

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



(Direktor: Prof. Dr. Jürgen Langner)

**Arbeiten zum Vorkommen und zur Regulation von Aminopeptidase N/CD13 mit
besonderer Berücksichtigung ihres Vorkommens auf Lymphozyten**

Habilitation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med. habil.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dr. med. Dagmar Ute Riemann
geboren am 24.05.1959 in Schönebeck/Elbe

Gutachter:

1. Prof. J. Langner, Halle
2. Prof. H.D. Flad, Borstel
3. Prof. F. Emmrich, Leipzig
4. Prof. H.H. Peter, Freiburg

urn:nbn:de:gbv:3-000003980

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003980>]

Referat und bibliographische Gestaltung

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Erweiterung unseres Wissens zum Vorkommen und zur Regulation von Aminopeptidase N (APN) in verschiedenen Zellsystemen.

Methoden: Mittels Doppelmarker-Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie wurde die APN-Expression auf T-Zellen außerhalb des peripheren Blutes verfolgt. Ebenfalls Durchflusszytometrie sowie APN-Enzymbestimmung und quantitative RT-PCR verwendeten wir für die Untersuchung der Regulation von Membranpeptidasen in verschiedenen Zellsystemen. In Kokulturrexperimenten von Lymphozyten mit adhärenz Zellen wurde Zell-Zell-Kontakt als ein möglicher Mechanismus der Induktion lymphozytärer APN untersucht.

Wesentliche Ergebnisse:

1. APN-tragende Lymphozyten finden sich in verschiedenen Körperflüssigkeiten und Geweben, u. a. in der Synovialflüssigkeit bei Gelenkentzündungen und in Nierentumoren.
2. Membranpeptidasen können durch Zytokine moduliert werden. Interleukin (IL)-4 und Interferon- γ führen zur Heraufregulation von APN und Dipeptidylpeptidase IV (DPIV)/CD26 in Nierenepithel- und Nierentumorzellen. Transforming growth factor (TGF)- β hemmt die Expression von DPIV/CD26 und Glutamylaminopeptidase, nicht jedoch von APN und bewirkt in Monozyten/Makrophagen sogar eine Heraufregulation von APN. Die oft mit APN und DPIV/CD26 kolokalisierte Membranpeptidase Neprilysin/CD10 wird in Fibroblasten-artigen Synoviozyten (SFC) durch TGF- β und IL-1 gehemmt, während IL-4 und verschiedene Interferone auch hier zur verstärkten Expression führen. IL-4 führt nicht zur APN-Expression reiner Lymphozytenkulturen.
3. Direkter Zell-Zell-Kontakt von Lymphozyten mit SFC u. a. Zellen führt bereits nach 60 min zu einer lymphozytären Expression von APN-mRNA und -Protein, Mitogene und Wachstum der SFC in einem Kollagengel steigern diesen Effekt.
4. Cyclodextrinbehandlung der SFC, die über einen Cholesterolentzug zur Zerstörung spezieller Membranmikrodomänen führt, hemmt die lymphozytäre APN-Induktion nach Zell-Zell-Kontakt mit SFC. Eine Anwesenheit von APN in Membranmikrodomänen der SFC konnte erstmalig gezeigt werden.

Schlussfolgerung: Außerhalb des peripheren Blutes und besonders in Entzündungssituationen können Lymphozyten APN exprimieren. Zytokine, die während einer Entzündung freigesetzt werden, regulieren APN u. a. Membranpeptidasen zellspezifisch und haben damit Einfluss auf die Spaltung von biologisch aktiven Peptidmediatoren. Zell-Zell-Kontakt ist ebenfalls ein wichtiger Regulator für die Expression von Membranpeptidasen.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einführung und Fragestellung	1
1.1. Aminopeptidase N (APN) - ein ubiquitäres Membranektoenzym mit vielfältigen Funktionen	
1.1.1. Struktur und Enzymeigenschaften	
1.1.2. Vorkommen und Funktion	3
1.1.3. Regulation	6
1.1.4. Andere, oft mit APN kolokalisierte Membranpeptidasen	8
1.1.4.1. Dipeptidylpeptidase IV/CD26	
1.1.4.2. Neprilysin/CD10	9
1.1.4.3. Glutamylaminopeptidase	11
1.1.5. Funktionelle Relevanz von Membranpeptidasen	11
1.1.5.1. Membranpeptidasen und Wachstumsvorgänge	12
1.1.5.2. Membranpeptidasen und Adhäsion an ECM	13
1.1.5.3. Membranpeptidasen und Signaltransduktion	13
1.1.5.4. Membranpeptidasen in Tumoren	16
1.2. Zielsetzung	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Patientenmaterial	
2.1.1. Synovialflüssigkeit	
2.1.2. Perikardflüssigkeit	
2.1.3. Bronchiallavageflüssigkeit	
2.1.4. Tumoren	20
2.2. Zellpräparation und Zellkultivierungsverfahren	
2.2.1. Präparation und Langzeitkultivierung Fibroblasten-artiger Synoviozyten (SFC)	
2.2.2. Nierentubulusepithel- und Nierentumorzellen	21
2.2.3. Kultivierung humaner Nabelschnurvenen-Endothelzellen	22
2.2.4. Präparation und Kurzzeitkultur von tonsillären Lymphozyten	
2.2.5. Präparation und Kurzzeitkultur von Lymphozyten aus peripherem Blut	23
2.2.6. Präparation tumorinfiltrierender Lymphozyten	
2.2.7. Sonstige Zelllinien	24
2.2.8. Mykoplasmentest	
2.3. Präparation von Zellmembranen aus Synoviozyten	25
2.4. Zytokine für Zellkultur und Regulationsversuche	25
2.5. Immunfluoreszenzfärbungen	26
2.5.1. Antikörper und Färbemethoden	
2.5.2. Durchflusszytometrie	28
2.5.3. Fluoreszenzmikroskopie	
2.6. Kokultivierungsversuche	29
2.7. Proteinbestimmung nach Lowry	31
2.8. Messung der Enzymaktivität von APN und DPIV/CD26	
2.9. RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und PCR	32
2.10. Statistische Verfahren	33
3. Ergebnisse	34
3.1. APN - ein lymphozytärer Marker	
3.1.1. Synoviale Lymphozyten tragen APN	
3.1.2. APN auf T-Zellen der Perikardflüssigkeit	36
3.1.3. APN auf T-Zellen der Bronchiallavage-Flüssigkeit	39
3.1.4. Vergleich des Phänotyps von T-Zellen aus verschiedenen Lokalisationen außerhalb des peripheren Blutes	40
3.1.5. APN auf tumorinfiltrierenden T-Zellen	41

3.2.	Arbeiten zur Regulation von APN	44
3.2.1.	Regulation der Expression von APN u. a. Membranpeptidasen in Nierentubulusepithel- und Nierentumorzellen	
3.2.2.	Regulation von APN auf Monozyten/Makrophagen	47
3.2.3.	Regulation von Membranpeptidasen auf SFC	48
3.2.4.	Zell-Zell-Kontakt als Ursache für eine lymphozytäre APN-Expression	49
3.2.4.1.	Zellkontakt von Lymphozyten mit verschiedenen adhären Zellen	
3.2.4.2.	Arbeiten mit Filtersystemen	57
3.2.4.3.	Arbeiten im Kollagengel	
3.2.4.4.	Arbeiten zur Modulation der lymphozytären APN-Expression nach Zell-Zell-Kontakt	60
3.2.5.	Lokalisierung von APN in Membranmikrodomänen der SFC	63
4.	Diskussion	64
4.1.	T-Zellphänotyp außerhalb des peripheren Blutes mit besonderer Berücksichtigung der Expression von APN	
4.1.1.	Synoviale T-Zellen	65
4.1.2.	T-Zellen in Perikardflüssigkeit	66
4.1.3.	T-Zellen in Bronchiallavage-Flüssigkeit	67
4.1.4.	T-Zellen in Tumoren	69
4.2.	Regulation verschiedener Membranpeptidasen	71
4.2.1.	Regulation durch Zytokine	71
4.2.1.1.	TGF- β hemmt nicht die APN-Expression	72
4.2.1.2.	Gegensätzliche Wirkungen von IL-4 und TGF- β auf Nephrylsin/CD10 in SFC	72
4.2.2.	Zell-Zell-Kontakt induziert eine Anzahl verschiedenster Membranenzyme	74
4.2.2.1.	Zell-Zell-Kontakt mit SFC führt zu lymphozytärer APN-Expression	76
4.2.2.2.	Zell-Zell-Kontakt als Modell für in vivo-Situationen	79
4.2.2.2.1.	Zell-Zell-Kontakt zwischen Lymphozyten und Fibroblasten/SFC	
4.2.2.2.2.	Zell-Zell-Kontakt zwischen Lymphozyten und Endothelzellen	81
4.2.2.3.	Peptidaseregulation durch Zell-Zell-Kontakt während der hämatopoetischen Reifung	82
4.3.	Assoziation von APN u.a. Membranpeptidasen in Membranmikrodomänen	83
5.	Zusammenfassung	86
6.	Literatur	88
7.	Anhang	113
7.1.	Thesen	
7.2.	Tabellarischer Lebenslauf	
7.3.	Erklärungen	
7.4.	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

Ala-pNA	Alanyl-para-Nitroanilid
APN	Aminopeptidase N
BALF	Bronchiallavage-Flüssigkeit
BSA	Bovine serum albumin
CD	Cluster of differentiation
DPIV	Dipeptidylpeptidase IV
ECGS	Endothelial cell growth supplement
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ESR	Einstundenwert der Blutsenkungsreaktion
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FAP	Fibroblastenaktivierungsprotein
FCS	Fetales Kälberserum
GM-CSF	Granulozyten- und Monozyten-koloniestimulierender Faktor
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
IL	Interleukin
IFN	Interferon
JCA	Juvenile chronische Arthritis
mAk	Monoklonaler Antikörper
MAP-Kinasen	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PHA	Phythämagglutinin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
SFC	Fibroblasten-artige Synoviozyten
LSM	Laserscanningmikroskop
RA	Rheumatoidarthritis
TA	Traumatische Arthritis
TCR	Antigenerkennender T-Zellrezeptor
TGF	Transforming growth factor
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor

1. Einführung und Fragestellung

1.1. Aminopeptidase N – ein ubiquitäres Membranenzym mit vielfältigen Funktionen

1.1.1. Struktur und Enzymeigenschaften

Aminopeptidase N (APN), auch als Membran-Alanylaminopeptidase oder mikrosomale Aminopeptidase bezeichnet (NC-IUBMB-Enzymklassifizierung: EC 3.4.11.2; Peptidaseklassifizierung: Clan MA, Familie M1, MEROPS-ID: M1.001), ist ein Zink-abhängiges Metalloenzym mit ubiquitärem Vorkommen und vielfältigen Funktionen (Übersichten in Barrett AJ, 1998A; Lendeckel U et al., 1999; Riemann D et al., 1999; Riemann D, 2001A). APN ist ein Ektoenzym, d. h. es ist ein integrales Protein der Plasmamembran mit dem katalytischem Bereich im Extrazellulärraum (Kenny J et al., 1987) (Abb. 1).

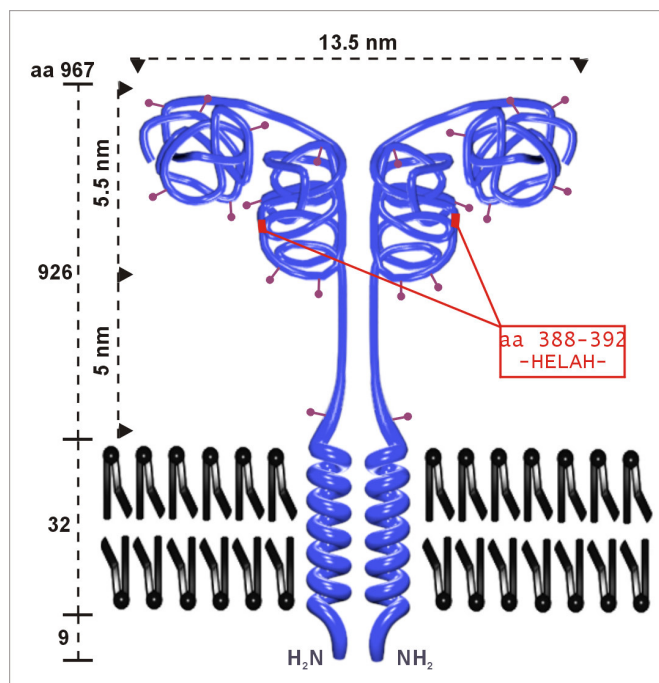


Abb. 1: Modell einer möglichen APN-Struktur in Anlehnung an Daten zu Glutamylaminopeptidase (Hesp JR et al., 1997). Das HELAH-Motiv des aktiven Zentrums (Aminosäure 388-392) ist markiert. Entsprechend der vor kurzem aufgeklärten Raumstruktur von Neprilysin/CD10 (Oefner C et al., 2000) könnten sich die 4 Domänen des Homodimers (anders als hier dargestellt) einander zuwenden und eine Höhle für das Substrat bilden, zu der es von 2 Seiten je einen engen Eingang gibt.

Humane APN ist ein Homodimer aus zwei 150 kDa großen, nicht-kovalent assoziierten Untereinheiten. Das Enzym konnte bisher nicht kristallisiert werden. Vorangegangene

Arbeiten zur Tertiärstruktur von APN stammen vorwiegend aus der Kopenhagener Arbeitsgruppe um Prof. Sjöström (Biochemie, Panum-Institut). Nach Einbringen von Schweinenieren-APN in Lipidvesikel wurde elektronenmikroskopisch eine dimere symmetrische Struktur von 13,5 x 5,5 nm gemessen, getrennt von der Zellmembran durch einen 5 nm langen Stiel (Hussain MM et al., 1981). Als Klasse-II-Membranprotein hat APN den Aminoterminus intrazellulär. Das Enzym ist aufgebaut aus einem kurzen intrazellulären Teil aus 8 Aminosäuren (ein Tyrosinrest an 5. Stelle), einer aus 23 hydrophoben Aminosäuren bestehenden Zellmembran-durchspannenden Region und einem Extrazellulärbereich, der wahrscheinlich - ähnlich Berechnungen für Glutamylaminopeptidase (Hesp JR et al., 1997) - zwei Untereinheiten enthält. Nach einer Stielregion aus einer Kette von 40 Aminosäuren, reich an Serin und Threonin als O-Glykosylierungsangriffspunkten (Noren K et al., 1997), kommt das katalytische Zentrum mit der Zink-Bindungsregion (HELAH-Motiv: Aminosäure 388-392, ein Zinkatom gebunden) und danach eine C-terminale Domäne, welche evt. eine Rolle in der Ligandenbindung spielt.

Als Aminopeptidase spaltet APN (bevorzugt neutrale) Aminosäuren vom nicht substituierten Aminoterminus von Oligopeptiden, Amiden oder Arylamiden. Site-directed Mutagenesis-Analysen ergaben, dass in APN neben den zwei His-Resten im HEXXH-Motiv als 3. Zinkligand ein 18 Aminosäuren C-terminal vom 2. His liegender Glutamatrest fungiert (Toh H et al., 1990). Jüngere Untersuchungen ergaben, dass E³⁵⁰ zur „anionischen Bindungsstelle“ gehört, da Mutationen (Bsp. E³⁵⁰A) den Verlust der Enzymfunktion bewirken (Luciani N et al., 1998). Weiterhin zeigten chemische Modifikationen von APN, dass die generelle Organisation des aktiven Zentrums mit der Beteiligung von Y, R, H und E/D-Resten dem aktiven Zentrum der Endopeptidase Thermolysin ähnelt (Helene A et al., 1991). Für die Messung der Enzymaktivität der APN wird sich die Tatsache zu Nutze gemacht, dass APN einige Amidderivate zwischen L-Aminosäuren und aromatischen Aminen spaltet. Die so bestimmte enzymatische Aktivität wurde früher Arylamidase genannt (Rehfeld N et al., 1967). Die am häufigsten verwendeten Substrate sind Aminoacyl-p-Nitroanilide und Aminoacyl-β-Naphthylamide, mit Alanin und Leucin als am häufigsten benutzten Acylgruppen. Der Entzug divalenter Kationen durch EDTA oder Phenanthrolin hemmt die APN-Enzymaktivität, da Zink essentiell benötigt wird. Für eine Klärung der Spezifität der Substratspaltung werden oft zusätzlich Inhibitoren eingesetzt. APN wird - eher nicht spezifisch - durch mikrobielle Produkte gehemmt, am bekanntesten sind Bestatin (Ubenimex, relativ unspezifisch, hemmt besser Argininaminopeptidase und Leucinaminopeptidase als APN), Amastatin (hemmt besser Glutamylaminopeptidase) und Probestin (Aoyagi T et al., 1990). Zu den

spezifischeren Inhibitoren gehören außerdem Actinonin (Umezawa H et al., 1985), PC18 (Reaux A et al., 1999) und RB3014 (Chen H et al., 1999).

1.1.2. Vorkommen und Funktion

Schon 1967 beschrieben Rehfeld und Mitarbeiter eine in fast allen Organen vorkommende Aminoacylarylamidase-Aktivität. Auch wenn das verwendete Substrat nicht spezifisch für APN war, bestätigten Arbeiten der nachfolgenden Jahre unter Verwendung spezifischer Antikörper das ubiquitäre Vorkommen von APN mit besonders ausgeprägter Expression in Dünndarm, Niere und Plazenta. Viele Zellarten, darunter einige Epithelzellen, Perizyten sowie Fibroblasten tragen APN auf ihrer Oberfläche. Die physiologischen Konsequenzen der APN-Aktivität sind vielfältig und abhängig von der Lokalisierung des Enzyms. Oft sind an der Spaltung von Peptiden andere, eng kolokalisierte Membranenzyme beteiligt, darunter Glutamylaminopeptidase, Dipeptidylpeptidase IV(DPIV)/CD26 und Neprilysin/CD10.

Man kann die APN-Funktionen generell in zwei Bereiche trennen, das sind digestive und regulative Wirkungen. In der Bürstensaummembran der Dünndarm-Schleimhaut ist APN am Endabbau von Peptiden beteiligt, APN macht hier 6 - 8 % der Membranproteine aus (Barrett AJ, 1998A). In ähnlicher Weise ist APN eine wichtige Komponente der Bürstensaummembran der proximalen Nierentubuli und ist beteiligt an der Rückgewinnung von Aminosäuren aus dem Ultrafiltrat.

Tabelle 1: Peptidsubstrate von APN

1. Vasoaktive Peptide	Lysyl-Bradykinin (Palmieri FE et al., 1985) Angiotensin III (Palmieri FE et al., 1985) Angiotensin IV
2. Neuropeptid-hormone	Leu - u. Met-enkephalin (Ward PE et al., 1990) Neurokinin A (Wang LH et al., 1991) Somatostatin (Ward PE et al., 1990)
3. Chemokine und immunmodulatorische Mediatoren	Formyl-Met-Leu-Phe (Spaltung zusammen mit Neprilysin/CD10) (Shipp MA et al., 1993) MCP-1 (Monocyte chemotactic protein) (Weber M, 1996) Thymopentin (Heizmann J et al., 1996) Tuftsin (Mathe G, 1987)

Wie andere Oberflächenproteasen ist APN außerhalb seiner digestiven Funktion auch am Prozessieren biologisch aktiver Peptidsubstrate beteiligt und kontrolliert so die lokalen Peptidkonzentrationen, die an den jeweiligen Rezeptor binden können. Einige der Peptidsubstrate sind in Tabelle 1 gezeigt. Interessanterweise binden viele APN-Peptidsubstrate an G-Protein-gekoppelte heptahelikale Rezeptoren.

In der Hämatopoese ist die Expression verschiedener Membranpeptidasen charakteristisch für bestimmte Entwicklungsstufen von Leukozyten. Moleküle wie Nephilysin/CD10 und APN/CD13 werden seit einigen Jahren zur Leukämie- und Lymphomtypisierung benutzt. Erst die Sequenzierung der cDNA-Klone dieser Antigene deckte die Übereinstimmung mit den bereits klonierten Membranpeptidasen auf, die ubiquitär vorkommen und eine Rolle in sehr unterschiedlichen Gebieten außerhalb der Hämatopoese spielen. APN wird auf Stammzellen und während der gesamten Reifung von Granulozyten und Monozyten exprimiert. In der Leukämietypisierung wird APN deshalb seit vielen Jahren als myeloisches Markermolekül verwendet (Drexler HG et al., 1991). Sehr frühe lymphatische Vorläuferzellen tragen ebenfalls APN, verlieren das Molekül jedoch in ihrer weiteren Entwicklung (Syrjälä M et al., 1994; Spits H et al., 1995). Reife Lymphozyten des peripheren Blutes, der Milz und der Tonsillen sind APN-negativ. Zellen einer akuten lymphatischen Leukämie können APN tragen, man spricht dabei von „myeloischer Koexpression“. Ob diese „Linienuntreue“ ein Zeichen der neoplastischen Umwandlung der Zelle ist oder aber eine Wiederholung eines Phänotyps, der physiologischerweise auf einer sehr kleinen Zellpopulation vorkommt, bleibt bislang unklar. Fälle pädiatrischer akuter B-Zelleukosen mit APN-Expression haben keine schlechtere Prognose als „typische“ B-Zelleukosen (Pui CH et al., 1998), während es für akute Leukämien des Erwachsenenalters widersprüchliche Ergebnisse gibt (Übersicht siehe Ryan DH et al., 1992). Auch lymphoproliferative Erkrankungen, die sich von einer reifen Zelle ableiten, können APN tragen. Dabei wurden u. a. spezielle Infiltrationsweisen der neoplastischen Zellen beobachtet (Pinto A et al., 1992).

Auf Monozyten und ausgereiften dendritischen Zellen wird die Antigenpräsentation auf MHC Klasse-II-Molekülen durch APN beeinflusst. Das Enzym beschneidet die aus der Bindungsgrube der MHC Klasse-II-Moleküle heraushängenden Peptide (Larsen SL et al., 1996). Prolin an vorletzter Stelle des Aminoterminus der Peptide hindert den weiteren Abbau durch APN. Wirklich findet man am Aminoterminus von auf HLA-DR-Molekülen vorkommenden Peptiden sehr häufig Prolin an vorletzter Stelle (Falk K et al., 1994). Das Wissen um das Trimmen von Peptiden durch APN wird genutzt, indem z. B. durch Acetylierung der Aminoterminus von Peptiden blockiert und so deren Immunogenität

verändert wird (Dong X et al., 2000). Bei der Reifung dendritischer Zellen aus monozytoiden Vorläuferzellen steigt die APN-Expression, am deutlichsten bereits nach 24 Stunden (Woodhead VE et al., 1998). Plasmazytoide dendritische Zellen, deren Fähigkeit zur Stimulation allogener T-Zellen gering sein soll (Kohrgruber N et al., 1999), sind APN-negativ (Chaperot L et al., 2001). Erst nach Differenzierung mit IL-3 und GM-CSF steigen sowohl die APN-Expression als auch die Fähigkeit zur allogenen T-Zellstimulation.

Es konnte gezeigt werden, dass die individuell sehr verschieden hohe APN-Aktivität auf Neutrophilen durch Methionin-Enkephalin beeinflusst wird und mit der Fähigkeit dieser Zellen zum respiratorischen Burst korreliert (Balog T et al., 1999).

APN ist außerdem ein Rezeptor für verschiedene Viren, gezeigt für das TGEV (transmissible gastroenteritis virus), welches schwere Gastroenteritiden in Ferkeln verursacht, sowie für das humane Coronavirus 229E als Auslöser von Infektionen der oberen Atemwege (Delmas B et al., 1992; Yeager CL et al., 1992). Während Coronavirus 229E Determinanten im N-terminalen Teil von APN nahe des aktiven Zentrums zum Andocken benutzt (Aminosäure 260-353), ist für die TGEV-Infektion Aminosäure 717-813 im C-terminalen APN-Bereich wichtig (Kolb AF et al., 1998). APN soll weiterhin einer von verschiedenen Rezeptoren für das Zytomegalie-Virus sein (Söderberg C et al., 1993), welches sich nur in APN-tragenden mononukleären Blutzellen vermehren kann (Larsson S et al., 1998). Es laufen Untersuchungen, die die apikale Expression von APN ausnutzen für einen apikalen Gentransfer über Coronavirus-abgewandelte Vektoren in APN-tragende Zielzellen (Wang G et al., 2000).

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass APN auf Perizyten in Gefäßwänden vorkommt (Kunz J et al., 1994). Bei der akuten experimentellen Autoimmunencephalitis ist während und nach der perivaskulären Entzündungsreaktion die APN-Expression der kleinen Hirngefäße vermindert, einhergehend mit einer funktionell gestörten Blut-Hirn-Schranke (Kunz J et al., 1995). Laut jüngsten Untersuchungen ist APN ein in der Angiogenese relevantes Molekül (Pasqualini R et al., 2000). Phagen, die ein Oberflächenpeptid mit dem NGR-Sequenzmotiv tragen, sollen in vivo selektiv in Tumorgefäße wandern. Der Rezeptor für NGR-Peptide ist WN/DDGWL (Pasqualini R et al., 1995). Ein entsprechendes Motiv befindet sich in APN sehr nahe dem aktiven Zentrum. Die Autoren propagieren, dass APN speziell von Endothelzellen in der Angiogenese exprimiert wird und dass sich mit APN-Inhibitoren Angiogenese und Tumorbildung im Tiermodell hemmen lassen. Im Mausmodell konnten Tumoren mit Tumornekrosefaktor (TNF)- α

gekoppelt an das zyklische Peptid CNGRC selektiv angegriffen werden (Curnis F et al., 2000).

Eine lösliche, durch proteolytische Abspaltung der Membranform entstandene Form von APN lässt sich in Serum, Synovia, Galle, Urin, Bronchiallavage-Flüssigkeit (BALF) und Samenflüssigkeit nachweisen. Die im Serum Gesunder gemessene APN-Enzymaktivität zeigt eine individuelle Variabilität, die zum Teil korrelierbar ist mit Alter, Geschlecht und Rauchverhalten (Sanderink GJ et al., 1988). Serum-APN ist außerdem ein nützlicher Marker bei hepatobiliären Erkrankungen, erhöht vor allem bei Patienten mit biliärer Obstruktion (Janas RM et al., 1999). Lösliche APN in der Gallenflüssigkeit fördert die Cholesterolkristallisation, ist also an der Entstehung von Cholesterol-Gallensteinen beteiligt (Nunez L et al., 1995). In der Synovia entzündeter Gelenke von Patienten mit Rheumatoïdarthritis (RA) wird vermehrt lösliche APN nachgewiesen (Lees T et al., 1991). In der BALF korreliert ein Anstieg löslicher APN mit einer hohen Zahl an Neutrophilen (Juillerat-Jeanneret L et al., 1997). Nicht zuletzt gilt lösliche APN im Urin seit einigen Jahren als nützlicher Marker zur Erkennung einer akuten Schädigung der Nierentubuli, z. B. bei Transplantatrejektion (Flynn FV, 1990).

1.1.3. Regulation

Da APN keine Zymogen-Vorläuferform besitzt, muss die Enzymaktivität über Synthese, Abbau oder endogene Inhibitoren reguliert werden. Bradykinin und Substanz P sind natürliche Peptide, die das Enzym in mikromolaren Konzentrationen hemmen können (Xu Y et al., 1995). Auch für Hämorphine als Abbauprodukte der Hämoglobin- β -Kette wurde eine inhibierende Wirkung beschrieben (Garreau I et al., 1998).

Die APN-Expression wird wie die Expression anderer Membranpeptidasen sowohl in der Embryonalentwicklung reguliert als auch durch Wachstums- und Differenzierungsvorgänge beeinflusst. APN spielt z. B. eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und funktionellen Reifung der Gallenkanalstrukturen (Lian WN et al., 1999). Mitogene Aktivierung von Zellen kann mit heraufregulierter APN-Expression einhergehen (Kunz D et al., 1993; Riemann D et al., 1993), ähnliches gilt für die Zelldifferenzierung. So ist sowohl auf Gewebsmakrophagen als auch auf dendritischen Zellen im Vergleich zu Blutmonozyten die APN-Expression erhöht (Koch AE et al., 1991; Woodhead VE et al., 1998). Zytokine können Membranpeptidasen regulieren, gezeigt u. a. für Interleukin (IL)-6, das in Osteosarkomzelllinien die APN-Expression erhöht (Kido A et al., 1999), als auch für IL-4, welches APN in Monozyten und

Endothelzellen heraufreguliert (van Hal PT et al., 1994). Glukokortikoide, epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) und Progesteron können in zellspezifischer Weise die Expression von APN erhöhen. Glukokortikoide haben einen Einfluss auf die Polarisierung verschiedener Epithelzellen und regulieren u. a. in Dünndarmepithelzellen und der fetalen Lunge APN herauf (Danielsen EM et al., 1984; Tangada SD et al., 1995). EGF stimuliert APN neben 5'Nukleotidase in glomerulären Mesangialzellen (Stefanovic V et al., 1998). In endometrialen Zellen ist die Peptidase während einer Choriongonadotropin-induzierten Pseudoschwangerschaft erhöht (Olsen J et al., 1995).

Virusinfektionen können eine APN-Expression herabregulieren, wie für das humane Zytomegalie-Virus gezeigt (Phillips AJ et al., 1998).

Inzwischen gibt es einige Informationen zu möglichen Regulationsfaktoren auf Genebene. Das APN-Gen wird durch 2 verschiedene Promotoren kontrolliert: der nahe am kodierenden Teil des Gens gelegene, sogenannte epitheliale Promotor kontrolliert die Transkription in epithelialen Zellen (Olsen J et al., 1991). In Fibroblasten und in hämatopoetischen Zellen ist der 8 kb vom epithelialen Promotor entfernte „myeloische“ Promotor aktiv (Shapiro LH et al., 1991). Die funktionelle Analyse des upstream-Bereiches des epithelialen Promotors führte zur Identifikation eines 300 bp langen Enhancers, der sowohl in epithelialen als auch in myeloischen Zellen aktiv ist. Mittels DNase I-Footprintings konnten 5 cis-wirkende Elemente definiert werden: 2 Ets-Bindungsstellen, sowie je eine C/EBP-, Sp1- und SRF-Bindungsstelle. Punktmutationen führten in allen Elementen (außer SRF) zu Aktivitätsverringernungen. (Olsen J et al., 1997). Der epitheliale Promotor enthält eine TATA-Box und Bindungsorte für Sp1, für Mitglieder der HNF1 (hepatocyte nuclear factor)-Familie und für ein Mitglied der Steroidhormonrezeptorfamilie, wahrscheinlich COUP-tf (Olsen J et al., 1995). Der myeloische Promotor dagegen ist GC-reich, ihm fehlt die TATA-Box und er enthält Bindungsorte für Mitglieder der Transkriptionsfaktorfamilien Myb und Ets (Shapiro LH et al., 1995). Andere Transkriptionsfaktoren, die an diesem Promotor angreifen, sind DMP-1, c-Maf und der Koaktivator CBP/p300 (Übersicht in Kehlen A et al., 2000B). Ein weiterer, bisher wenig charakterisierter APN-Promotor wurde in alveolären Epithelzellen beschrieben (Gillis LD et al., 1998).

1.1.4. Andere, oft mit APN kolokalisierte Membranpeptidasen

1.1.4.1. Dipeptidylpeptidase IV/CD26

DPIV/CD26 (EC 3.4.14.5, Clan SC, Familie S9b, MEROPS ID: S09.003, S09.013) ist Prototyp einer Familie verwandter Serinproteasen, die u. a. Fibroblastenaktivierungsprotein (FAP)- α , DPP6 und Seprase einschließt (Levy MT et al., 1999; Abbott CA et al., 2000). Der extrazelluläre Bereich besteht aus Stiel, Glykosylierungsregion, Cysteinreicher Region und der katalytischen Domäne am C-Terminus. Das Enzym findet sich reichlich in Epithelzellen der Niere, des Dünndarms und der Plazenta, oft in enger Kolokalisation mit APN. Auch Fibroblasten und Endothelzellen tragen das Molekül. Klonierung der DPIV-cDNA erbrachte die Identität mit dem T-Zellaktivierungs-Molekül CD26 (Tanaka T et al., 1992).

Ähnlich wie bei APN kann man die Funktionen des Membranenzym grob einteilen in digestiven Abbau sowie Modifizierung biologisch aktiver Peptide. DPIV/CD26 spaltet Dipeptide vom Aminoterminus kleiner Peptide, wobei die Sequenz X-Pro bevorzugt wird, vorausgesetzt die dritte Aminosäure ist weder Prolin noch Hydroxyprolin. Natürliche Substrate sind u. a. Bradykinin, Substanz P und β -Chemokine wie Eotaxin, RANTES (regulated upon activation, normally T-cell expressed and secreted) und SDF (stromal cell derived factor)-1 (De Meester I et al., 1999). Auch Mitglieder der Glucagonfamilie, wie Glucagon-like peptide-1, werden gespalten (Pauly RP et al., 1996). Inhibierung der enzymatischen Aktivität verstärkt die Glukose-stimulierte Insulinsekretion und verbessert die Glukosetoleranz in verschiedenen Tiermodellen für Typ-II-Diabetes (Holst JJ et al., 1998), was ein verstärktes internationales Interesse an DPIV/CD26-resistenten Derivaten von Glucagon-like peptide auslöste (Übersicht in Xiao Q et al., 2001). Knock-out-Mäuse für DPIV/CD26 sind gesund, aber zeigen eine bessere Glukosetoleranz als Wildtyp-Mäuse (Marguet D et al., 2000).

DPIV/CD26 ist involviert in T-Zellaktivierung (Übersicht in Kähne T et al., 1999) und auf der T-Zelloberfläche ein Bindungspartner sehr verschiedener Proteine, wie der Adenosindeaminase (ADA) (Richard E et al., 2000), des Membranenzym CD45 (Torimoto Y et al., 1991) oder des Chemokinrezeptors CXCR4 (Herrera C et al., 2001). Inzwischen sind einige natürliche Inhibitoren der DPIV/CD26 mit der aminoterminalen Sequenz XXP bekannt, darunter das HIV-1 Tat-Protein und der Thromboxan-A₂-Rezeptor (Wrenger S et al., 2000), die ebenfalls an das Enzym binden. Interessanterweise wirken DPIV-Inhibitoren u. a. über die Induktion einer Freisetzung des immunsuppressiv wirkenden Zytokins Transforming growth factor (TGF)- β (Reinhold D et al., 1997). Das Enzym soll ein TH-1-ähnliches Bild der Zytokinfreisetzung [Vorherrschen von Interferon

(IFN)- γ] fördern und Hemmung der Enzymaktivität unterdrückt TH-1-assoziierte Krankheitsbilder, wie z. B. Stress-induzierte Aborte bei Mäusen (Hildebrandt M et al., 2001) oder die experimentelle Autoimmunencephalitis (EAE) in Mäusen (Steinbrecher A et al., 2001).

Seit der Entdeckung von DPIV 1966 durch Hopsu-Havu und Glenner wurde dem Enzym eine Rolle im Kollagenmetabolismus zugesprochen, weil die zahlreichen Gly-Pro-Sequenzen im Kollagen potentielle Spaltstellen darstellen. Durch Immunhistochemie und Affinitätschromatographie konnte wirklich eine Bindung von DPIV/CD26 an Kollagen gezeigt werden (Hanski C et al., 1988), wobei das Molekül über seine Cystein-reiche Region bindet (Löster K et al., 1995). Jüngste Untersuchungen zeigen, daß DPIV/CD26 neben seiner Exopeptidaseaktivität auch eine geringe Endopeptidasewirkung ausübt und denaturiertes Kollagen Typ I, II, III und V zu spalten vermag. Der Umsatz ist jedoch gering und natives Kollagen kann nicht gespalten werden, so dass DPIV/CD26 eher eine Hilfsfunktion zukommt (Bermppohl F et al., 1998). In Fibroblasten-artig wachsenden Synoviozyten (SFC) soll DPIV/CD26 an Kohlenhydratketten von Plasmin(ogen) binden (Gonzalez-Gronow M et al., 1998), was zu kombinierten Proteaseaktionen führen könnte.

1.1.4.2. Neprilysin/CD10

Neprilysin/CD10 (EC 3.4.24.11; Clan MA; Familie M13; MEROPS-ID: M13.001) ist ein weiteres, oft mit APN kolokalisiertes Membranenzym (Übersicht in LeBien TW et al., 1989; Kenny AJ, 1993; Riemann D, 2001C). Es ist Mitglied einer vor kurzem beschriebenen Genfamilie, die die Kell-Blutgruppenproteine sowie „endothelin converting enzyme“ (ECE-1 und -2) einschließt (Turner AJ et al., 1997). Das Enzym wird auch als neutrale Endopeptidase 24.11, Enkephalinase bzw. CALLA (common acute lymphatic leukemia antigen) bezeichnet. 1974 wurde es von John Kenny und Mitarbeitern aus Kaninchennieren aufgereinigt (Kerr MA et al., 1974). Unabhängig davon wurde Neprilysin/CD10 später als verantwortliches Ektoenzym für die Inaktivierung von Enkephalinen (endogene Morphin-ähnliche Pentapeptide) im Hirn entdeckt (Matsas R et al., 1983). Nach Klonieren und Sequenzieren des Enzyms wurde klar, dass es mit dem leukozytären Oberflächenmolekül CALLA identisch ist (Malfroy B et al., 1988; Shipp MA et al., 1988).

Neprilysin/CD10 ist eine Metalloprotease der Gluzincin-Familie und spaltet Oligopeptide (bis 40 Aminosäuren) bevorzugt am Aminoende hydrophober Aminosäurereste (Phe, Leu, Met) (Abb. 2) und wird, ähnlich wie Thermolysin, von Phosphoramidon und

Thiorphan gehemmt (Hersh LB et al., 1986). Das Enzym kommt ubiquitär vor, mit besonders hohen Konzentrationen in den Epithelzellen der Bürstensaummembran der proximalen Nierentubuli, von Dünndarm und Plazenta. Auch findet man es auf Fibroblasten, lymphoiden Vorläuferzellen in Knochenmark und Thymus sowie auf reifen Granulozyten. Eine lösliche Form findet sich im Serum und soll u. a. mit der bronchialen Hyperreaktivität korrelieren (Ratti H et al., 2001) und ist besonders hoch in der Synovia von RA-Patienten (Appelboom T et al., 1991). Prostatosomen enthalten neben APN und DPiV/CD26 auch Neprilysin/CD10 (Renneberg H et al., 2001). Die Funktion des Enzyms variiert mit seiner Lokalisation, in den Nieren werden Peptide des Ultrafiltrates, Kinine und der „atrial natriuretic factor“ gespalten, im ZNS Opioidpeptide wie Substanz P und Enkephaline, und auf Neutrophilen das chemotaktische Peptid FMLP (Painter RG et al., 1988; Erdös EG et al., 1989). Im Hirn ist es hauptverantwortlich für den Abbau des Amyloid- β -Peptids (Takaki Y et al., 2000). Knock-out-Mäuse für Neprilysin/CD10 zeigen eine erhöhte Sensibilität für septischen Schock, was durch den verminderten Abbau von Mediatoren wie Endothelin, Bradykinin, Tachykinine oder Enkephaline verursacht sein könnte (Lu B et al., 1995). Ein Verlust der Expression von Neprilysin/CD10 auf Prostatakarcinomzellen geht mit einer gesteigerten Migration der Tumorzellen einher (Sumitomo M et al., 2000), ein Vorgang, der wahrscheinlich durch direktes Signaling über das Membranenzym ausgelöst wird (siehe Kapitel 1.1.5.3.).

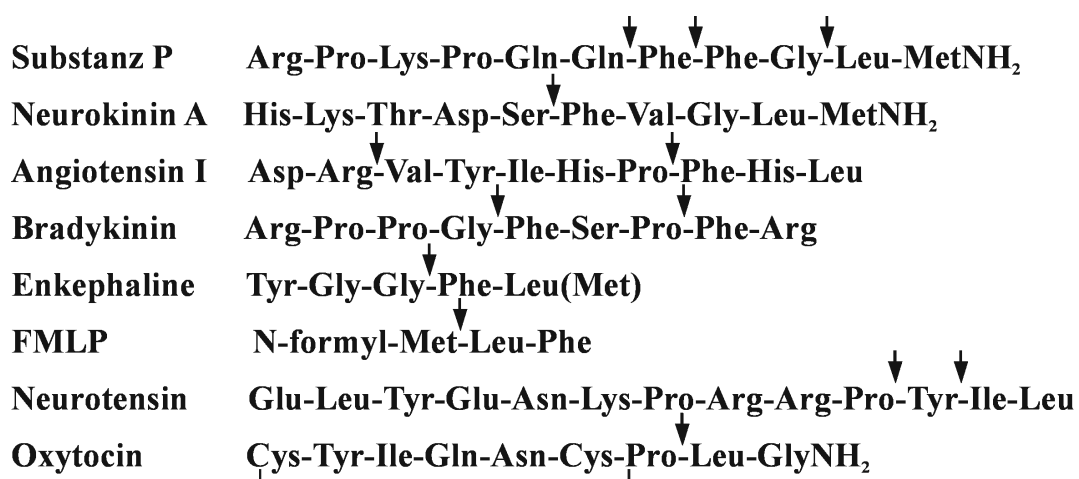


Abb. 2: Durch Neprilysin/CD10 gespaltene Bindungen in Peptidsubstraten (nach LeBien TW et al., 1989).

Neprilysin/CD10 ist eine der wenigen Membranpeptidasen, deren Tertiärstruktur inzwischen aufgeklärt werden konnte (Oefner C et al., 2000). Die Struktur zeigt zwei mehrfach verbundene Domänen pro Proteinkette, die eine große zentrale Höhle

umschließen, in der sich das aktive Zentrum befindet. Der Zugang zur Höhle ist eng und bestimmt die Größe der Peptidsubstrate.

1.1.4.3. Glutamylaminopeptidase

Glutamylaminopeptidase (EC 3.4.11.7; Clan MA, Familie M1, MEROPS ID: M01.003), früher auch als Aminopeptidase A bezeichnet, bzw. Angiotensinase A oder BP-1/6C3-Molekül, ist - ähnlich wie APN - ein homodimeres Typ-II-Membranprotein mit zwei extrazellulären Domänen, in der N-terminalen Domäne mit HEXXH-Sequenz und Zinkbindungsstelle im aktiven Zentrum sowie mit C-terminaler Substratbindungsdomäne (Hesp JR et al., 1997; Übersicht in Barrett, 1998B).

Das Enzym kommt auf der Bürstensaummembran der Nierentubuli und des Dünndarms sowie auf Gefäßendothelzellen, stromalen Zellen des Knochenmarks und des Thymus sowie frühen B-Zellvorstufen (BP-1-Antigen in Mäusen) vor. IL-7 induziert sowohl die Proliferation von B-Zellvorstufen als auch die Expression von Glutamylaminopeptidase auf diesen Zellen (Welch PA et al., 1990). Das Enzym spaltet selektiv aminoterminaler Glutaryl- und Aspartylreste von Peptidsubstraten wie Angiotensin II oder Cholecystokinin-8 und ist assoziiert mit so unterschiedlichen biologischen Prozessen wie der B-Lymphozytenreifung, der Angiogenese oder der Blutdruckregulation. Aus diesen Wirkungsgebieten ergeben sich klinische Fragestellungen der gezielten Beeinflussung des Enzyms, z. B. zur Blutdrucksenkung (Reaux A et al., 2000).

1.1.5. Funktionelle Relevanz von Membranpeptidasen

Abb. 3 zeigt die vielfältigen Funktionen von Membranpeptidasen, die sowohl in Differenzierung, Proliferation und Apoptose, als auch bei der Chemotaxis und in Invasionsvorgängen eine Rolle spielen und dabei hemmende und aktivierende Funktionen innehaben.

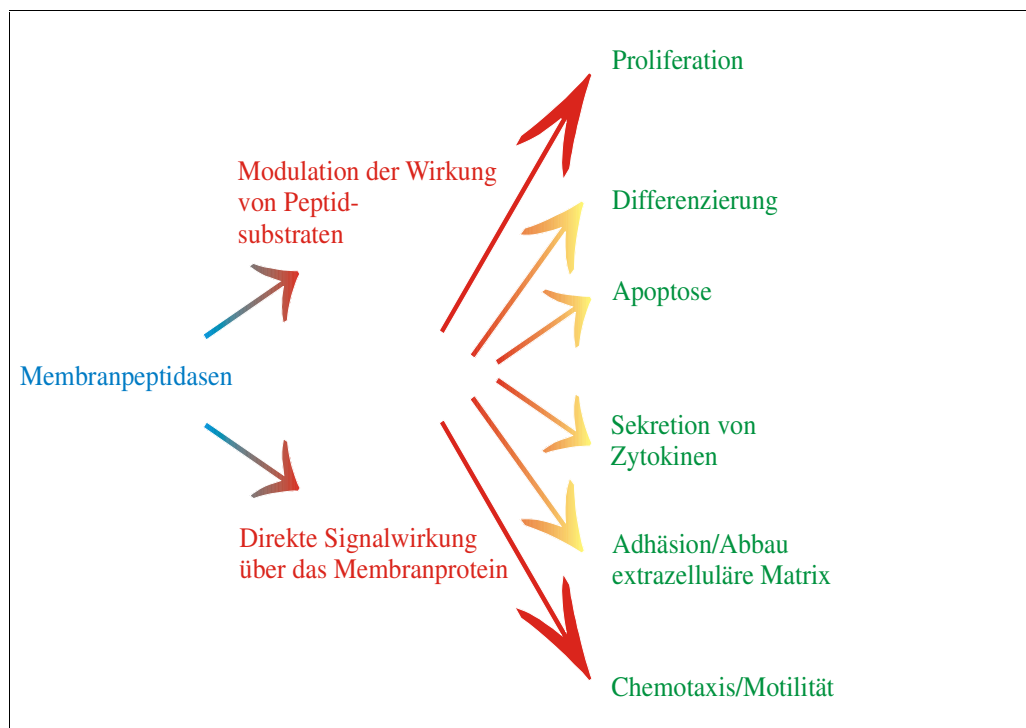


Abb. 3: Biologische Effekte, die mit Membranpeptidasen assoziiert sind. Die enzymatische Aktivität wird nicht für sämtliche der aufgezeigten Funktionen benötigt.

1.1.5.1. Membranpeptidasen und Wachstumsvorgänge

Zellmembranverankerte Proteasen können in Wachstumsprozessen von Zellen integriert sein. Mitogene stimulieren die Expression von Membranpeptidasen. Andererseits bewirken viele Proteinaseinhibitoren eine Hemmung des Zellwachstums. So verringert Hemmung der APN-Enzymaktivität die Proliferation der APN-positiven leukämischen T-Zelllinie Karpas 299 (Lendeckel U et al., 1998). Auch Neprilysin/CD10 moduliert zelluläre Proliferation. Das Enzym spaltet Bombesin-ähnliche Peptide, die Mitogene für Fibroblasten und Bronchialepithelzellen darstellen. Bombesine sind auch essentielle autokrine Wachstumsfaktoren für viele Bronchialkarzinome, auf denen das Enzym nur in geringer Menge exprimiert wird. Die Expression von Neprilysin/CD10 ist in Bronchialepithelzellen wie auch Bronchialkarzinom-Zelllinien invers korreliert mit dem Proliferationsverhalten (Ganju R et al., 1994). Der zytoplasmatische Teil von Neprilysin/CD10 enthält zwei potenzielle Erkennungsorte für die ubiquitär vorkommende Serin/Threonin-Kinase „Caseinkinase-II“, die selbst in Zellwachstum und -differenzierung integriert ist. Zum Beispiel wird ihre Aktivität beim Übergang von der späten G1- zur S-Phase benötigt (Pepperkok R et al., 1994). Ganju und Mitarbeiter konnten 1994 zeigen, dass Caseinkinase-II intrazelluläre Serin- und Threoninreste von Neprilysin/CD10 phosphorylieren kann und vermuten eine mögliche Funktion für die Internalisierung des

Enzyms (da in der S-Phase des Zellzyklus, wenn die Aktivität von Caseinkinase-II sehr hoch ist, Neprilysin/CD10 herabreguliert wird). Interessanterweise fand man in bestimmten epithelialen Tumoren mit reduzierter Expression an Neprilysin/CD10 besonders hohe Caseinkinase-II-Aktivität (Daya-Makin M et al., 1994), auch in Nierentumoren (Stalter G et al., 1994), für die unsere Arbeitsgruppe erstmalig die Herabregulation von Neprilysin-Enzymaktivität zeigen konnte (Göhring B et al., 1998).

1.1.5.2. Membranpeptidasen und Adhäsion an extrazelluläre Matrix

Proteolyse reguliert die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (ECM), den Umbau von ECM-Strukturen sowie die Freisetzung von an ECM gebundenen Mediatoren. Mit dem Umbau der ECM in Beziehung gebracht werden vorrangig Matrixmetalloproteasen, die zum Teil als membranverankerte Formen vorkommen, Adamalysin-verwandte Membranproteinasen (die Disintegrin und Metalloproteinasedomäne tragen) und Gewebsserinproteasen wie Thrombin, Urokinase, Plasminogenaktivator vom Gewebetyp und Plasmin (Werb Z, 1997). Membranpeptidasen können jedoch ebenfalls Zelladhäsionsvorgänge beeinflussen, denkbar z. B. über die Spaltung von Substraten, die ihrerseits Zelladhäsion modulieren. Als Beispiel kann die β_2 -Integrin-abhängige Adhäsivität über Neuropeptide und Chemokine und deren G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stimuliert werden. Neuropeptide wie „Calcitonin-gene related protein“, Neuropeptid Y und Somatostatin fördern ebenso wie das Chemokin „macrophage inflammatory protein“ (MIP)-1 β die T-Zelladhäsion an Fibronectin. Substanz P hemmt die Adhäsionssteigerung durch die genannten Mediatoren (Levite M et al., 1998). Peptidasen können an ECM binden, was zur Fokussierung proteolytischer Prozesse an definierte Orte führt. Außerdem kann es durch ECM-Bindung zur Enzymaktivitätserhöhung kommen, zum Schutz vor Inhibitoren, zum Anstieg der Halbwertszeit des Enzyms bzw. zur Wechselwirkung (Aktivierung, Inaktivierung) mit anderen Enzymen. So bindet DPIV/CD26 über seine Cystein-reiche Region an Kollagen (besonders Typ I und III) (Löster K et al., 1995). Auch für APN gibt es Hinweise auf eine Bindung an ECM (Menrad A et al., 1993), jedoch fehlen neuere Arbeiten zu diesem Thema.

1.1.5.3. Membranpeptidasen und Signaltransduktion

Membranverankerte Peptidasen üben sehr vielfältige zellbiologische Wirkungen aus, die durch die reine Enzymwirkung oft nicht zu erklären sind. Die meisten Daten zu einer Signaltransduktion über eine Membranpeptidase gibt es zu DPIV/CD26. CD26-Antikörper üben einen komitogenen Effekt auf eine T-Zellaktivierung über den CD3-T-

Zellrezeptor (TCR)-assoziierten Komplex aus. Dieser Prozess wird begleitet von einer erhöhten Tyrosinphosphorylierung der ζ -Kette des TCR mit erhöhter Aktivität der CD4-assoziierten p56lck-Tyrosinkinase (Kähne T et al., 1995; Mittrücker HW et al., 1995), wobei die TCR-assoziierten Adaptorproteine LAT (linker for activation of T cells) und TRIM (TCR interacting molecule) nicht beteiligt sein sollen (Hühn J et al., 2000). Nach DPIV/CD26-Crosslinking findet man außerdem eine höhere Phosphorylierung von p59fyn, ZAP70 und verschiedenen Mitogen-aktivierten Protein (MAP)-Kinasen (Hegen M et al., 1997). Da der intrazelluläre Teil von DPIV/CD26 nur aus 6 Aminosäuren besteht, sucht man zusätzliche, an der Signaltransduktion beteiligte Moleküle, z. B. soll CD45 als Membran-assoziierte Tyrosinphosphatase mit DPIV/CD26 kopräzipitierbar sein (Torimoto Y et al., 1991). Arbeiten mit Deletionsmutanten zeigen, dass für die Signalauslösung die proximale Glykosylierungs-reiche Region des Moleküls ausreicht, d. h. die enzymatische Wirkung wird hierzu nicht zwangsläufig benötigt (Hühn J et al., 2000). Die Signalinduktion über DPIV/CD26 ist nicht auf T-Zellen beschränkt: in SFC erfolgt über die Lektin-ähnliche Region des Enzyms die Bindung an Kohlenhydratketten von Plasmin(ogen) (Gonzalez-Gronow M et al., 1998). Die Autoren diskutieren, dass der intrazelluläre Kalziumanstieg nach Plasminogenspaltung durch Rezeptor-gebundene Urokinase über DPIV/CD26 mediiert sein könnte.

Neprilysin/CD10 ist in B-Zelllinien Bestandteil von Detergenz-resistenten Membranmikrodomänen (siehe Kapitel 4.3.), die reich an Cholesterol, Glykosphingolipiden, Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Proteinen sowie Phosphotyrosinkinasen sind (Angelisova P et al., 1999). Als Rafts oder Caveolae bezeichnet, sind diese Membrandomänen an Signaltransduktionsvorgängen über GPI-verankerte Proteine beteiligt, spielen aber auch eine essentielle Rolle in der Signalübermittlung über TCR, B-Zellrezeptor und F_c -Rezeptoren. In Immunpräzipitaten von Neprilysin/CD10 lässt sich mittels *in vitro*-Kinase-Assay eine Tyrosinphosphorylierung u. a. der Lyn-Kinase nachweisen (Ganju RK et al., 1996). Neprilysin/CD10 kann also neben der Ektoenzymwirkung über die Vermittlung von Tyrosinkinasen aus Membranmikrodomänen direkt an Signaltransduktionsvorgängen beteiligt sein.

Auch für APN gibt es Hinweise auf eine mögliche Beteiligung an direkter Signalübermittlung. McIntyre und Mitarbeiter beschrieben 1987 eine Kalziumerhöhung in myeloischen U937-Zellen mittels APN-spezifischer monoklonaler Antikörper (mAk), wobei sie eine Signalübermittlung über F_c -Rezeptoren vermuteten. Die Ergebnisse zur Kalziumerhöhung durch CD13-mAk konnten in unserer Arbeitsgruppe bestätigt und

erweitert werden (Navarrete Santos A et al., 2000A). APN-spezifische mAk bewirken eine zweigipflige Kurve des Anstiegs des freien intrazellulären Kalziums mit schneller schmalere Kurve durch die Freisetzung aus intrazellulären Speichern und einem länger anhaltenden Plateau durch den Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellulärraum in die Zelle. Verschiedene APN-spezifische mAk zeigten durchaus Unterschiede in der Signalauslösung, so reichte für einige Antikörper (z. B. WM-15, Enzymaktivität hemmend) einfache Ligandierung für das Kalziumsignal, für andere mAk war Kreuzvernetzung mit einem Sekundärantikörper nötig (z. B. SJ1D1, Enzymaktivität nicht inhibierend). Tyrosinkinaseinhibitoren und Hemmer der Phosphatidylinositol-3-Kinase unterdrückten das Kalziumsignal. APN-spezifische mAk konnten außerdem eine schnelle Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 auslösen, NF- κ B aktivieren und die mRNA für das chemotaktische Peptid IL-8 heraufregulieren (Navarrete Santos A et al., 2000A). Die APN-Enzymaktivität war für den Effekt nicht nötig. Ähnlich wie für Nephilysin/CD10 in B-Zellvorstufen gezeigt, könnte auch die in Monozyten von unserer Arbeitsgruppe erstmalig beschriebene Raft-Assoziation von APN (Navarrete Santos A et al., 2000B) wichtig für die direkte Signalübermittlung durch APN-Ligandierung sein.

Bisher fehlen Hinweise darauf, welche Liganden von APN *in vivo* direkt Signale in eine Zelle übermitteln können. Denkbar wären natürlich Substrate (siehe Tabelle 1) aber auch Inhibitoren wie Substanz P und Bradykinin. Andere bekannte Liganden sind Galectin-4 (beschriebene Kopräzipitation mit APN in Dünndarmepithel, Danielsen EM et al., 1997) oder Hämorphine als Abbauprodukte der β -Kette von Hämoglobin (Garreau I et al., 1998). Das Wissen um die hohe Affinität von APN zum Lektin Concanavalin (Con) A wird seit mehreren Jahren für die Reinigung von APN verwendet (ConA-Sepharose). Auch die bekannte Bindung von Coronaviren oder Zytomegalie-Virus an das APN-Molekül könnte direkt Signaltransduktion induzieren. Tatsächlich diskutieren Hansen GH und Mitarbeiter (1998), dass TGEV-Coronaviren als Cross-linker von APN fungieren und so ein Endozytosesignal auslösen. Schließlich wäre auch über die Bindung von *in vitro*-Korrelaten der CNGRC-Peptide (siehe Kap. 1.1.2.) eine Signalinduktion denkbar.

Abb. 4 zeigt, dass Signalübermittlung durch Membranpeptidasen entweder direkt über das Membranprotein vorstellbar ist, wobei es zu einer Assoziation mit zusätzlichen Proteinen kommen kann und die Enzymwirkung nicht zwangsläufig notwendig ist. Andererseits können biologische Peptidmediatoren über eine Substratspaltung durch Membranpeptidasen in ihrer Aktivität moduliert werden, was sich in veränderter Bindung an die Substratrezeptoren auswirkt. Dabei ist auffällig, dass Neuropeptide, Kinine oder chemotaktische Substanzen, die Substrate von Membranpeptidasen sein können, G-

Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen benutzen. Für DPIV/CD26 wurde die Lokalisation in einem Komplex zusammen mit dem Chemokinrezeptor CXCR4 beschrieben (Herrera C et al., 2001), sodass das Substrat SDF-1 den Rezeptor und die Peptidase in enger Nachbarschaft vorfindet.

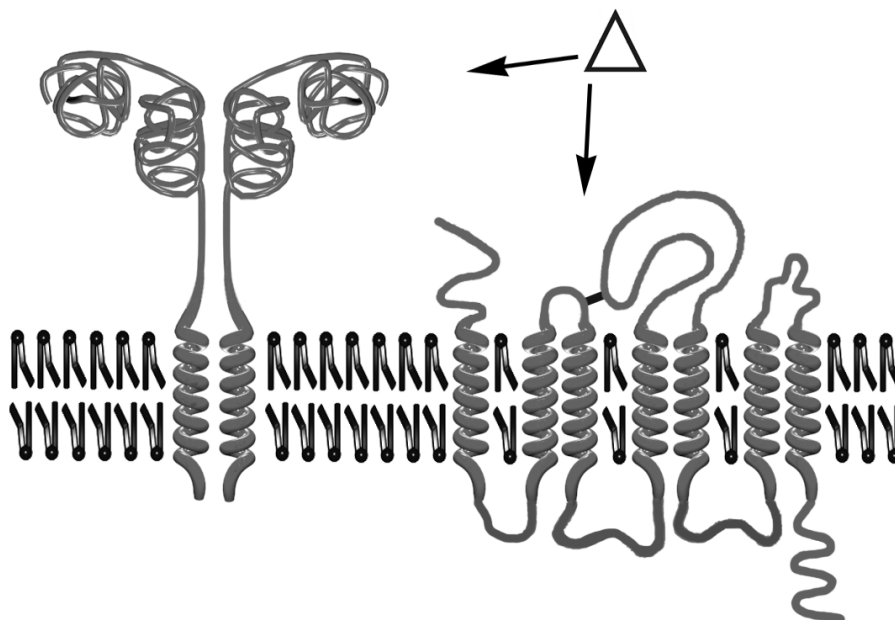


Abb.4: Mögliche Signalübermittlung über Membranpeptidasen. Das Dreieck symbolisiert ein Peptidsubstrat, welches entweder über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor Signale in eine Zelle übermittelt oder aber durch Bindung an eine Membranpeptidase. Letztere kann außerdem durch enzymatische Spaltung die Substratbindung an den Rezeptor modulieren.

1.1.5.4. Membranpeptidasen und Tumoren

Proteolytische Enzyme können Tumorprogression fördern, indem sie durch Abbau von ECM Zellen aus ihrem durch ECM induzierten Zellzyklusarrest ausbrechen lassen und Entdifferenzierung unterstützen oder indem sie Angiogenesefaktoren und Wachstumsfaktoren aus der ECM freisetzen. Auch Membranpeptidasen können die Metastasierung von Tumorzellen unterstützen. So soll die Mitwirkung von DPIV/CD26 wichtig sein bei der Adhäsion von Brust- und Prostatakarzinomzellen an Lungengefäßendothel (Johnson RC et al., 1993). Metastasierende Tumorzellen dringen in die ECM mittels Membranausstülpungen, sog. Invadopodien, ein. Auf den Invadopodien befinden sich neben Matrixmetalloproteinasen, wie z. B. MMP-2, auch Membranpeptidasen wie DPIV/CD26 und Seprase (Chen WT 1996). Seprase ist eine mit

DPIV/CD26 verwandte Serin-Membranpeptidase, deren Aktivität in Melanomzellen mit der Invasivität direkt korreliert sein soll (Goldstein LA et al., 1997). Fibroblasten aus dem Tumorstroma exprimieren FAP, ein ebenfalls DPIV/CD26-ähnliches Enzym (Scanlan MJ et al., 1994).

Tumorzellen zeigen oft anomale Expression von Membranpeptidasen, wobei sowohl Überexpression als auch Verminderung dieser Membranbestandteile vorkommen. So ist die Expression von DPIV/CD26 auf Schilddrüsenneoplasien nützlich in der Abgrenzung zu gutartigen Gewebshyperplasien (Kotani T et al., 1991). Andererseits gilt der Verlust an DPIV/CD26 auf Melanomzellen als Zeichen der Unabhängigkeit von exogenen Wachstumsfaktoren (Morrison ME et al., 1993). Beispiele für Tumoren mit herabregulierter bis fehlender Expression von Neprilysin/CD10 sind Bronchialkarzinome, wenig differenzierte Adenokarzinome des Magens und des Kolons, Androgen-unabhängig wachsende Prostatakarzinome und auch Nierentumoren (Übersicht in Riemann D, 2001C). In Prostatakarzinomen konnte eine die Herabregulation des Membranenzym begleitende Hypermethylierung der Neprilysin/CD10-Promotorregion gezeigt werden (Usmani BA et al., 2000). Die herabregulierte Neprilysin/CD10-Expression wird als Schritt in der Tumorentstehung verstanden, weil Bombesine als Substratpeptide mit Wachstumsfaktoreigenschaften für Epithelzellen ohne Neprilysin/CD10 langsamer abgebaut werden. Die Neuropeptide Endothelin-1 und Bombesine stimulieren außerdem über ihre G-Protein-gekoppelten heptahelikalen Rezeptoren Liganden-unabhängig den IGF-IR (insulin-like growth factor-1 receptor) mit resultierender Aktivierung der Serin-Threoninkinase Akt und antiapoptotischer Wirkung. Diese Vernetzung der Signaltransduktion zweier Rezeptoren wird durch Neprilysin/CD10 gestört (Sumitomo M et al., 2001). Weiterhin soll das Membranmolekül Neprilysin/CD10 auch ohne Enzymfunktion eine Rolle in der Tumormigration spielen. Assoziiert an das Membranmolekül ist die Src-Kinase Lyn, die durch Bindung an die p85-Untereinheit von Phosphoinositol-3-Kinase letztere von einer Bindung an fokale Adhäsionskinase (FAK) abhält, was zu einem schlechteren Migrationsvermögen Neprilysin/CD10-tragender Tumorzellen führt (Sumitomo M et al., 2000). Es gibt aber auch Beispiele für Tumoren mit einer heraufgesetzten Expression von Neprilysin/CD10, wie hepatozelluläres Karzinom, Gliom und malignes Melanom, für die ähnliche Untersuchungen zur Migrationsfähigkeit bisher fehlen. Akute B-Zelleukämien des Kindesalters tragen häufig Neprilysin/CD10 (CALLA-positiv, common ALL). Im Melanom soll die Anzahl Neprilysin/CD10-tragender Tumorzellen mit der Eindringtiefe in die Haut ansteigen (Carrel S et al., 1993). Die Expression des Membranenzym wurde bereits für

Therapieversuche mit CD10-Antikörpern gekoppelt an Superantigene, wie Staphylokokkenenterotoxin A, genutzt (Krull F et al., 1997).

Für APN gibt es mehrere Untersuchungen, die eine Rolle in der Tumormigration und -proliferation zeigen. So migrieren Melanomzellen, die - anders als Melanozyten - APN tragen, in Anwesenheit von APN-Inhibitoren bzw. APN-spezifischen mAk schlechter durch Matrigel (Menrad A et al., 1993). Hemmung der APN in Kulturen von Chorionkarzinomzellen supprimiert das Tumorwachstum (Ino K et al., 1994). Der relativ unspezifische APN-Inhibitor Bestatin wird als Ubenimex u. a. in der Tumorthherapie myeloischer Leukosen verwendet (Tatsumi N et al., 1991; Ota K et al., 1992). Lymphatische Hämoblastosen können ebenfalls APN tragen. Da das Enzym in der Leukämietypisierung als myeloischer Marker gilt, spricht man dann von „myeloischer Koexpression“. Eine Expression von APN auf B-Zellen eines Non-Hodgkin-Lymphoms scheint mit einem diffusen Verteilungsmuster der Knochenmarksinfiltration einherzugehen (Pinto A et al., 1992). Eine für die Tumorthherapie bedeutende Entdeckung ist, dass APN als Regulator endothelialer Zellmorphogenese an der Tumorangiogenese beteiligt ist (Bhagwat SV et al., 2001), was für Therapieversuche ausgenutzt werden kann.

1.2. Zielsetzung

Ziel der beschriebenen Arbeiten war es, unser Wissen zum Vorkommen und zur Regulation von APN u. a. membranständiger Peptidasen in verschiedenen Zellsystemen zu erweitern. Insbesondere sollten mehr Informationen zum Vorkommen und Entstehen APN-positiver Lymphozyten und zur APN-Regulation durch Zytokine und Zell-Zell-Kontakt gesammelt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Patienten-Untersuchungsmaterial

2.1.1. Synovialflüssigkeit

Synovia wurde uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Universitätskinderklinik (Frau Dr. V. John) und der Orthopädischen Universitätsklinik (Dr. J. Brandt). Diagnosestellung und Indikation zur Punktion lagen allein in den Händen der Kliniker. Die Proben erreichten unser Instiut in Heparinmonovetten und wurden innerhalb möglichst kurzer Zeit der Immunphänotypisierung zugeführt. Dazu wurden die zum Teil sehr viskösen Flüssigkeiten nach Zellzählung mit PBS verdünnt und bei 600 x g zentrifugiert. Die Doppelmarkerfluoreszenzfärbung erfolgte wie im Abschnitt 2.5.1. beschrieben. Wir teilten die Patienten nach ihrer Diagnose ein in die drei Gruppen: juvenile chronische Arthritis (JCA), RA und traumatische Arthritis (TA). In letztere Gruppe wurden auch nicht-infektiöse Ergüsse nach Gelenksoperation einbezogen.

2.1.2. Perikardflüssigkeit

Perikardflüssigkeit von Patienten mit offener Herzoperation wurde uns aus der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie unserer Universität zur Verfügung gestellt (Dr. M. Hermann, Dr. A. Simm). Bei der Operation wird diese Flüssigkeit nach Anschneiden des Herzbeutels abgesaugt. Wir erhielten zwischen 2 ml und 8 ml Flüssigkeit von im wesentlichen 3 Patientengruppen: Kinder mit Herzoperation wegen verschiedener Fehlbildungen, Erwachsene mit Herzklappenoperationen (oft Entzündungen in der Anamnese) und Erwachsene mit chronisch-ischämischer Herzkrankheit. Wir bestimmten erstmals den Immunphänotyp von Lymphozyten aus Perikardflüssigkeit (Doppelmarker-Immunfluoreszenz), nutzten die Flüssigkeit aber außerdem auch als Reservoir an Monozyten/Makrophagen, die über einfache Adhärenz in serumhaltigem Kulturmedium [RPMI-1640 mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) (C.C. Pro GmbH, Neustadt/W.) und Antibiotika (1 µl/ml Fungizone von Life Technologies Eggenstein, 0,75 µl/ml Refobacin von Merck)] an Kulturgefäße gewonnen wurden.

2.1.3. Bronchiallavage-Flüssigkeit

Wir nutzten zellreiche Bronchiallavage-Flüssigkeiten (BALF), die an unser Labor im Jahr 2000 zur Immunphänotypisierung gesendet wurden, um eine APN-Expression auf T-Zellen zu untersuchen. Anfordernde Einrichtungen waren die Klinik für Innere Medizin des Krankenhauses Martha-Maria Dörlau und die Klinik für Innere Medizin KIM2 I5

unserer Universität. Die Patientendiagnosen wurden uns freundlicherweise von Chefarzt Dr. W. Schütte (Dölau) und Frau Dr. B. Wollschläger (KIM1 I5) mitgeteilt. Zellen der BALF wurden im wesentlichen wie von Costabel beschrieben präpariert (Costabel U, 1994), d. h. BALF wird über Mull filtriert, um den Schleim zu entfernen. Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und mit direkt markierten mAk inkubiert. Parallel erfolgte mit der Zytocentrifuge die Herstellung von Objektträgerpräparaten zur Leukozytendifferenzierung nach Trocknung der Zellen, Methanolfixierung und Färbung nach Pappenheim. 600 Zellen pro Objektträger wurden ausgezählt.

2.1.4. Tumoren

208 Tumorproben erhielten wir in den Jahren 1993 bis 1997 nach Inspektion durch die Routinepathologie (Prof. Holzhausen, Institut für Pathologie unserer Universität). Sie stammten aus der Urologischen Universitätsklinik, der Thoraxchirurgie, Allgemeinchirurgie, Frauenklinik und Neurochirurgie. Die Tumorhistologien erhielten wir durch freundliche Mithilfe von Dr. R. Hintze aus dem Institut für Pathologie unserer Universität. Die Tumoren erreichten unser Institut in RPMI 1640-Medium mit 5 % FCS und Antibiotika (1 µl/ml Fungizone von Life Technologies Eggenstein, 0,75 µl/ml Refobacin von Merck). Tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) wurden innerhalb von maximal 6 Stunden präpariert (siehe Kapitel 2.2.6.).

2.2. Zellpräparationen und Zellkultivierungsverfahren

2.2.1. Präparation und Langzeitkultivierung Fibroblasten-artiger Synoviozyten

Pannusgewebe von Patienten mit JCA wurde uns in den Jahren 1991 bis 1998 freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. V. John der Universitätskinderklinik, Pannusgewebe von RA-Patienten erhielten wir aus der Orthopädischen Klinik unserer Universität (Dr. J. Brandt) sowie der Rheumaklinik Vogelsang (Prof. Kekow). Unser Institut hatte keinerlei Einfluss auf die Indikationsstellung zur Synovektomie. Das Pannusgewebe erreichte uns in sterilem Medium mit Antibiotikazusatz (1 µl/ml Fungizone von Life Technologies Eggenstein, 0,75 µl/ml Refobacin von Merck) und 5 % FCS und wurde von uns innerhalb von 6 Stunden steril weiterverarbeitet. Das Gewebe wurde fein zerschnitten und in einer Lösung mit 0,5 mg/ml Kollagenase vom Typ II (SIGMA) und 0,15 mg/ml DNase I (Boehringer Mannheim) ein bis zwei Stunden bei 37 °C unter Rühren inkubiert. Nach Zugabe von serumhaltigem Kulturmedium wurde das Zellgemisch mit einem Spritzenkolben durch ein Metallsieb (SIGMA Cell dissociation kit; 100 µm Porenweite) gerührt und bei 450 x g

bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Einsaat der Zellen in mit 0,5 % Gelatine (SIGMA) in PBS für 60 min bei 37 °C vorbereitete Zellkulturflaschen in RPMI 1640-Medium mit 20 % FCS, 0,2 mM Glutamin, 750 µl Refobacin (Merck, Darmstadt) und 1 ml/l Fungizone (Gibco BRL, Eggenstein) in einem Brutschrank mit einem CO₂-Gehalt von 5 %. Nach 24 Stunden erfolgte ein zweimaliges Waschen der adhären Zellen, die innerhalb von 6-14 Tagen zur Konfluenz heranwachsen. Das Umsetzen der konfluenten Zellkulturen erfolgte durch zweimaliges langsames Spülen der Zellen mit auf 37 °C vorgewärmter EDTA-Lösung (0,2 mM in Hank's ohne Kalzium und Magnesium) und nachfolgender 5-minütiger Inkubation der Zellen mit 0,05 mg/ml Trypsin bei 37 °C. Die Zellen wurden ca. wöchentlich 1 : 4 umgesetzt. Zur Einsaat wurde den Zellen eine Wachstumsfaktorpräparation für Endothelzellen (ECGS) (final 25 µg/ml; C.C. Pro GmbH, Neustadt/W.) zugesetzt, wobei 50 mg ECGS mit 7 ml Heparin (Konservierungsmittel-frei, Seromed) auf 25 ml Medium als Stammlösung portioniert (bei -20 °C gelagert) und in der Kultur final 1 : 80 verdünnt wurde.

In der Primärkultur und den beiden ersten Passagen waren stark MHC Klasse-II-positive synoviale Makrophagen nachweisbar, ab der 3. Passage erhielten wir morphologisch einheitlich erscheinende SFC (negativ für CD14 als Monozytenmarker, Charakterisierung in: Schwachula A et al., 1994), die wir im Stickstoff einfroren oder bis zur 8. Passage für Kokultivierungsversuche mit Lymphozyten und Regulationsversuche der Expression verschiedener Membranpeptidasen verwendeten.

2.2.2. Nierentubulusepithel- und Nierentumorzellen

Nephrektomiegewebe von Nierentumorpatienten wurde uns freundlicherweise aus der Urologischen Universitätsklinik zur Verfügung gestellt. Nach Begutachtung durch einen Pathologen erhielten wir Nierentumorgewebe und - falls möglich - morphologisch unbeteiligt wirkendes Gewebe der entnommenen Niere. Das Gewebe wurde unter sterilen Bedingungen weiterverarbeitet. Die Methode zur Zellgewinnung umfasste wie bei den Synoviozyten: Zerschneiden mit anschließendem enzymatischen Verdau unter Rühren mit Kollagenase/DNAse bei 37 °C, Rühren des Zellgemischs mit einem Spritzenstempel durch ein Sieb und einen Waschschriff. Danach folgten eine Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll (Dichte 1,077 g/ml, Pharmacia) mit Zentrifugation für 15 min bei 900 x g, Ernten der Zellen in der Interphase und zwei Waschschriffe mit PBS (Zentrifugation für 10 min bei 450 x g). Der enzymatische Verdau der meist klarzelligen (weichen) Tumorproben beschränkte sich auf 30 min. Normales Nierenrindengewebe

wurde ein bis zwei Stunden enzymatisch behandelt. Die Zellen wurden in Gelatinebeschichtete Kulturflaschen eingesät und erhielten Parker Medium, angereichert mit Antibiotika, 20 % FCS, 50 μ mol 2-Mercaptoethanol und 2 mmol Glutamin. Die Anzucht gelang bei ca. 20 % der Nierentumorkulturen und 90 % der Nierentubulusepithelzellen, allerdings konnte selten eine Zelllinie über die 3./4. Passage hinaus kultiviert werden, auch nicht unter Benutzung eines epithelialen Wachstumsfaktors (EGF, C.C. Pro GmbH Neustadt/W.). Umsetzen der Zellen mit EDTA und Trypsin erfolgte wie im Kapitel 2.2.1. beschrieben. Die Zellen wurden sowohl für Kokultivierungsversuche mit Lymphozyten als auch für Regulationsversuche von Membranpeptidasen mit Zytokinen verwendet.

2.2.3. Kultivierung humaner Nabelschnurvenen-Endothelzellen

Die Isolierung der Endothelzellen aus Nabelschnurvenen erfolgte mit nur geringen Variationen entsprechend der Methode nach Jaffe (1973). Die Methode ist gut dokumentiert in meiner Promotionsschrift (Riemann D, 1990). Da wir in der Zeit von 1988 bis 1991 einen großen Grundstock an eingefrorenen Zellen anlegten, konnten die hier beschriebenen Arbeiten mit aufgetauten Zellen durchgeführt werden, die in Gelatine beschichtete Kulturflaschen eingesät wurden. Kulturmedium war Medium 199 (Parker Medium) von GIBCO, angereichert mit 20 % FCS, 2 mmol Glutamin sowie dem Wachstumsfaktor ECGS (final 25 μ g/ml; C.C. Pro GmbH Neustadt/W.).

2.2.4. Präparation und Kurzzeitkultur von tonsillären Lymphozyten

Gaumen- und - in seltenen Fällen - Rachenmandeln wurden uns von Tonsillektomiepatienten (Alter 2-39 Jahre) mit tonsillärer Hypertrophie und/oder rekurrenden Tonsillitiden von der Universitäts-HNO-Klinik (Dr. T. Stange) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Tonsillen kamen in steriles Transportmedium (5 % FCS), das bei 4 °C gelagert wurde. Die Verarbeitung erfolgte innerhalb von 6 Stunden: Die Tonsillen wurden unter ständiger Befeuchtung mit PBS fein geschnitten, durch ein Metallsieb (Porenweite 100 μ m) gedrückt und über einen Ficoll-Dichtegradienten (1,077 g/ml; Pharmacia) gegeben (Zentrifugation für 20 min bei 900 x g), um mononukleäre Zellen zu gewinnen. Nach zweimaligem Waschen der Zellen aus der Interphase (8 min bei 450 x g zentrifugiert) erfolgte durch Adhärenz an Plastikulturflaschen in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS und Antibiotika über 2 Stunden eine Abreicherung der Monozyten. T- und B-Lymphozyten wurden nach Bestimmung der Gesamtzellzahl in einer Neubauer-Kammer (Überprüfung der Vitalität mit 0,04 % Trypanblau) über eine Rosettierung mit Schaferthozyten getrennt. Die

Schaferythrozyten (Behringwerke, Marburg) mussten in Vorbereitung zweimalig mit PBS gewaschen werden. Das Sediment wurde in RPMI 1640-Kulturmedium mit 10 % FCS aufgenommen (für 1 ml Erythrozytensediment 19 ml Kulturmedium) und resuspendiert. Danach erfolgte eine Zugabe von Polyethylenglycol (SIGMA, Deisenhofen). Die so behandelten Erythrozyten konnten bei 4 °C mehrere Wochen aufbewahrt werden. Zur Trennung wurden für 10^8 Zellen je 2 ml 5 % ige vorbehandelte Schaferythrozytenlösung zugegeben, die Zentrifugenröhrchen vorsichtig um die Längsachse rotiert und 10 min bei $110 \times g$ zentrifugiert. Nach Abnahme der (nicht rosettierten) B-Lymphozyten (zweimaliges Waschen mit PBS, Ermittlung der Zellzahl und der Reinheit über direkte Markierung mit dem Monozytenmarker CD14, dem T-Zellmarker CD3 und dem B-Zellmarker CD19 mittels Durchflusszytometrie) erfolgte die Freisetzung der rosettierten T-Zellen durch Lyse der Erythrozyten mit Ery-Lyse-Lösung (8,29 g NH_4Cl , 372 mg EDTA, 1 g KHCO_3 auf 1 l Aqua dest., pH 7,2). Die Reinheit von B- und T-Zellen lag jeweils meist über 95 %. Sowohl B- als auch T-Zellen wurden für Kokultivierungsversuche verwendet.

2.2.5. Präparation und Kurzzeitkultur von Lymphozyten aus peripherem Blut

Peripheres Blut erhielten wir von freiwilligen Gesunden und Buffy Coat-Proben der Blutspende Bergmannstrost (freundliche Vermittlung Dr. R. Tietze). Nach Verdünnung mit dem gleichen Volumen PBS (Zimmertemperatur) präparierten wir aus dem Blut über Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll mononukleäre Zellen (Zentrifugation wie oben beschrieben). Monozyten wurden durch Adhärenz (2 Stunden, 37 °C, Medium RPMI-1640 mit 10 % FCS) abgereichert. Eine Abreicherung von Thrombozyten erfolgte durch Waschen der Zellen mit PBS mit 5 mM EDTA. Die Zellen wurden für Kokultivierungsversuche eingesetzt. Das Medium zur Lymphozytenkultivierung bekam 100 U/ml IL-2 (Eurocetus) und zum Teil Mitogene wie PHA-L (2-5 µg/ml, Boehringer) zugesetzt.

2.2.6. Präparation tumorinfiltrierender Lymphozyten

Sowohl aus Nierenkarzinomen als auch aus Bronchialkarzinomen und anderen Tumoren präparierten wir tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL), um deren Expression von APN zu untersuchen. Das uns zur Verfügung stehende Tumorgewebe wurde in 5 mm³ große Stücke zerschnitten und mit 0,1 % Kollagenase II und 0,015 % DNase I (SIGMA) für 30 min bis 2 Stunden (abhängig von der Konsistenz des Gewebes) bei 37 °C unter Rühren inkubiert. Das Zellgemisch wurde durch ein Metallsieb mit 100 µm Porenweite (SIGMA)

gegeben, um nicht verdaute Stücken zu entfernen, und gewaschen. Nach Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll (Zentrifugation wie oben beschrieben) und Ernten der Zellen aus der Interphase wurden die mononukleären Zellen zweimal mit PBS gewaschen (8 min bei 450 x g zentrifugiert) und mit direkt markierten Antikörpern inkubiert.

2.2.7. Sonstige Zelllinien

Die HUT78- und Jurkat-T-Zelllinien und die frühe monozytäre Linie U937 (ATCC) erhielten wir freundlicherweise von Prof. Ole Werdelin vom Institut für Immunologie des Panum-Institutes Kopenhagen, Dänemark. Die meisten leukämischen Zelllinien wurden in RPMI-1640 mit 10 % FCS, Antibiotika, 2 mmol Glutamin und 50 µmol 2-Mercaptoethanol kultiviert. Hautfibroblasten von Neugeborenen (Linie 177) bekamen wir freundlicherweise von Frau Dr. Schmidt aus dem Institut für Pathologie unserer Universität. Fibroblasten aus Tonsillen erhielten wir während der Langzeitkultivierung von tonsillären Lymphozyten als Nebenprodukt. Die Fibroblasten wuchsen - wie auch die von DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) erworbenen Nierentumorzelllinien Caki-1 und Caki-2 und die von Dr. M. Schirner (Schering AG Berlin) zur Verfügung gestellte Prostatakarzinomzelllinie PC3 in oben genanntem Kulturmedium. Die relativ reife Monozytenlinie Mono-Mac-6 kauften wir ebenfalls von DSM. Das Kulturmedium dieser Zellen enthielt zusätzlich 1 mmol/l Pyruvat und 9 µg Insulin/ml. ECV340-Zellen (früher: spontan transformierte Gefäßendothelzelllinie; jetzt: Gallengangskapillarepithelzelllinie) wurden uns freundlicherweise von Frau Dr. C. Gläser (Institut für Humangenetik unserer Universität) zur Verfügung gestellt und in RPMI 1640-Kulturmedium mit nur 5 % FCS kultiviert. ECV340-Zellen (negativ für APN), die stabil mit verschiedenen APN-Varianten (Wildtyp und Deletion des Membranankers) transfiziert wurden (Thiele K et al., 1997), stellte Frau Katja Thiele aus unserem Institut zur Verfügung.

2.2.8. Mykoplasmentest

Zum Nachweis von möglichen Mycoplasmeninfektionen verwendeten wir einen Enzym-Immunoassay-Kit von Boehringer Mannheim, der polyklonale Antikörper gegen die 4 Hauptkontaminanten enthält. Der Test wurde ca. 14-täglich entsprechend dem Kit-Protokoll durchgeführt. Kontaminierte Kulturen wurden verworfen.

2.3. Präparation von Zellmembranen aus Synoviozyten

SFC wurden mittels EDTA und Trypsin aus den Kulturflaschen abgelöst, und bei 4 °C dreimal mit steriler PBS-Lösung (pH 7,2) gewaschen. Die Zellzahl wurde mit Zellfraktionierungspuffer auf 3×10^7 Zellen/ml eingestellt. Dieser Puffer enthielt: 0,25 M Saccharose, 0,1 M MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) und 1 mM PMSF (SIGMA). Die Zellen wurden mit einem Potter-Homogenisator oder mit Ultraschall (BANDELIN Sonoplus GM70) zerkleinert und bei 4 °C mit 1 000 x g zentrifugiert, um Kerne und nicht zerstörte Zellen entfernen zu können. Der Überstand wurde in 6 ml große Beckman-Polyacryl-Zentrifugenröhrchen gefüllt, mit Fraktionierungspuffer aufgefüllt und mit einer Metallkappe verschlossen für 30 min bei 4°C bei 100 000 x g zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge, SW55-Festwinkelrotor), um Zytosol und Membranfraktion zu trennen. In einer Sterilbox wurde das Röhrchen aufgeschnitten und das Pellet mit Fraktionierungspuffer aufgenommen und in ein neues Röhrchen überführt, um danach ein zweites Mal unter den gleichen Bedingungen zu zentrifugieren. Die gewaschene Membranfraktion wurde mit 1 ml PBS aufgenommen. Wir entnahmen Anteile für Proteinbestimmung und Enzymaktivitätsmessung. Die portionierten Membranfraktionen wurden bei -70 °C eingefroren.

2.4. Zytokine für Zellkultur und Regulationsversuche

Tabelle 2 veranschaulicht Herkunft und Konzentration sämtlicher verwendeter Zytokine. Betaseron war ein Geschenk der Schering AG (Dr. M. Schirner), TNF- α ein Geschenk der Knoll AG. Alle Zytokine wurden als Stammlösung bei -80 °C gelagert. Von TGF- β wurden zur Aktivierung des Zytokins Stammlösungen in HCl hergestellt (2 μ g in 200 μ l 0,05 N HCl), portioniert und erst kurz vor Gebrauch mit serumhaltigem Kulturmedium verdünnt.

Für die Regulation der Proteinexpression von Membranpeptidasen wurden Zellen für 3 Tage (nur bei IFN- α , - β und - γ 3 - 5 Tage) mit Zytokinen stimuliert, für die Regulation der mRNA-Expression 6 - 24 Stunden. Das verwendete Kulturmedium enthielt in den meisten Fällen 10 % FCS mit Antibiotika und keine weiteren Wachstumsfaktoren. In manchen Versuchen verwendeten wir den Proteinkinase C-Aktivator Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) (Sigma) in einer Konzentration von 10 ng/ml.

Tabelle 2: Charakterisierung der verwendeten Zytokine.

ZYTOKIN	QUELLE	KONZENTRATION
IL-1 β	PBH Hannover/Strathmann	5 ng/ml
IL-2	EuroCetus	100 U/ml
IL-4	PBH Hannover/Strathmann	2 ng/ml
IL-6	Prof. Heinrich (Aachen)	500 U/ml
IL-7	PBH Hannover/Strathmann	10 ng/ml
IL-10	Genzyme Corp. Cambridge	10 ng/ml
IL-13	ICC Ismaning	10 ng/ml
TNF- α	Knoll AG, Ludwigshafen	10 ng/ml
TGF- β 1	PBH Hannover/Strathmann	10 ng/ml
TGF- β 2	R&D Systems Wiesbaden	10 ng/ml
IFN- γ	PBH Hannover/Strathmann	200 U/ml
IFN- α 2b (Intron A)	Essex Pharma GmbH München	1000 U/ml
IFN- β (Betaseron)	Schering AG Berlin	1000 U/ml
GM-CSF	PBH Hannover/Strathmann	5 ng/ml

2.5. Immunfluoreszenzfärbungen

2.5.1. Antikörper und Färbemethoden

Tabelle 3 gibt einen Überblick über sämtliche verwendeten Antikörper. Für die Charakterisierung von Lymphozyten verwendeten wir meist Doppelfärbungen. Die Zellen wurden nach zwei Waschschritten auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und 100 μ l Zellsuspension bei Zimmertemperatur für 20 min mit den direkt markierten Antikörpern unter Lichtausschluss inkubiert. Die benötigte Menge an Antikörpern hatten wir in Vorversuchen austitriert. Es schloss sich ein Fixationsschritt für 10 min mit 1 %-iger Paraformaldehydlösung in PBS (pH 7,2) an und zwei Waschschrritte mit PBS. Die Zellen wurden in PBS aufgenommen und bis zur Messung im Dunkeln aufbewahrt. Zur Messung von T-Zelloberflächenmolekülen wurde Doppelfärbung mit CD3 als T-Zellmarker (z. B. FITC-markiert) und dem zu bestimmenden Marker in einer anderen Fluoreszenz [z. B. Phycoerythrin (PE)] verwendet. Adhärente Zellen wurden für die Durchflusszytometrie mit EDTA/Trypsin oder mit speziellem Enzym-freiem Zellablöser (SIGMA Cell Dissociation Solution Nonenzymatic) aus den Kulturgefäßen isoliert und zweimal mit PBS gewaschen. Die Färbung erfolgte entweder mit direkt markierten Antikörpern (Methode bei Zimmertemperatur, siehe oben) oder als indirekte Immunfluoreszenzmethode: 40 min Inkubation bei 4 °C mit dem ersten, nicht markierten

Antikörper, zweimaliges kaltes Waschen der Zellen, 30 min Inkubation bei 4 °C mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten, fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper, Waschen und Fixieren der Zellen. Isotypkontrollen spielten eine besondere Rolle bei der Färbung von Monozyten/Makrophagen. Hier wurde außerdem zur Unterdrückung einer unspezifischen Anfärbung eine 10-minütige Inkubation mit Pferdeserum vor Zugabe des Antikörpers praktiziert.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Antikörper (∅ = nicht markiert). Zum Setzen eines automatischen Lymphozytengates wurde die Kombination CD45 FITC/CD14 PE (Simultest IMK Plus, Röhrchen A, BD Heidelberg) und als Isotypkontrolle IgG1 FITC/IgG2a PE (Simultest Röhrchen B) verwendet.

ANTI-GEN	KLON	KONJU-GATION	QUELLE	SPEZIFITÄT
APA	BP-1	∅	D. Cooper, Howard Hughes Med. Institute	Glutamylaminopeptidase
Caveolin	Polyklonal	∅	Transduction Lab.	Caveolae-spezif. Molekül
CD3	Leu-4	FITC, PE	BD, Heidelberg	CD3-Molekülkomplex auf T-Zellen
CD4	Leu-3a	FITC, PE	BD, Heidelberg	Helferzell-spezif. Molekül
CD8	Leu-2a	FITC, PE	BD, Heidelberg	Zytotoxische T-Zellen
CD10	ALB2	∅	Immunotech	Neprilysin
CD10	HI10A	PE	BD, Heidelberg	Neprilysin
CD11b	Leu-15	PE	BD, Heidelberg	Integrin, α M-Untereinheit
CD13	WM15	PE	Pharmingen/BD	APN (Enzymaktivität hemmend)
CD13	Leu-M7	∅; PE	BD, Heidelberg	APN
CD13	SJ1D1	∅	Immunotech	APN
CD14		FITC, PE	BD, Heidelberg	Teil des LPS-Rezeptors, Monozytenmarker
CD16	Leu-11	PE	BD, Heidelberg	Fc-Rezeptor für IgG, Typ III
CD19	Leu-12	FITC, PE	BD, Heidelberg	B-Zell-spezifisches Antigen
CD25	B1.49.9	PE	Immunotech	IL-2-Rezeptor, α -Kette
CD26	Ta1	FITC, PE	Coulter/IT	DPIV
CD45RO	UCHL1	PE	DAKO, Hamburg	Memory-Marker, 180 kDa-Form
CD54	LB-2	PE	BD, Heidelberg	ICAM1-Molekül
CD59	P282(H19)	PE	BD, Heidelberg	Komplementschutzmolekül
CD69	TP/55.3.1	PE	Immunotech	AIM, früher Aktivierungsmarker
HLA-DR	L243	PE	BD, Heidelberg	MHC Klasse II-Molekül
CD134	ACT35	PE	Pharmingen/BD	OX40, Aktivierungsmarker
CD137	4B4-1	PE	Pharmingen/BD	4-1BB, Aktivierungsmarker

2.5.2. Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Messungen erfolgten am FACScan der Firma BD Heidelberg mit der Simulset-, Cellquest- oder der Lysis-Software. Ein Gate wurde meist anhand der Streulichteigenschaften (im Punktediagramm: Vorwärtsstreulicht aufgetragen auf Abszisse, Seitwärtsstreulicht auf Ordinate) auf die interessierende Zellpopulation gesetzt. 2000 bis 5000 Zellen wurden im gesetzten Gate hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften FL1 und/oder FL2 (logarithmische Auftragung) analysiert. Nach Setzen einer Grenze zur Autofluoreszenz im Kontrollröhrchen erfolgte die Auswertung als % positive Zellen. Im Falle einer annähernden Normalverteilung der gefärbten Zellpopulation verwendeten wir zur Auswertung den Mean-Wert (mittlerer Fluoreszenzkanal) als Messwert für die Fluoreszenzintensität.

Zur Quantifizierung der APN-Expression auf Lymphozyten verwendeten wir eine spezielle Präparation des PE-markierten Leu-M7-mAk (Protein : Farbstoff annähernd 1 : 1) (BD Heidelberg) und standardisierte Kügelchen mit 4 Konzentrationen an PE (QuantiBRITE™ PE, BD Heidelberg), die vor der zu messenden Probe mit den gleichen Geräteeinstellungen für die Fluoreszenz gemessen werden mussten.

2.5.3. Fluoreszenzmikroskopie

Färbungen für die Mikroskopie erfolgten direkt in 8-Kammer-Objektträgern (Lab Tek Chamber Slides, borosilicate, Nunc), deren Kammerwände nach Durchführung sämtlicher Färbeschritte sehr leicht abziehbar sind, um den Objektträger eindecken zu können. Zur Membranpermeabilisierung beim Nachweis intrazellulärer Antigene verwendeten wir 0,5 % NP40 in PBS nach Fixierung der Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (in PBS, pH 7,2) für 10 min. Als stabilen Fluoreszenzfarbstoff nutzten wir meist Cy3, gekoppelt an den Sekundärantikörper. Als flüssiges Eindeckmedium mit Ausbleichschutz fand Citifluor AF-1 (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim) Verwendung. Um die Beweglichkeit von Suspensionszellen für die Betrachtung am Laserscanningmikroskop (LSM) einzuschränken, wurde das fest werdende Gel/Mount-Eindeckmedium (Biomeda Corp., Natutech Frankfurt/M.) benutzt.

Für die Mikroskopie stand uns in unserem Institut ein Olympus Mikroskop (BH-2) mit Filtern für Grün-, Rot- und UV-Farbstoffe sowie ein inverses Fluoreszenzmikroskop von Firma Leica (DMiL) mit Spezialfilter für EGFP sowie einen Filter für rote Farbstoffe zur Verfügung. Ein LSM der Firma Carl Zeiss Jena mit UV-, Argon- und Helium/Neon-Laser

konnte von uns am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie genutzt werden (Ansprechpartner Frau Dr. Bettina Hause), ein LSM der Firma Leica im Institut für Anatomie (Ansprechpartner Frau Navarrete Santos).

2.6. Kokultivierungsversuche

Adhärenz wachsende Zellen wurden in flache, mit 0,5 % Gelatine (in PBS) vorbeschichtete 12- oder 24-Napf-Kulturplatten eingesät (ca. 5×10^4 Zellen/ml) und bis zur Konfluenz kultiviert. Lymphozyten (tonsillär, aus peripherem Blut oder lymphozytäre Linien) wurden in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml zu den adhärenz Zellen zugegeben und zwischen 30 min und 4 Tagen kultiviert. Für die Kokultur mit SFC oder Fibroblasten wurde serumfreies AIM V-Medium (Life Technologies, Eggenstein) verwendet, für die Kokultur mit Endothelzellen, Tubulusepithelzellen oder Makrophagen Medium mit 10 % FCS (Parker-Medium für Endothel, sonst RPMI-1640). Tonsilläre B-Lymphozyten wurden in Iscove's Medium mit 10 % FCS, 0,5 % BSA, 50 µg/ml Transferrin und 50 µmol 2-Mercaptoethanol unter Zusatz von IL-2 und IL-4 (Tabelle 2) kultiviert. In Parallelversuchen wurden Lymphozyten unter ähnlichen Kulturbedingungen ohne adhärenz Zellen kultiviert. Nach Ende der Kokultivierungszeit wurden die Lymphozyten durch kräftiges Spülen von den adhärenz Zellen abgelöst und meist für die Durchflusszytometrie mit FITC- und PE-markierten mAk inkubiert (z.B. CD3 als T-Zellmarker oder CD19 als B-Zellmarker FITC-markiert, APN mit CD13-mAk PE-markiert). Die Kokultur wurde zum Teil mit fixierten adhärenz Zellen durchgeführt. Die Fixierung erfolgte mit 1 % frischer Paraformaldehydlösung in PBS (pH 7,2) für 15 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen sehr gründlich gewaschen (dreimal PBS für je 5 min) und mit Lymphozyten kokultiviert.

Lösliche humane APN erhielten wir als Präparation aus Nieren von Prof. Hütter (ehemals Pathobiochemisches Institut unserer Universität). Mitogene wie ConA (SIGMA, 50 µg/ml) oder PHA-L (Boehringer Mannheim, 2-5 µg/ml) wurden auf ihre Wirkung in der Kokultur untersucht. CD3-mAk (Ortho Diagnostics) wurden in einer Endkonzentration von 1 µg/ml und CD28-mAk (Biosource, Ratingen) mit 0,5 µg/ml zur T-Zellstimulation verwendet. Aktinomycin (SIGMA) wurde in einer Konzentration von 0,2-1 µg/ml, Cycloheximid (SIGMA) von 5-9 µM und Cytochalain B (SIGMA) von 1-100 µM der Kokultur zugesetzt (30-minütige Vorinkubation der Lymphozyten mit dem Mediator). Einen Protease-Inhibitorencocktail, bezogen von SIGMA, testeten wir auf seinen Einfluss auf die lymphozytäre APN-Induktion nach Zellkontakt mit adhärenz Zellen. Ebenso

untersuchten wir den Einfluss einzelner Inhibitoren, wie Actinonin als APN-Inhibitor (SIGMA, 10^{-4} M), E64, PMSF (Boehringer Mannheim, 100 μ g/ml), Pepstatin (Boehringer Mannheim, 2 μ g/ml), 1,10-Phenanthrolin (SIGMA, 10^{-4} M) und den TNF- α -Proteaseinhibitor (TAPI, 50-300 μ M), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Firma Immunex (Washington). Wir untersuchten außerdem einen möglichen Einfluss einer Vorinkubation der vitalen oder fixierten SFC mit verschiedenen APN-spezifischen mAk (1 : 20, 15 min, 20 °C) auf die lymphozytäre APN-Expression nach Kokultur mit SFC. Für Versuche mit Cholesterolentzug wurden native und Paraformaldehyd-fixierte SFC für 1 Stunde mit 1-4 % Methyl- β -Cyclodextrin (SIGMA) behandelt und nach zwei Waschschrritten erfolgte Immunfluoreszenzfärbung für APN oder das GPI-gekoppelte Molekül CD59. Außerdem verwendeten wir diese Zellen zur Messung der Ala-pNA-spaltenden Enzymaktivität und zur Kokultivierung mit tonsillären Lymphozyten, die für diese Versuche Medium RPMI-1640 angereichert mit 10 % lipidfreiem FCS (C. C. Pro) erhielten.

In einigen Versuchen wurden die Lymphozyten in Transwell-Kammern mit einer Porenweite von 0,4 μ m (Polycarbonat, Costar) getrennt von den adhärennten Synoviozyten eingesät. Andere Transwell-Versuche beinhalteten das Einsäen von Endothelzellen auf Matrigel (Matrigel EHS, Boehringer Ingelheim)-beschichteten Filtern mit 8 μ m großen Poren (Costar). Nach Konfluenz dieser Zellen wurden Lymphozyten in die obere Kammer gegeben und nach einer definierten Zeit 1. aus der unteren Kammer (Zellen nach Migration), 2. als Fraktion nicht adhärennter, über den Endothelzellen schwimmenden Zellen und 3. als adhärennte Fraktion auf der Endothelzellschicht geerntet und nach Inkubation mit direkt markierten Antikörpern in der Durchflusszytometrie auf ihre APN-Expression untersucht.

Ein mehr an *in vitro*-Verhältnisse angepasster Kokultivierungsversuch beinhaltete das Eingießen von SFC in ein Kollagengel: Angesäuertes (und deshalb flüssiges) Kollagen Typ I aus Rattenschwänzen (BD, Heidelberg) wurde mit 1 N NaOH neutralisiert und die SFC in möglichst kleinem Volumen beigemischt. Als Serumausgleich wurde ITS+TM Premix (BD, Heidelberg), eine Mischung aus Insulin, Transferrin, Linolsäure u. a. Bestandteilen, zugesetzt. Eine mögliche Mischung war folgende:

491 μ l ITS

8,9 μ l 1 N NaOH

500 μ l Kollagen Typ I (365 mg/ml)

10-20 μ l suspendierte SFC ($3-5 \times 10^5$ Zellen/500 μ l Gel).

Nach 15-20 min im Brutschrank war das Gel fest, die SFC begannen sich nach ca. 24 Stunden auszustrecken. Für 12-Napf-Platten verwendeten wir 200 µl Gel pro Kavität, für 6-Napf-Platten 350 µl. Auf das Gel wurde eine dünne Mediumschicht aufgesetzt, um ein Austrocknen zu verhindern. Tonsilläre T-Lymphozyten, die in dieses Gel wanderten, wurden nach 2 Stunden mit Kollagenase Typ IA (0,05 % in serumfreiem Medium, SIGMA) aus dem Gel befreit und auf ihre APN-Expression im Durchflusszytometer nach direkter Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Kontrollzellen wanderten in ein leeres Gel oder wurden nur mit Kollagenase behandelt.

2.7. Proteinbestimmung nach Lowry

Sämtliche Proteinbestimmungen wurden mit der empfindlichen Methode nach Lowry in der Modifikation nach Langner (Langner J et al., 1971) durchgeführt. Alle Proben wurden mit 0,01 N NaOH auf eine Proteinkonzentration von 2-15 µg/20 µl Probe verdünnt und die Bestimmung erfolgte in Vierfachansätzen. Als Standard diente eine Humanserumalbuminlösung mit einer Konzentration von 0,75 g/l. 200 µl einer Lösung aus 1 Teil 1 % CuSO₄·5 H₂O und 50 Teilen aus 4 % Na₂CO₃ und 0,04 % K-Na-Tartrat in 0,2 N NaOH wurde mit 20 µl der Proteinlösung in 10 x 60 mm-Glasgefäßen gemischt und 20 min bei Raumtemperatur belassen. Dann erfolgte die Zugabe von 200 µl 0,18 N Folin-Ciocalteu-Reagenz mit kräftigem Vermischen. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei Zimmertemperatur erfolgte die Messung bei 578 nm am Spektrophotometer (Ultrospec III, Pharmacia).

2.8. Messung der Enzymaktivität von APN und DPIV/CD26

Die Enzymaktivitätsmessung von APN wurde mit 2,5 mmol Alanin-*p*-Nitroanilid-Substratlösung (Ala-*p*NA, SIGMA) und die von DPIV/CD26 mit 2,5 mmol Gly-Pro-*p*NA-Substratlösung (SIGMA) durchgeführt. Die dreimal mit PBS gewaschenen vitalen Zellen bzw. die Membranfraktionen wurden bei 37 °C zwischen 30 und 120 min in 67 mM Na₂HPO₄-Puffer (pH 7,2) mit dem Substrat inkubiert. Ein 0-min-Wert wurde genauso mitgeführt wie ein Substrat-Leerwert über die gesamte Reaktionszeit. Abstoppen der enzymatischen Reaktion erfolgte durch Pipettieren von 100 µl Reaktionsgemisch in 400 µl 1 M Natriumacetatpuffer (pH 4,4). Nach kurzer Zentrifugation (10 000 x g) wurde der Betrag an gebildetem *p*-Nitroanilin im Überstand durch Ermitteln des OD-Wertes bei 390 nm am Spektrophotometer (Ultrospec III, Pharmacia) ermittelt ($\epsilon = 11,5 \times 10^6$ cm²/mol für *p*-Nitroanilin). Durch Subtraktion des 0-Minutenwertes vom Extinktionswert

nach 30-120 min erhielt man die Extinktionsdifferenz von der außerdem der entsprechende Wert der Extinktionsdifferenz des Substratleerwertes abgezogen wurde. Reaktionsgefäße für Suspensionszellen waren Eppendorf-Röhrchen (Inkubation im Wasserbad). Adhärente Zellen wurden nach gründlichem Waschen direkt in 48-well-Platten im CO₂-Brutschrank mit 200 µl Substratpuffer inkubiert. Die Zellzahl wurde durch Ablösen der Zellen durch EDTA/Trypsin nach der Inkubation bestimmt. Enzymaktivitäten wurden als pkat/ml bzw. pkat/10⁶ Zellen berechnet.

Zur Spezifizierung der Ala-pNA-Spaltung verwendeten wir eine 30-minütige Vorinkubation der Zellen mit Inhibitoren wie Actinonin und Probestin (10⁻⁴ bis 10⁻⁸ M).

2.9. RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und PCR

Sämtliche Arbeiten der RNA-Isolierung, des Primerdesigns und der RT-PCR wurden von Frau Dr. Astrid Kehlen durchgeführt. Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987). Nach einer 10-minütigen Phase bei Raumtemperatur wurde die cDNA bei 42 °C über 50 min mit 500 pg Gesamt-RNA in Anwesenheit einer Verdünnungsreihe der internen kompetitiven Standard-RNA in 13 µl Diethylpyrocarbonatwasser, 4 µl 5-fachem Reverse-Transkriptions-Puffer (250 mM Tris/HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1 µl dNTP-Gemisch (10 mM an dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl (50 pmol) Random-Primer (Boehringer Mannheim) und 1 µl (200 U/µl) Superscript Plus (Life Technologies, Karlsruhe) synthetisiert.

Die genauen Bedingungen der Standardkonstruktion für APN und DPIV/CD26 sind unter 'Riemann et al., 1995' nachzulesen. Die Primer für die Neprilysin/CD10-Standardsynthese und nachfolgende RT-PCR hatten folgenden Aufbau:

- 1 CTG ATA TCA ACA CTC CAA AGC CAG CAA GTC ATC AGA CTG CA
- 2 GAT TTA GGT GAC ACT ATA GAA TAC CTG ATA TCA ACA CTC CAA
AGC CA
- 3 GCC AAG TCG AGG TTG GTG AA
- 4 CTG ATA TCA ACA CTC CAA AGC CA

Um eine verkürzte, homologe Standard-RNA zu erhalten, wurde in einer PCR mit dem zusammengesetzten Primer 1 (enthält Sequenz des 5'-Primers und eine interne spezifische CD10-Sequenz) und dem 3'-Primer 3 mit Hilfe eines CD10-Amplifikates

(erhalten mit den Primern 4 und 3) als Template eine Deletion erzeugt. Das so erhaltene verkürzte CD10-Amplifikat wurde nach Reinigung (Gel-Extraktions-Kit; Qiagen, Hilden) als Template in einer zweiten PCR mit den Primern 2 (zusammengesetzter Primer aus der Sequenz für den SP6-RNA-Polymerase-Promotor und der Sequenz für den CD10-Primer 4) und 3 eingesetzt. Nach erfolgter Reinigung (Gel-Extraktions-Kit) wurde das Produkt in einer in-vitro-Transkriptionsreaktion mittels SP6-RNA-Polymerase (Roche) in die CD10-Standard-RNA umgeschrieben. Die Konzentration der Standard-RNA wurde durch OD-Messung bei 260 nm ermittelt.

10 %-Anteile der so synthetisierten cDNA wurde in 50 µl folgender Lösung aufgenommen: 50 mM Tris-HCl (pH 9,0), 1,5 mM MgCl₂, 0,1 % Triton X-100, 0,1 mM von jedem dNTP, 1 U Taq Polymerase (AGS Heidelberg oder Qiagen, Hilden) und 25 pmol vom jeweils entsprechenden Sense-Primer bzw. Antisense-Primer. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermoblock (Biometra Göttingen) für 30 Zyklen: 60 s bei je 94 °C, 60 °C und 72 °C durchgeführt. 10 µl jedes Reaktionsproduktes wurde auf einem 1,5 % Agarosegel (mit 0,1 % Ethidiumbromid) in Tris-Acetat/EDTA-Elektrophoresepuffer aufgetrennt. Die relativen Intensitäten der Banden von Target- und Standard-PCR-Produkten, sichtbar gemacht mit UV-Licht, wurden mit Hilfe der Scan Pack 2,0-Software (Biometra Göttingen) densitometrisch ausgewertet.

2.10. Statistische Verfahren

Die Daten sind, falls nicht anders angegeben, als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Beim Vergleich des Phänotyps von Zellen aus dem Blut eines Patienten mit solchen aus verschiedenen Geweben (%-Werte, abhängige Werte) verwendeten wir den Wilcoxon-Test. Für den Vergleich unabhängiger Stichproben (%-Werte), nutzten wir den Mann-Whitney-*U*-Test (zwei Fallgruppen) bzw. den Kruskal-Wallis-*H*-Test (zwei oder mehr Fallgruppen). Alle Tests wurden, wie auch die bivariate Korrelation, mit Hilfe der Software SPSS Version 10 durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1. APN - ein lymphozytärer Marker

3.1.1. Synoviale Lymphozyten tragen APN

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die zelluläre Zusammensetzung der Synovia der verschiedenen Patientengruppen. Deutlich erkennbar sind die hohen Schwankungen der Werte in allen Gruppen. Lymphozyten machten in allen Gruppen im Durchschnitt ca. 15-20 % der Leukozyten aus, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben.

Tabelle 4: Zellzahl (in Gpt/l) und leukozytäre Zusammensetzung (in % der Leukozyten) der Synovialflüssigkeiten in den Gruppen RA, JCA und TA.

		ZELLZAHL	LYMPHO- ZYTEN	MONO- ZYTEN	GRANULO- ZYTEN
RA n = 35	Spanne	0,4 – 38	1 – 51	2 – 74	4 – 93
	MW ± SD	13,4 ± 10,3	14 ± 10	17 ± 18	71 ± 19
JCA n = 53	Spanne	0,3 – 93,6	1 – 92	1 – 76	0 – 98
	MW ± SD	17,6 ± 15,1	20 ± 19	12 ± 12	66 ± 25
TA n = 19	Spanne	0,2 – 34,3	1 – 70	1 – 70	3 – 96
	MW ± SD	9,5 ± 11	21 ± 23	24 ± 22	50 ± 33

Tabelle 5 gibt einen Überblick über Helferzellen und zytotoxische Zellen der Synovia in den 3 Gruppen. Tendenziell hatten Patienten mit JCA die höchsten Helferzellanteile, auch wenn das nicht statistisch signifikant war.

Tabelle 5: Anteil an Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen (in % der T-Zellen) in der Synovia der 3 Patientengruppen.

		CD4+- ZELLEN	CD8+- ZELLEN	RATIO CD4/CD8
RA	MW ± SD	32 ± 13	43 ± 14	1,1 ± 1,2
JCA	MW ± SD	42 ± 14	33 ± 12	1,5 ± 0,8
TA	MW ± SD	36 ± 19	29 ± 11	1,7 ± 2,0

Im Vergleich der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle auf T-Zellen zwischen peripherem Blut und Synovialflüssigkeit (Mischgruppe von Patienten mit RA und JCA) ergaben sich einige charakteristische Unterschiede (Abb. 5): Deutlich mehr synoviale T-Zellen trugen HLA-DR als MHC Klasse-II-Molekül, CD45RO als Marker für stattgefundenen Antigenkontakt und APN. Für CD25 fanden wir keinen signifikanten Unterschied zwischen Blut und Synovia. DPIV/CD26 wird dagegen auf einem signifikant höheren Anteil an T-Zellen des peripheren Blutes exprimiert.

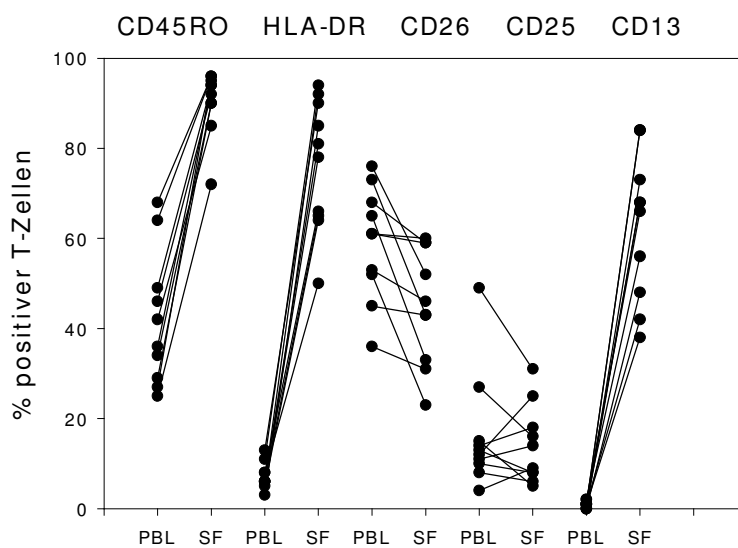


Abb. 5: Vergleich der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf T-Zellen des peripheren Blutes (PBL) und der Synovia (SF) von Patienten mit JCA und RA (jeweils zusammengehörige Werte verbunden).

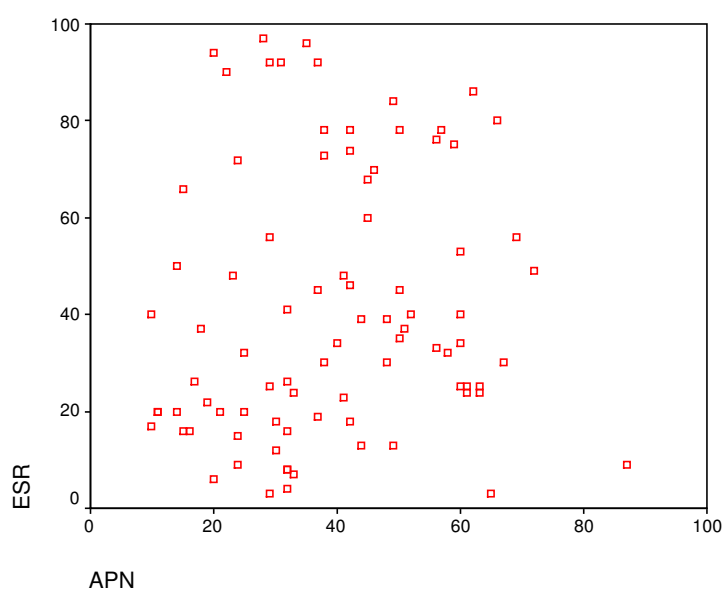
Helfer- und zytotoxische T-Zellen tragen gleichermaßen APN (Daten nicht gezeigt). Auch Lymphozyten, die wir nach Isolierung aus Pannusgewebe charakterisierten, trugen APN. Im Pannusgewebe beobachteten wir erstmalig APN-positive B-Zellen.

Beim Vergleich verschiedener Patienten gab es zwischen den Gruppen RA, JCA und TA hinsichtlich APN-tragender T-Zellen keinen signifikanten Unterschied (Tabelle 6). Dies kann zum einen der zu groben Einteilung geschuldet sein (z.B. JCA als heterogene Gruppe). Andererseits braucht die APN-Expression kein statischer Marker zu sein und kann - von einer Reihe von Faktoren beeinflusst - mit hoher Amplitude schwanken. T-Zellen in den Gruppen RA und JCA zeigten prozentual geringere Werte an DPIV/CD26

als solche in der TA-Gruppe. Eine Korrelation der Einstundenwerte der Blutsenkungsreaktion (ESR) als systemischer Entzündungsmarker mit der APN-Expression synovialer T-Zellen (Abb. 6) erbrachte ebenso wie eine Korrelation der Anzahl synovialer Leukozyten mit der APN-Expression synovialer T-Zellen keinen signifikanten Zusammenhang.

Tabelle 6: Vergleich der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf T-Zellen in den Gruppen RA, JCA und TA. Die Angaben sind % der T-Zellen.

	ANZAHL	CD13	CD26	HLA-DR	CD25
RA	35	37 ± 15	49 ± 12	67 ± 15	18 ± 11
JCA	53	42 ± 17	47 ± 16	58 ± 18	11 ± 7
TA	19	32 ± 21	65 ± 20	59 ± 18	15 ± 14



Korrelation nach Pearson: 0,111
Signifikanz: 0,309

Abb. 6: Bivariate Korrelation der APN-Expression auf synovialen T-Zellen (in % der T-Zellen) mit den ESR-Werten von Patienten mit JCA und RA.

3.1.2. APN auf T-Zellen der Perikardflüssigkeit

Wir erhielten in den Jahren 1992-1994 Perikardflüssigkeit von 127 Patienten, die sich einer offenen Herzoperation unterzogen. Die Patienten ließen sich in 3 Gruppen teilen: 45

Patienten (24 Männer, 21 Frauen; Altersmittelwert 54 Jahre; ESR: 33,5 mm/h) mit einer Herzklappenoperation (oft Entzündungen in der Anamnese), 27 Patienten (Männer/Frauen: 13/14; Altersmittelwert 8,8 Jahre; mittlerer ESR 12,8 mm/h) mit angeborenem Herzfehler und 55 Patienten mit chronisch-ischämischer Herzkrankheit (Männer/Frauen: 41/14; Altersmittelwert 58,8 Jahre; mittlerer ESR 24,3 mm/h).

Wir fanden in der Perikardflüssigkeit 0,3 - 17 Gpt/l Leukozyten, mit ca. einer reichlichen Hälfte Monozyten/Makrophagen und einem reichlichen Drittel Lymphozyten, wobei es keine signifikanten Unterschiede in der Zellzusammensetzung zwischen den Gruppen gab. Granulozyten machten meist einen nur geringen Anteil der Leukozyten aus (Tabelle 7).

Tabelle 7: Zellzahl (in Gpt/l) und leukozytäre Zusammensetzung (in % der Leukozyten) der Perikardflüssigkeiten in den Gruppen Herzklappenerkrankung (Gruppe 1), angeborene Herzfehler (Gruppe 2) und chronisch-ischämische Herzerkrankung (Gruppe 3) (MW = Mittelwert).

		ZELLZAHL	LYMPHO-ZYTEN	MONO-ZYTEN	GRANULO-ZYTEN
Gruppe 1 n = 45	Spanne MW	0,7 – 17,5 2,75	9 – 74 33	19 – 87 59	1 – 38 6
Gruppe 2 n = 27	Spanne MW	0,3 – 3,4 1,4	8 – 61 36	25 – 63 48	2 – 27 11
Gruppe 3 n = 55	Spanne MW	0,3 – 9,3 2,4	10 – 79 38	13 – 82 49	0 – 30 8

Beim Vergleich des Phänotyps der T-Zellen aus der Perikardflüssigkeit mit dem von Zellen aus parallel entnommenem peripherem Blut ergaben sich folgende Auffälligkeiten (Abb. 7): In der Perikardflüssigkeit gab es signifikant mehr CD45RO und HLA-DR-positive T-Zellen als im peripheren Blut. DPiV/CD26 wurde in der Perikardflüssigkeit - anders als in Synovia - auf signifikant mehr T-Zellen exprimiert als im peripheren Blut. Keinen Unterschied zwischen Perikardflüssigkeit und Blut ermittelten wir für CD25-positive Zellen. APN wurde in den meisten Fällen auf T-Zellen aus Perikardflüssigkeit exprimiert, wenn auch auf einem geringeren Prozentsatz an Zellen als in Synovialflüssigkeit.

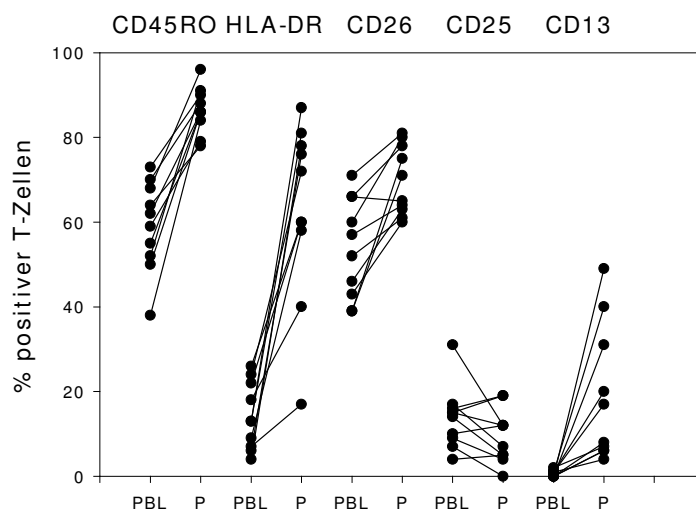


Abb. 7: Vergleich bestimmter Oberflächenproteine auf T-Zellen im Blut (PBL) und der Perikardflüssigkeit (P) von erwachsenen Patienten mit offener Herzoperation (zusammengehörige Werte verbunden).

Beim Vergleich des T-Zellphänotyps der drei Gruppen untereinander beobachteten wir in der Gruppe der Patienten mit Herzklappenerkrankungen einen signifikant höheren Anteil APN-tragender T-Zellen (Abb. 8). Dieser Unterschied war der einzige signifikante zwischen den erwachsenen Patienten der Gruppe 1 und 3. T-Zellen aus der Patientengruppe der angeborenen Herzerkrankungen (Kinder und Jugendliche) hatten die höchsten Anteile an CD11b und CD69 und die geringsten Anteile an CD25 (letzteres nur signifikant zwischen Gruppe 1 und 2). Auch das an CD11a und CD11b bindende Adhäsionsmolekül ICAM-1/CD54 fand sich häufiger in der Gruppe 2 (signifikant nur zwischen Gruppe 2 und 3). Diese Ergebnisse entstanden unter Mitwirkung der Promovenden Silke Mittenzwei und Jörg Menschikowski und wurden publiziert (Riemann D et al., 1994).

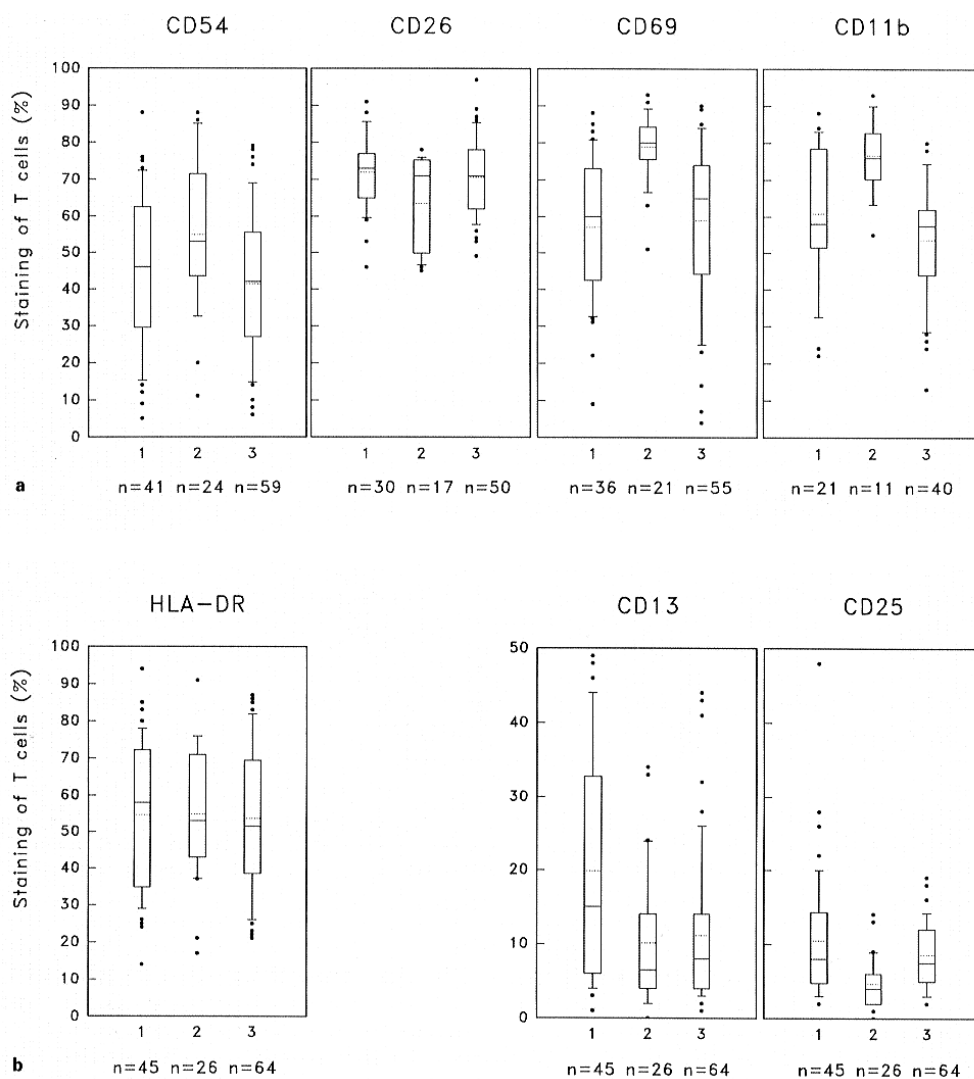


Abb. 8: Vergleich des T-Zellphänotyps in den Gruppen Herzklappenerkrankung (Gruppe 1), angeborene Herzfehler (Gruppe 2) und chronisch-ischämische Herzerkrankung (Gruppe 3). Dargestellt sind Box-Plots mit dem Mittelwert (gepunktete Linie) und dem Median (glatte Linie). Die Box umschließt die 25. bis 75. Percentile. Die 5. und 95. Percentilen sind als Fehlerbalken wiedergegeben.

3.1.3. Phänotyp von T-Zellen aus Bronchiallavage-Flüssigkeit

Erkrankungen der Lunge gehen nahezu immer mit einer Alveolitis, charakterisiert durch die Anwesenheit von Entzündungszellen im Bereich der Alveolarwand, einher. Wir untersuchten den T-Zellphänotyp in zellreicher BALF ($>5 \times 10^6$ Zellen/100 ml) von Patienten mit Sarkoidose. Der Lymphozytenanteil schwankte zwischen 9 - 82 % der Leukozyten. T-Zellen machten den überwiegenden Teil der Lymphozyten aus, der B-Zellanteil lag meist unter 2 % der Gesamtlmphozyten. Natürliche Killer (NK)-Zellen waren 0 - 9 % der Lymphozyten ($0,8 \pm 0,7$ %). Wie in Tabelle 8 dargestellt, machen

APN-positive T-Zellen nur einen geringen Anteil der BALF-Lymphozyten von Sarkoidosepatienten aus, während ein hoher Prozentsatz der T-Zellen positiv für HLA-DR und DPIV/CD26 war. Auch in anderen Patientengruppen beobachteten wir eher geringe Anteile APN-positiver T-Zellen in der BALF (selten über 20 % der T-Zellen, nicht dargestellt).

Tabelle 8: Lymphozytäre Zusammensetzung der BALF von 14 Patienten mit Sarkoidose. T-Zellen, CD4- und CD8-positive Zellen sind als % der Lymphozyten, die anderen Oberflächenmoleküle als % der T-Zellen angegeben.

T-ZELLEN	CD4	CD8	HLA-DR	APN	DPIV/CD26	CD25
96 ± 2	67 ± 18	20 ± 15	56 ± 17	11 ± 5	78 ± 15	7 ± 4

3.1.4. Vergleich des Phänotyps von T-Zellen aus verschiedenen Lokalisationen außerhalb des peripheren Blutes

Vergleicht man die APN-Expression auf T-Zellen außerhalb des peripheren Blutes von Patienten mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen fällt einem die besonders hohe Expression in der Synovialflüssigkeit auf und die geringe Expression in der BALF (Abb. 9).

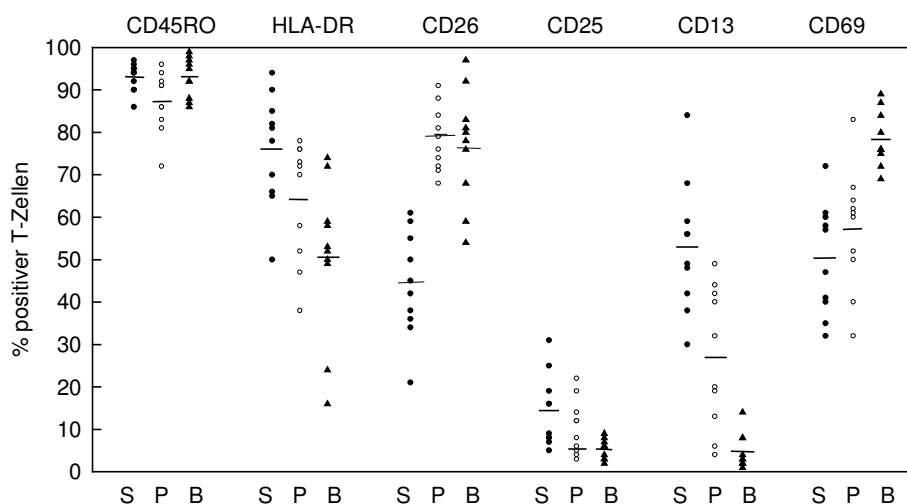


Abb. 9: Vergleich des Phänotyps von T-Zellen aus Synovia (S) von Patienten mit rheumatischen Gelenkerkrankungen, aus Perikardflüssigkeit (P) von Patienten mit Herzklappenerkrankungen und aus BALF (B) von Patienten mit entzündlichen und fibrotischen Lungenerkrankungen. Die % positiven Zellen beziehen sich auf die Gesamtzahl an CD3-positiven T-Zellen (Doppelfärbung).

Eine ähnliche Verteilung (in einem höheren Bereich) zeigt die Expression von HLA-DR-Molekülen auf T-Zellen. Während CD45RO auf den T-Zellen außerhalb des peripheren Blutes in den 3 Gruppen in ähnlich hoher Expression vorkommt, ist der Prozentsatz DPIV/CD26-positiver T-Zellen am geringsten in der Synovialflüssigkeit und der CD69-positiver T-Zellen am höchsten in der BALF.

3.1.5. APN auf tumorinfiltrierenden T-Zellen

Mittels Zweifarbenimmunfluoreszenz und Durchflusszytometrie wurden auch tumorinfiltrierende T-Zellen, die vorwiegend aus Nieren- und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen präpariert wurden, auf ihre Expression an APN untersucht. Die Daten bearbeitete Frau Katrin Eiselt im Rahmen ihrer Promotionsarbeit. Hinsichtlich der lymphozytären Zusammensetzung gab es zwischen den TIL aus Nierentumoren (überwiegend hellzellig) und aus Bronchialkarzinomen (eingeteilt in Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome) die in Tabelle 9 gezeigten signifikanten Unterschiede. Der B-Zellanteil war signifikant höher in den Lungentumoren, dagegen hatten Nierentumoren einen höheren Anteil an NK-Zellen. Der Anteil zytotoxischer T-Zellen überwog leicht in den Nierentumoren.

Tabelle 9: Zelluläre Zusammensetzung der TIL isoliert aus Plattenepithelkarzinomen der Lunge (Gruppe 1, n = 79), Lungen-Adenokarzinomen (Gruppe 2, n = 32) und hellzelligen Nierenkarzinomen (Gruppe 3, n = 78). Die Angabe der Werte erfolgt als % an Lymphozyten.

	T-ZELLEN	B-ZELLEN	NK-ZELLEN	CD4+-T-ZELLEN	CD8+-T-ZELLEN
Gruppe 1	74 ± 15	18 ± 15	8 ± 7	32 ± 12	31 ± 12
Gruppe 2	75 ± 14	16 ± 14	9 ± 8	34 ± 12	30 ± 14
Gruppe 3	77 ± 13	5 ± 5	17 ± 12	28 ± 13	38 ± 16

Chromophile und gemischte Nierentumoren hatten eine ähnliche TIL-Zusammensetzung wie die hellzelligen Nierentumoren (Daten nicht gezeigt). Dagegen zeigte sich in 2 chromophoben Nierentumoren ein deutlich höherer B-Zellanteil (18 ± 3 % der Gesamtlymphozyten) sowie ein höherer Anteil an Helferzellen (47 ± 3 % der Lymphozyten). In 4 kleinzelligen Lungentumoren beobachteten wir einen deutlich höheren B-Zellanteil (31 ± 18 % der TIL), während 5 großzellige Bronchialkarzinome einen besonders geringen B-Zellanteil hatten (7 ± 4 % der TIL). Adenosquamöse

Karzinome unterschieden sich in ihrer lymphozytären Zusammensetzung nicht von Plattenepithelkarzinomen und Adenokarzinomen (Daten nicht gezeigt).

Die tumorinfiltrierenden T-Zellen im Nierentumorgewebe zeigten gegenüber den T-Zellen aus peripherem Blut einige signifikante Unterschiede (Abb. 10). TIL hatten deutlich höhere Anteile APN-, HLA-DR- und CD45RO-positiver T-Zellen, gepaart mit geringeren Prozentzahlen CD25-positiver T-Zellen. Beim Vergleich des Anteils DPIV/CD26-positiver T-Zellen in Tumoren mit parallelen Werten aus peripherem Blut fiel ebenfalls eine leichte Verringerung in den TIL auf.

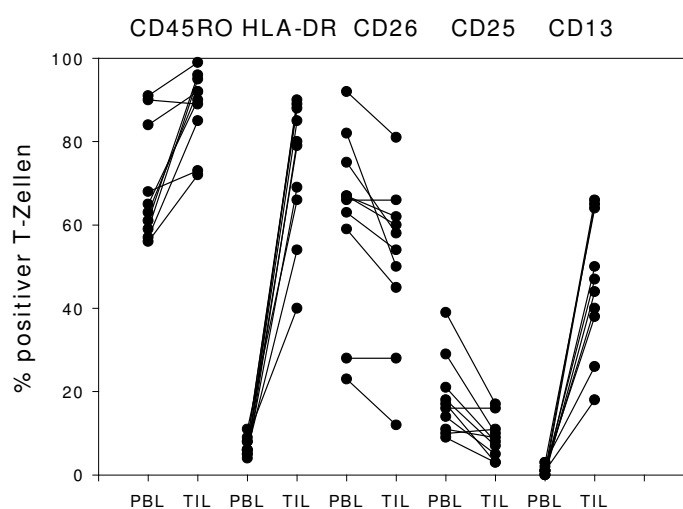


Abb. 10: Vergleich der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf T-Zellen des peripheren Blutes (PBL) und TIL aus Nierentumoren (zusammengehörige Werte verbunden).

Signifikant mehr T-Zellen aus Nierentumoren waren im Vergleich zu solchen aus Bronchialkarzinomen positiv für APN, DPIV/CD26 und HLA-DR als MHC Klasse-II-Molekül (Tab. 10). Lungentumoren hatten dagegen mehr CD25+, CD69+- und ICAM-1/CD54+-T-Zellen. Zwischen den beiden Lungentumorgruppen der Tabelle gab es keine signifikanten Unterschiede, auch wenn für das Integrin CD11b die geringsten Anteile positiver T-Zellen in der Plattenepithelkarzinomgruppe waren (signifikanter Unterschied nur zu Nierentumoren). In zwei chromophoben Nierentumoren fanden wir deutlich geringere Anteile APN-positiver ($9 \pm 11\%$), HLA-DR-positiver ($19 \pm 8\%$) und CD11b-positiver ($7 \pm 8\%$) T-Zellen. Die chromophilen Nierentumoren ($n = 12$) hatten einen höheren Anteil an HLA-DR-positiven ($75 \pm 16\%$) und CD11b-positiven ($44 \pm 22\%$) T-

Zellen, und eher weniger APN-exprimierende T-Lymphozyten (34 ± 23). Bei den Bronchialkarzinomen hatten die 4 kleinzelligen Tumoren die geringsten Anteile APN-positiver T-Zellen ($10 \pm 4 \%$), während die 5 großzelligen Lungentumoren mit $22 \pm 20 \%$ APN-positiven und $62 \pm 16 \%$ HLA-DR-positiven die höchsten Anteile hatten. Diese Unterschiede müssen mit höheren Zahlen verifiziert werden.

Tabelle 10: Expression Aktivierungs-assoziiertes T-Zelloberflächenmoleküle (angegeben in % der T-Zellen) auf TIL aus Plattenepithelkarzinomen der Lunge (Gruppe 1), Adenokarzinomen der Lunge (Gruppe 2) und hellzelligen Nierentumoren (Gruppe 3).

	CD13	HLA-DR	CD11B	CD25	CD69	CD54	CD26
Gruppe 1	15 ± 10	53 ± 16	17 ± 9	22 ± 8	87 ± 8	23 ± 12	40 ± 10
Gruppe 2	14 ± 6	49 ± 16	22 ± 11	19 ± 9	88 ± 10	27 ± 15	45 ± 15
Gruppe 3	42 ± 22	67 ± 18	32 ± 17	8 ± 4	64 ± 16	14 ± 10	62 ± 13

Beim Vergleich der TIL aus Lungentumoren mit Lungenmetastasen von verschiedenen Primärtumoren beobachteten wir keine signifikanten Unterschiede im T-Zellphänotyp für APN, HLA-DR, CD25 und CD11b. Bei der separaten Aufschlüsselung der Lungenmetastasen unterschiedlicher Primärlokalisation war der hohe Anteil APN-positiver T-Zellen in Nierentumormetastasen offensichtlich (Tabelle 11). Metastasen aus Nierentumoren zeigten einen höheren Anteil von NK-Zellen, Befunde, die mit höheren Fallzahlen verifiziert werden müssen.

Tabelle 11: Ergebnisse der Phänotypisierung von TIL in Lungenmetastasen mit unterschiedlicher Primärlokalisation

PRIMÄR-TUMOR	B-ZELLEN (% LYMPHO.)	T-ZELLEN (% LYMPHO.)	NK-ZELLEN (% LYMPHO.)	CD13 (% T-ZELLEN)
Mamma n = 6	11 ± 10	81 ± 9	8 ± 3	21 ± 15
Niere n = 4	9 ± 5	77 ± 9	14 ± 9	65 ± 40
Malignes Melanom n = 4	14 ± 14	81 ± 14	4 ± 1	11 ± 10
Magen-Darm-Trakt n = 2	13 ± 6	78 ± 11	10 ± 5	12 ± 8

Abb. 11 zeigt den Phänotyp von TIL aus einem Lungentumor, die über eine Woche mit 500 U/ml IL-2 kultiviert wurden und deshalb auch CD25 (IL-2-Rezeptor, α -Kette) in hohem Prozentsatz exprimieren. Deutlich sichtbar ist die Expression von APN/CD13 auf T-Zellen (Doppelfärbung mit CD3), während die in der Kultur anwesenden B- oder NK-Zellen APN-negativ sind.

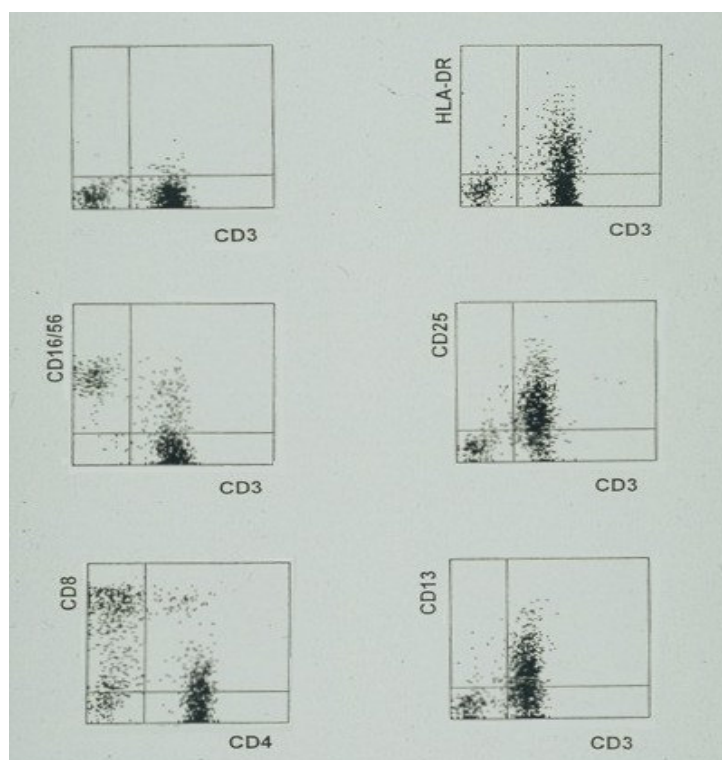


Abb. 11: Phänotypisierung mittels Doppelmarkerfluoreszenz und Durchflusszytometrie von für eine Woche mit hoher IL-2-Konzentration kultivierten Lymphozyten aus einem Lungentumor.

3.2. Arbeiten zur Regulation von APN und anderen Membranpeptidasen

3.2.1. Regulation von APN in Nierentubulusepithel- und Nierentumorzellen

Eine Reihe verschiedener Zytokine wurde von uns auf ihre Wirkung auf die Expression verschiedener Membranpeptidasen in kultivierten Nierentumor- und Nierentubulusepithelzellen untersucht. Wir beobachteten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Zellarten, deshalb wurde nachfolgend bei den Regulationsversuchen nicht zwischen beiden Zellarten unterschieden. Wie in Tabelle 12 verdeutlicht, fanden wir ähnlich den Literaturbefunden zu Gefäßendothelzellen und Monozyten, eine Heraufregulation von APN durch IL-4 sowie IL-13. Der Zeitverlauf der APN-Erhöhung entsprach den bei Monozyten beschriebenen 2-3 Tagen. Auch

DPIV/CD26 ließ sich durch IL-4 hochregulieren, nicht jedoch Glutamylaminopeptidase (nicht gezeigt), die in deutlich geringerer Intensität exprimiert wurde.

Tabelle 12: Regulation der Proteinexpression und der Enzymaktivität von APN und DPIV/CD26. Nierentumorzellen wurden für 3 Tage (5 Tage bei IFN- γ) mit verschiedenen Mediatoren inkubiert. Die Kontrollwerte (ohne Mediator) wurden 100 % gesetzt. Die Daten repräsentieren Mittelwert \pm SD aus mindestens 6 Experimenten (MFI = Mittlere Fluoreszenzintensität). *signifikant mit $p < 0,05$

Mediator	APN		DPIV/CD26	
	(% der MFI)	(% der Ala-pNA Spaltung)	(% der MFI)	(% der Ala-pNA Spaltung)
-	100	100	100	100
IL-4	229 \pm 52*	159 \pm 32*	145 \pm 27*	116 \pm 13*
IL-13	149 \pm 36*	116 \pm 12*	135 \pm 24*	115 \pm 14*
IFN-γ	136 \pm 14*	99 \pm 14	126 \pm 19*	99 \pm 15
IL-1β	119 \pm 29	108 \pm 17	113 \pm 18	99 \pm 16
TNF-α	114 \pm 18	107 \pm 7	89 \pm 10*	97 \pm 11
TGF-β1	95 \pm 14	97 \pm 11	68 \pm 12*	84 \pm 11
IL-6	104 \pm 8	100 \pm 6	98 \pm 11	101 \pm 9
IL-7	104 \pm 16	105 \pm 13	97 \pm 17	100 \pm 12
IL-10	97 \pm 8	105 \pm 4	95 \pm 8	105 \pm 6
GM-CSF	96 \pm 10	101 \pm 12	95 \pm 11	106 \pm 8
PMA	139 \pm 18*	143 \pm 24*	97 \pm 6	110 \pm 13

Die Ala-pNA-spaltende Aktivität der kultivierten Nierentumorzellen variierte zwischen 132 und 955 pkat/10⁶ Zellen (Mittelwert: 474 pkat/10⁶ Zellen). Die Gly-Pro-pNA-spaltende Aktivität war deutlich höher und betrug 156-2163 pkat/10⁶ Zellen (Mittelwert: 847 pkat/10⁶ Zellen). Tubulusepithelzellen zeigten unter unseren Kulturbedingungen eine Ala-pNA-Spaltung von 165-506 pkat/10⁶ Zellen und Gly-Pro-pNA-Spaltung von 175-468 pkat/10⁶ Zellen. Mit IL-4 konnte sowohl die Intensität der APN-Expression erhöht werden (Mean-Wert als Maß für die mittlere Fluoreszenzintensität) als auch die enzymatische Aktivität adhärenter vitaler Zellen. Die Spezifität der Ala-pNA-Spaltung wurde durch Inhibitoren wie Actinonin überprüft. Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR konnten die Proteinergebnisse auf mRNA-Ebene durch Astrid Kehlen bestätigt werden (Riemann et al., 1995).

Unterschiede in der Proteinexpression gab es zwischen APN und DPIV/CD26 bei der Kombination von IL-4 mit anderen Zytokinen, wie z. B. IL-1 und TNF- α . Beide genannten Zytokine konnten die APN-Heraufregulation durch IL-4 weiter steigern, obwohl sie allein nur eine geringe, nicht signifikante Steigerung verursachten (Abb. 12).

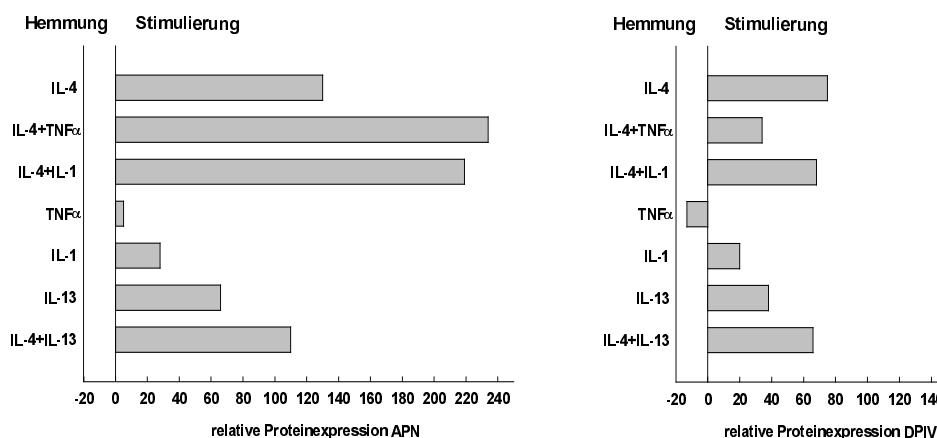


Abb. 12: Wirkung von Zytokinkombinationen auf die Expression von APN und DPIV/CD26 in Nierentubulusepithelzellen. Die mittlere Fluoreszenzintensität nach durchflusszytometrischer Messung ist als % der Kontrolle (ohne Mediator = 0) dargestellt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert dreier Versuche.

Für DPIV/CD26 gab es keinen additiven Effekt für IL-1 und IL-4 und eine Hemmung der IL-4-Heraufregulation durch TNF- α . TNF- α allein verringerte signifikant die DPIV/CD26-Expression. Eine Kombination von IL-13 mit IL-4 gab keine Steigerung, sondern eher eine Hemmung im Vergleich zum alleinigen IL-4-Effekt, was auf eine Konkurrenz beider Zytokine um den gleichen Rezeptor hinweisen könnte. Keinen signifikanten Einfluss auf die APN-Expression hatte die alleinige Gabe von GM-CSF, IL-10, IL-7, IL-6, TGF- β 1, TNF- α und IL-1 β (Tabelle 12). Mit IFN- γ konnte eine gesteigerte Proteinexpression, nicht jedoch Enzymaktivität, beobachtet werden. Der IFN- γ -Effekt erreichte seinen Maximalwert erst nach 3-5 Tagen. DPIV/CD26 wurde - anders als APN - durch TGF- β signifikant gehemmt. Eine Hemmung durch TGF- β und TNF- α beobachteten wir außer bei DPIV/CD26 auch bei Glutamylaminopeptidase (TGF- β 1: 76 ± 13 % der Kontrolle; TNF- α : 64 ± 21 % der Kontrolle). Interessanterweise ließ sich die Expression von Glutamylaminopeptidase durch alleinige Gabe des Inhibitors Bestatin (hemmt APN, Arginylaminopeptidase und Leucylaminopeptidase) stimulieren (auf 139 ± 34 % der Ausgangsintensität, $n = 10$).

3.2.2. Regulation von APN auf Monozyten/Makrophagen

Monozyten/Makrophagen aus Perikardflüssigkeit und verschiedene monozytäre Zelllinien wurden von uns in Kurzzeitkulturen auf die Modulierbarkeit ihrer APN-Expression untersucht. Wie aus der Literatur bereits bekannt (van Hal PT et al., 1992), konnten wir mit IL-4 die Intensität der APN-Expression erhöhen (Abb. 13). Auch die HLA-DR-Expression erhöhte sich nach IL-4-Inkubation, während der LPS-Rezeptorbestandteil CD14 bei gleicher Behandlung herabreguliert wurde, wie ebenfalls bereits bekannt ist (Lauener RP et al., 1990). Erstmals beobachteten wir, dass sowohl TGF- β 1 als auch -2 die APN-Expression von Monozyten/Makrophagen heraufregulieren kann, während die Expression von HLA-DR gehemmt wird (Daten nicht gezeigt). Besonders deutlich war der Effekt mit der frühen monozytären Zelllinie U937 ($2,6 \pm 0,5$ facher Anstieg nach 2 Tagen TGF- β 1-Behandlung), aber auch die relativ reife Linie Mono-Mac-6 ließ sich mit TGF- β stimulieren. Das Maximum der Heraufregulation von APN-Protein durch TGF- β lag zwischen 24 und 48 Stunden. Der Effekt war konzentrationsabhängig mit einem Maximum bei 20 ng/ml TGF- β 1. IL-10 hemmte signifikant die monozytäre APN-Expression. Sämtliche Daten zur Proteinexpression konnten auf mRNA-Ebene bestätigt werden (Kehlen A et al., 2000A).

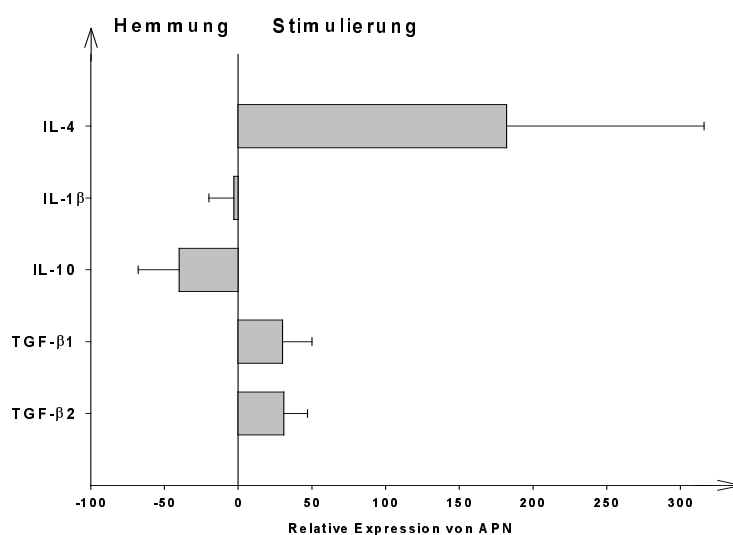


Abb. 13: Einfluss einer 3-tägigen Inkubation von Perikardmakrophagen mit verschiedenen Zytokinen auf deren APN-Expression. Die mittlere Fluoreszenzintensität, erhalten nach Inkubation der Zellen mit dem direkt markierten APN-spezifischen mAk-Klon Leu-M7, wurde als relative Veränderung zur Kontrolle angegeben (Kontrolle = 0; n = 3-5).

3.2.3. Regulation von Membranpeptidasen auf Fibroblasten-artig wachsenden Synoviozyten

SFC besitzen auf ihrer Oberfläche ein reiches Reservoir an Membranpeptidasen. Es finden sich sowohl APN, als auch DPIV/CD26 und Neprilysin/CD10. Die Zellen sind deshalb gut für vergleichende Regulationsversuche verschiedener Membranpeptidasen geeignet. Uns interessierte insbesondere Neprilysin/CD10, ein eng mit APN kolokalisiertes Enzym, für welches bisher keine Untersuchungen zur Zytokinmodulation auf SFC vorliegen. Im Vergleich zu den beiden anderen genannten Membranpeptidasen machte die Proteinexpression von Neprilysin/CD10 (mittlere Fluoreszenzintensität) ca. ein Viertel bis ein Zehntel aus. Eine Inkubation der Zellen mit IL-4 erhöht die Expression von Neprilysin/CD10 (Abb. 14). Ähnliche Ergebnisse beobachteten wir mit IFN- γ . 10^{-6} M Dexamethason wurde als Positivkontrolle verwendet, weil in verschiedenen Zellsystemen Glukokortikoide Neprilysin/CD10 heraufregulieren können (Shipp M et al., 1993). IL-13 induzierte in unseren Versuchen einen geringen Anstieg dieser Membranpeptidase, wie auch IFN- α oder IFN- β . TGF- β 1 und -2 hatten einen stark supprimierenden Effekt auf Neprilysin/CD10 und auch mit IL-1 β ließ sich die Enzymexpression hemmen. Der Proteinkinase C-Aktivator PMA zeigte keinen signifikanten Effekt.

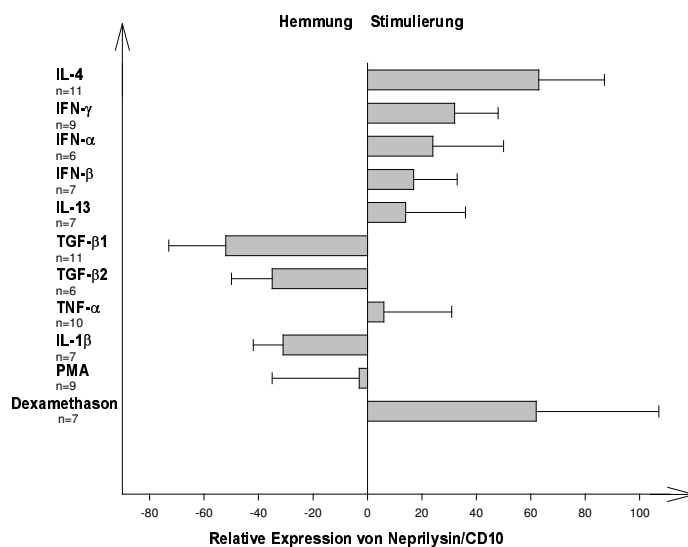


Abb. 14: Einfluss einer 3-tägigen Inkubation verschiedener Mediatoren auf die Neprilysin/CD10-Expression in SFC. Die mittlere Fluoreszenzintensität, erhalten nach Inkubation der Zellen mit einem CD10-mAk (Klon ALB2) und einem PE-markierten Sekundärantikörper und durchflusszytometrischer Messung, wurde als relative Veränderung zur Kontrolle angegeben (Kontrolle = 0 %; n = 3-5).

Mittels quantitativer RT-PCR konnten die Zytokineffekte durch Frau Dr. Astrid Kehlen auf mRNA-Ebene bestätigt werden, wobei der Effekt oft deutlicher ausgeprägt war als auf Proteinebene (Tabelle 13).

Tabelle 13: Modulation der Neprilysin/CD10-mRNA-Expression durch 24-stündige Zytokinbehandlung von kultivierten SFC. Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der quantitativen RT-PCR sind als % der Kontrollwerte angegeben (ohne Zytokin = 100 %; n = 3-7)

ZYTOKIN	IL-4	IFN- γ	IFN- α	IFN- β	TGF- β 1	TGF- β 2
Neprilysin mRNA	285 \pm 51	149 \pm 31	171 \pm 36	229 \pm 77	53 \pm 26	52 \pm 21

3.2.4. Zell-Zell-Kontakt als Ursache für eine lymphozytäre APN-Expression

3.2.4.1. Zell-Zell-Kontakt von Lymphozyten mit verschiedenen adhärenen Zellen

Reife Lymphozyten im peripheren Blut, Milz und Tonsillen waren in unseren Untersuchungen APN-negativ. Nach Permeabilisierung von PBL konnten allerdings geringe Prozentzahlen (unter 14 %) schwach APN-tragender T-Zellen gefunden werden (Riemann et al., 1993). Auch wies Astrid Kehlen in tonsillären Lymphozyten $3,5 \pm 3,3$ pg APN-mRNA/ μ g Gesamt-RNA nach (Spanne 0,2 – 10; n = 21). In mit hohen IL-2-Konzentrationen (bis 1000 U/ml) behandelten Langzeitkulturen von TIL oder in IL-2-kultivierten PBL mit hohem Anteil adhärenen Monozyten beobachteten wir sporadisch einen hohen Anteil APN-tragender T-Zellen (siehe Kap. 3.1.5.). Langzeitkultivierung der HUT-78-T-Zelllinie führte ebenfalls oft zu einer spontanen und ansteigenden APN-Expression. Mit Zytokinen wie IL-4 konnten wir in Kurzzeitkulturen (bis 5 Tage) humaner Lymphozyten bei völliger Depletion von Monozyten keine APN-Expression induzieren. Auch mit T- und B-Zell-Mitogenen sowie einer Stimulation mit CD3-Antikörpern bzw. einer Kombination aus CD3- und CD28-Antikörpern ließ sich in Lymphozytenkulturen nach 2-3 Tagen nur selten eine APN-Expression auf über 10 % der Zellen induzieren.

Um Langzeitkultivierung von B-Lymphozyten betreiben zu können, soll man diese u. a. unter Zugabe verschiedener Zytokine zusammen mit SFC kultivieren, ein Modellsystem, das die Situation im rheumatischen Pannusgewebe imitieren soll (Dechanet et al., 1995A). Als Quelle von B-Zellen werden oft Tonsillen verwendet, bei denen B-

Lymphozyten mindestens 50 % der Gesamtlymphozyten ausmachen. Wir beobachteten erstmalig, dass ein Teil der für Langzeitkultivierung mit SFC koinkubierten tonsillären B-Lymphozyten bereits nach einer reichlichen Stunde APN trägt, nachgewiesen mit Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie (Doppelfärbung CD19/CD13). Die B-Zellen verloren dieses Enzym während der Kokultur nicht mehr. Tonsilläre T-Lymphozyten zeigten unter ähnlichen Bedingungen der Kokultur mit SFC einen höheren Anteil APN-exprimierender Zellen (Abb. 15).

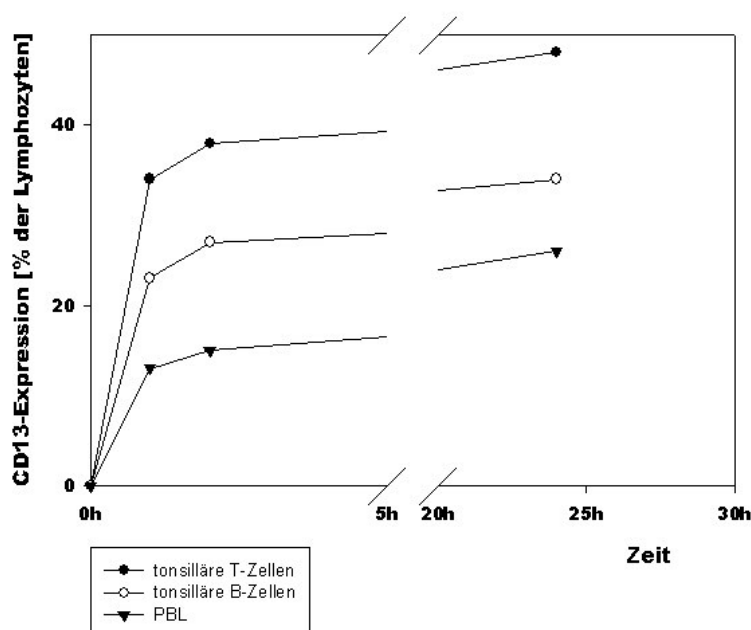


Abb. 15: Mittlerer Verlauf der APN-Induktion auf Lymphozyten nach direktem Zell-Zell-Kontakt mit SFC. Die Ergebnisse aus Doppelfärbung und Durchflusszytometrie sind dargestellt als % an Gesamtlymphozyten (PBL: Lymphozyten aus peripherem Blut).

Dagegen schwankte der Anteil APN-tragender peripherer Blutlymphozyten nach Kokultur mit SFC sehr stark und erreichte nur selten einen den tonsillären Lymphozyten entsprechenden Anteil APN-positiver Zellen. Dieses Ergebnis könnte dem geringeren Anteil an - mit Adhäsionsmolekülen reichlich versehenen - Memory-Zellen im peripheren Blut geschuldet sein (CD45RO auf tonsillären T-Zellen: 73 ± 11 %, $n = 49$). Oft fehlte jegliches Anheften der PBL an die SFC. Tonsilläre T-Zellen zeigen jedoch einen Phänotyp, der sich hinsichtlich vieler Moleküle signifikant von T-Zellen des peripheren Blutes unterscheidet, was Einfluss auf ihr Adhäsionsverhalten haben könnte. Genannt werden soll das starke Überwiegen CD4-positiver Zellen (78 ± 8 % der T-Zellen), der

hohe Anteil an HLA-DR ($40 \pm 14 \%$) und CD69 ($66 \pm 12 \%$) auf T-Zellen bei eher geringen Werten für CD25 ($8 \pm 3 \%$) und DPiV/CD26 ($30 \pm 12 \%$).

Auch mit leukämischen T-Zelllinien, wie HUT78 (HLA-DR+) und Jurkat (HLA-DR-negativ), beobachteten wir einen schnellen Anstieg der APN-Expression nach Kontakt mit SFC. Jurkat-Zellen, die nach Zell-Zell-Kontakt mit SFC in Anwesenheit des Mitogens PHA-L zu 75 % APN trugen, verloren diese Expression nach Separieren langsam innerhalb von 10 Tagen, mit 53 % APN-positiven Zellen am Tag 3 und 18 % positiven Zellen am Tag 6.

In der Kokultur bewegen sich die Lymphozyten mit kriechenden Bewegungen auf den adhärennten Zellen und schon nach 20 min kann man feste Zellkontakte sehen (Abb. 16).

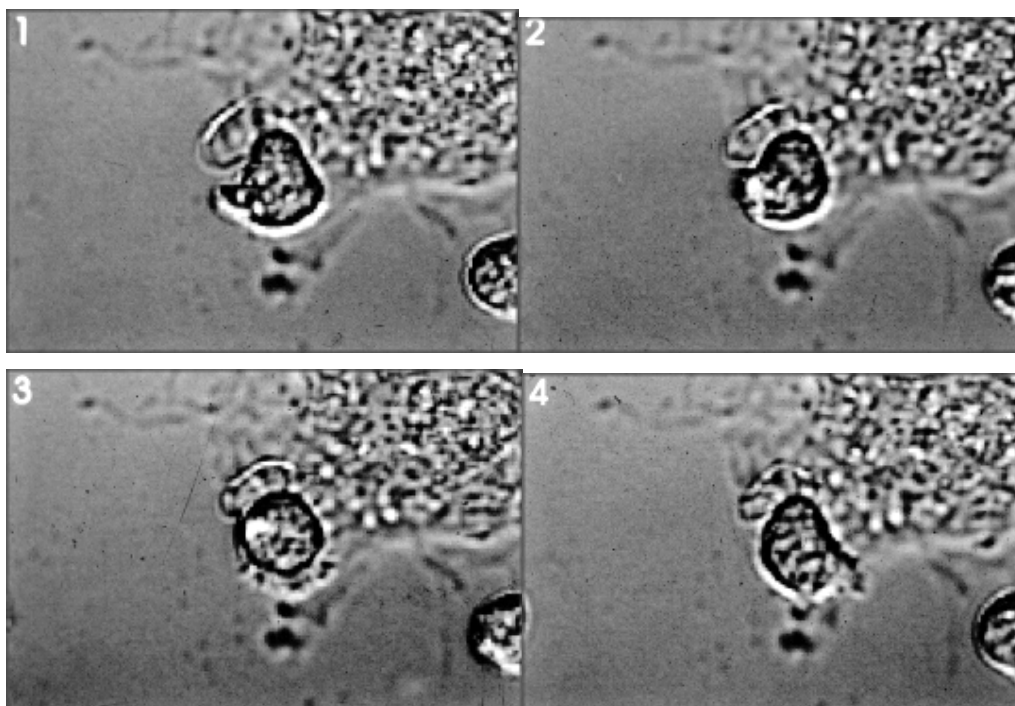


Abb. 16: Serie von Phasenkontrastaufnahmen (40-iger Objektiv, 4 s Abstand zwischen den Bildern), die kriechende Bewegungen eines Lymphozyten auf adhärennt wachsenden SFC zeigen.

Während an monozytäre Linien, wie z. B. THP-1, bei Markierung mit einem speziellen APN-spezifischen mAk (Leu-M7, Protein:PE = 1:1) im Median ca. 100 000 PE-Moleküle an die Einzelzellen banden, waren es bei Lymphozyten bzw. lymphozytären Zelllinien nach Zell-Zell-Kontakt mit SFC maximal 500-700 Moleküle, wobei die Quantifizierung problematisch war, da der Fluoreszenzbereich der lymphozytären Zellen damit unter der

geringsten Konzentration der PE-markierten Eichbeads und damit außerhalb des garantiert linearen Bereichs lag. Dabei muss man natürlich die geringere Größe von Lymphozyten im Vergleich zu Monozyten berücksichtigen. Die APN-Werte für SFC lagen weit höher als die der Monozyten und damit ebenfalls außerhalb des linearen Bereichs der Eichbeads.

Astrid Kehlen konnte mit Hilfe der quantitativen RT-PCR einen Anstieg von APN-mRNA in tonsillären T- und B-Zellen nach Inkubation mit SFC sowie SFC-Membranpräparationen (Verhinderung der Kontamination mit APN-mRNA aus den SFC) bis auf 1000 % der Kontrolle nachweisen (Riemann D et al., 2000). Der APN-mRNA-Anstieg war bereits nach 30 min nachweisbar mit einem Maximum zwischen 2-16 Stunden der Inkubation mit SFC-Membranen. Mit Hilfe eines Luciferase-Assays konnte Astrid Kehlen den Aktivitätsanstieg des myeloischen APN-Promotors in den Lymphozyten nach Zell-Zell-Kontakt mit SFC zeigen (Kehlen et al., 2000B), ein Ergebnis, das auf einen Anstieg der APN-Transkription in den Lymphozyten hinweist. Aktinomycin verringerte deutlich den Anstieg der durch SFC-Membranpräparationen verursachten lymphozytären APN-mRNA, dargestellt in Abb. 17.

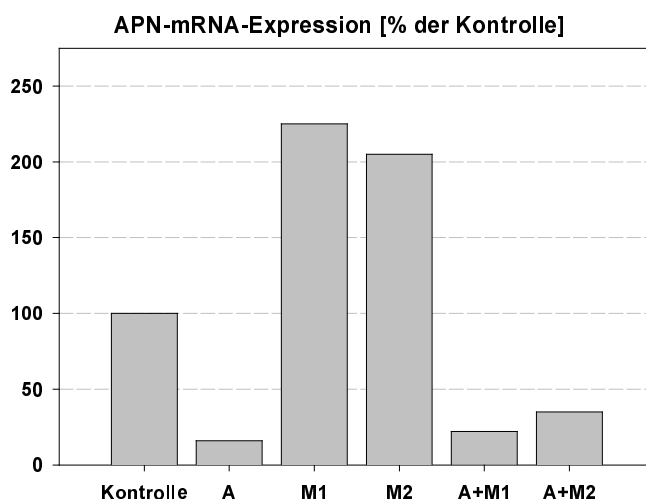


Abb. 17: Einfluss von Aktinomycin (A, 5 $\mu\text{g/ml}$) auf die APN-mRNA-Synthese in tonsillären T-Lymphozyten nach Inkubation mit SFC-Membranpräparationen (M1, M2). Die Daten sind aufgetragen als % der Kontrolle (Kontrolle ohne Behandlung = 100 %).

Trotzdem konnten wir mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid die lymphozytäre APN-Induktion nach Zell-Zell-Kontakt nicht vollständig hemmen (Abb. 18).

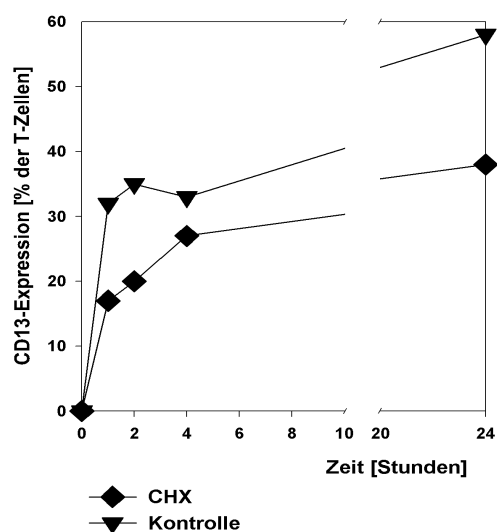


Abb. 18: Einfluss von Cycloheximid (CHX, 9 $\mu\text{g/ml}$) auf den Anstieg der APN-Expression in tonsillären T-Zellen nach Koinkubation mit SFC (durchflusszytometrische Messung).

Nicht nur die Expression des APN-Proteins konnte auf den tonsillären Lymphozyten nach Adhäsion an SFC nachgewiesen werden, sondern ebenfalls ein Anstieg der (mit 5-10 pkat/ 10^6 Zellen eher geringen) Ala-pNA-spaltenden Enzymaktivität dieser Zellen (Abb. 19).

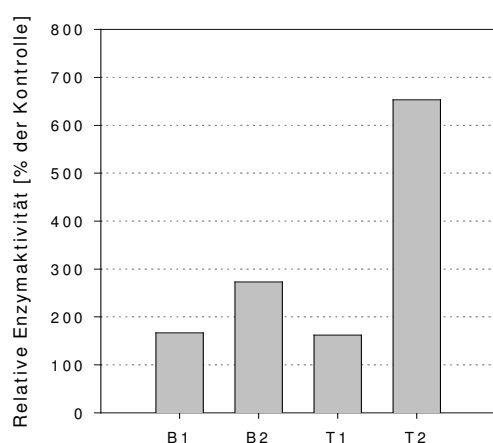


Abb. 19: Tonsilläre Lymphozyten (B: B-Zellen; T: T-Zellen) zeigen eine erhöhte Ala-pNA-spaltende Aktivität nach einstündigem Kontakt mit SFC. Die Daten sind aufgetragen als % der Kontrolle (Lymphozyten ohne Zell-Zell-Kontakt = 100 %).

Direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen Lymphozyten und SFC war nötig für die lymphozytäre APN-Induktion, denn Trennung der Lymphozyten von den SFC durch einen für Zellen undurchlässigen Filter verhinderte völlig den Effekt (Abb. 20). Lösliche humane APN aus Niere oder Plazenta, die in einer Konzentration gegeben wurde, die der hohen löslichen APN-Konzentration in der Synovia von Patienten mit JCA entsprach (500-1500 pkat/ml bei Ala-pNA-Spaltung), führte nicht zu einer lymphozytären APN-Expression, ein Ergebnis, das gegen einen lymphozytären Rezeptor für lösliche APN spricht. Dafür war mit SFC-Membranpräparationen eine deutliche, wenn auch geringe APN-Induktion auf T-Zellen möglich. Leichte Fixierung der SFC mit 2-4 % Paraformaldehyd (zerstört kaum deren Ala-pNA-spaltende Enzymaktivität, 95 % der enzymatischen Aktivität vitaler Zellen) verhinderte nicht die lymphozytäre APN-Expression nach Zell-Zell-Kultur. Dagegen unterdrückte Behandlung der SFC mit 0,05 % Glutaraldehyd (72 % der enzymatischen Aktivität unfixierter Zellen) oder Methanol (10 min, -20 °C) deren Fähigkeit zur lymphozytären APN-Induktion (Ergebnisse nicht gezeigt).

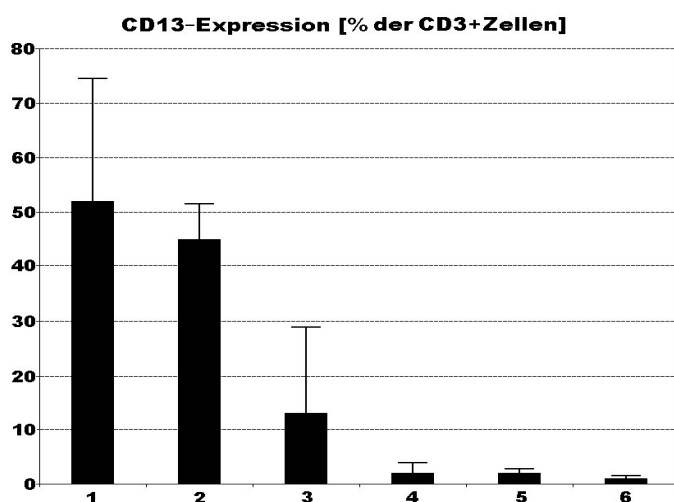


Abb. 20: Einfluss verschiedener Faktoren auf die durch Koinkubation induzierte APN-Expression tonsillärer T-Zellen. Die Lymphozyten wurden auf lebenden (1) oder mit Paraformaldehyd fixierten (2) SFC bzw. mit Membranpräparationen von SFC (3) inkubiert. Konditioniertes Medium (entnommen nach 24-stündiger Kokultur von SFC und T-Zellen) wurde mit den T-Zellen inkubiert (4), oder die Lymphozyten durch eine Membran von den SFC räumlich getrennt (5). T-Zellen wurden außerdem mit löslicher APN aus humaner Plazenta oder Nieren inkubiert (6). Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung der T-Zellen auf ihre APN-Expression.

Nicht nur SFC waren in der Lage, auf kokultivierten Lymphozyten eine APN-Expression auszulösen. Ähnliche (meist aber geringer ausfallende) Ergebnisse beobachteten wir nach Kokultur von tonsillären Lymphozyten auf Monozyten/Makrophagen, Endothelzellen aus Nabelschnurvenen, Nierentubulusepithelzellen, verschiedenen Fibroblasten und Tumorzellen (Tabelle 14, Abb. 21). Mausfibroblasten (z.B. L929-Zellen) waren nicht fähig zur Induktion von APN auf humanen Zellen. Die Ergebnisse mit den Monozyten lassen vermuten, dass in einer Mitogenstimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes immer auch Zell-Zell-Kontakt-Effekte zur lymphozytären APN-Induktion beitragen. Je konfluenter die adhärennten Zellen waren, um so besser induzierten sie APN auf T-Zellen. Die APN-Expression auf den adhärennten Zellen war wichtig für die APN-Induktion auf Lymphozyten, denn APN-negative adhärennte Zellen, wie z.. ECV304-Zellen und die Nierentumorzelllinie Caki-2, konnten niemals APN auf Lymphozyten induzieren (Tabelle 14).

Tabelle 14: Expression von APN auf verschiedenen adhärennten Zellarten und Fähigkeit zur APN-Induktion auf tonsillären T-Zellen nach Kurzzeitkultur (1-24 Stunden).

ZELLARTEN	APN-EXPRESSION AUF OBERFLÄCHE	INDUKTION VON APN AUF T-ZELLEN NACH KOKULTUR
SFC	+++	+
Endothelzellen	++	+
Monozyten/Makrophagen	+++	+
MRHF-Fibroblasten	+++	+
Nierentubulus-Epithelzellen	+++	+
Caco-2	+	-
ECV304	-	-
PC3	++	+
HT29	-	-
Caki-1	+++	+
Caki-2	-	-

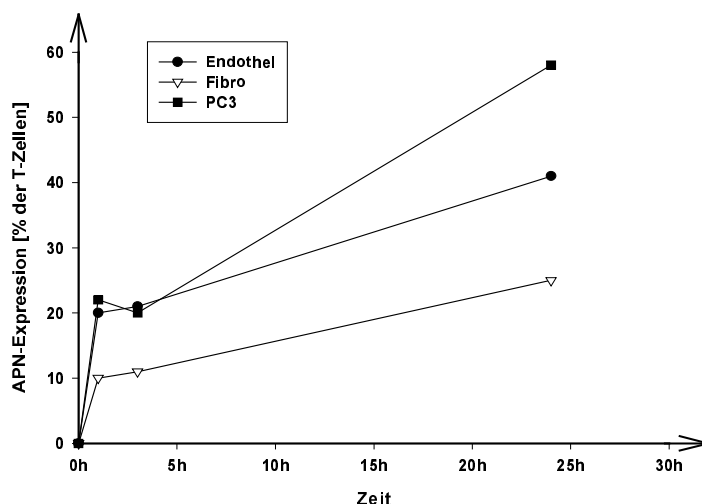


Abb. 21: Induktion lymphozytärer APN durch parallele Inkubation von tonsillären T-Lymphozyten eines Patienten mit humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (Endothel), einer Fibroblastenkultur aus Tonsille (Fibro) und der Prostatakarzinomzelllinie PC3 (Zweifarbimmunfluoreszenz und Durchflusszytometrie).

ECV304-Zellen, die von Katja Thiele mit einem APN-enthaltenden Vektor transfiziert wurden und APN stabil auf über 70 % der Zellen trugen, waren nun (trotz der bekannten geringen Expression von Adhäsionsmolekülen) in der Lage, lymphozytäre APN-Expression zu induzieren (Tabelle 15). ECV304-Zellen, die mit einem lösliche APN (ohne Membrananker)-enthaltenden Vektor stabil transfiziert waren, führten dagegen nicht zur APN-Induktion auf Lymphozyten in Kokultur.

Tabelle 15: Induktion von APN auf tonsillären T-Zellen und Jurkat-Zellen nach eintägiger Inkubation mit ECV304-Zellen, ECV-Zellen mit konstitutiver Expression von APN auf 75 % der Zellen, ECV-Zellen (p8) mit konstitutiver Sekretion von löslicher APN und SFC. Die Werte sind als % APN-positiver T-Zellen angegeben (n = 3-7).

	ECV304	ECV 75 % APN+	ECV.P8	SFC
Tonsilläre T-Zellen	0	44 ± 22	1	52 ± 21
Jurkat	1	34	1	78

Aus den Kokulturuntersuchungen mit lymphozytärer APN-Induktion ergab sich die Frage, ob andere Moleküle in ähnlich kurzer Zeit durch Zell-Zell-Kontakt auf Lymphozyten induziert werden. In unsere Untersuchungen bezogen wir lymphozytäre Aktivierungs-assoziierte Moleküle ein, wie z. B. HLA-DR, DPiV/CD26, CD25, CD40L, CD54, CD69, CD137/4-1BB und CD134/OX40. Zum anderen prüften wir Moleküle, die als „myeloische Marker“ gelten, wie z. B. CD33 oder CD11b. Wir erhielten keinen Hinweis auf weitere, innerhalb von 1-2 Stunden einer Kokultur mit SFC heraufregulierte Membranmoleküle auf Lymphozyten, wobei wir natürlich insgesamt nur ein sehr begrenztes Spektrum an Molekülen testen konnten.

3.2.4.2. Arbeiten mit Filtersystemen

Für die durchflusszytometrische Untersuchung der Lymphozyten nach Zell-Zell-Kontakt müssen die - oft eng anhaftenden - Lymphozyten von den adhären Zellen mehr oder weniger kräftig abgespült werden. Um mechanische Gewalt zu vermeiden, ließen wir tonsilläre Lymphozyten durch auf einen Matrigel-beschichteten Filter wachsende konfluente Endothelzellen wandern und untersuchten Lymphozyten im Überstand, Zellen haftend an Endothel und durch den Filter gewanderte Zellen in der unteren Kammer. Aus unseren Versuchen wurde ersichtlich, dass Lymphozyten keine APN zu exprimieren brauchen, um durch eine Endothelzellschicht hindurchzuwandern. APN-positive Lymphozyten fanden wir sowohl im Überstand über den Endothelzellen (38 ± 15 % der Lymphozyten), als auch in der adhären Schicht auf den Endothelzellen (38 ± 11 %) und ebenso in der unteren Kammer (27 ± 17 %, n = 3-5). Man kann annehmen, dass die positiven Lymphozyten im Überstand bereits Kontakt mit Endothelzellen hatten (nach ca. 20 Min wird bereits ein enger Kontakt beobachtet), jedoch nicht haften blieben.

3.2.4.3. Arbeiten im Kollagengel

Um ein den *in-vivo*-Bedingungen mehr angepasstes Modell der Kokultur zu untersuchen, säten wir SFC in Kollagen Typ I ein und ließen nach ein- bis mehrtägiger Adaptation der SFC tonsilläre T-Zellen in das Gel migrieren. Um die Lymphozyten im Durchflusszytometer untersuchen zu können, musste das Kollagengel mit Kollagenase aufgelöst werden. Alleinige Kollagenase-Behandlung der Lymphozyten hatte keine Wirkung auf die APN-Expression und wurde als Kontrolle mit einbezogen. Lymphozyten, die in ein leeres Gel migrierten, exprimieren keine APN. Kontakt mit ECM ist dafür also allein nicht ausreichend. Dagegen beobachteten wir eine schnelle APN-Induktion auf Lymphozyten, die in ein Gel mit SFC migrierten. Beim Vergleich

von T-Zellen, die **1.** über Nacht in ein Kollagengel migrierten und am nächsten Morgen 2 Stunden auf „Monolayer“-SFC verblieben mit solchen, die **2.** nach der Nacht im leeren Kollagengel nun für 2 Stunden in ein Kollagengel mit SFC migrierten, zeigten letztere eine lymphozytäre APN-Expression von $196 \pm 46 \%$ der APN-Expression der Lymphozyten des ersten Versuches ($n = 7$), d. h. entweder war gleichzeitiger Kontakt der Lymphozyten mit ECM und SFC besonders vorteilhaft für eine Induktion lymphozytärer APN oder SFC bekommen im Gel Merkmale, die besonders vorteilhaft für den Zell-Zell-Kontakt sind.

Mittels LSM konnten nach indirekter Färbung der Zellen im Gel mit einem APN-spezifischen Antikörper (nachfolgend Cy3-markierter Sekundärantikörper) Kontaktstellen von Lymphozyten und SFC untersucht werden, dargestellt in Abb. 22-24. Mittels Reflexionskontrastverfahren konnte zusätzlich sogar das Gel sichtbar gemacht werden (Abb. 25).

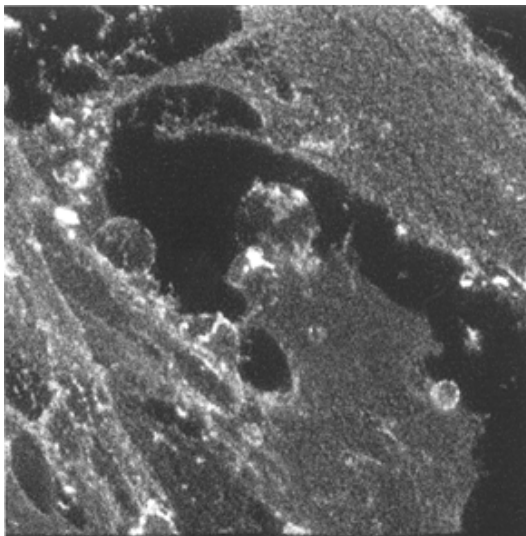


Abb. 22: Aufnahme von mit adhärent wachsenden SFC kokultivierten Lymphozyten mittels LSM. APN-Färbung (indirekt, Cy3-markierter Sekundärantikörper) ist grau dargestellt. Ein Lymphozyt mit fleckiger APN-Färbung ist durch einen Pfeil markiert (Vergrößerung: ca. $\times 2000$).

Während Synoviozyten im Mikroskop eine relativ gleichmäßige Membranfärbung aufwiesen, zeigte sich auf Lymphozyten oft eine eher lokal angeordnete, Patch-artige Verteilung der APN-Färbung, wobei auch das TCR-nah angeordnete CD3-Molekül nicht gleichmäßig verteilt war (Abb. 23).

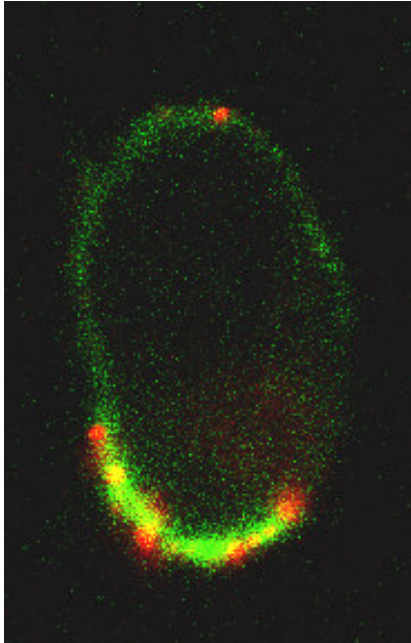


Abb. 23: LSM-Aufnahme einer T-Zelle aus peripherem Blut nach zweitägiger Mitogenstimulierung und dreistündigem Kontakt mit SFC (Vergrößerung ca. x 8000). Grün: CD3-FITC, direkte Markierung; Rot: APN-spezifischer mAk (Klon Leu-M7) gefolgt von Sekundärantikörper, Cy3-markiert. Die gelbe Farbe ergibt sich aus einer engen Lokalisation von CD3 und APN.

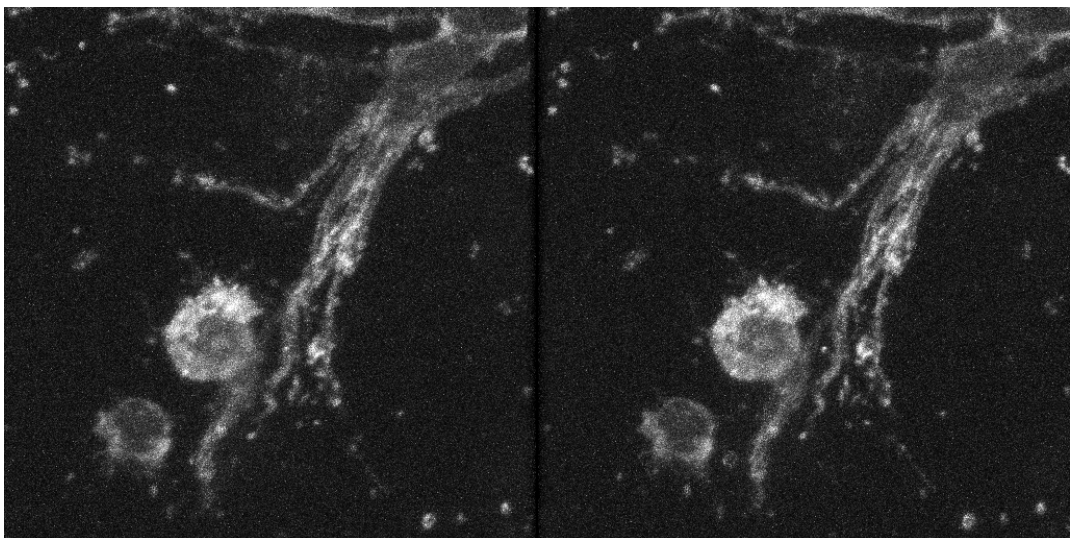


Abb. 24: LSM-Aufnahmen (Zusammensetzen von 15 Schnitten in der z-Achse, Bilder um 15 ° versetzt) einer T-Zelle, die Kontakt zu SFC-Ausläufern hat. Tonsilläre T-Zellen migrierten für 3 Stunden in ein Kollagengel mit eingesäten SFC. APN wurde mit indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen (Sekundärantikörper Cy3-markiert) (Vergrößerung: ca. x 1900).

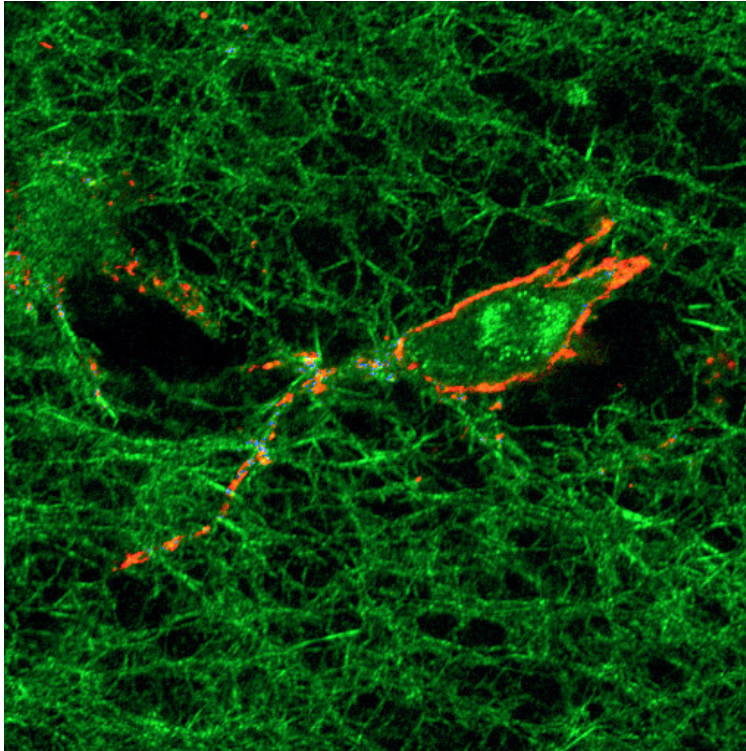


Abb. 25: LSM-Aufnahme (ca. 1000 fache Vergrößerung) eines Synoviozyten in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix. Reflexionskontrast wurde zur Darstellung des Gels verwendet (grüne Falschfarbe). APN-Expression wurde über indirekte Immunfluoreszenz (Leu-M7, Cy3-markierter Sekundärantikörper, rot) sichtbar gemacht und beide Aufnahmen übereinander gelegt.

3.2.4.4. Arbeiten zur Modulation der lymphozytären APN-Expression nach Zell-Zell-Kontakt

Inkubation der SFC mit verschiedenen APN-spezifischen mAk (SJ1D1, WM-15) konnte die lymphozytäre APN-Expression nach Zell-Zell-Kontakt (nachgewiesen mit Leu-M7) nicht vollständig hemmen. Nach Antikörper-Inkubation wurden die SFC vor der Inkubation mit den Lymphozyten z. T. von uns fixiert, um ein Shedden oder Internalisieren des Antikörper-beladenen APN-Moleküls zu verhindern. In 17 Versuchen erhielten wir nach Behandlung der SFC mit APN-spezifischen mAk eine lymphozytäre APN-Expression von 68 ± 28 % des Mean-Wertes der Kontrolle (d. h. ohne Antikörperinkubation).

APN-Inhibitoren wie Actinonin oder Inhibitoren wie E-64 (Cysteinproteasen), PMSF (Serinproteasen), Pepstatin (Aspartylproteasen) und o-Phenanthrolin (Metalloproteasen) zeigten genau wie ein kommerziell vertriebener Inhibitorcocktail keinen Einfluss auf die lymphozytäre APN-Induktion nach Zell-Zell-Kontakt mit SFC. Auch TAPI (TNF- α -

Proteaseinhibitor), ein Inhibitor für das Shedding verschiedener Membranproteine (Mohler KM et al., 1994) war ohne einen Einfluss. Während eine Inkubation reiner tonsillärer T-Zellen mit den Lektinen ConA oder PHA oder dem Protein-Kinase-C-Aktivator PMA selten zu einer APN-Expression auf über 5 % der Zellen führte, erhöhten T-Zell-Mitogene bereits nach sehr kurzer Zeit (1-2 Stunden) signifikant die APN-Induktion auf T-Lymphozyten in Kokultur mit SFC (Abb. 26). Wir beobachteten einen Mitogen-induzierten Anstieg der lymphozytären APN-Expression in Kokultur mit SFC auf 130 – 440 % der Werte ohne Mitogene. PMA zeigte einen anderen Zeitverlauf und erhöhte die lymphozytäre APN-Expression nach Zell-Zell-Kontakt mit langsamen Anstieg erst nach 2-3 Tagen. T-Zellen, die erst für eine Stunde mit SFC kokubiert wurden und dann für 2 Stunden bis einen Tag in Abwesenheit von SFC mitogen stimuliert wurden, zeigten eine nachträgliche Steigerung der APN-Expression (Tabelle 16). In dem gezeigten Beispiel haben Lymphozyten nach Kontakt mit SFC eine relativ geringe APN-Expression, was Resultat der sehr schonenden Ablösung von den adhärenen Zellen ist, um eine Beimengung von SFC bei der nachträglichen Mitogenstimulation zu vermeiden.

Tabelle 16: Einfluss einer nachträglichen Mitogenstimulation auf die APN-Expression lymphozytärer T-Zellen, die vorher eine Stunde mit SFC oder ECV304 (APN-negativ) kokubiert worden. IL-2: 100 U/ml. Die Daten repräsentieren % APN-positive T-Zellen.

	VORHER EINE STUNDE SFC			VORHER EINE STUNDE ECV		
	IL-2	IL-2/PHA	IL-2/PMA	IL-2	IL-2/PHA	IL-2/PMA
2 h	4	32	8	3	2	1
24 h	10	34	28	2	5	2

Eine 60-minütige Vorbehandlung der SFC mit Cytochalasin B verringerte deren Fähigkeit zur lymphozytären APN-Induktion mit:

0 μ M	100 %
1 μ M	77 \pm 11 %
10 μ M	80 \pm 6 %
100 μ M	48 \pm 12 % (n = 3-5).

Eine Cytochalasinkonzentration von 10 μ M und höher resultierte bereits innerhalb von 30 min in einer Abrundung und einer Ablösung der SFC von ihrer Unterlage. Andererseits beobachteten wir mit den leukämischen T-Zelllinien HUT78 und Jurkat bei Konzentrationen unter 50 μ M oft inverse Effekte, also eine Erhöhung der lymphozytären Expression nach Koinkubation mit Cytochalasin-behandelten SFC.

β -Methyl-Cyclodextrin entzieht Zellen Cholesterol, einhergehend mit einer Zerstörung der Cholesterol-angereicherten Membranmikrodomänen. Cyclodextrinbehandlung (1-4 % in serumfreiem Medium bzw. in Medium RPMI-1640 mit lipidfreiem FCS für eine Stunde) verursachte in unseren Versuchen weder eine signifikante Veränderung der APN-Expression von adhären wachsenden vitalen und fixierten SFC noch der enzymatischen Aktivität (Kontrolle 1597 ± 577 pkat/ 10^6 Zellen, nach Cyclodextrin 97,3 % der Kontrollaktivität, n = 7). Dagegen wurde die Expression des GPI-gekoppelten Moleküls CD59 in SFC deutlich verringert (auf 35-40 % der Ausgangsintensität). Zell-Zell-Kontakt mit Cyclodextrin-behandelten SFC führte jedoch zu einer signifikanten Verminderung der lymphozytären APN-Expression (Abb. 26). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Lokalisation von APN in Cholesterol-reichen Membranmikrodomänen der SFC einen wichtigen Faktor für die lymphozytäre APN-Induktion nach Zell-Zell-Kontakt darstellt.

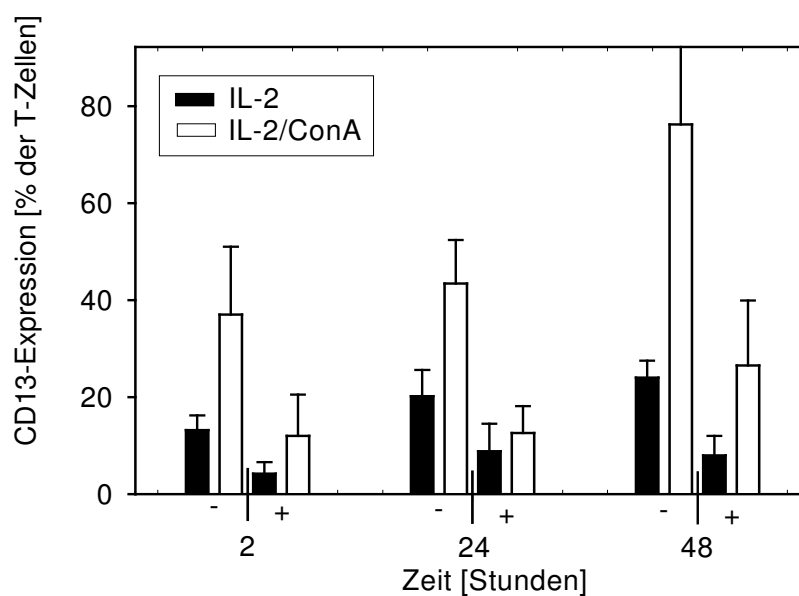


Abb. 26: Zeitverlauf der APN-Induktion auf tonsillären T-Lymphozyten nach Adhärenz an mit Paraformaldehyd fixierte SFC. Cyclodextrin-Vorbehandlung der SFC (+) verringerte deutlich deren Fähigkeit zur Induktion lymphozytärer APN (n = 5).

3.2.5. Lokalisierung von APN in Membranmikrodomänen von SFC

Die Versuche zum Einfluss eines Cholesterolentzuges durch Cyclodextrin auf die lymphozytäre APN-Expression nach Zell-Zell-Kontakt hatten auf eine mögliche Rolle der APN-Lokalisation in Cholesterol-reichen Membranmikrodomänen der SFC hingewiesen. Mittels LSM konnten wir die Kollokalisierung von Caveolin, einem Markermolekül der

Caveolae als speziellen Membranmikrodomänen, und APN in SFC zeigen (Abb. 27). Diese Ergebnisse wurden durch elektronenmikroskopische Darstellungen der APN in Rafts und Caveolae der SFC, durchgeführt in der Arbeitsgruppe von Dr. M. Danielsen (Biochemie, Panum-Institut in Kopenhagen), untermauert (Riemann D et al., 2001B). Dichtegradientenzentrifugation der bei 4 °C Triton X-behandelten SFC-Membranpräparation und Westernblot in den Fraktionen mit geringer (Ansammlung von Proteinen der Membranmikrodomänen) und hoher Dichte, durchgeführt von Dr. A. Navarrete Santos, bestätigte und erweiterte unser Ergebnis zur Anwesenheit von APN in Membranmikrodomänen der SFC auch auf DPIV/CD26 und Neprilysin/CD10 (Riemann et al., 2001B).

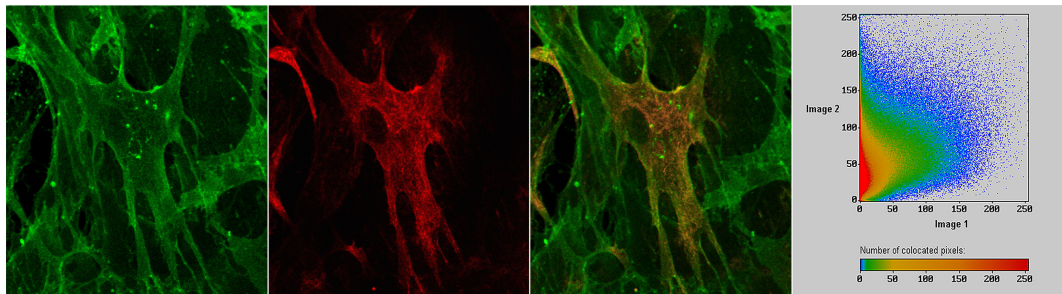


Abb. 27: APN ist teilweise kolokalisiert mit Caveolin in SFC: Die Zellen wurden nach Fixierung und Permeabilisierung mit dem APN-spezifischen Leu-M7-mAk indirekt gefärbt (FITC, grün), gefolgt von einer Markierung mit dem Caveolin-Ak (Cy3, rot). Die im LSM aufgenommenen Einzelbilder wurden im 3. Bild übereinandergelagert (Kolokalisation gelb/orange). Mit Hilfe einer speziellen Software von Carl Zeiss Jena konnte die Pixelkolokalisation im Bild ganz rechts dargestellt werden: Auf der Ordinate sind grüne Pixel (deutliches Überwiegen von APN), auf der Abszisse die roten Pixel (Caveolin) dargestellt. Kolokalisierte Pixel befinden sich in einem bestimmten Bereich in der Diagonale.

4. DISKUSSION

4.1. T-Zellphänotyp außerhalb des peripheren Blutes mit besonderer Berücksichtigung der Expression von APN

Nachdem wir zufällig die Anwesenheit APN-tragender T-Zellen in entzündlichen Gelenkflüssigkeiten entdeckt hatten, waren wir am möglichen Vorkommen APN-tragender T-Zellen in anderen Kompartimenten außerhalb des peripheren Blutes interessiert. Gleichzeitig wollten wir wissen, ob APN mit anderen Aktivierungs-assoziierten T-Zellmarkern zusammen auftritt, ob das Wissen um APN-positive T-Zellen als diagnostischer Marker Verwendung finden kann und ob man aus dem Vorkommen APN-positiver T-Zellen Rückschlüsse auf die Ursachen dieses T-Zellphänotyps schließen kann.

Untersuchungen zur Charakterisierung humaner Lymphozyten außerhalb des peripheren Blutes sind aus dem verständlichen Grund der begrenzten Verfügbarkeit dieser Zellen eher rar. Insbesondere fehlen oft Daten zu „normalen“ Kontrollgruppen, mit denen die in bestimmten Krankheits-assoziierten Situationen gewonnenen Daten verglichen werden können. Eine Krankheits-assoziierte Steigerung der Zahl der T-Zellen in bestimmten Geweben könnte resultieren aus erhöhtem Eintritt, lokaler Proliferation, vermindertem lokalen Tod oder vermindertem Abfluss, oder einer Kombination aller Faktoren. Lymphozyten, die in Lymphknoten migrieren, fehlen entzündliche oder zytotoxische Funktionen, während in peripheres Gewebe migrierende Zellen mit verschiedenen Effektorfunktionen ausgestattet sind (Sallusto F et al., 1999).

T-Zellen in den verschiedenen von uns untersuchten Lokalisationen außerhalb des peripheren Blutes (Ausnahme: Tonsillen) tragen zu >85 % CD45RO als „memory“-Marker [stattgehabter Antigenkontakt (Michie CA et al., 1992)], unterscheiden sich jedoch in ihrer APN-Expression. Memory-Zellen zeigen ein spezielles homing-Verhalten und wandern in Regionen des Körpers, die ähnlich jenen sind, in denen die Zellen zum ersten Mal auf ihr Antigen trafen. CD4-positive Memory-Zellen verlieren nach mehreren Antigenstimulationen das CD27-Molekül, ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie (Hintzen RQ et al., 1993). Beim Vergleich des T-Zellphänotyps verschiedener Orte außerhalb des peripheren Blutes registrierten wir einige Auffälligkeiten: So fand sich in der Synovia und im Pannusgewebe von Patienten mit entzündlichen Gelenkerkrankungen ein besonders hoher Anteil APN-tragender T-Zellen, während DPiV/CD26 (zumindestens in der Gruppe RA und JCA) eher herabreguliert war. Auch TIL in Nierentumoren hatten einen hohen Anteil APN-tragender T-Zellen. Gleichzeitig war ein hoher Anteil HLA-DR-

positiver T-Zellen ein Charakteristikum beider Lokalisationen. T-Zellen der BALF von Patienten mit Sarkoidose hatten dagegen eine geringe Expression von APN. Auch fanden wir in Tonsillektomiematerial nie APN-tragende Lymphozyten.

In zukünftigen Untersuchungen wäre die Einbeziehung der Expression von Chemokinrezeptoren interessant. Inzwischen weiß man z. B., dass die Expression von CCR7 die Memory-T-Zellen in zwei funktionell verschiedene Gruppen teilt (Sallusto F et al., 1999). CCR7-negative Memory-T-Zellen migrieren in entzündete Gewebe und sind Effektorzellen, wohingegen CCR7-positive Zellen in sekundäre Lymphorgane wandern, wo sie dendritische Zellen aktivieren können, aber sich erst nach erneuter Stimulation in CCR7-negative Effektorzellen umwandeln. Für die *in vivo*-Unterscheidung von (IL-2, IFN- γ und Lymphotoxin produzierenden und in zellmedierte Immunantwort integrierten) TH-1-Zellen von TH-2-Zellen (produzieren IL-4 und IL-5, sind beteiligt an der Herabregulation der zellmedierten und fördern die humorale Immunantwort) galten Chemokinrezeptoren in den letzten Jahren als ein hoffnungsvoller Kandidat, wobei es inzwischen auch gegenteilige Befunde gibt (Nanki T et al., 2000).

4.1.1. Synoviale T-Zellen

APN findet sich auf einem Großteil der synovialen T-Zellen von Patienten mit verschiedenartigen Gelenkentzündungen, wobei wir in den Gruppen RA, JCA und TA keine deutlichen Unterschiede registrierten. Auch im Pannusgewebe von Patienten mit RA und JCA fanden wir APN-positive Lymphozyten, nicht jedoch in parallel entnommenen Blutproben. Aus unseren Ergebnissen ergibt sich die Möglichkeit, dass Zell-Zell-Kontakt Ursache der APN-Expression synovialer T-Zellen ist. SFC sind stark APN-positiv und es gibt Hinweise darauf, dass bei RA synoviale Makrophagen besonders stark APN exprimieren (Emmrich F et al., 1990). T-Zellen im Synovialgewebe sind eine gemischte Population von vor kurzem eingewanderten Zellen und solchen, die im Synovialgewebe längere Zeit verbleiben. T-Zellen in der Synovia sind insofern einheitlicher, als sie aus dem Synovialgewebe stammen (Davis LS et al., 2001). Falls T-Zellen aus dem Synovialgewebe über die Lymphwege in das Blut rezirkulieren können, müssten sie auf ihrem Weg ihre APN-Expression verlieren.

Zum Phänotyp synovialer T-Zellen bei RA gibt es eine Reihe von Untersuchungen (Übersicht z. B. in Kinne RW et al., 1997; Weyand CM et al., 2000). Lange bekannt ist das Überwiegen CD45RO-positiver Zellen mit einem hohen Anteil CD69 und HLA-DR. CD69 als früh induzierbarer Aktivierungsmarker gilt als Marker für den ras-

Aktivierungsweg der T-Zellen (D'Ambrosio D et al., 1994). CD4-positive synoviale T-Zellen bei RA verlieren CD28 (mit Verlust der Ligation an B7-1/CD80 und B7-2/CD86) und erwerben Granzym und Perforin, verbunden mit einem funktionellen Wechsel in Richtung Zytotoxizität (Weyand CM et al., 2000). Das durch diese Zellen außerdem sezernierte TH1-Zytokin IFN- γ induziert eine HLA-DR-Expression auch der T-Zellen, was dazu führen kann, dass T-Zellen selbst Antigenepitope in der Bindungsgrube ihrer MHC Klasse-II-Moleküle an Helferzellen präsentieren. Interessanterweise wird über eine Rolle von APN im Antigenprocessing diskutiert, wie bereits im Kap. 1.1.2. ausgeführt wurde. Das Enzym soll die aus den Enden der Bindungsgrube heraushängenden Peptidstücke so beschneiden, dass Helferzelle und Antigen-präsentierende Zelle sterisch nicht behindert werden (Larsen SL et al., 1996). In unseren Versuchen hatten synoviale T-Zellen in der Patientengruppe TA ähnlich hohe Expression sowohl von HLA-DR als auch von APN, damit ist die HLA-DR- und APN-Expression synovialer T-Zellen keinesfalls RA-spezifisch. Synoviale T-Zellen bei JCA sollen im Gegensatz zu RA trotz deutlicher TH-1-Komponente besonders bei Patienten mit limitierter Gelenkzerstörung auch TH-2-Zytokine produzieren (Murray KJ et al., 1998).

Wir fanden bei verschiedenen Arthritisformen keine signifikante Korrelation zwischen sowohl der ESR der Patienten als auch der Zahl synovialer Leukozyten mit den APN-positiven synovialen T-Zellen, wobei man berücksichtigen muss, dass die Patienten einen unterschiedlichen Zeitverlauf der Erkrankung aufwiesen und sehr verschieden, z. T. immunsuppressiv, therapiert wurden. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Entzündungsaktivität und der synovialen APN-Expression auf T-Zellen könnte so verdeckt sein. Leider fehlen uns Untersuchungen zum T-Zellphänotyp in nicht-entzündeten Gelenken.

Zukünftige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe sollen die funktionellen Besonderheiten APN-tragender synovialer T-Zellen in den Mittelpunkt stellen. Insbesondere interessiert uns, ob neben einer möglichen lymphozytären Antigenpräsentation APN-Liganden in T-Zellen direkt MAP-Kinasen aktivieren können, ähnlich der in Monozyten durch Ligation/Crosslinking durch APN-spezifische mAk ausgelösten Signalkaskade (Navarrete Santos A et al., 2000A).

4.1.2. T-Zellen in Perikardflüssigkeit

Das Perikard ist eine seröse Membran mit einer Mikrovaskulatur ähnlich der der Synovialmembran und der Pleura. Ein Erwachsener hat ca. 20-25 ml Perikardflüssigkeit,

welche als Ultrafiltrat des Blutserums verstanden wird (Holt JP, 1970). Erwachsene mit Herzklappenerkrankungen, die hohe Entzündungsparameter (z. B. ESR) hatten, zeigten die höchsten Anteile APN-positiver T-Zellen. Daraus könnte man schließen, dass eine APN-Expression auf Lymphozyten Entzündungs-assoziiert auftritt und in der normalen Perikardflüssigkeit eher ein seltenes Ereignis darstellt. Lymphozytäre APN-Expression könnte auch hier Folge des Zell-Zell-Kontaktes mit Makrophagen und/oder Mesothelzellen sein. Zufällig entstandene Kulturen von schnell proliferierenden Mesothelzellen aus Perikardflüssigkeit trugen immer APN, wobei es keine Angaben in der Literatur zu einer *in vivo* Expression von APN auf Mesothelzellen gibt. Bei der HLA-DR-Expression auf T-Zellen fanden wir keine Unterschiede zwischen den Gruppen, was gegen eine enge Kopplung von HLA-DR und APN spricht. Unklar bleibt, warum Kinder mit Herzfehlern einen besonders hohen Anteil CD69 sowie der Adhäsionsmoleküle CD11b und ICAM-1/CD54 auf T-Zellen aufwiesen. Denkbar wären Alters-abhängige Besonderheiten im T-Zellphänotyp und/oder im Migrationsverhalten. Bisher gibt es keine Vergleichsuntersuchungen zum Phänotyp der T-Zellen in Perikardflüssigkeit.

4.1.3. T-Zellen in Bronchiallavage-Flüssigkeit

Die Lunge enthält eine große Anzahl an Lymphozyten, hauptsächlich Memory-T-Zellen, die in zwei Kompartimenten gefunden werden, der bronchialen Lamina propria und den peripheren alveolären und interstitiellen Lungenregionen. Anders als in Haut und Dünndarm sind bisher keine lymphozytären spezifischen Lungen-homing-Rezeptoren bekannt, es gibt jedoch Hinweise auf ein spezielles Muster an Chemokinrezeptoren für T-Zellen der Lunge (Campbell JJ et al., 2001). Wenig ist bisher bekannt zum Ursprung der Lymphozyten in der BALF und ihrem Weg aus dem peripheren Blut in den bronchoalveolären Raum. Lymphozyten machen unter 10 % der Gesamtleukozyten in der BALF gesunder Erwachsener aus. Die Immunphänotypisierung ist inzwischen ein anerkanntes Hilfsmittel, um Lungenerkrankungen besser definieren zu können. Besonders Sarkoidose und experimentell allergische Alveolitis zeigen ein typisches Bild mit einer Anreicherung von T-Lymphozyten, besonders des Helferzelltyps (CD4+) bei Sarkoidose und zytotoxischer T-Zellen (CD8+) bei exogen-allergischer Alveolitis (Bernhardt K et al, 1997). Sarkoidose ist eine chronische granulomatöse Erkrankung unbekannter Ursache mit koordinierter Wechselwirkung zwischen T-Zellen und Makrophagen, die zur Bildung der charakteristischen nicht-verkäsenden Granulome führen (Newman L et al., 1997). Sarkoidose soll mit einem deutlichen TH-1-Profil der T-Zellen einhergehen (Wahlström J et al., 2001). Lange bekannt ist, dass T-Lymphozyten der BALF Aktivierungsmarker wie CD45RO und CD69 exprimieren (Saltini C et al., 1990). Weiterhin beschrieben ist in T-

Zellen der BALF von Patienten mit Sarkoidose eine hohe Expression von DPIV/CD26, ICAM-1/CD54 und Fas/CD95 (Wahlström J et al., 1999). Die Expression von DPIV/CD26 soll in verschiedenen granulomatösen Erkrankungen mit der Synthese des TH-1-Zytokins IFN- γ korrelieren (Scheel-Toellner D et al., 1995), wobei auf Gewebeschnitten nur 2 von 7 ausgetesteten Antikörpern nützlich für die Erkennung TH-1-spezifischer T-Zellen waren (Seitzer U et al., 1998). Andererseits gibt es Untersuchungen, die einen Zusammenhang zwischen der Expression von DPIV/CD26 und der T-Zelladhäsivität an Endothelzellen und Fibroblasten verneinen (Mattern T et al., 1998). Unsere Ergebnisse zeigen einen geringen Anteil APN-tragender T-Zellen in der BALF von Sarkoidosepatienten gepaart mit einem hohen Anteil DPIV/CD26-positiver T-Zellen. Die Expression beider Aminopeptidasen auf T-Zellen scheint ebenfalls nicht eng gekoppelt zu sein.

Ungeklärt bleibt, warum Zell-Zell-Kontakt bei Sarkoidose nicht zur APN-Expression alveolärer Lymphozyten führt. In der Lunge wird APN von den Surfactant-produzierenden Alveolar-Epithelzellen vom Typ II (und nicht von den ausdifferenzierten Typ I-Zellen) exprimiert, neben ihrer Lokalisierung in Drüsengängen, Blutgefäßen, Nerven, stromalen Zellen und Alveolarmakrophagen (Funkhouser JD et al., 1987). Alveolarmakrophagen hat man eher geringe Fähigkeiten zur Antigenpräsentation zugeschrieben. Sie sollen die Proliferation von T-Zellen sogar supprimieren können (Strickland D et al., 1993). Bei Sarkoidose gibt es jedoch Untersuchungen, die zeigen, dass Alveolarmakrophagen Antigen prozessieren und an T-Lymphozyten präsentieren können (Grunewald J et al., 1999).

Interessanterweise gibt es eine Arbeit, die das Vorkommen APN-positiver Zellen in Sarkoidose untersucht und gerade bei Sarkoidose einen hohen Anteil löslicher APN in der BALF nachweist sowie sehr stark APN-positiv Makrophagen findet (Tani K et al., 2000). Die Autoren beschreiben weiter einen chemotaktischen Effekt, den lösliche APN selbst besonders auf CD4+ T-Lymphozyten ausübt und der mit Bestatin hemmbar ist. Lösliche APN könnte also zur alveolären Ansammlung von Helferzellen bei Sarkoidose beitragen. In der Literatur finden sich keine weiteren Hinweise auf eine chemotaktische Eigenschaft von APN auf Lymphozyten. Es gibt jedoch eine Arbeit, die eine hohe Konzentration löslicher APN mit einem hohen Granulozytenanteil in der BALF korreliert findet (Juillerat-Jeanneret L et al., 1997). Es bleibt nachzuprüfen, ob auch in der Synovia von RA-Patienten lösliche APN, die sich in besonders hohen Konzentrationen findet (Lees T et al., 1991), zur Ansammlung von Helferzellen und/oder Granulozyten beitragen kann.

4.1.4. T-Zellen in Tumoren

Auch T-Zellen, die in Tumoren migrieren, können APN exprimieren, wie von uns erstmalig gezeigt werden konnte. Eine mögliche Bedeutung dieses Befundes bleibt jedoch unklar. Tumor-spezifische T-Zellaktivität wurde sowohl in Nieren- als auch in Lungentumoren beschrieben (Schendel DJ et al., 1993; Calhoun RF et al., 2000). Es gibt jedoch bisher erstaunlich wenige Arbeiten mit einer Charakterisierung des Phänotyps von TIL. In Nierentumoren soll der Prozentsatz an TIL nicht mit dem Tumor Staging oder histologischen Grading korrelieren (Kowalczyk D et al, 1997). IL-4- und IL-10-mRNA kann man in TIL aus Nierentumoren nachweisen, was als TH-2-Antwort gedeutet wird (Maeurer MJ et al., 1995). In Bronchialkarzinomen soll die Anwesenheit von TIL dagegen auf eine bessere Prognose hindeuten (Kerr KM et al., 1998). Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass vor allem ein hoher B-Zellanteil (≥ 21 % der TIL) in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen in einem multivariaten Cox-Modell mit einem längerem Überleben korreliert ist (Riemann D et al., 1997). Mehrere Arbeiten beschreiben den hohen Anteil HLA-DR-positiver T-Zellen in Tumoren. So finden Van den Hove und Mitarbeiter (1997) mehr als 80 % der Helferzellen im Tumorstroma von Nierentumoren positiv für HLA-DR, während es im benachbarten tumorfreien Nierengewebe ca. 45 % sind. Wir selbst finden 68 % der Gesamt-T-Zellen in hellzelligen Nierentumoren HLA-DR-positiv, ohne weiter in Helferzellen und zytotoxische Zellen zu differenzieren. Ortegell und Mitarbeiter (2000) finden in nicht-kleinzelligen Lungentumoren 61 % HLA-DR-positive T-Zellen, ein Wert, der nur geringfügig über den von uns beobachteten Zahlen liegt.

Vergleicht man T-Zellen in hellzelligen Nierentumoren mit solchen aus Bronchialkarzinomen, so ergeben sich einige deutliche Unterschiede, wie der hohe Anteil APN-, HLA-DR- und DPiV/CD26-positiver T-Zellen in Nierentumoren, während in Bronchialkarzinomen CD25-, CD69- und ICAM-1/CD54-positive T-Zellen stärker exprimiert werden. Mangels entsprechender Untersuchungen kann man nur spekulieren, dass die Tumorzellumgebung nicht nur Einfluss auf ein bestimmtes Spektrum Aktivierungs-assoziiertes Oberflächenmarker auf T-Zellen hat, sondern dass sich auch funktionelle Unterschiede ergeben. CD25-positive Helferzellen gelten als suppressiv wirkende Regulatorzellen, die TGF- β produzieren (Read S et al., 2000). Der geringe Anteil CD25-positiver T-Zellen in Nierentumoren erinnert z. B. an die durch Metalloproteasen von Zervixkarzinomen spezifisch verursachte verringerte lymphozytäre CD25-Expression (Sheu B-C et al., 2001). Hinsichtlich der von uns untersuchten CD11b-Expression von tumorinfiltrierenden T-Zellen weiß man, dass die meisten CD28-

negativen Zellen CD11b-positiv sind (Yamada H et al., 1985). CD28-negative Zellen können nicht an die kostimulatorischen Moleküle B7-1/CD80 und B7-2/CD86 auf Antigen-präsentierenden Zellen binden. Es handelt sich um terminal differenzierte Zellen, denen ein zytolytisches Potential zugeschrieben wird (für Übersicht siehe Fiorentini S et al., 2001). CD11b-Expression auf CD8+ T-Zellen soll den Schritt von der memory-Zelle (CD45RO+CD28+) zur echten Effektorzelle markieren (Fiorentini S et al., 2001). β -2-Integrine (CD11b als α -Kette) vermitteln die lymphozytäre Adhäsion an Endothel sowie die Extravasation, und werden für das Homing in Entzündungsgebiete benötigt (Issekutz TB et al., 1993). Ähnlich wie von uns für APN beobachtet, sollen CD11b-positiv T-Zellen nicht in Tonsillen und Lymphknoten als sekundären Lymphorganen vorkommen (Hoshino T et al., 1993). Wir fanden in Plattenepithelkarzinomen die geringsten und in hellzelligen Nierentumoren die höchsten Anteile dieser Zellen.

Während primäre Lungentumoren einen relativ geringen Anteil APN-positiver TIL enthalten, ist der Anteil APN-positiver T-Zellen in Metastasen von Nierentumoren in der Lunge ähnlich hoch wie in Primärtumoren der Niere. Dies könnte dafür sprechen, dass T-Zellen erst in der Auseinandersetzung mit den Nierentumorzellen APN-Expression erwerben. Da wir auch *in vitro* durch Zell-Zell-Kontakte von tonsillären T-Zellen und Nierentumorzellen eine lymphozytäre APN-Expression induzieren konnten, ist es denkbar, dass der Grad an APN-Expression der TIL den Grad an Zell-Zell-Kontakten zwischen Nierentumorzellen und Lymphozyten widerspiegelt. Andererseits kann die Zell-Zell-Kontakt-induzierte lymphozytäre APN-Expression durch eine Reihe von Stimulatoren (Zytokine, Mitogene) erhöht werden, die besonders in Nierentumoren eine wichtige Rolle spielen könnten.

Im Rahmen der Dissertationsarbeit von Katrin Eiselt zur Abschätzung einer Prognoserelevanz verschiedener Merkmale von TIL in Lungentumoren (mittlere Patientenüberwachung von 14 Monaten) hatten Patienten mit Lungentumoren mit > 20 % APN-positiven T-Zellen im multivariaten Cox-Regressionsmodell, das Histologie, Tumor-Grading (nur G2 und G3 eingeschlossen), Staging (T1-3) und Residualtumor nach Operation (nur ohne) einschloss, eine schlechtere Prognose als solche mit < 9 % APN-positiven T-Zellen (Riemann D et al., 1997). Das relative Risiko der Patienten mit > 20 % APN-positiven T-Zellen im Tumor zu versterben war 3,6fach höher als das Risiko für Patienten mit < 9 % APN-positiven T-Zellen. Der Trend von APN-positiven T-Zellen als Marker für eine schlechte Prognose blieb zwar bei höheren Patientenzahlen und längerer Nachbeobachtungszeit erhalten, war aber nicht mehr signifikant (Katrin Eiselt, laufendes Dissertationsverfahren). Eine Deutung dieses Befundes bleibt im Moment schwierig, da

zu wenig über die Besonderheiten APN-positiver T-Zellen im Tumor bekannt ist. Wenn man direkten Zell-Zell-Kontakt mit Tumorzellen als Auslöser für eine lymphozytäre APN-Expression annimmt, könnte der enge Zellkontakt zwischen Lymphozyten und Bronchialkarzinomzellen eine Inaktivierung der Lymphozytenfunktionen bewirkt haben. Andererseits könnte eine hohe APN-Expression auf T-Zellen durch das Spalten biologischer Peptide Tumorzellwachstum unterstützen.

4.2. Regulation verschiedener Membranpeptidasen

4.2.1. Regulation durch Zytokine

Aus unseren Regulationsversuchen mit Zytokinen lassen sich einige Verallgemeinerungen ziehen: IL-4 ist ein Zytokin, das in unseren Versuchen sowohl APN, als auch DPIV/CD26 und Nephilysin/CD10 in unterschiedlichen Zellen heraufregulieren kann. Damit könnte IL-4 einen gesteigerten Abbau von Chemokinen, Enkephalinen u. a. biologischen Peptidmediatoren bewirken, aber auch das Antigenprocessing beeinflussen (Trimmen der in MHC Klasse-II-Molekülen gebundenen Peptide). TGF- β hat direkt gegensätzliche Wirkungen auf verschiedene Membranpeptidasen: In unseren Ergebnissen steht einer Herabregulation von Nephilysin/CD10 in SFC oder einer Herabregulation von DPIV/CD26 in Nierenepithelzellen eine Heraufregulation von APN in Monozyten gegenüber. In anderen Zelltypen als Monozyten hatte TGF- β zwar keine deutliche Heraufregulation von APN zur Folge, jedoch auch nie eine Verringerung. Das heißt, in Situationen mit hohen TGF- β -Konzentrationen werden Membranpeptidasen wie DPIV/CD26 und Nephilysin/CD10 herabreguliert sein, die Wirkung von APN jedoch bleibt erhalten bzw. wird (in Monozyten) erhöht.

Vergleicht man APN und DPIV/CD26, die auf der Bürstensaummembran der proximalen Nierentubuli eng kolokalisierten Membranenzyme, hinsichtlich der Regulation durch Mediatoren wie PMA als Proteinkinase C-Aktivator und Forskolin bzw. A23187 als c-AMP-erhöhende Substanzen, so ergeben sich einige auffällige Unterschiede. PMA ist nur für APN ein signifikanter Aktivator, nicht aber für DPIV/CD26. c-AMP-Erhöhung dagegen hemmt die APN-Expression, aber steigert deutlich DPIV/CD26 (und Glutamylaminopeptidase), wie durch Arbeiten von Frau Astrid Kehlen mittels mRNA-Quantifizierung deutlich wurde (Kehlen A et al., 1998).

4.2.1.1. TGF- β hemmt nicht die APN-Expression

TGF- β ist ein multifunktionelles Zytokin, das in Säugern in 3 Isoformen (TGF- β 1, -2, -3) existiert, und durch sehr verschiedene Zellen in einer latenten Pro-Form sezerniert wird, aus der durch bisher nur wenig verstandene Mechanismen biologisch aktives TGF- β freigesetzt wird. Mannose-6-Phosphat/IGF (insulin-like growth factor)-II-Rezeptor bindet latentes TGF- β und bildet außerdem Komplexe mit Urokinase (Plaminogenaktivator)-Rezeptor/CD87 auf Monozyten. Dieser Komplex bindet und aktiviert Plasminogen. Plasmin könnte also eines der TGF- β -aktivierenden Enzyme sein (Godar S et al., 1999). TGF- β soll die Reifung monozytärer Zellen vorantreiben (De Benedetti F et al., 1990; Turley JM et al., 1996) und führt u. a. zu einer Heraufregulation von Monozyten-typischen Markern wie Urokinase und Urokinaserezeptor/CD87 (Falcone DJ et al., 1995). Eine gesteigerte APN-Expression nach TGF- β -Behandlung könnte als Teil dieser Reifung verstanden werden. In der Synovia von RA-Patienten finden sich z. B. sowohl hohe Konzentrationen an TGF- β als auch Makrophagen mit besonders hoher APN-Intensität (Emmrich F et al., 1990). Die Reifung von Monozyten zu dendritischen Zellen (oft u. a. mit IL-4 und/oder TGF- β induziert) geht ebenfalls mit einer gesteigerten APN-Expression einher (Woodhead VE et al., 1998), und APN ist ein wichtiges Enzym in der Antigenpräsentation durch dendritische Zellen (Dong X et al., 2000).

TGF- β hemmt die Expression von DPIV/CD26 und Neprilysin/CD10. Interessanterweise kann eine Hemmung einer Membranpeptidase ihrerseits zur TGF- β -Synthese führen, gezeigt z. B. für die Hemmung der DPIV/CD26 in T-Lymphozyten (Reinhold D et al., 1997).

4.2.1.2. Gegensätzliche Wirkungen von IL-4 und TGF- β auf Neprilysin/CD10 in SFC

Bradykinin und Substanz P sind im Gelenk endogene Peptide mit potenten pro-inflammatorischen Effekten. Neprilysin/CD10 reguliert die Konzentration dieser Peptide. Deshalb hat man der Anwesenheit dieses Enzyms im Gelenk große Bedeutung geschenkt. Die Peptidase kommt außer auf SFC noch auf Chondrozyten (Lapadula G et al., 1995) und Osteoblasten (Benayahu D et al., 1994) vor, eine lösliche Form wurde bei verschiedenen Gelenkentzündungen in erhöhten Konzentrationen gefunden und korrelierte mit der Anzahl an Granulozyten im Gelenk (Matucci-Cerinic M et al., 1993; Appelboom T et al., 1991). Inzwischen gibt es sogar Versuche, lösliches rekombinantes Enzym als therapeutisches Agens bei Gelenkentzündungen zu verwenden, wobei sehr hohe Konzentrationen gegeben werden müssen (Solan NJ et al., 1998).

Viele Zytokine werden während eines Entzündungsvorgangs im Gelenk freigesetzt und tragen zum Teil zur Gelenkzerstörung bei bzw. haben anti-inflammatorische Wirkungen. Wir beschreiben die gegensätzlichen Effekte zweier als eher anti-inflammatorisch geltender Zytokine auf die Expression von Neprilysin/CD10: Während IL-4 und IL-13 die Expression erhöhen, hat TGF- β eine hemmende Wirkung. IL-4 ist in der Synovialflüssigkeit kaum nachzuweisen, jedoch findet sich das in vieler Hinsicht ähnlich wirkende Zytokin IL-13 in signifikanten Konzentrationen (Isomaki P et al., 1996). IL-4 und IL-13 wirken antientzündlich, indem sie die monozytäre Synthese von IL-1, TNF- α , IL-6 und IL-8 unterdrücken sowie die Wachstumsfaktor-stimulierte Proliferation von SFC bzw. deren Freisetzung von PGE₂ und GM-CSF hemmen (Übersicht in Dechanet J et al., 1995B). IL-4 stimuliert die Produktion des IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1RA) (Seitz et al., 1994) und hemmt die Transkription von Metalloproteinasen (Borghai RC et al., 1998). IL-4 soll - anders als in Monozyten - die IL-8-Synthese der SFC fördern, während die Synthese des Zytokins RANTES vermindert wird (Rathanaswami P et al., 1993). Tierversuche, die die Einsatzmöglichkeiten von IL-4 als therapeutischem Agens untersuchten, hatten allerdings eher enttäuschende Ergebnisse, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass IL-4 und IL-13 Synoviozyten vor Apoptose schützen sollen (Relic B et al., 2001). Unsere Arbeitsgruppe beschrieb bereits 1994, dass IL-4 die auf SFC vorhandene VCAM-1-Expression steigert (Schwachula A et al., 1994). SFC exprimieren keine γ_c -Kette, die sonst gemeinsamer Bestandteil von Rezeptoren für IL-4, IL-7, IL-9 und IL-15 ist. Sie besitzen aber IL-4-Rezeptor- $\alpha 1$, IL-13-Rezeptor- $\alpha 1$ und - $\alpha 2$ und können IL-4/IL-13-Rezeptorheterodimere bilden, von denen es jedoch nur ca. 300 pro Zelle geben soll (bei 5000 IL-13R $\alpha 2$ -Monomerrezeptoren) (Feng N et al., 1998).

TGF- β ist ein anderes Zytokin, das für einen Großteil der immunsuppressiven Wirkungen der Synovia von RA-Patienten verantwortlich sein soll (Lotz M et al., 1990). Die Bedeutung von TGF- β in Entzündungsvorgängen konnte in knock-out-Mäusen für TGF- $\beta 1$ gezeigt werden, die eine systemische Autoimmunerkrankung mit multifokalen Entzündungsherden zeigen, begleitet von einer Überexpression an pro-inflammatorischen Zytokinen (Shull MM et al., 1992). Allerdings kann man durch intraartikuläre Injektion von TGF- β auch eine Arthritis auslösen (Allen JB et al., 1990), zurückzuführen auf chemotaktische und angiogenetische Eigenschaften des Zytokins. TGF- β wird von SFC in latenter Form selbst synthetisiert (Brennan FM et al., 1990) und wirkt u. a. über eine Hemmung des Gewebeabbaus bei gleichzeitiger Förderung von Reparaturprozessen. In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten wir, dass TGF- β die IFN- γ -induzierte HLA-DR- und CIITA (Klasse-II-Transaktivator)-Expression in SFC zu

hemmen vermag (Navarrete Santos A et al., 1998). Jetzt zeigen wir, dass TGF- β die Expression des Enzyms Nephilysin/CD10 verringert und damit indirekt proinflammatorisch wirken kann. TGF- β unterdrückt nicht die Zellproliferation in SFC, sondern stimuliert sie sogar, besonders in Anwesenheit von IL-1 α (Taylor DJ et al., 1989), sodass die verringerte Nephilysin/CD10-Expression nach TGF- β -Behandlung nicht auf eine Wachstumshemmung der SFC zurückgeführt werden kann. TGF- β sollgegensätzlich zu unseren Befunden - keinen signifikanten Effekt auf die Expression von Nephilysin/CD10 in Hautfibroblasten haben (Trompezinski S et al., 2000).

4.2.2. Zell-Zell-Kontakt induziert eine Anzahl verschiedenster Membranenzyme

Direkter Zell-Zell-Kontakt von Lymphozyten und SFC bzw. anderer adhärenter Zellen führt zu einer lymphozytären Expression von APN, ein Ergebnis, das die Anwesenheit APN-positiver Lymphozyten in verschiedenen Lokalisationen außerhalb des peripheren Blutes erklären kann. Unsere Ergebnisse zur lymphozytären APN-Expression nach Zell-Zell-Kontakt reihen sich ein in ähnliche Befunde, welche in verschiedenen Modellsystemen mit sehr verschiedenen Membranenzymen erhoben wurden (Tab. 17).

Die Ergebnisse zeigen nicht nur eine Induktion von Membranenzymen nach Zell-Zell-Kontakt, sondern auch Herabregulation, gezeigt z. B. für die APN-Expression auf frühen lymphatischen Vorstufen, die nach direktem Zellkontakt mit stromalen Knochenmarkszellen auf transkriptioneller Ebene herabreguliert wird (Saito M et al., 1995). Auffällig ist, dass Lymphozyten nicht nur die beeinflussbaren Zellen sind, sondern selbst auf anderen Zellen den Membranenzymbesatz beeinflussen können, gezeigt z. B. für Monozyten und Fibroblasten (Miltenburg AM et al., 1995). Direkter Zell-Zell-Kontakt wird auch nicht in allen Fällen benötigt; so induzieren Glutamylaminopeptidase tragende Knochenmarkstromazellen in B-Zellvorstufen sehr schnell und selektiv die Expression von Glutamylaminopeptidase begleitet von erhöhter Proliferation der B-Zellen. IL-7 kann als Mediator jedoch teilweise die Wirkung der Knochenmarkstromazellen ersetzen (Welch PA et al., 1990). In bestimmten Fällen ist eine Beeinflussung von Membran-enzymen in einem Zellkontaktmodell über die Speziesgrenzen hinweg möglich (z. B. APN-Verlieren der lymphozytären Vorstufen nach Kontakt mit Stromazellen des Knochenmarks). Auch außerhalb des hämatopoetischen Systems finden sich Beispiele für Zell-Zell-Kontakt-regulierbare Membranenzyme, so wird die APN-Expression auf Mikroglia durch direkten Kontakt mit Astrozyten heraufreguliert (Lucius R et al., 1995), und auf gemischten Perizyten-angereicherten Endothelzellkulturen lässt sich APN auf Perizyten durch lösliche Faktoren aus Endothelzellüberständen induzieren (Ramsauer M et al., 1998).

Tabelle 17: Regulation von Peptidasen während der Kokultivierung verschiedener Zellen. Quellen: 1 (Saito M et al., 1995); 2 (Riemann D et al., 1997); 3 (Ramsauer M et al., 1998); 4 (Lucius R et al., 1995); 5 (Ishii E et al., 1995); 6 (Welch PA et al., 1990); 7 (Rohrbach MS et al., 1991).

Enzym	Enzymlokalisation	Stimulatoren des Effektes	Antwortende Zellen	Benötigte Zeit	Zell-Zell Kontakt benötigt ?	Quelle
APN	Plasma-membran	Knochenmark Stroma-Zellen	B-Zell Vorstufen	Tage	Ja	1
APN	Plasma-membran	SFC, Monozyten, HUVEC u.a.	B- und T- Zellen	min - h	Ja	2
APN	Plasma-membran	Endothelzellen	Perizyten	Tage	teilweise	3
APN	Plasma-membran	Astrozyten	Mikroglia			4
Neprilysin CD10	Plasma-membran	Knochenmark Stroma-Zellen	B-Zell Vorstufen	Tage	Ja	5
Glutamyl- aminopepti- dase	Plasma-membran	Knochenmark Stroma-Zellen	B-Zell Vorstufen	Tage	Nein ?	6
Angiotensin converting enzyme	Plasma-membran	T-Zellen	Monozyten	Tage	?	7
Leucinami- nopeptidase	Zytosol	T-Zellen	Monozyten	Tage	?	7

ECM-Strukturen scheinen in der Membranenzymregulation durch Zell-Zell-Kontakt ebenfalls eine Rolle zu spielen und es gibt – im Gegensatz zu APN – Membran-enzyme, die allein durch Kontakt mit ECM-Strukturen regulierbar sind, wie z. B. die Induktion von Tissue factor durch Fibronektin in der monozytären THP1-Zelllinie (McGilvray ID et al., 1997).

4.2.2.1. Zell-Zell-Kontakt mit SFC führt zu lymphozytärer APN-Expression

Innerhalb des rheumatischen Pannus finden sich synoviale Lymphozyten in engem Kontakt mit HLA-DR tragenden Makrophagen und SFC (Kobayashi et al., 1973). Untersuchungen der T-Zell-SFC-Interaktionen *in vitro* zeigten, dass Lymphozyten mit ihren Pseudopodien enge Kontaktareale ausbilden, in denen sich fibrilläre und mikrotubuläre Strukturen senkrecht zur Kontaktebene ausbilden, vergleichbar zu desmosomalen Strukturen (Holoshitz J et al., 1991). Zell-Zell-Kontakt aktiviert verschiedene Kinasen, unter ihnen die fokale Adhäsionskinase p125^{FAK} (Schlaepfer DD et al., 1999). Diese zytoplasmatische Tyrosinkinase scheint ein Konvergenzpunkt verschiedener Signalwege zu sein, darunter der Signalinduktion zum einen durch Adhäsion und zum anderen durch Substrate von Membranpeptidasen, die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren abläuft.

Innerhalb von 30-60 min eines Kontaktes von Lymphozyten mit SFC kommt es zur lymphozytären Expression von APN-Protein bei heraufregulierter APN-mRNA. Je dichter die SFC waren, umso stärker ausgeprägt war der Effekt, was u. a. daran liegen könnte, dass konfluente SFC im Gegensatz zu subkonfluenten Kulturen in hoher Menge das Adhäsionsmolekül CD54/ICAM-1 tragen sollen (Tanaka Y et al., 2000). Da Fixierung der SFC mit Paraformaldehyd die Ergebnisse der lymphozytären APN-Induktion kaum verändert, muss es sich um eine aktive Leistung der Lymphozyten handeln. Luciferase-Assays von Dr. A. Kehlen zeigten, dass Kontakt von Lymphozyten mit Membranfraktionen aus SFC zu einem Aktivitätsanstieg des myeloischen Promotors führt (Kehlen A et al., 2000B). Trotzdem ist die APN-Expression auf den adhären wachsenden Zellen wichtig für die Induktion von APN auf Lymphozyten, denn mit APN-negativen adhären Zellen konnte nie eine Induktion beobachtet werden. Ein bislang unbekannter Ligand auf T-Zellen könnte während des Zell-Zell-Kontaktes an die APN von SFC binden. Als *in vivo*-Situation vergleichbar wäre der hohe Anteil APN-positiver T-Zellen in hellzelligen Nierentumoren (APN-positiv) verglichen mit dem deutlich geringeren Anteil APN-positiver T-Zellen in chromophoben Nierentumoren (APN-negativ). Caco-2-Zellen (Kolonkarzinom) sind die einzigen APN-positiven Zellen, die in unseren Versuchen kaum zur lymphozytären APN-Induktion führten. Das könnte daran liegen, dass die Zellen im Verband eine sehr heterogene Expression verschiedener Membranenzyme, darunter auch APN, aufweisen, obwohl intrazelluläre Speicher vorhanden sind (Howell S et al., 1993). Lösliche APN bindet nicht an Lymphozyten: T-Zellen koinkubiert mit ECV-Zellen, die eine APN-Form ohne Membrananker sezernieren, trugen nie APN nach Zell-Zell-Kontakt.

Wie andere Autoren verwendeten wir allogene Kombinationen von T-Zellen und SFC, weil SFC eine allogene gemischte Lymphozytenkultur nur sehr schwach stimulieren können sollen (Tsai C et al., 1996).

Aus der Literatur gibt es einige Hinweise darauf, dass APN in Zell-Zell-Kontakten eine wichtige Rolle spielt. In konfluenten Melanomzellkulturen sammelt sich APN an den Zell-Zell-Kontaktstellen an (Menrad A et al., 1993). APN-spezifische Antikörper unterdrücken eine erhöhte IL-6-Synthese in den Kulturüberständen von Kokulturen aus Monozyten und SFC (Chomarat P et al., 1995). Wir konnten dieses Ergebnis bestätigen, allerdings war nach Behandlung allein von SFC mit dem APN-spezifischen WM-15-mAk bereits die IL-6-Synthese der SFC gehemmt, während dieser Antikörper in ähnlichen Versuchen mit Monozyten die Zytokinsynthese stimulierte (nicht gezeigt). APN-spezifische Antikörper hatten eine hemmende Wirkung auf die lymphozytäre APN-Expression nach Zell-Zell-Kontakt, konnten diese jedoch nie völlig verhindern. In Zusammenarbeit mit Dr. T Stange aus der HNO-Klinik unserer Universität, Prof. Holzhausen aus dem Pathologischen Institut und Frau Dr. U. Kettmann vom Institut für Physiologische Chemie entstanden elektronenmikroskopische Aufnahmen, die APN auf T-Zellen besonders auf den Pseudopodien zeigen (Abb. 28), was für eine Rolle im Zell-Zell-Kontakt spricht.

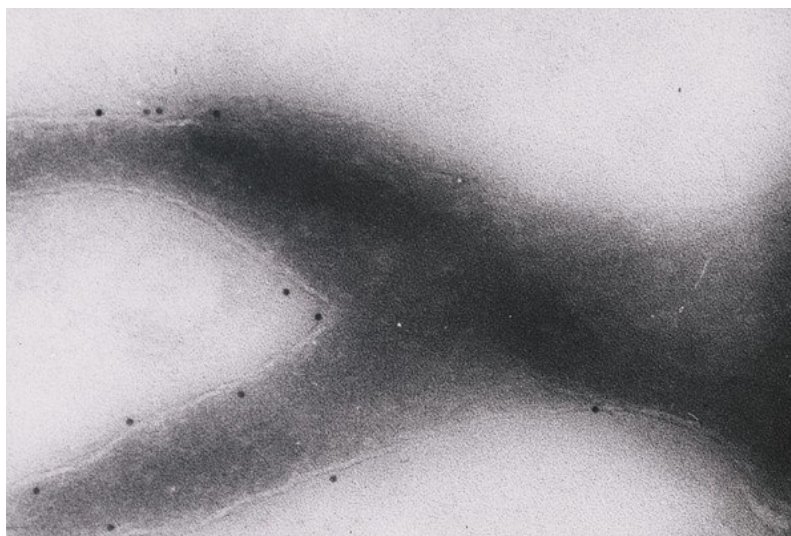


Abb. 28: Immunmarkierung (mit einem CD13-mAk und einem Anti-Maus-Antikörper mit 12 nm Goldpartikeln markiert) von ultradünnen Gefrierschnitten synovialer T-Lymphozyten, die in Gelatine eingebettet wurden. Das Bild wurde freundlicherweise von Frau Dr. Kettmann (Institut für Physiologische Chemie) zur Verfügung gestellt. Vergrößerung: ca. x 80 000.

Mitogene potenzieren deutlich die lymphozytäre APN-Expression nach Zell-Zell-Kontakt, wofür es zwei Ursachen geben könnte: Zum einen wird die Synthese von APN-mRNA erhöht, zum anderen wird die Zelladhäsivität der Lymphozyten verbessert. Cytochalasine, die als Inhibitoren der Polymerisation der Mikrofilamente (Maclean-Fletscher S et al., 1980) den Zytoskelettbau beeinträchtigen, hemmen die APN-Induktion tonsillärer Lymphozyten. Unsere Ergebnisse zeigen weiterhin eine deutliche Steigerung der lymphozytären APN-Expression beim Zell-Zell-Kontakt mit SFC im Kollagengel. Das Ergebnis deutet auf einen kostimulierenden Effekt der Signalübermittlung durch Integrine auf den Kokultureffekt. In Arbeiten auf mRNA- und Promotorebene konnte Frau Dr. A. Kehlen keinen deutlichen induzierenden Effekt von alleiniger Kollagen-I-Inkubation auf die Induktion von APN in Lymphozyten nachweisen (Kehlen A et al., 2000B), was nicht ausschließt, dass ECM kostimulatorisch wirkt. Andererseits könnten SFC im Kollagengel andere Eigenschaften zeigen, als wenn sie adhärirt auf Gelatine-beschichteten Kulturgefäßen wachsen. Sie bilden z. B. im Gel lange Fortsätze aus und besitzen damit für Lymphozyten mehr Kontaktfläche. Fibroblasten erhalten außerdem im Gel spezielle Eigenschaften: Sie adhäririeren an die Kollagenfasern und kontrahieren das erst lockere Gel zu einer dichten gewebeartigen Struktur. Die Zellen teilen sich nicht mehr, ihre Kollagensynthese ist herabgesetzt, während es zu einem Anstieg der Bildung von verschiedenen Kollagenasen (MMP-1, MMP-13 u a.) kommt (Ravanti L et al., 1999). Gleichzeitig sind MAP-Kinasen aller 3 Klassen (Erk, Jun, p38) aktiviert (Übersicht siehe Ravanti L et al., 1999). Für SFC gibt es erste Untersuchungen im 3-dimensionalen Kollagengel (Taguchi K et al., 1997), wenn auch nicht zu Zell-Zell-Kontakteffekten oder Membranenzymbesatz.

Da Cholesterolentzug durch Cyclodextrinbehandlung der SFC hemmend auf den Prozess der lymphozytären APN-Induktion nach Zell-Zell-Kontakt wirkt, ist die Lokalisation von APN in Rafts und/oder Caveolae als speziellen Cholesterol-reichen Membranmikrodomänen ein wichtiger Punkt. Membranmikrodomänen haben wichtige Funktionen in Zell-Zell-Kontaktstellen, z. B. sind tight junctions selbst Membranmikrodomänen (Nusrat A et al., 2000). Zell-Zell-Kontakt moduliert außerdem die subzelluläre Verteilung von Caveolin-1 als einem Markerprotein der Caveolae, das sich in Zell-Zell-Kontakt-Gebieten anreichert (Volonte D et al., 1999). Bisher fehlen Informationen, ob die Lokalisation von APN in den adhärenen Zellen in Rafts oder in Caveolae mit funktionellen Konsequenzen verbunden ist.

Auch wenn Zell-Zell-Kontakt von Lymphozyten mit SFC zu einem raschen Anstieg der Promotoraktivität und der lymphozytären APN-mRNA führt, können wir nicht vollständig ausschließen, dass es zusätzliche Mechanismen gibt, die zu solch schneller lymphozytärer APN-Expression führen. Denkbar wäre zum einen die Umverteilung intrazellulär gespeicherter APN aus Lymphozyten auf die Membran, ähnlich der schnellen Freisetzung von APN durch die Komplementkomponente C5a in Granulozyten (Werfel T et al., 1991) [diskutiert auch von Lendeckel U und Mitarbeitern bei einer Mitogen-induzierten lymphozytären APN-Expression (1997)]. Zum anderen möglich wäre eine Aufnahme APN-enthaltender Vesikel aus SFC durch Lymphozyten. Das ‚Shedden‘ von Membranvesikeln in den extrazellulären Raum ist ein häufig beobachtetes Phänomen sowohl normaler Zellen als auch von Tumorzellen (Daniak N, 1991). Es ist ein energieabhängiger Prozess, der der RNA- und Proteinsynthese bedarf. In den Vesikeln gibt es keinen Hinweis auf zytosolische Proteine oder Zellorganellen, jedoch wurden neben MHC- und Adhäsionsmolekülen zahlreiche Proteinase entdeckt (Dolo V et al., 1998). Die Vesikelfreisetzung scheint aus selektierten Plasmamembranabschnitten zu erfolgen, in denen sich spezifische Moleküle für Zelladhäsion (β 1-Integrine), Proteolyse (Matrixmetalloproteasen) und Antigen-präsentation (HLA-Moleküle) finden. Aus der Literatur bekannt ist die Übergabe von Lipidbestandteilen und APN aus Prostatosomen, 150-200 nm großen Membranvesikeln freigesetzt aus der Prostata, auf Spermien (Arienti G et al., 1997). Für Lymphozyten ist weiterhin bekannt, dass sie während der transendothelialen Migration endotheliale Moleküle erwerben (Brezinschek RI et al., 1999) und dass sie im Verlauf eines Kontaktes über den TCR, B-Zellrezeptor oder CD28 selektiv Membranmoleküle aus Antigen-präsentierenden Zellen aufnehmen können (Hwang I et al., 2000; Batista FD et al., 2001), wobei diese erworbenen Moleküle funktionell aktiv sind (z.B. B7-1/CD80; Sabzevari H et al., 2001). Für unsere Versuche müsste, wenn es sich um eine Übergabe von Membranabschnitten aus SFC handeln sollte, gefordert werden, dass sich diese durch Paraformaldehydfixierung nicht beeinträchtigen lässt [die Paraformaldehydfixierung von Antigen-präsentierenden Zellen soll die Übergabe von B7 an T-Zellen stark beeinträchtigen (Hwang I et al., 2000)]. Die Aktivierung des APN-Promotors und der Anstieg von APN-mRNA sprechen gegen eine alleinige Übergabe.

4.2.2.2. Zell-Zell-Kontakt als Modell für in vivo-Situationen

4.2.2.2.1. Zell-Zell-Kontakt zwischen Lymphozyten und Fibroblasten/SFC

Chronische Entzündungsreaktionen sind oft charakterisiert durch eine Ansammlung von Entzündungszellen im extravaskulären Bindegewebe. Lymphozyten können so direkt mit

stromalen Zellen interagieren. Fibroblasten ihrerseits bleiben nicht passive Zuschauer, sondern nehmen durch ihren Einfluss auf Lymphozyten direkt am Entzündungsgeschehen teil. Die rheumatoide Synovitis ist z. B. charakterisiert durch eine Infiltration mononukleärer Zellen und eine Zunahme der Synoviozyten, die essentiell sind für die Zerstörung von Knorpel und Knochen. Man kann in Einzelsuspensionen von T-Zellen und SFC in Anwesenheit von IL-2 und Mykobakterienextrakt Pannus-ähnliche Gewebearrangungen induzieren (Holoshitz et al., 1991). SFC tragen funktionelle IL-2-Rezeptoren (β - und γ -Kette) und produzieren nach IL-2-Stimulation das chemotaktische Peptid MCP (monocyte chemoattractant protein)-1 (Corrigall VM et al., 2001). Die Wechselwirkung von T-Lymphozyten mit SFC *in vitro* führt zu einer Anhäufung von TNF- α , IFN- γ sowie IL-6 im Kulturüberstand sowie zur erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1/CD54 und VCAM/CD106 auf den SFC (Bombara MP et al., 1993). Schon ruhende T-Zellen sollen SFC zur IL-6-, IL-8- und Stromelysinsynthese anregen können (Yamamura Y et al., 2001). Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen außerdem, dass T-Zellen nach Zell-Zell-Kontakt mit Fibroblasten bzw. mit SFC-Membranfraktionen IL-17 und IL-17-Rezeptor heraufregulieren (Thiele K et al., 2000). IL-17, ein Zytokin aus CD4+CD45RO+-Zellen, kann über seinen Rezeptor einen Anstieg von IL-6, IL-8 und Prostaglandin E₂ in SFC induzieren (Fossiez F et al., 1996). Einen Anstieg der lymphozytären IL-8-mRNA-Synthese nach Kontakt mit SFC bestätigen ebenfalls Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe. Bereits nach 10 Minuten eines Zell-Zell-Kontaktes lässt sich in Lymphozyten ein Anstieg phosphorylierter p42/p44-MAP-Kinasen im Westernblot nachweisen. Dagegen zeigten Untersuchungen von Frau Dr. Kehlen mit Hilfe quantitativer RT-PCR keinen Anstieg der mRNA der in der Regulation der APN-Transkription beteiligten Transkriptionsfaktoren c-ets-1 und -2 sowie Myb (Riemann D et al., 2000).

Fibroblasten scheinen ruhende T-Lymphozyten nicht zur Proliferation bringen zu können. Bereits ältere Untersuchungen zeigen aber, dass Inkubation von mit IL-2 kultivierten T-Zellen auf Fibroblasten zu einem verlängerten Überleben dieser bei fehlender Proliferation führt (Scott S et al., 1990). Signale stromaler Zellen erlauben das Verbleiben aktivierter T-Zellen in einem Ruhezustand (Gombert W et al., 1996). Knochenmarkstromazellen bieten ein essentielles Mikroklima besonders für die B-Lymphozytenreifung. Dabei spielt sowohl direkter Zellkontakt eine Rolle als auch die Synthese einer Vielzahl von Zytokinen (wie IL-4, IL-7, TGF- β) (Kinkade et al., 1993). In Entzündungsgebieten tragen Fibroblasten oft als Ergebnis ihrer Interaktion mit IFN- γ -produzierenden T-Zellen MHC-Klasse-II-Moleküle. Verschiedene Arbeiten zeigten die Fähigkeit zur Antigenpräsentation von solchen Klasse-II-positiven Fibroblasten (Umetsu

DT et al., 1986). T-Zellkontakt führt außerdem zur gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen auf SFC (Bombara MP et al., 1993). Mehrere Autoren befassen sich mit der Adhäsion von Lymphozyten an Fibroblasten, u. a. als Modell zum Studium der Wechselwirkung zwischen dem leukozytären Integrin LFA-1 (CD11a/CD18) und ICAM-1/CD54 (Cabanas C et al., 1991). T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut binden nur spärlich an unbehandelte humane SFC. Steigern lässt sich diese Bindung durch Zytokinbehandlung der SFC, besonders mit IFN- γ , aber auch mit TNF- α und IL-1 β (Krzesicki RF et al., 1991). Die Autoren finden, dass die Adhäsionssteigerung mit dem Anstieg von ICAM-1/CD54-Molekülen auf SFC korreliert, dass aber außer ICAM-1/CD54 und seinem Ligand CD11a/CD18 noch andere Adhäsionsmoleküle beteiligt sein müssen. Zu diesen anderen Molekülpaaren könnten der Schaferythrozytenrezeptor CD2 auf T-Zellseite und LFA-3/CD58 bzw. das GPI-gekoppelte Molekül CD59 gehören. Andere Möglichkeiten der Bindung von Lymphozyten an Fibroblasten wären homophile Wechselwirkungen des relativ ubiquitär vorkommenden Moleküls CD147/EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) (Sun J et al., 2001). Fibroblasten synthetisieren auch verschiedene ECM-Bestandteile, an die Lymphozyten binden können. Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS), eine der Fibronectinbindesequenzen (Ligand VLA auf T-Zellen), vermag jedoch nicht die Bindung von Milzlymphozyten an Hautfibroblasten zu hemmen (Abraham D et al., 1989).

4.2.2.2.2. Zell-Zell-Kontakt zwischen Lymphozyten und Endothelzellen

Die Extravasation mononukleärer Zellen, besonders Lymphozyten, in perivaskuläre Gewebe ist ein kritischer Schritt in der Entwicklung und dem Fortschreiten einer Entzündung. Indem Endothelzellen Adhärenz und Extravasation der Entzündungszellen beeinflussen, werden sie zu bedeutenden Regulatoren einer Entzündungsreaktion. Ein Initialereignis einer Migration von T-Zellen in das Gewebe ist ihre Adhäsion an Endothelzellen der postkapillären Venulen. Endothelzellen regulieren sowohl den Durchtritt intrinsisch migratorischer T-Zellen in Darm, Haut, Lunge als auch an Orte einer Gefäßentzündung.

Es gibt eine Vielzahl von Arbeiten über Moleküle, die in die lymphozytäre Migration durch Endothelzellen involviert sind. Auch Membranpeptidasen sind beteiligt an der Migration von Lymphozyten durch Endothelzellmonolayer. CD45RO-positive T-Zellen, die DPIV/CD26 in starker Intensität tragen, sollen *in vitro* ohne zusätzlichen Chemokingradienten bevorzugt durch HUVEC (human umbilical vein endothelial cell)-Monolayer migrieren, wobei ein Molekül 4C8 auf T-Zellen eine wichtige Rolle spielt

(Masuyama J et al., 1999). DPIV/CD26-negative T-Zellen adhären zwar, migrieren jedoch nicht. Unsere Ergebnisse implizieren, dass ein Durchwandern einer Gefäßwand ausreicht hinsichtlich einer lymphozytären APN-Induktion, sie aber nicht zwangsläufig induziert. Unsere *in vitro*-kultivierten Endothelzellen aus Nabelschnurvenen exprimieren APN. Jüngste Untersuchungen gehen jedoch *in vivo* von einer APN-Expression nur auf Endothelzellen von angiogenetischen Gefäßen aus (Pasqualini R et al., 2000). Ungeklärt bleibt, inwieweit Lymphozyten *in vivo* durch den Kontakt mit APN-positiven Perizyten zu einer APN-Expression angeregt werden können.

4.2.2.3. Peptidasenregulation durch Zell-Zell-Kontakt während der hämatopoetischen Reifung

Die lymphozytäre Reifung in den primären Lymphorganen erfolgt offensichtlich in einer Umgebung, in der Membranpeptidasen sowohl auf Stromazellen als auch auf Lymphozyten eine wichtige Rolle spielen. Die Expression von Membranpeptidasen auf stromalen Zellen von Knochenmark und Thymus ist eine wichtige Eigenschaft für die Reifung lymphatischer Vorläuferzellen. So wachsen B-Zellen in einer Mikroumgebung heran, in der Neprilysin/CD10 sowohl auf stromalen Zellen vorkommt als auch auf den B-Zellvorläufern, die sich in engem Kontakt zu den stromalen Zellen befinden (Ishii et al., 1995). Nach Hemmung des Enzyms in fetalen Thymusorgankulturen kommt es zur verzögerten Thymozytenreifung (Guerin S et al., 1997). Knochenmarkstromazellen tragen weiterhin Glutamylaminopeptidase und induzieren auf den eng adhären B-Zellvorstufen sowohl Proliferation als auch die Expression dieses Membranenzym (Welch PA et al., 1990). Dagegen bewirken (die auch APN-tragenden) Stromazellen eine Herabregulation von APN auf lymphozytären Vorstufen nach engem Zell-Zell-Kontakt (Saito M et al., 1995).

Bisher sind physiologische Substratpeptide, die für die Reifung lymphozytärer Vorstufen erforderlich sind, nicht bekannt. Da jedoch z. B. Ligandierung von Neprilysin/CD10 durch mAk für eine intrazelluläre Signalübermittlung in eine Zelle mit Phosphorylierung verschiedener Src-verwandter Kinasen ausreicht (Ganju RK et al., 1996), könnte auch die Bindung der Membranenzyme an bisher unbekannte Liganden wichtig für die lymphozytäre Reifung sein. Hinweise liefern jüngste Literaturdaten, die ein Wechselspiel von FAK und Neprilysin/CD10 in Prostatakarzinomzellen zeigen (Sumitomo M et al., 2000). Tumorzellen mit Expression von Neprilysin/CD10 sind weniger migratorisch, u. a., weil Neprilysin migrationsfördernde Peptidmediatoren inaktiviert. Das enzymatisch inaktive Enzym hat jedoch ähnliche Wirkung. Die Autoren spekulieren, dass der

Komplex aus Nephilysin und der phosphorylierten Src-Kinase Lyn die 85 kDa-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase bindet und an einer Assoziation mit FAK (migrationsfördernde Wirkung) hindert.

4.3. Assoziation von APN u. a. Membranpeptidasen in Membranmikrodomänen

In den letzten Jahren wurde klar, dass in wahrscheinlich allen Zellen die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran Mikrodomänen enthält, die sich durch eine selektive Anreicherung von speziellen Membranproteinen auszeichnen und die besonders reich an Glykosphingolipiden, Sphingomyelin und Cholesterol sind. Man kann sich diese vereinfachend als flüssigkristalline Inseln schwimmend im Meer von Phospholipiden vorstellen. Im englischen Schriftgut werden diese Mikrodomänen „Rafts“ genannt, andere Bezeichnungen sind „GPI-Molekül-angereicherte“ oder „Detergenz-unlösliche“ Mikrodomänen (Übersicht in: London E et al., 2000; Stahlhut M et al., 2000). Raft-assoziierte Proteine wie die GPI-verankerten Oberflächenproteine oder die acylierten Src-Kinasen sind bei geringen Temperaturen in nicht-ionischen Detergentien unlöslich und bleiben assoziiert mit trilamellaren Vesikeln, die von den gelösten Membranbestandteilen über Gewicht oder Größe getrennt werden können. Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET)-Untersuchungen und chemisches Kreuzvernetzen von GPI-gekoppelten Proteinen lassen eine Größe der Rafts unter 70 nm vermuten (Varma R et al., 1998), mit maximal 15 Proteinmolekülen pro Insel (Friedrichson T et al., 1998). Die bereits vor 48 Jahren von Palade (Palade GE et al., 1953) beschriebenen Caveolae als sackförmige Einstülpungen in Endothelzellen sind eine Caveolin-enhaltende Sonderform von Membranmikrodomänen mit separaten Membranmolekülen und evt. eigenständiger Funktion (siehe Abb. 29). Caveolae fehlen u. a. in Leukozyten (Fra AM et al., 1994), ansonsten können Rafts und Caveolae in Zellen nebeneinander vorkommen. Rafts und Caveolae enthalten Moleküle der Signaltransduktion (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit 7-Transmembrandomänen, Kalziumkanäle, Src-Kinasen u. a.) und sind beteiligt in der Organisation und Kompartimentierung von Signalwegen, aber auch im Cholesterolfstoffwechsel und in Endo-und Exozytosevorgängen.

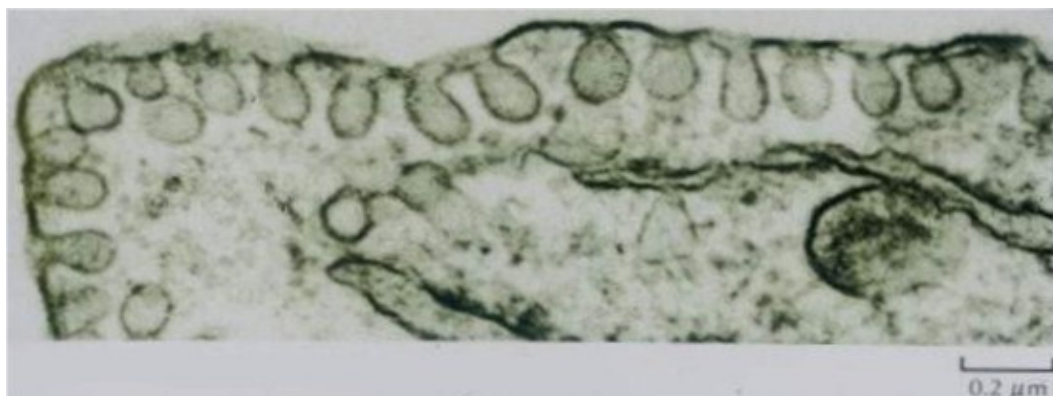


Abb. 29: Elektronenmikroskopische Darstellung von Caveolae in Fibroblasten. Bild wurde entnommen aus G. M. Cooper, *The Cell*, ASM Press 1997, S. 497

Membranmikrodomänen zeigen eine Anreicherung von GPI-verankerten Membranmolekülen (LPS-Rezeptor/CD14, 5'Nucleotidase/CD73, Komplement-Schutzfaktor/CD59, Urokinaserezeptor/CD87), können aber auch bestimmte transmembranöse Moleküle enthalten, z. B. Membranrezeptoren für Bradykinin oder Membranpeptidasen. In Monozyten wurden Komplexe aus β_2 -Integrinen (CD11a/CD18 und CD11b/CD18), Urokinaserezeptor/CD87 und den 4 Tyrosinkinase *fyn*, *lyn*, *hck* und *fgr* als Raft-assoziiert beschrieben (Bohuslav J et al., 1995). Solche Komplexe rekrutieren als „fokale Kontaktstellen“ Signal-übermittelnde Moleküle an den Ort von Zell-Zell- oder Zell-ECM-Adhäsionen und können die Zellmigration durch Gewebe erleichtern. Der Urokinaserezeptor/CD87 ist ebenfalls Bestandteil von Caveolae (Stahl A et al., 1995). In Endothelzellen verursacht Urokinase über den Rezeptor Phosphorylierungen an FAK, der in fokalen Adhäsionsorten angereicherten Proteine Paxillin und p130^{cas} sowie der MAP-Kinasen (Tang H et al., 1998). Dieses Aktivierungsmuster zeigt, dass die Besetzung des Urokinaserezeptors/CD87, eventuell über Clustering der Rezeptoren und Ansammlung in den Caveolae, die in Adhäsionsvorgängen beteiligten Signale erleichtert und Zellmigration über den ansteigenden Umsatz fokaler Kontaktpunkte erleichtert.

Die Lokalisation von APN in Rafts wurde bisher in Nierenepithel (Danielsen EM et al., 1995) und Monozyten gezeigt (Navarrete Santos A et al., 2000B). Jüngste Arbeiten unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit der Gruppe von E.M. Danielsen zeigen erstmalig, dass Membranpeptidasen wie APN, Neprilysin/CD10 und DPPIV/CD26 auch in Rafts und Caveolae von SFC vorkommen können (Riemann D et al., 2001), wobei die funktionellen Auswirkungen dieser Assoziation bisher unbekannt bleiben. Untersuchungen zur APN-assoziierten Funktion sind durch Zerstörung der Membranmikrodomänen mit Cholesterol-bindenden Substanzen, wie Filipin, Nystatin,

Digitonin und Cyclodextrin, denkbar (Ilangumaran S et al., 1998). Während Filipin und Nystatin globuläre multimere Ablagerungen in der Membran verursachen, wirkt Cyclodextrin nur auf der Zelloberfläche und schließt die aus der Membran extrahierten Cholesterolemoleküle in eine zentrale Kavität gebildet aus zyklischen Oligomeren aus Glucopyranosid in α -1,4 glykosidischer Bindung ein (Pitha J et al., 1988). Bisher gibt es nur wenige Arbeiten, die sich mit den Auswirkungen eines Cholesterolentzuges in Bezug auf Membranpeptidasen befassen: Danielsen und Mitarbeiter untersuchten den Effekt eines Cholesterolentzuges durch Cyclodextrinbehandlung auf die APN-Biosynthese in Enterozyten (Hansen GH et al., 2000). Die Autoren fanden neben einer Zerstörung des Golgi-Komplexes eine langsamere Reifung von APN gepaart mit einem falschen Sortieren, da APN teilweise basolateral exprimiert wurde. In unseren Versuchen konnte Cyclodextrinbehandlung der SFC deren durchflusszytometrisch ermittelte APN-Expression sowie deren Ala-pNA-spaltende Enzymaktivität nicht signifikant verändern. Andererseits verringerte Cyclodextrin-Behandlung signifikant die Expression von CD59 als GPI-verankertem Molekül. Versuche von Dr. Navarrete Santos mittels Gradientenzentrifugation zeigten, dass APN nach Cyclodextrinbehandlung zu einem deutlich geringeren Anteil in den Raft-assoziierten Membranfraktionen nachweisbar war (Riemann D et al., 2001), sprechen also für eine Umverteilung des Enzyms innerhalb der Membran. Für CD59 muss man dagegen eine mit dem Cholesterolentzug einhergehende Verarmung der Zellen an dem Molekül annehmen.

Unser Ergebnis, dass Cyclodextrinbehandlung der SFC die lymphozytäre APN-Expression nach Zell-Zell-Kontakt vermindert, weist darauf hin, dass Membranmikrodomänen eine wichtige Rolle hierbei spielen. Da APN-Expression der SFC ebenfalls eine Voraussetzung für die lymphozytäre APN-Expression nach Zell-Zell-Kontakt ist, wäre es möglich, dass als Voraussetzung für den Kokultur-Effekt eine APN-Assoziation in Membranmikrodomänen der adhärennten Zellen (enger Kontakt mit bisher unbekanntem Molekül?) bzw. eine Assoziation von APN mit Cholesterol nötig ist. Vorstellbar wäre, dass nach Cyclodextrinbehandlung durch den Entzug eines GPI-gekoppelten Membranproteins (CD59?) eine feste Assoziation zwischen Lymphozyten und SFC nicht mehr möglich ist. Im Mikroskop beobachteten wir jedoch eine ähnlich feste Adhäsion von Lymphozyten an Cyclodextrin-behandelte und unbehandelte SFC. Denkbar bliebe, dass ein enger Zellkontakt zu den SFC nur an Stellen möglich ist, an denen sich Membranmikrodomänen befinden und dass Cyclodextrin insgesamt die Dichte an Membranmikrodomänen und damit die Stellen eines sehr engen Kontaktes verringert.

5. ZUSAMMENFASSUNG

APN ist ein Zink-abhängiges, ubiquitär vorkommendes Membranenzym mit vielfältigen biologischen Wirkungen. Das Enzym spaltet Peptidmediatoren u. a. aus den Gruppen der Neuropeptide und immunmodulatorischen Proteine, der Chemokine und vasoaktiven Substanzen. Auch wenn bisher Untersuchungen zur APN im Vergleich mit DPIV/CD26 einen deutlich geringeren Umfang ausmachen, gibt es doch in den letzten Jahren vielfältige Hinweise auf biologisch interessante Aspekte dieser Peptidase, sei es als Rezeptor für Corona- und Zytomegalie-Virus, in der Leukämietypisierung als myeloischer Marker auf lymphozytären Zellen, in der Antigenpräsentation oder in der Tumormigration. Das Interesse an APN-Inhibitoren als potenten pharmakologischen Mediatoren entstammt der APN-Spaltung analgetisch wirksamer Opioidpeptide. Inhibitoren von APN und Neprilysin/CD10 blockieren komplett den Enkephalinabbau und haben deshalb stark schmerzhemmende Wirkung.

APN ist kein wirklicher myeloischer Marker, da auch Lymphozyten in verschiedenen Geweben außerhalb des peripheren Blutes APN exprimieren können. Dabei scheinen Entzündungen eine wichtige Rolle zu spielen. Wir nehmen an, dass APN unter normalen Bedingungen eher in geringer Menge auf Lymphozyten gefunden wird und einen „Aktivierungs-assoziierten“ Marker darstellt, der stattgehabten Zell-Zell-Kontakt anzeigt, wobei die genauen Erfordernisse für eine lymphozytäre APN-Induktion nach Zell-Zell-Kontakt noch zu definieren sind. Ein besonders hohes Vorkommen APN-tragender T-Zellen fand sich in entzündlicher Synovialflüssigkeit/Pannusgewebe sowie in Nierentumoren. Da sich TIL in Bronchialkarzinomen und Nierentumoren außer in ihrer Fähigkeit zur APN-Expression in einer Reihe von Membranmolekülen (HLA-DR, CD25, CD11b, CD54 usw.) unterscheiden, muss man funktionelle Unterschiede implizieren.

Die Expression von Membranpeptidasen wie APN, DPIV/CD26 und Neprilysin/CD10 lässt sich durch Zytokine, wie IL-4, Interferone oder TGF- β regulieren, wobei es sich in der Regulation durch ein Zytokin zwischen den verschiedenen Enzymen nicht immer um gleichsinnige Effekte handelt. So sind Musterbildungen in der Peptidasenexpression denkbar, die funktionelle Konsequenzen haben könnten. Membranpeptidasen können eine Reihe biologisch aktiver Peptidsubstrate spalten und damit aktivieren, inaktivieren oder in ihrer Rezeptorbindung und Funktion modulieren. Inzwischen gibt es auch Hinweise auf eine direkte Signalauslösung über diese Membranproteine, die mit der Lokalisation von Membranpeptidasen in Mikrodomänen (Rafts/Caveolae) zusammenhängen könnte.

Direkter Zell-Zell-Kontakt von Lymphozyten und SFC bzw. einigen anderen Zelltypen führt zu einer lymphozytären Expression von APN, ein Ergebnis, das die Anwesenheit APN-positiver Lymphozyten in verschiedenen Lokalisationen außerhalb des peripheren Blutes erklären kann und das sich einreicht in ähnliche Beobachtungen mit sehr verschiedenen Membranenzymen. Da Fixierung der SFC mit Paraformaldehyd die Ergebnisse zur lymphozytären APN-Induktion kaum verändert, muss es sich um eine aktive Leistung der Lymphozyten handeln. Trotzdem ist die APN-Expression auf den adhären wachsenden Zellen wichtig für die Induktion von APN auf Lymphozyten, denn mit APN-negativen adhären Zellen konnte nie eine Induktion beobachtet werden. Lymphozyten zeigen nach Zell-Zell-Kontakt mit SFC eine gesteigerte APN-Promotoraktivität und APN-mRNA. Trotzdem lässt sich der Effekt mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid nicht vollständig hemmen. Mitogene und Kontakt mit ECM fördern die lymphozytäre APN-Expression nach Zellkontakt mit SFC, während Cholesterolentzug durch Cyclodextrin hemmend wirkt. Der letzte Punkt könnte für die Wichtigkeit der Anwesenheit von APN in Rafts und Caveolae der SFC für die lymphozytäre APN-Expression nach Zell-Zell-Kontakt sprechen.

6. LITERATUR

- Abbott CA, Yu DM, Woollatt E, Sutherland GR, McCaughan GW und Gorrell MD (2000) Cloning, expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog, DPP8. *Eur J Biochem* **267**, 6140-6150
- Abraham D, Ince T, Muir H und Olsen I (1989) Fibroblast matrix and surface components that mediate cell-to-cell interaction with lymphocytes. *J Invest Dermatol* **93**, 335-340
- Allen JB, Manthey CL, Hand AR, Ohura K, Ellingsworth L und Wahl SM (1990) Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor beta. *J Exp Med* **171**, 231-47
- Angelisova P, Drbal K, Horejsi V und Cerny J (1999) Association of CD10/neutral endopeptidase 24.11 with membrane microdomains rich in glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins and lyn kinase. *Blood* **93**, 1437-1439
- Antczak C, De Meester I I und Bauvois B (2001) Ectopeptidases in pathophysiology. *BioEssays* **23**, 251-260
- Aoyagi T, Yoshida S, Nakamura Y, Shigihara Y, Hamada M und Takeuchi T (1990) Probestin, a new inhibitor of aminopeptidase M, produced by *Streptomyces azureus* MH663-2F6. I. Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J Antibiot* **43**, 143-148
- Appelboom T, de Maertelaer V, de Prez E, Hauzeur JP und Deschodt-Lanckman M (1991) Enkephalinase: a physiologic neuroimmunomodulator detected in the synovial fluid. *Arthritis Rheum* **34**, 1048-1051
- Arienti G, Carlini E, Verdacchi R, Cosmi EV und Palmerini CA (1997) Prostate to sperm transfer of CD13/aminopeptidase N (EC 3.4.11.2). *Biochim Biophys Acta* **1336**, 533-538
- Balog T, Marotti T, Abramic M, Svoboda-Beusen I und Hrsak I (1999) The role of aminopeptidase N in Met-enkephalin modulated superoxide anion release. *Immunopharmacology* **41**, 11-20
- Barrett AJ: Membrane alanyl aminopeptidase. In A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner eds., *Handbook of proteolytic enzymes*, Academic Press, London, 1998A, pp. 996-1000
- Barrett AJ: Glutamyl aminopeptidase. In A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner eds., *Handbook of proteolytic enzymes*, Academic Press, London, 1998B, pp. 1002-1005
- Batista FD, Iber D und Neuberger MS (2001) B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature* **411**, 489-494

- Benayahu D, Fried A, Shamay A, Cunningham N, Blumberg S und Wientroub S (1994) Differential effects of retinoic acid and growth factors on osteoblastic markers and CD10/NEP activity in stromal-derived osteoblasts. *J Cell Biochem* **56**, 62-73
- Berpohl F, Löster K, Reutter W und Baum O (1998) Rat dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) exhibits endopeptidase activity with specificity for denatured fibrillar collagens. *FEBS Lett* **428**, 152-166
- Bernhardt K (1997) Flow cytometry for extensive thoracic diagnosis. *Acta Med Austriaca* **24**, 5-7
- Bhagwat SV, Lahdenranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R und Shapiro LH (2001) CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* **97**, 652-659
- Bohuslav J, Horejsi V, Hansmann C, Stöckl J, Weidle UH, Majdic O, Bartke I, Knapp W und Stockinger H (1995) Urokinase plasminogen activator receptor, β 2-integrins, and Src-kinases within a single receptor complex of human monocytes. *J Exp Med* **181**, 1381-1390
- Bombara MP, Webb DL, Conrad P, Marlor CW, Sarr T, Ranges GE, Aune TM, Greve JM und Blue ML (1993) Cell contact between T cells and synovial fibroblasts causes induction of adhesion molecules and cytokines. *J Leukoc Biol* **54**, 399-406
- Borghaei RC, Rawlings PL Jr und Mochan E (1998) Interleukin-4 suppression of interleukin-1-induced transcription of collagenase (MMP-1) and stromelysin 1 (MMP-3) in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* **41**, 1398-1406
- Brennan FM, Chantry D, Turner M, Foxwell B, Maini R und Feldmann M (1990) Detection of transforming growth factor-beta in rheumatoid arthritis synovial tissue: lack of effect on spontaneous cytokine production in joint cell cultures. *Clin Exp Immunol* **81**, 278-285
- Brezinschek RI, Oppenheimer-Marks N und Lipsky PE (1999) Activated T cells acquire endothelial cell surface determinants during transendothelial migration. *J Immunol* **162**, 1677-1684
- Cabanas C und Hogg N (1991) Lymphocyte-fibroblast adhesion. A useful model for analysis of the interaction of the leucocyte integrin LFA-1 with ICAM-1. *FEBS Lett* **292**, 284-288
- Calhoun RF II, Naziruddin B, Enriquez-Rincon F, Duffy BF, Ritter JM, Sundaresan S, Patterson GA, Cooper JD und Mohanakumar T (2000) Evidence for cytotoxic T lymphocyte response against human lung cancer: reconstitution of antigenic epitope with peptide eluted from lung adenocarcinoma MHC class I. *Surgery* **128**, 76-85

- Campbell JJ, Brightling CE, Symon FA, Qin S, Murphy KE, Hodge M, Andrew DP, Wu L, Butcher EC und Wardlaw AJ (2001) Expression of chemokine receptors by lung T cells from normal and asthmatic subjects. *J Immunol* **166**, 2842-2848
- Carrel S, Zografos L, Schreyer M und Rimoldi D (1993) Expression of CALLA/CD10 on human melanoma cells. *Melanoma Res* **3**, 319-323
- Chaperot L, Bendriss N, Manches O, Gressin R, Maynadie M, Trimoreau F, Orfeuvre H, Corront B, Feuillard J, Sotto JJ, Bensa JC, Briere F, Plumas J und Jacob MC (2001) Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **97**, 3210-3217
- Chen H, Noble F, Mothe A, Meudal H, Coric P, Danascimento S, Roques BP, George P und Fournie-Zaluski MC (2000) Phosphinic derivatives as new dual enkephalin-degrading enzyme inhibitors: Synthesis, biological properties, and antinociceptive activities. *J Med Chem* **43**, 13898-1408
- Chen H, Roques BP und Fournie-Zaluski MC (1999) Design of the first highly potent and selective aminopeptidase N (EC 3.4.11.2) inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* **9**, 1511-1516
- Chen WT (1996) Proteases associated with invadopodia and their role in degradation of extracellular matrix. *Enzym Protein* **49**, 59-71
- Chomarat P, Rissoan MC, Pin JJ, Banchereau J und Miossec P (1995) Contribution of IL-1, CD14, and CD13 in the increased IL-6 production induced by in vitro monocyte-synoviocyte interactions. *J Immunol* **155**, 3645-3652
- Chomczynski P und Sacchi N (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159
- Corrigall VM, Arastu M, Khan S, Shah C, Fife M, Smeets T, Tak PP und Panayi GS (2001) Functional IL-2 receptor beta (CD122) and gamma (CD132) chains are expressed by fibroblast-like synoviocytes: activation by IL-2 stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production. *J Immunol* **166**, 4141-4147
- Costabel U (1994) Atlas der bronchoalveolären Lavage. Georg Thieme Verlag Stuttgart. New York.
- Curnis F, Sacchi A, Borgna L, Magni F, Gaspari A und Corti A (2000) Enhancement of tumor necrosis factor α antitumor immunotherapeutic properties by targeted delivery to aminopeptidase N (CD13). *Nature Biotechnol* **18**, 1185-1190
- D'Ambrosio D, Cantrell DA, Frati L, Santoni A und Testi R (1994) Involvement of p21ras activation in T cell CD69 expression. *Eur J Immunol* **24**, 616-620
- Daniak N (1991) Surface membrane-associated regulation of cell assembly, differentiation and growth. *Blood* **78**, 264-276

- Danielsen EM (1984) Biosynthesis of intestinal microvillar proteins. Expression of aminopeptidase N along the crypt-villus axis. *Eur J Biochem* **145**, 653-658
- Danielsen EM (1995) Involvement of detergent-insoluble complexes in the intracellular transport of intestinal brush border enzymes. *Biochemistry* **34**, 1596-1605
- Danielsen EM und van Deurs B (1997) Galectin-4 and small intestinal brush border enzymes form clusters. *Mol Biol Cell* **8**, 2241-2251
- Davis LS, Cush JJ, Schulze-Koops H und Lipsky PE (2001) Rheumatoid synovial CD4+ T cells exhibit a reduced capacity to differentiate into IL-4-producing T-helper-2 effector cells. *Arthritis Res* **3**, 54-64
- Daya-Makin M, Sanghera J, Mogentale T, Lipp M, Parchomchuk J, Hogg J und Pelech S (1994) Activation of a tumor-associated protein kinase (p40TAK) and casein kinase 2 in human squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res* **54**, 2262-2268
- De Benedetti F, Falf LA, Ellingsworth LR, Ruscetti FW und Faltynek CR (1990) Synergy between transforming growth factor- β and tumor necrosis factor- α in the induction of monocytic differentiation of human leukemic cell lines. *Blood* **75**, 626-632
- Dechanet J, Merville P, Durand I, Banchereau J und Miossec P (1995A) The ability of synoviocytes to support terminal differentiation of activated B cells may explain plasma cell accumulation in rheumatoid synovium. *J Clin Invest* **95**, 456-463
- Dechanet J, Rissoan MC, Banchereau J und Miossec P (1995B) Interleukin 4, but not interleukin 10, regulates the production of inflammation mediators by rheumatoid synoviocytes. *Cytokine* **7**, 176-183
- Delmas B, Gelfi J, L'Haridon R, Vogel LK, Sjöström H, Noren O und Laude H (1992) Aminopeptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature* **357**, 417-420
- De Meester I, Korom S, Van Damme J und Scharpe S (1999) CD26, let it cut or cut it down. *Immunol Today* **20**, 367-375
- Dolo V, Ginestra A, Cassara D, Violini S, Lucania G, Torrisi MR, Nagase H, Canevari S, Pavan A und Vittorelli ML (1998) Selective localization of matrix metalloproteinase 9, beta1 integrins, and human lymphocyte antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells. *Cancer Res* **58**, 4468-74
- Dong X, An B, Salvucci Kiersteadt L, Storkus WJ, Amoscato AA und Salter RD (2000) Modification of the amino terminus of a class II epitope confers resistance to degradation by CD13 on dendritic cells and enhances presentation to T cells. *J Immunol* **164**, 129-135

- Drexler HG, Thiel E und Ludwig WD (1991) Reviews of the incidence and clinical relevance of myeloid antigen-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **5**, 637-705
- Emmrich F, Gebauer F, Weseloh G, Glückert K und Kinne R (1990) Phenotype analysis of “inflammatory“ macrophages in rheumatoid arthritis by two colour cytofluorometry and immunohistology. *Agents & Actions* **29**, 95-97
- Erdös EG und Skidgel RA (1989) Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *FASEB J* **3**, 145-151
- Falcone DJ, McCaffrey JM, McAdam K und Borth W (1995) THP-1 macrophage membrane-bound plasmin activity is up-regulated by transforming growth factor- β 1 via increased expression of urokinase and the urokinase receptor. *J Cell Physiol* **164**, 334-343
- Falk K, Rotzschke O, Stefanovic S, Jung G und Rammensee HG (1994) Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules. *Immunogenetics* **39**, 230-242
- Feng N, Lugli SM, Schnyder B, Gauchat JF, Graber P, Schlagenhaut E, Schnarr B, Wiederkehr-Adam M, Duschl A, Heim MH, Lutz RA und Moser R (1998) The interleukin-4/interleukin-13 receptor of human synovial fibroblasts: overexpression of the non-signaling interleukin-13 receptor alpha2. *Lab Invest* **78**, 591-602
- Fiorentini S, Licenziati S, Alessandri G, Castelli F, Caligaris S, Bonafede M, Grassi M, Garrafa E, Balsari A, Turano A und Caruso A (2001) CD11b expression identifies CD8+CD28+ T lymphocytes with phenotype and function of both naive/memory and effector cells. *J Immunol* **166**, 900-907
- Flynn FV (1990) Assessment of renal function: selected developments. *Clin Biochem* **23**, 49-54
- Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J und Lebecque S (1996) T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* **183**, 2593-2603
- Fra AM, Williamson E, Simons K und Parton RG (1994) Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. *J Biol Chem* **269**, 30745-30748
- Friedrichson T und Kurzchalia TV (1998) Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature* **394**, 802-805

- Funkhouser JD, Cheshire LB, Ferrara TB und Peterson RD (1987) Monoclonal antibody identification of a type II alveolar epithelial antigen and expression of the antigen during lung development. *Dev Biol* **119**, 190-198
- Ganju RK, Sunday M, Tsarwhas D, Card A und Shipp M (1994) CD10/NEP in non-small cell lung carcinomas. Relationship to cellular proliferation. *J Clin Invest* **94**, 1784-1791
- Ganju RK, Shpektor RG, Brenner DG und Shipp MA (1996) CD10/neutral endopeptidase 24.11 is phosphorylated by casein kinase II and coassociates with other phosphoproteins including the Lyn Src-related kinase. *Blood* **88**, 4159-4165
- Garreau I, Chansel D, Vandermeersch S, Fruitier I, Piot JM und Ardaillou R (1998) Hemorphins inhibit angiotensin IV binding and interact with aminopeptidase N. *Peptides* **19**, 1339-1348
- Gillis LD, Pendley DS und Funkhouser JD (1998) The major APN transcript of the alveolar type II epithelial cell originates from a unique upstream promoter region. *Biochim Biophys Acta* **1399**, 126-40
- Godar S, Horejsi V, Weidle UH, Binder BR, Hansmann C und Stockinger H (1999) M6P/IGFII-receptor complexes urokinase receptor and plasminogen for activation of transforming growth factor- β 1. *Eur J Immunol* **29**, 1004-1013
- Göhring B, Holzhausen H-J, Meye A, Heynemann H, Rebmann U, Langner J und Riemann, D (1998) Endopeptidase 24.11/CD10 is down-regulated in renal cell cancer. *Int J Mol Med* **2**, 409-414
- Goldstein LA, Ghersi G, Pineiro-Sánchez ML, Salamone M, Yeh Y, Flassabe D und Chen W-T (1997) Molecular cloning of seprase: a serine integral membrane protease from human melanoma. *Biochem Biophys Acta* **1361**, 11-19
- Gombert W, Borthwick NJ, Wallace DL, Hyde H, Bofill M, Pilling D, Beverly PC, Janossy G, Salmon M und Akbar AN (1996) Fibroblasts prevent apoptosis of IL-2 deprived T cells without inducing proliferation: a selective effect on Bcl-X_L expression. *Immunology* **89**, 397-404
- Gonzalez-Gronow M, Weber MR, Shearin TV, Gawdi G, Pirieshepherd SR und Pizzo SV (1998) Plasmin(ogen) carbohydrate chains mediate binding to dipeptidyl peptidase IV (CD26) in rheumatoid arthritis human synovial fibroblasts. *Fibrinolysis Proteolysis* **12**, 366-374
- Grunewald J, Eklund A, Wigzell H, Van Meijgaarden KE und Ottenhoff TH (1999) Bronchoalveolar lavage cells from sarcoidosis patients and healthy controls can efficiently present antigens. *J Intern Med* **245**, 353-357

- Guerin S, Mari B, Fernandez E, Belhacene N, Toribio ML und Auberger P (1997) CD10 is expressed on human thymic epithelial cell lines and modulates thymopentin-induced cell proliferation. *FASEB J* **11**, 376-381
- Hansen GH, Delmas B, Besnardeau L, Vogel LK, Laude H, Sjostrom H und Noren O (1998) The coronavirus transmissible gastroenteritis virus causes infection after receptor-mediated endocytosis and acid-dependent fusion with an intracellular compartment. *J Virol* **72**, 527-534
- Hansen GH, Niels-Christiansen L-L, Thorsen E, Immerdal L und Danielsen EM (2000) Cholesterol depletion of enterocytes. *J Biol Chem.* **275**, 5136-5142
- Hanski C, Huhle T, Gossrau R und Reutter W (1988) Direct evidence for the binding of rat liver DPPIV to collagen in vitro. *Exp Cell Res* **178**, 64-72
- Hegen M, Kameoka J, Dong RP, Schlossman SF und Morimoto C (1997) Cross-linking of CD26 by antibody induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase. *Immunology* **90**, 257-264
- Heizmann J, Langguth P, Biber A, Oschmann R, Merkle HP und Wolffram S (1996) Enzymatic cleavage of thymopietin oligopeptides by pancreatic and intestinal brush-border enzymes. *Peptides* **17**, 1083-1089
- Helene A, Beaumont A und Roques BP (1991) Functional residues at the active site of aminopeptidase N. *Eur J Biochem* **196**, 385-393
- Herrera C, Morimoto C, Blanco J, Mallol J, Arenzana F, Lluís C und Franco R (2001) Comodulation of CXCR4 and CD26 in human lymphocytes. *J Biol Chem* **276**, 19532-19539
- Hersh LB und Morihara K (1986) Comparison of the mammalian endopeptidase 24.11 (enkephalinase) to the bacterial neutral endopeptidase thermolysin. *J Biol Chem* **261**, 6433-6437
- Hesp, JR und Hooper NM (1997) Proteolytic fragmentation reveals the oligomeric and domain structure of porcine aminopeptidase A. *Biochemistry* **36**, 3000-3007
- Hildebrandt M, Arck PC, Kruber S, Demuth HU, Reutter W und Klapp BF (2001) Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) activity abrogates stress-induced, cytokine-mediated murine abortions. *Scand J Immunol* **53**, 449-454
- Hintzen RQ, de Jong R, Lens SM, Brouwer M, Baars P und van Lier RA (1993) Regulation of CD27 expression on subsets of mature T-lymphocytes. *J Immunol* **151**, 2426-2435
- Holoshitz J, Kosek J, Sibley R, Brown DA und Strober S (1991) T lymphocyte-synovial fibroblast interactions induced by mycobacterial proteins in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **34**, 679-686

- Holst JJ and Deacon CF (1998) Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes. *Diabetes* **47**, 663-670
- Holt JP (1970) The normal pericardium. *Am J Cardiol* **26**, 455-465
- Hopsu-Havu VK und Glenner GG (1966) A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. *Histochemie* **7**, 197-201
- Hoshino T, Yamada A, Honda J, Imai Y, Nakao M, Inoue M, Sagawa K, Yokoyama MM, Oizumi K und Itoh K (1993) Tissue-specific distribution and age-dependent increase of human CD11b+ T cells. *J Immunol* **151**, 2237-2246
- Howell S, Brewis IA, Hooper NM, Kenny AJ und Turner AJ (1993) Mosaic expression of embrane peptidases by confluent cultures of Caco-2 cells. *FEBS Lett* **317**, 109-112
- Hühn J, Ehrlich S, Fleischer B und von Bonin A (2000) Molecular analysis of CD26-mediated signal transduction in T cells. *Immunol Lett* **72**, 127-132
- Hussain MM, Tranum-Jensen J, Noren O, Sjöström H und Christiansen K (1981) Reconstitution of purified and amphiphilic pig intestinal microvillus aminopeptidase. Mode of membrane insertion and morphology. *Biochem J* **199**, 179-186
- Hwang I, Huang JF, Kishimoto H, Brunmark A, Peterson PA, Jackson MR, Surh CD, Cai Z und Sprent J (2000) T cells can use either T cell receptor or CD28 receptors to absorb and internalize cell surface molecules derived from antigen-presenting cells. *J Exp Med* **191**, 1137-1148
- Ilangumaran S und Hoessli DC (1998) Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem J* **335**, 433-440
- Ino K, Goto S, Okamoto T, Nomura S, Nawa A, Isobe K, Mizutani S und Tomada Y (1994) Expression of aminopeptidase N on human choriocarcinoma cells and cell growth suppression by the inhibition of aminopeptidase N activity. *Jpn J Cancer Res* **85**, 927-933
- Ishii E, Greaves A, Grunberger T, Freedman MH und Letarte M (1995) Tumor formation by a human pre-B leukemia cell line in SCID mice is enhanced by matrigel and is associated with induction of CD10 expression. *Leukemia* **9**, 175-184
- Isomaki P, Luukkainen R, Toivanen P und Punnonen J (1996) The presence of interleukin-13 in rheumatoid synovium and its antiinflammatory effects on synovial fluid macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **39**, 1693-1702
- Issekutz TB (1993) Dual inhibition of VLA-4 and LFA-1 maximally inhibits cutaneous delayed-type hypersensitivity-induced inflammation. *Am J Pathol* **143**, 1286-1293
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG und Minick CR (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunological criteria. *J Clin Invest* **52**, 2745-2756

- Janas RM, Socha J, Warnawin K und Rujner J (1999) Further studies on aminopeptidase-M in blood in children with cholestatic liver diseases and viral hepatitis. *Dig Dis Sci* **44**, 170-176
- Johnson RC, Zhu D, Augustin-Voss HG und Bendicht UP (1993) Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV is an adhesion molecule for lung-metastatic rat breast and prostate carcinoma cells. *J Cell Biol* **121**, 1423-1432
- Juillerat-Jeanneret L, Aubert JD und Leuenberger P (1997) Peptidases in human bronchoalveolar lining fluid, macrophages, and epithelial cells: dipeptidyl (amino) peptidase IV, aminopeptidase N, and dipeptidyl (carboxy) peptidase (angiotensin-converting enzyme). *J Lab Clin Med* **130**, 603-614
- Kähne T, Lendeckel U, Wrenger S, Neubert K, Ansorge S und Reinhold D (1999) Dipeptidyl peptidase IV: a cell surface peptidase involved in regulating T cell growth (review). *Int J Mol Med* **4**, 3-15
- Kähne T, Neubert K und Ansorge S (1995) Enzymatic activity of DPIV/CD26 is involved in PMA-induced hyperphosphorylation of p56lck. *Immunol Lett* **46**, 189-193
- Kehlen A, Göhring B, Langner J und Riemann D (1998) Regulation of the expression of aminopeptidase A, aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 in renal carcinoma cells and renal-tubular epithelial cells by cytokines and cAMP-increasing mediators. *Clin Exp Immunol* **111**, 435-441
- Kehlen A, Langner J und Riemann D (2000A) Transforming growth-factor- β increases the expression of aminopeptidase N/CD13 mRNA and protein in monocytes and monocytic cell lines. *Adv Exp Med Biol* **477**, 49-56
- Kehlen A, Olsen J, Langner J und Riemann D (2000B) Increased lymphocytic aminopeptidase N/CD13 promoter activity after cell-cell contact. *J Cell Biochem* **80**, 115-123
- Kenny AJ (1993) Endopeptidase-24.11: putative substrates and possible roles. *Biochem Soc Trans* **21**, 663-668
- Kenny AJ und Turner AJ (1987) What are ectoenzymes? In: *Mammalian ectoenzymes*. A.J. Kenny and A.J. Turner, eds. (Amsterdam, Elsevier), pp. 1-13
- Kerr KM, Johnson SK, King G, Kennedy MM, Weir J und Jeffrey R (1998) Partial regression in primary carcinoma of the lung: does it occur? *Histopathology* **33**, 55-63
- Kerr MA und Kenny J (1974) The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J* **137**, 477-488
- Kido A, Krüger S, Haeckel C und Roessner A (1999) Possible contribution of aminopeptidase N (APN/CD13) to invasive potential enhanced by interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in human osteosarcoma cell lines. *Clin Exp Metastasis* **17**, 857-863

- Kinkade PW, Lee G, Pietrangeli CE, Hayashi SI und Gimble JM (1993) Cells and molecules that regulate B lymphopoiesis in bone marrow. *Ann Rev Immunol* **7**, 111-143
- Kinne RW, Palombo-Kinne E und Emrich F (1997) T-cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Villains or accomplices? *Biochim Biophys Acta* **1360**, 109-141
- Kobayashi I und Ziff M (1973) Electron microscopic studies of lymphoid cells in the rheumatoid synovial membrane. *Arthritis Rheum* **16**, 471-486
- Koch AE, Burrows JC, Skoutelis A, Marder R, Domer PH, Anderson B und Leibovich SJ (1991) Reactivity of human tissues with monoclonal antibodies to myeloid activation and differentiation antigens. An immunohistochemical study. *Pathobiology* **58**, 241-248
- Kohrgruber N, Halanek N, Groger M, Winter D, Rappersberger K, Schmitt-Egenolf M, Stingl G und Maurer D (1999) Survival, maturation, and function of CD11c- and CD11c+ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. *J Immunol* **163**, 3250-3259
- Kolb AF, Hegyi A, Maile J, Heister A, Hagemann M und Siddell SG (1998) Molecular analysis of the coronavirus-receptor function of aminopeptidase N. *Adv Exp Med Biol* **440**, 61-67
- Kotani T, Aratake Y, Ogata Y, Umeki K, Araki Y, Hirai K, Kuma K und Ohtaki S (1991) Expression of dipeptidyl aminopeptidase IV activity in thyroid carcinoma. *Cancer Lett* **57**, 203-208
- Kowalczyk D, Skorupski W, Kwias Z und Nowak J (1997) Flow cytometric analysis of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with renal cell carcinoma. *Br J Urol* **80**, 543-547
- Krull F, Holzer U, Ihle J, Bethge W, Fierlbeck G, Kalland T, Dohlsten M, Niethammer D und Dannecker GE (1997) Superantigen-induced lysis of melanoma cells. *Melanoma Res* **7**, 214-222
- Krzesicki RF, Fleming WE, Winterrowd GE, Hatfield CA, Sanders ME und Chin JE (1991) T lymphocyte adhesion to human synovial fibroblasts. Role of cytokines and the interaction between intercellular adhesion molecule 1 and CD11a/CD18. *Arthritis Rheum* **34**, 1245-1253
- Kunz D, Bühling F, Hütter HJ, Aoyagi T und Ansorge S (1993) Aminopeptidase N (CD13, EC 3.4.11.2) occurs on the surface of resting and concanavalin A-stimulated lymphocytes. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **374**, 291-296
- Kunz J, Krause D, Gehrman J und Dermietzel R (1995) Changes in the expression pattern of blood-brain barrier-associated pericytic aminopeptidase N (pAP N) in the

- course of acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **59**, 41-55
- Kunz J, Krause D, Kremer M und Dermietzel R (1994) The 140-kDa protein of blood-brain barrier-associated pericytes is identical to aminopeptidase N. *J Neurochem* **62**, 2375-2386
- Langner J, Ansorge S, Bohley P, Kirschke H und Hanson H (1971) Intracellular protein breakdown. 1. Activity determinations of endopeptidases using protein substrates. *Acta Biol Med Germ* **26**, 935-951
- Lapadula G, Iannone F, Zuccaro C, Covelli M, Patella V, Lobianco G und Pipitone V (1995) Expression of membrane-bound peptidases (CD10 and CD26) on human articular chondrocytes. Possible role of neuropeptidases in the pathogenesis of osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol* **13**, 143-8
- Larsen SL, Pederson LO, Buus S und Stryhn A (1996) T cell responses affected by aminopeptidase N (CD13)-mediated trimming of major histocompatibility complex class II-bound peptides. *J Exp Med* **184**, 183-189
- Larsson S, Söderberg-Naucler C und Möller E (1998) Productive cytomegalovirus (CMV) infection exclusively in CD13-positive peripheral blood mononuclear cells from CMV-infected individuals. *Transplantation* **65**, 411-415
- Lauener RP, Goyert SM, Geha RS und Vercelli D (1990) Interleukin-4 down-regulates the expression of CD14 in normal human monocytes. *Eur J Immunol* **20**, 2375-2381
- LeBien TW und McCormack RT (1989) The common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10)--emancipation from a functional enigma. *Blood* **73**, 625-635
- Lees T, Mantle D, Walker D, Jones P und Blake D (1991) Identification of aminopeptidases in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients. *Biochem Soc Trans* **19**, 215S
- Lendeckel U, Arndt M, Frank K, Wex T und Ansorge S (1999) Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (Review). *Int. J. Mol. Med.* **4**, 17-27
- Lendeckel U, Kähne T, Arndt M, Frank K und Ansorge S (1998) Inhibition of alanyl aminopeptidase induces MAP-kinase p42/ERK2 in the human T cell line KARPAS-299. *Biochem Biophys Res Communicat* **252**, 5-9
- Lendeckel U, Wex T, Ittenson A, Arndt M, Frank K, Mayboroda O, Schubert W und Ansorge S (1997) Rapid mitogen-induced aminopeptidase N surface expression in human T cells is dominated by mechanisms independent of de novo protein biosynthesis. *Immunobiology* **197**, 55-69
- Levite M, Cahalon L, Hershkoviz R, Steinman L und Lider O (1998) Neuropeptides, via specific receptors, regulate T cell adhesion to fibronectin. *J Immunol* **160**, 993-1000

- Levy MT, McCaughan GW, Abbott CA, Park JE, Cunningham AM, Muller E, Rettig WJ und Gorrell MD (1999) Fibroblast activation protein: a cell surface dipeptidyl peptidase and gelatinase expressed by stellate cells at the tissue remodelling interface in human cirrhosis. *Hepatology* **29**, 1768-1778
- Lian WN, Tsai JW, Yu PM, Wu TW, Yang SC, Chau YP und Lin CH (1999) Targeting of aminopeptidase N to bile canaliculi correlates with secretory activities of the developing canalicular domain. *Hepatology* **30**, 748-760
- Löster K, Zeilinger K, Schuppan D und Reutter W (1995) The cysteine-rich region of dipeptidyl peptidase IV (CD26) is the collagen-binding site. *Biochem Biophys Res Commun* **217**, 341-348
- London E und Brown DA (2000) Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim Biophys Acta* **1508**, 182-195
- Lotz M, Kekow J und Carson DA (1990) Transforming growth factor-beta and cellular immune responses in synovial fluids. *J Immunol* **144**, 4189-4194
- Lu B, Gerard NP, Kolakowski LF Jr, Bozza M, Zurakowski D, Finco O, Carroll MC und Gerard C (1995) Neutral endopeptidase modulation of septic shock. *J Exp Med* **181**, 2271-2275
- Luciani N, Marie-Claire C, Ruffet E, Beaumont A, Roques BP und Fournie-Zaluski MC (1998) Characterization of Glu350 as a critical residue involved in the N-terminal amine binding site of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2): insights into its mechanism of action. *Biochemistry* **37**, 686-692
- Lucius R, Sievers J und Mentlein R (1995) Enkephalin metabolism by microglial aminopeptidase N (CD13). *J Neurochem* **64**, 1841-1847
- Lümmen G, Blass-Kampmann S, Rübbeb H, Suhr J und Otto T (2000) Tumor-infiltrating lymphocytes express vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas. *Onkologie* **23**, 458-462
- MacLean-Fletcher S und Pollard TD (1980) Mechanism of action of cytochalasin B on actin. *Cell* **20**, 329-341
- Malfroy B, Kuang WJ, Seeburg PH, Mason AJ und Schofield PR (1988) Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). *FEBS Lett* **229**, 206-210
- Marguet D, Baggio L, Kobayashi T, Bernard AM, Pierres M, Nielsen PF, Ribet U, Watanabe T, Drucker DJ und Wagtmann N (2000) Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 6874-6879

- Mari B, Imbert V, Belhacene N, Far DF, Peyron JF, Pouyssegur J, van Obberghen-Schilling E, Rossi B und Auberger P (1994) Thrombin and thrombin receptor agonist peptide induce early events of T-cell activation and synergize with TCR cross-linking for CD69 expression and interleukin 2 production. *J Biol Chem* **269**, 8517-8523
- Masuyama J, Berman JS, Cruikshank WW, Morimoto C und Center DM (1992) Evidence for recent as well as long term activation of T cells migrating through endothelial cell monolayers in vitro. *J Immunol* **148**, 1367-1374
- Masuyama J, Yoshio T, Suzuki K, Kitagawa S, Iwamoto M, Kamimura T, Hirata D, Takeda A, Kano S und Minota S (1999) Characterization of the 4C8 antigen involved in transendothelial migration of CD26hi T cells after tight adhesion to human umbilical vein endothelial cell monolayers. *J Exp Med* **189**, 979-989
- Mathe G (1987) Do tuftsin and bestatin constitute a biopharmacological immunoregulatory system? *Cancer Detect Prevent* **S1**, 445-455
- Matsas R, Fulcher IS, Kenny AJ und Turner AJ (1983) Substance P and [Leu] enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**, 3111-3115
- Mattern T, Reich C, Schonbeck U, Ansorge S, Demuth HU, Loppnow H, Ulmer AJ und Flad HD (1998) CD26 (dipeptidyl peptidase i.v.) on human T lymphocytes does not mediate adhesion of these cells to endothelial cells or fibroblasts. *Immunobiology* **198**, 465-475
- Matucci-Cerinic M, Lombardi A, Leoncini G, Pignone A, Sacerdoti L, Spillantini MG und Partsch G (1993) Neutral endopeptidase (3.4.24.11) in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. A marker of disease activity or a regulator of pain and inflammation? *Rheumatol Int* **13**, 1-4
- Maulon L, G  erin S, Ricci J-E, Farahifar D, Breittmayer J-P und Auberger P (1998) T-cell receptor signaling pathway exerts a negative control on thrombin-mediated increase in $[Ca^{2+}]_i$ and p38 MAPK activation in Jurkat T cells: Implications of the tyrosine kinase p56Lck. *Blood* **91**, 4232-4241
- May AE, Kanse SM, Lund LR, Gisler RH, Imhof BA und Preissner KT (1998) Urokinase receptor (CD87) regulates leukocyte recruitment via $\beta 2$ integrins in vivo. *J Exp Med* **188**, 1029-1037
- McGilvray ID, Lu Z, Bitar R, Dackiw AP, Davreux CJ und Rotstein OD (1997) VLA-4 integrin cross-linking on human monocytic THP-1 cells induces tissue factor expression by a mechanism involving mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **272**, 10287-10294
- McIntyre EA, Jones HM, Roberts PJ, Tidman N und Linch DC (1987) Identification of signal transduction molecules on monocytic cells. In *Leucocyte Typing III. White Cell*

- Differentiation Antigens. AJ McMichael, PCL Beverly, S Cobbold und MJ Crumpton, eds. Oxford University Press, 685-688
- Menrad A, Speicher D, Wacker J und Herlyn M (1993) Biochemical and functional characterization of aminopeptidase N expressed by human melanoma cell. *Cancer Res* **53**, 1450-1455
- Maeurer MJ, Martin DM, Castelli C, Elder E, Leder G, Storkus WJ und Lotze MT (1995) Host immune response in renal cell cancer: interleukin-4 (IL-4) and IL-10 mRNA are frequently detected in freshly collected tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* **41**, 111-121
- Michie CA, McLean A, Alcock C und Beverley PC (1992) Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature* **360**, 264-265
- Middelhoven PJ, Ager A, Roos D und Verhoeven AJ (1997) Involvement of a metalloprotease in the shedding of human neutrophil F_{cy} RIIIB. *FEBS Lett* **414**, 14-18
- Miltenburg AM, Lacraz S, Welgus HG und Dayer JM (1995) Immobilized anti-CD3 antibody activates T cell clones to induce the production of interstitial collagenase, but not tissue inhibitor of metalloproteinases, in monocytic THP-1 cells and dermal fibroblasts. *J Immunol* **54**, 2655-2667
- Mittrücker HW, Steeg C, Malissen B und Fleischer B (1995) The cytoplasmic tail of the T cell receptor zeta chain is required for signaling via CD26. *Eur J Immunol* **25**, 295-297
- Mohler KM, Sleath PR, Fitzner JN, Ceretti DP, Alderson M, Kerwar SS, Torrance DS, Otten-Evans C, Greenstreet T und Weerawarna K (1994) Protection against lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing. *Nature* **370**, 218-220
- Morrison ME, Vijayasradhi S, Engelstein D, Albino AP und Houghton AN (1993) A marker for neoplastic progression of human melanocytes is a cell surface ectopeptidase. *J Exp Med* **177**, 1135-1143
- Murray KJ, Grom AA, Thompson SD, Lieuwen D, Passo MH und Glass DN (1998) Contrasting cytokine profiles in the synovium of different forms of juvenile rheumatoid arthritis and juvenile spondyloarthritis: prominence of interleukin 4 in restricted disease. *J Rheumatol* **25**, 1388-1398
- Nanki T und Lipsky PE (2000) Lack of correlation between chemokine receptor and T(h)1/T(h)2 cytokine expression by individual memory T cells. *Int Immunol* **12**, 1659-1667
- Navarrete Santos A, Kehlen A, Schutte W, Langner J und Riemann D (1998) Regulation by transforming growth factor-beta1 of class II mRNA and protein expression in

- fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Int Immunol* **10**, 601-607
- Navarrete Santos A, Langner J, Herrmann M und Riemann D (2000A) Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. *Cell Immunol* **200**, 22-32
- Navarrete Santos A, Roentsch J, Danielsen EM, Langner J und Riemann D (2000B) Aminopeptidase N/CD13 is associated with raft membrane microdomains in monocytes. *Biochem Biophys Res Comm* **269**, 143-148
- Newman LS, Rose CS und Maier LA (1997) Medical Progress: Sarcoidosis. *N Engl J Med* **336**, 1224-1233
- Noren K, Hansen GH, Clausen H, Noren O, Sjöström H und Vogel LK (1997) Defectively N-glycosylated and non-O-glycosylated aminopeptidase N (CD13) is normally expressed at the cell surface and has full enzymatic activity. *Exp Cell Res* **231**, 112-118
- Nunez L, Amigo L, Mingrone G, Rigotti A, Puglielli L, Raddatz A, Pimentel F, Greco AV, Gonzalez S und Garrido J (1995) Biliary aminopeptidase-N and the cholesterol crystallization defect in cholelithiasis. *Gut* **37**, 422-426
- Nusrat A, Parkos CA, Verkade P, Foley CS, Liang TW, Innis-Whitehouse W, Eastburn KK und Madara JL (2000) Tight junctions are membrane microdomains. *J Cell Sci* **113**, 1771-81
- Oefner C, D'Arcy A, Hennig M, Winkler FK und Dale GE (2000) Structure of human neutral endopeptidase (neprilysin) complexed with Phosphoramidon. *J Mol Biol* **296**, 341-349
- Olsen J, Classen-Linke I, Sjostrom H und Noren O (1995) Pseudopregnancy induces the expression of hepatocyte nuclear factor-1 beta and its target gene aminopeptidase N in rabbit endometrium via the epithelial promoter. *Biochem J* **312**, 31-37
- Olsen J, Kokholm K, Troelsen JT und Laustsen L (1997) An enhancer with cell-type dependent activity is located between the myeloid and epithelial aminopeptidase N (CD 13) promoters. *Biochem J* **322**, 899-908
- Olsen J, Laustsen L, Karnstrom U, Sjostrom H und Noren O (1991) Tissue-specific interactions between nuclear proteins and the aminopeptidase N promoter. *J Biol Chem* **266**, 18089-18096
- Ortegel JW, Staren ED, Faber LP, Warren WH und Braun DP (2000) Cytokine biosynthesis by tumor-infiltrating T lymphocytes from human non-small-cell lung carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* **48**, 627-34
- Ota K und Uzuka Y (1992) Clinical trials of bestatin for leukemia and solid tumors. *Biotherapy* **4**, 205-214

- Painter RG, Dukes R, Sullivan J, Carter R, Erdös EG und Johnson AR (1988) Function of neutral endopeptidase on the cell membrane of human neutrophils. *J Biol Chem* **263**, 9456-9461
- Palade GE (1953) Fine structure of blood capillaries. *J Appl Physiol* **24**, 1424
- Palmieri FE, Petrelli JJ und Ward PE (1985) Vascular, plasma membrane aminopeptidase M. Metabolism of vasoactive peptides. *Biochem Pharmacol* **34**, 2309-2317
- Pauly RP, Rosche F, Wermann M, McIntosh CH, Pederson RA und Demuth HU (1996) Investigation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide-(1-42) and glucagon-like peptide-1-(7-36) degradation in vitro by dipeptidyl peptidase IV using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. A novel kinetic approach. *J Biol Chem* **271**, 23222-23229
- Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sakamoto M, Stryhn A, Ashmun RA, Shapiro LH, Arap W und Ruoslahti E (2000) Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* **60**, 722-727
- Pasqualini R, Koivunen E und Ruoslahti E (1995) A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. *J Cell Biol* **130**, 1186-1196
- Pepperkok R, Lorenz P, Ansorge W und Pyerin W (1994) Casein kinase II is required for transition of G₀/G₁, early G₁ and G₁/S phases of the cell cycle. *J Biol Chem* **269**, 6986-6991
- Phillips AJ, Tomasec P, Wang EC, Wilkinson GW und Borysiewicz LK (1998) Human cytomegalovirus infection downregulates expression of the cellular aminopeptidases CD10 and CD13. *Virology* **250**, 350-358
- Pinto A, Zagonel V, Carbonare A und Del Vecchio L (1992) Expression of myeloid associated antigens in chronic lymphocytic leukaemia. *Brit J Haematol* **82**, 173-175
- Pitha J, Irie T, Sklar PB und Nye JS (1988) Drug solubilizers to aid pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives. *Life Sci* **43**, 493-502
- Pui CH, Rubnitz JE, Hancock ML, Downing JR, Raimondi SC, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Head DR, Relling MV, Evans WE und Behm FG (1998) Reappraisal of the clinical and biologic significance of myeloid-associated antigen expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* **16**, 3768-3773
- Ramsauer M, Kunz J, Krause D und Demietzel R (1998) Regulation of a blood-brain barrier-specific enzyme expressed by cerebral pericytes (Pericytic aminopeptidase N/pAPN) under cell culture condition. *J Cerebral Blood Flow Metab* **18**, 1270-1281
- Rasmussen UB, Vouret-Craviari V, Jallat S, Schlesinger Y, Pages G, Pavirani A, Lecocq JP, Pouyssegur J und van Obberghen-Schilling E (1991) cDNA cloning and

- expression of a hamster α -thrombin receptor coupled to Ca^{2+} mobilization. *FEBS Lett* **288**, 123-128
- Rathanaswami P, Hachicha M, Sadick M, Schall TJ und McColl SR (1993) Expression of the cytokine RANTES in human rheumatoid synovial fibroblasts. Differential regulation of RANTES and interleukin-8 genes by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* **268**, 5834-5839
- Ratti H, Zhang M und Kunkel G (2001) Correlation between neutral endopeptidase (NEP) 3.4.24.11 in serum and the degree of the bronchial hyperreactivity. *Regul Pept* **97**, 181-186
- Ravanti L, Hakkinen L, Larjava H, Saarialho-Kere U, Foschi M, Han J und Kahari VM (1999) Transforming growth factor-beta induces collagenase-3 expression by human gingival fibroblasts via p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **274**, 37292-37300
- Ravanti L, Heino J, Lopez-Otin C und Kähäri V-M (1999) Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **274**, 2446-2455
- Read S, Malmström V, und Powrie F (2000) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* **192**, 295-302
- Reaux A, deMota N, Zini S, Cadel S, Fournier-Zaluski MC, Roques BP, Corvol P und Llorens-Cortes C (1999) PC18, a specific aminopeptidase inhibitor, induces vasopressin release by increasing the half-life of brain angiotensin III. *Neuroendocrinology* **69**, 370-376
- Reaux A, Iturrioz X, Vazeux G, Fournie-Zaluski MC, David C, Roques BP, Corvol P und Llorens-Cortes C (2000) Aminopeptidase A, which generates one of the main effector peptides of the brain renin-angiotensin system, angiotensin III, has a key role in central control of arterial blood pressure. *Biochem Soc Trans* **28**, 435-440
- Reinhold D, Bank U, Bühling F, Lendeckel U, Faust J, Neubert K und Ansorge S (1997) Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor- β 1 in PWM-stimulated PBMC and T cells. *Immunology* **91**, 354-360
- Rehfeld N, Peters JE, Giesecke H und Haschen RJ (1967) Untersuchungen über Aminosäuren-Arylamidasen. I. Verteilung und Isoenzyme der Arylamidase im menschlichen Organismus. *Acta Biol Med Germ* **19**, 819-830
- Relic B, Guicheux J, Mezin F, Lubberts E, Togninalli D, Garcia I, van den Berg WB und Guerne PA (2001) IL-4 and IL-13, but not IL-10, protect human synoviocytes from apoptosis. *J Immunol* **166**, 2775-2782

- Renneberg H, Albrecht M, Kurek R, Krause E, Lottspeich F, Aumüller G und Wilhelm B (2001) Identification and characterization of neutral endopeptidase (EC 3. 4. 24. 11) from human prostasomes--localization in prostatic tissue and cell lines. *Prostate* **46**, 173-183
- Richard E, Arredondo-Vega FX, Santisteban I, Kelly SJ, Patel DD und Hershfield MS (2000) The binding site of human adenosine deaminase for CD26/Dipeptidyl peptidase IV: the Arg142Gln mutation impairs binding to CD26 but does not cause immune deficiency. *J Exp Med* **192**, 1223-1235
- Riemann D (1990) Kultivierung und Charakterisierung humaner Endothelzellen aus Nabelschnurvene unter Berücksichtigung ihrer möglichen Beteiligung an der Antigenpräsentation. Promotionsschrift, Martin-Luther-Universität, Medizinische Fakultät.
- Riemann D (2001A; im Druck) CD13. In: *Encyclopedia of Molecular Medicine (EMM)*. T. Creighton, ed. Wiley Press, New York.
- Riemann D (2001C; im Druck) CD10. In: *Encyclopedia of Molecular Medicine (EMM)*. T. Creighton, ed. Wiley Press, New York.
- Riemann D, Hansen GH, Niels-Christiansen L-L, Thorsen E, Immerdal, L, Navarrete Santos A, Kehlen A, Langer J und Danielsen M (2001B) Caveolae/lipid rafts in fibroblast-like synoviocytes: Ecto-peptidase-rich membrane microdomains. *Biochem J* **354**, 47-55
- Riemann D, Kehlen A und Langner J (1995) Stimulation of the expression and the enzyme activity of aminopeptidase N/CD13 and dipeptidylpeptidase IV/CD26 on human renal cell carcinoma cells and renal tubular epithelial cells by T cell-derived cytokines, such as IL-4 and IL-13. *Clin Exp Immunol* **100**, 277-283
- Riemann D, Kehlen A und Langner J (1999) CD13 – not just a marker in leukemia typing. *Immunol Today* **20**, 83-88
- Riemann D, Kehlen A, Thiele K, Löhn M und Langner J (1997) Induction of aminopeptidase N/CD13 on human lymphocytes upon adhesion to fibroblast-like synoviocytes, endothelial cells, epithelial cells and monocytes/macrophages. *J Immunol* **158**, 3425-3432
- Riemann D, Röntsch J, Hause B, Langner J und Kehlen A (2000) Cell-cell contact between lymphocytes and fibroblast-like synoviocytes induces lymphocytic expression of aminopeptidase N/CD13 and results in lymphocytic activation. *Adv Exp Med Biol* **477**, 57-66
- Riemann D, Schwachula A, Hentschel M und Langner J (1993) Demonstration of CD13/aminopeptidase N on synovial fluid T cells from patients with different forms of joint effusions. *Immunobiology* **187**, 24-35

- Riemann D, Wenzel K, Schulz T, Hofmann S, Neef H, Lautenschläger C und Langner J (1997) Phenotypic analysis of T lymphocytes isolated from non-small-cell lung cancer. *Int Arch Allergy Immunol* **114**, 38-45
- Riemann D, Wollert HG, Menschikowski J, Mittenzwei S und Langner J (1994) Immunophenotype of lymphocytes in pericardial fluid from patients with different forms of heart disease. *Int Arch Allergy Immunol* **104**, 48-56
- Rohrbach MS und Conrad AK (1991) Comparison of the T lymphocyte-dependent induction of angiotensin-converting enzyme and leucine aminopeptidase in cultured human monocytes. *Clin Exp Immunol* **83**, 510-515
- Ryan DH (1992) Phenotypic heterogeneity in acute leukemia. *Clin Chim Acta* **206**, 9-23
- Sabzevari H, Kantor J, Jaigirdar A, Tagaya Y, Naramura M, Hodge J, Bernon J und Schlom J (2001) Acquisition of CD80 (B7-1) by T cells. *J Immunol* **166**, 2505-13
- Saito M, Kumagai M, Okazaki T, Nakazawa S, Shapiro LH, Look AT, Campana D (1995) Stromal cell-mediated transcriptional regulation of the CD13/aminopeptidase N gene in leukemic cells. *Leukemia* **9**, 1508-1516
- Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M und Lanzavecchia A (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-712
- Saltini C, Kirby M, Trapnell BC, Tamura N und Crystal RG (1990) Biased accumulation of T lymphocytes with "memory"-type CD45 leukocyte common antigen gene expression on the epithelial surface of the human lung. *J Exp Med* **171**, 1123-40
- Sanderink GJ, Artur Y, Schiele F, Gueguen R und Siest G (1988) Alanine aminopeptidase in serum: biological variations and reference limits. *Clin Chem* **34**, 1422-6
- Scanlan MJ, Mohan Raj BK, Calvo B, Garin-Chesa P, Sanz-Moncasi MP, Healey JM, Old LJ und Rettig WJ (1994) Molecular cloning of fibroblast activation protein α , a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 5657-5661
- Scheel-Toellner D, Richter E, Toellner KM, Reiling N, Wacker HH, Flad HD und Gerdes J (1995) CD26 expression in leprosy and other granulomatous diseases correlates with the production of interferon-gamma. *Lab Invest* **73**, 685-690
- Schendel DJ, Gansbacher B, Oberneder R, Kriegmair M, Hofstetter A, Riethmüller G und Segurado OG (1993) Tumor-specific lysis of human renal cell carcinomas by tumor-infiltrating lymphocytes. I. HLA-A2-restricted recognition of autologous and allogeneic tumor lines. *J Immunol* **151**, 4209-20
- Schlaepfer DD (1999) Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* **71**, 435-478

- Schwachula A, Riemann D, Kehlen A und Langner J (1994) Characterization of the immunophenotype and functional properties of fibroblast-like synoviocytes in comparison to skin fibroblasts and umbilical vein endothelial cells. *Immunobiology* **190**, 67-92
- Scott S, Pandolfi F und Kurnick JT (1990) Fibroblasts mediate T cell survival: a proposed mechanism for retention of primed T cells. *J Exp Med* **172**, 1873-1876
- Seitz M, Loetscher P, Dewald B, Towbin H, Ceska M und Baggiolini M (1994) Production of interleukin-1 receptor antagonist, inflammatory chemotactic proteins, and prostaglandin E by rheumatoid and osteoarthritic synoviocytes--regulation by IFN-gamma and IL-4. *J Immunol* **152**, 2060-2065
- Seitzer U, Scheel-Toellner D, Mattern T, Haas H, Flad HD und Gerdes J (1998) Staining pattern of seven monoclonal anti-CD26 antibodies in leprosy: implications for the use of CD26 as a surrogate marker of a human Th1-like reaction. *Virchows Arch* **432**, 343-347
- Shapiro LH (1995) Myb and ets proteins cooperate to transactivate an early myeloid gene. *J Biol Chem* **270**, 8763-8771
- Shapiro LH, Ashmun RA, Roberts WM und Look AT (1991) Separate promoters control transcription of the human aminopeptidase N gene in myeloid and intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* **266**, 11999-12007
- Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lien HC, Huang SC und Lin RH (2001) A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res* **61**, 237-242
- Shipp MA und Look AT (1993) Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: Cutting is the key! *Blood* **82**, 1052-1070
- Shipp MA, Richardson NE, Sayre PH, Brown NR, Masteller EL, Clayton LK, Ritz J und Reinherz EL (1988) Molecular cloning of the common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) identifies a type II integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 4819-4823
- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, Annunziata N und Doetschman T (1992) Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359**, 693-9
- Söderberg C, Giugni TD, Zaia JA, Larsson S, Wahlberg JM und Möller E (1993) CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *J Virol* **67**, 6576-6585
- Solan NJ, Ward PE, Sanders SP, Towns MC und Bathon JM (1998) Soluble recombinant neutral endopeptidase (CD10) as a potential antiinflammatory agent. *Inflammation* **22**, 107-21

- Spits H, Lanier LL und Phillips JH (1995) Development of human T and natural killer cells. *Blood* **85**, 2654-2670
- Spörri B, Bickel M, Limat A, Waelti ER, Hunziker T und Wiesmann UN (1997) Juxtacrine stimulation of cytokine production in cocultures of human dermal fibroblasts and T cells. *Cytokine* **8**, 631-635
- Stahl A und Mueller BM (1995) The urokinase-type plasminogen activator receptor, a GPI-linked protein, is localized in caveolae. *J Cell Biol* **129**, 335-344
- Stahlhut M, Sandvig K und van Deurs B (2000) Caveolae: Uniform structures with multiple functions in signaling, cell growth, and cancer. *Exp Cell Res* **261**, 111-118
- Stalter G, Siemer S, Becht E, Ziegler M, Remberger K und Issinger OG (1994) Asymmetric expression of protein kinase CK2 subunits in human kidney tumors. *Biochem Biophys Res Commun* **202**, 141-147
- Stefanovic V, Vlahovic P und Mitic-Zlatkovic M (1998) Epidermal growth factor upregulates aminopeptidase N and 5'-nucleotidase in human glomerular mesangial cells. *Kidney Blood Press Res* **21**, 310-316
- Steinbrecher A, Reinhold D, Quigley L, Gado A, Tresser N, Izikson L, Born I, Faust J, Neubert K, Martin R, Ansorge S und Brocke S (2001) Targeting dipeptidyl peptidase IV (CD26) suppresses autoimmune encephalomyelitis and up-regulates TGF-beta 1 secretion in vivo. *J Immunol* **166**, 2041-2048
- Strickland DH, Thepen T, Kees UR, Kraal G und Holt PG (1993) Regulation of T-cell function in lung tissue by pulmonary alveolar macrophages. *Immunology* **80**, 266-272
- Sumitomo M, Shen R, Walburg M, Dai J, Geng Y, Navarro D, Boileau G, Papandreou CN, Giancotti FG, Knudsen B und Nanus DM (2000) Neutral endopeptidase inhibits prostate cancer cell migration by blocking focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest* **106**, 1399-1407
- Sumitomo M, Milowsky MI, Shen R, Navarro D, Dai J, Asano T, Hayakawa M und Nanus DM (2001) Neutral endopeptidase inhibits neuropeptide-mediated trans-activation of the insulin-like growth factor receptor-Akt cell survival pathway. *Cancer Res* **61**, 3294-3298
- Sun J und Hemler ME (2001) Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res* **61**, 2276-2281
- Syrjälä M, Ruutu T und Jansson SE (1994) A flow cytometric assay of CD34-positive cell populations in the human bone marrow. *Br J Haematol* **88**, 679-684
- Taguchi K, Hirano T, Iwasaki K und Sugihara H (1997) Reconstruction culture system simulating human synovium: a three-dimensional collagen gel culture of synoviocytes. *Cell Struct Funct* **22**, 4443-453

- Takaki Y, Iwata N, Tsubuki S, Taniguchi S, Toyoshima S, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Lee HJ, Shirotani K und Saido TC (2000) Biochemical identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid beta peptide in the brain. *J Biochem* **128**, 897-902
- Tanaka T, Camerini D, Seed B, Torimoto Y, Dang NH, Kameoka J, Dahlberg HN, Schlossman SF und Morimoto C (1992) Cloning and functional expression of the T cell activation antigen CD26. *J Immunol* **149**, 481-486
- Tanaka Y, Nomi M, Fujii K, Hubscher S, Maruo A, Matsumoto S, Awazu Y, Saito K, Eto S und Minami Y (2000) Intercellular adhesion molecule 1 underlies the functional heterogeneity of synovial cells in patients with rheumatoid arthritis: involvement of cell cycle machinery. *Arthritis Rheum* **43**, 2513-2522
- Tang H, Kerins DM, Hao Q, Inagami T und Vaughan DE (1998) The urokinase-type plasminogen activator receptor mediates tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and activation of mitogen-activated protein kinase in cultured endothelial cells. *J Biol Chem* **273**, 18268-18272
- Tangada SD, Peterson RD und Funkhouser JD (1995) Regulation of expression of aminopeptidase N in fetal rat lung by dexamethasone and epidermal growth factor. *Biochim Biophys Acta* **1268**, 191-199
- Tani K, Ogushi F, Huang L, Kawano T, Tada H, Hariguchi N und Sone S (2000) CD13/aminopeptidase N, a novel chemoattractant for T lymphocytes in pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 1636-1642
- Tatsumi N, Sannomiya Y, Sasaki A, Im T, Ota K, Oohira H, Nakao H und Yasui Y (1991) Effects of ubenimex, a biological response modifier, on myelodysplastic syndrome and chronic leukemia. *Biomed Pharmacother* **45**, 95-103
- Taylor DJ, Feldmann M, Evanson JM und Woolley DE (1989) Comparative and combined effects of transforming growth factors alpha and beta, interleukin-1 and interferon-gamma on rheumatoid synovial cell proliferation, glycolysis and prostaglandin E production. *Rheumatol Int* **9**, 65-70
- Thiele K, Riemann D, Kehlen A, Löhn M, Vogel LK und Langner J (1997) Two transfected endothelial cell lines expressing high levels of membrane bound or soluble aminopeptidase N. *Adv Exp Med Biol* **421**, 81-84
- Thiele K, Riemann D, Navarrete Santos A, Langner J und Kehlen A (2000) Cell-cell contact of human T cells with fibroblasts changes lymphocytic mRNA expression: Increased mRNA expression of interleukin-17 and interleukin-17 receptor. *Eur Cytokine Netw* **11**, 53-58
- Toh H, Minami M und Shimizu T (1990) Molecular evolution and zinc ion binding motif of leukotriene A4 hydrolase. *Biochem Biophys Res Communicat* **171**, 216-221

- Torimoto Y, Dang NH, Vivier E, Tanaka T, Schlossman SF und Morimoto C (1991) Coassociation of CD26 (dipeptidyl peptidase IV) with CD45 on the surface of human T lymphocytes. *J Immunol* **147**, 2514-2517
- Trompezinski S, Pernet I, Mayoux C, Schmitt D und Viac J (2000) Transforming growth factor-beta1 and ultraviolet A1 radiation increase production of vascular endothelial growth factor but not endothelin-1 in human dermal fibroblasts. *Br J Dermatol* **143**, 539-545
- Tsai C, Diaz LA Jr, Singer NG, Li LL, Kirsch AH, Mitra R, Nickoloff BJ, Crofford LJ und Fox DA (1996) Responsiveness of human T lymphocytes to bacterial superantigens presented by cultured rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum* **39**, 125-136
- Turley JM, Falk LA, Ruscetti FW, Kasper JJ, Francomano T, Fu T, Bang OS und Birchenall-Roberts MC (1996) Transforming growth factor beta 1 functions in monocytic differentiation of hematopoietic cells through autocrine and paracrine mechanisms. *Cell Growth Differ* **7**, 1535-1544
- Turner AJ und Tanzawa K (1997) Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J* **11**, 355-364
- Umetsu DT, Katzen D, Habara HH und Geha RS (1986) Antigen presentation by human dermal fibroblasts: activation of resting T lymphocytes. *J Immunol* **136**, 440-445
- Umezawa H, Aoyagi T, Tanaka T, Suda H, Okuyama A, Naganawa H, Hamada M und Takeuchi T (1985) Production of actinonin, an inhibitor of aminopeptidase M, by actinomycetes. *J Antibiot* **38**, 1629-1630
- Usmani BA, Shen R, Janeczko M, Papandreou CN, Lee WH, Nelson WG, Nelson JB und Nanus DM (2000) Methylation of the neutral endopeptidase gene promotor in human prostate cancers. *Clin Cancer Res* **6**, 1664-1670
- Van Damme J, Rampart M, Conings R, Decock B, Van Osselaer N, Willems J und Billiau A (1990) The neutrophil-activating protein interleukin 8 and beta-thromboglobulin: in vitro and in vivo comparison of NH₂-terminally processed forms. *Eur J Immunol* **20**, 2113-2118
- Van den Hove LE, Van Gool SW, Van Poppel H, Baert L, Coorevits L, Van Damme B und Ceuppens JL (1997) Phenotype, cytokine production and cytolytic capacity of fresh (uncultured) tumour-infiltrating T lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol* **109**, 501-509
- Van Hal PT, Hopstaken-Broos JP, Wijkhuijs JM, Te Velde AA, Figdor CG und Hoogsteden HC (1992) Regulation of aminopeptidase-N (CD13) and Fc epsilon RIIb (CD23) expression by IL-4 depends on the stage of maturation of monocytes/macrophages. *J Immunol* **149**, 1395-1401

- Van Hal PT, Hopstaken-Broos JP und Prins A (1994) Potential indirect antiinflammatory effects of IL-4: Stimulation of human monocytes, macrophages and endothelial cells by IL-4 increases aminopeptidase N activity (CD13; EC 3.4.11.2). *J Immunol* **153**, 2718-2728
- Varma R und Mayor S (1998) GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* **394**, 798-801
- Volonte D, Galbiati F und Lisanti MP (1999) Visualization of caveolin-1, a caveolar marker protein, in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras. The subcellular distribution of caveolin-1 is modulated by cell-cell contact. *FEBS Lett* **445**, 431-439
- Wahlström J, Berlin M, Skold CM, Wigzell H, Eklund A und Grunewald J (1999) Phenotypic analysis of lymphocytes and monocytes/macrophages in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid from patients with pulmonary sarcoidosis. *Thorax* **54**, 339-346
- Wahlström J, Katchar K, Wigzell H, Olerup O, Eklund A und Grunewald J (2001) Analysis of intracellular cytokines in CD4(+) and CD8(+) lung and blood T cells in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* **163**, 115-121
- Walsh DA, Mapp PI, Wharton J, Polak JM und Blake DR (1993) Neuropeptide degrading enzymes in normal and inflamed synovium. *Am. J. Pathol.* **142**, 1610-1621
- Wang G, Deering C, Macke M, Shao J, Burns R, Blau DM, Holmes KV, Davidson BL, Perlman S und McCray PB Jr (2000) Human coronavirus 229E infects polarized airway epithelia from the apical surface. *J Virol* **74**, 9234-9239
- Wang LH, Ahmad S, Benter IF, Chow A, Mizutani S und Ward PE (1991) Differential processing of substance P and neurokinin A by plasma dipeptidyl(amino)peptidase IV, aminopeptidase M and angiotensin converting enzyme. *Peptides* **12**, 1357-1364
- Ward PE, Benter IF, Dick L und Wilk S (1990) Metabolism of vasoactive peptides by plasma and purified renal aminopeptidase M. *Biochem Pharmacol* **40**, 1725-1732
- Weber M, Ugucioni M, Baggiolini M, Clark-Lewis I und Dahinden CA (1996) Deletion of the NH₂-terminal residue converts monocyte chemotactic protein 1 from an activator of basophil mediator release to an eosinophil chemoattractant. *J Exp Med* **183**, 681-685
- Welch PA, Burrows PD, Namen A, Gillis S und Cooper MD (1990) Bone marrow stromal cells and interleukin-7 induce coordinate expression of the BP-1/6C3 antigen and pre-B cell growth. *Int Immunol* **2**, 697-705
- Werb Z (1997) ECM and cell surface proteolysis: Regulating cellular ecology. *Cell* **91**, 439-442

- Werfel T, Sonntag G, Weber MH und Götze O (1991) Rapid increase in the membrane expression of neutral endopeptidase (CD10), aminopeptidase N (CD13), tyrosine phosphatase (CD45), and F_cγ-RIII (CD16) upon stimulation of human peripheral leucocytes with human C5a. *J Immunol* **147**, 3909-3914
- Weyand CM, Bryl E und Goronzy JJ (2000) The role of T cells in rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **48**, 429-435
- Woodhead VE, Binks MH, Chain BM und Katz DR (1998) From sentinel to messenger: an extended phenotypic analysis of the monocyte to dendritic cell transition. *Immunology* **94**, 552-559
- Wrenger S, Faust J, Mrestani-Klaus C, Fengler A, Stöckel-Maschek A, Lorey S, Kähne T, Brandt W, Neubert K, Ansoerge S und Reinhold D (2000) Down-regulation of T cell activation following inhibition of dipeptidyl peptidase IV/CD26 by the N-terminal part of the thromboxane A2 receptor. *J Biol Chem* **275**, 22180-22186
- Xiao Q, Giguere J, Parisien M, Jeng W, St-Pierre SA, Brubaker PL und Wheeler MB (2001) Biological activities of glucagon-like peptide-1 analogues in vitro and in vivo. *Biochemistry* **40**, 2860-2869
- Xu Y, Wellner D und Scheinberg DA (1995) Substance P and bradykinin are natural inhibitors of CD13/aminopeptidase N. *Biochem Biophys Res Commun* **208**, 664-674
- Yamada H, Martin PJ, Bean MA, Braun MP, Beatty PG, Sadamoto K und Hansen JA (1985) Monoclonal antibody 9.3 and anti-CD11 antibodies define reciprocal subsets of lymphocytes. *Eur J Immunol* **15**, 1164-1168
- Yamamura Y, Gupta R, Morita Y, He X, Pai R, Endres J, Freiberg A, Chung K und Fox DA (2001) Effector function of resting T cells: activation of synovial fibroblasts. *J Immunol* **166**, 2270-2275
- Yeager CL, Ashmun RA, Williams RK, Cardellichio CB, Shapiro LH, Look AT und Holmes KV (1992) Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* **357**, 420-422

7. ANLAGEN

7.1. Thesen

Arbeiten zum Vorkommen und zur Regulation von Aminopeptidase N/CD13 mit besonderer Berücksichtigung ihres Vorkommens auf Lymphozyten

Aminopeptidase N (APN) ist ein Zink-abhängiges, ubiquitär vorkommendes Membranenzym mit vielfältigen biologischen Wirkungen. Viele Zellarten, darunter einige Epithelzellen, Leukozyten der myeloischen Reihe, Perizyten sowie Fibroblasten tragen APN auf ihrer Oberfläche. Die physiologischen Konsequenzen der APN-Aktivität sind vielfältig und abhängig von der Lokalisierung des Enzyms. Oft sind an der Spaltung von Peptiden andere, eng kolokalisierte Membranenzyme beteiligt, darunter Glutamylaminopeptidase, Dipeptidylpeptidase IV(DPIV)/CD26 und Neprilysin/CD10.

Die APN-Expression wird sowohl in der Embryonalentwicklung reguliert als auch durch Wachstums- und Differenzierungsvorgänge beeinflusst. In der Hämatopoese ist die Expression verschiedener Membranpeptidasen charakteristisch für bestimmte Entwicklungsstufen von Leukozyten. Moleküle wie Neprilysin/CD10 und APN/CD13 werden demzufolge seit einigen Jahren zur Leukämie- und Lymphomtypisierung benutzt.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, unser Wissen zum Vorkommen und zur Regulation von APN u. a. membranständiger Peptidasen in verschiedenen Zellsystemen zu erweitern. Da wir erstmalig APN-tragende T-Zellen in entzündlichen Synovialflüssigkeiten beschrieben, waren wir besonders an einer lymphozytären APN-Expression interessiert. Insbesondere sollten mehr Informationen zum Vorkommen und Entstehen APN-positiver Lymphozyten und zur APN-Regulation durch Zytokine und Zell-Zell-Kontakt gesammelt werden.

- APN ist kein wirklicher myeloischer Marker, da auch Lymphozyten in verschiedenen Geweben außerhalb des peripheren Blutes APN exprimieren können. Wir konnten erstmalig die Anwesenheit APN-tragender T-Zellen in entzündlichen Gelenksergüssen, Perikardflüssigkeit, bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) und verschiedenen Tumoren zeigen.
- Ein besonders hohes Vorkommen APN-tragender T-Zellen fand sich in entzündlichen Synovialflüssigkeiten und im Pannusgewebe von Patienten mit

juveniler chronischer Arthritis und Rheumatoidarthritis sowie in hellzelligem Nierentumoren. Tumorinfiltrierende Lymphozyten in Bronchialkarzinomen und Nierentumoren unterschieden sich außer in ihrer Fähigkeit zur APN-Expression in einer Reihe von Membranmolekülen (HLA-DR, CD25, CD11b, CD54 usw.). T-Zellen der BALF von Patienten mit Sarkoidose zeigten nur eine geringe APN-Expression von T-Zellen.

- Hinsichtlich der APN-Expression auf T-Zellen in der Perikardflüssigkeit hatten Patienten mit Herzklappenerkrankungen, die häufiger Entzündungen in ihrer Anamnese hatten, signifikant höhere Werte als Patienten mit angeborenen Herzfehlern und Patienten mit chronisch-ischämischer Herzkrankheit. Wir fanden in T-Zellen von unterschiedlichen Körperflüssigkeiten und Geweben keine enge Assoziation der Expression von APN mit DPIV/CD26, HLA-DR und CD25 (Proliferationsmarker).
- Membranpeptidasen wie APN, DPIV/CD26, Glutamylaminopeptidase und Neprilysin/CD10 lassen sich durch Zytokine, wie Interleukin (IL)-4, Interferone oder Transforming growth factor (TGF)- β regulieren, wobei es sich in der Regulation durch ein Zytokin zwischen den verschiedenen Enzymen nicht immer um gleichsinnige Effekte handelt. So sind Musterbildungen in der Peptidasenexpression denkbar, die funktionelle Konsequenzen haben könnten.
- Sowohl IL-4 als auch Interferon- γ führen zur Heraufregulation von APN und DPIV/CD26 in Nierenepithel- und Nierentumorzellen. TGF- β hemmt die Expression von DPIV/CD26, nicht jedoch von APN und bewirkt in Monozyten/Makrophagen sogar eine Heraufregulation von APN. Die mit APN und DPIV/CD26 kolokalisierte Membranpeptidase Neprilysin/CD10 wird in Fibroblasten-artigen Synoviozyten (SFC) durch TGF- β und IL-1 gehemmt, während IL-4 und verschiedene Interferone auch hier zur verstärkten Expression führen. IL-4 führt nicht zur APN-Expression reiner Lymphozytenkulturen.
- Zell-Zell-Kontakt zwischen Lymphozyten und SFC bzw. einigen anderen Zelltypen (Endothelzellen, Fibroblasten, Nierentubulusepithelzellen, Monozyten u. a.) führt bereits nach 60 min zu einer lymphozytären Expression von APN, ein Ergebnis, das die Anwesenheit APN-positiver Lymphozyten in verschiedenen Lokalisationen außerhalb des peripheren Blutes erklären kann und das sich

einreicht in ähnliche Beobachtungen zur Regulation von sehr verschiedenen Membranenzymen durch Zell-Zell-Kontakt.

- Direkter Kontakt zwischen Lymphozyten und SFC ist nötig für die lymphozytäre APN-Induktion, denn Trennung der Lymphozyten von den SFC durch einen für Zellen undurchlässigen Filter verhindert völlig den Effekt. Lösliche humane APN aus Nieren, die in einer Konzentration gegeben wurde, die der hohen löslichen APN-Konzentration in der Synovia von Patienten mit JCA entsprach (500-1500 pkat/ml bei Ala-pNA-Spaltung), führt nicht zu einer lymphozytären APN-Expression, ein Ergebnis, das gegen einen lymphozytären Rezeptor für lösliche APN spricht. Auch mit SFC-Membranpräparationen ist eine geringe APN-Induktion auf T-Zellen möglich.
- Lymphozyten zeigen nach Zell-Zell-Kontakt mit SFC eine gesteigerte APN-Promotoraktivität und APN-mRNA-Synthese. Trotzdem lässt sich der Effekt der lymphozytären APN-Expression nach Zellkontakt mit SFC mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid nicht vollständig hemmen.
- Da Fixierung der SFC mit Paraformaldehyd die Ergebnisse zur lymphozytären APN-Induktion kaum verändert, muss es sich um eine aktive Leistung der Lymphozyten handeln. Die APN-Expression auf den adhärent wachsenden Zellen ist wichtig für die Induktion von APN auf Lymphozyten, denn mit APN-negativen adhären Zellen konnte nie eine Induktion beobachtet werden.
- ECV304-Zellen, die mit einem APN-enthaltenden Vektor transfiziert wurden und APN stabil auf über 70 % der Zellen tragen, sind nun (trotz der bekannten geringen Expression von Adhäsionsmolekülen) in der Lage, lymphozytäre APN-Expression zu induzieren. ECV304-Zellen, die mit einem lösliche APN (ohne Membrananker)-enthaltenden Vektor stabil transfiziert sind, führen dagegen nicht zur APN-Induktion auf Lymphozyten in Kokultur.
- Als weitere Modellsysteme zum Generieren einer lymphozytären APN-Induktion nach Zell-Zell-Kontakt wurde sowohl das Durchwandern eines endothelialen Monolayers verwendet als auch das Einwandern von Lymphozyten in ein Kollagengel mit eingesäten SFC.

- Einsäen der SFC in ein Kollagengel fördert die lymphozytäre APN-Expression nach Zellkontakt. Dagegen hemmen sowohl Behandlung der SFC mit Cytochalasin B (Störung des Zytoskelettaufbaus) als auch Cholesterolentzug der SFC durch Methyl- β -Cyclodextrin (Zerstörung von Cholesterol-reichen Membranmikrodomänen) diesen Vorgang. Der letzte Punkt könnte für die Wichtigkeit der Anwesenheit von APN in Rafts und Caveolae der SFC für die lymphozytäre APN-Expression nach Zell-Zell-Kontakt sprechen.
- Mittels Immunfluoreszenz konnte erstmalig die Kollokalisierung von APN und Caveolin, einem Markermolekül der Caveolae, in SFC gezeigt werden. Diese Ergebnisse konnten durch Dichtegradientenzentrifugation und Elektronenmikroskopie bestätigt und auf DPPIV/CD26 und Neprilysin/CD10 erweitert werden.

Zukünftige Arbeiten sollen sich mehr mit funktionellen Aspekten einer APN-Expression auf Lymphozyten befassen, sollen mögliche *in vivo*-Liganden aufdecken und sich weiter mit der Lokalisation von APN in Rafts und Caveolae auseinandersetzen.

7.2. Tabellarischer Lebenslauf

Name:	Dagmar Riemann
Anschrift:	Friedensstraße 1E, 06114 Halle
Geburtsort/-datum:	Schönebeck, 24.5.1959
Nationalität:	deutsch
Familie	Lebensgemeinschaft, 2 Kinder
Abitur:	1973 - 1977 Gymnasium „August Hermann Francke“ (Auszeichnung)
Vorpraktisches Jahr:	1977 - 1978 Klinik für Therapeutische Radiologie, Vossstrasse
Studiengang:	1978 - 1984 Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle 1984 Approbation
Thema der Diplomarbeit:	„Einfluß eiweißreicher Diät auf die oberflächliche Hydrophobizität von Zytosolproteinen der Rattenleber“ Mentor: Prof. Peter Bohley, Institut für Physiolog. Chemie der Martin-Luther-Universität, 1982 verteidigt
Thema der Dissertation:	„Kultivierung und Charakterisierung humaner Endothelzellen aus Nabelschnurvene unter Berücksichtigung ihrer möglichen Beteiligung an der Antigenpräsentation“ Mentor: Prof. J. Langner, Leiter des Instituts für Medizinische Immunologie 1990 verteidigt
Facharztausbildung:	1984 – 1990 am Institut für Medizinische Immunologie zum Facharzt für Immunologie, Kolloquium Oktober 1990
Dienststellung:	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Medizin. Immunologie
Leitungstätigkeit:	Leiter der Diagnostikabteilung Durchflusszytometrie (Immundefektdiagnostik, Leukämietypisierung, BALF-Zelltypisierung) ab 1990
Forschungsgebiete:	-Charakterisierung von fibroblastenartig wachsenden Synoviozyten aus Synovektomiegewebe von Rheumatikern -Charakterisierung von Aminopeptidase N/CD13 als lymphozytärem Aktivierungsantigen -Phänotypisierung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten -Charakterisierung verschiedener Membranpeptidasen in Nierentumoren und in Synoviozyten -Charakterisierung von molekularen Veränderungen potentiell prädisponierender Gene für RA und JCA ; Kooperation mit Dr. Taubert aus dem Pathologischen Institut unserer Universität
Mitgliedschaften:	Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGI) Deutsche Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ) Gesellschaft für Signaltransduktion

7.3. Erklärungen

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und versichere, dass ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Halle, den 15. 6. 2001

Erklärung über frühere Habilitationsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich keine früheren Habilitationsversuche unternommen habe.

Halle, den 15. 6. 2001

7.4. Danksagung

Meinem Chef, Prof. Jürgen Langner, danke ich für sein Interesse und die Unterstützung und Förderung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit.

Die vorliegende Arbeit wurde in dankenswerter Weise unterstützt durch Sachbeihilfen der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Thyssenstiftung. Frau Dr. B. Göhring, Herr Dr. M. Löhn und Herr Dr. A. N. Santos waren als wissenschaftliche Mitarbeiter über die Deutsche Forschungsgemeinschaft für das Projekt „Membranpeptidasen in Nierentumoren“ (Rie 799/1-1) und im Rahmen zweier SFB-Förderperioden im Projekt „Untersuchungen zur Funktion, zum ultrastrukturellen Vorkommen und zur Beeinflussbarkeit von Aminopeptidase N/CD13 auf synovialen Lymphozyten“ (Leiter D. Riemann und Prof. Dr. J. Langner) angestellt.

Die Durchführung sämtlicher Experimente waren nur in Teamarbeit unter Mitwirkung folgender wissenschaftlicher Mitarbeiter, technischer Assistentinnen und von mir mitbetreuter Doktoranden und Diplomanden möglich, denen ich hiermit ganz herzlich danken möchte: Aus unserer Arbeitsgruppe bin ich besonders Frau Dr. Astrid Kehlen, Dr. Alexander Navarrete Santos, Frau Katja Thiele, Dr. Matthias Löhn, Frau Karin Bornschein, Frau Karin Jung, Frau Rosemarie Meinicke, Frau Gisela Landa und Frau Grit Helbing zu Dank verpflichtet. Aus der großen Schar an Diplomanden und medizinischen Doktoranden möchte ich hier stellvertretend nennen: Frau Katarina Baluchova, Frau Jana Röntsch, Frau Katrin Eiselt, Frau Silke Mittenzwei, Jörg Menschikowski, Dr. Peter Haase und Hagen Leine.

Eine intensive wissenschaftliche Zusammenarbeit verbindet mich mit meinen Kooperationspartnern, die die experimentellen Arbeiten bereicherten und denen ich hiermit herzlich danken möchte. Hervorheben möchte ich Dr. Michael Danielsen (Institut für Biochemie des Panum-Institutes in Kopenhagen) für seine sehr hilfreichen Diskussionen zu Rafts und Caveolae in Synoviozyten, Dr. Bettina Hause (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie) und Dr. Harald Aurich für ihre Unterstützung am Laserscanningmikroskop, Prof. Hans-Jürgen Holzhausen und Dr. Raoul Hintze für die Hilfe bei der Erfassung sämtlicher Tumorhistologien (Institut für Pathologie unserer Universität), Dr. Thoralf Stange (HNO-Klinik) für die Zusammenarbeit bei der Tonsillenbereitstellung, Frau Dr. Vera John (Kinderklinik) und Dr. Jörg Brandt (Orthopädische Klinik) sowie Prof. Kekow (Rheumaklinik Vogelsang) für die Bereitstellung von Synovialflüssigkeit und Synovektomiepräparaten, Prof. Heynemann und den Klinikern der Urologischen Universitätsklinik für die Überlassung von Nierentumorgewebe, Prof. Neef (ehemals Thoraxchirurgie) für die freundliche Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Lungentumoren. Perikardflüssigkeit wurde uns freundlicherweise aus der Klinik für Herzchirurgie unserer Universität bereitgestellt, wobei ich stellvertretend Dr. Manfred Herrmann und

Dr. Andreas Simm danken möchte. Frau Dr. Bettina Wollschläger (KIMII I5) und Chefarzt Dr. Wolfgang Schütte (Krankenhaus Martha-Maria Dörlau) danke für die Überlassung der klinischen Daten der BAL-Patienten, Dr. Rainer Tietze (Blutspende Bergmannstrost) für die Organisation der Bereitstellung von Buffy coat-Proben, Frau Dr. Schmidt (Institut für Pathologie unserer Universität) für die Überlassung einer Zelllinie an neonatalen humanen Hautfibroblasten und Frau Dr. Christiane Gläser (Institut für Humangenetik) für die Bereitstellung der ECV304-Zelllinie. Dr. Michael Schirner (Schering Berlin) bin ich dankbar für die freundliche Schenkung von Betaseron, Prof. Heinrich (RWTH Aachen) für die Überlassung von rekombinanten IL-6 und der Knoll-AG für die Schenkung von TNF- α . Weiter gilt mein Dank Prof. M. D. Cooper (Howard Hughes Medical Institute) für die Schenkung des mAk gegen Glutamylaminopeptidase und Firma Immunex (Washington) für die Bereitstellung von TAPI.

Für die Hilfe bei der Anfertigung einiger Abbildungen der Arbeit bin ich Marco Pahl, Matthias Klapperstück, Cornelius Hempel und Tobias Müller zu Dank verpflichtet.