

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
Medizinische Fakultät
an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Hollemann

**Einfluss von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren auf Proteinsynthese und
Proliferation der Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien FTC 133 und 8505C und deren
Expression der Cathepsine B, D und L**

Dissertation

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

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

von: Alexander Plehn
geboren am 04.03.1975 in Halle (Saale)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Cuong Hoang-Vu
2. PD Dr. Thomas Wex (Magdeburg)

15.07.2008

05.11.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000015063

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000015063>]

Meinen Eltern

Referat und bibliographische Beschreibung

Die lysosomalen Proteinase Cathepsin L, B und D sind eng mit den Prozessen der Tumor-Infiltration, -Invasion und -Metastasierung verknüpft. In vielen malignen Tumoren finden sich eine vermehrte Expression und Sekretion dieser Proteasen, welche häufig mit dem Grad der Malignität sowie dem Metastasierungspotential korrelieren.

Inhalt der vorliegenden Arbeit ist es, erstmalig den Einfluss von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (*epidermal growth factor (EGF)*, *Insulin*, *thyroid stimulating hormone (TSH)*, *Phorbol-12-myristat-13-azetat (PMA)*, *Forskolin*) auf Proteinsynthese und Proliferation der differenzierten, niedrig-malignen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie (SDC-ZL) FTC 133 und der hoch-malignen, anaplastischen SDC-ZL 8505C und deren Expression der Cathepsine B, D und L zu untersuchen.

FTC 133 und 8505C wurden über definierte Zeitintervalle mit Wachstumsfaktoren (*TSH*, *EGF* und *Insulin*) sowie spezifischen Aktivatoren von Transduktionswegen (*Forskolin* und *PMA*) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Analyse der Cathepsin L-, B- und D-Expression auf messenger-RNA-Niveau (RT-PCR) sowie auf Proteinebene, die Analyse ihrer intrazellulären Expression und ihrer Sekretion (ELISA, Western Blot, Aktivitäten). Zusätzlich bestimmten wir den Proteingehalt und die Proliferationsrate der Tumorzellen.

Proliferation und Wachstum wiesen in beiden Zelllinien in Abhängigkeit von verschiedenen Transduktionswegen konträre Verhaltensmuster auf. Mittels RT-PCR-Analyse ließ sich die Expression aller drei Cathepsine auf mRNA-Ebene in beiden SDC-ZL bestätigen, jedoch fanden sich weder Zelllinien- noch Faktor-spezifische Differenzen in der mRNA-Expression. Auf Proteinebene hingegen exprimierte 8505C signifikant mehr Cathepsin L, B und D als die niedrig-malignen Zellen der FTC 133. Darüber hinaus konnte der Cathepsin L-, B- und D-Gehalt in 8505C durch alle eingesetzten Faktoren erhöht werden, während sich in FTC 133 lediglich die Cathepsin L-Synthese stimulieren ließ. Die verstärkte Sekretion von Cathepsinen ist ein bekanntes Malignitäts- und Prognosekriterium zahlreicher Tumoren. Analog hierzu weist die anaplastische Zelllinie 8505C eine deutlich höhere basale Cathepsin L- und B-Sekretion als die differenzierte Zelllinie FTC 133 auf. Die Aktivierung des Proteinkinase-C-Wegs (PKC) im Rahmen der malignen Transformation scheint ein signifikantes Malignitätsmerkmal von Schilddrüsenkarzinomen zu sein. So induziert das Stimulans PMA als Aktivator der PKC eine deutliche Steigerung sowohl der Expression als auch der Sekretion von Pro-/Cathepsin L und B in 8505C, jedoch nicht in FTC 133.

Die vorliegenden Befunde zeigen, dass auch in SDC-ZL mit zunehmendem Malignitätsgrad, histologischer Entdifferenzierung und eingeschränkter klinischer Prognose vermehrt bestimmte Cathepsine synthetisiert und sezerniert werden. Darüber hinaus geht ein zunehmend invasives Potential von Schilddrüsenkarzinomen mit einer Sensibilisierung gegenüber Wachstumsfaktoren einher. Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren sowie die Aktivierung spezifischer Transduktionswege, wie der Proteinkinase C, führen zu einer erhöhten Expression der lysosomalen Proteinase Cathepsin L, B und D.

Plehn, Alexander: Einfluss von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren auf Proteinsynthese und Proliferation der Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien FTC 133 und 8505C und deren Expression der Cathepsine B, D und L. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2008

Inhaltsverzeichnis

1	VERZEICHNIS DER IM TEXT VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN.....	1
2	EINLEITUNG.....	3
2.1	Grundlagen der Tumorbiologie	3
2.2	Tumorassoziierte Proteolyse.....	3
2.3	Lysosomale Proteinase.....	4
2.3.1	<i>Die lysosomalen Proteinase Cathepsin L , B und D</i>	<i>4</i>
2.3.2	<i>Die physiologische Rolle von Cathepsinen im Zellstoffwechsel.....</i>	<i>6</i>
2.3.3	<i>Pathophysiologische Funktionen von Cathepsinen bei nichtmalignen Erkrankungen</i>	<i>7</i>
2.3.4	<i>Cathepsine in malignen Tumoren.....</i>	<i>8</i>
2.4	Die Schilddrüse im Zentrum endokriner und parakriner Regelkreise	9
2.4.1	<i>Die Stellung der Schilddrüse im endokrinen System</i>	<i>9</i>
2.4.2	<i>Endokrine und parakrine Beeinflussungen der Schilddrüse</i>	<i>11</i>
2.4.3	<i>Wachstumsfaktoren und ihre Transduktionsmechanismen</i>	<i>11</i>
2.4.4	<i>Die Bedeutung von Wachstumsfaktoren in normalem Schilddrüsengewebe sowie bei malignen und nichtmalignen Schilddrüsenerkrankungen.....</i>	<i>14</i>
2.5	Die exponierte Stellung von Cathepsinen in der Schilddrüse.....	16
2.6	Cathepsine bei nichtmalignen Schilddrüsenerkrankungen.....	17
2.7	Epidemiologische und klinische Aspekte maligner Schilddrüsenerkrankungen	17
2.8	Cathepsine in malignen Schilddrüsenerkrankungen.....	19
2.9	Das therapeutische und prognostische Dilemma der Entdifferenzierung in Schilddrüsenkarzinomen.....	19
2.10	Konzept und Ziel der vorliegenden Arbeit.....	20
3	MATERIAL UND METHODEN	21
3.1	Zellkultivierung und Zellstimulation	21
3.1.1	<i>Zelllinien und Kultivierung.....</i>	<i>21</i>
3.1.2	<i>Zellhomogenate</i>	<i>22</i>
3.1.3	<i>Geräte.....</i>	<i>23</i>
3.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Western-Blot.....	23
3.2.1	<i>SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....</i>	<i>23</i>
3.2.2	<i>Reagenzien</i>	<i>23</i>
3.2.3	<i>Proben</i>	<i>25</i>
3.2.4	<i>Western-Blot.....</i>	<i>25</i>
3.2.5	<i>Semiquantitative Western-Blot-Analyse.....</i>	<i>26</i>
3.3	Proliferationsassay und Zellzählung	28

3.4	Proteinbestimmung nach Lowry.....	28
3.4.1	<i>Reagenzien und Geräte.....</i>	28
3.4.2	<i>Probenbestimmung.....</i>	29
3.5	RT-PCR Analyse.....	29
3.5.1	<i>RNA-Isolierung.....</i>	29
3.5.2	<i>Reverse Transkription.....</i>	29
3.5.3	<i>Polymerase Chain Reaction (PCR).....</i>	29
3.5.4	<i>Reagenzien und Geräte.....</i>	31
3.6	Aktivitätsbestimmung der lysosomalen Proteinase Cathepsin L und B.....	32
3.6.1	<i>Prinzip.....</i>	32
3.6.2	<i>Probenbestimmung.....</i>	32
3.6.3	<i>Geräte.....</i>	33
3.7	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	33
3.7.1	<i>Prinzip des ELISA.....</i>	33
3.7.2	<i>Reagenzien und Geräte.....</i>	34
4	ERGEBNISSE.....	34
4.1	Messenger RNA-Nachweis von Cathepsin L, B und D mittels RT-PCR.....	34
4.2	Analysen auf Proteinebene.....	35
4.2.1	<i>Proteingehalt der Zellhomogenate.....</i>	35
4.2.2	<i>Western Blot: Cathepsin L-, B- und D-Konzentration im Zytoplasma.....</i>	37
4.2.3	<i>ELISA: Procathepsin L- und Cathepsin L-Konzentration im Zytoplasma.....</i>	41
4.2.4	<i>Nachweis von sezerniertem Cathepsin L im konditionierten Medium durch Western Blot.....</i>	44
4.2.5	<i>Quantitative Bestimmung von sezerniertem Procathepsin L und Cathepsin L im Kulturmedium durch ELISA.....</i>	44
4.2.6	<i>Aktivität der sezernierten Cathepsine L und B.....</i>	47
4.3	Zellproliferationsassay.....	49
5	DISKUSSION.....	50
5.1	Wachstumsfaktoren und ihre Bedeutung für maligne Tumoren.....	50
5.1.1	<i>Der Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Proteinsynthese und Proliferation von Tumorzellen.....</i>	50
5.1.2	<i>Wachstumsfaktoren und der Grad der Tumordifferenzierung.....</i>	51
5.1.3	<i>Der Einfluß von Wachstumsfaktoren auf Cathepsinexpression und -sekretion.....</i>	52
5.1.4	<i>Wachstumsfaktoren als Malignitätskriterien und Prognosefaktoren.....</i>	54
5.2	Die Beteiligung der Cathepsine L, B und D an nichtmalignen Prozessen der Gewebeinfiltration, -destruktion und -invasion.....	55
5.2.1	<i>Physiologische Invasionsprozesse.....</i>	55
5.2.2	<i>Pathologie der Entzündung.....</i>	56
5.2.3	<i>Parasitäre Invasion.....</i>	56
5.3	Die Rolle von Cathepsin L, B und D und ihrer Inhibitoren in malignen Tumoren.....	57
5.3.1	<i>Die Überexpression lysosomaler Proteinase – ein typisches Phänomen maligner Tumoren.....</i>	57

5.3.2	<i>Korrelation zwischen maligner Transformation und Cathepsintranskription</i>	57
5.3.3	<i>Korrelation der Cathepsinexpression mit dem Grad der Entdifferenzierung, der Malignität sowie dem Metastasierungspotential</i>	58
5.3.4	<i>Aufhebung der intrazellulären Cathepsintopographie als Malignitätsmerkmal</i>	59
5.3.5	<i>Sekretion von Cathepsinen durch maligne transformierte Zellen</i>	59
5.3.6	<i>Membranbindung der Cathepsine und ihre Rolle in der Tumorinvasion</i>	60
5.3.7	<i>Die Rolle der Cathepsine in tumorassoziierten Zellen</i>	61
5.3.8	<i>Die tumorassoziierte extrazelluläre Proteolyse</i>	62
5.3.9	<i>Cathepsine und ihre Inhibitoren</i>	62
5.3.10	<i>Cathepsine als prognostische Faktoren</i>	64
5.3.11	<i>Hemmung von Malignität durch Antisense-Oligonukleotide und Anti-Cathepsin Antikörper</i>	64
5.3.12	<i>Cathepsine als Mediatoren des programmierten Zelltods</i>	65
5.4	Die Zelllinien FTC 133 und 8505C im direkten Vergleich	65
5.5	Schlussfolgerung und klinischer Ausblick	66
6	LITERATURVERZEICHNIS	68
7	ANHANG	I
7.1	Chemikalienverzeichnis	I
7.2	Thesen	III
7.3	Publikationsverzeichnis	V
7.4	Lebenslauf.....	VI
7.5	Selbstständigkeitserklärung	VIII
7.6	Danksagung	IX