Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Psychosomatik
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

HABLITITATIONSSCHRIFT

Vom Modell zur Therapie: Tumorzelldetektion und Immunmodulation

Zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach
Innere Medizin

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Dr. med. Martin Hildebrandt
aus Berlin

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. med. J. W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Neubauer, Marburg

2. Prof. Dr. med. S. Ansorge, Magdeburg

Eingereicht am: 27. Juni 2002

Abstract

Mit der vorliegenden Habilitationsschrift habe ich den Versuch unternommen, die beiden Themenkomplexe meiner bisherigen wissenschaftlichen Tätigkeit als Beispiele für die Rolle von Modellen in der klinischen Forschung zu verwenden. Den Anstoß dazu gaben Diskrepanzen, die mir in der Auseinandersetzung mit eigenen Ergebnissen und Beobachtungen im Umfeld dieser Themenkomplexe aufgefallen sind: der Rolle kontaminierender Tumorzellen in der Hochdosistherapie maligner Tumoren einerseits und dem Enzym Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) andererseits. Die beobachteten Diskrepanzen sind Ausdruck konkurrierender pathophysiologischer oder therapeutischer Modelle, und die Präferenz eines bestimmten Modells scheint nicht rein rational erklärbar. Welche Faktoren tragen jedoch zur Entscheidung für oder gegen ein bestimmtes Modell bei?

Ich möchte den Umgang mit wissenschaftlichen Modellen anhand der genannten Themenkomplexe aus meiner Sicht erörtern. Anschließend soll ein Entwurf skizziert werden, in dem die der Entscheidung für oder gegen ein therapeutisches Modell zugrundeliegende Motivationslage besser verständlich wird und die Intentionalität klinischer Forschung auf den Patienten hin berücksichtigt.

Schlagwörter:
Klinische Forschung,
Modell,
Hochdosistherapie,
Dipeptidylpeptidase IV,
Blutstammzellen

Abstract

In the thesis presented here, I have taken the challenge to use the topics of my scientific work to discuss the role that models appear to exert in clinical science. This decision arose from discrepancies that became evident in the comparative assessment of my own studies in relation with the surrounding scientific context: the role of tumor cells contaminating peripheral blood or progenitor cell harvests as part of a high-dose chemotherapy regimen on the one hand, and the enzyme dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) on the other. The observed discrepancies appear to result from competing pathophysiological or therapeutic models, and the preference or rejection of one model apparently cannot be explained solely by rational factors.

I will discuss the application of models in the context of the topics which my scientific work has been focusing on, and I will develop a draft proposal which will render the individual motivational status underlying the decision in favor of or against a distinct model easier to understand, with attention to the intentionality of clinical research towards the patient.

Keywords:
Clinical Science,
model,
high-dose chemotherapy,
dipeptidyl peptidase IV,
hematopoietic progenitor cells.

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung **1**

II. Gute Zellen, Schlechte Zellen: hämatopoetische Stammzellen, zirkulierende Tumorzellen und das Bemühen, die einen von den anderen zu trennen **3**

1. Einführung: Transplantation hämatopoetischer Vorläuferzellen *3*
2. Das Problem der Quantifizierung der Vorläuferzellen *5*
3. Das Problem potentiell schädlicher Zellen im Stammzelltransplantat *6*
4. Nachweis zirkulierender Tumorzellen: Methodik *8*
5. Spezifischer Nachweis von Mammakarzinom- und Hodentumorzellen im Blut *10*
6. Nachweis von Tumorzellen in Transplantaten: klinische Relevanz *13*
7. Klinische Relevanz bei Patienten mit Hodentumoren *14*
8. Eliminierung zirkulierender Tumorzellen *16*

III. Dipeptidylpeptidase IV **20**

1. Einführung *20*
2. Substrate der DPP IV *21*
3. Einbindung in Immunfunktionen *21*
4. Nutritive Aspekte *23*
5. Psychomodulatorische Aspekte *24*
6. Lösliche DPP IV: Ursprung und Funktion *24*
7. Klinische Aspekte der DPP IV *26*
Immunprozesse, Autoimmunerkrankungen und AIDS *26*
DPP IV bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen *27*
Veränderungen der DPP IV-Aktivität im Serum bei Erkrankungen aus dem psychosozialen Formenkreis *28*
8. Mögliche Konsequenzen erhöhter DPP IV-Aktivität *30*
9. DPP IV-Inhibition in einem Modell für stressimmunologische Interaktionen *32*

IV. Zur Rolle des Modells in der klinischen Forschung **37**

1. Modelle in der klinischen Forschung *37*
2. Philosophischer Exkurs: Entscheidungsprozesse und Lebenswelten *40*
3. Wissenschaftliche Entscheidungen in der klinischen Forschung *41*

V. Zusammenfassung **43**

VI. Literatur **44**

VII. Eigene Publikationen (Auswahl) **55**

VIII. Danksagung **57**

I. Einleitung

„The real issue, as I see it, is the extent to which nature constrains scientific theorizing.“ (Giere, 1988)

Klinische Forschung ist patientengerichtet; sie bemüht sich um ein besseres Verständnis physiologischer Prozesse und deren Änderungen bei Krankheiten mit dem Ziel, für den Patienten einen therapeutischen Gewinn zu erzielen. Die Motivation zur klinischen Forschung kann nicht nur individuell unterschiedlich stark ausgeprägt sein, sie wird auch von einer kaum überschaubaren Zahl von Faktoren beeinflußt, wie dem Bemühen um Heilung oder Linderung, dem Appell der Betroffenen, der Befriedigung über einen erzielten therapeutischen Erfolg, technischen Innovationen, finanziellen Erwägungen oder wissenschaftlicher Neugier. So münden offenbar verschiedene, teils bewußte, teils unbewußte Faktoren in Entscheidungen der Wissenschaftler für ein bestimmtes experimentelles Modell oder therapeutisches Konzept ein. Wie kann man angesichts dieser schwer übrschaubaren Motivationslage klinische Forschung im Interesse des Patienten betreiben?

Die beiden Schwerpunkte meiner bisherigen wissenschaftlichen Arbeit bieten meines Erachtens geeignete Beispiele für eine Auseinandersetzung über den Umgang mit therapeutischen Modellen im Rahmen der vorliegenden Habilitationsschrift. Einen Schwerpunkt stellt die Selektion hämatopoetischer Vorläuferzellen im Kontext der Hochdosis-Chemotherapie dar, verbunden mit dem Bemühen, unerwünschte, da potentiell gefährliche Zellpopulationen zu entfernen. Hier konnten wir zum einen Methoden der Tumorzelldetektion etablieren, zum anderen belegen, daß bei Patienten mit Hodentumoren der Nachweis solcher Tumorzellen in den Stammzell-Asservaten ein schlechtes Ansprechen auf die Hochdosistherapie und ein verkürztes ereignisfreies Überleben voraussagt. Dies traf sogar auf jene Patienten zu, bei denen anhand etablierter prognostischer Kriterien mit hoher Wahrscheinlichkeit ein gutes Ansprechen auf die Therapie eigentlich hätte erwartet werden können. Sind die detektierten Tumorzellen eher von prognostisch-diagnostischer Bedeutung? Oder sind sie, wenn sie mit einem Stammzellasservat reinfundiert werden, in der Lage, sich im Organismus anzusiedeln und ein Rezidiv des Tumors zu verursachen? Diese Möglichkeit wird diskutiert und von verschiedenen experimentellen Beobachtungen gestützt, ist jedoch bis heute nicht endgültig bewiesen worden. Muß nun die Konsequenz der prognostischen Bedeutung von Hodentumorzellen in Stammzellasservaten sein, daß wir sie, wie bei anderen Tumoren propagiert und praktiziert, aus den Asservaten eliminieren? Verschiedene Verfahren zur Entfernung solcher Tumorzellen stehen

zur Verfügung. Sie sind nicht nur meist teuer, sondern genießen auch ein hohes Prestige in der hämatologisch-onkologischen Forschung. Müßten wir aber Patienten mit nachgewiesenen Tumorzellen in den Stammzellasservaten aufgrund der erhobenen Daten nicht eher von belastenden Hochdosis-Therapieprotokollen ausschließen, da sie voraussichtlich von diesen nicht profitieren werden?
Das am weitesten verbreitete Verfahren der Aufreinigung von Stammzell-Asservaten, die Selektion CD34-positiver hämatopoetischer Vorläuferzellen, besticht durch die Eleganz eines halbautomatisierten, in sich geschlossenen Systems. Jedoch findet sich auch hier eine problematische Diskrepanz: Ursprünglich war die Zahl der CD34-positiven Vorläuferzellen in einem Stammzellprodukt als operationale Größe, bei mangelnder Kenntnis der eigentlichen pluripotenten „Stammzelle“ des Blutes, verwendet worden. Eine Mindestzahl CD34-positiver Zellen sagt für den Empfänger mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Rekonstitution des peripheren Blutbildes nach Hochdosistherapie voraus. Die Selektion CD34-positiver Zellen macht jedoch aus einer vormals operationalen Größe ein Medizinprodukt, welches möglicherweise die für eine langfristige Rekonstitution des Blutes eigentlich relevante Vorläuferzelle nicht enthält.

Der zweite Schwerpunkt meiner wissenschaftlichen Arbeit ist das Enzym Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV), welches in den letzten Jahren mehr Aufmerksamkeit in der klinischen Forschung erlangt hat und dessen Hemmung als therapeutisches Prinzip derzeit in klinischen Studien evaluiert wird. Die verfügbaren Daten geben Grund zur Annahme, daß dieses Enzym in verschiedene komplexe Regelkreise des Organismus eingebunden ist, denn Peptidhormone mit nachgewiesener Bedeutung für die Modulation einer Immunantwort, für die Hunger-Sättigungs-Regulation wie auch für die Schmerzempfindung gehören zu den Substraten der DPP IV. Daneben ist das Enzym an der Aktivierung und Signaltransduktion von T-Lymphozyten beteiligt und trägt zu proinflammatorischen Immunantworten bei. Eine Hemmung der Aktivität der DPP IV ist wiederum in der Lage, derartige Immunantworten zu unterdrücken. Die Betrachtung der DPP IV als komplexen Modulator an einer Schnittstelle verschiedenster Funktionen hat mich zu der Vermutung geführt, daß die Aktivität des Enzyms an physiologischen Alarmreaktionen des Organismus beteiligt sein könnte. Die gezielte Inhibition der DPP IV-Aktivität als therapeutisches Prinzip, wie sie derzeit für die Behandlung des Typ II-Diabetes mellitus großes Interesse findet, könnte daher in schwer kontrollierbarer Weise komplexe Mechanismen beeinflussen, deren mangelnde Kenntnis eine solche Intervention derzeit vielleicht noch nicht erlaubt.

Ich möchte im Rahmen der Habilitationsschrift den Umgang mit therapeutischen Modellen anhand der genannten Themenkomplexe aus meiner Sicht darstellen. Abschließend soll ein Entwurf skizziert werden, in dem die der Entscheidung für oder gegen ein therapeutisches

Modell zugrundeliegende Motivationslage besser verständlich wird und die Intentionalität klinischer Forschung auf den Patienten hin berücksichtigt.

II. Gute Zellen, Schlechte Zellen: hämatopoetische Stammzellen, zirkulierende Tumorzellen und das Bemühen, die einen von den anderen zu trennen

1. Einführung: Transplantation hämatopoetischer Vorläuferzellen

Das Konzept der Transplantation hämatopoetischer Vorläuferzellen geht auf erste tierexperimentelle Untersuchungen in der Mitte des vorigen Jahrhunderts zurück (Jacobson et al., 1951), die zeigten, daß die Übertragung von Milzzellen oder Knochenmark syngener Spender auf Empfänger nach Ganzkörperbestrahlung deren Tod verhinderte. Allerdings war zu jenem Zeitpunkt die Grundlage dieses protektiven Effektes unklar; Jacobson (Jacobson, 1952) favorisierte hormonelle Faktoren. Die Transplantation hämatopoetischer Vorläuferzellen bei Patienten erfuhr bis zum Ende der 60er Jahre geringe Beachtung, zumal eine 1970 publizierte Metaanalyse ein eher entmutigendes Resümee zog. Der Durchbruch der heutigen Knochenmarktransplantation begann mit der Erkenntnis der Bedeutung der Histokompatibilitätstestung. Die erste erfolgreiche Knochenmarktransplantation unter Berücksichtigung der Kompatibilität der Zelloberflächenmerkmale von Spender und Empfänger wurde bei einem Kind mit schwerer kombinierter Immundefizienz durchgeführt (Good et al., 1969). Die Zahl durchgeführter Transplantationen stieg mit der Einführung der autologen Knochenmarktransplantation und der Erkenntnis, daß auch im peripheren Blut Vorläuferzellen nachgewiesen werden können: Durch subletale Schädigung des Knochenmarks im Rahmen einer Chemotherapie sind sie in der Erholungsphase des Knochenmarks vermehrt in der Peripherie nachweisbar, ferner kann eine Ausschwemmung hämatopoetischer Vorläuferzellen durch Gabe geeigneter Wachstumsfaktoren induziert werden. Die maschinelle Anreicherung zirkulierender Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut verringerte nicht nur das mit der Knochenmarkpunktion verbundene Risiko, sondern erlaubte auch die Gewinnung erheblich größerer Zahlen von Vorläuferzellen. Die Fähigkeit peripherer Vorläuferzellen, eine Regeneration des Knochenmarks im Empfänger zu bewirken, unterscheidet sich von der der Vorläuferzellen des Knochenmarks in der Geschwindigkeit der Rekonstitution, in der Manipulierbarkeit der gewonnenen Zellfraktion sowie in der Qualität und Intensität der beobachteten Nebenwirkungen (Bennett et al., 1995; Faucher et al., 1994; Peters et al., 1993; Pettengell et al., 1993). Unklar ist jedoch, ob dies den in das periphere Blut mobilisierten Vorläuferzellen *per se* zuzuschreiben ist oder eher dem Einsatz hämatopoetischer Wachstumsfaktoren (Janssen et al., 1994).
Die Indikation zur Transplantation hämatopoetischer Vorläuferzellen soll nur prinzipiell skizziert werden. Die autologe Transplantation erlaubt eine Umgehung der mit den meisten zytostatisch

wirksamen Therapeutika zu erwartenden Hämatotoxizität, so daß eine Erhöhung der applizierten Dosis über diese Grenze hinaus möglich wird[1]. Voraussetzung ist die Sensitivität der jeweiligen Erkrankung gegenüber den verwendeten Therapeutika und eine mit der Dosis steigende Wirksamkeit gegenüber der malignen Erkrankung. Bei der allogenen Transplantation wird über den Aspekt der direkten Toxizität hinaus erwartet, das hämatopoetische System des Empfängers durch ein gesundes allogenes Transplantat weitgehend zu ersetzen, so daß schon auf der frühestmöglichen Ebene eine Zerstörung potentiell oder nachweislich aberranter klonogener Zellen erfolgen kann. Ferner wird erhofft, daß das Transplantat eine Abwehrfähigkeit gegen bösartige Zellklone über spezifische Erkennung dieser entwickelt, welche dem Empfänger aus verschiedenen Gründen versagt war (sog. GvL- (Graft versus Leukemia)-Effekt).

Folgende Ziele der Transplantation hämatopoetischer Vorläuferzellen lassen sich zusammenfassen:

Effizientere Therapie durch höhere Dosis und somit höhere Wirksamkeit der zytostatischen Therapie,
beherrschbare Hämatotoxizität,
dauerhafte Regeneration bzw. Chimärismus der Hämatopoese,
dauerhafte Eliminierung oder Kontrolle maligner Vorläuferzellen.

Aus Sicht des Patienten formulierte Ziele, welche sich aus den obigen teilweise ergeben, sind eine höhere kurative Chance bzw. ein verlängertes ereignisfreies Überleben, verbunden mit einer höheren Lebensqualität als unter anderen, nicht die Transplantation von Vorläuferzellen einschließenden Therapiemodalitäten.
Die Probleme der Hochdosistherapie in Kombination mit einer Knochenmark- oder Stammzelltransplantation sind vielfältiger Natur: Sie betreffen die Infektionskontrolle unter der Therapie, die therapieassoziierte Toxizität einschließlich der Gefahr sekundärer Neoplasien, das Transplantatversagen ebenso wie eine überschießende Immunantwort des Transplantats gegen den Wirt bis hin zur immer noch oft tödlich verlaufenden akuten Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (GvHD, Graft versus Host Disease), ferner gesundheitsökonomische Aspekte und das Problem der Langzeitrehabilitation. Diese zu diskutieren ist nicht das Thema der vorliegenden

[1] Eine Dosiserhöhung ist nur innerhalb der Grenzen, die durch anderweitige Toxizität der jeweiligen Substanz gezogen werden, möglich. So ist beispielsweise die applizierbare Dosis von Anthrazyklinen durch die zu erwartende Kardiotoxizität nur geringfügig über das im Rahmen der Standardtherapie gewohnte Maß hinaus möglich. Üblicherweise werden daher Substanzklassen mit nachgewiesener Wirksamkeit gegenüber der Grunderkrankung und – abgesehen von der Hämatotoxizität – vertretbarer Toxizität bei Dosiseskalation verwendet, wie die Gruppen der Alkylantien, der Topoisomerase II-Inhibitoren, Antimetaboliten oder Nitrosoharnstoffe.

Arbeit. Ich werde mich auf den Aspekt der Identifizierung und Eliminierung potentiell schädlicher Zellen aus den zu transplantierenden Vorläuferzellen konzentrieren und mich mit den dabei verwendeten Modellen der Vorläuferzellen und der zu eliminierenden Zellen beschäftigen.

2. Das Problem der Quantifizierung der Vorläuferzellen

Das Konzept der Transplantation hämatopoetischer Vorläuferzellen basiert auf einem Modell, das sich in der Praxis der Hochdosistherapie bewährt hat: Pluripotente Vorläuferzellen des blutbildenden Systems können bei einem Spender oder beim Patienten selbst gewonnen und auf einen Empfänger übertragen werden; sie siedeln sich nach Infusion im Knochenmark an und tragen durch Teilung und fortschreitende Differenzierung zur Rekonstitution der Blutbildung bei. Bis heute ist es jedoch weder möglich, die eigentliche Vorläuferzelle dieses Modells zu charakterisieren, noch genau zu sagen, wie viele dieser Vorläuferzellen mindestens benötigt werden, um in einer für den Empfänger vertretbaren Zeit eine funktionsfähige Hämatopoese nach Myeloablation zu erzielen. Lediglich aus tierexperimentellen Untersuchungen mit Titration der transplantierten Zellen sind Annäherungen bekannt. Es sind daher Operationalisierungen vorgeschlagen worden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit ein „Engraftment“, also eine dauerhafte Regeneration des peripheren Blutbildes, erwarten lassen. Ursprünglich wurden die im Transplantat enthaltenen mononukleären Zellen gezählt und eine Zielgröße von $1\text{-}3 \times 10^8$ mononukleärer Zellen je Kilogramm des Empfängergewichts angestrebt. Ein *in vitro*-Modell, in welchem Vorläuferzellen zu Kolonien („colony-forming units“, CFU) von erythroiden oder granulozytär-monozytären Zellen des Blutes expandieren und differenzieren, erlaubt eine qualitative Aussage über die Wachstums- und Teilungsfähigkeit der gewonnenen Vorläuferzellen. Eine Quantifizierung der Kolonien als alleinige Methode zur Abschätzung der Zahl von Vorläuferzellen im Transplantat wird angesichts der in multizentrischen Studien belegten geringen Verläßlichkeit mittlerweile nur in wenigen Zentren akzeptiert (Serke et al., 1998).

Als Standardmethode gilt die durchflußzytometrische Bestimmung der Zahl von Zellen innerhalb des gewonnenen Transplantates, welche das Oberflächenantigen CD34 tragen (Krause et al., 1996). CD34 ist ein membranständiges Antigen, das auf hämatopoetischen Vorläuferzellen, ferner auf Endothelzellen kleinerer Gefäße (Fina et al., 1990; Krause et al., 1996) und embryonalen Fibroblasten (Brown et al., 1991) nachgewiesen werden kann. Die höchste Antigendichte von CD34 ist auf frühen Vorläuferzellen beschrieben worden, nimmt aber mit fortschreitender Differenzierung der Zellen ab (Civin et al., 1987). Vollständig differenzierte Zellen des Blutes sind CD34-negativ. Die stark CD34-positiven Zellen sind in Größe und Morphologie Lymphozyten vergleichbar und wachsen *in vitro* in Kolonien vielfältigster

hämatopoetischer Differenzierung aus (DiGiusto et al., 1994; Murray et al., 1995). Die eher willkürliche Unterscheidung nach stärkerer oder schwächerer Expression des CD34-Antigens hat dazu geführt, daß weitere Antigene hinzugezogen wurden, um möglichst frühe Vorläuferzellen charakterisieren zu können. Als Konsensus gilt derzeit, daß die frühesten charakterisierbaren Vorläuferzellen des Blutes folgende Antigenkombination tragen: $CD34^{stark\ pos.}$, $CD38^{schwach\ bis\ neg.}$, HLA-DR $^{schwach\ bis\ neg.}$, $CD90^{pos.}$, $CD117^{pos.}$, $Rhodamin123^{schwach\ pos.}$, bei Fehlen weiterer linienspezifischer Antigene (Baum et al., 1992; Fritsch et al., 1993; Olweus et al., 1996; Recktenwald und Waller, 1996). Die Transplantation von 2 Mio. CD34-positiven Zellen je Kilogramm des Körpergewichtes im autologen Bereich bzw. 4 Mio. CD34-positiven Zellen bei der allogenen Transplantation werden weitgehend als für die Regeneration erforderliche Mindestdosis akzeptiert. Diese Zahl muß jedoch als operationale Größe verstanden werden, da die eigentlichen Vorläuferzellen hinsichtlich ihrer Oberflächenantigene bis heute nicht charakterisiert sind. Im Gegenteil: jüngste Untersuchungen beim Hund belegen in ähnlicher Weise wie zuvor bei der Maus die Existenz einer Population ruhender, fibroblastenähnlicher Vorläuferzellen des Blutes, welche nicht das CD34-Antigen tragen (Ema et al., 2000; Huss et al., 2000). Diese Zellen beginnen erst mit Eintritt in den Zellzyklus, CD34 an ihrer Oberfläche zu exprimieren.

Das Modell der Ausdifferenzierung aller Blutzellen aus Vorläuferzellen, welche schließlich auf eine gemeinsame pluripotente Vorläuferzelle zurückgehen, läßt sich am Wechsel des Phänotyps, also der Expression verschiedener Antigene an der Zelloberfläche im Zuge der Differenzierung, kohärent nachvollziehen. Es wird angenommen, daß die Änderung des Phänotyps der CD34-negativen Vorläuferzelle zu einem CD34-positiven Phänotyp ebenfalls einen Differenzierungsschritt darstellt, der mit Verminderung der Pluripotenz und der langfristigen Überlebensfähigkeit der Zelle einhergehen könnte (Dao und Nolta, 2000). Beim jetzigen Wissensstand hat sich dennoch die Quantifizierung CD34-positiver Zellen zur Abschätzung der Eignung des Stammzellasservates für die Transplantation bewährt. Ferner ist vorstellbar, daß bei einer ausreichenden Zahl CD34-positiver Zellen eine genügende Anzahl eigentlicher (CD34-negativer?) Vorläuferzellen im gewonnenen Transplantat enthalten ist, um eine erfolgreiche Regeneration des peripheren Blutbildes zu gewährleisten.

3. Das Problem potentiell schädlicher Zellen im Stammzelltransplantat

Die CD34-positiven Zellen, mit deren Hilfe die Wahrscheinlichkeit einer Regeneration des peripheren Blutbildes in adäquater Zeit befriedigend vorhergesagt werden kann, machen nur einen geringen Anteil der im Transplantat enthaltenen Zellen aus. Die Gesamtzahl umfaßt auch Zellpopulationen, die in der allogenen Transplantation in verschiedener Hinsicht, zum Beispiel

durch Expansion im Rahmen einer Immunantwort gegen den Empfänger, eine schwere Schädigung des Wirtes nach sich ziehen können. Zum Teil kann das Risiko derartiger Komplikationen durch Auswahl eines geeigneten Spenders vermindert werden, zum Teil nur durch Entfernung der betreffenden Zellen aus dem Transplantat. So kann bei Inkompatibilität der AB0-Blutgruppenmerkmale zwischen Spender und Empfänger durch Aufbereitung des Transplantates unter Entfernung der Erythrozyten oder des Plasmas und Versorgung des Empfängers mit AB0-kompatiblen Blutprodukten die Gefahr einer klinisch relevanten Hämolyse vermindert werden. Die HLA-Kompatibilität von Spender und Empfänger macht eine schwere Abstoßungsreaktion zwar weniger wahrscheinlich, schließt sie jedoch nicht aus (Bortin, 1970). Es liegt nahe, das HLA-System als Repräsentanz der Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger zu verstehen, welche sich im klinischen Einsatz bewährt hat. An diesem Beispiel wird jedoch zugleich deutlich, daß theoretisch bessere Modelle für die Kompatibilität durchaus vorstellbar sind. So könnte die Kenntnis weiterer Faktoren, die eine bessere Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger definieren, eine Transplantation weniger riskant gestalten oder im Idealfall die derzeit erforderlichen Methoden der Immunsuppression oder Myeloablation entbehrlich machen.

Probleme der Inkompatibilität sind bei der autologen Transplantation bis auf Berichte von anekdotenhaftem Charakter nicht bekannt. Hier tritt jedoch mit der zu behandelnden Grunderkrankung ein Problem auf, welches im Folgenden ausgeführt werden soll: die Existenz zirkulierender Tumorzellen im Blut des Patienten.

Die Metastasierung maligner Tumoren in entfernte Organe ist mit dem Modell der hämatogenen Aussaat erklärbar: Zellen des Primärtumors gelangen in die Blutbahn, können in Kapillarnetzen entfernt gelegener Organe durch Adhäsionsprozesse oder Embolisierung der Zirkulation entweichen und durch Implantation und Ausbildung eines eigenen Blutgefäßnetzes zu Metastasen in dem befallenen Organ expandieren. Als Besiedelung des Knochenmarks ist die hämatogene Metastasierung bei zahlreichen soliden Tumoren wie auch bei malignen hämatologischen Erkrankungen Teil der Diagnostik zur Stadieneinteilung der Tumorausbreitung. Bei hämatologischen Erkrankungen ermöglicht der Nachweis maligner Zellen im peripheren Blut eine Diagnose, eine prognostische Einschätzung und, zum Beispiel bei der chronischen myeloischen Leukämie, eine Entscheidung über Art und Intensität der erforderlichen Therapie. Zahlreiche Studien liegen mittlerweile zum Charakter der in Blut oder Knochenmark nachgewiesenen Tumorzellen vor (Pantel et al., 1999). So wird im Fall des Mammakarzinoms vermutet, daß zumindest manche der im Knochenmark lokalisierten Zellen über Jahre hinweg in einer Latenzphase ruhen, zu einem nicht vorhersagbaren Zeitpunkt jedoch wieder in den Zellzyklus eintreten und expandieren könnten (Pantel et al., 1999). Darüber hinaus scheinen im Zuge der Stammzellmobilisierung unter Gabe hämatopoetischer Wachstumsfaktoren auch

Tumorzellen in das periphere Blut mobilisiert und mit der Stammzellapherese angereichert zu werden (Brugger et al., 1994). Der Vergleich mit ruhenden oder mobilisierten Vorläuferzellen der Hämatopoese liegt nahe.
Am Beispiel des Mammakarzinoms und der Keimzelltumoren soll folgenden Fragen nachgegangen werden:
1. Wie lassen sich Tumorzellen in Blut oder Knochenmark – und somit in für die Hochdosistherapie gewonnenen Transplantaten - diagnostizieren und quantifizieren?
2. Ist der Nachweis von Tumorzellen von Relevanz für den Patienten?
3. Im Kontext der Hochdosistherapie stellt sich die Frage, ob die Tumorzellen von Bedeutung für den Verlauf der Transplantation sind und gegebenenfalls entfernt werden müßten.

4. Nachweis zirkulierender Tumorzellen: Methodik

Grundsätzlich lassen sich Tumorzellen im Blut über Eigenschaften identifizieren, die herkömmlichen Zellen des Blutes fehlen. Der Nachweis solcher Merkmale hat Modellcharakter für die Präsenz von Tumorzellen im Blut oder Knochenmark, solange die Spezifität der Methode und die Kenntnis der untersuchten Eigenschaft falsch positive Ergebnisse ausschließen. Sinkt die Spezifität einer Methode aufgrund neuer Beobachtungen, wird ihre Eignung zur Tumorzelldetektion fraglich, wie geschehen bei der t(14;18)-Translokation als Beleg für die Präsenz von B-Zell-Lymphomzellen im peripheren Blut (Aster et al., 1992; Limpens et al., 1991). Bei Eingrenzung auf das periphere Blut oder Knochenmark als dem Bezugssystem der Methode können jedoch Eigenschaften bzw. Moleküle der zu detektierenden Zellen als geeignet akzeptiert werden, die in Bezug auf andere Organe aufgrund mangelnder Spezifität nicht für den Nachweis von Tumorzellen in Frage kämen.
Ersten Arbeiten über Karzinomzellen im Knochenmark zufolge galt die Expression von Zytokeratinfilamenten als charakteristisch für epitheliale Zellen und somit als geeignet zum Nachweis nichthämatopoetischer Zellen im Knochenmark. Abgesehen von möglichen Störquellen wie unter der Punktion eingeschleppter epithelialer Zellen kann mit Berechtigung angenommen werden, daß Cytokeratin-positive Zellen im Blut oder im Knochenmark epithelialen Ursprungs und möglicherweise Tumorzellen sind. Gestützt wird diese Annahme zum einen durch Untersuchungen an Blut- und Knochenmarkproben gesunder Spender, die mittlerweile in zahlreichen Studien verschiedener Zentren durchweg negativ ausfielen, zum anderen durch Wachstum von Kolonien Cytokeratin-positiver Zellen aus immunzytochemisch positiv befundeten Blut- und Knochenmarkproben *in vitro*. Ein Vorteil der immunzytochemischen Färbung Cytokeratin-positiver Zellen ist deren Quantifizierbarkeit, was Verlaufsuntersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten unter der Therapie ermöglicht. Diesem Vorteil stehen ein hoher

zeitlicher, finanzieller und personeller Aufwand gegenüber, denn die Sensitivität der Methode wird durch die Zahl der untersuchten Zytozentrifugenpräparate bestimmt (Franklin et al., 1996). Molekularbiologische Methoden wie die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) erscheinen diesbezüglich vorteilhafter: Die Auswertung der Befunde ist schneller und einfacher, es können größere Probenzahlen gleichzeitig untersucht werden, und das Testresultat (positiv/negativ) gilt als besser objektivierbar. Eine quantitative Aussage ist jedoch, zumindest bei der „klassischen" PCR-Methode, nicht möglich[2]. Die Nutzung der PCR zum Nachweis tumorspezifischer genomischer DNA-Sequenzen ist oftmals durch mangelnde Spezifität, relativ geringe Sensitivität und technische Probleme begrenzt, zumal in Frage kommende Genabschnitte eine erhebliche Größe erreichen. Eine Ausnahme stellen jedoch tumorspezifische Chromosomentranslokationen oder physiologische Genrearrangements einer monoklonal expandierten Zellpopulation dar. Wenn die Nachweismethode zwar bei manchen Erkrankungen auf patientenspezifische DNA-Sequenzen abgestimmt werden muß, ist eine höhere Spezifität der Methode durch diese Zielsequenz gewährleistet, welche – wie bei der CML oder den Tumoren der Ewing-Familie - durchaus von pathophysiologischer Bedeutung für die Erkrankung sein kann oder zumindest charakteristisch für eine monoklonal expandierende Zellpopulation ist.
Die Kombination von reverser Transkription und anschließender Amplifiaktion der von einer bestimmten Gensequenz transkribierten RNA (RT-PCR) hat sich als Methode zum Nachweis von Tumorzellen häufiger bewährt. Zielsequenz ist eine tumorspezifisch (oder für die normale Hämatopoese atypisch) exprimierte RNA-Sequenz. Problematisch ist hier eher eine mangelnde Spezifität, da für verschiedene als tumorspezifisch erachtete RNA-Sequenzen bei Ausreizung der Sensitivität falsch positive Ergebnisse, offenbar durch minimale basale Expression, beobachtet wurden(Bostick et al., 1998). Transkripte tumorspezifischer Translokationen sind nicht immer von diesem Problem ausgeschlossen.

[2] Erst neuere Techniken erlauben einen quantitativen Nachweis basierend auf der PCR-Methode Nitsche, A.; Steuer, N..; Schmidt, C.A.; Landt, O.. und Siegert, W. (1999): Different Real-Time PCR Formats Compared for the Quantitative Detection of Human Cytomegalovirus DNA, Clin Chem 45 [11], Seite 1932-1937., oftmals jedoch mit geringerer Sensitivität gegenüber der „klassischen" PCR.

5. Spezifischer Nachweis von Mammakarzinom- und Hodentumorzellen im Blut

Bei unserer Suche nach einem spezifisch exprimierten Molekül zum Nachweis von Mammakarzinomzellen im peripheren Blut erwies sich, nach Prüfung anderer in Frage kommender Transkripte, der Rezeptor für den Epithelialen Wachstumsfaktor (Epithelial Growth Factor Receptor, EGF-R) als sensitiv und spezifisch (Hildebrandt et al., 1997). Gleichzeitig erwies sich in unseren Untersuchungen die andernorts propagierte RT-PCR auf die für Cytokeratin 19 (CK 19) kodierende mRNA für die Detektion von Tumorzellen als ungeeignet; falsch positive Ergebnisse waren am ehesten durch Pseudogene zu erklären, welche vermutlich durch virale reverse Transkription und Reinsertion in das Genom entstanden sind. Mindestens fünf solcher Pseudogene sind für CK 19 bekannt (Ruud et al., 1999).
Aufgrund der bekannten Expression des EGF-R in Zellen des Knochenmarksstromas (Satomura et al., 1998) kam eine Verwendung für die Detektion von Karzinomzellen im Knochenmark nicht in Frage. Diese Begrenzung der Eignung war jedoch für unsere Fragestellung, die Detektion der Tumorzellkontamination in Stammzellasservaten des peripheren Blutes, nicht relevant. Ein möglicher Vorteil der für den EGF-R kodierenden mRNA als Zielsequenz lag in der Assoziation einer vermehrten Expression des Rezeptors mit einem negativen Östrogenrezeptorstatus des Tumors und einem ungünstigen klinischen Verlauf (Newby et al., 1995), was die Möglichkeit nahelegte, mit EGF-Rezeptor-positiven Zellen eine klinisch relevante Subpopulation von Tumorzellen zu detektieren. Ein Patent für die von uns entwickelte Methode wurde 1997 angemeldet (Hildebrandt und Mapara, 1997).
Hinsichtlich der Detektion von Tumorzellen im peripheren Blut konzentrierten sich die Bemühungen der meisten Arbeitsgruppen auf die Erkrankungen, die das Gros der Indikationen für die Hochdosistherapie stellen und, angesichts ihres systemischen Charakters oder ihres Metastasierungsmusters, die Präsenz oder eine klinische Relevanz zirkulierender Tumorzellen erwarten lassen. Beispiele für derartige Erkrankungen sind das Neuroblastom (Bensinger et al., 1990; Brenner et al., 1993; Civin et al., 1996), das Mammakarzinom (Cote et al., 1999; Cote et al., 1991; Mansi et al., 1987; Ross et al., 1993) und Lymphome (Bensinger et al., 1990; Gribben et al., 1991; Pettengell et al., 1993). Hingegen war der Aspekt zirkulierender Tumorzellen im Blut bei Patienten mit *Keimzelltumoren* bisher nicht thematisiert worden. Diese Tatsache ist vermutlich durch den geringen Anteil bedingt, den diese Entität an der Gesamtzahl autologer Transplantationen ausmacht, denn die Indikation für die Hochdosistherapie kann derzeit nur für relativ kleine, definierte Untergruppen von Patienten mit fortgeschrittenem oder rezidiviertem Keimzelltumor als gesichert angesehen werden (Bosl, 1993).
Ziel unserer ersten Studie zu diesem Thema war, Techniken für die sensitive Detektion von

Keimzelltumorzellen im peripheren Blut und in Stammzellasservaten zu etablieren. Hierfür wurden Zellen geeigneter Tumorzellinien in mononukleäre Zellen des Blutes in Titration eingesät („Spiking“), eine von uns auch beim Mammakarzinom genutzte Methode, um etablierte und neue Methoden bzw. Sequenzen auf ihre Sensitivität hin vergleichend zu untersuchen. In diesem Fall verglichen wir die klassische Methode immunzytochemischer Detektion mit der RT-PCR. Die immunzytochemische Methode erlaubte eine Detektion von einer Tumorzelle in 10^5 mononukleären Zellen; dies entsprach der schon zuvor beim Mammakarzinom beobachteten Sensitivität. Bei der Suche nach geeigneten Sequenzen für die RT-PCR war der zuvor etablierte Nachweis der EGF-R mRNA (Hildebrandt et al., 1997) aufgrund geringer Sensitivität nicht geeignet. Eine andere Zielsequenz, die Keimzell-Alkalische Phosphatase (Germ cell alkaline phosphatase, GCAP) erwies sich wiederum als überaus sensitiv; obendrein war die Spezifität des Nachweises durch die Methode der RT-PCR gewährleistet, da nur auf der RNA-Ebene eine Differenzierung zwischen der Tumorzell-assoziierten GCAP und der in der Proteinsequenz nahezu identischen, aber auch in der normalen Hämatopoese exprimierten Plazentaren Alkalischen Phosphatase (PLAP) möglich war. Ein monoklonaler Antikörper, der zwischen diesen Isoformen der Alkalischen Phosphatase unterscheiden könnte, ist derzeit nicht bekannt. Die Sensitivität der RT-PCR auf GCAP unterschied sich je nach verwendeter Zellinie deutlich: einer Sensitivität von $1:10^4$ in einer Linie stand eine Sensitivität von über $1:10^6$ in einer anderen Linie gegenüber. Dies reflektiert möglicherweise ein *in vivo* ähnlich beobachtetes Phänomen: Schär et al. (Schär et al., 1997) zeigten, daß der Grad der GCAP-Expression je nach Grad der Differenzierung des Primärtumors schwankte – ein eventueller Nachteil für die Tumorzelldetektion im Blut bzw. im Stammzellasservat, da somit mögliche intra- und interindividuelle Schwankungen der Sensitivität unserer Methode nicht auszuschließen waren. Dennoch erlaubte die Kombination zweier Methoden, die immunzytochemische Detektion Cytokeratin-positiver Zellen und der Nachweis der GCAP mRNA mittels der RT-PCR, die Vorteile beider Methoden zu vereinen und die Wahrscheinlichkeit der Detektion von Tumorzellen zu erhöhen: Die teilweise überlegene, aber schwankende Sensitivität der RT-PCR mit der etwas geringeren, aber stabilen Sensitivität eines vielfach erprobten und validierten Verfahrens. Bei der Untersuchung von Patientenproben zeigte sich bei der RT-PCR auf die für GCAP kodierende mRNA eine höhere Sensitivität als bei der immunzytochemischen Färbung Cytokeratin-positiver Zellen (Hildebrandt et al., 1998). Dennoch waren in Proben mancher Patienten Cytokeratin-positive Zellen bei negativem Resultat der RT-PCR feststellbar: möglicherweise war hier das oben beschriebene Phänomen niedriger mRNA-Expression Ursache des negativen PCR-Befundes, so daß in diesen Fällen die immunzytochemische Färbung bezüglich der Sensitivität überlegen war. Die von uns beschriebene Rate kontaminierter Stammzellasservate (etwa 30%) war mit Ergebnissen einer anderen, im selben Jahr publizierten

Untersuchung vergleichbar, welche zum Nachweis der Tumorzellen im Blut eine RT-PCR auf die für β-HCG kodierende mRNA etabliert hatte (Fan et al., 1998). Festzuhalten ist, daß mit Hilfe immunzytochemischer und molekularbiologischer Methoden Zellen oder Transkripte in Blutproben detektiert werden können, die – bei geeigneter Zielsequenz bzw. Antigen - bei gesunden Spendern nicht, bei Patienten mit malignen Tumoren jedoch in einem erheblichen Prozentsatz nachweisbar sind und als Indiz für die Präsenz von Tumorzellen im Blut betrachtet werden können. Voraussetzung für die Nutzung der Zielsequenz bzw. des Antigens ist, daß vorliegende experimentelle Daten die Eignung zur Tumorzelldetektion stützen, zum Beispiel anhand von Befunden an Tumorzellinien, ferner daß Vergleichsproben gesunder Spender und Zellinien hämatopoetischen Ursprungs obligat negativ für die Zielsequenz oder das Antigen sind. Für die Detektion von Zellen des Mammakarzinoms etablierten wir auf diesem Weg eine RT-PCR-Methode zum Nachweis der EGF-R mRNA, für die Keimzelltumoren eine RT-PCR-Methode für die GCAP mRNA. In beiden Tumorarten wurden vergleichende Untersuchungen mit immunzytochemischer Färbung auf Cytokeratin durchgeführt. Es muß jedoch betont werden, daß positive Befunde mit den genannten Methoden in keinem Fall eindeutige Beweise für das Vorhandensein maligner Zellen, sondern höchstens für Zellen nicht hämatopoetischen Ursprungs sind. Ferner ist unklar, ob diese Zellen an der hämatogenen Aussaat des Tumors beteiligt sind und somit eine Bedrohung für den Patienten darstellen. Das Wachstum von Tumorzellen aus dem peripheren Blut *in vitro* (Brugger et al., 1994; Putz et al., 1999) kann als Beleg für die Vitalität und Expansionsfähigkeit der Tumorzellen betrachtet werden, ist jedoch den immunzytochemischen Methoden und der RT-PCR an Sensitivität unterlegen und belegt nicht den möglichen invasiven Charakter der Tumorzellen. Ein Beleg mit größerer Tragfähigkeit bezüglich der Relevanz residualer Tumorzellen wurde von der Arbeitsgruppe um K. Pantel (Scheunemann et al., 1999) erbracht: Einzelne Zytokeratin-positive Zellen in einem ansonsten histopathologisch unauffälligen Lymphknoten eines Patienten mit Ösophaguskarzinom führten nach subkutaner Injektion bei SCID-Mäusen zum Wachstum von Tumoren.

6. Nachweis von Tumorzellen in Transplantaten: klinische Relevanz

Methoden zum Nachweis von Tumorzellen sollen helfen, die prognostische Bedeutung zirkulierender Tumorzellen zu beurteilen, ferner zu prüfen, ob Methoden zur Eliminierung solcher Zellen erfolgreich eingesetzt wurden. Die zugrundeliegenden Hypothesen sind folgende:

- Tumorzellen im Blut haben diagnostische und prognostische Bedeutung,
- Tumorzellen im Blut haben Metastasierungs- bzw. Rezidivpotential, bilden also den Prozess der hämatogenen Aussaat ab,
- Die Reinfusion von Tumorzellen mit den Stammzellasservaten birgt ein Rezidivrisiko für den Patienten,
- Die Entfernung von Tumorzellen aus dem peripheren Blut bzw. aus Stammzellasservaten führt zu günstigeren krankheitsfreien Verläufen nach Hochdosistherapie.

Anders als bei minimaler residualer Tumorerkrankung im Knochenmark (Braun et al., 2000; Diel et al., 1996) oder in peripheren Lymphknoten (Izbicki et al., 1997; Scheunemann et al., 1999) ist bei Karzinomen die klinische Relevanz von Tumorzellen im Blut erst kürzlich erstmals belegt worden (Cote et al., 1999). Für Karzinomzellen in Stammzellasservaten im Rahmen der Hochdosistherapie kommt zu dem diagnostisch-prognostischen Aspekt die von Tumorzellen möglicherweise ausgehende Rezidivgefahr nach Transfusion hinzu. Bei Patienten mit follikulärem Lymphom und nachgewiesener t(14;18)-Translokation unter den Zellen des transplantierten Stammzellasservates war die Rezidivwahrscheinlichkeit höher als bei Patienten mit t(14;18)-negativen Asservaten (Gribben et al., 1991). Offen bleibt jedoch selbst bei dieser aufschlussreichen klinischen Studie, ob den Tumorzellen selbst pathologische Bedeutung zukommt oder ob sie nur Ausdruck fortgeschrittener Erkrankung sind. Die weitestreichenden, letztlich aber nicht beweisenden Untersuchungen zur klinischen Relevanz von malignen Zellen in transplantierten Asservaten (Brenner et al., 1993; Deisseroth et al., 1994; Rill et al., 1994) zeigten bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, Neuroblastom oder chronisch-myeloischer Leukämie, als Beleg für einen Beitrag von Tumorzellen im Asservat zu Rezidiven, genmarkierte Zellen des Asservats an Orten eines Rezidivs nach Hochdosistherapie, allerdings *neben nichtmarkierten Zellen*.
Einen Beleg für die prognostische Bedeutung von Tumorzellen im Asservat konnten wir bei Patienten mit Keimzelltumoren nach Hochdosistherapie erbringen, worauf im folgenden eingegangen werden soll.

7. Klinische Relevanz bei Patienten mit Hodentumoren

An sich ist die Geschichte der Therapie der Keimzelltumoren ein Beispiel für eine stadiengerechte multimodale Therapie, deren Erfolg auf der Einführung einer geeigneten zytostatischen Therapie basiert (Bosl und Motzer, 1997). Selbst die Patienten, die nicht genügend auf die konventionelle Therapie ansprechen, können in erheblichem Anteil von Hochdosis-Therapieansätzen profitieren, unter Zuhilfenahme von zuvor gesammelten Knochenmark- oder Stammzellasservaten (Bajorin et al., 1988; Beyer et al., 1994). Welche Bedeutung haben die in Stammzellasservaten nachgewiesenen Tumorzellen?
Wir untersuchten die Beziehung zwischen dem Nachweis von Tumorzellen im Asservat und dem ereignisfreien bzw. Gesamtüberleben nach Hochdosis-Chemotherapie im Vergleich zu etablierten prognostischen Faktoren (Hildebrandt et al., 2000). 57 Patienten wurden in klinische Therapieprotokolle eingeschlossen, welche eine konventionell dosierte Chemotherapie, gefolgt von Hochdosistherapie, beinhalteten (Beyer et al., 1996). Bei allen Patienten war zuvor entweder eine Progredienz des Keimzelltumors unter bzw. ein Rezidiv nach cis-platin-haltiger Chemotherapie diagnostiziert worden. Als konventionelle Therapie vor Hochdosistherapie wurden Paclitaxel und Ifosfamid (TI), gefolgt von Paclitaxel, Ifosfamid und Cisplatin (TIP, n=44), Cisplatin, Etoposid und Ifosfamid (PEI, n=12) oder Cisplatin, Ifosfamid und Vinblastin (VIP, n=1) verwendet. Sechs der ursprünglich 57 Patienten erhielten wegen massiver Progredienz des Tumors (n=4) oder wegen reduzierter Nierenfunktion (n=2) keine Hochdosistherapie.
Die Stammzellapheresen wurden nach dem ersten Zyklus der Chemotherapie unter Gabe von hämopoetischen Wachstumsfaktoren (G-CSF 5-10 µg/kg/d s.c.) durchgeführt. Eine Probe vom ersten bzw. einzigen gewonnenen Aphereseprodukt wurde auf Tumorzellkontamination untersucht. Hierbei wurden aus frischen, d.h. nicht kryokonservierten Proben Zytozentrifugenpräparate für die immunzytochemische Färbung und aus kryokonservierten Proben RNA-Präparationen für die RT-PCR hergestellt.
Insgesamt wurden 42/57 Proben mittels der immunzytochemischen Methode auf Cytokeratin-positive Zellen untersucht, 48/57 Proben mittels der RT-PCR auf GCAP-Transkripte und 33 Proben mit beiden Techniken. 16/57 Proben (28%) wiesen einen entweder immunzytochemisch, RT-PCR-gestützt oder in beiden Techniken positiven Befund auf. Für 51 Patienten, die letztlich mit der Hochdosistherapie behandelt wurden, ergab sich folgende Verteilung: 13/42 Proben (29%) positiv in der RT-PCR auf GCAP, und 4/37 Proben (11%) positiv in der immunzytochemischen Färbung.

Patienten- und Tumorcharakteristika wie Tumorlokalisation und Metastasierungsmuster zu Studienbeginn (n=57) und unmittelbar vor Hochdosistherapie (n=51) zeigten zunächst keinen Zusammenhang mit der Präsenz von Tumorzellen in den Asservaten. Auch die Zuordnung zu prognostischen Gruppen anhand klinischer Risikofaktoren (Beyer et al., 1996) erbrachte keinen Unterschied in der Verteilung Tumorzell-positiver Asservate zwischen diesen klinisch definierten Gruppen (vgl. Tabellen 1 und 2, Seite 73 dieser Schrift).

Mit Kaplan-Meier-Analysen (Kaplan und Meier, 1958) analysierten wir das Gesamtüberleben und das ereignisfreie Überleben der in die Studie eingeschlossenen Patienten (vgl. Abb. 1A-D, Seite 75 dieser Schrift). Die Überlebensrate für alle 57 Patienten betrug 1 Jahr nach Studienbeginn 64% (Gesamtüberleben) und 38% (ereignisfreies Überleben). Unter den 16 Patienten, deren Asservate mit mindestens einer der beiden Methoden positiv auf Tumorzellkontamination reagierten, lagen diese Zahlen nach einem Jahr bei 43% (Gesamtüberleben) und 0% (ereignisfreies Überleben). Diesen Zahlen standen ein Gesamtüberleben von 71% und ein ereignisfreies Überleben von 52% nach einem Jahr bei Patienten mit negativ getesteten Asservaten gegenüber. Ähnliche Zahlen fanden sich bei Analyse nur derjeniger Patienten, welche tatsächlich der Hochdosistherapie unterzogen wurden. Beide zur Tumorzelldetektion eingesetzten Methoden waren auch allein betrachtet in der Lage, Patienten mit verkürztem ereignisfreien Überleben nach Hochdosistherapie zu identifizieren. Patienten, deren Asservate in der RT-PCR positiv getestet worden waren, zeigten in keinem Fall ein ereignisfreies Überleben über 6 Monate hinaus, gegenüber 51% der Patienten mit negativ getesteten Asservaten (p=0,012). Bei alleiniger Auswertung der immunzytochemisch untersuchten Asservate zeigten sich ähnliche Überlebensraten (0% bei Tumorzelldetektion vs. 50% bei negativ getesteten Asservaten; p=0,008).

Der Nachweis von Tumorzellen im Asservat korrelierte ebenfalls mit dem Ansprechen auf die Hochdosistherapie. 32 der 51 Patienten, die der Hochdosistherapie unterzogen worden waren, erzielten mindestens eine markernegative partielle Remission (63%). Von diesen erlitten im weiteren Verlauf 14 (44%) ein Rezidiv. Fünf dieser vierzehn Patienten (36%) hatten Asservate erhalten, die positiv auf Tumorzellkontamination waren, gegenüber zwei von achtzehn Patienten ohne ein Rezidiv nach Hochdosistherapie (11%, p=0,035). Die Überlebensanalyse zeigte ein verkürztes ereignisfreies und Gesamtüberleben nach Hochdosistherapie für die Patienten, die zwar mit einer mindestens markernegativen Remission gut auf die Hochdosistherapie angesprochen hatten, aber nach unseren Untersuchungsbefunden Tumorzellen in den Asservaten aufwiesen.

Der prognostische Zugewinn, der bezüglich des Ansprechens auf eine Hochdosistherapie mit der Untersuchung auf kontaminierende Tumorzellen erzielt werden kann, wurde anhand des Vergleichs mit zuvor etablierten klinischen Faktoren (Beyer et al., 1996) untersucht. In univariaten

Analysen waren, bis auf den Faktor einer primär mediastinalen Tumorlokalisation, sowohl die klinischen Faktoren als auch die Variable „Tumorzellkontamination“ in der Lage, einen ungünstigen Verlauf in Bezug auf Gesamtüberleben und ereignisfreies Überleben vorherzusagen. In der Regressionsanalyse zeigte jedoch die Variable „Tumorzellkontamination“ den höchsten prädiktiven Wert für eine geringe ereignisfreie Überlebenswahrscheinlichkeit (Tabelle 3, Seite 76 dieser Schrift). Sogar innerhalb der gemäß klinischer Parameter prognostisch günstigen Gruppe konnten mit Hilfe der Tumorzelldetektion Patienten mit verkürztem Gesamtüberleben oder ereignisfreiem Überleben identifiziert werden.

Birgt die Detektion residualer Tumorzellen tatsächlich zusätzliche prognostische Information bezüglich des klinischen Verlaufs nach Hochdosistherapie? Drei Beobachtungen scheinen diese Annahme zu stützen. Zum einen konnten anhand der Tumorzelldetektion sogar innerhalb der 32/51 Patienten mit gutem Ansprechen auf die Hochdosistherapie diejenigen identifiziert werden, die ein verkürztes ereignisfreies und Gesamtüberleben aufwiesen. Gleiches gilt für die Untersuchung der 35 Patienten, die aufgrund etablierter klinischer Parameter eine günstige Prognose nach Hochdosistherapie erwarten ließen. Schließlich belegten die Ergebnisse der Regressionsanalyse (Tabelle 3, Seite 76 dieser Schrift) die herausgehobene Bedeutung der Tumorzellkontamination als stärksten unabhängigen Prognosefaktor bei den eingeschlossenen Patienten.
Wichtige Fragen wurden durch diese Studie eher aufgeworfen als beantwortet: Tragen die Tumorzellen in den Asservaten über ihre offensichtliche prognostische Bedeutung selbst zu Rezidiven der Tumore bei? Ist die Depletion von Tumorzellen aus einem positiv getesteten Stammzellprodukt anzustreben, um Patienten vor einer durch die Reinfusion bedingten Rezidivgefahr zu schützen? Sollte alternativ bei positiv getesteten Asservaten ein weiteres, möglichst negativ getestetes und somit nicht oder unterhalb der Nachweisgrenze kontaminiertes Stammzellkonzentrat gewonnen werden, welches vielleicht mit einem geringeren Rezidivrisiko verbunden wäre? Vor allem bringt jedoch die prognostische Bedeutung der Daten der vorgestellten Studie bei Bestätigung durch andere Zentren die Therapeuten in Zugzwang, wenn positive Stammzellasservate ein äußerst geringes Ansprechen auf die Hochdosistherapie befürchten lassen; Nutzen und Risiko der aggressiven Therapie müßten dann besonders kritisch beurteilt werden.

8. Eliminierung zirkulierender Tumorzellen

Die Gültigkeit des Modells der Rezidiventstehung durch kontaminierende Tumorzellen, welche mit einem Knochenmark- oder Stammzellasservat im Rahmen der Hochdosistherapie reinfundiert

werden, kann noch nicht als bewiesen gelten; viele der vorliegenden Daten, von denen einige im vorausgehenden Kapitel diskutiert wurden, scheinen jedoch in diese Richtung zu weisen oder zumindest nicht das Modell zu widerlegen. Die sich als Konsequenz ergebenden Bemühungen, diese Tumorzellen aus den Asservaten zu entfernen, sind in den letzten Jahren aus dem Stadium experimenteller Studien zur Routine in spezialisierten Laboratorien geworden. Die Vielfalt der zu diesem Zweck eingesetzten Möglichkeiten soll hier nicht erschöpfend dargestellt werden. Im Kern laufen die Methoden jedoch auf grundsätzlich zwei verschiedene Prinzipien hinaus: Erstens, das Bemühen, die Tumorzellen aus dem Asservat spezifisch zu eliminieren, oder zweitens, diejenigen Zellen, welche für die Rekonstitution der Hämatopoese und somit für den Erfolg der Hochdosistherapie als erforderlich betrachtet werden, in einem Aufreinigungsverfahren anzureichern und dadurch von unerwünschten Zellen zu isolieren.
Am Beispiel des Mammakarzinoms versuchten wir, die Präsenz und die Zahl kontaminierender Tumorzellen zu bestimmen, um dann diese Zellen aus Blutproben zu eliminieren. Die Problematik der Detektion residualer Tumorzellen wurde oben ausgeführt. Das auf der Detektion der für den Epidermal Growth Factor (EGF)-Rezeptor kodierenden mRNA basierende RT-PCR-Verfahren wurde zum Monitoring der Tumorzellkontamination und Depletion im experimentellen Maßstab eingesetzt.
Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden in definiertem Verhältnis mit Tumorzellen einer Mammakarzinom-Linie versetzt. Zur Entfernung der Tumorzellen wählten wir das Verfahren der immunmagnetischen Selektion: paramagnetische Kügelchen (sog. „beads“) werden – direkt oder über einen Brückenantikörper – mit einem Antikörper verknüpft, welcher ein für die zu selektierende Zelle spezifisches Antigen erkennt und an diese bindet. Dieses Verfahren ermöglicht es, nach Applikation eines Magneten den aus beads, Antikörpern und Tumorzellen bestehenden Komplex zu isolieren. Prinzipiell ist dies sowohl zur Anreicherung als auch zur Entfernung einer bestimmten Zellpopulation mittels geeigneter Antikörper möglich.
Wenn Tumorzellen aus einer Blutprobe eliminiert werden sollen, setzt dies sowohl ein Verfahren zur spezifischen und effizienten Eliminierung als auch ein sensitives Verfahren zur Dokumentation der Tumorzellentfernung voraus. Im Falle der immunmagnetischen Selektion muß ein für die zu selektierenden Zellen spezifisches Antigen durch einen Antikörper an der Oberfläche der Tumorzellen detektierbar sein. Für die Mammakarzinomzellen nutzten wir einen Antikörper, welcher an das Oberflächenantigen HEA 125 (Epithelial Membrane Antigen, EMA; (Simon et al., 1990) bindet. Für das Monitoring der Tumorzelldepletion kam dieses Antigen nicht in Frage, da eine immunzytochemische Färbung die Verwendung eines weiteren, gegen ein anderes Epitop des Antigens gerichteten und somit nicht kreuzreagierenden Antikörpers voraussetzen würde; dieser war jedoch nicht verfügbar. Eine Detektion mittels der RT-PCR kam ebenfalls nicht in Frage, da auch in mononukleären Zellen des Blutes gesunder Spender

Transkripte für EMA nachweisbar waren. Wir nutzten daher wiederum Zytokeratin als Antigen für die immunzytochemische Färbung und die EGF-Rezeptor-mRNA für die RT-PCR (Hildebrandt et al., 1997). Im Idealfall läßt sich die Tumorzellkontamination vor Depletion in der Ausgangsfraktion und nach Depletion nicht mehr in der nicht gebundenen Zellfraktion, jedoch im bead-Antikörper-Tumorzell-Komplex nachweisen (vgl. Abbildung 7C, Seite 64 der vorliegenden Schrift).
Eine immunmagnetische Selektion kann auch zu ausschließlich diagnostischen Zwecken – bei Vorliegen einer geeigneten Antikörper-Antigen-Kombination – durchgeführt werden; die Tumorzellen können in diesem Fall durch ein spezielles Konstrukt, in welchem die Antikörper über ein DNA-Verbindungsstück an die paramagnetischen Kügelchen gekoppelt werden, selektiert und anschließend mittels DNAse von den beads abgetrennt und immunzytochemisch untersucht werden. Vorteil ist hier, daß eine Quantifizierung der Tumorzellen aus unprozessiertem Vollblut erfolgen kann. Im Falle der Hodentumoren erlaubte diese Methode einen Nachweis von bis zu 10 Tumorzellen in 5 ml Vollblut.

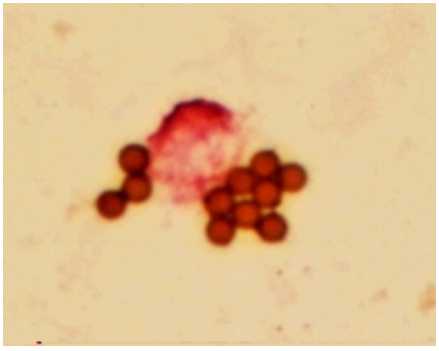

Abbildung 1: Selektierte Cytokeratin-positive Tumorzelle mit umgebenden paramagnetischen Kügelchen. Die Tumorzelle wurde immunmagnetisch aus einer Vollblutprobe über anti-PLAP-Antikörper isoliert und mit einem anti-Cytokeratin-Fab-Fragment (Micromet, Baxter Deutschland, Unterschleißheim) gegengefärbt.

Für die klinisch-therapeutische Anwendung hat die immunmagnetische Selektion CD34-positiver Zellen die größte Verbreitung gefunden, da sich bei dieser Methode klinische Vorteile mit einer breiten Anwendungsbasis verknüpfen. Nicht die zu eliminierenden, sondern die für die Wiederherstellung der Hämatopoese und somit für das Gelingen der Transplantation als relevant erachteten Zellen werden angereichert und so von nicht gewünschten oder nicht benötigten Zellen getrennt, in einem vergleichsweise kleinen Volumen kryokonserviert und später transfundiert. Auf diesem Weg reduziert sich auch die für die Kryokonservierung erforderliche Menge des Stabilisators Dimethylsulfoxid (DMSO), dessen Infusion mit zum Teil erheblichen Nebenwirkungen für den Patienten verbunden ist. In den USA war dies die primäre Indikation für die Zulassung eines derartigen Selektionsverfahrens im klinischen Maßstab (Ceprate™ System, Cellpro, Bothell, USA).
Die Selektion CD34-positiver Zellen im klinischen Maßstab bot uns die Möglichkeit, die

etablierten Verfahren zur Detektion von Karzinomzellen einzusetzen, um den gewünschten Effekt einer Reduktion der Zahl kontaminierender Tumorzellen zu belegen (Mapara et al., 1997). Hier erwies sich die RT-PCR-gestützte Methode des Nachweises der EGF-Rezeptor-mRNA als weniger sensitiv als die vergleichend eingesetzte immunzytochemische Färbung, wenn sie auch anderen mittels der RT-PCR detektierten Indikatorsequenzen überlegen war. Beide Verfahren wiesen zudem in einem erheblichen Anteil der selektierten Zellfraktionen weiterhin Tumorzellen nach, trotz einer Reduktion der Tumorzellzahl um 1,9 log im Median (Spannweite: 0,7 bis über 3 log). Eine weitere Reduktion kontaminierender Tumorzellen ist zwar durch anschließende oder sogar parallele Antikörper-vermittelte immunmagnetische Depletion unerwünschter Zellen prinzipiell möglich (Mapara et al., 1999). Allerdings ist der klinische Nutzen einer weiteren Depletion, angesichts des finanziellen und logistischen Aufwands, bei möglichem weiteren Verlust erwünschter CD34-positiver Zellen, derzeit fraglich, zumal hier bezüglich der kontaminierenden Zellen in einem Grenzbereich diagnostischer Sensitivität operiert wird. Wenn hingegen im allogenen Bereich eine Reduktion immunkompetenter T-Lymphozyten auf ein definiertes Maß angezielt wird, ist nach unserer Erfahrung im Allgemeinen mit alleiniger Selektion der CD34-positiven Zellen eine genügende Reduktion CD3-positiver Lymphozyten mit dem hierzu verwendeten System (Isolex 300i, Version 1.1.3; Baxter Biotech, Unterschleißheim) erzielbar. Angesichts der für die allogene Transplantation benötigten höheren Zahl CD34-positiver Zellen erschien es hier eher bedeutsam, den mit der Selektion obligat verbundenen Verlust CD34-positiver Zellen zu minimieren. Mit einer Zusammenstellung und statistischen Auswertung unserer Ergebnisse zur CD34-Selektion konnten wir Wege zur Optimierung der Ausbeute CD34-positiver Zellen aufzeigen (Hildebrandt et al., 2000). Derartige Untersuchungen machen jedoch deutlich, wie sich mit Eintritt der immunmagnetischen Selektion im klinischen Maßstab und mit Fragen methodischer Optimierung der Wechsel eines ursprünglich im Sinne einer operationalen Größe eingeführten Modells der CD34-positiven Zelle zu einem im Routineverfahren hergestellten Medizinprodukt endgültig vollzieht. Erst langfristige Verlaufsbeobachtungen werden zeigen,

- ob eine Reduktion der Zahl der Tumorzellen im Stammzellasservat mit einer geringeren Rezidivgefahr verbunden ist,
- ob die Selektion CD34-positiver Zellen zu Produkten führt, mit denen nach echter Myeloablation eine normale und dauerhafte Hämatopoese wiederhergestellt werden kann, und
- in welchen Anwendungsfeldern der erhebliche logistische und finanzielle Aufwand solcher Selektionsmethoden tatsächlich durch höhere therapeutische Erfolge für den Patienten gerechtfertigt wird.

III. Dipeptidylpeptidase IV

Im folgenden Abschnitt soll die Bedeutung des Enzyms Dipeptidyl-Peptidase IV (DPP IV, CD26, EC 3.4.14.5) als Schnittstelle komplexer Regelkreise in Hunger-Sättigungs-Regulation, Immunmodulation und Peptidmetabolismus dargestellt werden. Das von uns vorgeschlagene Modell der Funktion dieses Enzyms (Hildebrandt et al., 2000) geht über die derzeit vorliegenden klinischen Erkenntnisse zur DPP IV hinaus und verweist auf eine Bedeutung, die es auch bei der Entwicklung therapeutischer Strategien zu berücksichtigen gilt.

1. Einführung

Dipeptidylpeptidase IV ist ein membranständiges Glykoprotein mit einer Vielzahl unterschiedlicher Funktionen wie Zelladhäsion, Zellbewegung durch die Extrazellulärmatrix und Kostimulation im Rahmen der T-Zell-Aktivierung. Mit der Fähigkeit, N-terminal Dipeptide zu spalten, wenn Prolin an vorletzter Stelle steht, erlangt das Enzym eine besondere Bedeutung für den Metabolismus von Peptidhormonen, da eine derartige Aminosäurensequenz Peptide vor ubiquitärer Degradation durch unspezifische Proteasen schützt (Yaron und Naider, 1993). Das Enzym kann auf der Membranoberfläche verschiedener Organe und Gewebe nachgewiesen werden, zu denen Kapillarendothelien (Mrazkova et al., 1986), Hepatozyten (Elovson, 1980; Kreisel et al., 1984), Enterozyten (Darmoul et al., 1994; Kozakova et al., 1998) und die Glomeruli und proximalen Tubuli der Niere zählen (Barth und Schulz, 1974; Imai et al., 1992). Die Oberflächenexpression von DPP IV kennzeichnet Zellen von höherem Reifungs- und Differenzierungsgrad (Darmoul et al., 1992; Ruiz et al., 1997). Die funktionelle Bedeutung der enzymatischen Aktivität der DPP IV definiert sich aus dem Ort der Expression und den lokal verfügbaren Substraten (Kennett et al., 1996). Dabei scheinen der Funktionszustand des Organs und äußere Einflüsse die Expression der DPP IV zu modulieren, so zum Beispiel prolinreiche Kost (Suzuki et al., 1993), Interferon-γ sowie Antigen- (Dang et al., 1991; Schmitz et al., 1996) oder Mitogenstimulation (Plana et al., 1991). Seit der ersten Beschreibung des Enzyms (Hopsu-Havu und Glenner, 1966) konzentrierten sich die meisten Untersuchungen zur DPP IV auf formale Aspekte des Metabolismus von Membranproteinen. Hier diente DPP IV als Beispiel für spezifische Mechanismen der Membranexpression und Re-expression von Glykoproteinen (Kreisel et al., 1993; Kreisel et al., 1984), Glykosylierungsprozesse (Hartel Schenk et al., 1991; Yamashita et al., 1988) sowie für eine funktionelle Membranpolarisation (Decaens et al., 1996). Am Beispiel der DPP IV konnten wir auf organspezifische Mechanismen der Proteinexpression, d.h. transkriptionale oder posttranskriptionale Steuerung, hinweisen (Hildebrandt et al., 1991).

Auch die veränderte Glykosylierung im Kontext maligner Transformation war an der DPP IV demonstriert worden (Hartel Schenk et al., 1991; Hildebrandt, 1994). Belege für eine Beteiligung der DPP IV an Prozessen der Zelladhäsion (Hanski et al., 1985) und der Immunmodulation (Bednarczyk et al., 1991) erlaubten erstmals einen Einblick in die zahlreichen biologischen Prozesse, an welchen das Enzym offenbar beteiligt ist.

2. Substrate der DPP IV

Viele biologisch aktive Peptide tragen an definierten Stellen der Aminosäurensequenz Prolin, was in zweierlei Hinsicht bedeutsam ist: Zum einen beeinflußt Prolin in erheblichem Umfang die Sekundärstruktur des Proteins und somit auch dessen biologische Aktivität, wie zum Beispiel Membranpassage oder Rezeptorbindung. Zum anderen stellen die Prolinmoleküle selektive Angriffspunkte für prolinspezifische Peptidasen wie DPP IV dar (Yaron und Naider, 1993). Dementsprechend verlängert die Modifizierung der Substratstruktur (Campbell et al., 1994) oder der Einsatz von Inhibitoren der enzymatischen Aktivität (Kieffer et al., 1995) gleichermaßen die biologische Halbwertzeit von Substraten der DPP IV, mit potentiellen klinischen oder pharmazeutischen Anwendungsmöglichkeiten (Mentlein, 1999). Die Zahl möglicher Substrate der DPP IV ist um so größer, wenn eine gleichzeitige Metabolisierung von Peptiden durch DPP IV und andere spezifische Peptidasen wie zum Beispiel Aminopeptidase N (AP-N, CD13) in Betracht gezogen wird, was zu einer Hydrolyse von Peptidhormonen führen würde, welche Prolin an dritt- oder viertletzter Stelle tragen. Exemplarisch wurde dies für Bradykinin gezeigt (Mentlein und Roos, 1996; Pesquero et al., 1992). Eine Übersicht über relevante Substrate der DPP IV (Tabellen 1 bis 5, Seiten 104, 106, 107 und 108 dieser Schrift) soll die mögliche komplexe Bedeutung des Enzyms veranschaulichen.

3. Einbindung in Immunfunktionen

Die immunologische Bedeutung der DPP IV war bereits Gegenstand ausführlicher Übersichtsarbeiten (Augustyns et al., 1999; De Meester et al., 1999; Morimoto und Schlossman, 1998); nur einige Aspekte sollen im folgenden Abschnitt dargestellt werden. Das T-Zell-Antigen CD26 ist mit der DPP IV weitgehend identisch und besitzt auch ihre enzymatische Aktivität. Hohe Expression des Antigens definiert eine Untergruppe von T-Lymphozyten mit Gedächtnisfunktion (Dong und Morimoto, 1996; Morimoto und Schlossman, 1998). In einem Modell humaner Nabelschnur-Endothelzellen konnte gezeigt werden, daß T-Lymphozyten mit hoher CD26-Expression Endothelschichten ohne einen Chemokingradienten durchwandern können (Masuyama et al., 1992; Masuyama et al., 1999). Angesichts der beschriebenen

Gedächtnisfunktion der stark CD26 exprimierenden Zellen könnten sich diese Zellen als Initiatoren einer entzündlichen Reaktion eignen, wo immer diese erforderlich sein sollte.

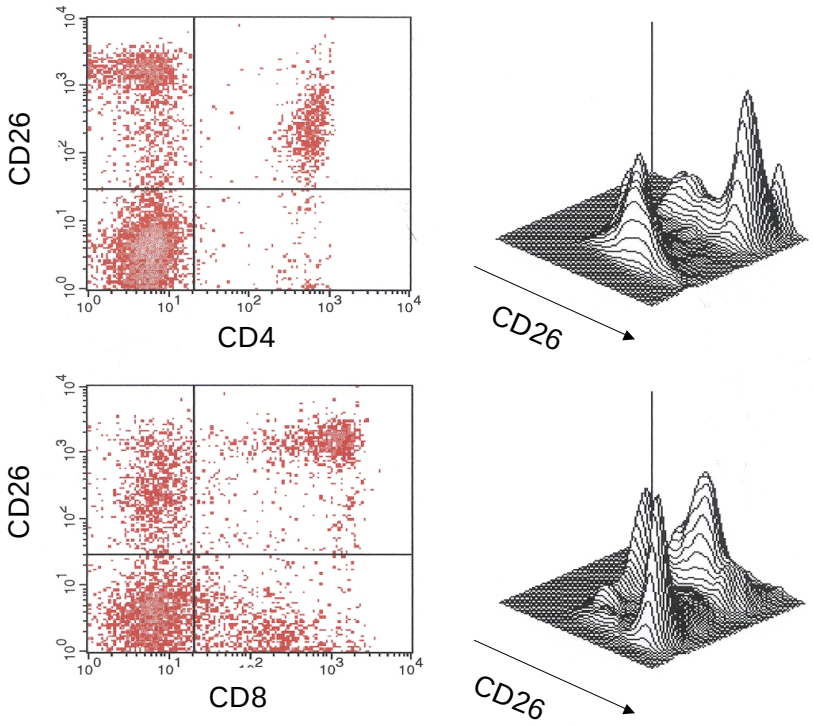

Abbildung 2: Durchflußzytometrische Charakterisierung humaner Lymphozyten des peripheren Blutes. Dargestellt sind Färbungen der Antigenpaare CD26/CD4 und CD26/CD8. Unterschiedliche Zellpopulationen können anhand der CD26-Antigendichte voneinander abgegrenzt werden.

Wie auch bei anderen Ektopeptidasen mit Einbindung in immunologische Prozesse bekannt, zum Beispiel CD10 (CALLA) und CD13 (Aminopeptidase N), wird die Expression von CD26/DPP IV streng im Verlauf der Lymphozytendifferenzierung kontrolliert (Marguet et al., 1992). Im Prozeß der Thymusausreifung wird die CD26-assoziierte Enzymaktivität erst in höheren Stadien der T-Zell-Reifung nachweisbar und könnte hier an der Eliminierung bestimmter T-Zell-Klone beteiligt sein (Ruiz et al., 1997). Die Expression von CD26 an der Zelloberfläche ist für die T-Zell-Aktivierung und –Kostimulation von Bedeutung. Da CD26 jedoch nur über einen Abschnitt von 6 Aminosäuren in der Zelloberfläche verankert ist, muß eine intrazelluläre Signaltransduktion durch andere Komponenten der Zellmembran vermittelt werden. Tatsächlich läßt sich CD26 mit der Tyrosinkinase CD45 gemeinsam präzipitieren (Morimoto und Schlossman, 1998). Arbeiten anderer Autoren legen die Vermutung nahe, daß eine CD26-vermittelte Signaltransduktion über die CD3ζ Kette erfolgen könnte (von Bonin et al., 1997). Eine komplexe Wechselwirkung zwischen CD26, CD45 und der CD3ζ Kette ist möglich (Kähne et al., 1999; von Bonin et al., 1998). CD26-positive T-Lymphozyten sind in der Lage, Interferon–γ zu produzieren (Willheim et al., 1997). Die enzymatische Aktivität der DPP IV verstärkt zelluläre Immunantworten, die durch

externe Stimuli über CD26 und/ oder CD3 vermittelt werden (Tanaka et al., 1993), ist jedoch nicht unabdingbar für die T-Zell-Stimulation via CD26 (Steeg et al., 1995). CD26 dient ferner der Verankerung der Ekto-Adenosindeaminase (ADA) in der Lymphozytenmembran (Blanco et al., 1996), welche, über ihre T-Zell-protektive Bedeutung bei der Entgiftung extrazellulären Adenosins oder 2`-Deoxyadenosins hinaus, mit verschiedenen weiteren membranständigen Proteinen interagiert (Franco et al., 1998). Damit stellt die Fähigkeit von CD26/ DPP IV, ADA zu binden, eine weitere Facette in der vielfältigen Bedeutung dieses Enzyms dar. Berichtet wird, daß Monozyten eine membranständige Peptidase mit einer Spezifität und Sensitivität gegenüber Inhibitoren tragen, welche mit der der DPP IV identisch ist (Bauvois et al., 1992). Dieser Aussage steht die Beobachtung gegenüber, daß zwei etablierte Antikörper gegen Epitope der DPP IV weder auf Monozyten noch auf monozytoiden U937-Zellen, welchen die genannte enzymatische Aktivität ebenfalls zu eigen ist, ein membranständiges DPP IV-Antigen detektierten. Ein "DPP IV-like enzyme" (Bauvois et al., 1992) könnte jedoch mit der Extrazellulärmatrix in Wechselwirkung treten und somit für die Gewebeinfiltration durch monozytäre Zellen von Bedeutung sein. Ferner ist das genannte "DPP IV-like enzyme", gemeinsam mit Tripeptidyl-Endopeptidase, verantwortlich für den Abbau von TNF–α, womit eine Limitierung der Bioverfügbarkeit von TNF-α unmittelbar am wichtigsten Syntheseort, nämlich den Monozyten selbst, möglich wäre (Beutler et al., 1985; Durum et al., 1985).

4. Nutritive Aspekte

DPP IV metabolisiert Peptide und Proteine zu Oligopeptiden und Aminosäuren, die nunmehr transportiert und gegebenenfalls wiederverwendet werden können. Der Peptidabbau durch DPP IV stellt einen die Umsatzrate limitierenden Schritt für den intestinalen und renalen Transport prolinhaltiger Peptide dar. Die Fähigkeit der DPP IV, am proximalen Tubulus die Reabsorption prolinhaltiger Di- und Tripeptide zu vermitteln (Tiruppathi et al., 1993), mag letztlich dem renalen Verlust dieser essentiellen Aminosäure vorbeugen.
Viele Peptidhormone der enteroinsulären Achse (GLP-1, GLP-2, GIP; vgl. Tabelle 1, Seite 104 dieser Schrift) vermitteln als Inkretine Signale vom Intestinum zum Pankreas und beeinflussen unter anderem die Insulinproduktion und –inkretion. Bemerkenswert ist, daß ein Großteil von ihnen in seiner Bioverfügbarkeit entscheidend durch DPP IV gesteuert wird (Kieffer et al., 1995; Pederson et al., 1998) und Veränderungen in der Aminosäurensequenz oder Inhibierung der DPP IV-Aktivität (Holst und Deacon, 1998) tiefgreifende Veränderungen in ihrem Metabolismus und somit in ihrer Bioverfügbarkeit nach sich ziehen. Auf dieser Beobachtung basiert auch das therapeutische Konzept der Inhibition der DPP IV zur Behandlung der Hyperglykämie bei Typ II-Diabetes (Holst und Deacon, 1998): die Blockierung der DPP IV-Aktivität führt zu höheren

Serumkonzentrationen der Inkretine, zu erhöhter Insulininkretion, höherer peripherer Insulinsensitivität und somit zu rascherer Normalisierung des Blutzuckers. Darüber hinaus stellen Enzyme des Verdauungssystems, wie Trypsinogen (Erlanson Albertsson und Larsson, 1988; Heymann et al., 1986) und Procolipase, Substrate der DPP IV dar. Dies gilt auch für das bei der Aktivierung der Procolipase freigesetzte Enterostatin (Bouras et al., 1996), ein bioaktives Peptid, welchem eine regulatorische Bedeutung für die Aufnahme von Lipiden zugeschrieben wird (Erlanson Albertsson und Larsson, 1988; Lin et al., 1998).

Neuropeptid Y (NPY) gehört zu den stärksten orexigen wirksamen Peptidhormonen (Bray, 1993; Chance und Fischer, 1993; Karydis und Tolis, 1998) und wird durch DPP IV in seiner Rezeptorspezifität verändert (Grandt et al., 1993), was in nutritiver Hinsicht von besonderer Bedeutung ist (Nichol et al., 1999; Xu et al., 1998): Der Verlust der Bindungsfähigkeit an Y1-Rezeptoren hätte nicht nur Einfluß auf die Regulation des Hunger- und Sättigungsgefühls, sondern auch auf die über diese Rezeptoren vermittelte erhöhte gastrische Motilität (Chen et al., 1997). Auch GLP-2, welches stimulierend auf die Darmmotilität wirkt, und die stark sekretogenen Peptidhormone VIP und PACAP werden durch DPP IV inaktiviert (Mentlein et al., 1993).

5. Psychomodulatorische Aspekte

Viele der Peptidhormone und Proteine, die als Substrate der DPP IV bekannt sind, fanden sich in den vergangenen Jahren im Zentrum psychoneuroendokriner Forschung (Myers, 1994). Angesichts der hohen Wirksamkeit mancher Substrate, wie Neuropeptid Y (NPY) oder Substanz P, muß gefolgert werden, daß der Einfluß der DPP IV auf deren biologische Wirksamkeit und die Auswirkungen veränderter DPP IV-Aktivität bei manchen Erkrankungen, insbesondere des psychosozialen Formenkreises, in den letzten Jahren unterschätzt wurde (vgl. hierzu: Tabelle 4, Seite **Fehler! Textmarke nicht definiert.**).

6. Lösliche DPP IV: Ursprung und Funktion

DPP IV-Aktivität kann im Serum (Iwaki Egawa et al., 1998), im Urin, in der Seminalflüssigkeit (Wilson et al., 1998) und der Amnionflüssigkeit (Hildebrandt, unveröffentlichte Beobachtung) nachgewiesen werden. Der Ursprung der löslichen DPP IV im Serum muß bis heute als ungeklärt angesehen werden. Jedoch ist jedes Peptidhormon, welches Prolin an der vorletzten Aminosäurenposition trägt, potentielles Substrat der DPP IV und kann binnen Minuten im Serum metabolisiert werden. Es fällt auf, daß entzündliche und neoplastische Veränderungen in DPP IV-reichen Geweben oftmals mit erhöhter DPP IV-Aktivität einhergehen, was auf eine mögliche

Freisetzung der DPP IV im Zuge der Gewebezerstörung hinweist. Verschiedene Autoren schlugen eine Freisetzung von DPP IV von der Zellmembran durch einen aktiven Prozeß vor, ohne daß dieser bis heute belegt werden konnte (Abbott et al., 1995; Juillerat Jeanneret et al., 1997). Vergleichende Untersuchungen an DPP IV, die aus humanem Serum aufgereinigt worden war, zeigten eine weitreichende immunologische und enzymchemische Übereinstimmung mit der DPP IV der Niere, auch hinsichtlich der Fähigkeit, Adenosin-Deaminase zu binden (Iwaki Egawa et al., 1998). Untersuchungen an T-Lymphozyten des peripheren Blutes von Patienten mit Karzinomen der Mundhöhle legten die Vermutung nahe, daß DPP IV von der Oberfläche aktivierter T-Lymphozyten freigesetzt wird (Uematsu et al., 1996). In ähnlicher Weise geht bei Ratten mit Hepatomen die Abnahme der an der Hepatom-Zelloberfläche nachweisbaren DPP IV mit einer Zunahme der Serumaktivität einher (Hanski et al., 1988), wobei jedoch offenbleibt, ob ein Transfer von der Zellmembran in das Serum stattfindet oder grundsätzlich unabhängige Mechanismen dieses Phänomen bedingen. Hingegen korrelierte bei Untersuchungen an lymphoblastischen HL60-Zellen eine Abnahme der DPP IV-Expression an der Zelloberfläche nicht mit Veränderungen der Aktivität im Zellkulturüberstand, was gegen eine Abschilferung der DPP IV von der Zelloberfläche in das Serum spricht (Laouar et al., 1993).

7. Klinische Aspekte der DPP IV

Immunprozesse, Autoimmunerkrankungen und AIDS

Bei *Transplantatabstoßungen* konnte ein rapider Anstieg sowohl der DPP IV-Aktivität im Serum als auch der Zahl CD26-positiver Lymphozyten beobachtet werden, die sich jeweils unter Immunsuppression normalisierten. Inhibition der DPP IV-Aktivität führte im tierexperimentellen Rahmen zu einer Verzögerung der Transplantatabstoßung (Korom et al., 1997). Bei Patienten mit *Systemischem Lupus Erythematodes* wurde eine erniedrigte Aktivität der DPP IV im Serum beobachtet, während die Aktivität an der Lymphozytenoberfläche nur bei Patienten mit erhöhter SLE-Krankheitsaktivität erniedrigt war (Stancikova et al., 1992). Diese Beobachtungen deckten sich weitgehend mit entsprechenden tierexperimentellen Beobachtungen zum SLE (Hagihara et al., 1989). Bei *Rheumatoider Arthritis* wurde in der Synovialflüssigkeit eine selektive Aktivitätsminderung der DPP IV beobachtet (Kamori et al., 1991). Die Blockierung der DPP IV-Aktivität verminderte die Krankheitsaktivität in Alkylamin- und Adjuvans-induzierter Arthritis (Tanaka et al., 1997; Tanaka et al., 1998). Plasminogen und Streptokinase binden beide an DPP IV, welche auf der Zellmembran von entzündlich veränderten Synoviozyten exprimiert wird (Gonzalez Gronow und Weber, 1998). Interessanterweise kompetiert hier Fibronektin, ein Ligand für DPP IV (Hanski et al., 1985; Piazza et al., 1989), mit Streptokinase, da beide Proteine über das Aminosäurenmotiv LTSRPA an DPP IV binden (Gonzalez Gronow und Weber, 1998). In der Tat konnte gezeigt werden, daß die Bindung von Streptokinase an DPP IV zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und gleichzeitiger Plasminogenaktivierung führte. Somit scheint DPP IV auf verschiedene Weise, sowohl über seine enzymatische Aktivität als auch über weitere Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, an der Pathogenese von Arthritiden beteiligt zu sein.

Im Verlauf der *HIV-Infektion* ist die Membranexpression des HIV envelope protein gp120/gp41-Komplexes nicht nur verantwortlich für die Vermittlung der interzellulären Membranfusion, die letztlich zur Bildung von Synzytien führt, sondern initiiert auch die Apoptose in CD4-positiven Zellen. Jacotot et al. (Jacotot et al., 1996) zeigten, daß eine zunehmende Expression von CD26 auf CD4-positiven Zellen zu einer erhöhten Apoptoserate über den gp120/gp41-Komplex führt. Offenbar wird die Signaltransduktion über CD26, die normalerweise zur T-Zell-Aktivierung führt (Fleischer, 1994), nach HIV-Infektion verändert. Allerdings zeigen Transfektionsstudien mit Wildtyp- und mutiertem CD26 ohne enzymatische Aktivität (Morimoto et al., 1994), daß die Anwesenheit der enzymatischen Aktivität die Effizienz der HIV-Infektion vermindert, während das Fehlen der enzymatischen Aktivität mit erhöhter Empfindlichkeit gegenüber Apoptose, offenbar über CD95 (Apo-1/Fas), korreliert. Die Gesamtzahl CD26-positiver T-Zellen mit

Gedächtnisfunktion scheint bei HIV-positiven Personen erniedrigt zu sein (Vanham et al., 1993), was tatsächlich das Ergebnis einer erhöhten Apoptoserate über den gp120/gp41-Komplex sein könnte. Interessanterweise wird die DPP IV-Aktitivität im Serum HIV-positiver Personen als normal beschrieben, was normale Umsatzraten der Substrate der DPP IV, wie RANTES und SDF-1α und dementsprechend einen protektiven Effekt gegenüber dem Eintritt des HI-Virus bedingen würde, beim derzeitigen Wissensstand jedoch rein spekulativ ist.

DPP IV bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Tierexperimentelle Untersuchungen und Befunde bei Patienten legen die Annahme nahe, daß immunologische Imbalancen in erheblichem Umfang zur Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen beitragen. Zwei Modelle immunologischer Veränderungen wurden vorgeschlagen, welche an der Entstehung der für das jeweilige Krankheitsbild charakteristischen immunologischen Veränderungen und histopathologischen Läsionen beteiligt sind: eine Interleukin (IL) 12-vermittelte Th1-Immunantwort mit typischem Zytokinprofil (γ-Interferon (γ-IFN) und Tumor necrosis factor-alpha, TNF-α) einerseits, ein Interleukin (IL-)4-vermitteltes Th2-Zytokinprofil andererseits. So stützen tierexperimentelle Untersuchungen ein Modell, gemäß dem das Bild einer transmuralen Entzündung im Sinne eines M. Crohn eher mit einer Th1-Immunantwort assoziiert ist, während sich bei einem eher oberflächlichen Entzündungsmuster der Darmschleimhaut wie bei Colitis ulcerosa eine deutliche Nähe zu einer Th2-Immunantwort mit vorrangiger Produktion von IL-4 findet (Strober et al., 1998). Sowohl das Expressionsmuster der DPP IV im Verdauungstrakt (Bai, 1993; Darmoul et al., 1994; Hansen et al., 1994) als auch die Beteiligung der DPP IV an der Fokussierung einer Immunantwort in Richtung eines Th1-Zytokinprofils (Willheim et al., 1997) lassen eine Beteiligung des Enzyms zumindest an der mit einem Th1-Zytokinprofil assoziierten Ileitis terminalis (M. Crohn) vermuten. Wir untersuchten daher, ob Veränderungen der Expression und Aktivität von CD26/DPP IV bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen beobachtet werden können, die in Beziehung zur Krankheitsaktivität und auch zur jeweiligen Entität und dem mit ihr assoziierten Zytokinprofil stehen (Hildebrandt et al., 2001). Wir untersuchten bei 110 ambulanten Patienten mit *chronisch-entzündlicher Darmerkrankung* (M. Crohn: n=63, Colitis ulcerosa: n=47) die DPP IV-Aktivität im Serum, ferner die Zahl CD26- (DPP IV)-positiver Lymphozyten des peripheren Blutes sowie die CD26-Antigendichte. Zusätzlich wurde die Expression verschiedener T-Zell-Aktivierungsantigene (CD25, CD95) und kostimulatorischer Moleküle (CD28) bestimmt. Ein Teil der eingeschlossenen Patienten (n=39) konnte nach drei bis sechs Monaten ein weiteres Mal untersucht werden. Es fand sich für beide Entitäten eine erniedrigte Serumaktivität der DPP IV bei gleichzeitig

erhöhter CD26-Antigendichte auf Lymphozyten des peripheren Blutes. Der prozentuale Anteil dieser Zellen an der Gesamtzahl zirkulierender T-Lymphozyten war nicht erhöht; allerdings wiesen CD26-positive Lymphozyten in erhöhtem Ausmaß eine Koexpression von Aktivierungsmolekülen an der Zelloberfläche auf. Die Untersuchungen zeigten ferner eine inverse Korrelation der DPP IV-Aktivität im Serum mit etablierten Indices der Krankheitsaktivität (M. Crohn: CDAI; r=-0.38, p<0,01; Colitis ulcerosa: CAI nach Rachmilewitz; r=-0,41, p<0,01). Weiterhin korrelierte die DPP IV-Aktivität invers mit den Konzentrationen zweier Akutphasenproteine, dem C-reaktiven Protein (CRP; r=-0,25; p<0,01) und dem Orosomucoid (r=-0,28; p<0,01).

Diese Beobachtungen wiesen Ähnlichkeiten mit den Ergebnissen vergleichbarer Untersuchungen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis sowie Parallelen zu entsprechenden tierexperimentellen Befunden (Gotoh et al., 1989; Mizokami et al., 1996; Muscat et al., 1994), ebenso zu Patienten mit Systemischem Lupus erythematodes auf (Plana et al., 1991; Stancikova et al., 1992). Die erniedrigte DPP IV-Aktivität im Serum korrelierte nicht nur invers mit dem Schweregrad der Erkrankung, sondern kontrastierte mit erhöhter DPP IV-Expression und –Aktivität in Bereichen aktiver Entzündung (Walsh et al., 1993) und ebenfalls mit erhöhter Zahl CD26-positiver Lymphozyten (Mizokami et al., 1996), möglicherweise im Sinne einer funktionellen Kompartimentierung (Walsh et al., 1993).

Meine Interpretation dieses Gegensatzes zwischen lokal erhöhter, systemisch jedoch erniedrigter DPP IV-Aktivität ist die eines gegenregulatorischen Mechanismus, über den eine Eindämmung systemischer Immunantworten im Rahmen der zugrundeliegenden Erkrankung möglich wäre, da eine Aktivierung relevanter Peptidhormone (vgl. Tabelle 2, Seite 104 dieser Schrift) hin zu einer proinflammatorischen Th1-Immunantwort in geringerem Umfang erfolgen würde. Daneben könnte die Bestimmung der DPP IV-Aktivität bei Patienten mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung, zusätzlich zu etablierten, jedoch nicht immer klinischen befriedigenden Laborparametern (Nielsen et al., 2000), diagnostische Bedeutung im Sinne einer verfeinerten Bestimmung der Krankheitsaktivität gewinnen. Eine Unterscheidung beider Entitäten, M. Crohn und Colitis ulcerosa, war jedoch anhand der DPP IV-Aktivität oder der Zahl CD26-positiver Lymphozyten nicht möglich. Somit wäre zu folgern, daß die Bestimmung der DPP IV-Aktivität und –Expression eine Differenzierung zwischen Th1- und Th2- Immunantwort nicht erlaubt, oder daß das Modell der Entstehung der beiden Krankheitsbilder auf dem Boden dieser unterschiedlichen Immunantworten durch unsere Befunde nicht gestützt wird.

Veränderungen der DPP IV-Aktivität im Serum bei Erkrankungen aus dem psychosozialen Formenkreis

Bei Patienten mit Erkrankungen des psychosozialen Formenkreises fanden sich Veränderungen

der DPP IV-Aktivität im Serum, deren Ausmaß den bei Autoimmunerkrankungen oder immunologischen Prozessen Veränderungen vergleichbar sind. Ihre Interpretation ist jedoch schwierig und stellt eine willkommene Quelle möglicher Trugschlüsse dar. Maes und Mitarbeiter führten ausgedehnte Untersuchungen bei Patienten mit *Major Depression* gem. DSM-IV und mit *Schizophrenie* durch (Maes et al., 1991; Maes et al., 1996). Sie fanden gegenüber gesunden Probanden erniedrigte Aktivitäten der DPP IV im Serum, wobei ein Einfluß von antidepressiv oder antipsychotisch wirksamen Substanzen ausgeschlossen werden konnte (Maes et al., 1996). Die Vermutung, daß die beobachteten Veränderungen Ausdruck eines Zustandes der Immunsuppression seien (Maes et al., 1992), konnte nicht durch Veränderungen der Lymphozytenpopulationen oder der Lymphozytenfunktion untermauert werden. Patienten mit *hyporektischen Eßstörungen* wiesen in unseren Untersuchungen mehrheitlich eine erhöhte DPP IV-Aktivität im Serum auf. Gleichzeitig waren die Zahlen CD26-positiver Lymphozyten im peripheren Blut erniedrigt (Hildebrandt et al., 1999). Diese Befunde sind immunologisch in mehrfacher Hinsicht interessant: Die niedrige Zahl CD26-positiver Lymphozyten ist, ähnlich wie die niedrige Konzentration von IgG-Molekülen im Serum, möglicher Ausdruck einer Immunsuppression im Zuge der Mangelernährung. Zudem fand sich eine selektive Verminderung bestimmter Fraktionen der CD26-positiven Zellen, die sich von den bei anderen Erkrankungen beobachteten Veränderungen unterschied und mit dem Erhalt der T-Zellen mit hoher CD26-Antigendichte einherging, denen Gedächtnisfunktionen im Immunsystem zugeschrieben werden (Hildebrandt et al., 2001). Hingegen war eine erhöhte DPP IV-Aktivität im Serum bisher nur im Kontext akuter Abstoßungsreaktionen bekannt. Aus immunologischer Sicht könnte sie einen Versuch darstellen, eine im Rahmen der Mangelernährung zu erwartende Immunschwäche zu kompensieren: So war postuliert worden (Tanaka et al., 1994), daß die exogene Zufuhr rekombinanter löslicher DPP IV bei bestehender Immunschwäche einen kompensatorischen und immunmprotektiven Effekt haben müßte. In Anlehnung an diese Hypothese könnte die endogene Erhöhung der DPP IV-Aktivität dem gleichen Zweck dienen; allerdings berührt dies nur eine der verschiedenen möglichen Konsequenzen erhöhter DPP IV-Aktivität.

8. Mögliche Konsequenzen erhöhter DPP IV-Aktivität

Da Veränderungen der Aktivität der DPP IV Veränderungen des Substratumsatzes bedeuten (Xiao et al., 2000), gilt es, sich die vielfältigen Auswirkungen veränderter DPP IV-Aktivität auf die Substrate des Enzyms in verschiedenen Regelkreisen vorzustellen. Dies läßt auch die möglichen Konsequenzen der Blockierung der DPP IV-Aktivität zu therapeutischen Zielsetzungen umso deutlicher werden.
Wie ist, angesichts der vielfältigen Implikationen der DPP IV, die physiologische Bedeutung des Enzyms zu verstehen? Bei Betrachtung der Substrate der DPP IV ergibt sich auf den ersten Blick ein verwirrendes, da teilweise widersprüchliches Bild. Beispiele für funktionell entgegengesetzte Implikationen finden sich im Lipidmetabolismus, der Natriurese sowie der Modulation des Aktivierungszustands immunkompetenter Zellen.
Bei genauerer Betrachtung läßt sich jedoch ein Modell erarbeiten, in dem die DPP IV in der Summe ihrer Funktionen einen für den Organismus insgesamt *abschirmenden und protektiven Effekt* ausübt. Wir können annehmen, daß die enzymatische Aktivität der DPP IV zu einer *verstärkten Schmerzwahrnehmung* beiträgt, indem potente analgetisch wirksame µ-Opiat-Rezeptor-Antagonisten inaktiviert und gleichzeitig Substanz P als stärkster bekannter Schmerzmediator zu einer stärker wirksamen Form metabolisiert wird. In diesen Prozeß, welcher zu einer erniedrigten Reizschwelle führen könnte, ist DPP IV möglicherweise über weitere Substrate eingebunden. Eine erhöhte enzymatische Aktivität der DPP IV würde ferner einen *immunprotektiven Effekt* bedingen, vorrangig über eine
- Verstärkung der T-Zell-Aktivierung (Bednarczyk et al., 1991),
- inhibitorische Wirkung auf die Freisetzung immunsuppressiver Zytokine (Reinhold et al., 1997),
- Fokussierung der T-Zell-Immunantwort hin zu einem proinflammatorischen Th1-Typ des sezernierten Zytokinmusters (Willheim et al., 1997) bei
- Inaktivierung von zu einem Th2-Typ der Zytokinantwort führenden Mediatoren wie Eotaxin (Struyf et al., 1999) und IP-10 (Oravecz et al., 1997).

Die verfügbaren experimentellen und klinischen Daten legen die Vermutung nahe, daß die Wirkungen der DPP IV im Sinne eines *bimodalen Effekts* der DPP IV gedeutet werden kann. Auf der einen Seite ist DPP IV an einer T-Zell-Aktivierung und einem immunprotektiven Effekt beteiligt, auf der anderen Seite werden potente Chemokine, die ebenfalls eine Immunantwort aufrechterhalten oder ausweiten können, durch DPP IV inaktiviert. Dieser scheinbar widersprüchliche Effekt kann physiologische Relevanz haben, wenn die Spezifität und Effektivität einer Immunantwort erhöht und gleichzeitig eine unkontrollierte Ausweitung der Immunreaktion

verhindert werden soll: Bestimmte Immunreaktionen, die über Mechanismen wie die Antigen-abhängige T-Zell-Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor initiiert wurden, werden über die enzymatische Aktivität der DPP IV aufrechterhalten oder verstärkt, während parallel stattfindende Prozesse oder Ausweitungen der Immunantwort eher gedämpft werden, im Sinne einer Fokussierung der Immunreaktion auf aktive Entzündungsprozesse.
Aus klinischer Perspektive verdeutlicht die bei anorektischen Patientinnen beobachtete erhöhte DPP IV-Aktivität im Serum den in diesem Modell vorgeschlagenen Effekt der DPP IV-Aktivität: ihre Erhöhung würde demnach einen Versuch darstellen, die durch Malnutrition beeinträchtigte Infektabwehr zu verstärken oder zumindest partiell aufrechtzuerhalten. Die Inaktivierung potenter insulinotroper Peptidhormone, verbunden mit einer erhöhten Glukoseaufnahme infolge der Inaktivierung des Gastrin Releasing Peptide (GIP), würde zu einer *erhöhten Glukoseverfügbarkeit* in der Zirkulation führen, bei gleichzeitig verminderter Verdauungstätigkeit infolge der Inaktivierung motilitätssteigernder und sektretogener Peptidhormone. Diese Betrachtung in Richtung einer eher katabolen Stoffwechsellage wird schlüssig ergänzt durch die Tatsache, daß neben den anabol wirksamen insulinotropen Peptiden auch Growth Hormone Releasing Factor und weitere Mitogene durch DPP IV inaktiviert werden. Bezogen auf das klinische Beispiel der Anorexia nervosa macht die schwere Unterernährung im Zuge der Erkrankung - zumindest für eine Zeit der Änderung des Grundumsatzes eines Organismus (Hildebrandt et al., 2001) – eine eher katabole Stoffwechsellage erforderlich, was die Inaktivierung anaboler bioaktiver Peptide mit einschließt (Bongers et al., 1992; Boulanger et al., 1992; Campbell et al., 1994). Die erhöhte Schmerzwahrnehmung und vermehrte Glukoseverfügbarkeit runden das Modell der DPP IV als Teil eines protektiven Schutzmechanismus ab. Im Kern führt diese Betrachtungsweise zu einem Modell, in welchem DPP IV Teil einer *physiologischen Alarmreaktion des Organismus* ist.

9. DPP IV-Inhibition in einem Modell für stressimmunologische Interaktionen

Inhibitoren der enzymatischen Aktivität der DPP IV wirken in teils reversibler, teils irreversibler Weise durch Blockierung des katalytischen Zentrums. Eine Vielzahl chemischer Substanzen kann diese inhibitorische Wirkung ausüben (Augustyns et al., 1999), wobei die Reversibilität der Inhibition für die Anwendung am Menschen allgemein als obligat betrachtet wird. Die Bedeutung der DPP IV für den Glukosemetabolismus führte zu dem therapeutischen Konzept der DPP IV-Inhibition in der Behandlung des Typ II-Diabetes. Die beeindruckende Fähigkeit der DPP IV-Inhibitoren, sowohl im Tiermodell als auch bei ansonsten nahezu therapierefraktären Patienten eine Normoglykämie zu erzielen, stellt in der Tat einen neuartigen Therapieansatz dar, der mittlerweile zur Entwicklung und klinischen Prüfung verschiedener Substanzen geführt hat und, angesichts der Prävalenz des Typ II-Diabetes, auch seitens der pharmazeutischen Industrie mit Interesse verfolgt wird.

Bei Betrachtung der vielfältigen Funktionen der DPP IV stellt sich jedoch die Frage, ob nicht über die Erzielung einer Normoglykämie hinaus weitere Effekte der DPP IV-Inhibition, vor allem in immunologischer Hinsicht, zu erwarten wären, was das therapeutische Spektrum dieser Substanzen erweitern, jedoch auch kritisch einschränken könnte. Dieser Frage sind wir in einem Tiermodell nachgegangen, welches im folgenden Abschnitt dargestellt werden soll: Stressinduzierte Aborte der Maus (Hildebrandt et al., 2001).

Das mütterliche Immunsystem trägt zu Erfolg oder Mißerfolg der Schwangerschaft sowohl bei der Maus als auch beim Menschen bei (Arck et al., 1999). Das derzeit akzeptierte Modell der immunologischen Kontrolle über die Schwangerschaft besagt, daß im Falle einer gelungenen Schwangerschaft eher protektive Entzündungsmediatoren in der Decidua vorrangig produziert werden, die als T-Helfer2/T-Helfer3-Immunantwort zusammengefaßt werden (Interleukin-4 und –10, ferner Transforming Growth Factor (TGF)-β2; (Arck et al., 1995; Krishnan et al., 1996; Lin et al., 1993). Im Falle einer Abstoßung herrscht hingegen eine Produktion entzündungsfördernder Mediatoren wie den Zytokinen Interferon-γ und TNF-α vor, welche als T-Helfer-1-Typ der Zytokinantwort bezeichnet wird. Unter den Bedingungen, die einen derartigen Wechsel von einem schwangerschaftsprotektiven Th2/Th3-Zytokinprofil hin zu einer abortogenen Th1-Zytokinantwort führen, verdient aus psychoimmunologischer Sicht die Belastung mit einem externen Stressor (Ultraschallquelle, (Arck et al., 1995)) besonderes Interesse. Dieser Abstoßungsprozeß schließt eine Substanz P-vermittelte Mastzell- und Makrophagen-Aktivierung mit ein (Markert et al., 1997). Das Konzept der Zytokinmuster, welche den Erfog oder das Scheitern der Schwangerschaft bestimmen, führt zu der bis heute ungeklärten Frage, über welches „Relais“ der Wechsel von einem schwangerschaftsprotektiven hin zu einem abortogenen Zytokinprofil vermittelt wird.

Weibliche CBA/J-Mäuse und männliche DBA/2 Mäuse wurden über Nacht verpaart. Untergruppen von mindestens zehn schwangeren Mäusen erhielten ab Tag 5,5 der Schwangerschaft intraperitoneale Injektionen von Ile-Thiazolidid, einem reversiblen DPP IV-Inhibitor (20 µmol/kg/d). Kontrollgruppen wurde das unwirksame Stereoisomer des Inhibitors in gleicher Menge injiziert. Die Hälfte der Tiere, denen der Inhibitor bzw. das unwirksame Stereoisomer injiziert worden war, wurden am Tag 5,5 der Schwangerschaft einem exogenen Stressor (Ultraschallquelle) für 24 h ausgesetzt. Alle Tiere wurden am Tag 13,5 der Schwangerschaft getötet. Die Zahl der Implantationen in der Gebärmutter wurde ebenso wie die Zahl der Resorptionsstellen (=Aborte) dokumentiert.
Die Lymphozyten der Milz und der Dezidua wurden über einen Dichtegradienten isoliert und durchflußzytometrisch untersucht. Hier wurde die Expression von Oberflächenantigenen und die intrazelluläre Produktion von Zytokinen (Interleukin-10, γ-Interferon) quantifiziert.

Abbildung 3

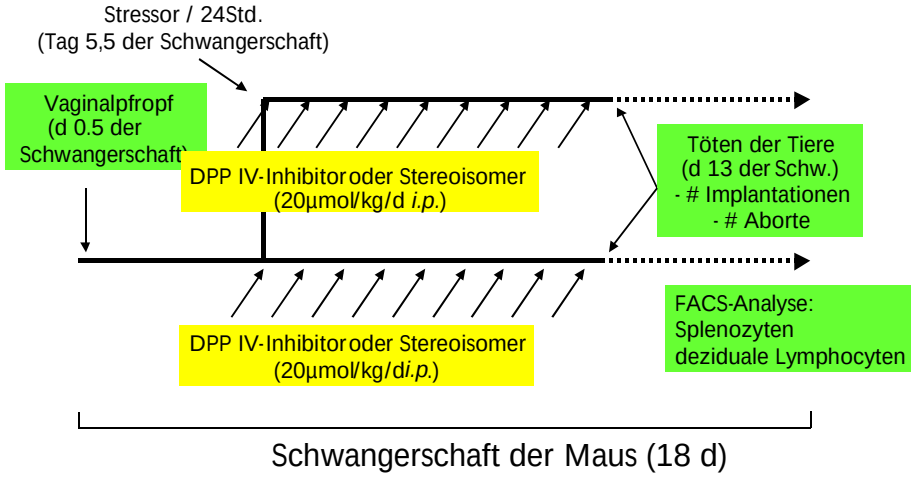

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Untersuchungen zur DPP IV bei stressinduzierten Aborten der Maus

Unter den gestressten Tieren wurde ein erwarteter Anstieg der Abortrate beobachtet (37,2% vs. 10,5% bei nicht gestressten Kontrolltieren; $p<0,01$). Der Effekt des Stressors wurde unter der Gabe des DPP IV-Inhibitors komplett unterdrückt (14,5% bei nicht gestressten Tieren mit dem Inhibitor, 13,6% bei gestressten Tieren mit dem Inhibitor). Hinsichtlich der Zahl der Implantationen fanden sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Abbildung 1 (Seite 99 dieser Schrift) stellt den prozentualen Anteil der Aborte an den Implantationen je

Gruppe dar.
Der prozentuale Anteil CD2-/CD26-positiver Zellen in der Milz unterschied sich nicht zwischen den vier untersuchten Gruppen. Die IL-10- und die γ-Interferon-produzierenden Zellen fanden sich ausschließlich unter den CD26-positiven Zellen. Keine signifikanten Unterschiede fanden sich zwischen den Gruppen hinsichtlich der Zahl IL-10-produzierender Zellen der Milz. Die Zahl der Interferon-γ-produzierenden Zellen war nur in der Gruppe der gestressten Tiere ohne den DPP IV-Inhibitor erhöht, nicht jedoch bei Applikation des DPP IV-Inhibitors.
Unter den dezidualen Lymphozyten war der prozentuale Anteil der CD2-positiven Zellen (T-Lymphozyten gesamt) der vier untersuchten Gruppen gleich. Der Anteil CD26/DPP IV-positiver Zellen stieg jedoch unter Stressexposition an (67% vs 43% bei nicht gestressten Tieren, $p<0,05$; vgl. Abb. 3, Seite 100 der vorliegenden Schrift). Bei den Tieren mit Stressexposition ohne DPP IV-Inhibitor wurden unter den dezidualen Lymphozyten mehr γ-Interferon-produzierende Zellen gefunden. Unter Gabe des DPP IV-Inhibitors hingegen lag der Anteil γ-Interferon-produzierender Zellen auf dem Niveau nicht gestresster Tiere. Der Anteil IL-10-produzierender Zellen war in beiden Gruppen gestresster Tiere deutlich vermindert, ohne daß Unterschiede nach Gabe des Inhibitors erkennbar waren. Wiederum waren die IL-10- oder γ-Interferon-produzierenden Zellen ausschließlich unter der CD26-positiven Fraktion zu finden.
Bemerkenswert war, daß eine einmalige Injektion des DPP IV-Inhibitors unmittelbar vor der Stressexposition, d.h. Tag 5,5 der Schwangerschaft, genügte, um nicht nur die gleichen immunologischen Veränderungen hervorzurufen wie die tägliche Applikation gleicher Mengen des Inhibitors von Tag 5,5 bis Tag 13,5 der Schwangerschaft. Mehr noch, die einmalige Injektion am Tag 5,5 der Schwangerschaft reichte aus, um den zu erwartenden Anstieg der Abortrate unter Stress komplett zu unterbinden (13,9% (Tag 5,5) und 10,2% (Tage 5,5 bis 13,5) vs. 36,4% (Stress und unwirksames Stereoisomer), $p<0.01$).
Das in unserem Labor verwendete Modell stressinduzierter Aborte der Maus bietet, neben dem reproduktionsbiologisch interessanten Aspekt, einen durch Beginn der Schwangerschaft und Zahl der beobachteten Aborte klar definierten Rahmen zur Untersuchung (psycho-) immunologischer Fragestellungen. Wir konnten demonstrieren, daß die Inhibition der enzymatischen Aktivität der DPP IV zu einer Verhinderung eines stressinduzierten Anstiegs der Abortrate im beschriebenen Modell führt. Die Untersuchungen zeigten, daß dies mit einem Ausbleiben der unter Stress beobachteten erhöhten Produktion von γ–Interferon lokal, d.h. in der Decidua, einhergeht. γ–Interferon ist für seine entscheidende Bedeutung bei der Vermittlung der stressinduzierten Aborte bekannt.
Über die beobachtete Veränderung der lokalen γ-Interferon-Produktion hinaus versuchten wir, die Bedeutung von CD26/DPP IV für Mechanismen der Zell-Zell-Interaktion und der T-Zell-Stimulation zu untersuchen, die für die beobachtete Blockierung der stressinduzierten Aborte

relevant sein könnten. *In vitro*-Daten und *In vivo*-Daten belegten eine Beeinflussung des Antigenpaars CD28 und CTLA-4 durch DPP IV bzw. durch Inhibition der DPP IV- Aktivität. Diese Antigene sind als entscheidende kostimulatorische Moleküle im Rahmen der T-Zell-Aktivierung bekannt. Die erhobenen Befunde erlauben nicht nur ein besseres Verständnis der immunologischen Bedeutung der DPP IV-Aktivität, sondern führen auch möglicherweise zu weiteren Optionen der therapeutischen Nutzung von DPP IV-Inhibitoren. Ein Patent auf die Verwendung von DPP IV-Inhibitoren für eine derartige Modulation T-Zell-vermittelter Immunantworten wurde von uns angemeldet.

Wie in den vorigen Abschnitten ausgeführt, scheint DPP IV zur Entwicklung einer Zytokinantwort vom Th1-Typ beizutragen, indem sie die Produktion der zugehörigen Zytokine, insbesondere die von γ-Interferon, verstärkt, und zugleich die Entwicklung einer Typ2-Zytokinantwort unterdrückt (De Meester et al., 1999; von Bonin et al., 1998). In verschiedenen Studien konnte die Bedeutung der DPP IV bei der Th1-/Th2-Modulation *In vitro* belegt werden (Reinhold et al., 1997; Reinhold et al., 1997).
Der von uns verwendete Inhibitor, Ile-Thiazolidid, supprimiert die Expression von γ-IFN, IL-12 und IL-10 auf transkriptionaler Ebene, während die Expression von TGF-β1 gefördert wird (Arndt et al., 2000; Reinhold et al., 1997). Dieser reversible Inhibitor ist mit dem Ziel des Einsatzes beim Menschen entwickelt worden und stellt einen der aussichtsreichsten Kandidaten für die oben geschilderte Therapie des Typ II-Diabetes dar (Pauly et al., 1996; Pederson et al., 1998). Der Mechanismus, über welchen DPP IV-Inhibitoren auf die Zytokinproduktion Einfluß nehmen, wird nur unzureichend verstanden. Zumindest ist bekannt, daß die Inhibition der DPP IV-Aktivität frühe Phosphorylierungsschritte in der T-Zell-Aktivierung wie die Hyperphosphorylierung von $p56^{lck}$ dosisabhängig und reversibel unterdrückt (Kähne et al., 1995). Da DPP IV/CD26 mit dem Antigen CD45 an der Oberfläche von T-Lymphozyten assoziiert zu sein scheint (De Meester et al., 1999), welches wiederum die Phosphorylierung von $p56^{lck}$ reguliert (Xu und Chong, 1995), ist es wahrscheinlich, daß der skizzierte Weg der intrazellulären Signalübertragung zu den Effektorwegen der DPP IV bzw. der Inhibitoren der DPP IV-Aktivität gezählt werden muß. Studien an Ratten, denen inkompatible Herzen transplantiert worden waren, hatten zuvor gezeigt, daß eine irreversible Inhibition der DPP IV-Aktivität zu einem verlängerten Transplantatüberleben führte (Korom et al., 1997). Vermutlich waren in jenen Studien ähnliche Effektormechanismen wie die hier skizzierten an dem verlängerten Transplantatüberleben beteiligt.
Die vermehrte Produktion von γ-Interferon in den dezidualen Lymphozyten als Folge der Stressexposition, die nach bisheriger Datenlage für den Anstieg der Abortrate verantwortlich ist (Chaouat et al., 1990; Clark et al., 1998), ist offenbar sensitiv gegenüber Inhibitoren der DPP IV-

Aktivität. Über den lokalen Aspekt hinaus scheint die Inhibition der DPP IV-Aktivität jedoch auch systemisch die Zytokinproduktion zu beeinflussen, wenn auch die Daten in unserer Studie nur grenzwertig Signifikanzniveau erreichten. Weitere Effektormechanismen der DPP IV müssen in Betracht gezogen werden, auch was eine mögliche systemische Wirkung der DPP IV-Inhibitoren betrifft. Insbesondere muß Substanz P hier erwähnt werden, welche nicht nur ein potenter Mediator stress-induzierter Aborte im hier vorgestellten Modell ist (Arck et al., 1995), sondern auch durch DPP IV moduliert, d.h. aktiviert wird (Nausch et al., 1990).

Die Charakterisierung der DPP IV als „Schutzengel"(Hildebrandt et al., 2000) angesichts der Vielfalt ihrer möglichen Funktionen in Regulationsmechanismen der Immunfunktion, der Hunger-Sättigungsregulation, der Stoffwechsellage, der Zelladhäsion und der Modulation bioaktiver Peptidhormone, mag befremdend klingen. Sie soll jedoch auf das hier skizzierte Modell verweisen, in welchem die DPP IV ein *zentrales Element einer physiologischen Alarmreaktion des Organismus* darstellt. Von diesem Modell ausgehend, müssen Bemühungen, DPP IV-Inhibitoren therapeutisch, zum Beispiel zur Behandlung des Typ II-Diabetes (Deacon et al., 1998; Holst und Deacon, 1998) einzusetzen, zum jetzigen Zeitpunkt kritisch hinterfragt werden. Bis heute ist kein Krankheitsbild des Menschen mit dem Fehlen der DPP IV im Sine eines genetischen Defektes assoziiert worden, wenn auch derartige Krankheitsbilder durchaus vorstellbar wären, unter Umständen aber mit einem letalen Phänotyp verbunden sind. Angesichts der evolutiv hochkonservierten Struktur der DPP IV könnte ein Defekt dieses „Schutzengels" in der Tat einen nicht wieder gutzumachenden Verlust darstellen.

IV. Zur Rolle des Modells in der klinischen Forschung

1. Modelle in der klinischen Forschung

Modelle helfen, die Welt besser zu verstehen und Konsequenzen für ein bestmögliches Handeln zu ziehen. Auf der Basis von Modellen werden Experimente und klinische Studien entwickelt, deren Ergebnisse zu einem besseren Verständnis des jeweiligen physiologischen oder pathophysiologischen Prozesses beitragen sollen. Auf dem Boden dieses Prozesses steter Verbesserung, dem das Modell einer Erkrankung oder eines physiologischen Vorgangs unterworfen ist, fußen wiederum neue Konzepte therapeutischer Intervention. Die Symptome sowie das pathophysiologische Modell der zu behandelnden Erkrankung bestimmen den Rahmen, innerhalb dessen eine therapeutische Intervention denkbar ist. Je befriedigender das für die Erkrankung entwickelte Modell ist, desto eher läßt die Intervention einen Nutzen für den Patienten erwarten und desto genauer lassen sich die zu erwartenden Effekte der Intervention abschätzen. Ist der Schweregrad einer Erkrankung hoch, sind wir auch bereit, ein Modell für eine therapeutische Intervention zu akzeptieren, das unter anderen Umständen aufgrund der zu erwartenden (oder im Rahmen der zugrundeliegenden Modelle möglichen) Kollateralwirkungen nicht als befriedigend betrachtet werden könnte. Gleichzeitig können andere Modelle helfen, unerwünschte Begleiteffekte beherrschbar zu machen.
Im Rahmen einer neoplastischen Erkrankung hat die Überlegung, ein zytostatisch wirksames Medikament trotz der bekannten oder zu erwartenden Effekte auf andere Organsysteme einzusetzen, durchaus eine mögliche Berechtigung, da die Schwere der Erkrankung und der therapeutische Nutzen des zytotoxischen Effektes die Wirkung auch auf andere Organe in den Hintergrund treten lassen. Gleichzeitig ist evident, daß im Rahmen einer weniger schweren Erkrankung dieses therapeutische Modell weitaus weniger befriedigend sein könnte.
In einem fortgeschrittenen Stadium einer neoplastischen Erkrankung, beispielsweise eines Keimzelltumors, kann eine Dosiserhöhung eines Zytostatikums erwogen werden, die aufgrund ihrer Nebenwirkungen in einem früheren Stadium nicht akzeptabel wäre. Voraussetzung ist, daß wir andere Modelle, zum Beispiel das Modell der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle, therapeutisch nutzen können, um zu erwartende Effekte der höheren Dosis zu kompensieren. Auch hier muß gelten, daß der zu erwartende Nutzen einer solchen Verschärfung der Therapie dieses neue therapeutische Konzept rechtfertigt. Das Hinzutreten neuer Informationen kann jedoch auch den Wert bzw. die Qualität eines Modells verringern. Wird also im Fall der Hochdosistherapie festgestellt, daß ein neuer, unabhängiger und prognostisch relevanter Faktor bei einzelnen Patienten das Ausbleiben des erwünschten therapeutischen Nutzens prognostiziert, muß überlegt werden, ob eine therapeutische Intervention im Rahmen des

bestehenden Modells gerechtfertigt ist.
Die Detektion residualer Tumorzellen wird im Allgemeinen als möglicher Ausdruck hämatogener Metastasierung gedeutet: Tumorzellen verlassen den Primärtumor über die Blutbahn und siedeln sich an peripher gelegenen Orten an, sei es, um im Knochenmark in einem Zustand der Ruhe (G0-Phase) zu verharren und später, nach Wiedereintritt in den Zellzyklus, Ausgangspunkt eines Rezidivs zu werden; sei es, um andere Organe zu besiedeln und frühzeitig Makrometastasen zu bilden. Eine hämatogene Aussaat kann bei einer Vielzahl neoplastischer Erkrankungen angenommen werden, nicht nur, wenn der einzig vorstellbare Weg zum Ort der Metastasierung über die Blutbahn führt, sondern auch, weil wir Zellen im Blut nachweisen können, die charakteristische Eigenschaften der malignen Erkrankung tragen. Der Nachweis dieser Zellen korreliert offenbar in verschiedenen Erkrankungen mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf, und deren Verschwinden unter Therapie läßt bei manchen Erkrankungen ein günstigeres ereignisfreies Überleben erhoffen. Daneben kann die Aufreinigung von Stammzellasservaten zu einer Verminderung der Tumorzellzahl führen, was bei einigen malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems mit einem günstigeren Verlauf nach Hochdosistherapie korreliert. Eine beträchtliche Zahl von Argumenten stützt also das Konzept der klinischen Relevanz kontaminierender Tumorzellen im peripheren Blut für den Verlauf und die Therapie neoplastischer Erkrankungen. Der endgültige Beweis für eine alleinige Bedeutung kontaminierender Tumorzellen für ein Rezidiv steht aus. Dennoch erscheint es aufgrund der jetzigen Datenlage gerechtfertigt, die vormals experimentellen Methoden zur Tumorzellentfernung im klinischen Maßstab zu nutzen, in der Hoffnung, den Patienten mit Tumorzellen, die das zu transplantierende Asservat kontaminierten, nicht zu gefährden. Wie verhalten wir uns aber, wenn, wie bei den Keimzelltumoren gezeigt, der Nachweis atypischer Zellen oder tumorspezifischer RNA-Sequenzen im Blut ein für den Patienten ungünstiges Ergebnis einer geplanten aggressiven Therapie signalisiert und die Erfahrung mit der Erkrankung zeigt, daß diese kontaminierenden Tumorzellen wahrscheinlich nicht kausal bedeutsam sind, eine Aufreinigung des Stammzellasservates also die ungünstige Prognose vermutlich nicht verbessern würde? In diesem Fall müßte der vorzeitige Abbruch einer mit viel Hoffnung seitens des Patienten besetzten, wissenschaftlich prestigeträchtigen und nicht zuletzt kostenintensiven Therapie erwogen werden.

Bei anderen Erkrankungen kann die Vielfalt und Komplexität pathophysiologischer Modelle zu einer Konkurrenz zahlreicher therapeutischer Konzepte führen. Ein multimodaler therapeutischer Ansatz, der verschiedene pathophysiologische Konzepte in sich vereint, kann auch erheblich bessere Behandlungsresultate im Sinne additiver Effekte oder eines Synergismus bedingen. Voraussetzung muß auch hier sein, daß das zugrundeliegende therapeutische Modell eine hohe

Kompatibilität mit dem pathophysiologischen Modell der Erkrankung einerseits sowie mit weiteren physiologischen oder pathophysiologischen Modellen andererseits aufweist. Mangelnde Kompatibilität mit anderen Modellen ist ein Indiz für potentiell bedrohliche Nebeneffekte der geplanten Therapie.
Wenn neue wissenschaftliche Aussagen auf bisher unbekannte Beziehungen der betreffenden Therapie zu anderen Modellen hinweisen, ist es geboten, zu prüfen, ob das ursprüngliche Modell eine therapeutische Nutzung im bisher intendierten Rahmen weiterhin zuläßt. Wenn beispielsweise ein neuartiger Ansatz zur Therapie des Typ II-Diabetes im Rahmen anderer Experimente einen potenten immunsuppressiven Effekt zeigt, muß überlegt werden, ob eine zwar antidiabetisch wirksame, aber auch immunsuppressive Therapie Patienten, die ohnehin als immunsupprimiert betrachtet werden müssen, nicht eher schaden als nützen könnte. Im Falle der Inhibitoren der DPP IV-Aktivität, auf welche ich mich hier beziehe, verweist das Modell, das wir vorgeschlagen haben, eher auf den Grad der Unkenntnis, der im Bereich der Peptidmodulation und Peptidwirkung zum jetzigen Zeitpunkt besteht. Angesichts der erheblichen Konkurrenz mit anderen, bewährten therapeutischen Optionen für eine nicht unmittelbar lebensbedrohliche Erkrankung muß eine therapeutische Nutzung des Konzeptes der Inhibition der DPP IV beim derzeitigen Wissensstand kritisch hinterfragt werden.
Diese Betrachtungen schließen nicht aus, daß in einem anderen Umfeld, d.h. bei einer anderen Erkrankung, der Einsatz von Inhibitoren der DPP IV-Aktivität eher diskutiert werden könnte. Voraussetzung wäre zum einen, daß das pathophysiologische Modell der Erkrankung und das therapeutische Konzept der DPP IV-Inhibition weitgehend kompatibel sind und ferner mit einem Modell in Übereinstimmung stehen, das der biologischen Bedeutung der DPP IV am nächsten kommt. Zum anderen müßte die Indikation angesichts des derzeitigen Kenntnisstands auf eine kleinere Patientenpopulation begrenzt werden und sollte sich nicht auf eine Erkrankung beziehen, welche Dimensionen einer Volksseuche besitzt: Das Auftreten möglicher Kollateraleffekte der DPP IV-Inhibitoren wäre besser überschaubar. Die Schwere der Erkrankung und eine geringe Konkurrenz therapeutischer Konzepte müßten ebenfalls als Voraussetzungen dienen, um den Einsatz der Inhibitoren beim jetzigen Kenntnisstand ihrer möglichen vielfachen Effekte zu rechtfertigen. Erkrankungen, die hier einen Nutzen der DPP IV-Inhibitoren erwarten lassen könnten, sind Autoimmunerkrankungen oder chronisch-entzündliche Erkrankungen; auch Graft versus Host-Reaktionen und andere Zustände gestörter Immuntoleranz erscheinen als Indikationen plausibel, zumindest eher als Typ II-Diabetes.

2. Philosophischer Exkurs: Entscheidungsprozesse und Lebenswelten

Im folgenden Abschnitt soll ein Exkurs in die Wissenschaftstheorie eingeschoben werden, da sich aus der Lektüre der Arbeiten zweier Philosophen Anknüpfungspunkte zu der vorliegenden Habilitationsschrift fanden, die ich für einen Erklärungsversuch wissenschaftlicher Entscheidungsprozesse nutzen möchte. Dieser Einschub ist nicht als Beleg für vermeintliche Fachkompetenz in einem mir fremden Feld zu verstehen, sondern als Bereicherung der Auseinandersetzung über therapeutische Modelle und wissenschaftliche Entscheidungsprozesse aus einem anderen Blickwinkel gedacht; es liegt mir fern, den Eindruck wissenschaftsphilosophischer Expertise entstehen zu lassen. Zum einen handelt es sich um den Begriff der *Lebenswelt*, der in der Wissenschaftsphänomenologie Edmund Husserls auftaucht, zum anderen und auf Husserl aufbauend um die *Theorie kommunikativen Handelns* bei Jürgen Habermas.

Die 1936 erschienene „Krisis"-Abhandlung Edmund Husserls markiert, wie in der Einleitung zu der von E. Ströker herausgegebenen Ausgabe des Werkes (Husserl, 1996) ausgeführt, einen Wendepunkt, in dem Husserl schließlich zur Geschichte und der Lebenswelt des Menschen gefunden habe. Die hier gemeinte Krise sei die Krise der Philosophie als Krise dessen, „was Wissenschaftlichkeit überhaupt dem menschlichen Dasein bedeutet hatte und bedeuten kann", ((Husserl, 1996), S. 4). Wenn die Krisis-Schrift auch den Untertitel „Einleitung in die transzendentale Phänomenologie" trägt, verstand Husserl sie offenbar als „eine relativ in sich geschlossene Vorbesinnung, eine erste Selbstverständigung, Selbstberatung" über eine neuartige „in unserer philosophischen Gesamtlage notwendig gewordene Zielstellung und Methode der Philosophie"(Husserl, 1996).

Der Begriff der „Lebenswelt" taucht in der „Krisis"-Schrift erstmals auf und führte, wie E. Ströker formuliert, zu einer allzu voreiligen Vereinnahmung Husserls für mancherlei spätere anders gelagerte Problematik, der Husserl kaum mehr als den griffigen Terminus der „Lebenswelt" geliefert habe ((Husserl, 1996), S. XI der Einleitung). In kaum zu übertreffender Weise beschreibt er jedoch die *Rahmenbedingungen wissenschaftlicher Entscheidungen*, welche maßgeblich den wissenschaftlichen Entscheidungsprozeß begründen. Insbesondere weist der Terminus der „Lebenswelt", über den wissenschaftlichen Bereich hinaus, auf die individuell unterschiedlichen Lebensbedingungen und Erfahrungshorizonte hin, die in ihrer Subjektivität und dem Grad ihrer Beeinflußbarkeit durch äußere Faktoren weder einer Normierung noch reiner Rationalität unterworfen werden können. Es ist diese Lebenswelt, die das Interesse für eine bestimmte wissenschaftliche Thematik, beispielsweise die Bedeutung des Enzyms DPP IV, ebenso

determiniert wie die Sichtweise auf dieses Enzym, in diesem Fall als „Schutzengel“ im Zentrum einer Alarmreaktion des Organismus (Hildebrandt et al., 2000). Einem anderen mag vor dem Hintergrund der ihm eigenen Lebens- und Erfahrungswelt diese Sichtweise eher fremd oder ähnlich vertraut erscheinen.
Habermas greift den Terminus der Lebenswelt auf, um ihn als Komplementärbegriff zum kommunikativen Handeln einzuführen (Habermas, 1981). Aus meiner Sicht stellt er in ähnlicher Weise einen *Komplementärbegriff zum wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn* dar. Ähnlich wie für das kommunikative Handeln kann der Prozeß wissenschaftlicher Erkenntnis als ein „kooperativer Deutungsprozeß“ beschrieben werden, in dem sich die Teilnehmer auf etwas in der objektiven, der sozialen und der subjektiven Welt zugleich beziehen, auch wenn sie in ihren Äußerungen nur eine der drei Ebenen, so zum Beispiel Aspekte vermeintlicher Rationalität und Objektivität, thematisch hervorheben. Das Bezugssystem dieser drei Welten bildet den Interpretationsrahmen, innerhalb dessen die Teilnehmer „gemeinsame Definitionen ihrer Handlungssituation erarbeiten. Sie nehmen nicht geradehin auf etwas in einer Welt Bezug, sondern relativieren ihre Äußerung an der Möglichkeit, daß deren Geltung von einem anderen Aktor bestritten wird“((Habermas, 1981), S. 184). Die Arbeit in einem Labor oder der wissenschaftliche Diskurs auf einem Kongreß wird so zu einem durch Themen herausgehobenen, durch Handlungsziele und –pläne artikulierten Ausschnitt aus „lebensweltlichen Verweisungszusammenhängen“: Die individuelle Lebenswelt, der die Teilnehmer an diesem Ausschnitt wissenschaftlichen Erkenntnisgewinns angehören, bildet den Hintergrund, in dem bestimmte Sachverhalte „im Modus einer lebensweltlichen Selbstverständlichkeit“ gegeben sind, aber in Form eines „konsentierten und zugleich problematisierbaren Wissens mobilisiert“ werden, wenn sie im Sinne eines Verweisungszusammenhangs für die jeweilige Situation relevant werden. Diese Selbstverständlichkeit schließt die teils bewußten, teils unbewußten Faktoren ein, die, durch die Lebens- und Erfahrungswelt bestimmt, mich an der jeweiligen wissenschaftlichen Handlungssituation in einer mir eigenen und im Kontext der jeweiligen Situation spezifischen Weise teilnehmen lassen.

3. Wissenschaftliche Entscheidungen in der klinischen Forschung

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, können verschiedenste Faktoren, die der individuellen Lebenswelt des Wissenschaftlers entstammen und sein Urteil beeinflussen, genannt werden. Viele von ihnen sind im Moment der Entscheidung unbewußt und haben das grundsätzliche Vorgehen jedes Individuums bei Entscheidungsprozessen beeinflußt. Sie sind, über den Aspekt der wissenschaftlichen Tätigkeit hinaus, abhängig von den subjektiven Bedingungen einer individuell unterschiedlich geformten Erfahrungs- und Lebenswelt, welche das Spektrum der

Entscheidungsmöglichkeiten des Wissenschaftlers ebenso wie seine Motivation zur Forschung und die Präferenz bestimmter Modelle bestimmen.
Die Nutzung gewonnener Erkenntnis trägt nicht nur zu weiterem Erkenntnisgewinn und auch methodisch zur Gestaltung neuer Experimente bei; als Technologie führt sie in den Bereich der technisch-industriellen Umsetzung und der dort relevanten Einflussfaktoren, zu denen unter anderem finanzielle Interessen zählen. Diese vermögen angesichts des großen Marktes für pharmazeutische und medizintechnische Produkte sowie des Gewinnpotentials der diese Welt begleitenden Zivilisationserkrankungen das wissenschaftliche Urteil zu beeinflussen. Das mit der Publikation gewonnener Daten verbundene Prestige kann für den Wissenschaftler selbst von beträchtlichem Nutzen sein, was, so muß vermutet werden, in die Attraktivität eines bestimmten Modells mit einmündet.
Die von Habermas skizzierten Strukturen kommunikativen Handelns (vgl. Seite 40) können, über den Aspekt der Komplementarität zum Begriff der Lebenswelt hinaus, dazu beitragen, den Prozeß klinischer Forschung besser zu strukturieren und auf seine Intentionalität hin zu definieren. Nach Habermas bezieht sich kommunikatives Handeln auf die Ebenen der objektiven, der sozialen und der subjektiven Welt. Wenn wir die klinische Forschung ebenfalls auf diese Ebenen beziehen, läßt sich der Prozeß wissenschaftlichen Erkenntnisgewinns vielleicht wie folgt verstehen: Die *objektive Ebene* kann mit dem Begriff der Sach- oder Detailkenntnis beschrieben werden. Die *soziale Ebene* schließt das Konkurrieren verschiedener Modelle genauso ein wie konkurrierende Interessen der am Prozeß der klinischen Forschung und therapeutischen Umsetzung Beteiligten wie wissenschaftliche Fachgesellschaften, pharmazeutische Industrie und die Krankenkassen, für die die Akzeptanz eines therapeutischen Konzeptes die Frage nach der Übernahme der entstehenden Kosten aufwirft. Der *subjektiven Ebene* sind persönliche Motive des einzelnen wissenschaftlich Tätigen, seine „Lebenswelt“, zuzuordnen. Wenn auch die in der klinischen Forschung Tätigen in ihren Äußerungen nur eine der drei Ebenen thematisch hervorheben, bezieht sich der „kooperative Deutungsprozeß“ Habermas zufolge immer auf alle drei genannten Ebenen zugleich.
Um jedoch den ersten Satz der vorliegenden Habilitationsschrift nochmals aufzugreifen, ist klinische Forschung patientengerichtet. Diese Intentionalität klinischer Forschung muß sich ebenfalls auf diese drei Ebenen in ihrer Gesamtheit beziehen. Im Interesse des Patienten müssen dann folgende Elemente der drei Ebenen besondere Bedeutung haben:
- klinische Erfahrung und Flexibilität in der Anwendung geeigneter Modelle zum besseren Verständnis eines Krankheitsprozesses,
- soziales Engagement für die Etablierung und stete Verbesserung klinisch-therapeutischer Standards sowie
- persönliche Betroffenheit angesichts individuellen Leides.

V. Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit habe ich den Versuch unternommen, die beiden Themenkomplexe meiner bisherigen wissenschaftlichen Tätigkeit als Beispiele für die Rolle von Modellen in der klinischen Forschung zu verwenden. Den Anstoß dazu gaben Diskrepanzen, die mir in der Auseinandersetzung mit eigenen Ergebnissen und Beobachtungen im Umfeld dieser Themenkomplexe aufgefallen sind: der Rolle kontaminierender Tumorzellen in der Hochdosistherapie maligner Tumoren einerseits und dem Enzym Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) andererseits.

Modelle sind statische Konstrukte in einem immer dynamischeren Umfeld und müssen sich stets aufs Neue gegenüber anderen Modellen bewähren. Zahlreiche Faktoren, die nur zum Teil bewußt sind, bewegen Wissenschaftler dazu, ein bestimmtes Modell zu bevorzugen. Wissenschaftliche Reputation, persönliche Motive und finanzielle Interessen können zu diesen Faktoren zählen und werden aus der individuellen Lebenswelt des Einzelnen heraus besser erklärbar. Vor diesem Hintergrund wird zugleich deutlich, daß wissenschaftliche Entscheidungen nicht rational sind, sondern durch unterschiedliche Interessen der Beteiligten beeinflußt werden.

In Anlehnung an Habermas läßt sich der Prozess wissenschaftlichen Erkenntnisgewinns durch formale Gliederung in eine objektive, eine soziale und eine subjektive Ebene deuten. Wissenschaftliche Entscheidungen beziehen sich immer auf alle drei Ebenen, auch wenn meist nur eine der Ebenen im Diskurs genannt wird. Wenn, wie zu Beginn der vorliegenden Arbeit formuliert, klinische Forschung patientengerichtet ist, so müssen im Interesse des Patienten die Kenntnis einer großen Zahl verfügbarer Modelle, die Entscheidung über die Akzeptanz eines Modells im Konsens der Beteiligten und die Vergegenwärtigung individuellen Leids zu der Entwicklung neuer therapeutischer Modelle beitragen.

VI. Literatur

Abbott, C. A.; Gorrell, M. D.; Kobayashi, Y.; Kawasaki, T.; Liddle, C.; Bishop, G. A. und McCaughan, G. W. (1995): Increased serum levels of dipeptidyl peptidase IV (CD26) in rats undergoing liver regeneration, Int Hepatol Commun 4 [3], Seite 165-174.

Arck, P. C.; Ferrick, D. A.; Steele-Norwood, D.; Egan, P. J.; Croitoru, K.; Carding, S. R.; Dietl, J. und Clark, D. A. (1999): Murine T cell determination of pregnancy outcome, Cell Immunol 196 [2], Seite 71-9.

Arck, P. C.; Merali, F. S.; Manuel, J.; Chaouat, G. und Clark, D. A. (1995): Stress-triggered abortion: inhibition of protective suppression and promotion of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) release as a mechanism triggering resorptions in mice, Am J Reprod Immunol 33 [1], Seite 74-80.

Arck, P. C.; Merali, F. S.; Stanisz, A. M.; Stead, R. H.; Chaouat, G.; Manuel, J. und Clark, D. A. (1995): Stress-induced murine abortion associated with substance P-dependent alteration in cytokines in maternal uterine decidua, Biol Reprod 53 [4], Seite 814-9.

Arndt, M.; Lendeckel, U.; Spiess, A. ; Faust, J.; Neubert, K.; Reinhold, D. und Ansorge, S. (2000): Dipeptidyl Peptidase IV (DPIV/CD26) mRNA Expression in PWM-Stimulated T-Cells Is Suppressed by Specific DP IV Inhibition, an Effect Mediated by TGF-beta(1). Biochem Biophys Res Commun 274 [2], Seite 410-414.

Aster, J. C.; Kobayashi, Y.; Shiota, M.; Mori, S. und Sklar, J. (1992): Detection of the t(14;18) at similar frequencies in hyperplastic lymphoid tissues from American and Japanese patients, Am J Pathol 141 [2], Seite 291-9.

Augustyns, K.; Bal, G.; Thonus, G.; Belyaev, A.; Zhang, X. M.; Bollaert, W.; Lambeir, A. M.; Durinx, C.; Goossens, F. und Haemers, A. (1999): The unique properties of dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV / CD26) and the therapeutic potential of DPP IV inhibitors, Curr Med Chem 6 [4], Seite 311-27.

Bai, J. P. (1993): Distribution of brush-border membrane peptidases along the rabbit intestine: implication for oral delivery of peptide drugs, Life Sci 52 [11], Seite 941-7.

Bajorin, D.; Katz, A.; Chan, E.; Geller, N.; Vogelzang, N. und Bosl, G. J. (1988): Comparison of criteria for assigning germ cell tumor patients to "good risk" and "poor risk" studies, J Clin Oncol 6 [5], Seite 786-92.

Barth, A. und Schulz, H. (1974): Untersuchungen und Charakterisierung der Dipeptidylpeptidase IV, Acta biologica et medica germanica 32, Seite 157-174.

Baum, C. M.; Weissman, I. L.; Tsukamoto, A. S.; Buckle, A. M. und Peault, B. (1992): Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population, Proc Natl Acad Sci U S A 89 [7], Seite 2804-8.

Bauvois, B.; Sanceau, J. und Wietzerbin, J. (1992): Human U937 cell surface peptidase activities: characterization and degradative effect on tumor necrosis factor-alpha, Eur J Immunol 22 [4], Seite 923-30.

Bednarczyk, J. L.; Carroll, S. M.; Marin, C. und McIntyre, B. W. (1991): Triggering of the proteinase dipeptidyl peptidase IV (CD26) amplifies human T lymphocyte proliferation, J Cell Biochem 46 [3], Seite 206-18.

Bennett, C. L.; Armitage, J. L. und Armitage, G. O. (1995): Costs of care and outcomes for high-dose therapy and autologous transplantation for lymphoid malignancies: results from the University of Nebraska 1987 through 1991, J Clin Oncol 13, Seite 969-973.

Bensinger, W. I.; Berenson, R. J.; Andrews, R. G.; Kalamasz, D. F.; Hill, R. S.; Bernstein, I. D.; Lopez, J. G.; Buckner, C. D. und Thomas, E. D. (1990): Positive selection of hematopoietic progenitors from marrow and peripheral blood for transplantation, J Clin Apheresis 5 [2], Seite 74-6.

Beutler, B.; Greenwald, D.; Hulmes, J. D.; Chang, M.; Pan, Y. C.; Mathison, J.; Ulevitch, R. und Cerami, A. (1985): Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin, Nature 316 [6028], Seite 552-4.

Beyer, J.; Bokemeyer, C.; Schmoll, H. J. und Siegert, W. (1994): Treatment intensification in disseminated germ-cell tumors, World J Urol 12 [4], Seite 207-13.

Beyer, J.; Kramar, A.; Mandanas, R.; Linkesch, W.; Greinix, A.; Droz, J.P.; Pico, J.L.; Diehl, A.; Bokemeyer, C.; Schmoll, H.J.; Nichols, C.R.; Einhorn, L.H. und W., Siegert (1996): High-Dose Chemotherapy as Salvage Treatment in Germ Cell Tumors: A Multivariate Analysis of Prognostic Factors, CJ Clin Oncol 14 [10], Seite 2638-2645.

Blanco, J.; Marie, I.; Callebaut, C.; Jacotot, E.; Krust, B. und Hovanessian, A. G. (1996): Specific binding of adenosine deaminase but not HIV-1 transactivator protein Tat to human CD26, Exp Cell Res 225 [1], Seite 102-11.

Bongers, J.; Lambros, T.; Ahmad, M. und Heimer, E. P. (1992): Kinetics of dipeptidyl peptidase IV proteolysis of growth hormone-releasing factor and analogs, Biochim Biophys Acta 1122 [2], Seite 147-53.

Bortin, M. M. (1970): A compendium of reported human bone marrow transplants, Transplantation 9 [6], Seite 571-587.

Bosl, G. J. (1993): Chemotherapy of germ cell tumors: current status and future directions, Eur Urol 23 Suppl 2, Seite 53-6.

Bosl, G.L. und Motzer, R.J. (1997): Testicular Germ-Cell Cancer (Review Article), N Engl J Med 337 [4], Seite 242-53.

Bostick, P. J.; Chatterjee, S.; Chi, D. D.; Huynh, K. T.; Giuliano, A. E.; Cote, R. und Hoon, D. S. (1998): Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients, J Clin Oncol 16 [8], Seite 2632-40.

Boulanger, L.; Roughly, P. und Gaudreau, P. (1992): Catabolism of rat growth hormone-releasing factor(1-29) amide in rat serum and liver, Peptides 13 [4], Seite 681-9.

Bouras, M.; Huneau, J. F. und Tome, D. (1996): The inhibition of intestinal dipeptidylaminopeptidase-IV promotes the absorption of enterostatin and des-arginine-enterostatin across rat jejunum in vitro, Life Sci 59 [25-26], Seite 2147-55.

Braun, S.; Pantel, K.; Muller, P.; Janni, W.; Hepp, F.; Kentenich, C. R.; Gastroph, S.; Wischnik, A.; Dimpfl, T.; Kindermann, G.; Riethmuller, G. und Schlimok, G. (2000): Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer, N Engl J Med 342 [8], Seite 525-33.

Bray, G. A. (1993): The nutrient balance hypothesis: peptides, sympathetic activity, and food intake, Ann N Y Acad Sci 676, Seite 223-41.

Brenner, M. K.; Rill, D. R.; Moen, R. C.; Krance, R. A.; Mirro, J.; Anderson, W. F und Ihle, J. N (1993): Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone marrow transplantation, Lancet 341, Seite 85.

Brown, J.; Greaves, M. F. und Molgaard, H. V. (1991): The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic cell lines, brain, and embryonic fibroblasts, Int Immunol 3 [2], Seite 175-184.

Brugger, W.; Bross, K.J.; Glatt, M.; Weber, F.; Mertelsmann, R. und Kanz, L. (1994): Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors, Blood 83 [3], Seite 636-640.

Campbell, R. M.; Stricker, P.; Miller, R.; Bongers, J.; Liu, W.; Lambros, T.; Ahmad, M.; Felix, A. M. und Heimer, E. P. (1994): Enhanced stability and potency of novel growth hormone-releasing factor (GRF) analogues derived from rodent and human GRF sequences, Peptides 15 [3], Seite 489-95.

Chance, W. T. und Fischer, J. E. (1993): Neurotransmitters and food intake, Nutrition 9 [5], Seite 470-1.

Chaouat, G.; Menu, E.; Clark, D. A.; Dy, M.; Minkowski, M. und Wegmann, T. G. (1990): Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy, J Reprod Fertil 89 [2], Seite 447-58.

Chen, C. H.; Stephens, R. L., Jr. und Rogers, R. C. (1997): PYY and NPY: control of gastric motility via action on Y1 and Y2 receptors in the DVC, Neurogastroenterol Motil 9 [2], Seite 109-16.

Civin, C. I.; Banquerigo, M. L.; Strauss, L. C. und Loken, M. R. (1987): Antigenic analysis of hematopoiesis. VI. Flow cytometric characterization of My-10-positive progenitor cells in normal human bone marrow, Exp Hematol 15 [1], Seite 10-7.

Civin, C. I.; Trischmann, T.; Kadan, N. S.; Davis, J.; Noga, S.; Cohen, K.; Duffy, B.; Groenewegen, I.; Wiley, J.; Law, P.; Hardwick, A.; Oldham, F. und Gee, A. (1996): Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis, J Clin Oncol 14 [8], Seite 2224-33.

Clark, D. A.; Chaouat, G.; Arck, P. C.; Mittruecker, H. W. und Levy, G. A. (1998): Cytokine-dependent abortion in CBA x DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fgl2 prothrombinase, J Immunol 160 [2], Seite 545-9.

Cote, R. J.; Peterson, H. F.; Chaiwun, B.; Gelber, R. D.; Goldhirsch, A.; Castiglione-Gertsch, M.; Gusterson, B. und Neville, A. M. (1999): Role of immunohistochemical detection of lymph-node metastases in management of breast cancer: International Breast Cancer Study Group, Lancet 354 [9182], Seite 896-900.

Cote, R.J.; Rosen, P.P.; Lesser, M.L..; Old, L.J. und Osborne, M.P. (1991): Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases, J Clin Oncol 9, Seite 1749-56.

Dang, N. H.; Torimoto, Y.; Shimamura, K.; Tanaka, T.; Daley, J. F.; Schlossman, S. F. und Morimoto, C. (1991): 1F7 (CD26): a marker of thymic maturation involved in the differential regulation of the CD3 and CD2 pathways of human thymocyte activation, J Immunol 147 [9], Seite 2825-32.

Dao, M.A. und Nolta, J.A. (2000): CD34: to select or not to select? That is the question, Leukemia 14 [5], Seite 773-776.

Darmoul, D.; Lacasa, M.; Baricault, L.; Marguet, D.; Sapin, C.; Trotot, P.; Barbat, A. und Trugnan, G. (1992): Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) gene expression in enterocyte-like colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2. Cloning of the complete human coding sequence and changes of dipeptidyl peptidase IV mRNA levels during cell differentiation, J Biol Chem 267 [7], Seite 4824-33.

Darmoul, D.; Voisin, T.; Couvineau, A.; Rouyer Fessard, C.; Salomon, R.; Wang, Y.; Swallow, D. M. und Laburthe, M. (1994): Regional expression of epithelial dipeptidyl peptidase IV in the human intestines, Biochem Biophys Res Commun 203 [2], Seite 1224-9.

De Meester, I.; Korom, S.; Van Damme, J. und Scharpe, S. (1999): CD26, let it cut or cut it down, Immunol Today 20 [8], Seite 367-75.

Deacon, C. F.; Hughes, T. E. und Holst, J. J. (1998): Dipeptidyl peptidase IV inhibition potentiates the insulinotropic effect of glucagon-like peptide 1 in the anesthetized pig, Diabetes 47 [5], Seite 764-9.

Decaens, C.; Rodriguez, P.; Bouchaud, C. und Cassio, D. (1996): Establishment of hepatic cell polarity in the rat hepatoma-human fibroblast hybrid WIF-B9. A biphasic phenomenon going from a simple epithelial polarized phenotype to an hepatic polarized one, J Cell Sci 109 [6], Seite 1623-1635.

Deisseroth, A. B.; Zu, Z.; Claxton, D.; Hanania, E. G.; Ellerson, D.; Goldberg, L.; Thomas, M.; Janicek, K.; Anderson, W. F.; Hester, J.; Körbling, M.; Durett, A.; Moen, R.; Berenson, R.; Heimfeld, S.; Hamer, J.; Calvert, L.; Tibbits, P.; Talpaz, M.; Kantarjian, H.; Champlin, R. und Reading, C. (1994): Genetic marking shows that Ph+ cells present in autologous transplants of chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse, Blood 83, Seite 3068.

Diel, I.J.; Kaufmann, M.; Costa, S.S.; Holle, R.; von Minckwitz, G. und Solomayer, E.F. (1996): Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status, J Natl Cancer Inst 88, Seite 1652-8.

DiGiusto, D.; Chen, S.; Combs, J.; Webb, S.; Namikawa, R.; Tsukamoto, A.; Chen, B. P. und Galy, A. H. (1994): Human fetal bone marrow early progenitors for T, B, and myeloid cells are found exclusively in the population expressing high levels of CD34, Blood 84 [2], Seite 421-32.

Dong, R.P. und Morimoto, C. (1996): Role of CD26 for CD4 memory T cell function and activation, Hum Cell 9 [3], Seite 153-162.

Durum, S. K.; Schmidt, J. A. und Oppenheim, J. J. (1985): Interleukin 1: an immunological perspective, Annu Rev Immunol 3, Seite 263-87.

Elovson, J. (1980): Biogenesis of plasma membrane glycoproteins. Tracer kinetic study of two rat liver plasma membrane glycoproteins in vivo, J Biol Chem 255 [12], Seite 5816-5825.

Ema, H.; Takano, H.; Sudo, K. und Nakauchi, H. (2000): In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells, J Exp Med 192 [9], Seite 1281-1288.

Erlanson Albertsson, C. und Larsson, A. (1988): The activation peptide of pancreatic procolipase decreases food intake in rats, Regul Pept 22 [4], Seite 325-31.

Fan, Y.; Einhorn, L.; Saxman, S.; Katz, B.; Abonour, R. und Cornetta, K. (1998): Detection of germ cell tumor cells in apheresis products using polymerase chain reaction, Clin Cancer Res 4 [1], Seite 93-8.

Faucher, C.; le Corroller, A. G. und Blaise, D. (1994): Comparison of G-CSF-primed peripheral blood progenitor cells and bone marrow auto transplantation: clinical assessment and cost-effectiveness, Bone Marrow Transplant 14, Seite 895-901.

Fina, L.; Molgaard, H. V.; Robertson, D.; Bradley, N. J.; Monaghan, P.; Delia, D.; Sutherland, D. R.; Baker, M. A. und Greaves, M. F. (1990): Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells, Blood 75 [12], Seite 2417-02426.

Fleischer, B. (1994): CD26 - a surface protease involved in T-cell activation., Immunol Today 15 [4], Seite 180-184.

Franco, R.; Valenzuela, A.; Lluis, C. und Blanco, J. (1998): Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes, Immunol Rev 161, Seite 27-42.

Franklin, W. A.; Shpall, E. J.; Archer, P.; Johnston, C. S.; Garza Williams, S.; Hami, L.; Bitter, M. A.; Bast, R. C. und Jones, R. B. (1996): Immunocytochemical detection of breast cancer cells in marrow and peripheral blood of patients undergoing high dose chemotherapy with autologous stem cell support, Breast Cancer Res Treat 41 [1], Seite 1-13.

Fritsch, G.; Buchinger, P.; Printz, D.; Fink, F. M.; Mann, G.; Peters, C.; Wagner, T.; Adler, A. und Gadner, H. (1993): Rapid discrimination of early CD34+ myeloid progenitors using CD45-RA analysis, Blood 81 [9], Seite 2301-9.

Giere, R.N. (1988): Explaining science: a cognitive approach, The University of Chicago Press, Chicago, ISBN: 0-226-29206-1.

Gonzalez Gronow, M. und Weber, M.R. (1998): Dipeptidyl peptidase IV (CD26) is a receptor for streptokinase on rheumatoid synovial fibroblasts, Fibrinolysis Proteolysis 12 [3], Seite 129-135.

Good, R. A.; Gatti, R. A.; Hong, R. und Meuwissen, H. J. (1969): Graft tratment of immunological deficiency, Lancet 1 [7606], Seite 1162.

Gotoh, H.; Hagihara, M.; Nagatsu, T.; Iwata, H. und Miura, T. (1989): Activities of dipeptidyl peptidase II and dipeptidyl peptidase IV in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis, Clin Chem 35 [6], Seite 1016-1018.

Grandt, D.; Dahms, P.; Schimiczek, M.; Eysselein, V. E.; Reeve, J. R., Jr. und Mentlein, R. (1993): Proteolytic processing by dipeptidyl aminopeptidase IV generates receptor selectivity for peptide YY (PYY), Med Klin 88 [3], Seite 143-5.

Gribben, J. G.; Freedman, A. S.; Neuberg, D.; Roy, D. C.; Blake, K. W.; Woo, S. D.; Grossbard, M. L.; Rabinowe, S. N.; Coral, F.; Freeman, G. J. und et al. (1991): Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma, N Engl J Med 325 [22], Seite 1525-33.

Habermas, J. (1981): Theorie kommunikativen Handelns, Suhrkamp, Frankfurt/M.

Hagihara, M.; Fujiwara, M. und Nagatsu, T. (1989): Activities of dipeptidyl peptidases in BXSB mice and MRL/lpr mice with lupus erythematosus-like syndrome, Biochem Med Metab Biol 42 [3], Seite 224-31.

Hansen, G. H.; Niels Christiansen, L. L.; Poulsen, M. D.; Noren, O. und Sjostrom, H. (1994): Distribution of three microvillar enzymes along the small intestinal crypt-villus axis, J Submicrosc Cytol Pathol 26 [4], Seite 453-60.

Hanski, C.; Huhle, T.; Gossrau, R. und Reutter, W. (1988): Direct evidence for the binding of rat liver DPP IV to collagen in vitro, Exp Cell Res 178, Seite 64-72.

Hanski, C.; Huhle, T. und Reutter, W. (1985): Involvement of plasma membrane dipeptidyl peptidase IV in fibronectin-mediated adhesion of cells on collagen, Biol Chem Hoppe Seyler 366 [12], Seite 1169-76.

Hartel Schenk, S.; Loch, N.; Zimmermann, M. und Reutter, W. (1991): Development of monoclonal antibodies against different protein and carbohydrate epitopes of dipeptidyl peptidase IV from rat liver plasma membranes, Eur J Biochem 196 [2], Seite 349-55.

Heymann, E.; Mentlein, R.; Nausch, J.; Erlanson-Albertson, C.; Yoshimoto, T. und Feller, A.C. (1986): Processing of procolipase and trypsinogen by pancreatic dipeptidyl peptidase IV, Biomed Biochim Acta 45, Seite 575-584.

Hildebrandt, M. (1994): Untersuchungen zur Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) im Verlauf der Differenzierung und Entdifferenzierung verschiedener Organe der Ratte, Fachbereich Grundlagenmedizin, Freie Universität Berlin, Berlin.

Hildebrandt, M.; Arck, P.; Kruber, S.; Demuth, H.-U.; Reutter, W. und Klapp, B. F. (2001): Inhibition of Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV, CD26) Activity Abrogates Stress-Induced, Cytokine-Mediated Murine Abortions, Scand J Immunol 53 [5], Seite 449-54.

Hildebrandt, M.; Bläser, F.; Beyer, J.; Siegert, W.; Mapara, M.; Huhn, D. und Salama, A. (1998): Detection of tumor cells in peripheral blood samples from patients with germ cell tumors using immunocytochemical and reverse transcriptase-polymerase chain reaction techniques, Bone Marrow Transplant 22, Seite 771-775.

Hildebrandt, M. und Mapara, M.Y. (1997): Verfahren zum Nachweis von kontaminierendem Karzinomzellen mittels Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR), Deutsches Patentamt, Germany, Max Delbrück Centrum für Molekulare Medizin

Hildebrandt, M.; Mapara, M.Y.; Körner, I.J.; Bargou, R.C.; Moldenhauer, G. und Dörken, B. (1997): Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)-controlled immunomagnetic purging of breast cancer cells using the magnetic cell separation (MACS) system: a sensitive method for monitoring purging efficiency., Exp Hematol 25, Seite 57-65.

Hildebrandt, M.; Reutter, W.; Arck, P.; Rose, M. und Klapp, B. F. (2000): A guardian angel: the involvement of dipeptidyl peptidase IV in psychoneuroendocrine function, nutrition and immune defence, Clin Sci (Colch) 99 [2], Seite 93-104.

Hildebrandt, M.; Reutter, W. und Gitlin, J. D. (1991): Tissue-specific regulation of dipeptidyl peptidase IV expression during development, Biochem J 277 [Pt 2], Seite 331-4.

Hildebrandt, M.; Rick, O.; Salama, A.; Siegert, W.; Huhn, D. und Beyer, J. (2000): Detection of germ-cell tumor cells in peripheral blood progenitor cell harvests: impact on clinical outcome, Clin Cancer Res 6 [12], Seite 4641-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11156214

Hildebrandt, M.; Rose, M.; Mayr, C.; Schüler, C.; Reutter, W.; Salama, A. und Klapp, B.F. (1999): Alterations in expression and in serum activity of Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV, CD26) in Patients with hyporectic eating disorders, Scand J Immunol 50 [5], Seite 536-541.

Hildebrandt, M.; Rose, M.; Mönnikes, H.; Reutter, W.; Keller, W. und Klapp, B.F. (2001): A role for Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) in nutritional control, Nutrition 17 [6], Seite 451-4.

Hildebrandt, M.; Rose, M.; Rüter, J.; Salama, A.; Mönnikes, H. und Klapp, B.F. (2001): Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) in patients with Inflammatory Bowel Disease, Scand J Gastroenterol 36 [12], Seite 1067-72.

Hildebrandt, M.; Serke, S.; Meyer, O.; Ebell, W. und Salama, A. (2000): Immunomagnetic selection of CD34+ cells: factors influencing component purity and yield, Transfusion 40 [5], Seite 507-12.

Holst, J. J. und Deacon, C. F. (1998): Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes, Diabetes 47 [11], Seite 1663-70.

Hopsu-Havu, V.K. und Glenner, G.G. (1966): A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-ß-naphthylamide, Histochemie 7, Seite 197-200.

Huss, R.; Gatsios, P.; Graeve, L.; Lange, C.; Eissner, G.; Kolb, H. J.; Thalmeier, K. und Heinrich, P. C. (2000): Quiescence of CD34-negative haematopoietic stem cells is mediated by downregulation of Cyclin B and no stat activation, Cytokine 12 [8], Seite 1195-204.

Husserl, E. (1996): Die Krisis der europäischen Wissenschaften und die transzendentale Phänomenologie: eine Einleitung in die phänomenologische Philosophie, Ströker, E., Meiner, Hamburg.

Imai, K.; Maeda, M.; Fujiwara, H.; Kariya, M.; Takakura, K.; Kanzaki, H. und Mori, T. (1992): Dipeptidyl peptidase IV as a differentiation marker of the human endometrial glandular cells, Hum Reprod 7 [9], Seite 1189-94.

Iwaki Egawa, S.; Watanabe, Y.; Kikuya, Y. und Fujimoto, Y. (1998): Dipeptidyl peptidase IV from human serum: Purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence, J Biochem 124 [2], Seite 428-433.

Izbicki, J.R.; Hosch, S.B.; Pichlmeier, U.; Rehders, A.; Busch, C.; Niendorf, A.; Passlick, B.; Broelsch, C.E. und Pantel, K. (1997): Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer, N Engl J Med 337 [17], Seite 1188-1194.

Jacobson, L.O. (1952): Evidence for a humoral factor (or factors) concerned in recovery from radiation injury: a review, Cancer Res 12 [315-325].

Jacobson, L.O.; Simmons, E.L.; Marks, E.K. und Eldredge, J.H. (1951): Recovery from radiation injury, Science 113, Seite 510-511.

Jacotot, E.; Callebaut, C.; Blanco, J.; Riviere, Y.; Krust, B. und Hovanessian, A. G. (1996): HIV envelope glycoprotein-induced cell killing by apoptosis is enhanced with increased expression of CD26 in CD4+ T cells, Virology 223 [2], Seite 318-30.

Janssen, W. E.; Perkin, J. und Hiemenz, J. W. (1994): Granulocyte recovery is not different following auto-transplant with G-CDF primed bone marrow or G-CSF mobilized peripheral blood stem cells, Blood 84 [Suppl.], Seite 367A.

Juillerat Jeanneret, L.; Aubert, J. D. 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 [6], Seite 603-14.

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, Int J Mol Med 4 [1], Seite 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 [1-2], Seite 189-193.

Kamori, M.; Hagihara, M.; Nagatsu, T.; Iwata, H. und Miura, T. (1991): Activities of dipeptidyl peptidase II, dipeptidyl peptidase IV, prolyl endopeptidase, and collagenase-like peptidase in synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis, Biochem Med Metab Biol 45 [2], Seite 154-60.

Kaplan, E.L. und Meier, P. (1958): Non-parametric estimation from incomplete observations, J Am Stat Assoc 53, Seite 457-481.

Karydis, I. und Tolis, G. (1998): Orexis, anorexia, and thyrotropin-releasing hormone, Thyroid 8 [10], Seite 947-50.

Kennett, C. N.; Cox, S. W. und Eley, B. M. (1996): Histochemical and immunocytochemical localization of dipeptidyl peptidases II and IV in human gingiva, J Periodontol 67 [9], Seite 846-52.

Kieffer, T. J.; McIntosh, C. H. und Pederson, R. A. (1995): Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV, Endocrinology 136 [8], Seite 3585-96.

Korom, S.; De Meester, I.; Stadlbauer, T. H.; Chandraker, A.; Schaub, M.; Sayegh, M. H.; Belyaev, A.; Haemers, A.; Scharpe, S. und Kupiec Weglinski, J. W. (1997): Inhibition of CD26/dipeptidyl peptidase IV activity in vivo prolongs cardiac allograft survival in rat recipients, Transplantation 63 [10], Seite 1495-500.

Kozakova, H.; Stepankova, R.; Kolinska, J.; Farre, M. A.; Funda, D. P.; Tuckova, L. und Tlaskalova Hogenova, H. (1998): Brush border enzyme activities in the small intestine after long-term gliadin feeding in animal models of human coeliac disease, Folia Microbiol Praha 43 [5], Seite 497-500.

Krause, D. S.; Fackler, M. J.; Civin, C. I. und May, W. S. (1996): CD34: structure, biology, and clinical utility, Blood 87 [1], Seite 1-13.

Kreisel, W.; Hildebrandt, H.; Mossner, W.; Tauber, R. und Reutter, W. (1993): Oligosaccharide reprocessing and recycling of a cell surface glycoprotein in cultured rat hepatocytes, Biol Chem Hoppe Seyler 374 [4], Seite 255-63.

Kreisel, W.; Reutter, W. und Gerok, W. (1984): Modification of the intramolecular turnover of terminal carbohydrates of dipeptidylaminopeptidase IV isolated from rat-liver plasma membrane during liver regeneration, Eur J Biochem 138 [3], Seite 435-8.

Krishnan, L.; Guilbert, L. J.; Wegmann, T. G.; Belosevic, M. und Mosmann, T. R. (1996): T helper 1 response against Leishmania major in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. Correlation with increased IFN-gamma and TNF and reduced IL-10 production by placental cells, J Immunol 156 [2], Seite 653-62.

Laouar, A.; Wietzerbin, J. und Bauvois, B. (1993): Divergent regulation of cell surface protease expression in HL-60 cells differentiated into macrophages with granulocyte macrophage colony stimulating factor or neutrophils with retinoic acid, Int Immunol 5 [8], Seite 965-73.

Limpens, J.; de Jong, D.; van Krieken, J. H.; Price, C. G.; Young, B. D.; van Ommen, G. J. und Kluin, P. M. (1991): Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia, Oncogene 6 [12], Seite 2271-6.

Lin, H.; Mosmann, T. R.; Guilbert, L.; Tuntipopipat, S. und Wegmann, T. G. (1993): Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface, J Immunol 151 [9], Seite 4562-73.

Lin, L.; Umahara, M.; York, D. A. und Bray, G. A. (1998): Beta-casomorphins stimulate and enterostatin inhibits the intake of dietary fat in rats, Peptides 19 [2], Seite 325-31.

Maes, M.; De Meester, I.; Scharpe, S.; Desnyder, R.; Ranjan, R. und Meltzer, H. Y. (1996): Alterations in plasma dipeptidyl peptidase IV enzyme activity in depression and schizophrenia: effects of antidepressants and antipsychotic drugs, Acta Psychiatr Scand 93 [1], Seite 1-8.

Maes, M.; De Meester, I.; Vanhoof, G.; Scharpe, S.; Bosmans, E.; Vandervorst, C.; Verkerk, R.; Minner, B.; Suy, E. und Raus, J. (1991): Decreased serum dipeptidyl peptidase IV activity in major depression, Biol Psychiatry 30 [6], Seite 577-86.

Maes, M.; Lambrechts, J.; Bosmans, E.; Jacobs, J.; Suy, E.; Vandervorst, C.; de Jonckheere, C.; Minner, B. und Raus, J. (1992): Evidence for a systemic immune activation during depression: results of leukocyte enumeration by flow cytometry in conjunction with monoclonal antibody staining, Psychol Med 22 [1], Seite 45-53.

Maes, M.; Vandoolaeghe, E.; Ranjan, R.; Bosmans, E.; Van Gastel, A.; Bergmans, R. und Desnyder, R. (1996): Increased serum soluble CD8 or suppressor/cytotoxic antigen concentrations in depression: suppressive effects of glucocorticoids, Biol Psychiatry 40 [12], Seite 1273-81.

Mansi, J.L.; Berger, U.; Easton, D.; McDonnell, T.; Redding, W.H.; Gazet, J.C.; McKinna, A.; Powles, T.J. und Coombes, R.C. (1987): Micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer: evaluation as an early predictor of bone metastases, Br Med J (Clin Res Ed) 295, Seite 1093-6.

Mapara, M. Y.; Korner, I. J.; Hildebrandt, M.; Bargou, R.; Krahl, D.; Reichardt, P. und Dorken, B. (1997): Monitoring of tumor cell purging after highly efficient immunomagnetic selection of CD34 cells from leukapheresis products in breast cancer patients: comparison of immunocytochemical tumor cell staining and reverse transcriptase-polymerase chain reaction, Blood 89 [1], Seite 337-44.

Mapara, M.Y.; Körner, I.J.; Lentzsch, S.; Hildebrandt, M. und Dörken, B. (1999): Combined Positive/Negative Selection in Stem Cell Transplantation: Perspectives in Graft Engineering, Infusionsther Transfusionsmed 26 [3], Seite 140-145.

Marguet, D.; Bernard, A. M.; Vivier, I.; Darmoul, D.; Naquet, P. und Pierres, M. (1992): cDNA cloning for mouse thymocyte-activating molecule. A multifunctional ecto-dipeptidyl peptidase IV (CD26) included in a subgroup of serine proteases, J Biol Chem 267 [4], Seite 2200-2208.

Markert, U. R.; Arck, P. C.; McBey, B. A.; Manuel, J.; Croy, B. A.; Marshall, J. S.; Chaouat, G. und Clark, D. A. (1997): Stress triggered abortions are associated with alterations of granulated cells into the decidua, Am J Reprod Immunol 37 [1], Seite 94-100.

Masuyama, J.; Berman, J.S.; Cruikshank, W.W.; Morimoto, C. und Center, D.M. (1992): Evidence for recent as well as long term activation of T cells migrating through endothelial cell monolayers in vitro, J Immunol 148 [5], Seite 1367-74.

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 CD26(hi) T cells after tight adhesion to human umbilical vein endothelial cell monolayers, J Exp Med 189 [6], Seite 979-90.

Mentlein, R. (1999): Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides, Regul Pept 85 [1], Seite 9-24.

Mentlein, R.; Gallwitz, B. und Schmidt, W.E. (1993): Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum, Eur J Biochem 214 [3], Seite 829-35.

Mentlein, R. und Roos, T. (1996): Proteases involved in the metabolism of angiotensin II, bradykinin, calcitonin gene-related peptide (CGRP), and neuropeptide Y by vascular smooth muscle cells, Peptides 17 [4], Seite 709-20.

Mizokami, A.; Eguchi, K.; Kawakami, A.; Ida, H.; Kawabe, Y.; Tsukada, T.; Aoyagi, T.; Maeda, K.; Morimoto, C. und Nagataki, S. (1996): Increased population of high fluorescence 1F7 (CD26) antigen on T cells in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, J Rheumatol 23 [12], Seite 2022-26.

Morimoto, C.; Lord, C. I.; Zhang, C.; Duke Cohan, J. S.; Letvin, N. L. und Schlossman, S. F. (1994): Role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in human immunodeficiency virus type 1 infection and apoptosis, Proc Natl Acad Sci U S A 91 [21], Seite 9960-4.

Morimoto, C. und Schlossman, S. F. (1998): The structure and function of CD26 in the T-cell immune response, Immunol Rev 161, Seite 55-70.

Mrazkova, O.; Grim, M. und Carlson, B. M. (1986): Enzymatic heterogeneity of the capillary bed of rat skeletal muscles, Am J Anat 177 [2], Seite 141-8.

Murray, L.; Chen, B.; Galy, A.; Chen, S.; Tushinski, R.; Uchida, N.; Negrin, R.; Tricot, G.; Jagannath, S.; Vesole, D. und et al. (1995): Enrichment of human hematopoietic stem cell activity in the CD34+Thy-1+Lin- subpopulation from mobilized peripheral blood, Blood 85 [2], Seite 368-78.

Muscat, C.; Bertotto, A.; Agea, E.; Bistoni, O.; Ercolani, R.; Tognellini, R.; Spinozzi, F.; Cesarotti, M. und Gerli, R. (1994): Expression and functional role of 1F7 (CD26) antigen on peripheral blood and synovial fluid T cells in rheumatoid arthritis patients, Clin Exp Immunol 98 [2], Seite 252-6.

Myers, R. D. (1994): Neuroactive peptides: unique phases in research on mammalian brain over three decades, Peptides 15 [2], Seite 367-81.

Nausch, I.; Mentlein, R. und Heymann, E. (1990): The degradation of bioactive peptides and proteins by dipeptidyl peptidase IV from human placenta, Biol Chem Hoppe Seyler 371 [11], Seite 1113-8.

Newby, J.C.; A'Hern, R.P.; Leek, R.D.; Smith, I.E.; Harris, A.L. und Dowsett, M. (1995): Immunohistochemical assay for epidermal growth factor receptor on paraffin-embedded sections: validation against ligand-binding assay and clinical relevance in breast cancer, Br J Cancer 71 [6], Seite 1237-1242.

Nichol, K.A.; Morey, A.; Couzens, M.H.; Shine, J.; Herzog, H. und Cunningham, A.M. (1999): Conservation of expression of neuropeptide Y5 receptor between human and rat hypothalamus and limbic

regions suggests an integral role in central neuroendocrine control, J Neurosci 19 [23], Seite 10295-304.

Nielsen, O.H.; Vainer, B.; Madsen, S.M.; Seidelin, J.B. und Heegaard, N.H. (2000): Established and emerging biological activity markers of inflammatory bowel disease, Am J Gastroenterol 95 [2], Seite 359-67.

Nitsche, A.; Steuer, N..; Schmidt, C.A.; Landt, O.. und Siegert, W. (1999): Different Real-Time PCR Formats Compared for the Quantitative Detection of Human Cytomegalovirus DNA, Clin Chem 45 [11], Seite 1932-1937.

Olweus, J.; Thompson, P. A. und Lund-Johansen, F. (1996): Granulocytic and monocytic differentiation of CD34hi cells is associated with distinct changes in the expression of the PU.1-regulated molecules, CD64 and macrophage colony-stimulating factor receptor, Blood 88 [10], Seite 3741-54.

Oravecz, T.; Pall, M.; Roderiquez, G.; Gorrell, M. D.; Ditto, M.; Nguyen, N. Y.; Boykins, R.; Unsworth, E. und Norcross, M. A. (1997): Regulation of the receptor specificity and function of the chemokine RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) by dipeptidyl peptidase IV (CD26)-mediated cleavage, J Exp Med 186 [11], Seite 1865-72.

Pantel, K.; Cote, R. J. und Fodstad, O. (1999): Detection and clinical importance of micrometastatic disease, J Natl Cancer Inst 91 [13], Seite 1113-24.

Pauly, R. P.; Rosche, F.; Wermann, M.; McIntosh, C. H.; Pederson, R. A. und Demuth, H. U. (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 [38], Seite 23222-9.

Pederson, R. A.; White, H. A.; Schlenzig, D.; Pauly, R. P.; McIntosh, C. H. und Demuth, H. U. (1998): Improved glucose tolerance in Zucker fatty rats by oral administration of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor isoleucine thiazolidide, Diabetes 47 [8], Seite 1253-8.

Pesquero, J. B.; Jubilut, G. N.; Lindsey, C. J. und Paiva, A. C. (1992): Bradykinin metabolism pathway in the rat pulmonary circulation, J Hypertens 10 [12], Seite 1471-8.

Peters, W. P.; Rosner, G. und Ross, M. (1993): Comparative effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on priming peripheral blood progenitor cells for use with autologous bone marrow after high-dose chemotherapy, Blood 81, Seite 1709-1719.

Pettengell, R.; Morgenstern, G. R. und Woll, P. J. (1993): Peripheral blood progenitor cell transplantation in lymphoma and leukemia using single apheresis., Blood 82, Seite 3770-3777.

Piazza, G. A.; Callanan, H. M.; Mowery, J. und Hixson, D. C. (1989): Evidence for a role of dipeptidyl peptidase IV in fibronectin-mediated interactions of hepatocytes with extracellular matrix, Biochem J 262 [1], Seite 327-34.

Plana, M.; Vinas, O.; De la Calle Martin, O.; Lozano, F.; Ingles Esteve, J.; Romero, M.; Alberola Ila, J.; Yague, J.; Vilella, R. und Vives, J. (1991): Induction of interleukin 2 (IL 2) and interferon-gamma and enhancement of IL 2 receptor expression by a CD26 monoclonal antibody, Eur J Immunol 21 [4], Seite 1085-8.

Putz, E.; Witter, K.; Offner, S.; Stosiek, P.; Zippelius, A. und Johnson, J. (1999): Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases, Cancer Res 85, Seite 1419-1424.

Recktenwald, D.J. und Waller, E.K. (1996): Flow Cytometric Analysis, Morsty G und Sheridan W, Cell Therapy Stem Cell Transplantation, Gene Therapy and Cellular Immunotherapy Seite 75, Cambridge University Press, New York, NY.

Reinhold, D.; Bank, U.; Buhling, F.; Lendeckel, U.; Faust, J.; Neubert, K. und Ansorge, S. (1997): Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor-beta 1 in PWM-stimulated PBMC and T cells, Immunology 91 [3], Seite 354-60.

Reinhold, D.; Kahne, T.; Tager, M.; Lendeckel, U.; Buhling, F.; Bank, U.; Wrenger, S.; Faust, J.; Neubert, K. und Ansorge, S. (1997): The effect of anti-CD26 antibodies on DNA synthesis and cytokine production (IL-2, IL-10 and IFN-gamma) depends on enzymatic activity of DP IV/CD26, Adv Exp Med Biol 421, Seite 149-55.

Rill, D. R.; Santana, V. M.; Roberts, W. M.; Nilson, T.; Bowman, L. C.; Krance, R. A.; Heslop, H. E.; Moen, R. C.; Ihle, J. N. und Brenner, M. K. (1994): Direct demonstration that autologous bone marrow transplantation for solid tumors can return a multiplicity of tumorigenic cells, Blood 84 [2], Seite 380-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8025266

Ross, A.A.; Cooper, B.W.; Lazarus, B.M.; Mackay, W.; Moss, T.J.; Ciobanu, N.; Tallman, M.S.; Kennedy, M.J.; Davidson, N.E. und Sweet, D. (1993): Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques, Blood 82 [9], Seite 2605-2610.

Ruiz, P.; Hao, L.; Zucker, K.; Zacharievich, N.; Viciana, A. L.; Shenkin, M. und Miller, J. (1997): Dipeptidyl peptidase IV (CD26) activity in human alloreactive T cell subsets varies with the stage of differentiation and activation status, Transpl Immunol 5 [2], Seite 152-61.

Ruud, P.; Fodstad, O. und Hovig, E. (1999): Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells., Int J Cancer 80, Seite 119-125.

Satomura, K.; Derubeis, A. R.; Fedarko, N. S.; Ibaraki-O'Connor, K.; Kuznetsov, S. A.; Rowe, D. W.; Young, M. F. und Robey, P. G. (1998): Receptor Tyrosine Kinase Expression in Human Bone Marrow Stromal Cells, J Cell Physiol 177, Seite 426-438.

Schär, B. K.; Otto, V. I. und Hanseler, E. (1997): Simultaneous detection of all four alkaline phosphatase isoenzymes in human germ cell tumors using reverse transcription-PCR, Cancer Res 57 [17], Seite 3841-6.

Scheunemann, P.; Izbicki, J.R. und Pantel, K. (1999): Tumorigenic potential of apparently tumor-free lymph nodes, N Engl J Med 340, Seite 1687.

Schmitz, T.; Underwood, R.; Khiroya, R.; Bachovchin, W. W. und Huber, B. T. (1996): Potentiation of the immune response in HIV-1+ individuals, J Clin Invest 97 [6], Seite 1545-9.

Serke, S.; Beyer, J.; Rick, O.; Schwella, N.; Meyer, O.; Hildebrandt, M. und Huhn, D. (1998): Analysis of CD34-expressing cells in clinical practice, Vox Sang 74 Suppl 2, Seite 469-75.

Simon, B.; Podolsky, D.K.; Moldenhauer, G.; Isselbacher, K.J.; Gattoni-Celli, S. und Brand, S.J. (1990): Epithelial glycoprotein is a member of a family of epithelial cell surface antigens homologous to nidogen, a matrix adhesion protein, Proc Natl Acad Sci U S A 87 [7], Seite 2755-2759.

Stancikova, M.; Lojda, Z.; Lukac, J. und Ruzickova, M. (1992): Dipeptidyl peptidase IV in patients with systemic lupus erythematosus, Clin Exp Rheumatol 10 [4], Seite 381-5.

Steeg, C.; Hartwig, U. und Fleischer, B. (1995): Unchanged signaling capacity of mutant CD26/dipeptidylpeptidase IV molecules devoid of enzymatic activity, Cell Immunol 164 [2], Seite 311-5.

Strober, W.; Fuss, I.J.; Ehrhardt, R.O.; Neurath, M.; Boirivant, M. und Ludviksson, B.R. (1998): Mucosal immunoregulation and inflammatory bowel disease: new insights from murine models of inflammation, Scand J Immunol 48 [5], Seite 453-8.

Struyf, S.; Proost, P.; Schols, D.; De Clercq, E.; Opdenakker, G.; Lenaerts, J. P.; Detheux, M.; Parmentier, M.; De Meester, I.; Scharpe, S. und Van Damme, J. (1999): CD26/dipeptidyl-peptidase IV down-regulates the eosinophil chemotactic potency, but not the anti-HIV activity of human eotaxin by affecting its interaction with CC chemokine receptor 3, J Immunol 162 [8], Seite 4903-9.

Suzuki, Y.; Erickson, R. H.; Sedlmayer, A.; Chang, S. K.; Ikehara, Y. und Kim, Y. S. (1993): Dietary regulation of rat intestinal angiotensin-converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV, Am J Physiol 264 [6 Pt 1], Seite G1153-9.

Tanaka, S.; Murakami, T.; Horikawa, H.; Sugiura, M.; Kawashima, K. und Sugita, T. (1997): Suppression of arthritis by the inhibitors of dipeptidyl peptidase IV, Int J Immunopharmacol 19 [1], Seite 15-24.

Tanaka, S.; Murakami, T.; Nonaka, N.; Ohnuki, T.; Yamada, M. und Sugita, T. (1998): Anti-arthritic effects of the novel dipeptidyl peptidase IV inhibitors TMC-2A and TSL-225, Immunopharmacology 40 [1], Seite 21-6.

Tanaka, T.; Duke Cohan, J. S.; Kameoka, J.; Yaron, A.; Lee, I.; Schlossman, S. F. und Morimoto, C. (1994): Enhancement of antigen-induced T-cell proliferation by soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV, Proc Natl Acad Sci U S A 91 [8], Seite 3082-6.

Tanaka, T.; Kameoka, J.; Yaron, A.; Schlossman, S. F. und Morimoto, C. (1993): The costimulatory activity of the CD26 antigen requires dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity, Proc Natl Acad Sci U S A 90 [10], Seite 4586-90.

Tiruppathi, C.; Miyamoto, Y.; Ganapathy, V. und Leibach, F. H. (1993): Genetic evidence for role of DPP IV in intestinal hydrolysis and assimilation of prolyl peptides, Am J Physiol 265 [1 Pt 1], Seite G81-9.

Uematsu, T.; Urade, M.; Yamaoka, M. und Yoshioka, W. (1996): Reduced expression of dipeptidyl peptidase (DPP) IV in peripheral blood T lymphocytes of oral cancer patients, J Oral Pathol Med 25 [9], Seite 507-12.

Vanham, G.; Kestens, L.; De Meester, I.; Vingerhoets, J.; Penne, G.; Vanhoof, G.; Scharpe, S.; Heyligen, H.; Bosmans, E.; Ceuppens, J. L. und et al. (1993): Decreased expression of the memory marker CD26 on both CD4+ and CD8+ T lymphocytes of HIV-infected subjects, J Acquir Immune Defic Syndr 6 [7], Seite 749-57.

von Bonin, A.; Huhn, J. und Fleischer, B. (1998): Dipeptidyl-peptidase IV/CD26 on T cells: analysis of an alternative T-cell activation pathway, Immunol Rev 161 [Feb], Seite 43-53.

von Bonin, A.; Steeg, C.; Mittrucker, H. W. und Fleischer, B. (1997): The T-cell receptor associated zeta-chain is required but not sufficient for CD26 (dipeptidylpeptidase IV) mediated signaling, Immunol Lett 55 [3], Seite 179-82.

Walsh, D. A.; Mapp, P. I.; Wharton, J.; Polak, J. M. und Blake, D. R. (1993): Neuropeptide degrading enzymes in normal and inflamed human synovium, Am J Pathol 142 [5], Seite 1610-21.

Willheim, M.; Ebner, C.; Baier, K.; Kern, W.; Schrattbauer, K.; Thien, R.; Kraft, D.; Breiteneder, H.; Reinisch, W. und Scheiner, O. (1997): Cell surface characterization of T lymphocytes and allergen-specific T cell clones: correlation of CD26 expression with T(H1) subsets, J Allergy Clin Immunol 100 [3], Seite 348-55.

Wilson, M. J.; Ruhland, A. R.; Pryor, J. L.; Ercole, C.; Sinha, A. A.; Hensleigh, H.; Kaye, K. W.; Dawkins, H. J.; Wasserman, N. F.; Reddy, P. und Ahmed, K. (1998): Prostate specific origin of dipeptidylpeptidase IV (CD-26) in human seminal plasma, J Urol 160 [5], Seite 1905-9.

Xiao, Q.; Boushey, R.P.; Cino, M.; Drucker, D.J. und Brubaker, P.L. (2000): Circulating levels of glucagon-like peptide-2 in human subjects with inflammatory bowel disease, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 278 [4], Seite R1057-63.

Xu, B.; Kalra, P. S.; Moldawer, L. L. und Kalra, S. P. (1998): Increased appetite augments hypothalamic NPY Y1 receptor gene expression: effects of anorexigenic ciliary neurotropic factor, Regul Pept 75-76, Seite 391-5.

Xu, X. und Chong, A. S. (1995): Cross-linking of CD45 on NK cells stimulates p56lck-mediated tyrosine phosphorylation and IFN-gamma production, J Immunol 155 [11], Seite 5241-8.

Yamashita, K.; Tachibana, Y.; Matsuda, Y.; Katunuma, N.; Kochibe, N. und Kobata, A. (1988): Comparative studies of the sugar chains of aminopeptidase N and dipeptidylpeptidase IV purified from rat kidney brush border membrane, Biochemistry 27, Seite 5565-5573.

Yaron, A. und Naider, F. (1993): Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins, Crit Rev Biochem Mol Biol 28 [1], Seite 31-81.

VII. Eigene Publikationen (Auswahl)

1. Hildebrandt, M.; Mapara, M.Y.; Körner, I.J.; Bargou, R.C.; Moldenhauer, G. und Dörken, B. (1997): Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)-controlled immunomagnetic purging of breast cancer cells using the magnetic cell separation (MACS) system: a sensitive method for monitoring purging efficiency., Exp Hematol 25, Seite 57-65. (Seiten 58 bis 66 der Druckversion)

2. Hildebrandt, M.; Bläser, F.; Beyer, J.; Siegert, W.; Mapara, M.; Huhn, D. und Salama, A. (1998): Detection of tumor cells in peripheral blood samples from patients with germ cell tumors using immunocytochemical and reverse transcriptase-polymerase chain reaction techniques, Bone Marrow Transplant 22, Seite 771-775. (Seiten 67 bis 71 der Druckversion)

3. Hildebrandt, M.; Rick, O.; Salama, A.; Siegert, W.; Huhn, D. und Beyer, J. (2000): Detection of germ-cell tumor cells in peripheral blood progenitor cell harvests: impact on clinical outcome, Clin Cancer Res 6 [12], Seite 4641-6. (Seiten 72 bis 77 der Druckversion)

4. Hildebrandt, M.; Serke, S.; Meyer, O.; Ebell, W. und Salama, A. (2000): Immunomagnetic selection of CD34+ cells: factors influencing component purity and yield, Transfusion 40 [5], Seite 507-12. (Seiten 78 bis 83 der Druckversion)

5. Hildebrandt, M.; Reutter, W. und Gitlin, J. D. (1991): Tissue-specific regulation of dipeptidyl peptidase IV expression during development, Biochem J 277 [Pt 2], Seite 331-4. (Seiten 84 bis 88 der Druckversion)

6. Hildebrandt, M.; Rose, M.; Mayr, C.; Schüler, C.; Reutter, W.; Salama, A. und Klapp, B.F. (1999): Alterations in expression and in serum activity of Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV, CD26) in Patients with hyporectic eating disorders, Scand J Immunol 50 [5], Seite 536-541. (Seiten 89 bis 94 der Druckversion)

7. Hildebrandt, M.; Rose, M.; Mönnikes, H.; Reutter, W.; Keller, W. und Klapp, B.F. (2001): A role for Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) in nutritional control, Nutrition 17 [6], Seite 451-4. (Seiten 95 bis 99 der Druckversion)

8. Hildebrandt, M.; Arck, P.; Kruber, S.; Demuth, H.-U.; Reutter, W. und Klapp, B. F. (2001): Inhibition of Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV, CD26) Activity Abrogates Stress-Induced, Cytokine-Mediated Murine Abortions, Scand J Immunol 53 [5], Seite 449-54. (Seiten 100 bis 111 der Druckversion)

9. Hildebrandt, M.; Reutter, W.; Arck, P.; Rose, M. und Klapp, B. F. (2000): A guardian angel: the involvement of dipeptidyl peptidase IV in psychoneuroendocrine function, nutrition and immune defence, Clin Sci (Colch) 99 [2], Seite 93-104. (Seiten 104 bis 115 der Druckversion)

10. Hildebrandt, M.; Rose, M.; Rüter, J.; Salama, A.; Mönnikes, H. und Klapp, B.F. (2001): Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) in patients with Inflammatory Bowel Disease, Scand J Gastroenterol 36 [12], Seite 1067-72. (Seiten 116 bis 121 der Druckversion)

VIII. Danksagung

Ich möchte all jenen danken, die meine bisherige wissenschaftliche Tätigkeit begleitet und gefördert haben. Dies gilt insbesondere für Herrn Prof. W. Reutter, Institut für Molekularbiologie und Biochemie am Fachbereich Humanmedizin der Freien Universität Berlin, der seit meiner Promotionstätigkeit an seinem Institut über berufliche Aspekte hinaus mein Mentor geblieben ist. Ferner gilt dies für Herrn Prof. B. Dörken, Herrn Dr. M. Mapara und Frau Dr. I.-J. Körner, durch deren Hilfe ich meine Kenntnisse der Tumorimmunologie, der Stammzellselektion und –transplantation gewinnen konnte; Herrn Prof. A. Salama, der mich stets mehr als Freund denn als Mitarbeiter behandelt und unterstützt hat; Herrn Prof. D. Huhn, der wissenschaftliches Interesse in für mich vorbildlicher Weise mit Verständnis und menschlicher Wärme für seine Patienten verband, und schließlich Herrn Prof. B. F. Klapp, der mich bei der Habilitationsschrift wie auch zahlreichen anderen Vorhaben unterstützte, mir großzügigen Freiraum für Gestaltung und Durchführung meiner Laboruntersuchungen ließ und mich stets aufs Neue mit unkonventionellen Ideen überraschte.

Mein Dank gilt ferner Herrn Priv.-Doz. Dr. med et phil. G. Danzer, der meine Bemühungen um ein Verständnis wissenschaftlicher Entscheidungsprozesse in angenehmer Diskussion flankierend stützte. Desgleichen danke ich Herrn Dr. G. Schiemann von der philosophischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, der sich nicht zu schade war, sich mit meinen philosophischen Gehversuchen auseinanderzusetzen.

Danken möchte ich allen, wenn auch nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen in Labor und Klinik, die eine erfolgreiche Durchführung der hier dargestellten klinischen und experimentellen Untersuchungen erst möglich machten. Mein Dank gilt auch Herrn Priv.-Doz. H.-U. Demuth und Herrn Dr. T. Hoffmann von ProBioDrug GmbH, Halle/S., für die Begeisterung und das Engagement, das sie in unserer Kooperation und bei zahlreichen Diskussionen an den Tag legten.

Ich danke meinen Eltern, die meine Arbeit, die in dieser Habilitationsschrift mündete, immer mit Anteilnahme und Liebe verfolgt haben. Die Gespräche mit meinem Vater haben wesentlich zu dem Konzept der Habilitationsschrift beigetragen.

Ich danke meiner Frau Angela, die viel Geduld mit mir und meiner Arbeit hatte und mich in der Fertigstellung der Schrift anspornte und unterstützte. Ihr ist diese Habilitationsschrift gewidmet.

Berlin, den 5. Juni 2002