer lysiert (30 min auf Eis), und anschließend 5 min bei 1000 x g oder maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. In Abhängigkeit der Untersuchungsabsichten wurden die Zellen in neutralem (0,5 % TritonX-100/PBS, pH 7,2), saurem (0,5 % TritonX-100/Na-Acetat, pH 5,5) oder inhibitorhaltigem Lysepuffer (1 % TritonX-100, NaF, NaCl, Hepes, Na-Orthovanadat, PMSF, Aprotinin, Leupeptin) lysiert. Der im Kit enthaltene BSA-Standard (Bovine Serum Albumin, 2 mg/ml) und die zu untersuchenden Lysate wurden entsprechend verdünnt. Für die Bestimmung wurden je 100 μl BSA-Standard und Proben in 96-well-Platten pipettiert und anschließend mit 100 μl BCA-Arbeitsreagenz gemischt. Dieses BCA-Arbeitsreagenz bestand aus 25 Teilen Reagenz MA (Na_2CO_3 , NaHCO_3 , Natriumtartrat in 0,5N NaOH) 24 Teilen Reagenz MB (Bicinchonininsäure) und ein Teil Reagenz MC (CuSO_4). Die 96-well-Platte wurde 30 s geschüttelt und lichtgeschützt 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm im Plattenreader (Dynatech MR 5000) gemessen.

Das Prinzip dieses Assays beruht auf einer Cu^{2+} -Bindung an die Peptidbindungen der Proteine und dessen Reduktion zu Cu^+ in alkalischer Umgebung. Der Cu^+ -Komplex kann von Bicinchonininsäure (BCA) detektiert werden. Proportional zur Proteinmenge entsteht ein violettes Reaktionsprodukt, bestehend aus 2 Molekülen BCA mit einem Kupferion (Cu^+). Das Absorptionsmaximum dieses Komplexes liegt zwischen 540-590 nm.

2.3.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

2.3.2.1 Kathepsin L-ELISA 1

Die quantitative Kathepsin L-Messung in Zelllysaten erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Sandwich-ELISA (KRKA, J. Stefan Institute Ljubljana, Slovenia). Die im Kit befindlichen Mikrotiter-Strips waren mit einem polyklonalen Anti-human-Kathepsin L-Antikörper (AK) vom Schaf beschichtet. Das zu quantifizierende Kathepsin L hatte an diese Festphaseantikörper gebunden. Ein zweiter Anti-human- Kathepsin L-AK vom Schaf, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (MPOD), detektierte das Kathepsin L-Antigen. Dieser enzymgekoppelte Komplex wurde durch Zugabe von TMB-Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Hydrogenperoxid) sichtbar gemacht. Es entwickelte sich ein blauer Farbkomplex, der nach Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure gelb wurde. Die Lichtabsorption des Farbkomplexes wurde bei 450 nm im Plattenreader Dynatech MR 5000 gemessen und ist der Kathepsin L-Konzentration im Untersuchungsmaterial proportional. Die Kathepsin L-Konzentration wurde über einen mitgeführten Kathepsin L-Standard bestimmt.

2.3.2.2 Kathepsin L-ELISA 2

Weiterhin wurde ein, in unserer Arbeitsgruppe etablierter, Kathepsin L-ELISA für die quantitative Kathepsin L-Messung in Zelllysaten und Kulturüberständen eingesetzt. Als Fang- und Detektions-AK dienten zwei monoklonale Antikörper (33/1-mAK und 33/2-mAK), die freundlicherweise von Dr. E. Weber, Institut für

Physiologische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle, zur Verfügung gestellt wurden (Weber et al., 1994). Als Kathepsin L-Standard wurde rekombinantes humanes Kathepsin L aus der Hefe, welches von Prof. Dr. D. Brömme, Mt. Sinai Medical School zur Verfügung gestellt wurde, genutzt. Es wurde der Kathepsin L-Gehalt in Zelllysaten und Kulturüberständen bestimmt. Die Zellpellets wurden lysiert (0,5 % TritonX-100/PBS) und die Gesamtproteinkonzentration im Zelllysate bestimmt.

Die Zellkulturüberstände wurden geerntet, bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, der Niederschlag verworfen. Der Überstand wurde über einem Proteinkonzentrations-Filter eingengt. 1,5 ml Überstand wurden hierfür in Centrex UF-2-Filter (Schleicher und Schuell) pipettiert, bei 5000 x g 30 min zentrifugiert und auf ein Volumen von 300-400 µl eingengt. Der konzentrierte Überstand wurde für die Kathepsin L-Messung eingesetzt.

ELISA-Protokoll:

- 10-20 µg/ml 33/1-mAK wurde in 0,2 M Na-Carbonatpuffer (pH 9,4-9,7) auf "High binding" 96-well-Platten (Costar) bei 4 °C über Nacht adsorbiert
- Waschen mit 300 µl PBS/Tween
- Blocken mit 300 µl 3 % BSA/PBS, 1 h bei 37 °C inkubiert
- Waschen mit 300 µl PBS/Tween
- 100 µl Kathepsin L-Standard, Lysate und Kulturüberstände in 3 % BSA/PBS, 1 h bei 37 °C inkubiert
- Waschen mit 300 µl PBS/Tween
- 100 µl 33/2-mAK-Biotin gekoppelt (0,666 µg/ml-1,3 µg/ml in 3% BSA/PBS), 1 h bei 37 °C
- Waschen mit 300 µl PBS/Tween
- 100 µl ExtraAvidin-AP (Alkalische Phosphatase) - Konjugat (Sigma, 1:500 in 3 % BSA/PBS), 1 h bei 37 °C inkubiert
- Waschen mit 300 µl PBS/Tween
- 100 µl AP-Substrat (Sigma, p-Nitrophenylphosphat-Tabletten-Set), 20 min, dunkel bei RT entwickelt
- Stoppen der Enzymreaktion durch Zugabe von 100 µl 1 N NaOH
- Absorptionmessung bei 405 nm im Plattenreader

2.3.2.3 ELISA´s zum Nachweis verschiedener Zytokine

Für die Messung der Zytokinkonzentrationen wurden Zellkulturüberstände geerntet, bei maximaler Geschwindigkeit 5 min zentrifugiert, der Niederschlag verworfen, die Überstände in 1,0 ml aliquotiert und bis zur Analyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Für die Messung von IL-8, IL-6, IL-18 und MCP-1 wurden Immunassays der Firma R&D (Quantikine[®]) verwendet. Bei allen Assays ist ein entsprechender monoklonaler Fangantikörper bereits an Mikrotiter-Strips gebunden. Nach Bindung von Standard- und Probenprotein kann ein Meerrettich-Peroxidase-konjugierter polyklonaler AK das gebundene Antigen detektieren. Nach Entfernung ungebundener Substanzen und überschüssiger Antikörper/Enzymverbindungen wird durch Substratzugabe ein Farbkomplex entwickelt, der proportional der gebundenen Antigenmenge ist. Die Absorption wurde bei 450 nm im Plattenreader gemessen.

Messung von TGF- β 1 und TGF- β 2

nach Reinhold, Bank et al., 1997

Vor der Messung von TGF- β 1 und - β 2 in Kulturüberständen wurden die Proben aktiviert durch Zugabe von 10 μl 2,5 M HCl und 30 minütiger Inkubation bei 37 $^{\circ}\text{C}$ unter Schütteln. Durch Zugabe von 10 μl 2,5 M NaOH wurde der Aktivierungsansatz neutralisiert.

Protokoll für TGF- β 1/2-ELISA :

- monoklonaler Maus-anti-TGF- β 1-, - β 2-, - β 3-Antikörper (2 $\mu\text{g/ml}$, R&D Systems) wurde in Coating-Puffer verdünnt, auf hochaffine ELISA-Platten (Greiner, 100 $\mu\text{l/well}$) pipettiert und über Nacht bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert zur Adsorption
- Waschen mit PBS/Tween
- mit Blocking-Puffer wurden freie Proteinbindungsstellen blockiert, 200 $\mu\text{l/well}$, 1 h bei RT inkubiert
- Waschen mit PBS/Tween

- 100 μ l/well TGF- β 1-Standard (25 ng/ml in Waschpuffer, R&D Systems) bzw. TGF- β 2-Standard (25 ng/ml rekombinantes TGF- β 2, Genezyme) und Proben 1 h bei 37 °C inkubiert
- Waschen mit PBS/Tween
- 100 μ l/well Huhn-anti-TGF- β 1, (10 μ g/ml in Antikörper-Puffer, R&D Systems) bzw. Kaninchen-anti-TGF- β 2 (2,5 μ g/ml in Antikörper-Puffer, R&D), 1 h, 37 °C inkubiert
- Waschen mit PBS/Tween
- 100 μ l/well Kaninchen-anti-Huhn-Biotin-AK, (Dianova) 1:5000 in Antikörper-Puffer bzw. Esel-anti-Kaninchen-Phosphatase (Dianova) 1:2500 in Antikörper, 1 h bei RT inkubiert
- Waschen mit PBS/Tween
- 100 μ l/well Streptavidin-Phosphatase, 1:500 in PBS/Tween zum TGF- β 1-Ansatz, 1h bei RT inkubiert bzw. Substratzugabe zum TGF- β 2-Ansatz, 30 min bei RT, Stoppen mit 2 N NaOH, Absorptionsmessung bei 405 nm (Substrat=SIGMA FASTTM p-Nitrophenylphosphate-Tabletten-Set)
- Waschen des TGF- β 1-Ansatzes mit PBS/Tween, 3 x
- Substratzugabe (SIGMA FASTTM p-Nitrophenylphosphat-Tabletten-Set, Sigma), pNPP-Tabletten und Tris-Puffer-Tablette in 20 ml A.d. lösen, 100 μ l/well, 30 min bei RT
- Stoppen mit 50 μ l 2 N NaOH
- Absorptionsmessung bei 405 nm

2.3.3 Polyakrylamidgel-Elektrophorese von Proteinen

Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophoresesystem (BioRad) sowie mit dem NuPAGE[®] Bis-Tris-Elektrophoresesystem (Invitrogen). Folgende Gele kamen zum Einsatz:

SDS-haltiges Trenn- und Sammelgel:

Tabelle 11: Rezeptur von SDS-haltigen Trenn- und Sammelgelen

Puffer und Reagentien	Trenngel, 15 %	Sammelgel, 4,5 %
30% Acrylamid/Bisacrylamid	10 ml	4,5 ml
Trenngelpuffer UGB	5 ml	
Sammelgelpuffer LGB		2,5 ml
10 % APS	66 µl	30 µl
TEMED	20 µl	20 µl
68 % Glycerol		0,7 ml
A. d.	ad 20 ml	ad 10 ml

Das flüssige Trenngel wurde zwischen zwei ethanolgereinigte Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation bei RT wurde das Isopropanol entfernt, die Trenngeloberfläche mit A.d. gespült, mit dem Sammelgel überschichtet und der Probenkamm eingesetzt.

Die zu trennenden Proben wurden mit DTT (Dithiothreitol)-versetztem Laemmli-Sample-Puffer (BioRad) im Verhältnis 1:1 gemischt und dabei reduziert, 5 min bei 95 °C erhitzt, abgekühlt und in die Geltaschen gefüllt. Ein Molekulargewichtsmarker ("SeeBlue™ Plus2", Novex) zur Identifikation der Proteingröße wurde mitaufgetragen. Der negativ geladene SDS-Protein-Komplex wanderte im 1 x Tris-Glycine-SDS-Elektrophoresepuffer (BioRad) unter Anlegung einer Spannung von 140 Volt zur Anode.

NuPage™ Bis-Tris-HCL gepuffertes Polyacrylamidgel (pH 6.4, 4-12 % Acrylamid):

Die kommerziell bezogenen Bis-Tris-Gele enthalten kein SDS und mussten daher unter denaturierenden, SDS-haltigen Elektrophoresebedingungen behandelt werden.

Die Proben wurden mit LDS-Sample-Puffer und DTT (2,5 mM) reduziert und 10 min unter Schütteln bei 70 °C inkubiert. Sie und ein Molekulargewichtsmarker wurden in die Geltaschen pipettiert. Als Laufpuffer wurde der NuPage™-MES-SDS-Puffer (20 x) verwendet. In die obere Pufferkammer wurden 500 µl

NuPage™-Antioxidant gegeben, um die reduzierten Proteine während der Elektrophorese vor einer Reoxidation zu schützen. Die Elektrophorese lief bei einer Spannung von 200 Volt 30 min.

2.3.4 Proteintransfer mittels Western Blot

Für den Proteintransfer wurden das Sammelgel entfernt. Das in Aqua dest. und Transferpuffer^{a/b} angefeuchtete Gel wurde zwischen 2 Lagen Transferpuffer getränktes Gel-Blotting-Papier (Schleicher & Schuell) platziert. Auf das Gel wurde luftblasenfrei die Nitrozellulosemembran (Hybond™ECL™, Amersham Pharmacia Biotech) gebettet. Da der Proteintransfer von der Kathode zur Anode erfolgt, muß beim Aufbau des Blots die Nitrozellulosemembran der Anode zugewandt sein. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Stromstärke von 0,8-3 mA/cm² (Semidry Electrobloetter, Owl).

Überschüssige freie Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran wurden durch Inkubation mit 5 % Magermilch/PBS bei 4 °C über Nacht blockiert.

2.3.5 Immunfärbung

Die weitere Behandlung der Nitrozellulosemembran wurde wie folgt unter kontinuierlichem Schütteln durchgeführt:

Blot 2-3 x Waschen mit PBS/Tween

Primärantikörper in Verdünnungspuffer \Longrightarrow 1 h bei RT inkubiert

3 x 10 min waschen in PBS/Tween

Sekundärantikörper in Verdünnungspuffer \Longrightarrow 1 h bei RT inkubiert

2 x 10 min waschen in PBS/Tween

1 x 10 min waschen in AP-Puffer

BCIP/NBT-Substrat verdünnt in AP-Puffer \Longrightarrow 10-20 min bei RT inkubiert, bis violetter Farbkomplex deutlich sichtbar war
(33 µl/66 µl in 10 ml AP-Puffer)

Verwendete Antikörper:

Primärantikörper	Monoklonaler Anti-human-Kathepsin L-AK (33/2) aus der Maus, 1:10000 in Verdünnungspuffer
	Polyklonaler Anti-human-Kathepsin D-AK vom Kaninchen, 1:5000 in Verdünnungspuffer
Sekundärantikörper	Esel-anti-Maus IgG, Peroxidase-gekoppelt, 1:5000 in Verdünnungspuffer
	Esel-anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-gekoppelt, 1:5000 in Verdünnungspuffer

2.3.6 Bestimmung von Enzymaktivitäten**2.3.6.1 Anreicherung der lysosomalen/endosomalen Fraktion von
A549- Zellklonen**

nach Tournu et al., 1998

Für die Bestimmung der Enzymaktivitäten von Cysteinproteasen in A549-Klonen wurde die lysosomale/endosomale Fraktion dieser Zellen isoliert. Dazu wurden 10×10^6 Zellen geerntet, in PBS gewaschen, in 2 ml 0,25 M Saccharosepuffer resuspendiert und 5 x durch eine „26-gauge“-Kanüle gezogen, um die äußere Zellmembran mechanisch zu zerstören. Das Zellhomogenat wurde 2 min bei 2000 x g zentrifugiert und das kernhaltige Sediment verworfen. Der Überstand wurde bei 70 000 x g 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Das endosomale/lysosomale Zellpellet wurde in hypotonem, 50 mM Na-Acetatpuffer/0,2 mM EDTA (pH 5,5), resuspendiert und neben der zytoplasmatischen Fraktion (Überstand nach Zentrifugation bei 70 000 x g) bei -20 °C eingefroren. Es erfolgte eine Proteinbestimmung in der endosomalen/lysosomalen und zytoplasmatischen Fraktion wie oben beschrieben.

2.3.6.2 Bestimmung der Kathepsin L-Aktivität

nach Barrett et al., 1981

Das für die Messung der Kathepsin L-Aktivität verwendete Z-Phe-Arg-AMC-Substrat (Bachem) ist nicht nur von Kathepsin L sondern auch von Kathepsin B spaltbar. Daher ist die Kathepsin L-Aktivitätsbestimmung in Anwesenheit des Kathepsin B-spezifischen Inhibitors CA 074-Me durchgeführt worden. Die CA 074-Me-resistente Aktivität entspricht in den A549-Klonen im Wesentlichen der Kathepsin L-Aktivität und wurde ausgewertet.

Weiterhin bestimmten wir die Kathepsin B-Aktivität mit dem spezifischen Z-Arg-Arg-AMC-Substrat (Bachem) und die Kathepsin K-Aktivität mit Z-Gly-Pro-Arg-AMC. Für die Enzymansätze wurden schwarze FluoroNunc™-Mikrotiterplatten verwendet. Proben, Substrate und Inhibitoren wurden in 50 mM Na-Acetattpuffer/0,2 mM EDTA verdünnt unter Zusatz von 5 mM DTT (pH5.5). Pro Ansatz wurden 50 µl Probe (endosomale/lysosomale Fraktion und zytoplasmatische Fraktion), 50 µl Inhibitor und 50 µl Substrat pro well nach folgendem Schema pipettiert:

50 µl ⇨ Probe in 50 mM Na-Acetattpuffer/ 0,2 mM EDTA/ 5 mM DTT
 50 µl ⇨ Inhibitoren (∅, E64, CA 074-Me)
 50 µl ⇨ Substrat (Z-Phe-Arg-AMC, Z-Arg-Arg-AMC,
 Z-Gly-Pro-Arg-AMC)

Konzentrationen im Ansatz:

Proben	100 µg/ml Protein
Z-Phe-Arg-AMC	15 µM
Z-Arg-Arg-AMC	15 µM
Z-Gly-Pro-Arg-AMC	80 µM
E-64	15 µM
CA 074-Me	1 mM

Die endosomale/lysosomale Fraktion enthielt im Vergleich zur zytoplasmatischen Fraktion 90 % der Aktivität.

Als Kontrollen bzw. Blankwerte wurden der AMC-Standard (2,5 μ M, 150 μ l/well), der jeweilige Substratleewert (50 μ l Substrat + 100 μ l 50 mM Na-Acetatpuffer/0,2 mM EDTA/ 5 mM DTT) und der 50 mM Na-Acetatpuffer verwendet. Nach 30 min Inkubation im Dunkeln bei RT wurde die Fluoreszenzintensität des durch die Substrathydrolyse freigesetzten 7-Amino-4-Methyl-Cumarins quantifiziert bei einer Anregungswellenlänge von 410 nm und Emissionswellenlänge von 450 nm im Fluorolite Mikroplattenreader 1000 (Dynatech).

2.3.6.3 Bestimmung der Kathepsin D-Aktivität

nach Gulnik et al., 1997

Das für die Kathepsin D-Messung verwendete Peptidsubstrat (Ac-Glu-Asp(EDANS)-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Gly-Lys(DABCYL)-Glu-NH₂, Bachem) besteht aus einer fluorogenen Gruppe (EDANS), dessen Fluoreszenz im ungespaltenen Zustand durch einen Resonanzenergieübertrag zu einer Quenchergruppe (DABCYL) gehemmt ist. Die Erhöhung der Fluoreszenz während der Substratspaltung wurde in einem Fluoreszenz-Spektrophotometer (Perkin Elmer) bei einer Anregungswellenlänge von 349 nm und einer Emissionswellenlänge von 487 nm gemessen.

Protokoll:

- 1-2 x 10⁶ Zellen wurden in 150 μ l 0,5 % TritonX-100/50 mM Na-Acetat (pH 5,5) lysiert, 30 min auf Eis inkubiert, alle 10 min geschüttelt und 5 min bei 1000 x g zentrifugiert
- Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mittels Pierce-Assay
- 100 μ g/ml Protein und 25 μ l DMSO wurden auf ein Volumen von 2500 μ l in 50 mM Glycin-HCl-Puffer (pH 3,5) verdünnt
- Der Ansatz wurde 4 min bei 37 °C vorinkubiert und in eine Quarzküvette pipettiert

- Unmittelbar nach Substratzugabe (2,5 μM) wurde die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeit gemessen (5 min)

2.3.6.4 EnzChek[®] Protease-Assay

Zur Analyse der enzymatischen Aktivität gegenüber einem Proteinsubstrat wurde der EnzChek[™] Protease Assay der Firma Molecular Probes angewendet. Als Substrat diente Casein, das mit einem grün fluoreszierenden und durch die Tertiärstruktur des intakten Moleküls gequenchten Farbstoff (BODIPY[®] FL) markiert war. Der proteolytische Caseinabbau setzte fluoreszierende Produkte frei. Die Fluoreszenz wurde bei 530 nm gemessen und war proportional der Enzymaktivität.

Protokoll:

- 1 x 10⁶ Zellen wurden in 250 μl neutralem (pH 7) oder saurem (pH 5,5) Puffer lysiert (vgl. 2.3.1), 30 min auf Eis inkubiert, alle 10 min geschüttelt und 5 min bei 1000 x g zentrifugiert
- Bestimmung des Gesamtproteingehaltes mittels Pierce-Assay
- 100 $\mu\text{g/ml}$ Protein wurden pro Ansatz in Verdünnungspuffer (Kit) oder 50 mM Na-Acetatpuffer mit 2,5 mM DTT verdünnt (100 $\mu\text{l/well}$ in schwarze FluoroNunc[™]-Platten)
- Zugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ Caseinsubstrat verdünnt in Verdünnungspuffer oder 50 mM Na-Acetatpuffer mit 2,5 mM DTT (100 $\mu\text{l/well}$)
- 1 h inkubiert bei 37 °C lichtgeschützt
- Fluoreszenzmessung im Mikroplattenreader-Fluorolite 1000 bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und Emissionswellenlänge von 530 nm

2.3.6.5 EnzChek[®] Protease-Assay mit Inhibitoreinsatz

Der gleiche Versuchsansatz wie oben fand Anwendung mit Zelllysaten unter sauren Lyse- und Assaybedingungen unter Verwendung folgender Inhibitoren:

- Pepstatin A (PepA) 30 μM
- Orthophenantrolin (OPA) 2 mM

- Diisopropylfluorophosphat (DFP) 1mM
- E-64 200 μ M
- Kontrolle ohne Inhibitoren

Die Volumenverhältnisse von Lysat, Caseinsubstrat und Inhibitoren waren 100 μ l : 100 μ l : 20 μ l.

2.3.6.6 Bestimmung der Caspase 3-Aktivität

Nach 24-stündiger Inkubation der A549-Klone mit Anti-human-Fas-AK wurden die Zellen geerntet, 1 x gewaschen mit PBS und durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit sedimentiert.

Die Enzymaktivität wurde mit dem Enzchek[®] Caspase-3 Assay Kit der Firma Molecular Probes bestimmt. Hierfür wurden die Zellen in 1 x Lysepuffer lysiert, 30 min auf Eis inkubiert und alle 10 min geschüttelt. Die lysierten Zellen wurden bei 5000 rpm 5 min zentrifugiert und der Überstand für die Aktivitätsmessung verwendet. 50 μ l des Zellüberstandes wurden zusammen mit 50 μ l 2 x Substratlösung (200 μ M Z-DEVD-AMC in 2 x Reaktionspuffer/1 mM DTT) in einer 96-well-Platte (schwarze FluoroNunc[™]-Platten) gemischt. Der Ansatz wurde 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach proteolytischer Spaltung des Z-DEVD-AMC-Substrates entstand ein fluoreszierendes Produkt. Die Fluoreszenz wurde im Mikroplattenreader Fluorolite 1000 (Dynatech Laboratories) bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm gemessen. Die Fluoreszenz wurden zum Gesamtproteingehalt der jeweiligen Probe ins Verhältnis gesetzt.

2.3.7 Proliferationstest

Die A549-Klone wurden in einer Zellzahl von 2000 in 96-well-Platten ausgesät und 1-5 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen wurde mittels des grün fluoreszierenden Farbstoffes CyQUANT GR (Molecular Probes) die Nukleinsäure quantifiziert. Hierfür wurde das Kulturmedium aus der Platte ausgeschlagen und die Zellen bei –80 °C eingefroren. Anschließend wurden

die gefrorenen Zellen aufgetaut und in einem Fluoreszenzfarbstoff (CyQUANT GR) enthaltendem Lysepuffer aufgenommen. Die Fluoreszenz wurde direkt gemessen und war ein Maß für die Nukleinsäure bzw. Zellzahl.

2.3.8 Migrationstest

Der Migrationstest diente der Untersuchung der Wanderungsfähigkeit der A549-Klone durch 8 µm große Poren einer Transwell-Kammer (Costar). Es wurden 2×10^6 Zellen in 25 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät, mit 0,09 MBq ³[H]-Thymidin markiert und über Nacht bei 37°C und CO₂ inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen 2 x mit Hank's-Salzlösung (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen und mit Trypsin/EDTA geerntet. 50 000 Zellen wurden in 100 µl IMDM-G418-Medium auf die Mikroporenmembran der Transwell-Kammern pipettiert, welche in 24-well-Kulturplatten platziert waren. Auf den Boden der 24-well-Platten wurden 600 µl IMDM-G418-Medium gefüllt, sodass die Transwell-Kammer an ihrer Unterseite befeuchtet und die migrierten Zellklone mit Nährmedium versorgt wurden. Nach 72 h Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die migrierten Zellen von der Unterseite der Transwell-Kammer mit Hank's-Salzlösung gespült, mit Trypsin/EDTA abgelöst und auf eine 96-well-Platte überführt. Die Zellen wurden mittels Harvestergerät auf einen Glasfaserfilter gesaugt und dabei lysiert. Der Glasfaserfilter wurde in eine Probentasche mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit eingeschweißt. Die an Nukleinsäure gebundene Radioaktivität wurde am Liquid Szintillations-Counter gemessen. Es wurde der prozentuale Anteil der migrierten Zellen im Vergleich zu nicht migrierten Kontrollzellen ermittelt. Diese Kontrollzellen wurden in die 24-well-Platten ohne Transwell-Kammer ausgesät und unter gleichen Bedingungen kultiviert.

2.3.9 Invasionstest

Der Invasionstest stellt ein Modell der Tumorzellinvasion durch die Basalmembran dar. Diese muß, um von den Tumorzellen passiert zu werden, durch deren proteolytische Enzyme degradiert werden.

Es kamen 24-well-Platten, in die Transwell-Kammern mit einer Membranporengröße von 8 μm platziert wurden, zum Einsatz. Auf die Polycarbonatmembran wurde eine Matrigel[®]-Beschichtung (Becton Dickinson) aufgetragen, die reich an extrazellulären Matrixproteinen, wie Laminin, Kollagen IV und Proteoglykanen war.

Im Vorfeld des Versuches wurden die Membranen der Transwell-Kammern 2 h bei 37 °C mit Matrigel (50 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ Wachstumsoberfläche in IMDM) beschichtet und inkubiert. Die Zellen wurden wie beschrieben geerntet, in physiologischer Kochsalzlösung 1:20 verdünnt und im Coulter Counter gezählt. Es wurden 30 000 Zellen in 300 μl IMDM-G418 auf die Matrigelmembran pipettiert. Das untere well wurde mit 1 ml IMDM-G418 gefüllt, so daß die Transwell-Kammer an ihrer Unterseite mit Medium befeuchtet wurde. Der Ansatz wurde 72 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die invasiven Zellen von der Unterseite der Membran abgelöst durch 3-maliges Spülen mit Hank's-Salzlösung und 5-minütiger Inkubation mit Trypsin/EDTA. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Spülen mit 500 μl PBS von der Filterunterseite der Transwell-Kammer abgelöst, 1:20 in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und im Coulter-Counter gezählt. Es wurde der prozentuale Anteil der invasiven Zellen im Vergleich zu den nicht invasiven Kontrollzellen ermittelt. Die Kontrollzellen wurden in 24-well-Platten ohne Transwell-Kammer ausgesät und unter gleichen Bedingungen kultiviert.

2.3.10 Durchflußzytometrische Analysen

2.3.10.1 Analysieren im Durchflußzytometer

Mit Hilfe eines Durchflußzytometers können einzelne Zellen hinsichtlich ihrer physikalischen Eigenschaften, wie Größe, Form oder Granularität und ihrer biochemischen Merkmale, wie Enzymaktivität oder Oberflächenrezeptoren näher charakterisiert werden. Hier sind Zellen jeder Herkunft geeignet; Blutzellen, Zellen aus Körperflüssigkeiten (Liquor, Bronchial Lavage) oder Tumorzellen.

Die Zellen werden in einer Suspension mit Überdruck nacheinander durch eine Meßkammer geleitet, in der sie von einem fokussierten Laserstrahl beleuchtet

werden. Das entstehende Streulicht wird in Winkeln von ca. 10° und 90° gemessen - Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC). Diese Signale geben Auskunft über Größe und Granularität der Zelle. Durch den Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, die durch Laserlicht bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden, ist es möglich, Antigene, Nukleinsäuren oder intrazelluläre Stoffwechselfvorgänge zu detektieren. Diese zunächst optischen Signale werden durch Photomultiplier in elektrische Pulse konvertiert, verstärkt und als digitale Meßdaten im Computer verarbeitet. Die Auswertung der Meßergebnisse ist in Form einer Einparameter- oder Zweiparameterdarstellung möglich. Die Zweiparameterdarstellung zeigt die Relation zwei verschiedener Eigenschaften einer Zelle zueinander an, z.B. die Korrelation von FSC und SSC oder die Korrelation von Grün- und Rotfluoreszenz. So ist beispielsweise im Zweiparameter-Punkthistogramm von FSC und SSC die Differenzierung von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten möglich. Die einparametrische Histogramm-Analyse findet Anwendung in der DNS-Analyse und Einfarbenimmunfluoreszenz.

2.3.10.2 Nachweis des Fas/Apo-1-Antigens (CD95)

Das Fas/Apo-1-Antigen (CD95) wird auf Zelloberflächen von normalen und neoplastischen Zellen exprimiert und ist der Beginn einer Signalkaskade, die zum Zelltod (Apoptose) führt. In der Arbeit von Wen et al. wird die CD95-Expression auf A549-Zellen beschrieben. (Wen et al., 1997)

Auf der Oberfläche der A549-Klone wurde mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers die CD95-Expression durchflußzytometrisch untersucht.

Hierfür wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen pro 2 ml IMDM-G418 in 6-well-Platten ausgesät und 36-40 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet. $0,5-1,0 \times 10^6$ Zellen wurden in 10 % FCS/PBS gewaschen, 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und mit 10 µl Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugierten Anti-human-CD95 monoklonalen Antikörper aus der Maus (Pharmingen) 30 min bei 4 °C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen mit 10 % FCS/PBS, 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert und in 500 µl Fixativ (1 % Paraformaldehyd in PBS) resuspendiert. Als Isotypkontrolle diente

IgG1-FITC/IgG1-PE (PE=Phycoerythrin, Immunotech). Die Zellen wurden im Durchflußzytometer (FACScan, Becton Dickinson) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm analysiert und ihre mittlere Fluoreszenzintensität ausgewertet.

2.3.10.3 Nachweis des Fas/Apo-1-Antigens (CD95) nach IFN- γ -Inkubation

Aus verschiedenen Arbeiten geht hervor, daß IFN- γ bei der Apoptoseinduktion eine Rolle spielt (Kalvakolanu, 2000; Wen et al., 1997; Deiss et al., 1996). Es stellte sich die Frage, ob IFN- γ die Expression des CD95-Antigens auf der Zelloberfläche der A549-Klone beeinflusst.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen pro 2 ml IMDM-G418 in 6-well-Platten ausgesät, 24 h kultiviert und für weitere 12 h mit IFN- γ (1000U/ml, Strathmann Biotech GmbH) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet mit Trypsin/EDTA und wie unter Punkt 2.3.10.2 gefärbt und analysiert.

2.3.10.4 Apoptoseinduktionsmodell

nach Wen, Medani et al., 1997

Da auf den A549-Klonen die CD95-Expression positiv war, wurde dieser Signaltransduktionsweg beschritten, um Apoptose zu induzieren. Die Zellen wurden wie unter Punkt 2.3.10.2 beschrieben in 6-well-Platten ausgesät, 24 h kultiviert, 10-12 h mit 1000 U/ml IFN- γ vorinkubiert und anschließend mit 100 ng/ml Anti-human-Fas-Antikörper (ah-Fas-AK, Biomol) für 24, 48 und 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden nach 24 h Apoptoseinduktion geerntet, um die Caspase 3-Aktivität zu messen, nach 48 und 72 h um das 7A6-Membranprotein sowie DNS-Bruchstücke mit Hilfe der TUNEL-Färbung zu detektieren.

2.3.10.5 Nachweis des Membranproteins 7A6

nach Zhang et al., 1996

Das 7A6-Membranprotein ist in der Literatur vorwiegend als mitochondriales Membranprotein beschrieben, das in Zellen exprimiert wird, die einen programmierten Zelltod sterben. Gleichzeitig scheint es auf der äußeren Zellmembran exprimiert zu werden, da ungeachtet einer Permeabilisierung der Zellen, das 7A6-Antigen detektierbar ist. Wir entschieden uns für den Nachweis des 7A6-Membranproteins auf der Zelloberfläche. Das 7A6-Antigen wurde mit dem fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörper APO2.7-PC5 (PC5=PE/Cy5=R-Phycoerythrin kovalent gebunden an Cyanin 5.1, Immunotech) nachgewiesen.

Hierfür wurden $0,5-1,0 \times 10^6$ Zellen nach 48- und 72-stündiger Inkubation mit ah-Fas-AK geerntet, in Falcon Polystyren Reagenzgläser gefüllt, 6 min bei $200 \times g$ zentrifugiert, mit 2 ml 2,5 % FCS/PBS gewaschen und erneut 6 min bei $200 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und der Ansatz mit 10 μ l Apo2.7-PC5 und 90 μ l 2,5 % FCS/PBS gefüllt, leicht geschüttelt und 15 min bei RT dunkel inkubiert. Anschließend wurde mit 2 ml FCS/PBS gewaschen, bei $200 \times g$ 6 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Zellen wurden in 1 ml 2,5 % FCS/PBS resuspendiert und im Durchflußzytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 670 nm analysiert.

2.3.10.6 TUNEL-Färbung

Im späteren Verlauf der Apoptose kommt es zur Aktivierung von Endonukleasen, die die Chromatinstruktur des Zellkerns in 300 kb-Fragmente spalten bis hin zu DNS-Stücken von 50 bp Länge. Mit der TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling)-Färbung können diese DNS-Fragmente detektiert werden. Das Prinzip der Methode besteht in der Anlagerung von Desoxyuridintriphosphat (dUTP) an die freien 3'-OH-Enden der DNS-Strangbrüche durch die terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT).

Für die TUNEL-Färbungen wurde der APO-BRDU™-Test der Firma Pharmingen verwendet. Die TdT katalysierte die Addition von bromiertem dUTP (Br-dUTP) an das 3'-OH-Ende von Doppel- und Einzelstrang-DNS. Nach der Br-dUTP-Inkorporation wurden die DNS-Strangbrüche mit einem FITC-markierten Anti-BrdU-mAK identifiziert, gleichzeitig wurde die Gesamt-DNS mit Propidiumjodid (PJ) gefärbt. Im Durchflußzytometer wurde die FITC-Fluoreszenz (bei 520 nm) und die PJ-Fluoreszenz (bei 623 nm) der DNS-Bruchstücke und der Gesamt-DNS, nach einer Anregung bei 488 nm, analysiert.

Für den Versuch wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen/ 2 ml IMDM-G418 in 6-well-Platten ausgesät, und nach dem Apoptoseinduktionsmodell inkubiert. Anschließend wurden die adhärenen Zellen geerntet. $1-2 \times 10^6$ Zellen wurden in 0,5 ml PBS resuspendiert und anschließend fixiert und gefärbt.

Zellfixierung: Die Zellsuspension wurde in 1 % Paraformaldehyd/PBS überführt und 15 min auf Eis fixiert. Danach wurden die Zellen bei 300 x g zentrifugiert, das Pellet mit 5 ml PBS gewaschen und durch Zentrifugation erneut sedimentiert. Der Wasch- und Zentrifugationsvorgang wurde wiederholt. Die Zellen wurden in 0,5 ml PBS resuspendiert, in 5 ml eiskalten 70 % Ethanol überpipettiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

DNS-Färbung: Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen für die DNS-Färbung zunächst bei 500 x g für 10 min zentrifugiert. Das Ethanol wurde abgesaugt, die Zellen mit 1 ml Waschpuffer gewaschen und bei 500 x g für 10 min zentrifugiert. Der Wasch- und Zentrifugationsschritt wurde wiederholt. Im Anschluß wurden die Zellen in 50 μl DNS-Färbelösung resuspendiert und 2 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad inkubiert. Die Zellen wurden alle 15 min geschüttelt, um sie zu resuspendieren.

Die DNS-Färbelösung für einen Ansatz war folgendermaßen zusammengesetzt:

- 10 μl Reaktionspuffer
- 0,75 μl TdT Enzym
- 8 μl Br-dUTP
- ad 51 μl A.d.

Es folgten zwei Spülschritte. Dazu wurde 1 ml Spülpuffer auf die Zellen gegeben, 10 min bei 500 x g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden in 0,1 ml Antikörperlösung resuspendiert und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Antikörperlösung war folgendermaßen zusammengesetzt:

- 5 µl FITC-markierter Anti-BrdU-AK
- 95 µl Spülpuffer

Nach Zugabe von 0,5 ml PJ/RnaseA-Lösung zum Zellansatz mit der Antikörperfärbelösung und 30-minütiger Inkubation im Dunkeln wurden die Zellen durchflußzytometrisch analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung von Kathepsin L-*antisense*-Klonen

3.1.1 Ermittlung der zytotoxischen G418-Konzentration für A549-Zellen

Im Vorfeld der Transfektion war es notwendig, die für die A549-Zellen zytotoxische Geneticin (G418)-Konzentration zu ermitteln. G418 ist ein Neomycinanalogon und zählt in die Klasse der Aminoglykosid-Antibiotika. Es blockiert die Proteinbiosynthese durch Hemmung der ribosomalen Funktion. Das Resistenzgen Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase (APH), auf Plasmid-Vektoren als Kan/Neo-Resistenzgen bezeichnet, phosphoryliert das Antibiotikum (Kanamycin, Neomycin bzw. G418) und entgiftet es somit.



Nach Transfektion der A549-Zellen mit dem Plasmid-Vektor pCR3.1 und dessen integrierter Kathepsin L-cDNS entgiftet das Kan/Neo-Resistenzgen G418 und bewirkt das Überleben der erfolgreich transfizierten Zellen. Den untransfizierten A549-Zellen fehlt das Resistenzgen wodurch sie leicht durch G418 abzutöten sind. Die dazu geeignete G418-Konzentration wurde folgendermaßen ermittelt:

Die A549-Zellen wurden in einer Dichte von 2000 Zellen pro well in Mikrotiterplatten ausgesät und G418-Konzentrationen von 2,0, 1,0, 0,5, 0,25, 0,12, 0,06, 0,03 und 0,015 mg/ml über einen Zeitraum von 3, 5, 7 und 10 Tagen ausgesetzt. Nach den entsprechenden Inkubationstagen wurde die Zellzahl mit dem CyQUANT[®]-Zell-proliferations-Assay der Firma Molecular Probes bestimmt. Dabei wurden die durch G418 abgestorbenen Zellen gewaschen und die Nukleinsäure der verbliebenen Zellen mit einem FITC-markiertem Farbstoff gefärbt. Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm und Emissionswellenlänge von 520 nm im Mikroplatten-Reader detektiert.

Aus Abbildung 2 ist ersichtlich, dass bei der verwendeten G418-Konzentration von 1 mg/ml nach 10 Tagen die Fluoreszenz, ein Maß für die Zellzahl, nahe Null ist. Die Konzentration von 1 mg/ml G418 ist demzufolge die zytotoxische Konzentration für die A549-Zellen und schien daher geeignet, um die transfizierten Zellen zu kultivieren.

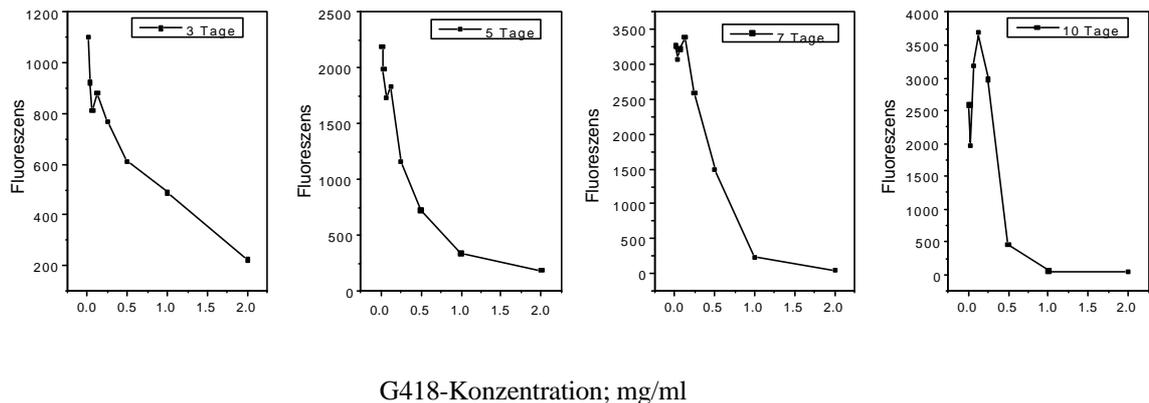


Abb.2: Ermittlung der zytotoxischen G418-Konzentration für A549-Zellen. 2000 Zellen wurden in Mikrotiterplatten ausgesät und einer G418-Konzentration von 2, 1, 0,5, 0,25, 0,12, 0,06 und 0,015 mg/ml über einen Zeitraum von 3, 5, 7 und 10 Tagen ausgesetzt. Anschließend wurde die Zellzahl mittels CyQUANT-Zellproliferations-Assay bestimmt. Die durch G418 abgestorbenen Zellen wurden entfernt und die Nukleinsäure der verbliebenen adhären Zellen mit einem FITC-markiertem Farbstoff gefärbt. Die Fluoreszenz, ein Maß für die Zellzahl, wurde bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm detektiert. Nach 10 Tagen waren bei einer G418-Konzentration von 1 mg/ml die Zellen nahezu vollständig abgestorben.

3.1.2 Herstellung der Kathepsin L-antisense-Konstrukte

Mit Hilfe von PCR-Reaktionen wurden drei humane Kathepsin L-cDNS-Fragmente aus A549-Zellen amplifiziert. Dabei handelte es sich um ein die gesamte kodierende Kathepsin L-Sequenz umfassendes 1002 bp großes Fragment (Kathepsin Lg, Abb. 3B), ein 588 bp großes 5'-Fragment (Kathepsin La, Abb. 3C) und ein 738 bp großes 3'-Fragment (Kathepsin Le, Abb. 3D). In Abbildung 3 A

sind die kodierende Sequenz des humanen Kathepsin L-Gens, die Lage der verwendeten Primer sowie die amplifizierten cDNS-Fragmente (3 B-D) abgebildet. Weiterhin ist in Abb. 3E ein 324 bp großes Fragment (Kathepsin Lm/324 bp) dargestellt. Dieses Fragment amplifizierten wir, um die in die A549-Zellen transfizierten Kathepsin L-Konstrukte nach Isolierung genomischer DNS nachzuweisen.

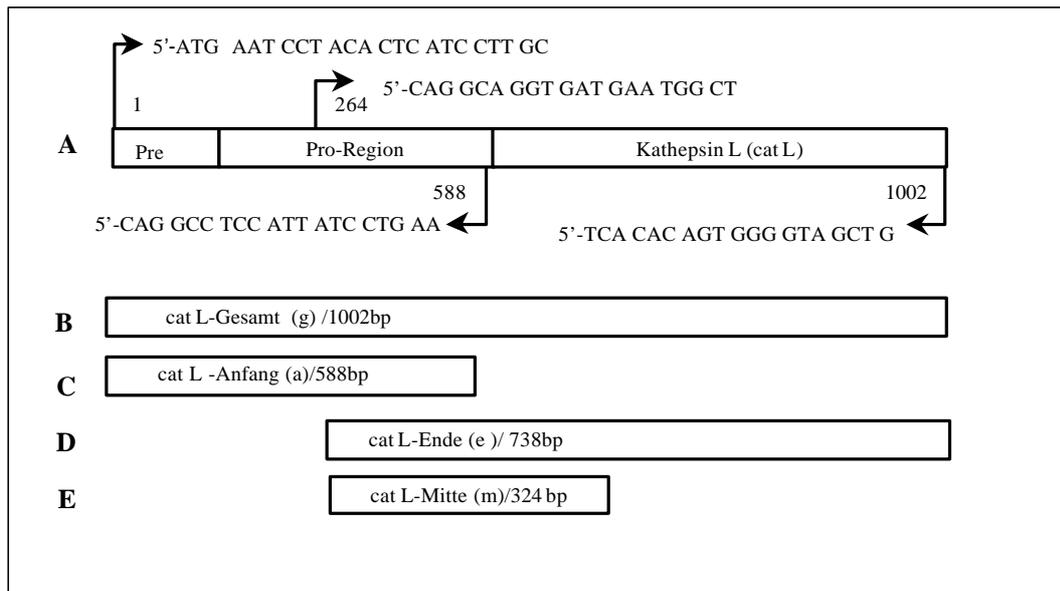


Abb. 3: Darstellung der kodierenden Sequenz des humanen Kathepsin L-Gens (cat L) und der Lage der flankierenden Primer (A) für die Amplifikation der DNS-Fragmente. Mittels PCR wurden aus A549-Zellen 3 Kathepsin L-cDNA-Fragmente (cat L) amplifiziert: **B** cat Lg/1002 bp, **C** cat La/588 bp und **D** cat Le/738 bp. In den A549-Klonen wurde nach Isolierung von Gesamt-DNS ein 324 bp großes cat L-Fragment amplifiziert (cat Lm/324 bp, **E**)

Die Kathepsin L-cDNS-Fragmente Kathepsin Lg (cat Lg), Kathepsin La (cat La) und Kathepsin Le (cat Le) wurden in den Vektor pCR3.1 kloniert und in E.coli transformiert. Die Plasmid-DNS von jeweils 8-10 Klonen wurde isoliert und hinsichtlich der Integration der Kathepsin L-cDNS-Fragmente untersucht. Als Negativkontrolle diente der Vektor pCR3.1 ohne Insert. Um die Orientierung der klonierten Kathepsin L-cDNS-Fragmente im Vektor festzustellen, wurde die Plasmid-DNS mit den Restriktionsendonukleasen Hinc II und Bgl II geschnitten.

Die Bgl II-Schnittstelle ist auf dem integrierten Kathepsin L-cDNS-Fragment lokalisiert. Sie befindet sich für das Kathepsin Lg-Fragment und das Kathepsin La-Fragment nach 346 bp, für das Kathepsin Le-Fragment nach 82 bp. Die Schnittstelle für Hinc II befindet sich auf dem Vektor nach 10 bp. Für die in sense bzw. antisense orientierten Kathepsin L-cDNS Fragmente im Vektor ergaben sich nach diesem Doppelenzymverdau die folgenden Fragmentgrößen (Tab. 12).

Tabelle 12: Fragmentgrößen von sense bzw. antisense orientierten Kathepsin L-cDNS-Fragmenten im Vektor pCR3.1 nach Restriktionsenzymverdau mit Hinc II und Bgl II sowie Fragmentgrößen des Vektors pCR3.1 ohne Insert

Vektor pCR3.1 ohne bzw. mit Kathepsin L-Insert	Fragmentgrößen
pCR3.1 ohne Insert	5,04 kb
pCR3.1 + Kathepsin L as	1,06 kb/ 4,56 kb
pCR3.1 + Kathepsin L aas	0,96 kb/ 4,67 kb
pCR3.1 + Kathepsin L es	0,8 kb/ 4,98 kb
pCR3.1 + Kathepsin L eas	1,37 kb/ 4,4 kb
pCR3.1 + Kathepsin L gs	1,06 kb/ 4,98 kb
pCR3.1 + Kathepsin L gas	1,37 kb/ 4,67 kb
1 kb Marker	

(s = sense, as = antisense, a=Anfangskonstrukt, e=Endkonstrukt, g=Gesamtkonstrukt)

Nach Detektion jeweils eines Kathepsin Lg-, Kathepsin La- und Kathepsin Le-Konstruktes mit sense- (s) bzw. antisense-Orientierung (as) über Gelelektrophorese wurden die ausgewählten Plasmide sequenziert. Die für die folgenden Transfektionsansätze genutzten Kathepsin L-Konstrukte wurden anschließend in 100 ml Kulturen vermehrt und einer Plasmidisolierung mit gleichzeitiger Endotoxineliminierung unterzogen.

Endotoxine bzw. Lipopolysaccharide (LPS) sind Zellmembranbestandteile gramnegativer Bakterien, wie E.coli, die insbesondere während der Lyse der Bakterienzellwände in großen Mengen freigesetzt werden. Da die Kathepsin L-cDNS enthaltenen Plasmide später in Zelllinien transfiziert werden sollten, war es wichtig den LPS-Gehalt weitestgehend zu reduzieren.

Abbildung 4 fasst die durch Restriktionsenzymverdau erhaltenen pCR3.1-Vektoren mit den integrierten sense- und *antisense* Kathepsin L-cDNS-Fragmenten zusammen. Die Plasmid-DNS mit den integrierten Kathepsin L-*antisense*-Konstrukten wurde für die anschließende Transfektion in die A549-Zellen verwendet.

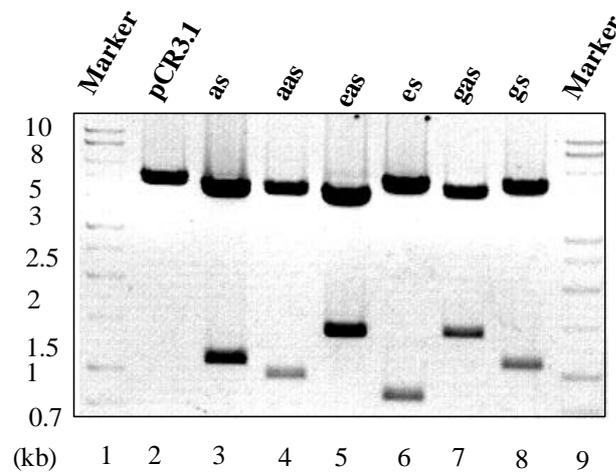


Abb. 4: Gelelektrophoretische Auftrennung von Plasmid-DNS-Fragmenten nach Restriktionsenzymverdau mit Hinc II und Bgl II. Bahn 1/9: 1 kb-Marker, Bahn 2: Vektor pCR3.1 ohne Insert, Bahn 3/4: cat La s/as, Bahn 5/6: cat Le as/s, Bahn 7/8: cat Lg as/s. Die Fragmentgrößen sind in Tabelle 14 dargestellt. (s=sense, as=antisense)

3.1.3 Transfektion und Selektion stabiler Klone

Im Vorfeld der Transfektion der Kathepsin L-Konstrukte in die A549-Zellen wurde die Transfektionseffizienz ermittelt. Hierfür wurde der Kontrollvektor pcDNS3.1/His/LacZ in die A549-Zellen transfiziert. Das LacZ-Gen codiert für die β -Galaktosidase, die die Hydrolyse des β -Galaktosids X-Gal katalysiert. Dabei

entsteht in den Zellen ein blauer Farbstoff, welcher unter dem Mikroskop sichtbar ist.

Bei einem konstanten Plasmid-DNS-Einsatz von 2 µg wurden 5 und 10 µg Lipofektin[®]-Reagenz getestet. Weiterhin wurden die Zellen für 5 und 12 h mit dem Lipofektin-DNS-Komplex inkubiert. Aus Tabelle 13 sind die eingesetzten DNS- und Lipofektin[®]-Reagenzkonzentrationen, die Inkubationszeiten und die dazugehörigen Transfektionseffizienzen zu entnehmen.

Tabelle 13: Ermittlung der prozentualen Transfektionseffizienz durch Einsatz von 2 µg Plasmid-DNS und 5 bzw. 10 µg Lipofektin[®]-Reagenz. Die Zellen wurden für 5 und 12 h mit dem Lipofektin-DNS-Komplex inkubiert

DNS [µg]	Lipofektin [µg]	Inkubationszeit [h]	Transfektions- effizienz [%]
2	5	5	6,1
2	10	5	7,6
2	5	12	7,5
2	10	12	18,8

Da die Transfektionseffizienz unter Verwendung von 2 µg Plasmid-DNS, 10 µg Lipofektin[®]-Reagenz bei einer Inkubationszeit von 12 h mit 18,8 % am höchsten war, wurden die A549-Zellen unter diesen Bedingungen transfiziert. Die Transfektionsansätze für die antisense-Kathepsin L-cDNS-Fragmente, integriert im Vektor pCR3.1, gehen aus Abbildung 5 hervor. Als Kontrolle wurde der Vektor pCR3.1 ohne Insert transfiziert.

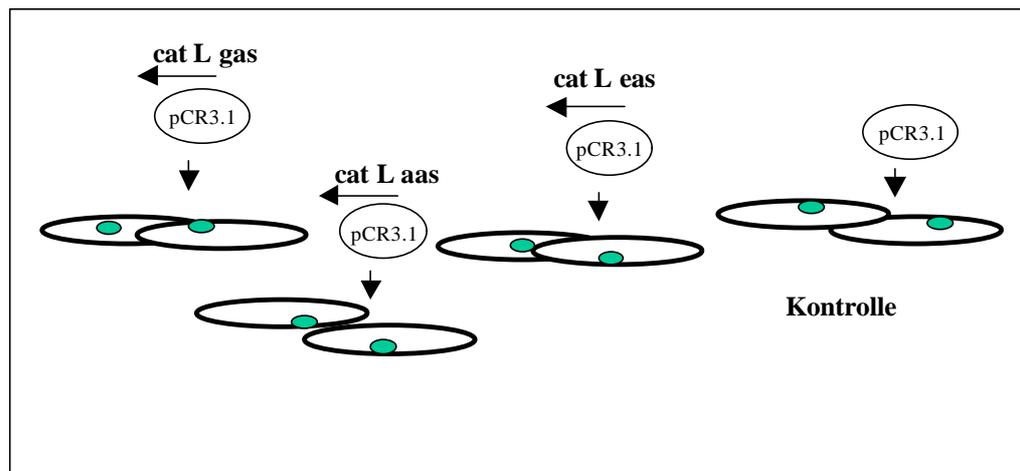


Abb. 5: Transfektionsansätze für cat L-Konstrukte in as-Orientierung sowie für Vektor pCR3.1 ohne Insert in A549-Zellen. 2 µg Plasmid-DNA wurde mit 10 µg Lipofektin-Reagenz gemischt, auf die adhärenen Zellen gegeben und 12 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach 4-5-wöchiger selektiver Kultivierung der stabil transfizierten A549-Klone mit 1 mg/ml G418 wurden pro Transfektionsansatz 6 bis 8, insgesamt 49 stabile A549-Klone erhalten. Der Erfolg der Transfektion wurde auf DNS- und Proteinebene untersucht.

3.2 Charakterisierung der Kathepsin L-*antisense*-Klone

3.2.1 Stabiler Einbau der Kathepsin L-*antisense*-Konstrukte in A549-Zellen

Die nach der klonalen Selektion gepickten 49 A549-Klone wurden auf die Existenz des 324 bp großen Kathepsin L-cDNA-Fragmentes und des 397 bp großen Neomycinfragmentes überprüft. Um in den Zellklonen die integrierten *antisense*-Konstrukte zu identifizieren, wurde die gesamte DNS isoliert und einer PCR-Amplifikation unterzogen. Die verwendeten Primerpaare hybridisierten mit Sequenzabschnitten auf Exon 4 und 5 des Kathepsin L-Gens und amplifizierten auf der genomischen DNS Teile dieser Exons sowie das dazwischenliegende

Intron 4 (166 bp), sodass sich ein 538 bp großes Fragment ergab. Die transfizierten Konstrukte enthielten kein Intron und ergaben ein 324 bp großes Amplifikat (Chauhan et al., 1993). Auf diese Weise ließ sich das Kathepsin L-cDNS-Fragment im Plasmidvektor (324 bp Fragment) von dem auf der zellulären DNS (538 bp großes Fragment aus Exon 4, Intron 4, Exon 5) unterscheiden. Die Existenz des Vektors pCR3.1 wurde durch die Amplifikation von Teilen des Neomycin-Resistenzgenes nachgewiesen (397 bp großes Fragment). Abbildung 6 zeigt die Klone, in denen beide Fragmente nachweisbar waren. Für die nachfolgenden Charakterisierungen verwendeten wir die *antisense*-Klone gas13a, gas11b, eas9a und eas8c. Als Kontrolle diente uns der Zellklon mit dem Vektor pCR3.1 ohne Insert (Kontrollklon pCR3.1).

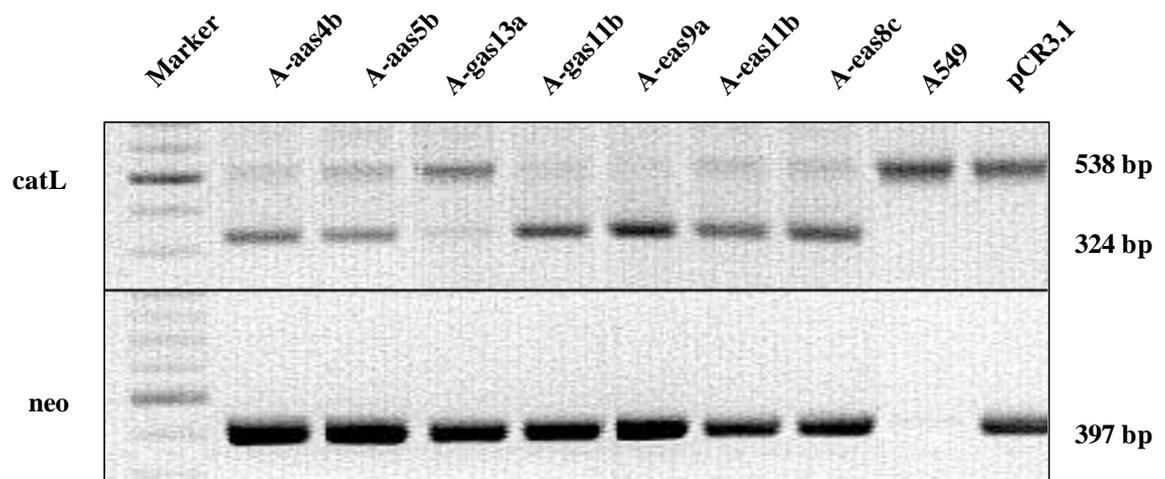


Abb. 6: Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten.

DNS wurde aus A549-Klonen zum Nachweis des 324 bp großen cat L-cDNS-Fragmentes und des 397 bp großen neo-Fragmentes auf Vektor pCR3.1 isoliert. Parallel zur Amplifikation des 324 bp großen cat L-cDNA-Fragmentes wurde mit dem gleichen Primerpaar ein 538 bp großes cat L-Fragment auf der genomischen DNA synthetisiert, da hier zwischen Exon 4 und 5 ein 166 bp großes Intron mit amplifiziert wurde.

3.2.2 Quantitativer Nachweis eines Kathepsin L-Defizits in den *antisense*-Klonen

Die im Plasmid vor dem CMV-Promotor lokalisierte Kathepsin L-*antisense*-cDNS wird von der zellulären RNS-Polymerase zu Kathepsin L-*antisense*-mRNS transkribiert. *Antisense*- und zelluläre sense-mRNS sind zueinander komplementär und bilden ein doppelsträngiges RNS-Hybrid, das vermutlich schnell von RNasen abgebaut wird. Somit wird die Translation zum Protein weitestgehend blockiert.

Mittels quantitativer PCR am Light Cycler wurde auf den A549-Klonen der Kathepsin L-mRNS-Gehalt bestimmt. Hierfür wurde das 324 bp große Kathepsin L-Fragment (Abb. 3) und ein β -Actin-Fragment amplifiziert. β -Actin gilt u. a. als sog. "housekeeping"-Gen und wird in seiner Expression von äußeren Einflüssen, wie den *antisense*-Konstrukten nicht beeinflusst. Es wurde der relative Kathepsin L-mRNS-Gehalt ermittelt. Die vier *antisense*-Klone zeigten einen relativen Kathepsin L-Gehalt von 40-60 % gegenüber dem Kontrollklon pCR3.1 (vgl. Abb. 7).

Die Verringerung der Kathepsin L-Proteinexpression wurde mittels Enzymimmunassay quantifiziert. In Zelllysaten der A549-Klone wurden die Kathepsin L- und Gesamtproteinmengen ermittelt und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Daraus wurden die relativen Kathepsin L-Konzentrationen abgeleitet. Insgesamt zeigten die Kathepsin L-*antisense*-Klone eine Kathepsin L-Restkonzentration von 20-30 % (Abb. 7).

Außerdem wurde der sekretierte Kathepsin L-Gehalt in den Zellkulturüberständen der A549-Klone bestimmt. Die *antisense*-Klone zeigten eine um 50 % geringere Kathepsin L-Sekretion als der Kontrollklon (Abb. 7).

Die Kathepsin L-Aktivität wurde in der lysosomalen/endosomalen Fraktion der A549-Klone bestimmt. Das synthetische Substrat Z-Phe-Arg-AMC wurde für die Aktivitätsmessung eingesetzt. Da es ebenfalls von Kathepsin B gespalten wird, erfolgte die Kathepsin L-Messung unter Verwendung des Kathepsin B-spezifischen Inhibitors CA 074-Me. Die CA 074-Me-resistente Aktivität entsprach der Kathepsin L-ähnlichen Aktivität und wurde ausgewertet. Aus Abbildung 7 ist ersichtlich, dass die relative Restaktivität von Kathepsin L in den *antisense*-Klonen 30- bis 60 % der Aktivität der Kontrollzellen beträgt. Diese relativ hohe

Aktivität wird neben Kathepsin L vermutlich von anderen Kathepsin L-ähnlichen Proteasen verursacht (Barrett et al., 1981; Chapman et al., 1997).

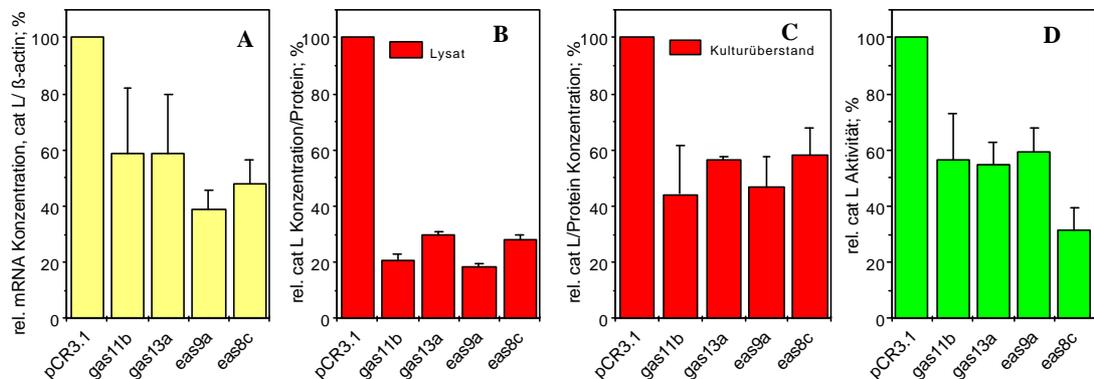


Abb. 7: Quantitativer Nachweis eines Kathepsin L-Defizits (cat L) in den antisense-Klonen.

A Bestimmung der relative cat L-mRNS durch Messung von cat L und β -Actin mittels Ligth Cycler PCR. Der relative cat L-mRNS-Gehalt betrug 40-60 % in den *antisense*-Klonen im Vergleich zum Kontrollklon pCR3.1. **B** Quantifizierung der cat L- und Proteinkonzentration mit Hilfe von ELISA- und Pierce-Methoden im Zellysat und im Zellkulturüberstand (**C**). Die relative cat L-Konzentration in den *antisense*-Klonen betrug 20-30 % im Lysat und 50 % im Sekret beim Vergleich mit dem Kontrollklon. **D** Messung der cat L-Aktivität in der lysosomalen/endosomalen Fraktion der A549-Klone mit dem synthetischen Substrat Z-Phe-Arg-AMC. Die Messung erfolgte indirekt unter Verwendung des Kathepsin B (cat B)-Inhibitors CA 074-Me, da das Substrat auch von cat B gespalten wird. Die CA 074-Me-resistente Aktivität entsprach der cat L-ähnlichen Aktivität und wurde ausgewertet. Die relative cat L-Aktivität in den *antisense*-Klonen entsprach 30-60 %.

3.3 Funktionelle Untersuchungen an den Kathepsin L-antisense-Klonen

Lysosomale Cysteinproteasen spielen in verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Frühere Arbeiten zeigten eine Funktion dieser Enzyme im Prozess des Proteinkatabolismus (Kirschke et al., 1995) der Antigenpräsentation (Riese et al., 1996), der Aktivierung anderer Enzyme und der Hormonreifung (Samarel et al., 1989; Docherty et al., 1982). Tumorzellen oder aktivierte Zellen im Rahmen entzündlicher Erkrankungen können Kathepsine sekretieren, die dann eine wichtige Rolle beim Ab- und Umbau extrazellulärer Matrix spielen (Guinec et al., 1993). Die Produzenten dieser Proteasen sind an den Ort der Entzündung eingewanderte Granulozyten, Alveolarmakrophagen oder die Lungenepithelzellen. Allerdings wurden für die meisten bisherigen Untersuchungen relativ unspezifische Reagenzien, wie gruppenspezifische Inhibitoren eingesetzt. In unserem Zellmodell der spezifischen Suppression von Kathepsin L wollten wir die funktionellen Konsequenzen dieses Enzymdefektes für die A549-Zellen untersuchen. Deshalb wurde in verschiedenen experimentellen Ansätzen die Proliferation, das Apoptoseverhalten, die Migration und die Invasivität, aber auch die Zytokinproduktion der antisense-transfizierten Zellklone untersucht und mit den entsprechenden Eigenschaften von Kontrollzellen, die mit dem Expressionsvektor ohne spezifisches Insert transfiziert waren, verglichen.

3.3.1 Proliferationsverhalten der Kathepsin L-*antisense*-Klone

Um den Einfluß einer Kathepsin L-Suppression auf das Proliferationsverhalten der A549-Klone zu untersuchen, wurden sie in Mikrotiterplatten ausgesät. Nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen wurde mit Hilfe des CyQUANT[®] Proliferationsassays ihre Zellzahl bestimmt. Dabei zeigten die *antisense*-Klone eine, um 20 % verringerte Zellzahl im Vergleich zum Kontrollklon (100 %) (Abb. 8).

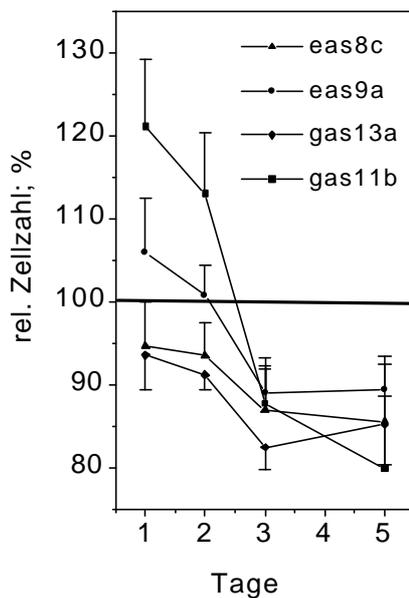


Abb. 8: Untersuchung des Proliferationsverhaltens der A549-Klone. Die Klone wurden in Mikrotiterplatten ausgesät und ihre Zellzahl nach jeweils 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen mit Hilfe des CyQUANT Proliferationsassays bestimmt. Nach 3 bis 5 Tagen betrug die Zellzahl der *antisense*-Klone ca. 80 % im Vergleich zum Kontrollklon (100 %).

3.3.2 Apoptoseverhalten der Kathepsin L-*antisense* Klone

Die A549-Zellen und *antisense*-Klone exprimieren auf ihrer Oberfläche den Fas/Apo-1 (CD95)-Rezeptor, der zur TNF-Rezeptorfamilie gehört. Durch Bindung des entsprechenden Fas-Liganden oder anti-CD95-mAK wird der Fas-Rezeptor aktiviert. Dieser enthält eine cytoplasmatische Domäne, die nach Stimulierung verschiedene zytosolische Caspasen aktiviert. In der Zelle wird eine Selbstmordkaskade ausgelöst, die zum Zelltod führt. Dieser Induktionsmechanismus wurde ausgenutzt, um in den A549-Klonen Apoptose zu induzieren. Apoptotische Zellen zeigen charakteristische biochemische und

morphologische Veränderungen, wie die Aktivierung der Caspasekaskade, Veränderungen in der Membransymmetrie, DNS-Fragmentierungen und schließlich Zellfragmentierungen mit Bildung apoptotischer Vesikel. Um nach Apoptoseinduktion in den A549-Klonen einige dieser charakteristischen Merkmale festzustellen, wurde die Caspase 3-Aktivität, die DNS-Fragmentierung über TUNEL-Färbung sowie Veränderungen auf der Membranoberfläche, durch Detektion des Membranproteins 7A6 untersucht.

3.3.2.1 Detektion von Fas/Apo-1 (CD95)

Die A549-Klone wurden mit dem FITC-markierten humanen anti-CD95-mAK (ha-CD95-mAK) gefärbt und ihre mittlere Fluoreszenzintensität bei 525 nm im Durchflusszytometer gemessen.

Abbildung 9 zeigt eine repräsentative Histogrammdarstellung der CD95-Färbung des Kontrollklons (2. Peak) im Vergleich zum *antisense*-Klon eas9a (3. Peak) ohne vorherige IFN- γ -Stimulation. Die mittlere Fluoreszenzintensität des *antisense*-Klons eas9a (39 %) war im Vergleich zum Kontrollklon pCR3.1 (21 %) um fast das Doppelte erhöht. Durch Vorinkubation der A549-Klone mit 1000 U/ml IFN- γ für 10-12 h konnte die CD95-Expression auf der Zelloberfläche im Vergleich zu unstimulierten A549-Klonen kaum erhöht werden (1,2fach, Abb. 10). IFN- γ hatte also keinen wesentlichen Einfluß auf die Expression des Fas-Rezeptors auf der Oberfläche der A549-Klone. Nach Inkubation mit anti-Fas-mAK allein war nahezu kein Apoptosesignal detektierbar. Die Kombination von IFN- γ und anti-Fas-mAK induzierte in A549-Klonen sehr gut Apoptose, was auf eine Beteiligung von IFN- γ in der intrazellulären Apoptosesignalkaskade hinweist (Wen et al., 1997; Heim et al., 1995). Aus diesem Grund induzierten wir in den A549-Klonen mit dem anti-Fas-mAK und IFN- γ Apoptose. Insgesamt konnte bei allen *antisense*-Klonen eine 1,6-2,0fach erhöhte CD95-Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Die relativen Werte sind in Abbildung 11 zusammengefasst.

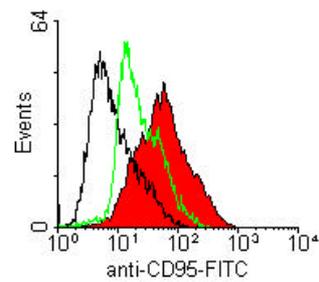


Abb. 9: Vergleich der CD95-Expression auf der Oberfläche des Kontrollklons pCR3.1 und dem *antisense*-Klon eas9a. Die Färbung wurde mit dem FITC-konjugierten anti-CD95-mAK durchgeführt. Messung der Fluoreszenzintensität bei 525 nm im Durchflußzytometer. Erläuterung der Peaks von links nach recht: 1. Peak: Isotypkontrolle IgG1-FITC-PE, 2. Peak: Kontrollklon pCR3.1 gefärbt mit anti-CD95-FITC, 3. Peak: *Antisense*-Klon eas9a gefärbt mit anti-CD95-FITC

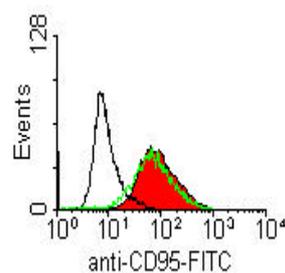


Abb. 10: Unveränderte CD95-Expression nach Vorinkubation mit und ohne IFN- γ (Vergleich des *antisense*-Klons gas13a). Erläuterung der Peaks von links nach rechts: 1. Peak: Isotypkontrolle IgG1-FITC-PE, 2. Peak: *Antisense*-Klon gas13a ohne IFN- γ -Vorinkubation gefärbt mit anti-CD95-FITC, 3. Peak: *Antisense*-Klon gas13a mit 12-stündiger IFN- γ -Vorinkubation gefärbt mit anti-CD95-FITC.

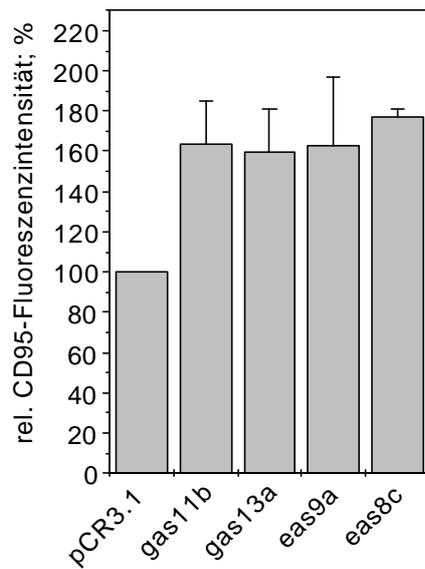


Abb.11: Oberflächenfärbung der A549-Klone mittels FITC-konjugiertem anti-human-CD95-mAK. Durchflusszytometrische Messung der mittleren Fluoreszenzintensität bei 525 nm. Ermittlung der relativen CD95-Fluoreszenzintensität. Die *antisense*-Klone zeigten eine 1,6-2,0fach erhöhte Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Kontrollklon.

3.3.2.2 Messung der Caspase 3-Aktivität

Die A549-Klone wurden zur Messung der Caspase 3-Aktivität nach dem beschriebenen Apoptoseinduktionsmodell behandelt. Sie wurden in 6-well-Kulturplatten ausgesät, 24 h kultiviert bis zu einer 60-80%igen Konfluenz, 12 h mit 1000 U/ml IFN- γ vorinkubiert und anschließend mit 100 ng/ml anti-Fas-mAK für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 24 h Apoptoseinduktion wurden die Zellen geerntet und sedimentiert. Die Caspase 3-Aktivität wurde mit dem Substrat Z-DEVD-AMC gemessen. Die in Abbildung 12 dargestellte relative Caspase 3-Aktivität der A549-Klone war auf das 1,6-1,8fache gegenüber dem Kontrollklon pCR3.1 erhöht.

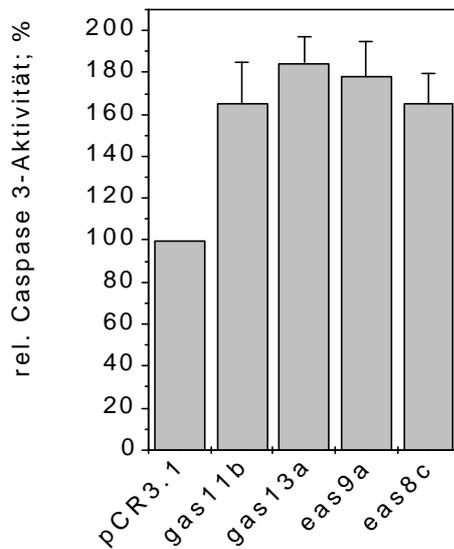


Abb. 12: Relative Caspase 3-Aktivität in A549-Klonen. Die Klone wurden 12 h mit 1000 U/ml IFN- γ vorinkubiert und anschließend 24 h mit 100 ng/ml anti-Fas-mAK inkubiert. Die Caspase 3-Aktivität wurde mit dem Substrat Z-DEVD-AMC gemessen. In den *antisense*-Klonen war die Aktivität um das 1,6-1,8fache erhöht im Vergleich zum Kontrollklon pCR3.1.

3.3.2.3 Bestimmung der DNS-Fragmentierung mit Hilfe der TUNEL-Färbung

In den A549-Klonen wurde wie oben beschrieben Apoptose induziert. Nach 48 und 72 h Apoptoseinduktion wurden die Zellen geerntet, in PBS resuspendiert, in 1 % Paraformaldehyd fixiert und die 3'OH-Enden der DNS-Bruchstücke mit BrdUTP markiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37 °C erfolgte die Zugabe eines FITC-markierten anti-BrdU-mAK, um die DNS-Strangbrüche zu detektieren. Gleichzeitig wurde die Gesamt-DNS mit Propidiumjodid (PJ) gefärbt. Im Durchflußzytometer wurden zunächst anhand der PJ-Färbung die zu untersuchenden Zellen eingegrenzt und etwaige Aggregate ausgeschlossen (Abb.13 A) Ausgehend von diesem Auswertefenster wurde erneut ein 2-Parameter-Punkthistogramm erstellt, das die PJ-Färbung in Relation zur BrdU-FITC-Fluoreszenz darstellt (Abb. 13 B). Durch die BrdU-FITC-Fluoreszenzintensität ließen sich die nicht-apoptotischen Zellen von den apoptotischen Zellen differenzieren.

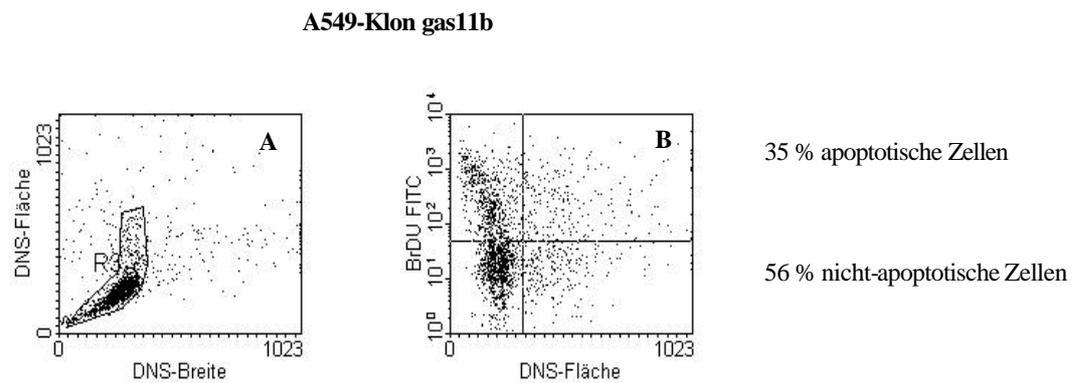


Abb. 13: Bestimmung von DNS-Fragmenten über TUNEL-Färbung in den A549-Klonen am Beispiel des *antisense*-Klons gas11b. Nach 48 und 72 h Apoptoseinduktion wurden die Zellen in 1% Paraformaldehyd fixiert und die freien 3'OH-Enden der DNS-Bruchstücke mit Br-dUTP markiert. Mit einem anti-BrdU-mAK wurden die DNS-Bruchstücke detektiert. Gleichzeitig wurde die gesamte DNS mit PJ gefärbt. **A** Eingrenzung der gesuchten Zellen durch Ausschluß von Aggregaten (DNS-Fläche : DNS-Weite). **B** PJ-Färbung in Relation zur BrDU-FITC-Fluoreszenz und Auftrennung der apoptotischen- und nicht-apoptotischen Zellen in Abhängigkeit ihres BrDU-FITC-Gehaltes.

Der Anteil der apoptotischen Zellen unter den A549-Klonen wurde nach 48 und 72 h anti-Fas-Inkubation gemessen und ist in Abbildung 14 zusammengefasst. Nach 48 und 72 h anti-Fas-Inkubation zeigte sich in den *antisense*-Klonen eine 1,5-3,0fach erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zum Kontrollklon pCR3.1. Jedoch war nach 72 h Apoptoseinduktion, verglichen mit den 48 h Werten, keine weitere Steigerung der Anzahl der apoptotischen Zellen zu verzeichnen.

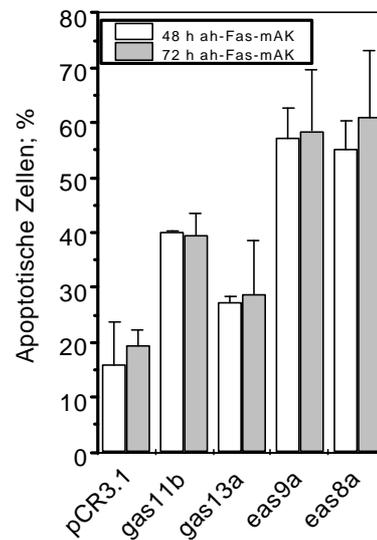


Abb.14: Bestimmung von DNS-Fragmenten mittels TUNEL-Färbung in den A549-Klonen. Nach 12 h IFN- γ (1000 U/ml) Vorinkubation und anschließender 48 und 72-stündiger anti-Fas- Inkubation (100 ng/ml) wurden die Zellen in 1% Paraformaldehyd fixiert und die freien 3'OH-Enden der DNS-Bruchstücke mit Br-dUTP markiert. Mit einem anti-BrdU-mAK wurde der Anteil der apoptotischen Zellen detektiert. Die *antisense*-Klone zeigten eine 1,5-3,0fach erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zum Kontrollklon.

3.3.2.4 Nachweis des Membranproteins 7A6

Das in der Literatur beschriebene Membranprotein 7A6 wird von Zellen exprimiert, die einen programmierten Zelltod sterben. Seine Expression wurde bislang auf der mitochondrialen Membran als auch auf der Zelloberfläche beschrieben (Zhang et al., 1996).

Die Expression des Membranprotein 7A6 auf der Zelloberfläche der A549-Klone wurde nach 12-stündiger IFN- γ -Vorinkubation und anschließender Apoptoseinduktion für 48 und 72 h bestimmt. $0,5-1,0 \times 10^6$ Zellen wurden nach

entsprechender Inkubationszeit geerntet und mit dem APO2.7-PC5-mAK gefärbt. Am Durchflußzytometer wurde der Anteil der APO2.7-positiven Zellen bestimmt. Abbildung 15 zeigt eine vergleichende Histogrammdarstellung der Detektion des 7A6-Antigens auf der Oberfläche des Kontrollklons pCR3.1 und des *antisense*-Klons eas8c. Der Abbildung 15 ist zu entnehmen, dass der Kontrollklon pCR3.1 (M2 19 %) im Vergleich zum *antisense*-Klon eas8c (71 %) einen deutlich verringerten Gehalt an apoptotischen Zellen aufweist. Der Anteil der apoptotischen Zellen in den A549-Klonen nach 48 und 72 h anti-Fas-Inkubation ist in Abbildung 16 zusammengefasst. Sowohl nach 48 als auch nach 72 h Apoptoseinduktion zeigte sich in den *antisense*-Klonen eine 1,2-2,5fach erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zum Kontrollklon.

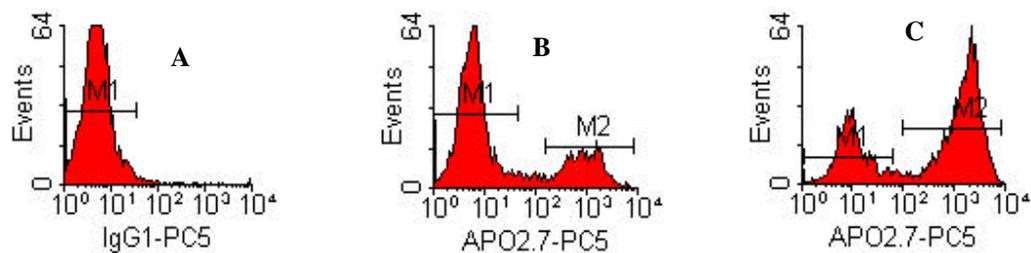


Abb. 15: Durchflusszytometrische Detektion des 7A6-Antigens auf der Oberfläche der A549-Klone am Beispiel des Kontrollklons pCR3.1 und des *antisense*-Klons eas8c. Nach 12 h IFN- γ -Vorinkubation und 48 h anti-Fas-mAK-Inkubation (100 ng/ml) wurden die Zellen mit dem APO2.7-PC5-mAK gefärbt und der Anteil der Apo2.7-PC5 positiven Zellen (M2) ermittelt. **A** Isotypkontrolle IgG1-PC5, **B** Kontrollklon pCR3.1 gefärbt mit Apo2.7-PC5 (M2=19%), **C** *antisense*-Klon eas8c gefärbt mit Apo2.7-PC5 (M2=71%). M1: Anteil Apo2.7-PC5 negativer Zellen

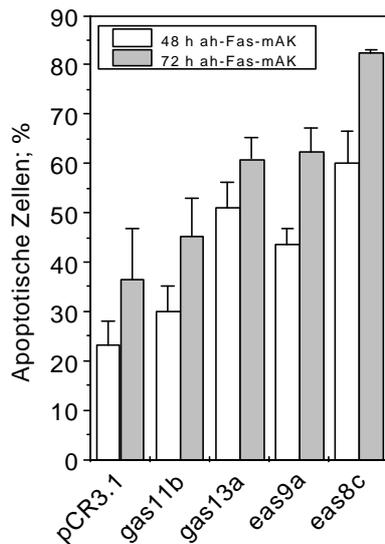


Abb. 16: Durchflusszytometrische Detektion des 7A6-Antigens auf der Oberfläche der A549-Klone. Nach 12 h IFN- γ -Vorinkubation und 48 und 72-stündiger anti-Fas-mAK-Inkubation (100 ng/ml) wurden die Zellen mit dem Apo2.7-PC5-mAK gefärbt und der Anteil der Apo2.7-PC5 positiven Zellen ermittelt. Die *antisense*-Klone zeigten im Vergleich zum Kontrollklon eine 1,2-2,5fach erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen.

3.3.3 Invasions- und Migrationsverhalten der Kathepsin L-*antisense*-Klone

Um das Invasionsverhalten der *antisense*-Klone zu untersuchen, wurden sie auf Matrigel[®]-beschichteten, porösen Membranen 72 h bei 37 °C inkubiert. Der Abbau der Matrixproteine ist wichtige Voraussetzung für die Migration durch die Matrigelschicht. Dieser Abbau erfolgte durch freigesetzte Proteasen. Nach der 3-tägigen Inkubationszeit wurden die A549-Klone von der Membranunterseite abgelöst und gezählt. Im Ergebnis wurde der Anteil der eingesetzten Zellen bestimmt, der die matrigelbeschichtete Membran durchwandert hatte. Wie aus Abbildung 17 A zu entnehmen ist, war die Invasivität der *antisense*-Klone im Vergleich zum Kontrollklon pCR3.1, um das 1,5-3,0fache erhöht.

Weiterhin wurde das Migrationsverhalten der *antisense*-transfizierten Zellen mit dem Kontrollklon verglichen. Die Zellklone wurden mit $^3\text{[H]}$ -Thymidin markiert, auf eine Mikroporenmembran von Transwell-Kammern gegeben und bei 37 °C inkubiert. Nach 3 Tagen wurden die durch die poröse Membran migrierten Zellklone geerntet, lysiert und anhand der gemessenen Radioaktivität quantifiziert. Es wurde der Anteil der migrierten Zellen ermittelt. Die *antisense*-transfizierten Klone zeigten im Vergleich zum Kontrollklon 3-10fach erhöhte Migrationsraten (Abb. 17 B).

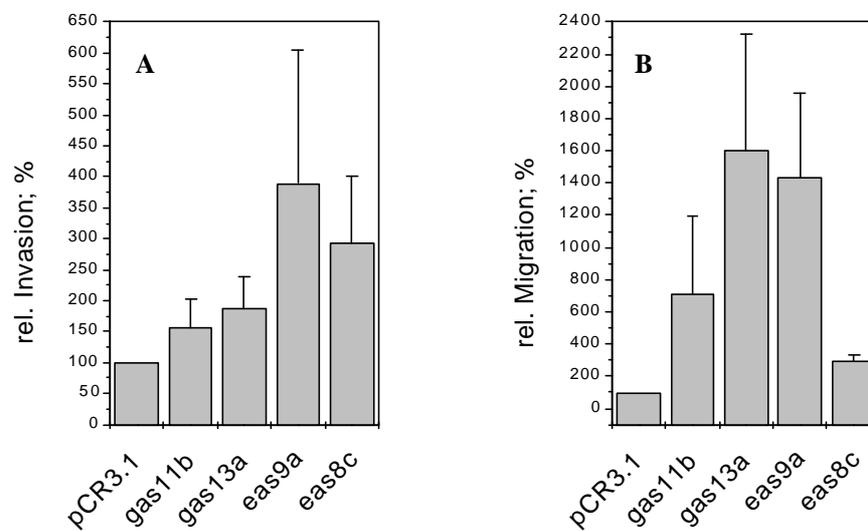


Abb. 17: Invasions- und Migrationsverhalten der A549-Klone durch poröse Membranen. **A** Relative Invasion: Nach 3 Tagen Inkubation bei 37 °C auf einer Matrigel beschichteten Membran wurde der relative Anteil der Zellen bestimmt, der die Matrigelmembran degradiert und durchwandert hatte. Die *antisense*-Klone zeigten eine 1,5-3,0fach erhöhte Invasion im Vergleich zum Kontrollklon.

B Relative Migration: Nach 3-tägiger Inkubation bei 37 °C wurden die durch die unbeschichtete poröse Membran migrierten Zellklone anhand ihrer Radioaktivität quantifiziert. Es wurde der relative Anteil der migrierten Zellen ermittelt. Die *antisense*-Klone zeigten vergleichsweise zum Kontrollklon eine 3-10fach erhöhte Migration.

3.3.4 Proteolytische Aktivität der Kathepsin L-*antisense*-Klone

Da die *antisense*-Klone eine erhöhte Invasivität zeigten, vermuteten wir, dass hierfür die Aktivität einer oder mehrerer Proteasen verantwortlich sein könnte.

3.3.4.1 Bestimmung der proteolytischen Aktivität mit dem Substrat Casein

Um möglicherweise erhöhte Proteaseaktivitäten in den *antisense*-Klonen gegenüber höhermolekularen Proteinsubstraten zu detektieren verwendeten wir Casein, das von Metallo-, Serin-, Sulfhydryl- und Aspartatproteasen gespalten werden kann. Nach der Lyse von ca. 1×10^6 Zellen bei neutralem (pH 7.4) oder saurem (pH 5.5) pH-Wert bestimmten wir in den A549-Klonen die hydrolytische Aktivität mit Hilfe des FITC-markierten Caseinsubstrates im neutralen und sauren pH-Milieu.

Wurden die A549-Klone unter neutralen Pufferbedingungen analysiert, zeigten sich keine Unterschiede in der Proteaseaktivität beim Vergleich des Kontrollklons pCR3.1 mit den *antisense*-Klonen. Unter sauren pH-Wertbedingungen war eine 1,3-1,6fach erhöhte Proteaseaktivität in den *antisense*-Klonen im Vergleich zum Kontrollklon detektierbar (Abb. 18).

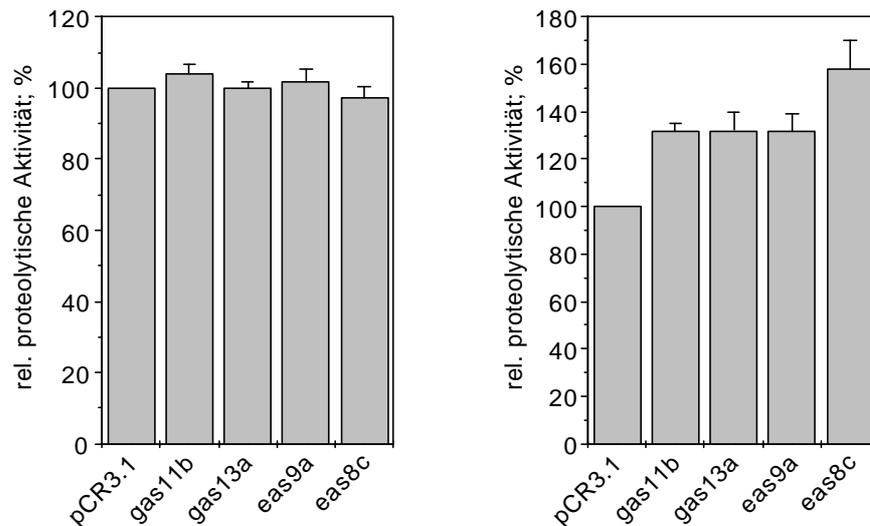


Abb. 18: Bestimmung der proteolytischen Aktivität in den A549-Klonen unter Verwendung des Substrates Casein. A Lyse der Zellklone und Aktivitätsmessung bei neutralem pH-Wert. **B** Lyse der Zellklone und Aktivitätsmessung bei saurem pH-Wert. Unter sauren pH-Wertbedingungen war in den antisense-Klonen eine 1,3-1,6fach erhöhte Aktivität im Vergleich zum Kontrollklon pCR3.1 messbar.

Die erhöhte Proteaseaktivität unter sauren pH-Wertbedingungen ließ die Beteiligung einer Sulfhydryl- oder Aspartatprotease vermuten. Um die verantwortliche Enzymklasse näher zu bestimmen, wurde der oben beschriebene Ansatz wiederholt unter Verwendung des Cysteinprotease-Inhibitors L-trans-Epoxy succinyl-Leu-*α*-methyl-Valine (E-64), des Serinproteaseinhibitors Diisopropylfluorophosphat (DFP), des Metalloprotease-Inhibitors Orthophenanthrolin (OPA) und des Aspartatprotease-Inhibitors Pepstatin A (PepA). Aus Abbildung 19 gehen die proteolytischen Aktivitäten der A549-Klone ohne und mit Verwendung der aufgezählten Proteaseinhibitoren hervor. Unter Einsatz des Aspartatprotease-Inhibitors Pepstatin A war die Aktivität deutlich reduziert im Gegensatz zu allen anderen verwendeten Inhibitoren.

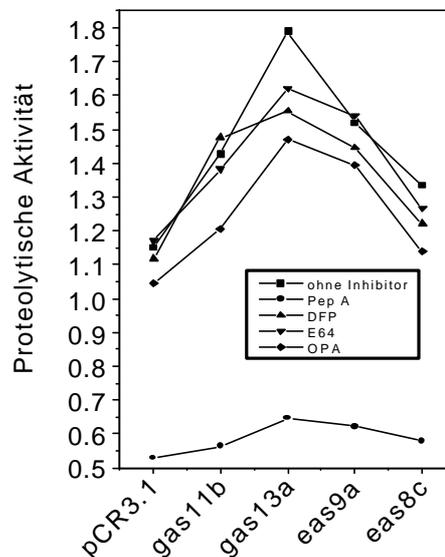


Abb. 19: Bestimmung der proteolytischen Aktivität mit Hilfe des Caseinsubstrats in den A549-Klonen nach Einsatz verschiedener Inhibitoren. Lyse der Zellen und Messung der Enzymaktivität bei pH-Wert 5,5. Inkubation ohne bzw. mit den Proteaseinhibitoren PepA, DFP, E-64 und OPA. Der Einsatz des Aspartatinhibitors PepA reduzierte die proteolytische Aktivität in den A549-Klonen deutlich. Alle anderen Inhibitoren hatten keinen Einfluß auf die Aktivität.

3.3.4.2 Messung der spezifischen Kathepsin D-Aktivität

Die reduzierte Proteaseaktivität unter Einsatz von Pepstatin A ließ die Vermutung zu, dass die erhöhte Aktivität durch eine Aspartatprotease verursacht werden könnte. Da Kathepsin D bei einem pH-Wert von 5 Casein spaltet und laut Literaturangaben nicht nur lysosomal und intrazellulär, sondern auch extrazellulär lokalisiert ist (Duffy, 1996), wurde in den A549-Klonen die spezifische Kathepsin D-Aktivität unter Verwendung des spezifischen Peptidsubstrats Ac-Glu-Asp(EDANS)-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Gly-Lys(DABCYL)-Glu-NH₂ bei einem pH-Wert von 3.8 untersucht. Aus Abbildung 20 ist zu

erkennen, dass die *antisense*-Klone im Vergleich zum Kontrollklon pCR3.1 eine 2-8fach erhöhte Kathepsin D-Aktivität hatten.

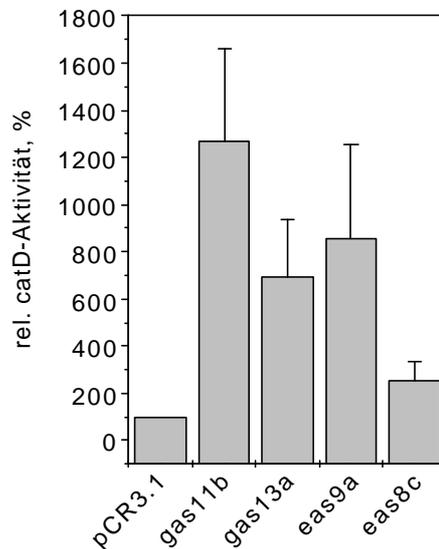


Abb. 20: Bestimmung der relativen Kathepsin D (cat D)-Aktivität in den A549-Klonen. Dabei kam das spezifische Peptidsubstrates Ac-Glu-Asp(EDANS)-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Gly-Lys(DABCYL)-Glu-NH₂ bei einem pH-Wert von 3.8 zum Einsatz. Die *antisense*-Klone zeigen im Vergleich zum Kontrollklon eine 2-8fach erhöhte cat D-Aktivität.

3.3.4.3 Analyse der Kathepsin D-Expression durch Western Blot

Mittels Western Blot konnten in den A549-Klonen drei verschiedene Kathepsin D-Banden detektieren werden. Dabei handelte es sich um die proteolytisch aktive 48 kD schwere Kathepsin D-Form und um eine 45 kD schwere Bande, die möglicherweise eine Isoform der Kathepsin D-Einzelkettenform (Single Chain) darstellt. Beide Kathepsin D-Formen wurden in den *antisense*-Klonen stärker exprimiert als im Kontrollklon pCR3.1. Weiterhin war eine 29 kD schwere Kathepsin D-Form sichtbar, wobei es sich um die doppelkettige, reife Kathepsin

D-Form handelte. Diese war dagegen nicht in allen *antisense*-Klonen eindeutig erhöht (Abb. 21).

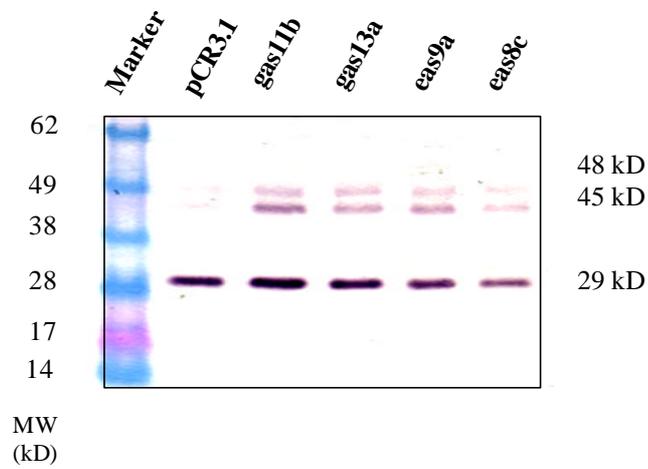


Abb. 21: Kathepsin D-Expression (cat D) in A549-Klonen. 1,5 μ g Protein wurden unter SDS-haltigen Elektrophoresebedingungen (4-12 % Polyacrylamidgel) aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Mittels polyklonalen Primär-AK, POD-konjugierten Sekundär-AK und NBT/BCIP-Substrat wurden eine 48, 45 und 29 kD schwere Kathepsin D-Bande detektiert.

3.3.5 Zytokinsekretion der Kathepsin L-*antisense*-Klone

Im weiteren Verlauf der funktionellen Charakterisierung der *antisense*-Klone wurde die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8, MCP-1 und IL-18 sowie der antiinflammatorischen Zytokine TGF- β 1 und - β 2 untersucht.

Wie unter Methoden beschrieben, kamen für die Bestimmung der proinflammatorischen Zytokine kommerzielle ELISA's mit einem spezifischen monoklonalen Primärantikörper sowie einem MPOD-markierten polyklonalen Sekundärantikörper zum Einsatz. Für die Messung von TGF- β 1 und - β 2 wurde der von Reinhold und Bank etablierte ELISA (Reinhold et al., 1997) genutzt.

Die ermittelten Zytokinkonzentrationen (pg/ml oder ng/ml) wurden auf 1×10^6 Zellen bezogen. Wie aus Abbildung 22 hervorgeht, war die IL-8-Sekretion in den *antisense*-Klonen um das 4-8fache erhöht und die MCP-1-Sekretion dagegen um die Hälfte erniedrigt. Die Konzentrationen von TGF- β 1 und - β 2, IL-6 und IL-18 waren dagegen nicht wesentlich verändert.

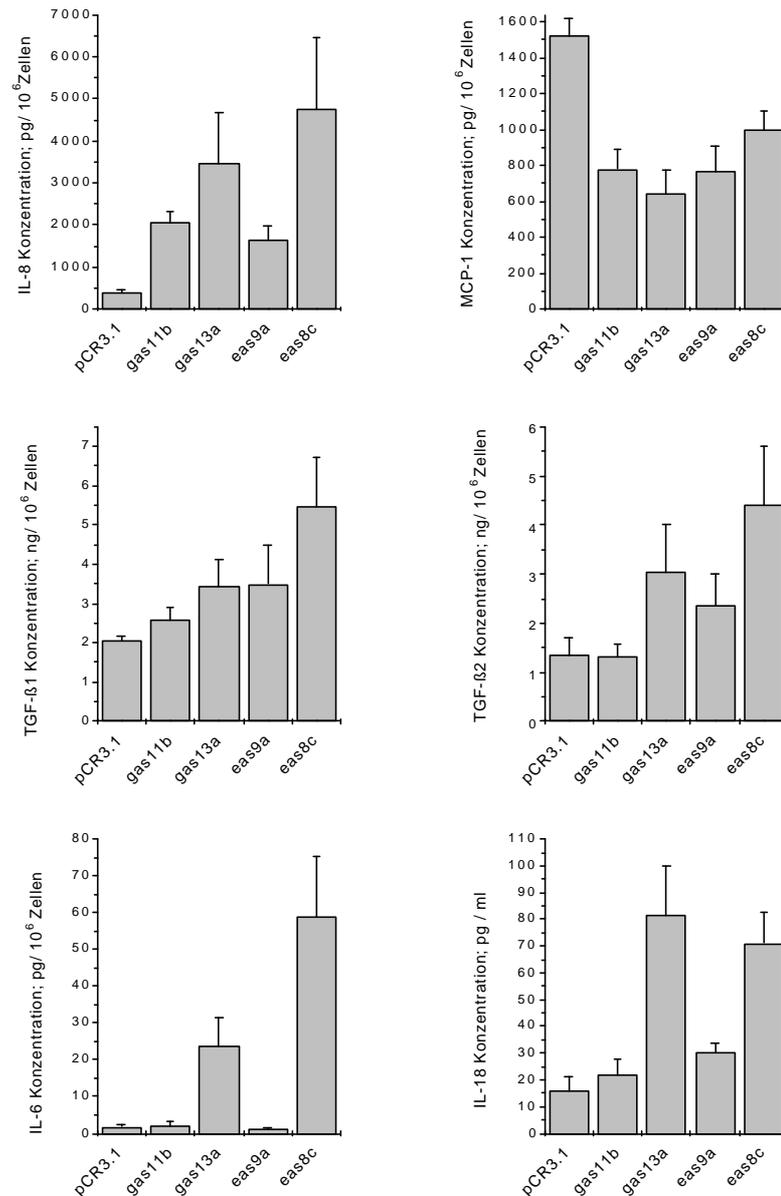


Abb. 22: Untersuchung der Zytokinsekretion in den A549-Klonen.

Die proinflammatorischen Zytokine IL-8, MCP-1, IL-6 und IL-18 sowie die antiinflammatorischen Zytokine TGF-β1 und -β2 wurden im Zellkulturüberstand mit Hilfe von ELISA quantifiziert. Die ermittelten Zytokinkonzentrationen wurden auf die Zellzahl von 1×10^6 bezogen. Dabei war die IL-8-Sekretion um das 4-8fache erhöht und die MCP-1-Sekretion um das 2fache erniedrigt. Die Sekretion der anderen Zytokine war dagegen nicht eindeutig verändert.

4 Diskussion

4.1 Gegenstand der vorliegenden Arbeit

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung von Kathepsin L auf physiologische Funktionen von Lungenepithelzellen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde der Einfluß der Suppression der Kathepsin L-Expression in der humanen Lungenepithelzelllinie A549 auf Zellfunktionen, wie die Proliferation, den programmierten Zelltod und das Invasions- sowie Migrationsverhalten bestimmt. Einen weiteren Untersuchungsschwerpunkt bildete die Bestimmung der pro- und antiinflammatorischen Zytokinen IL-8, MCP-1, IL-6, IL-18, TGF- β 1 und TGF- β 2 in Zellkulturüberständen dieser Kathepsin L-defizienten Zellen, da aus vorangegangenen Untersuchungen bekannt war, dass diese Zytokine von Lungenepithelzellen sekretiert werden.

Bisher ist aus der wissenschaftlichen Literatur bekannt, dass Kathepsin L an der Degradation von Matrixproteinen (Kirschke et al., 1995), an Knochenresorptionsvorgängen (Tagami et al., 1994; Kakegawa et al., 1995), an der Tumordinvasion sowie an Zellproliferationsprozessen (Thomssen et al., 1995; Ledakis et al., 1996) beteiligt ist. Ob Kathepsin L in apoptotischen Prozessen und der Zytokinsekretion eine Rolle spielt, ist bislang nicht erwiesen. Auch ist der bisherige Kenntnisstand auf experimentelle Ansätze zurückzuführen, bei denen vorrangig gruppenspezifische Inhibitoren oder antikatalytische Antikörper eingesetzt worden, um die spezifische Enzymaktivität zu inhibieren.

Um die Kathepsin L-Expression in der Lungenepithel-Zelllinie A549 bereits auf der Translationsebene zu blockieren wurde der methodische Ansatz der *antisense*-mRNS-Technik gewählt. Als Untersuchungsmaterial wurde die Zelllinie A549 verwendet, da sie als permanent wachsende, maligne transformierte Zelllinie für langfristige Untersuchungen geeignet ist.

4.2 Etablierung und Charakterisierung der Kathepsin L-*antisense*-Klone

Zur Untersuchung der Funktion spezifischer Proteasen gibt es verschiedene Herangehensweisen. Es stehen zahlreiche klassenspezifische Inhibitoren zur Verfügung, wie z.B. L-trans-Epoxysuccinyl-Leu-*agmatine* (E-64), ein irreversibler Cysteinproteinaseinhibitor oder Leupeptin, ein reversibler Serin- und Cysteinproteinaseinhibitor. Gleiches gilt für die anderen Enzymklassen. Neben diesen Inhibitoren, die eine gesamte Enzymklasse hemmen, gibt es spezifischere Inhibitoren, die bevorzugt die Aktivität einzelner Proteasen hemmen, z.B. CA 074, ein spezifischer Kathepsin B-Inhibitor, Z-Phe-Phe-CHN₂, ein Kathepsin L-Inhibitor (Kirschke et al., 2000) oder Arphamenin A und B, die spezifisch die Metalloprotease Aminopeptidase B hemmen. Durch Proteaseinhibitoren wird allerdings nur die katalytische Aktivität der Proteasen gehemmt. Der zur Verfügung stehende Untersuchungszeitraum ist dabei sehr eingeschränkt, da die Inhibitoren kontinuierlich von außen zugefügt werden müssen.

Eine gut etablierte Untersuchungsmethode ist die *antisense*-RNS-Technologie, die beispielsweise gegenüber Inhibitoren wesentliche Vorteile aufzuweisen hat. Die Expression der gewünschten Protease wird sehr früh, d. h. vor der Translation zum Protein blockiert. Desweiteren ist die Ausschaltung der Protease hochspezifisch. Die Ziel-RNS hybridisiert mit der *antisense*-RNS und wird von der Ribonuklease H verdaut.

Wir entschieden uns für die *antisense*-RNS-Technik, um die Expression des Kathepsin L-Gens bereits auf RNS-Ebene zu hemmen, da diese Methode sehr spezifisch ist, bislang mit Erfolg von verschiedenen Arbeitsgruppen angewendet wurde und mit einem überschaubaren Zeit- und Arbeitsaufwand durchführbar war. Weiterhin entschieden wir uns für eine stabile Transfektion der A549-Zellen, um langfristige und reproduzierbare Untersuchungen durchführen zu können. Der Vorteil einer stabilen gegenüber einer transienten Transfektion besteht darin, dass die Fremd-DNS durch Selektionsmedium dauerhaft in der transfizierten Zelle verbleibt und möglicherweise ins Wirtsgenom integriert wird. Bei einer transienten Transfektion wird die fremde DNS in der Zelle schnell abgebaut, da

der Selektionsdruck fehlt. Die funktionellen Untersuchungen müssen sofort nach Transfektion durchgeführt werden und sind auf einen kurzen Zeitraum beschränkt. Ein Nachteil stabil transfizierter Zelllinien ist ihre dauerhafte Kultivierung unter Selektionsdruck. Zelllinien sind maligne transformiert. Die Kultivierung unter zusätzlichem Selektionsdruck birgt weitere Mutationsgefahren.

Die A549-Zellen wurden mit drei verschiedenen Kathepsin L-cDNS-Konstrukten in *antisense*-Orientierung mit Hilfe des Expressionsvektors pCR3.1 transfiziert, da im Vorfeld der Arbeiten ungewiss war, welche cDNS-Konstrukte die beste Kathepsin L-Inhibierung zeigen werden. Dabei handelte es sich um ein Kathepsin L-cDNS-Gesamtkonstrukt, ein 5'- und ein 3'-Konstrukt. Die unter Kontrolle des CMV-Promotors transkribierte Kathepsin L-*antisense*-mRNS war komplementär zur zellulären Kathepsin L-mRNS. Durch Hybridisierung beider RNS-Sequenzen wurde die Translation des zellulären Kathepsin L-mRNS-Transkripts weitestgehend verhindert. Nach Denhard gibt es drei Mechanismen der *antisense*-RNS-Inhibierung (Denhardt, 1992).

1. Die Inhibierung auf der Ebene des Splicings des Primärtranskripts.
2. Die Inhibierung beim Transport der reifen zellulären mRNS ins Zytosol.
3. Die Inhibierung der Translation der mRNS an den Ribosomen.

Aufgrund des auf dem Expressionsvektor kodierten Neomycinresistenzgens wurden nach klonaler Selektion mit 1 mg/ml G418 stabile A549-Klone mit stabiler Expression der Kathepsin L-*antisense*-RNS isoliert. Der Erfolg der stabilen Transfektion wurde auf DNS-, RNS- und Proteinebene untersucht.

Aus 49 primär isolierten Zellklonen wurden für die weiteren Untersuchungen 4 *antisense*-Klone ausgewählt, die sich durch eine besonders deutliche Reduktion der Kathepsin L-Expression auf mRNS-, Protein- und Enzymaktivitätsebene auszeichneten.

Die mit dieser Kathepsin L-*antisense*-RNS stabil transfizierten A549-Klone zeigten eine deutlich verringerte Kathepsin L-Proteinexpression (um 80 %) und standen über einen längeren Zeitraum für funktionelle Untersuchungen zur Verfügung. Dabei wurden die Kathepsin L-*antisense*-Klone mit Kontrollzellen verglichen, die auf gleiche Weise mit dem Transfektionsvektor ohne *antisense*-Insert transfiziert waren.

Charakterisierung auf mRNA-, Protein- und Enzymaktivitätsebene

Die Kathepsin L *antisense*-Klone zeigten im Vergleich zum Kontrollklon eine auf 40-60 % verringerte relative Kathepsin L mRNA-Konzentration.

Eine starke Reduktion des relativen Kathepsin L-Proteingehaltes konnte in den Zelllysaten der *antisense*-Klone festgestellt werden. In allen vier *antisense*-Klonen war eine relative Kathepsin L-Konzentration von nur 20-30 % im Vergleich zum Kontrollklon (Abb. 7) mittels ELISA-Technik quantifizierbar.

Erwartungsgemäß zur reduzierten intrazellulären Kathepsin L-Konzentration sekretierten die *antisense*-Klone auch ca. 50 % weniger Kathepsin L im Vergleich zum Kontrollklon (Abb.7).

Die Kathepsin L-Aktivität wurde in den A549-Klonen mit dem Substrat Z-Phe-Arg-AMC unter Einsatz des Kathepsin B Inhibitors CA 074-Me gemessen. Dabei entsprach die CA 074-Me resistente Aktivität der Kathepsin L-ähnlichen Aktivität. Dies bedeutet, dass die hier gemessene Aktivität nicht allein durch Kathepsin L, sondern auch von verwandten Kathepsinen, wie Kathepsin K, H oder F verursacht wird. Kathepsin F ist ubiquitär verbreitet und spaltet Substrate wie Z-Phe-Arg-AMC mit hoher katalytischer Effizienz (Wang et al., 1998). Die in den *antisense*-Klonen gemessenen relativen Kathepsin L-Aktivitäten lagen zwischen 30 und 60 % (Abb. 7) und sind vergleichbar mit anderen Referenzen (Kirschke et al., 2000; Krueger et al., 2000).

4.3 Funktionelle Untersuchungen an Kathepsin L-defizienten A549-Klonen

4.3.1 Verringerung der Proliferation

Im Ergebnis der vorliegenden Arbeit wurde durch intrazelluläre Inhibierung der Kathepsin L-Expression in den *antisense*-Klonen eine um ca. 20 % verringerte Proliferation ermittelt. Erwartungsgemäß zur intrazellulär reduzierten Kathepsin L-Expression sekretierten alle Klone deutlich weniger Kathepsin L in den extrazellulären Raum. Dabei war die sekretierte Kathepsin L-Konzentrationen der vier *antisense*-Klone um ca. 50 % dezimiert im Vergleich zum Kontrollklon. Vermutlich steht die verringerte Kathepsin L-Sekretion der *antisense*-Klone im Zusammenhang mit ihrer verringerten Proliferation. Daher lag die Vermutung nahe, dass Kathepsin L in der Regulation der Zellproliferation eine Rolle spielen könnte, indem es in der sekretierten Proform als Wachstumsfaktor über den IGF-Signaltransduktionsweg die DNS-Synthese der A549-Zellen stimuliert.

Aus verschiedenen Quellen geht hervor, dass das Kathepsin L-Gen als sog. "Gen für eine verzögerte Antwort" an der DNS- und Proteinsynthese beteiligt ist. Kane und Gottesman beschrieben 1990, dass in NIH3T3-Zellen das Kathepsin L-Gen durch die Wachstumsfaktoren PDGF und EGF, durch Phorbol 12-Myristat-13-Acetat (PMA), durch cAMP und aktivierte Onkogene, wie v-ras, v-src und v-mos auf mRNA- und Proteinebene aktiviert wird. Im Gegensatz dazu verringert TGF- β die Kathepsin L mRNA-Expression (Kane et al., 1990).

Die oben genannten Faktoren stimulieren die Kathepsin L-Transkription, indem das DNS-Bindungsprotein Egr-1- und später das Sp-1-Bindungsprotein an die Promotorregion des Kathepsin L-Gens binden. Das Egr-1-Protein gehört zu den sog. "frühen Antwortgenen", die die "verzögerten Antwortgene" aktivieren (Ishidoh et al., 1998).

Sezerniertes Prokathepsin L bindet an Kationen-unabhängige Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren und andere unbekannte Rezeptoren und fördert dadurch die zelluläre DNS-Synthese. Außerdem degradieren Prokathepsin L und Kathepsin L im extrazellulären Raum Fibronectin, Laminin und Kollagen und ermöglichen damit eine schnellere Ausbreitung der Zelle (Ishidoh et al., 1998).

Für die Funktion des Prokathepsin L als Wachstumsfaktor und somit Proliferationsförderer gibt es verschiedene Hinweise:

- Kasai et al. zeigten 1993, dass Prokathepsin L in unreifen Thymozyten die DNS-Synthese nach Stimulation mit IL-1, IL-7 und anti CD3 Antikörpern fördert (Kasai et al., 1993).
- Weber et al. zeigten 1997, dass die Metastasierung und lokale Expansion von Myelomzellen, die Prokathepsin L sekretieren, durch Fusion mit Plasmazellen, welche monoklonale Antikörper für Prokathepsin L produzieren, unterdrückt werden kann. Diese Beobachtung spricht dafür, dass Prokathepsin L am Wachstum und an der Metastasierung von Myelomzellen beteiligt ist (Weber et al., 1997).

Nach Ishidoh et al. ist der Effekt von Prokathepsin L auf das Zellwachstum mit dem des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors (IGF) vergleichbar (Ishidoh et al., 1998). Beispielsweise wird die Oberflächenbindung von Prokathepsin L, dessen Konzentration mit der wachstumsstimulierenden Aktivität korreliert, durch einen spezifischen Prokathepsin L-Antikörper oder durch einen Kationen-unabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Antikörper aufgehoben (Ishidoh et al., 1993). Der wachstumsfördernde Effekt von Prokathepsin L könnte über den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, der auch als IGF-II-Rezeptor bezeichnet wird, verlaufen, wobei der Signaltransduktionsweg unbekannt ist (Ishidoh et al., 1998).

Edwards et al. beschreibt 1998 ebenfalls eine Kathepsinbindung an den IGF-II-Rezeptor, dessen Internalisierung sowie lysosomale Degradation. Siddle referierte 1992, dass bislang Unklarheit über die Signaltransduktion des IGF-II-Rezeptors herrscht. Eine Bindung von IGF oder Kathepsin L an diesen Rezeptor führt nicht zu einer proliferationsfördernden Signaltransduktion. Deshalb wird davon ausgegangen, dass der IGF-II-Rezeptor für eine kompetitive Herabregulation der IGF-vermittelten Signale verantwortlich ist. Eine verringerte Kathepsin L-Konzentration im extrazellulären Raum der *antisense*-Klone könnte demnach zu einer verringerten Bindung von Kathepsin L und Internalisierung des Kathepsin L-IGF-II-Rezeptor-Komplexes führen. Der IGF-II-Rezeptor steht somit fast ausschließlich für die Bindung von IGF zur Verfügung, sodass die proliferationsfördernde Signaltransduktion über den IGF-I-Rezeptorweg verringert ist. Der IGF-I-Rezeptor wurde von Ankrapp et al. auf der Oberfläche von A549-Zellen nachgewiesen und beschrieben (Ankrapp et al., 1993).

4.3.2 Erhöhung der Apoptoseempfindlichkeit

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit ist die erhöhte Sensitivität der Kathepsin L-defizienten Zellklone gegenüber den apoptoseinduzierenden Stimuli IFN- γ und anti-Fas-Antikörper. Die Expression des Fas-Rezeptors (CD95) auf der Oberfläche der antisense-Klone war auf 160-180 % erhöht. Die Untersuchung von drei spezifischen Apoptosemerkmalen, wie der Caspase 3-Aktivität, der DNS-Fragmentierung und der Expression des Membranproteins 7A6, ergaben eine 2-3fach erhöhte Sensitivität der *antisense*-Klone gegenüber den apoptoseinduzierenden Signalen. Daraus wurde geschlossen, dass Kathepsin L die Tumorzelllinie A549 vor dem natürlichen Zelltod schützt bzw. als Überlebensfaktor dieser Zelllinie fungieren könnte.

Apoptose spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Homeostase vielzelliger Organismen. Im Verlauf der Embryonalentwicklung sterben Zellen durch Apoptose während der Morphogenese oder Synaptogenese. Im erwachsenen Organismus werden Zellen durch Apoptose eliminiert, um Gewebe- und Organgrößen konstant zu halten. Apoptosedisregulationen führen zu Tumorwachstum, Autoimmunerkrankungen oder zu neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson (Roberg et al., 1999; Ashkenazi et al., 1998; Evan et al., 1998).

Apoptose kann über eine Vielzahl von extra- und intrazellulären Signalen induziert werden. Dazu zählen UV- oder γ -Strahlen, die DNS-Schäden hervorrufen, Glukokortikoide oder der Entzug von Wachstumsfaktoren. Viele Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche spezifische Rezeptoren, sog. Todesrezeptoren, die in Gegenwart extrazellulärer Apoptosesignale den programmierten Zelltod inszenieren, indem innerhalb von Sekunden nach Bindung des Liganden intrazelluläre Caspasen aktiviert werden, die das Ableben der Zelle bewirken.

Diese Art der Apoptoseinduktion machen sich die Zellen des Immunsystems bei der Vernichtung virusinfizierter Zellen zu Nutze. Die Todesrezeptoren gehören zur Gen-Familie des Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptors (TNF-R), die durch ähnliche, cysteinreiche extrazelluläre Domänen und homologe zytoplasmatische Sequenzen, den sog. Todesdomänen, gekennzeichnet sind. Die am besten

charakterisierten Todesrezeptoren sind CD95 (auch als Fas oder Apo1 bezeichnet) und TNF-R1 (Hongo et al., 2000; Kuwano et al., 1999). Die Liganden dieser Rezeptoren sind strukturell verwandte Moleküle und gehören in die TNF-Genfamilie.

CD95 und der CD95-Ligand spielen eine wichtige Rolle in folgenden physiologischen Apoptoseprozessen des Immunsystems (Ashkenazi et al., 1998):

- Periphere Eliminierung von aktivierten reifen T-Zellen am Ende der Immunantwort
- Abtötung von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen durch zytotoxische T-Zellen oder natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

Neben der aktiven Teilnahme der Caspasen und auch der Mitochondrien (Enari et al., 1998; Green et al., 1998; Gross et al., 1999; Kluck et al., 1997; Li et al., 1997; Mancini et al., 1998; Susin et al., 1999), gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Cystein- und Aspartatproteasen aus dem endosomalen/lysosomalen Kompartiment am apoptotischen Geschehen (Roberts et al., 1997; Stoka et al., 2000; van Eijk et al., 1999).

So induziert beispielsweise der Kathepsin-Inhibitor Z-Phe-Gly-NHO-Bz in verschiedenen humanen Tumorzelllinien Apoptose (Zhu et al., 2000), was bedeutet, dass Kathepsine Überlebensfaktoren für Tumorzellen sind.

Shibata et al. zeigten, dass in PC12-Zellen eine durch Serumentzug induzierte Apoptose durch Überexpression von Kathepsin B gehemmt werden kann (Shibata et al., 1998). Im Gegensatz dazu wurde bei Überexpression von Kathepsin D, einer Aspartatproteinase, in HeLa-Zellen und PC12-Zellen Apoptose induziert.

Weiterhin wird in der Arbeit von Isahara et al. bestätigt, dass die Kathepsine B und D an der Regulation des programmierten Zelltodes beteiligt sind, indem Kathepsin B die Apoptose hemmt und Kathepsin D sie fördert. Durch Einsatz des Kathepsin B-Inhibitors CA 074 und von Kathepsin B-*antisense*-Oligonukleotiden wurde Apoptose induziert (Isahara et al., 1999). Kathepsin D übernimmt in diesem Zusammenhang die Rolle des Apoptosemediators. Die apoptoseinduzierende Wirkung von Kathepsin D wird wahrscheinlich durch Kathepsin B unterdrückt.

Eine weitere Arbeit von Deiss et al. bekräftigt die Rolle von Kathepsin D am programmierten Zelltod, der durch Interferon- γ und Fas/Apo1 induziert wurde. Dabei wirkte Kathepsin D als positiver Apoptosemediator (Deiss et al., 1996).

Ausgehend von diesen Literaturquellen stellte sich die Frage, ob Kathepsin L, ähnlich wie Kathepsin B, die A549-Zelllinie vor Apoptose schützt. Speziell für Kathepsin L gibt es dahingehend keine Daten. Im Ergebnis dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass die Kathepsin L-*antisense*-Klone im Vergleich zum Kontrollklon eine 2-3fach erhöhte Sensitivität gegenüber apoptoseinduzierenden Stimulie aufwiesen. Kathepsin L scheint die A549-Zellen, ähnlich wie Kathepsin B die PC12-Zellen, vor Apoptose zu schützen.

4.3.3 Erhöhte Kathepsin D-Expression

Außerdem konnte in den *antisense*-Klonen eine verstärkte Kathepsin D-Expression und eine 2-8fach erhöhte Enzymaktivität im Vergleich zum Kontrollklon gemessen werden. Die proteolytisch aktive 48 kD schwere Kathepsin D-Form (Single Chain), die häufig in prälysosomalen Vesikeln gefunden wird, war in den Kathepsin L-*antisense*-Klonen verstärkt exprimiert. Gleiches galt für die 45 kD Kathepsin D-Form, die vermutlich eine Isoform darstellt. In der Arbeit von Démoz et al. (Demotz et al., 1989) werden ebenfalls zwei "Single Chain"-Formen des reifen Kathepsin D mit einem Molekulargewicht von 45 und 43 kD beschrieben.

Bei der reifen doppelkettigen Kathepsin D-Form mit einem Molekulargewicht von 29 kD zeigten nur die *antisense*-Klone *gas11b* und *gas13a* eine erhöhte Expression.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Kathepsin D in Kathepsin L-defizienten A549-Klonen auf Protein- und Aktivitätsebene aufreguliert war. Eine Erklärung für diese erhöhte Expression könnte sein, dass Kathepsin D den "turnover" in den Lysosomen aufrecht erhält und den Kathepsin L-spezifischen Substratabbau mit übernimmt. Bednarski et al. zeigte in Hippocampuszellen, dass durch Inhibierung von Kathepsin B und L die Aktivität von Kathepsin D erhöht werden kann (Bednarski et al., 1998). Ob Kathepsin D auch ein positiver Mediator im stimulierten Apoptosegeschehen der Kathepsin L supprimierten A549-Klone ist, bleibt nachzuweisen.

4.3.4 Erhöhte Invasion

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der Invasivität der Kathepsin L-*antisense*-Klone gegenüber einer Matrigelmembran. Diese bestand aus extrazellulären Matrixproteinen, wie Proteoglykanen, Lamininen und Kollagen IV.

Aufgrund der Kathepsin L-Suppression wurde von den *antisense*-Klonen eine verringerte Invasionsfähigkeit erwartet, da mit Kathepsin L eine Protease, die extrazelluläre Matrix degradieren könnte, fehlt. Im Gegensatz dazu zeigten die *antisense*-Klone eine 1,5-3,0fach erhöhte Invasivität auf der Matrigelmembran. Deshalb wurde vermutet, dass die Suppression der Kathepsin L-Expression zu einer Aufregulation einer anderen Protease, die für einen verstärkten Matrixabbau zuständig ist, führt. Diese Hypothese wurde anhand der Beeinflussung der Caseinspaltung durch gruppenspezifische Inhibitoren untersucht. Unter Lyse- und Assaybedingungen bei einem pH-Wert von 5,5 konnten wir eine 1,3-1,6fach erhöhte Proteaseaktivität der Kathepsin L-defizienten Klone quantifizieren. Die Untersuchungen mit gruppenspezifischen Inhibitoren deuteten insbesondere auf die erhöhte Expression einer Aspartatprotease hin. Somit korrelierten diese Befunde mit der oben beschriebenen verstärkten Expression und Aktivität von Kathepsin D, welches für die verstärkte Degradation der Matrigelmembran und damit für die erhöhte Invasivität der Zellen verantwortlich sein könnte. Verschiedene Arbeitsgruppen wiesen nach, dass Kathepsin D sekretiert werden kann und in der Lage ist, extrazelluläre Matrixbestandteile, wie Proteoglykan oder Kollagen zu spalten (Bohley et al., 1992, Lorenzo et al., 2000; Barrett, 1977). Voraussetzung für die enzymatische Aktivität von Kathepsin D ist ein saures Milieu. Dieses könnte beispielsweise im perizellulären Raum durch eine massive Freisetzung lysosomaler Inhaltsstoffe geschaffen werden. Eine andere mögliche Wirkung von Kathepsin D besteht in der Initiierung einer extrazellulären proteolytischen Aktivierungskaskade, in deren Verlauf z. B. uPA (Urokinase-Plasminogenaktivator) aktiviert wird, welches wiederum Plasminogen in Plasmin umwandelt und die extrazelluläre Matrix degradiert.

Zahlreiche Literaturquellen belegen, dass die Fähigkeit von Tumorzellen, durch Gewebe zu wandern, durch die verstärkte Expression und Sekretion

proteolytischer Enzyme, die die extrazelluläre Matrix abbauen können, hervorgerufen wird. Wichtige Proteasesysteme sind neben dem Plasminogenaktivatorsystem und den Matrixmetalloproteasen (MMP) die Kathepsine.

Kathepsine sind sowohl in der Lage, extrazelluläre Matrixproteine zu spalten, als auch andere, für die Tumorprogression wichtige Enzyme, zu modifizieren. Kathepsin B und L aktivieren beispielsweise Pro-uPA (Pro-Urokinase-Plasminogenaktivator) (Duffy, 1996). Ihrerseits werden die Kathepsine B und L von Kathepsin D und spezifischen Metalloproteasen in ihre enzymatisch aktiven Formen überführt (Kirschke et al., 2000). Aus verschiedenen Arbeiten geht hervor, dass die Kathepsine B, L und D in Tumorgewebe verstärkt exprimiert werden (Duffy, 1996; Thomssen et al., 1995; Ledakis et al., 1996; Keppler et al., 1996; Yan et al., 1998; Chauhan et al., 1991). Man fand erhöhte mRNA-Spiegel, erhöhte Aktivitäten oder verschiedene Isoformen (z.B. Splicingvarianten auf mRNA-Ebene, Fehlen der Signalsequenz) dieser Kathepsine. Außerdem kommt es zu einer Gleichgewichtsverschiebung zwischen Kathepsinen und Cystatinen im extrazellulären Raum zur Seite der Kathepsine. Gleichfalls ist eine untypische Lokalisation der Lysosomen in der Zellperipherie und somit eine Konzentrierung der Kathepsine an der Plasmamembran zu beobachten.

Durch das Fehlen von Kathepsin L kommt es möglicherweise zu einer Verschiebung des Proteasengleichgewichts in den Zellklonen, was scheinbar durch die Erhöhung der Kathepsin D-Expression ausgeglichen wird.

4.3.5 Veränderte Zytokinsekretion - Erhöhte Migration

Im weiteren Verlauf der funktionellen Charakterisierungen wurde die Sekretion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen analysiert. Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass A549-Zellen insbesondere IL-8, MCP-1, IL-6, IL-18, TGF- β 1 und - β 2 exprimieren. Deshalb untersuchten wir mögliche Konsequenzen der Supprimierung von Kathepsin L auf die Sekretion dieser Zytokine. Im Ergebnis dieser Untersuchungen war in den *antisense*-Klonen die IL-8-Sekretion um das 4-8fache erhöht und die MCP-1-Sekretion um das 2fache verringert. Die

Sekretion von IL-6, IL-18, TGF- β 1 und β 2 dagegen war in den *antisense*-Klonen weder eindeutig erhöht oder erniedrigt.

Die Vermutung ist naheliegend, dass IL-8 als autokriner Wachstumsfaktor an seinen Rezeptor auf der Zelloberfläche bindet und internalisiert wird. Kathepsin L als endosomale/lysosomale Protease scheint an der Degradation des internalisierten Rezeptor-Ligand-Komplexes beteiligt zu sein. Die MCP-1-Expression wird über den mitogen-aktivierten Proteinkinaseweg angeregt. Die Signaltransduktion könnte beispielsweise nach Stimulation des IGF-Rezeptorweges ausgelöst werden. Fehlendes Kathepsin L könnte somit zur Modulation des IGF-Signaltransduktionsweges führen und nachfolgend zur verringerten MCP-1-Transkription.

Weiterhin wurde in den *antisense*-Klonen eine 3-10fach gesteigerte Migration gemessen, die möglicherweise auf die erhöhte IL-8-Sekretion dieser Klone zurückführbar ist. In ersten Vorversuchen wurde die Wirkung eines neutralisierenden IL-8-Antikörpers auf die Migration vereinzelter *antisense*-Klone untersucht. Im Vergleich zu unbehandelten Klonen zeigte sich, dass eine Inkubation mit einem anti-IL-8-Antikörper die erhöhte Migration der *antisense*-Klone supprimierte. (Weber et al., 1997)

IL-8 und MCP-1 gehören zur Familie der Chemokine, die als chemische Lockstoffe für phagozytierende Zellen fungieren. Sie bewirken die Migration neutrophiler Granulozyten und Monozyten aus dem Blut zum Infektionsherd. Die Chemokin-Familie lässt sich in drei Gruppen unterteilen:

- CXC-Chemokine: In der Aminosäuresequenz dieser Zytokine sind die ersten beiden Cysteine durch eine Aminosäure getrennt.
- CC-Chemokine: Die beiden Cysteinreste in der Aminosäuresequenz sind benachbart.
- C-Chemokine: In der betreffenden Region der Aminosäuresequenz befindet sich nur ein Cysteinrest.

Ein weiteres molekulares Merkmal der Chemokine ist die Konservierung von vier, für die Ausbildung der Tertiärstruktur wichtigen, Cysteinresten. Zwischen den Cysteinen 1 und 3 sowie 2 und 4 werden Disulfidbrücken ausgebildet. Während die CXC-Chemokine im Allgemeinen die Wanderung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten fördern, unterstützen die CC-Chemokine die

Aktivierung und Wanderung von Monozyten, Lymphozyten, Basophilen, Eosinophilen, Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und dendritischen Zellen.

IL-8 zählt zu den CXC-Chemokinen, MCP-1 dagegen zu den CC-Chemokinen. Sie binden an G-Protein-gekoppelte spezifische Rezeptoren, die die Lipid-Doppelschicht siebenfach durchspannen.

IL-8 bindet an zwei Rezeptoren. Der Rezeptor CXCR-1 (IL-8RA) hat hohe Affinität für IL-8 und geringe Affinität für andere Chemokine. Der Rezeptor CXCR-2 (IL-8RB) besitzt gleich hohe Affinität für IL-8 als auch für Chemokine wie GRO- α -, - β -, - γ (Growth Related Oncogene) oder NAP-2 (Neutrophil Activating Peptide). Die IL-8-Rezeptoren werden auf zahlreichen Zellen exprimiert, wie z. B. von neutrophilen Granulozyten, CD4⁺ T-Zellen, Monozyten, Blutplättchen, Leukozyten-Zelllinien, Fibroblasten, Keratinocyten, Endothelzellen und Melanomzellen. IL-8 wird ebenso von einer Vielzahl von Zellen gebildet, z.B. von mononukleären Zellen, NK-Zellen, neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten, Mastzellen, Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen sowie von Tumorzellen. Weiterhin kann die IL-8-Produktion von Zytokinen, wie IL-1 oder TNF- α (Tumor Nekrose Faktor- α), bakteriellen und viralen Molekülen, wie LPS (Lipopolysaccharide) oder Doppelstrang-DNS, pflanzlichen Produkten, wie Concanavalin A oder PMA und vielen anderen Mediatoren stimuliert werden.

Neben der Stimulation der Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten bewirkt IL-8 auch eine erhöhte Migration naiver T-Zellen und aktiviert andere Zelltypen, wie Fibroblasten, Melanomzellen, Endothelzellen, Keratinozyten und Epithelzellen.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass Tumorzelllinien, darunter auch Lungenepithelzellen IL-8 produzieren und dass dieses Zytokin autokrine Wirkung besitzt (Xu et al., 2000; Brew et al., 2000; Fujisawa et al., 2000; Browning et al., 2000). Die Blockierung der Wirkung von IL-8 mit einem anti-IL-8-Antikörper führte zum verringerten Wachstum von Lungen-, Magen- und Kolonadenokarzinomzellen (Fujisawa et al., 2000). IL-8 ist auch ein autokriner Wachstumsfaktor für Melanomzellen. Dabei korrelierte die IL-8 Expression dieser Zellen mit ihrem metastasierendem Potential (Singh et al., 1995). Aus einer Arbeit von Kitadai et al. (Kitadai et al., 2000) geht hervor, dass extrazellulär zugeführtes IL-8 in humanen Magenkarzinomzellen die Expression des Epidermalen

Wachstumsfaktorrezeptors, des Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktors, der Metalloproteinase-9 und von IL-8 selbst erhöht, jedoch die Expression von E-Cadherin verringert. IL-8 spielt demnach eine Rolle beim Wachstum von humanen Magenkarzinomzellen in Form eines autokrinen und parakrinen Faktors. Weiterhin wurde nachgewiesen durch die Arbeitsgruppe von Wilson, dass IL-8 in verschiedenen Zellarten, wie Keratinozyten, Endothelzellen oder humanen Kolonepithelzellen, die Proliferation und Migration stimuliert (Wilson et al., 1999). Möglicherweise kommt es zur Aufregulation eines oder mehrerer Adhäsionsmoleküle durch IL-8 (Roebuck, 1999). IL-8 bewirkt z. B. die verstärkte Expression von β -2-Integrinen in neutrophilen Granulozyten. Durch anti-IL-8 Antikörper konnte diese erhöhte Migration gehemmt werden (Wilson et al., 1999).

MCP-1 induziert Monozyten- und T-Zellchemotaxis über den MCP-1-Rezeptor CCR-2. CC-Rezeptoren gehören wie die CXC-Rezeptoren zur Familie der G-Protein gekoppelten Sieben-Transmembran-Rezeptoren. CCR-2 interagiert nicht nur mit MCP-1 sondern auch mit MCP-2, MCP-3 und MCP-4 und wird auf Monozyten, basophilen Granulozyten, aktivierten T-Zellen, NK-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert. Außerdem wurde beschrieben, dass MCP-1 über Tyrosinkinase-gekoppelte Rezeptoren eine Signaltransduktionskaskade in Monozyten aktiviert (Ashida et al., 2001).

Über die eigentliche Ursache für die deutlich erhöhte IL-8-Sekretion und die verringerte MCP-1 Sekretion in den Kathepsin L-defizienten Klonen kann derzeit nur spekuliert werden. Folgende Erklärungen kommen in Frage:

1. Nach der Bindung von IL-8 an seinen spezifischen Rezeptor CXCR1 oder CXCR2 wird einerseits eine G-Protein vermittelte Signalkaskade aktiviert, andererseits wird der Ligand-Rezeptor-Komplex internalisiert, in sog. frühe Endosomen. Der internalisierte Ligand-Rezeptor-Komplex wird entweder durch Veränderungen des pH-Wertes und proteolytische Enzyme in den frühen Endosomen getrennt (wobei der Rezeptor zurück auf die Zelloberfläche transportiert wird, um neue Liganden zu binden) oder der Ligand und der Rezeptor werden durch Proteasen in den späten Endosomen bzw. Lysosomen degradiert (Feniger-Barish et al., 2000; Ray et al., 1997). Verschiedene Arbeitsgruppen beschrieben eine Beteiligung des endosomalen

Kompartimentes am Recycling des CXCR-2-Liganden (Richardson et al., 1998; Yang et al., 1999; Ludwig et al., 2000). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass endosomale Proteasen an der Degradation verschiedener Rezeptor-Ligand-Komplexe beteiligt sind. Der IGF-I-Rezeptor beispielsweise wird nach Ligandbindung internalisiert, der Rezeptor-Ligand-Komplex dissoziiert und der Ligand wird durch endosomale Proteasen degradiert. Navab et al. (Navab et al., 2001) zeigten, dass die Inhibierung von IGF-I-degradierender endosomaler Enzyme durch die Cysteinproteainhibitoren E-64 und CA 074-Me das "Rezeptortrafficking und -signaling" verändert. Authier et al. beschrieben, dass Kathepsin B an der endosomalen Degradation des EGFR (Epidermis Growth Factor Receptor) als auch des EGF-Liganden beteiligt ist (Authier et al., 1999). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass EGFR unter in vitro-Bedingungen durch eine Kathepsin L-ähnliche Protease in ein 94 kD-Produkt gespalten wird (Hiwasa et al., 1988; Authier et al., 1999).

Ausgehend von diesen Literaturquellen wurde als Ursache für die deutlich erhöhten extrazellulären IL-8-Konzentrationen der *antisense*-Klone eine Beteiligung von Kathepsin L in der Regulation des Rezeptorrecyclings in den frühen und späten Endosomen oder im lysosomalen Kompartiment vermutet. Die hohe IL-8-Sekretion der Kathepsin L-defizienten Klone könnte darauf beruhen, dass nach Bindung von IL-8 an seinen CXC-Rezeptor der Komplex zwar internalisiert, aber aufgrund des fehlenden Kathepsin L in den Endosomen und Lysosomen dieser Ligand-Rezeptor-Komplex oder der Ligand bzw. der Rezeptor nicht degradiert wird. Wird der Rezeptor-Ligand-Komplex nicht degradiert ist das Rezeptorrecycling zurück an die Zellmembran gestört. Die Anzahl der IL-8-Rezeptoren auf der Oberfläche sinkt. Eine Veränderung in der Signaltransduktion über die verbliebenen Rezeptoren, bei der es zu einer erhöhten IL-8-Synthese kommen könnte, ist die Folge. Wird der Ligand IL-8 im endosomalen/lysosomale Kompartiment nicht degradiert, könnte dieser, vergleichbar mit der Transzytose, in den extrazellulären Raum zurück sekretiert werden, und somit für die erhöhten IL-8-Konzentrationen sorgen.

2. Eine weitere Erklärung für die erhöhte IL-8-Sekretion der Kathepsin L-defizienten Klone könnte eine Störung in der Signaltransduktion und somit der Regulation der IL-8-Genexpression sein. Zu einer Aufregulation des

IL-8-Gens könnte es kommen, wenn ein beteiligter Transkriptionsfaktor in Folge einer Degradationsstörung nicht abgebaut wird. Transkriptionsfaktoren, wie z.B. das c-Fos-Protein sind kurzlebige Proteine, die von Calpainen und dem ubiquitin-abhängigen System degradiert werden. Aniento et al. (Aniento et al., 1996) beschrieben, dass auch das lysosomale Kompartiment an der c-Fos-Degradation beteiligt ist. Die IL-8 Promotorstruktur zeigt eine Bindungsstelle für AP-1, NF- κ B und NF-IL-6. Die AP-1-Bindungsstelle interagiert beispielsweise mit Bindungsproteinen der Jun- und Fos-Genfamilie (Roebuck, 1999).

Durch Fehlen von Kathepsin L, das möglicherweise an der Degradation von Transkriptionsfaktoren für IL-8 beteiligt ist, könnte es somit zu einer Anreicherung eines Transkriptionsfaktors und zur erhöhten IL-8-Expression sowie -Sekretion kommen.

3. Nach Bindung von MCP-1 an seinen CC-Rezeptor wird ebenfalls eine G-Protein-gekoppelte Signaltransduktionskette aktiviert, in deren Verlauf verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert und im Ergebnis zahlreiche Gene transkribiert werden (Kito et al., 2001). Weiterhin kann MCP-1 eine Signaltransduktionskaskade über Tyrosinkinase-gekoppelte Rezeptoren in Monozyten auslösen (Yamasaki et al., 2001). Die Arbeitsgruppe von Heinrich et al. zeigte ebenfalls, dass die MCP-1-Expression über den mitogen-aktivierten Proteinkinaseweg angeregt wird (Heinrich et al., 2000). Die Wachstumsfaktor-abhängige Proteinkinase Raf-1 wird dabei durch Ras-Proteine aktiviert. Weiterhin zeigte diese Arbeitsgruppe, dass Gene wie Metalloproteinase 3, 10 und 13, Kathepsin L und andere, durch Raf-1 induziert werden können. Diese Aktivierungskaskade kann ebenfalls nach Stimulation des IGFR (Insulin Growth Factor Receptor) ausgelöst werden.

Fehlendes Kathepsin L könnte deshalb zur Modulation des IGF-Signaltransduktionsweges und damit zur verringerten Stimulation des Proteinkinaseweges und der MCP-1-Transkription in den *antisense*-Klonen führen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Kathepsin L wahrscheinlich in die Regulation des malignen Wachstums von Lungenepithelzellen eingreifen kann und somit an der Regulation der Tumorprogression beteiligt ist. Die Fähigkeit der Zellen einen natürlichen Zelltod zu sterben ist gleichzeitig vermindert, da Zellwachstum und -teilung in unkontrolliertem Maß überwiegen.

Kathepsin L fördert neben anderen Proteasen die Tumordinvasion. Durch Inhibierung von Kathepsin L war jedoch entgegen unseren Erwartungen die Tumordinvasion in den Zellklonen nicht beeinträchtigt. Proteasen, wie z. B. Kathepsin D u. a. scheinen hier die matrixdegradierende Funktion zu übernehmen.

Weiterhin scheint Kathepsin L mit seinem proteolytischen Potential am IL-8- Rezeptorrecycling und/oder Abbau von Transkriptionsfaktoren für die IL-8-Expression beteiligt zu sein. Die deutlich erhöhten extrazellulären IL-8-Konzentrationen in den Kathepsin L-defizienten A549-Klonen weisen darauf hin.

Kathepsin L scheint über den IGF-Signaltransduktionsweg an der Transkription des MCP-1-Gens beteiligt zu sein. Sekretiertes MCP-1 wiederum lockt Monozyten zu Entzündungsherden als auch zu Tumorzellen, um an deren Vernichtung teilzunehmen.

Eine aus Literaturquellen bekannte Korrelation zwischen einer erhöhten IL-8-Konzentration und einer gesteigerten Migration konnte auch in den Kathepsin L-defizienten Klonen beobachtet werden.

5 Zusammenfassung

Kathepsin L zählt zu den Cysteinproteasen der Papainfamilie, deren hauptsächliche Funktion in der lysosomalen Proteindegradation sowie der limitierten Proteolyse besteht. Darüber hinaus wird Kathepsin L in seiner Proform von zahlreichen Zellen, wie Makrophagen, Fibroblasten, Osteoklasten, Epithelzellen und maligne transformierten Zellen sekretiert und bewirkt einen Abbau der extrazellulären Matrix. Neben der Hauptfunktion im intrazellulären Proteinkatabolismus wurde eine Kathepsin L-Beteiligung an physiologischen und pathologischen Prozessen beschrieben. Beispielsweise ist es an Knochenresorptionsvorgängen sowie an proteolytischen Prozessierungsprozessen im Rahmen der Antigenpräsentation durch MHC II beteiligt. Das Fehlen von Kathepsin L in kortikalen Thymusepithelzellen bewirkt eine Verminderung der Antigenpräsentation, was eine Einschränkung der positiven Selektion der T-Zellen zur Folge hat.

Eine große Bedeutung scheint Kathepsin L bei der Progression maligner Tumoren zu spielen. Bei invasiven Prozessen werden das interstitielle Stroma, die extrazelluläre Matrix und die Basalmembran lokal von Kathepsin L und anderen Proteasen degradiert. Auch entzündliche Lungenerkrankungen sind gekennzeichnet durch Zerstörung der Zell- und Bindegewebsstrukturen, hervorgerufen durch freigesetzte Proteasen aus eingewanderten Granulozyten, Makrophagen sowie aus Lungenepithelzellen.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der *antisense*-mRNS-Technik eine Kathepsin L-defiziente Lungenepithelzelllinie (A549) zu etablieren. Diese transfizierten Zellklone sollten hinsichtlich physiologischer Funktionen, wie Proliferation- und Apoptoseverhalten, Migrations- und Invasionsfähigkeit sowie der Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine untersucht werden.

Um langfristige und reproduzierbare Analysen an der Lungenepithelzelllinie A549 durchführen zu können wurden diese Zellen mit Kathepsin L-*antisense*-mRNS stabil transfiziert.

Die für die funktionellen Untersuchungen verwendeten Kathepsin L-defizienten Zellklone wurden auf mRNA-, Protein- und Aktivitätsebene ausführlich charakterisiert. Auf Proteinebene konnte die Kathepsin L-Expression um ca. 70-80 % blockiert werden. Der relative mRNA- und Aktivitätsgehalt betrug in den *antisense*-Klonen noch 40-60 %.

Im Ergebnis der Charakterisierungen wurden vier Kathepsin L-defiziente A549-Klone, die das gesamte Kathepsin L-Konstrukt sowie das 3'-Fragment in *antisense*-Orientierung enthielten (gas11b, gas13a, eas9a, eas8c), mit Kontrollzellen ohne Kathepsin L-Konstrukt (pCR3.1) verglichen.

Die Kathepsin L-defizienten Klone wurden in funktionellen Versuchen auf ihr Proliferations- und Apoptoseverhalten, ihre Migrations- und Invasionsfähigkeit sowie auf die Sekretion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6, IL-8, IL-18, MCP-1 und TGF- β 1/2, getestet und dabei mit dem Kontrollklon verglichen.

Im Ergebnis dieser Arbeit wurde in den Kathepsin L-supprimierten Klonen im Vergleich zum Kontrollklon eine um 20 % verringerte Proliferationsrate und eine 2-3fach erhöhte Empfindlichkeit gegenüber apoptoseinduzierenden Reagenzien gemessen.

Aus verschiedenen Arbeiten geht hervor, dass Kathepsin L in seiner sekretierten Proform Wachstum, Proliferation und Metastasierung verschiedener Zelltypen fördert.

Die autokrine Bindung von Prokathepsin L an den IGF-II/M6P-Rezeptor wurde in diesem Zusammenhang beschrieben. Dabei wird indirekt über den IGF-I-Rezeptor eine Signaltransduktionskaskade aktiviert, an deren Ende die DNS-Synthese steht. Durch die Suppression von Kathepsin L in den A549-Klonen fehlt extrazelluläres Prokathepsin L. Der IGF-Rezeptorweg wird nicht aktiviert, die Proliferation nicht gefördert sondern eher verringert.

Gleichzeitig zeigten die Kathepsin L-*antisense*-Klone eine Aufregulation des CD95-Oberflächenrezeptors um das 1,5-2,0fache gegenüber der Kontrolle. Die über den CD95-Todesrezeptor induzierte Apoptose war in den *antisense*-Klonen um das 2-3fache erhöht im Vergleich zum Kontrollklon. Kathepsin L übt

möglicherweise einen schützenden Effekt auf das Überleben der A549-Zelllinie aus. Bisher gibt es in der Literatur Hinweise, dass Kathepsin B und -D an der Regulation des programmierten Zelltodes beteiligt sind. Dabei scheint Kathepsin B eine hemmende und Kathepsin D eine fördernde Wirkung auf den Apoptoseprozess auszuüben. Kathepsin L hat möglicherweise eine mit Kathepsin B vergleichbare hemmende Wirkung auf den Zelltod.

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit ist die erhöhte Expression und Enzymaktivität (2-8fach) von Kathepsin D. Grund für diese Kathepsin D-Überexpression könnte dessen Übernahme des Kathepsin L-spezifischen Substratabbaus sein. Dass Kathepsin D auch ein positiver Mediator im Apoptosegeschehen der Kathepsin L-defizienten A549-Klone ist, erscheint denkbar, bleibt aber nachzuweisen.

Weiterhin zeigten die Kathepsin L-defizienten Klone eine 1,5-3,0fach erhöhte Invasion auf Matrigelmembranen. Die Überexpression einer anderen Protease infolge der Kathepsin L-Suppression könnte hierfür verantwortlich sein. Unter sauren Lyse- und Assaybedingungen (pH 5,5) wurde die Gesamtproteaseaktivität in den A549-Klonen mit dem Substrat Casein gemessen. Die Proteaseaktivität der *antisense*-Klone war um das 1,3-1,6fache erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Mit Hilfe von gruppenspezifischen Inhibitoren für Metalloproteasen (Orthophenantrolin, OPA), Serinproteasen (Diisopropylfluorophosphat, DFP), Cysteinproteasen (L-trans-Epoxy succinyl-Leu-*agmatine*, E64) und Aspartatproteasen (Pepstatin A, Pep A) wurde nachgewiesen, dass eine Aspartatprotease für die erhöhte Proteaseaktivität verantwortlich ist. Weitere Versuche bestätigten eine erhöhte Expression und Aktivität der Aspartatprotease Kathepsin D.

Die Kathepsin L-defizienten Zellen zeigten eine 4-8fache Erhöhung der IL-8-Sekretion, eine 3-10fach erhöhte Migrationsrate und eine um die Hälfte verringerte MCP-1-Freisetzung. Aus zahlreichen Arbeiten ist bekannt, dass IL-8 die Funktion eines autokrinen Wachstumsfaktors auf verschiedene Zellarten, wie z.B. Lungenepithelzellen, Melanomzellen oder Magenkarzinomzellen, ausübt. Außerdem wirkt es chemotaktisch auf Neutrophile und bewirkt die Migration

verschiedener Zelltypen, wie naiver T-Zellen, Fibroblasten, Kerationzyten oder Epithelzellen. Die erhöhte Migration der Kathepsin L-defizienten Klone wird wahrscheinlich durch die hohen extrazellulären IL-8-Konzentrationen verursacht.

In Vorversuchen konnte die Migration der *antisense*-Klone mit Hilfe eines neutralisierenden IL-8-Antikörpers gehemmt werden. Auch soll laut Literaturquellen die Aktivierung der MMP-9 eine Folge erhöhter extrazellulärer IL-8-Konzentrationen sein. Die hohe IL-8-Sekretion könnte eine weitere Ursache für die starke Invasivität der *antisense*-Klone darstellen. Möglicherweise bewirkt IL-8 eine Aktivierung von MMP-9 im extrazellulären Raum, welches dann an der Matrixdegradation neben Kathepsin D mit beteiligt ist.

Als Ursache für die erhöhte IL-8- und verringerte MCP-1-Sekretion kommen folgende Erklärungen in Frage:

1. Veränderungen im Rezeptorre cycling
2. Veränderter Abbau von Transkriptionsfaktoren
3. Beeinflussung der chemokininduzierten Signaltransduktionswege.

Insgesamt sprechen die erhaltenen Ergebnisse für eine fördernde Wirkung von Kathepsin L an der DNS-Synthese und für einen hemmenden Einfluß auf das Apoptosegeschehen in maligne transformierten Zelllinien. Kathepsin L ist somit eine wichtige Protease in der Tumorprogression. Außerdem könnte Kathepsin L eine Rolle in Degradationsprozessen von Trankriptionsfaktoren und/oder Ligand-Rezeptor-Komplexen spielen.

6 Literatur

- Aniento, F., Papavassiliou, A.G., Knecht, E., & Roche, E. (1996). Selective uptake and degradation of c-Fos and v-Fos by rat liver lysosomes. FEBS Lett., 390(1), 47-52.
- Ankrapp, D.P., & Bevan, D.R. (1993). Insulin-like growth factor-I and human lung fibroblast-derived insulin-like growth factor-I stimulate the proliferation of human lung carcinoma cells in vitro. Cancer Res., 53(14), 3399-3404.
- Ashida, N., Arai, H., Yamasaki, M., & Kita, T. (2001). Distinct signaling pathways for MCP-1-dependent integrin activation and chemotaxis. J.Biol.Chem., 276(19), 16555-16560.
- Ashkenazi, A., & Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. Science, 281(5381), 1305-1308.
- Authier, F., & Chauvet, G. (1999). In vitro endosome-lysosome transfer of dephosphorylated EGF receptor and Shc in rat liver. FEBS Lett., 461(1-2), 25-31.
- Authier, F., Metioui, M., Bell, A.W., & Mort, J.S. (1999). Negative regulation of epidermal growth factor signaling by selective proteolytic mechanisms in the endosome mediated by cathepsin B. J.Biol.Chem., 274(47), 33723-33731.
- Barrett, A.J. (1977). Human cathepsin D. Advances in Experimental Medicine and Biology, 95:291-300., 291-300.
- Barrett, A.J., & Kirschke, H. (1981). Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. Methods Enzymol., 80 Pt C, 535-561.
- Barrett, A.J., & Rawlings, N.D. (1991). Types and families of endopeptidases. Biochem.Soc.Trans., 19(3), 707-715.
- Barrett, A.J. (1992). Cellular proteolysis. An overview. Ann.N.Y.Acad.Sci., 674, 1-15.

- Barrett, A.J. (1997). Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 4: corrections and additions (1997). Eur.J.Biochem., 250(1), 1-6.
- Bednarski, E., & Lynch, G. (1998). Selective suppression of cathepsin L results from elevations in lysosomal pH and is followed by proteolysis of tau protein. Neuroreport, 9(9), 2089-2094.
- Bohley, P., Segeln, P.O. (1992). Proteases and proteolysis in the lysosome. Experientia, (48), 151-156.
- Brew, R., Erikson, J.S., West, D.C., Kinsella, A.R., Slavin, J., & Christmas, S.E. (2000). Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. Cytokine, 12(1), 78-85.
- Bromme, D., Okamoto, K., Wang, B.B., & Biroc, S. (1996). Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. J.Biol.Chem., 271(4), 2126-2132.
- Browning, D.D., Diehl, W.C., Hsu, M.H., Schraufstatter, I.U., & Ye, R.D. (2000). Autocrine regulation of interleukin-8 production in human monocytes. Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol, 279(6), L1129-L1136
- Bühling, F., Gerber, A., Häckel, C., Krüger, S., Köhnlein, T., Brömme, D., Reinhold, D., Ansorge, S., & Welte, T. (1999). Expression of cathepsin K in lung epithelial cells. Am.J.Cell.Mol.Biol., 20(4), 612-619.
- Bühling, F., Fengler, A., Brandt, W., Welte, T., Ansorge, S., Nögler, D. (1999). Review: Novel cysteine proteases of the papain family. In: Cellular peptidases in immune functions and diseases 2. Langner, J., Ansorge, S., Plenum Publishers, New York, S.241-254.
- Chapman, H.A., Riese, R.J., & Shi, G.P. (1997). Emerging roles for cysteine proteases in human biology. Annu.Rev.Physiol, 59, 63-88.

- Chapman, H.A. (1998). Endosomal proteolysis and MHC class II function. Curr.Opin.Immunol., 10(1), 93-102.
- Chauhan, S.S., Goldstein, L.J., & Gottesman, M.M. (1991). Expression of cathepsin L in human tumors. Cancer Res., 51(5), 1478-1481.
- Chauhan, S.S., Popescu, N.C., Ray, D., Fleischmann, R., Gottesman, M.M., & Troen, B.R. (1993). Cloning, genomic organization, and chromosomal localization of human cathepsin L. J.Biol.Chem., 268(2), 1039-1045.
- Deiss, L.P., Galinka, H., Berissi, H., Cohen, O., & Kimchi, A. (1996). Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. EMBO J., 15(15), 3861-3870.
- Demotz, S., Matricardi, P.M., Irle, C., Panina, P., Lanzavecchia, A., & Corradin, G. (1989). Processing of tetanus toxin by human antigen-presenting cells. Evidence for donor and epitope-specific processing pathways. J.Immunol., 143(12), 3881-3886.
- Denhardt, D.T. (1992). Mechanism of action of antisense RNA. Sometime inhibition of transcription, processing, transport, or translation. Ann.N.Y.Acad.Sci., 660, 70-76.
- Devalia, J.L., Sapsford, R.J., Wells, C.W., Richman, P., & Davies, R.J. (1990). Culture and comparison of human bronchial and nasal epithelial cells in vitro. Respir.Med., 84, 303-312.
- Docherty, K., Carroll, R.J., & Steiner, D.F. (1982). Conversion of proinsulin to insulin: involvement of a 31,500 molecular weight thiol protease. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 79(15), 4613-4617.
- Duffy, M.J. (1996). Proteases as prognostic markers in cancer. Clin.Cancer Res., 2(4), 613-618.
- Edwards, D.R., & Murphy, G. (1998). Cancer. Proteases--invasion and more. Nature, 394(6693), 527-528.

- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature, 391(6662), 43-50.
- Evan, G., & Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. Science, 281(5381), 1317-1322.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., & Danielsen, M. (1987). Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84(21), 7413-7417.
- Felgner, P.L., & Ringold, G.M. (1989). Cationic liposome-mediated transfection. Nature, 337(6205), 387-388.
- Feniger-Barish, R., Belkin, D., Zaslaver, A., Gal, S., Dori, M., Ran, M., & Ben Baruch, A. (2000). GCP-2-induced internalization of IL-8 receptors: hierarchical relationships between GCP-2 and other ELR(+)-CXC chemokines and mechanisms regulating CXCR2 internalization and recycling. Blood, 95(5), 1551-1559.
- Fujisawa, N., Sakao, Y., Hayashi, S., Hadden, W.A., III, Harmon, C.L., & Miller, E.J. (2000). alpha-Chemokine growth factors for adenocarcinomas; a synthetic peptide inhibitor for alpha-chemokines inhibits the growth of adenocarcinoma cell lines. J.Cancer Res.Clin.Oncol., 126(1), 19-26.
- Gelb, B.D., Shi, G.P., Chapman, H.A., & Desnick, R.J. (1996). Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. Science, 273(5279), 1236-1238.
- Green, D.R., & Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. Science, 281(5381), 1309-1312.
- Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Korsmeyer, S.J. (1999). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. J.Biol.Chem., 274(2), 1156-1163.

- Guinec, N., Dalet-Fumeron, V., & Pagano, M. (1993). "In vitro" study of basement membrane degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B, B-like and L. Digestion of collagen IV, laminin, fibronectin, and release of gelatinase activities from basement membrane fibronectin. Biol.Chem.Hoppe Seyler, 374(12), 1135-1146.
- Gulnik, S.V., Suvorov, L.I., Majer, P., Collins, J., Kane, B.P., Johnson, D.G., & Erickson, J.W. (1997). Design of sensitive fluorogenic substrates for human cathepsin D. FEBS Lett., 413(2), 379-384.
- Heim, M.H., Kerr, I.M., Stark, G.R., & Darnell, J.E., Jr. (1995). Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. Science, 267(5202), 1347-1349.
- Heinrich, J., Bosse, M., Eickhoff, H., Nietfeld, W., Reinhardt, R., Lehrach, H., & Moelling, K. (2000). Induction of putative tumor-suppressing genes in Rat-1 fibroblasts by oncogenic Raf-1 as evidenced by robot-assisted complex hybridization. J.Mol.Med., 78(7), 380-388.
- Hiwasa, T., Sakiyama, S., Yokoyama, S., Ha, J.M., Noguchi, S., Bando, Y., Kominami, E., & Katunuma, N. (1988). Degradation of epidermal growth factor receptors by cathepsin L-like protease: inhibition of the degradation by c-Ha-ras gene products. FEBS Lett., 233(2), 367-370.
- Hongo, T., Morimoto, Y., Iwagaki, H., Kobashi, K., Yoshii, M., Urushihara, N., Hizuta, A., & Tanaka, N. (2000). Functional expression of Fas and Fas ligand on human colonic intraepithelial T lymphocytes. J.Int.Med.Res., 28(3), 132-142.
- Ishidoh, K., & Kominami, E. (1998). Gene regulation and extracellular functions of procathepsin L. Biol.Chem., 379(2), 131-135.
- Isahara, K., Ohsawa, Y., Kanamori, S., Shibata, M., Waguri, S., Sato, N., Gotow, T., Watanabe, T., Momoi, T., Urase, K., Kominami, E., & Uchiyama, Y. (1999). Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases. Neuroscience, 91(1), 233-249.

- Ishidoh, K., Takeda-Ezaki, M., & Kominami, E. (1993). Procathepsin L-specific antibodies that recognize procathepsin L but not cathepsin L. FEBS Lett., 322(1), 79-82.
- Ishii, Y., Hashizume, Y., Watanabe, T., Waguri, S., Sato, N., Yamamoto, M., Hasegawa, S., Kominami, E., & Uchiyama, Y. (1991). Cysteine proteinases in bronchoalveolar epithelial cells and lavage fluid of rat lung. J.Histochem.Cytochem., 39(4), 461-468.
- Takegawa, H., Tagami, K., Ohba, Y., Sumitani, K., Kawata, T., & Katunuma, N. (1995). Secretion and processing mechanisms of procathepsin L in bone resorption. FEBS Lett., 370(1-2), 78-82.
- Kalvakolanu, D.V. (2000). Interferons and cell growth control. Histol.Histopathol., 15(2), 523-537.
- Kane, S.E., & Gottesman, M.M. (1990). The role of cathepsin L in malignant transformation. Semin.Cancer Biol., 1(2), 127-136.
- Kasai, M., Shirasawa, T., Kitamura, M., Ishido, K., Kominami, E., & Hirokawa, K. (1993). Proenzyme form of cathepsin L produced by thymic epithelial cells promotes proliferation of immature thymocytes in the presence of IL-1, IL-7, and anti-CD3 antibody. Cell Immunol., 150(1), 124-136.
- Keppler, D., & Sloane, B.F. (1996). Cathepsin B: multiple enzyme forms from a single gene and their relation to cancer. Enzyme Protein, 49(1-3), 94-105.
- Kirschke, H., Langner, J., Wiederanders, B., Ansorge, S., & Bohley, P. (1977). Cathepsin L. A new proteinase from rat-liver lysosomes. Eur.J.Biochem., 74(2), 293-301.
- Kirschke, H., Barrett, A.J., Rawlings, N.D. (1995). Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. Protein-Profile, 2(14), 1581-1643.
- Kirschke, H., Eerola, R., Hopsu-Havu, V.K., Bromme, D., & Vuorio, E. (2000). Antisense RNA inhibition of cathepsin L expression reduces tumorigenicity of malignant cells. Eur.J.Cancer, 36(6), 787-795.

- Kitadai, Y., Haruma, K., Mukaida, N., Ohmoto, Y., Matsutani, N., Yasui, W., Yamamoto, S., Sumii, K., Kajiyama, G., Fidler, I.J., & Tahara, E. (2000). Regulation of disease-progression genes in human gastric carcinoma cells by interleukin 8. Clin.Cancer Res., *6*(7), 2735-2740.
- Kito, K., Morishita, K., & Nishida, K. (2001). MCP-1 receptor binding affinity is up-regulated by pre-stimulation with MCP-1 in an actin polymerization-dependent manner. J.Leukoc.Biol., *69*(4), 666-674.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., & Newmeyer, D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science, *275*(5303), 1132-1136.
- Kominami, E., Kunio, I., & Katunuma, N. (1987). Activation of the intramyofibrillar autophagic-lysosomal system in muscular dystrophy. Am.J.Pathol., *127*(3), 461-466.
- Krueger, S., Haeckel, C., & Buehling, F. (2000). Antisense inhibition of cathepsin B in a human osteosarcoma cell line. Advances in Experimental Medicine and Biology, *477*, 439-444.
- Kuwano, K., Hagimoto, N., Kawasaki, M., Yatomi, T., Nakamura, N., Nagata, S., Suda, T., Kunitake, R., Maeyama, T., Miyazaki, H., & Hara, N. (1999). Essential roles of the Fas-Fas ligand pathway in the development of pulmonary fibrosis. J.Clin.Invest., *104*(1), 13-19.
- Ledakis, P., Tester, W.T., Rosenberg, N., Romero-Fischmann, D., Daskal, I., & Lah, T.T. (1996). Cathepsins D, B, and L in malignant human lung tissue. Clin.Cancer Res., *2*(3), 561-568.
- Lemere, C.A., Munger, J.S., Shi, G.P., Natkin, L., Haass, C., Chapman, H.A., & Selkoe, D.J. (1995). The lysosomal cysteine protease, cathepsin S, is increased in Alzheimer's disease and Down syndrome brain. An immunocytochemical study. Am.J.Pathol., *146*(4), 848-860.

- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell., 91(4), 479-489.
- Lorenzo, K., Ton, P., Clark, J.L., Coulibaly, S., & Mach, L. (2000). Invasive properties of murine squamous carcinoma cells: secretion of matrix-degrading cathepsins is attributable to a deficiency in the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. Cancer Res., 60(15), 4070-4076.
- Ludwig, A., Ehlert, J.E., Flad, H.D., & Brandt, E. (2000). Identification of distinct surface-expressed and intracellular CXC-chemokine receptor 2 glycoforms in neutrophils: N-glycosylation is essential for maintenance of receptor surface expression. J.Immunol., 165(2), 1044-1052.
- Mancini, M., Nicholson, D.W., Roy, S., Thornberry, N.A., Peterson, E.P., Casciola-Rosen, L.A., & Rosen, A. (1998). The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. J.Cell Biol., 140(6), 1485-1495.
- McGrath, M.E. (1999). The lysosomal cysteine proteases. Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct., 28, 181-204.
- Mort, J.S., Recklies, A.D., & Poole, A.R. (1984). Extracellular presence of the lysosomal proteinase cathepsin B in rheumatoid synovium and its activity at neutral pH. Arthritis Rheum., 27(5), 509-515.
- Nakagawa, T., Roth, W., Wong, P., Nelson, A., Farr, A., Deussing, J., Villadangos, J.A., Ploegh, H., Peters, C., & Rudensky, A.Y. (1998). Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. Science, 280(5362), 450-453.
- Nakase, T., Takeuchi, E., Sugamoto, K., Kaneko, M., Tomita, T., Myoui, A., Uchiyama, Y., Ochi, T., & Yoshikawa, H. (2000). Involvement of multinucleated giant cells synthesizing cathepsin K in calcified tendinitis of the rotator cuff tendons [In Process Citation]. Rheumatology.(Oxford), 39(10), 1074-1077.

- Navab, R., Chevet, E., Authier, F., Di Guglielmo, G.M., Bergeron, J.J., & Brodt, P. (2001). Inhibition of endosomal insulin-like growth factor-I processing by cysteine proteinase inhibitors blocks receptor-mediated functions. J.Biol.Chem., 276(17), 13644-13649.
- Ray, E., & Samanta, A.K. (1997). Receptor-mediated endocytosis of IL-8: a fluorescent microscopic evidence and implication of the process in ligand-induced biological response in human neutrophils. Cytokine, 9(8), 587-596.
- Reinhold, D., Bank, U., Buhling, F., Junker, U., Kekow, J., Schleicher, E., & Ansorge, S. (1997). A detailed protocol for the measurement of TGF-beta1 in human blood samples. J.Immunol.Methods, 209(2), 203-206.
- Richardson, R.M., Ali, H., Pridgen, B.C., Haribabu, B., & Snyderman, R. (1998). Multiple signaling pathways of human interleukin-8 receptor A. Independent regulation by phosphorylation. J.Biol.Chem., 273(17), 10690-10695.
- Riese, R.J., Wolf, P.R., Bromme, D., Natkin, L.R., Villadangos, J.A., Ploegh, H.L., & Chapman, H.A. (1996). Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. Immunity, 4(4), 357-366.
- Roberg, K., Johansson, U., & Ollinger, K. (1999). Lysosomal release of cathepsin D precedes relocation of cytochrome c and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress. Free Radic.Biol.Med., 27(11-12), 1228-1237.
- Roberts, L.R., Kurosawa, H., Bronk, S.F., Fesmier, P.J., Agellon, L.B., Leung, W.Y., Mao, F., & Gores, G.J. (1997). Cathepsin B contributes to bile salt-induced apoptosis of rat hepatocytes. Gastroenterology, 113(5), 1714-1726.
- Rocheftort, H., Garcia, M., Glondu, M., Laurent, V., Liaudet, E., Rey, J.M., & Roger, P. (2000). Cathepsin D in breast cancer: mechanisms and clinical applications, a 1999 overview. Clin.Chim.Acta, 291(2), 157-170.
- Roebuck, K.A. (1999). Regulation of interleukin-8 gene expression. J.Interferon Cytokine Res., 19(5), 429-438.

- Samarel, A.M., Ferguson, A.G., Decker, R.S., & Lesch, M. (1989). Effects of cysteine protease inhibitors on rabbit cathepsin D maturation. Am.J.Physiol., 257(6 Pt 1), C1069-C1079
- Shibata, M., Kanamori, S., Isahara, K., Ohsawa, Y., Konishi, A., Kametaka, S., Watanabe, T., Ebisu, S., Ishido, K., Kominami, E., & Uchiyama, Y. (1998). Participation of cathepsins B and D in apoptosis of PC12 cells following serum deprivation. Biochem.Biophys.Res.Comm., 251(1), 199-203.
- Siddle, K.,(1992). The insulin receptor. In: Receptor subunits and complexes. Burgen, A., & Barnard, E.A., University Press, Cambridge, S. 261-351.
- Singh, R.K., Gutman, M., Reich, R., & Bar-Eli, M. (1995). Ultraviolet B irradiation promotes tumorigenic and metastatic properties in primary cutaneous melanoma via induction of interleukin 8. Cancer Res., 55(16), 3669-3674.
- Sloane, B.F., & Honn, K.V. (1984). Cysteine proteinases and metastasis. Cancer Metastasis Rev., 3(3), 249-263.
- Stoka, V., Turk, B., Schendel, S.L., Kim, T.H., Cirman, T., Snipas, S.J., Ellerby, L.M., Bredesen, D., Freeze, H., Abrahamson, M., Bromme, D., Krajewski, S., Reed, J.C., Yin, X.M., Turk, V., & Salvesen, G.S. (2000). Lysosomal protease pathways to apoptosis: cleavage of bid, not Pro-caspases, is the most likely route. J.Biol.Chem., .
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebbersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., & Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature, 397(6718), 441-446.
- Tagami, K., Kakegawa, H., Kamioka, H., Sumitani, K., Kawata, T., Lenarcic, B., Turk, V., & Katunuma, N. (1994). The mechanisms and regulation of procathepsin L secretion from osteoclasts in bone resorption. FEBS Lett., 342(3), 308-312.

- Tao, K., Stearns, N.A., Dong, J., Wu, Q.L., & Sahagian, G.G. (1994). The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. Arch.Biochem.Biophys., 311(1), 19-27.
- Thomssen, C., Schmitt, M., Goretzki, L., Oppelt, P., Pache, L., Dettmar, P., Janicke, F., & Graeff, H. (1995). Prognostic value of the cysteine proteases cathepsins B and cathepsin L in human breast cancer. Clin.Cancer Res., 1(7), 741-746.
- Tournu, C., Obled, A., Roux, M.P., Deval, C., Ferrara, M., & Bechet, D.M. (1998). Glucose controls cathepsin expression in Ras-transformed fibroblasts. Arch.Biochem.Biophys., 360(1), 15-24.
- Troen, B.R., Gal, S., & Gottesman, M.M. (1987). Sequence and expression of the cDNA for MEP (major excreted protein), a transformation-regulated secreted cathepsin. Biochem.J., 246(3), 731-735.
- Tsuchida, K., Aihara, H., Isogai, K., Hanada, K., & Shibata, N. (1986). Degradation of myocardial structural proteins in myocardial infarcted dogs is reduced by Ep459, a cysteine proteinase inhibitor. Biol.Chem.Hoppe Seyler, 367(1), 39-45.
- Turk, B., Dolenc, I., Lenarcic, B., Krizaj, I., Turk, V., Bieth, J.G., & Bjork, I. (1999). Acidic pH as a physiological regulator of human cathepsin L activity. Eur.J.Biochem., 259(3), 926-932.
- Tuschl, T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P., & Sharp, P.A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. Genes Dev., 13(24), 3191-3197.
- Uchiyama, Y., Waguri, S., Sato, N., Watanabe, T., Ishido, K., and Kominami, E. (1994). Cell and tissue distribution of lysosomal cysteine proteinases. Acta Histochem.Cytochem., 27(4), 287-308.
- van Eijk, M., & de Groot, C. (1999). Germinal center B cell apoptosis requires both caspase and cathepsin activity. J.Immunol., 163(5), 2478-2482.

- Wang, B., Shi, G.P., Yao, P.M., Li, Z., Chapman, H.A., & Bromme, D. (1998). Human cathepsin F. Molecular cloning, functional expression, tissue localization, and enzymatic characterization. J.Biol.Chem., 273(48), 32000-32008.
- Weber, E., Gunter, D., Laube, F., Wiederanders, B., & Kirschke, H., (1994). Hybridoma cells producing antibodies to cathepsin L have greatly reduced potential for tumor growth. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 120(9), 564-7.
- Weber, E., Bahn, H., & Gunther, D. (1997). Monoclonal antibodies against cathepsin L and procathepsin L of different species. Hybridoma, 16(2), 159-166.
- Wen, L.P., Madani, K., Fahrni, J.A., Duncan, S.R., & Rosen, G.D. (1997). Dexamethasone inhibits lung epithelial cell apoptosis induced by IFN-gamma and Fas. Am.J.Physiol, 273(5 Pt 1), L921-L929
- Wilson, A.J., Byron, K., & Gibson, P.R. (1999). Interleukin-8 stimulates the migration of human colonic epithelial cells in vitro. Clin.Sci.(Colch.), 97(3), 385-390.
- Xu, L., & Fidler, I.J. (2000). Interleukin 8: an autocrine growth factor for human ovarian cancer. Oncol.Res., 12(2), 97-106.
- Yamasaki, M., Arai, H., Ashida, N., Ishii, K., & Kita, T. (2001). Monocyte chemoattractant protein 1 causes differential signalling mediated by proline-rich tyrosine kinase 2 in THP-1 cells. Biochem.J., 355(Pt 3), 751-756.
- Yan, S., Sameni, M., & Sloane, B.F. (1998). Cathepsin B and human tumor progression. Biol.Chem., 379(2), 113-123.
- Yang, W., Wang, D., & Richmond, A. (1999). Role of clathrin-mediated endocytosis in CXCR2 sequestration, resensitization, and signal transduction. J.Biol.Chem., 274(16), 11328-11333.
- Zhang, C., Ao, Z., Seth, A., & Schlossman, S.F. (1996). A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells. J.Immunol., 157(9), 3980-3987.

Zhu, D.M., & Uckun, F.M. (2000). Z-Phe-Gly-NHO-Bz, an inhibitor of cysteine cathepsins, induces apoptosis in human cancer cells. Clin.Cancer Res., 6(5), 2064-2069.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Aline Wille, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literaturquellen und Hilfsmitteln verfasst habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet. Es wurde weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des Doktorgrades an einer anderen Einrichtung vorgelegt.

Magdeburg, den 09.12.2001

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. S. Ansorge und Herrn Prof. K. Neubert, die es mir ermöglichten am Institut für Immunologie diese Promotionsarbeit durchzuführen sowie ihrem Interesse am Fortgang dieser Arbeit. Ebenfalls danken möchte ich Herrn Prof. Dr. G.-J. Krauß für die Vorbereitung auf die erforderliche Zusatzprüfung im Fach Biochemie sowie die Abnahme der Prüfungsleistung.

Ich bedanke mich insbesondere bei Dr. T. Welte und Dr. F. Bühling für die Überlassung des interessanten Themas, für die engagierte Betreuung und Unterstützung bei der praktischen Umsetzung wissenschaftlicher Fragestellungen. Als Projektleiter haben sie maßgeblichen Anteil an den vorgestellten Ergebnissen. Frau Dr. A. Gerber danke ich recht herzlich für die anregende Zusammenarbeit und Unterstützung bei molekularbiologischen Fragestellungen.

Bei Frau M. Blichmann, Frau G. Weitz und Frau Y. Peter bedanke ich mich für die praktische Unterstützung bei Zellkulturarbeiten und molekularbiologischen Arbeiten sowie für das angenehme und heitere Arbeitsklima im Labor.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. S. Krüger und Frau D. Gärtner für die Hilfe bei der Durchführung von Invasionsassays in ihrem Labor sowie für anregende und kritische Hinweise und Diskussionen.

Weiterhin danke ich Frau A. Reisenauer für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung von ELISA-Analysen. Ihr, Frau A. Heimburg und Frau N. Waldburg danke ich außerdem für stets hilfreiche und anregende Diskussionen über fachliche Fragestellungen sowie für eine angenehme, freundliche und offene Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Immunologie für die gute und angenehme Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Name: Aline Wille
Geburtsdatum: 25.08.1970
Geburtsort: Ribnitz-Damgarten

Schulbildung:

1977-1985 Besuch der Oberschule Maxim-Gorki in Magdeburg
1985-1989 Besuch der Erweiterten Oberschule Alexander von Humboldt mit erweitertem neusprachlichem Unterricht in Magdeburg
Abschluss: Abitur
1990-1992 Ausbildung zur Biologisch-technischen Assistentin an der Dr. Heinemann Schule in Braunschweig

Studium:

1992-1997 Studium der Ökotrophologie an der Fachhochschule Anhalt in Bernburg (Saale)
1996-1997 Diplomarbeit am Institut für Diabetes „Gerhard Katsch“ der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald zum Thema: „Bedeutung X-chromosomaler Genregionen an der Entstehung eines Typ I Diabetes - Eine Pilotstudie an ausgewählten Familien“
Abschluss: Diplom Ökotrophologin
1998-2001 Anfertigung der Dissertation zum Thema: „Untersuchungen des Einflusses der *antisense*-Inhibierung von Kathepsin L auf die funktionelle Aktivität von Lungenepithelzellen“ am Institut für Immunologie der Otto-von-Guerike-Universität Magdeburg

Praktische Tätigkeiten:

1994-1995 Praktikum am Deutschen Institut für Ernährungsforschung in Potsdam-Rehbrücke
1997-1998 Tätigkeit als Ernährungsberaterin im Diakonie - Krankenhaus Elbingerode sowie in der HNO-Klinik der Otto-von-Guerke-Universität in Magdeburg
1998-1999 Dozententätigkeit an der Zahnärztekammer Sachsen-Anhalt sowie am Institut für Weiterbildung in der Krankenpflege der DAG in Magdeburg

