

Expression auf mRNA-Ebene (RT-PCR) und auf Protein-Ebene im Immunoblot, im ELISA und durch Aktivitätsbestimmungen, ebenso wie die Sekretion der Cathepsine.

Zusammenfassend sollte es Ziel dieser Arbeit sein, im Vergleich der beiden SD-Tumorzelllinien unterschiedlicher Herkunft, Gemeinsamkeiten und Differenzen zwischen ihnen bezüglich

- des exprimierten Cathepsinprofils,
- der Sekretion der Cathepsine,
- der möglichen Regulation beider durch Wachstumsfaktoren bzw. Hormone und
- spezifische Aktivatoren einzelner Transduktionswege zu finden, die Aussagen zu den sehr unterschiedlichen Charakteristika der den Zelllinien zugrunde liegenden Malignom-Entitäten zulassen und sie erklären.

Ein genaues Verständnis der biochemischen Grundlagen von Tumordinfiltration, -invasion und –metastasierung und ihrer Regulationsmechanismen ist Voraussetzung für innovative und erfolgreichere Therapieprinzipien in der Onkologie - nicht zuletzt im Bereich der Schilddrüsenkarzinome.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultivierung und Zellstimulation

3.1.1 Zelllinien und Kultivierung

Im Rahmen dieser Arbeit sind zwei etablierte Schilddrüsenkarzinomzelllinien verwendet worden: FTC 133 und 8505C. Bei beiden Zellarten handelt es sich um adhärent wachsende, humane Zellen, welche bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ inkubiert wurden.

FTC 133, freundlicherweise überlassen von P. Goretzki (Düsseldorf, D), ist eine humane follikuläre Schilddrüsenkarzinomzelllinie, die aus einer mediastinalen Lymphknotenmetastase eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms einer 42-jährigen Frau im Juni 1987 etabliert wurde. Als Zeichen eines differenzierten thyreoidalen Charakters exprimiert FTC 133 sowohl 5'-Deiodase Typ I als auch Thyreoglobulin.

Die Zelllinie 8505C hingegen gewann N. Nakamura 1988 aus dem Primärtumor eines Schilddrüsenkarzinoms vom anaplastischen Typ einer 78-jährigen Frau. Wie für anaplastische Schilddrüsenkarzinome typisch und im Kontrast zu differenzierten Schilddrüsenkarzinomen (FTC 133), weist 8505C eine Deletion im p53-Gen auf [82, 86].

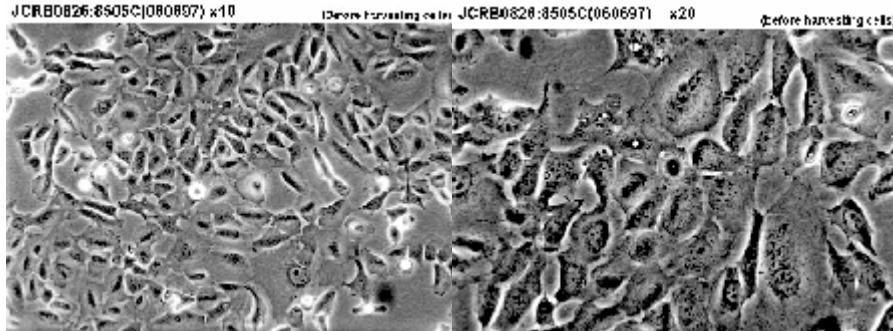


Abbildung 2: Zelllinie 8505C in Kultur

Zellen beider Zelllinien wurden in DMEM-Ham's F-12 Medium (mit 10% FCS) kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte in 3-4 tägigen Intervallen. Erreichten die Zellen Konfluenz, wurden sie passagiert. Dem Beginn einer jeden Stimulationsreihe gingen mindestens 3 Passagen voran, um die durch Kryokonservierung bedingten apoptotischen Einflüsse auf die Tumorzellen zu minimieren.

Nach Erreichen von Konfluenz und einer 72-stündigen Kultivierung in FCS-freiem Medium, sind die Zellen mit rekombinantem humanen TSH (100 μ U / mL), Forskolin (10^{-5} mol / L), EGF (5 ng / mL), PMA (10 ng / mL) oder Insulin (5 μ g / mL) für 24, 48 und 72 Stunden stimuliert worden (Tabelle 3). Während dieser Inkubationszeit erfolgte der Mediumwechsel täglich. Das konditionierte Medium wurde zur weiteren Analyse bei -25°C konserviert.

Tabelle 3: Stimulationsfaktoren und ihre Charakteristika

Stimulationsfaktor	Charakteristika
Insulin	Hydrophiles Hormon; Wirkung über Plasmamembranrezeptoren (Insulin-Rezeptor) mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität; Stimulation von IP3-Kaskade, PKB und MAP-Kinasen
EGF	Epidermal Growth Factor; Wirkung vermittelt über Plasmamembran-EGF-Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität; Stimulation von PKC via IP3 und MAP-Kinasen
TSH	Thyroid Stimulating Hormone (Thyreotropin) aktiviert zwei Transduktionssysteme: 1. Adenylatcyclase-System \Rightarrow via Konzentrationserhöhung von cAMP zur Aktivierung der Proteinkinase A 2. Phospholipase-C-System \Rightarrow vermehrte Bildung von DAG und IP ₃ \Rightarrow Ca ²⁺ \uparrow und Proteinkinase C-Aktivierung
Forskolin	Gewonnen aus der indischen Pflanze <i>Coleus forskohlii</i> , Aktivator der Adenylatcyclase und via cAMP der Proteinkinase A
PMA	Phorbol-12-myristat-13-azetat Phorbol-Ester führen als spezifische Analoga des DAG über eine Aktivierung der DAG-vermittelten Kaskade des IP3-Systems zur Stimulation der Proteinkinase C

3.1.2 Zellhomogenate

Nach Beendigung der Stimulation wurden die adhärennten Zellen mit Trypsin-EDTA isoliert und zum Zellaufschluß in aqua dest. resuspendiert. Zur Vervollständigung der Zelllyse wurden die Proben dreimal einem Frier-Tau-Zyklus unterzogen. Das so erhaltene Zellhomogenat

konservierten wir bei -80°C . Anschließend erfolgte eine Abtrennung der membranen Anteile des Homogenats bei $100000 \times g$ (Ultrazentrifuge L8-70M, Beckman). Die so gewonnene zytoplasmatische Phase wurde zur weiteren Analyse bei -20°C aufbewahrt.

3.1.3 Geräte

Zellkulturflaschen 75 cm^2 und 150 cm^2 (Greiner bio-one, Kremsmünster)

CO_2 -Brutschrank Cytoperm 2 (Heraeus, Gera)

Mikroskop Axioplan 2 (Zeiss, Jena)

Reinraumbank HS 12 (Heraeus, Gera)

3.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Western-Blot

3.2.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Nach Gewinnung der zytoplasmatischen Zellfraktion sowie Konservierung des Kulturmediums erfolgte die Auftrennung der Proteine der Proben mittels SDS-PAGE in einem BioRad-System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Nach Anfertigung von Trenn- (12,5%) und Sammelgel (4%) (*Tabelle 5*) wurden Ober- und Unterpuffer (*Tabelle 4*) aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Applikation der reduzierten (β -Mercaptoethanol) und mit Probenpuffer (*Tabelle 6*) versetzten Proben in die Taschen des Sammelgels. Hierbei war darauf zu achten, dass die maximale Proteinbeladung $40 \mu\text{g}$ nicht überschreitet. Im konstanten elektrischen Feld (300V, 0,5A) wandern die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht mit unterschiedlicher Geschwindigkeit zur unten gelegenen Anode. Zugewandtes Bromphenolblau wandert mit der Front. Mitgeführt wurden weiterhin eine Negativkontrolle (aqua dest.), eine Positivkontrolle (8505C, zytoplasmatische Fraktion, 24h Inkubation) sowie ein definiertes Proteinmarkergemisch (*Tabelle 8*).

3.2.2 Reagenzien

1. Puffer (4fach konzentriert)

Tabelle 4: Puffer-Reagenzien

Reagenz	Oberpuffer	Unterpuffer	Obergelpuffer	Untergelpuffer
Tris, g	15,125	15,125	15,125	45,5
Glycin, g	72	72	-	-
SDS, g	5	-	-	-
1N HCl	-	-	-	-
H_2O , mL	5000	5000	250	250
pH, mit 1 N HCl eingestellt	9,39	8,5	6,8	8,8

2. Polyacrylamidgele:

Tabelle 5: Polyacrylamidgele

Trenngel (12,5%) (für 2 Gele)		Sammelgel (4%)	
Acrylamid-Bisacrylamidlösung (A)	12,5 mL	Acryl-Bisacrylamidlösung (B)	1,5 mL
H ₂ O	10 mL	Tris-HCl, pH 6,8	2,5 mL
Tris-HCl, 1,5 M; pH 8,8	7,5 mL	H ₂ O	6 mL
NH ₄ -Persulfat, 10%	100 µL	TEMED	10 µL
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	20 µL	NH ₄ -Persulfat, 10%	30 µL
Acrylamid-Bisacrylamidlösung (A)		Acryl-Bisacrylamidlösung (B)	
Acrylamid	75 g	Acrylamid	73 g
Bisacrylamid	0,8 g	Bisacrylamid	2 g
ad 250 mL H ₂ O		ad 250 mL H ₂ O	

3. Probenpuffer

Tabelle 6: Probenpuffer

Glycerol, 10%	1 mL
SDS, 2,3%	230 mg
Tris-HCl, pH 6,8; 0,0625 M	1,250 mL
Bromphenolblau, 0,1%	1,0 mL
H ₂ O	6,5 mL

4. Reduzierender Puffer

Tabelle 7: reduzierender Puffer

Probenpuffer	475 µl
β-Mercaptoethanol	25 µl

5. Markerproteine

Tabelle 8: Markerproteine

Protein	relative Molmasse in Da
Lactalbumin	14000
Sojabohnentrypsininhibitor	21000
Carboanhydrase	30000
Ovalbumin	43000
Serumalbumin	67000
Phosphorylase B	94000

3.2.3 Proben

Probenzusammensetzung

1. Gesamtproteinmenge des Homogenats oder des Kulturmediums je Slot:

Cathepsin L-Nachweis:	40 µg Protein / Slot
Cathepsin B-Nachweis:	10 µg Protein / Slot
Cathepsin D-Nachweis:	15 µg Protein / Slot

2. Menge des Homogenats oder des Kulturmediums auf der Basis einer identischen Zellzahl je Slot.

Probenvorbereitung

Mischungsverhältnis Proben-reduzierender Puffer 1:1, anschließend 95°C, 10min

3.2.4 Western-Blot

Der Western-Blot ist eine sehr empfindliche immunologische Technik, um ein bestimmtes Protein in einer komplexen Mischung detektieren zu können. Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE, werden die Proteine bei 4°C durch ein elektrisches Feld (300V/0,5A) vom Gel auf eine Polymerschicht, wie Nitrocellulose (HybondTM-c extra, Amersham Pharmacia Biotech, Heidelberg), übertragen (BIO-RAD Blotkammer, Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Die Proteine binden an die Membranen und werden zugänglich für zugegebene spezifische Primär-Antikörper. Um noch verbleibende freie Bindungsstellen auf der Nitrocellulose zu blockieren, werden die Membranen in 0,5 % TWEEN 20 inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen mit Puffer erfolgt eine Inkubation der Membranen über Nacht mit den entsprechenden Primär-Antikörpern (*Tabelle 11*).

Die so entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe lassen sich mittels eines markierten Sekundär-Antikörper sichtbar machen, welcher gegen den Primär-Antikörper gerichtet ist (*Tabelle 12*). Hierbei verwandte Sekundär-Antikörper sind Meerrettich-Peroxidase konjugierte Antikörper. Das Enzym setzt Wasserstoffperoxid zu Wasser um. Als Reduktionsmittel fungieren dabei Substrate, deren Oxidationsprodukte eine Färbung zeigen (Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid) oder Photonen freisetzen (Lumi-Light, Roche/Mannheim).

Reagenzien:

1. Pufferlösungen

Tabelle 9: Western-Blot, Pufferlösungen

Blotpuffer, pH 6,5		Spülpuffer, pH 7,5-7,6	
Natriumdihydrogenphosphat, 1 M	37 mL	Tris	4,8 g
Natriumhydrogenphosphat, 0,5 M	26 mL	Natriumchlorid	18 g
		Salzsäure, 1 N	3,0 mL
		Triton X100, 10%	10 mL
ad 2000 mL H ₂ O		ad 2000 mL H ₂ O	

3. Blockierlösung

100 µl Tween 20 ad 20 mL Spülpuffer

4. Entwicklerlösungen

Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid-Färbung

Tabelle 10: NBT-Entwicklerlösung

Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid	6 mg in 20 mL Spülpuffer gelöst
NADH	20 mg
Phenol, 85%ig	10 µl
H ₂ O ₂ , 30%ig	10 µl

Lumi-Light, Roche/Mannheim

5. Farblösung für Marker

10 mL Essigsäure 5%ig und Amidoschwarz

6. Antikörper

Tabelle 11: Primär-Antikörper

Antikörper	Klonalität	Tier	Verdünnung	Herkunft
Anti-human-Cathepsin L	polyklonal	Kaninchen	1:5000	RD-Laboratories Diessen
Anti-human-Cathepsin B	polyklonal	Kaninchen	1:100000	IPC Halle
Anti-human-Cathepsin D	polyklonal	Kaninchen	1:10000	IPC Halle

Tabelle 12: Sekundär-Antikörper

Anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase-markiert	polyklonal	Ziege	1:1000	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-IgG, Peroxidase-markiert	polyklonal	Ziege	1:500	Dianova, Hamburg

3.2.5 Semiquantitative Western-Blot-Analyse

Nach Entwicklung der Western Blots (Enhanced Chemical Luminescence) erfolgte zur weiterführenden semiquantitativen Auswertung eine Digitalisierung. Hierzu wurden die Blots mittels eines optischen Scanners (Mikrotek, ScanMaker X6) unter konstanten Bedingungen eingelese. Anschließend konnten mit Hilfe des Programms SigmaGel, Jandel Scientific, die Grauwert-Intensitäten der Blot-Banden mittels Integralbestimmung ermittelt werden. Nach Äquilibrierung der Intensitäten entsprechend der Positivkontrollen, waren vergleichende, semiquantitative Aussagen möglich. Dieses Prinzip der semiquantitativen Analyse ist exemplarisch in *Abbildung 3* anhand des Western Blot des zytoplasmatischen Cathepsin B-Gehaltes pro Zelle der Zelllinie 8505C nach 24h Stimulation dargestellt.

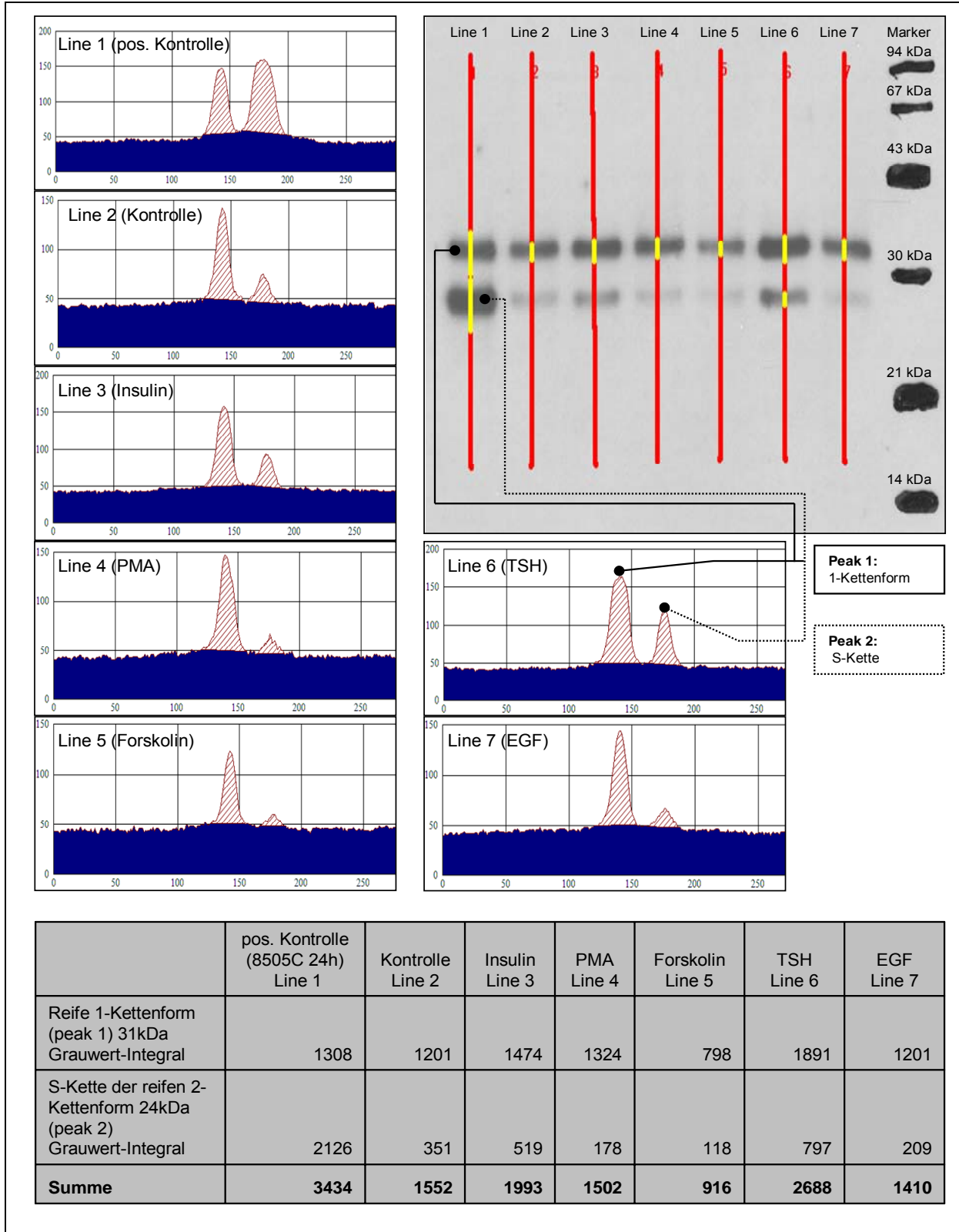


Abbildung 3: Cathepsin B-Expression pro Zelle der Zelllinie 8505C in Grauwertintensitätsintegralen des Western Blot nach 24h Stimulation.

3.3 Proliferationsassay und Zellzählung

Nach Aussaat von 2×10^5 Zellen je 25 cm²-Kulturflasche, wurden die Proben bis zum Erreichen der Konfluenz mit 10% FCS-haltigem DMEM-Ham's F-12 Medium kultiviert. Es schlossen sich 72 Stunden in FCS-freiem DMEM-Ham's F-12-Medium an. Die Stimulation erfolgte wie bereits in Abschnitt 3.1. aufgeführt, wobei identische Konzentrationen der jeweiligen Stimulantien und identische Expositions-Intervalle eingehalten wurden.

Nach Inkubationsende konnten die Zellen mittels Trypsin geerntet werden, um anschließend in einem Zellzähler (Beckmann Coulter, Z1) gezählt zu werden (0,5 mL Zählvolumen, 11 µm Cellcut).

3.4 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry kombiniert die Biuretreaktion mit der Nachweismethode nach Folin und Ciocalteu. Cu²⁺-Ionen gehen mit den Stickstoffatomen der Peptidbindung einen violett gefärbten, löslichen Komplex ein (Biuretreaktion), während Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdänsäure durch die im Protein enthaltenen aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan in einer Farbreaktion reduziert werden (Folin und Ciocalteu).

Die Extinktion des durch beide Prozesse entstehenden Farbkomplexes wird nach zwei Stunden bei 578 nm gemessen. Als Eichwert dient eine Albuminlösung (14 µg / 20 µl). Anschließend wird nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz die Proteinkonzentration anhand der gemessenen Extinktion ermittelt ($E = \epsilon \times c \times d$).

3.4.1 Reagenzien und Geräte

1. Lowry-Puffer

Tabelle 13: Lowry-Puffer

NaOH	8,0 g	200,0 mmol/L
Na ₂ CO ₃	40,0 g	377,2 mmol/L
K-H-Tartrat	0,4 g	2,12 mmol/L
Wasser	ad 1000 mL	

2. Phenolreagenz (Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz)

Phosphormolybdän-Wolfram-Säure, 0,18 N NaOH äquivalent

3. CuSO₄

43 mmol/L (1 g CuSO₄ x 4 H₂O / 100 mL)

4. CuSO₄-Puffer-Lösung

50 mL Lowry-Puffer + 1 mL CuSO₄-Lösung 1%

5. Eichwert

Albuminlösung (14,0 mg / 20 mL)

6. Leerwert

destilliertes Wasser + CuSO₄-Lösung + Phenolreagenz

Geräte:

Eppendorf-Photometer mit Mikroabsaugküvette und Drucker

3.4.2 Probenbestimmung

20 µl Probenlösung + 200 µl CuSO₄-Puffer-Lösung

20 min Inkubation bei Raumtemperatur

+ 200 µl Phenolreagenz

120 min Inkubation bei Raumtemperatur

Extinktionsmessung bei 578 nm

3.5 RT-PCR Analyse

3.5.1 RNA-Isolierung

Nach einer Stimulationsperiode wurden die adhärent wachsenden Zellen mittels TRIS-HCl-Triton X-100 (TRIZOL, GibcoBRL) lysiert und das erhaltene Homogenat 2-3 min bei 15-30°C mit Chloroform inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4°C und 12000 x g für 15 Minuten ließ sich das Lysat in drei Phasen separieren: 1. eine schwach rötliche proteinhaltige Phenolphase, 2. eine DNA-haltige Interphase und 3. eine obere farblose RNA-enthaltende Schicht.

Letztere Schicht wurde vorsichtig abpipettiert, die RNA mittels Isopropanol ausgefällt und in RNA-ase freiem Wasser resuspendiert. Abschließend erfolgte die RNA-Konzentrationsbestimmung in 10 mM TRIS-HCl-Puffer, pH 7,5 bei 260 nm und 280 nm.

3.5.2 Reverse Transkription

Ein Mikrogramm der RNA wurde in 20 µl DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat) zur Inhibierung potentieller RNasen aufgenommen und bei 42°C 45 min mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RT-Mix, Abschnitt 3.5.4. Reagenzien und Geräte) in die komplementäre DNA (c-DNA) überführt. Es folgte die Inaktivierung des Enzyms durch Denaturierung bei 95°C.

3.5.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Thermophile Bakterien heißer Geysirquellen (z.B. *Thermus aquaticus*) besitzen hitzeresistente Enzyme, so auch Polymerasen, die eine Replikation der DNA bei hohen Temperaturen ermöglichen, ohne selbst zu denaturieren [15]. In vitro nutzt man diese Hitzestabilität der Polymerasen, indem man in Thermocyclern einen zyklischen Temperaturwechsel erzeugt. Bei hoher thermischer Energie werden die Wasserstoffbrücken zwischen DNA-Strängen gespalten und konsekutiv freie, einsträngige DNA geschaffen. An diese binden nach Erreichen der Annealing-Temperatur spezifische Primer, die zusammen mit der DNA-Polymerase eine

Replikation des DNA-Abschnittes katalysieren. Primer sind kurze DNA-Abschnitte, die an einem spezifischen Locus des DNA-Stranges binden, Angriffspunkte der Polymerasen und somit Startpunkte der Replikation sind. Man unterscheidet je nach Transskriptionsstrang zwischen sense- und antisense-Primern.

Der ‚perfekte‘ Primer muss dabei mehreren Kriterien genügen:

1. Die Primersequenz sollte exakt zur gewünschten c-DNA-Sequenz passen und möglichst keine Homologien mit anderen Gentranskripten aufweisen.
2. Das Transskriptionsprodukt soll zwischen 400 und 2000 Basenpaaren haben. Kleinere Produkte erreichen in gängigen Agarosegelen eine nur ungenügende Auflösung. Grosse DNA-Sequenzen hingegen werden auf Grund von Limitationen der Transkription weniger effizient amplifiziert.
3. Primersequenzen sind günstigerweise auf getrennten Exons zu wählen, um Produkte von kontaminierender Genom-DNA differenzieren zu können. Diese werden durch verbliebene Introns größer ausfallen.
4. Um eine ähnliche Annealing Temperatur beider Primer zu erreichen, sollten diese zwischen 22 und 30 Nukleotidpaare umfassen und einen gleich hohen Anteil aller Basen enthalten.
5. Zusätzlich sind Intra- und Inter-Strang Basenpaarungen mit Dimer- und Schleifenbildung zu vermeiden.

Unter Berücksichtigung dieser Kriterien und mit Hilfe einer Computersoftware (Gene Runner Vers. 3.04 Hastings Software, Inc.) konnten optimale Primersequenzen ermittelt werden (*Tabelle 16*). Die eindeutige Spezifität der Primer überprüften wir online in der Blast Search GenBank Database des GenomeNet und führten eine einmalige Sequenzierung aller PCR-Produkte durch. Diese bestätigte in allen Fällen das spezifische Produkt und damit die Spezifität der Primer.

Unter Anwendung der entsprechenden Primer-Paare und eines Taq-DNA-Polymerase-Kits erfolgte die PCR der verschiedenen c-DNA-Proben.

Zur Visualisierung und Auswertung der PCR-Produkte wurden diese neben einem definierten DNA-Markergemisch in ein mit Ethidiumbromid-versetztes 1%iges Agarosegel appliziert und bei 70 mA ca. 90 Minuten elektrophoretisch getrennt. Im ultravioletten Licht fluoreszieren die so separierten Ethidiumbromid-markierten-DNA-Transkripte in Abhängigkeit von der Transkriptmenge. Die Gele wurden abschließend fotografisch protokolliert.

Als Positivkontrollen fungierten Beta-Aktin-Primer und ihre Transkripte aus einer Ovarialfibroblastenpopulation.

3.5.4 Reagenzien und Geräte

RT-Mix:

Tabelle 14: RT-Mix

5 x RT-Puffer	5,0 µL
dNTP-Mix , 12,5 mM	1,0 µL
Random Primer, 100 ng / µL	3,0 µL
DTT, 0,01 M	2,5 µL
RNasin, 40 U / µL	0,5 µL
Superscript II, 200 U / µL	0,3 µL
DEPC-H ₂ O	2,7 µL

PCR-Mix:

Tabelle 15: PCR-Mix

H ₂ O (aqua-bidest)	16,3 µL
10 x PCR-Puffer (komplett)	2,5 µL
dNTP-Mix, 100 µM	3,0 µL
sense-Primer, 10 pM	0,25 µL
antisense-Primer, 10 pM	0,25 µL
Taq-DNA Polymerase, 5 U / µL	0,2 µL

DNA-Stopper (30% Glycerol in TE-Puffer, Bromphenolblau)

1% Agarosegel, 2 g Agarose ad 200 mL TBE-Puffer (Tris, Borsäure, EDTA)

Ethidiumbromid (50 µl ad 100 mL TBE)

Geräte:

T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen)

Kühlzentrifuge Biofuge 28RS (Heraeus, Gera)

Zentrifuge Galaxy 7D (VWR International, Darmstadt)

Elektrophoresekammer (Biometra, Göttingen)

Kodak Image Station 440 (Kodak, Stuttgart)

Primer:

Tabelle 16: Primer

Cathepsin	Sense-Primer	Antisense-Primer	Annealing-Temp.
Cat.L	-CTGCACAATCAGGAATACAG-	-TATGGATAGGATTCCTCAGAG-	53,6°C
Cat.B	-TGTGGAAGCCATCTCTGAC-	-TTGTAGAGCAGGAAGTCCG-	56,5°C
Cat.D	-TCACAGTCGTCTTCGACAC-	-GTAATACTTGGAGTCTGTGCC-	56,8°C

LADDER-Marker (GibcoBRL, Paisley, Schottland)

100 Basenpaare (BP)-Ladder: bestehend aus 15 Fragmenten zwischen 100 und 1500 BP in Vielfachen von 100 BP und einem zusätzlichen Fragment von 2072 BP. Die 600 BP-Bande erscheint zur besseren Orientierung ca. 2 bis 3-mal heller als die übrigen Banden.

3.6 Aktivitätsbestimmung der lysosomalen Proteinase Cathepsin L und B

3.6.1 Prinzip

Methoden wie Western Blot oder ELISA weisen die Existenz eines Enzyms nach, geben aber keine Information über den biochemischen Funktionszustand des Proteins. Die Aktivität eines Enzyms ist aber entscheidend, um seine biologische Wirkung abschätzen zu können.

In unseren Untersuchungen wurden die Aktivitäten von Cathepsin L und B in den Zellkulturüberständen ermittelt.

Die Bestimmung der Cathepsin L-Aktivitäten erfolgte nach Heidtmann, 1993 [78] unter Verwendung von Peptidmethylcoumarylamiden. Das synthetische, nicht fluoreszierende Z-Phe-Arg-NHMec wird in Anwesenheit von Cathepsin L bei pH 5,5 hydrolysiert. Dabei wird das 7-Amino-4-methylcoumarin freigesetzt, dessen Fluoreszenz der Quantifizierung dient (Fluorimeter TKO 100). Z-Phe-Arg-NHMec ist jedoch nicht spezifisch für Cathepsin L, da u. a. auch Cathepsin B das Substrat hydrolysiert. Dies macht einen Kontrollansatz notwendig, indem in einem zweiten Ansatz Cathepsin L spezifisch und irreversibel durch Z-Phe-Phe-CHN₂ inhibiert wird. Der Zusatz von EDTA, einem Chelatbildner, bewirkt eine Komplexbildung von Schwermetallionen, die als freie Ionen eine inhibierende Wirkung auf das katalytische Zentrum haben.

Procathepsin B wurde in einem ersten Inkubationsschritt durch Pepsin zu Cathepsin B aktiviert. Anschließend konnte ein Aktivitätsassay analog zu Cathepsin L unter Verwendung des Cathepsin B-spezifischen Substrats Z-Arg-Arg-NMec bei pH 6,5 durchgeführt werden. Diese Methodik macht es möglich, die Procathepsin B- von Cathepsin B-Aktivität abzugrenzen, indem jeweils ein Assay mit und ohne Pepsin erfolgt.

3.6.2 Probenbestimmung

Cathepsin L:

10 µL Probe + 300 µL 0,1 M Acetatpuffer (Aktivierungspuffer), pH 5,5 (auf 2 mL je 100 µL 0,1 M DTE und 0,1 M EDTA)

5 min, 37°C Inkubation

+ 200 µL Z-Phe-Arg-NHMec (10 µL, 10⁻² M / 8 mL H₂O)

15 min, 37°C Inkubation

+ 2 mL Stopper (9,4 g Monochloressigsäure + 65 mL 2 N NaOH + 6 g Eisessig pro 1000 mL

Aqua ad, pH 4,0-4,4)

Messung der Fluoreszenz

Cathepsin B / Pro-B:

Cathepsin B: 10 µL Probe + 30 µL Glycinpuffer 0,1M, pH 3,0

Pro-Cathepsin B: 10 µL Probe + 30 µL Glycinpuffer 0,1M, pH 3,0 + Pepsin

30 min, 37°C Inkubation

+ 260 µL Phosphatpuffer (Aktivierungspuffer), pH 6,5 (auf 2 mL je 100 µL 0,1M DTE und 0,1M EDTA)

+ 200 µL Z-Arg-Arg-NMec (10 µL, 10⁻² M / 4 mL H₂O)

15 min, 37°C Inkubation

+ 2 mL Stopper (9,4 g Monochloressigsäure + 65 mL, 2 N NaOH + 6 g Eisessig pro 1000 mL Aqua ad, pH 4,0-4,4)

Messung der Fluoreszenz (ex.: 400 nm, em.: 505 nm)

3.6.3 Geräte

Fluorimeter (DNA-Fluorimeter TKO 100, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA)

Messung der Aktivitäten in RFU (Relative Fluorescence Units)

3.7 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.7.1 Prinzip des ELISA

Die Bestimmung der Konzentrationen von Cathepsin L und Procathepsin L erfolgte in einem ELISA, welcher von unserer Arbeitsgruppe etabliert wurde. Bei diesem Sandwich-ELISA kommen Epitop-spezifische, monoklonale anti-human Cathepsin L / Procathepsin L-Antikörper als Fänger-Antikörper (catcher) auf der Mikrotiterplatte (Costar high binding, flat bottom) zur Anwendung (*Tabelle 17*). Die Spezifität dieser monoklonalen Antikörper machte es möglich, reifes Cathepsin L von seiner Pro-Form differenzieren zu können.

Zur Detektion des gebundenen Cathepsins diente ein polyklonaler anti-human-Cathepsin L-Kaninchen-Antikörper (RD-Laboratories, 1:1000). Anschließend erfolgte die Visualisierung durch einen Peroxidase-markierten-anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper (Roche, Mannheim; 1:2000) mit ABTS (Roche, Mannheim). Die Absorption wurde in einem Mikrotiterplattenreader bei 450 nm gemessen. Als Standard diente gereinigtes humanes Procathepsin L.

Die niedrigste detektierbare Cathepsin L-/ Pro-Cathepsin L-Konzentration des Systems betrug 2 ng / mL. Zellkulturmedien sowie Zytoplasma beider Zelllinien wurden untersucht, wobei wir uns zytoplasmatisch auf den Nachweis des Gesamt-Cathepsin L (Antikörper 33/1) beschränkten.

Tabelle 17: ELISA, monoklonale Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Detektierte Epitope	Epitoplokalisierung
CPLH-2D4	1:50	T ₆₇ SEEFQVMNGFQ	Pro-Peptid
CPLH-33/1	1:300	F ₂₄₁ YKE ₂₄₄	Reifes Cathepsin L

3.7.2 Reagenzien und Geräte

Chemikalien:

Tabelle 18: ELISA, Chemikalien

Na ₂ CO ₃	0,1 M
PBS-Tween	0,05 %
PBS-BSA	3 %
ABTS-Lösung (2,2-Azino-bis-[3-ethylbenzthiazolinesulfonat(6)]-diammoniumsalz)	

Geräte:

Mikrotiterplattenreader (Sunrise, Tecan, Grödig, Österreich)

Mikrotiterplatte Costar high binding, flat bottom (eBioscience, San Diego, USA)

4 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression der Cathepsine L, B und D in den Schilddrüsenkarzinomzelllinien 8505C und FTC133 nach Stimulation verschiedener Transduktionswege zu untersuchen. Hierzu erfolgte eine Analyse auf Messenger-RNA-Ebene mittels RT-PCR-Technik sowie auf Proteinniveau mit Hilfe von Western Blot, ELISA und Aktivitätsbestimmungen. Zusätzlich sollten eventuelle Proliferationseffekte der Stimulanzien und Differenzen zwischen beiden Zelllinien erfasst werden.

4.1 Messenger RNA-Nachweis von Cathepsin L, B und D mittels RT-PCR

Die RT-PCR Analyse bestätigte die Expression aller drei Cathepsine auf mRNA Ebene in beiden Schilddrüsenkarzinomzelllinien. Faktor-spezifische Differenzen in der mRNA-Expression konnten ebenso wenig wie individuelle Zellliniencharakteristika im Rahmen dieses semi-quantitativen Versuchsansatzes nachgewiesen werden. (Abb. 4-9)

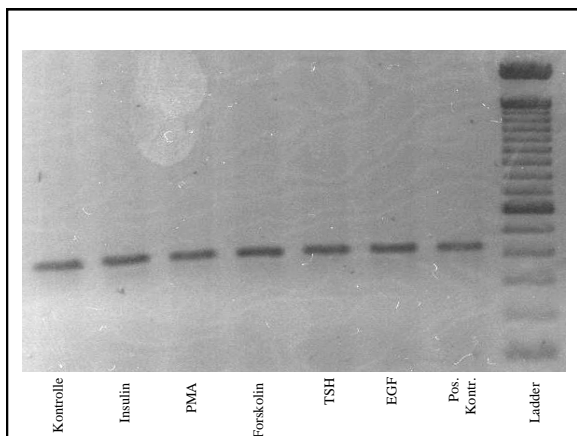


Abbildung 4: Cathepsin L, Zelllinie FTC 133, PCR, 24h Stimulation

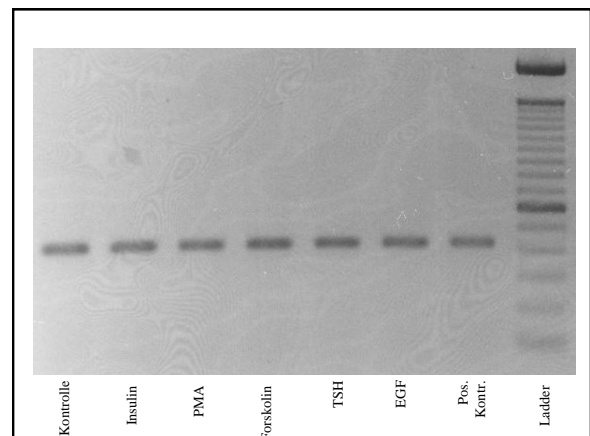


Abbildung 5: Cathepsin L, Zelllinie 8505C, PCR, 24h Stimulation