

7 Anhang

7.1 Chemikalienverzeichnis

10 x PCR-Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
2,2'-Azino-bis[3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure (6)]-diammonium-Salz (ABTS)	Roche Diagnostics, Mannheim
2-Mercaptoethanol	Pharmacia Biotech AB, Uppsala
4-Nitrobluetetrazoliumchloride (NBT)	Roche Diagnostics, Mannheim
Acrylamid-Bisacryamidlösung, 37,5 : 1	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Agarose	SERVA GmbH, Heidelberg
Albumin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Aldolase	SERVA GmbH, Heidelberg
Amidoschwarz (0,8%) Lösung	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	SERVA GmbH, Heidelberg
Z-Arg-Arg-NMec	Bachem, Weil am Rhein
Blockierungreagenz für ELISA	Roche Diagnostics, Mannheim
Bromphenolblau	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Chloroform	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
DEPC	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMEM-Ham's F-12 Medium	GibcoBRL, Paisley, Schottland
DMSO	Merck, Darmstadt
dNTP-Mix	InViTek, Berlin
DTE	Serva, Heidelberg
DTT	GibcoBRL, Paisley, Schottland
EDTA	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
EGF	Genzyme GmbH, Alzenau
Essigsäure 97 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanol 99,8 %	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
FCS	BioWest, Nuaille, Frankreich
Folin-Ciocalteu-Lösung	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Formalinlösung 35 %	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Forskolin	Calbiochem, Darmstadt
Glutaraldehyde 25 %	SERVA GmbH, Heidelberg
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Insulin	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

Isopropanol	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche Diagnostics, Mannheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Monochloressigsäure	Merck, Darmstadt
NADH ₂	Roche Diagnostics, Mannheim
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Pepsin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Phenol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
PMA	Calbiochem, Darmstadt
Random Primer	GibcoBRL, Paisley, Schottland
RNA-ase freies Wasser	Ambresco, Solon, USA
RNasin	GibcoBRL, Paisley, Schottland
RT-Puffer	GibcoBRL, Paisley, Schottland
Salzsäure, rauchend 37%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Schwefelsäure 5 N	Merck, Darmstadt
Sense/Antisense-Primer	Metabion, Martinsried
Silbernitrat	Fluka Chemie GmbH, Schwalbach
Sodiumdodecylsulfate (SDS)	SERVA GmbH, Heidelberg
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	SERVA GmbH, Heidelberg
Superscript II (Reverse Transkriptase)	GibcoBRL, Paisley, Schottland
Taq-DNA Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
TBE-Puffer	AppliChem, Darmstadt
TEMED	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Triton X-100	SERVA GmbH, Heidelberg
TRIZOL	GibcoBRL, Paisley, Schottland
Trypsin	GibcoBRL, Paisley, Schottland
TSH	Genzyme GmbH, Alzenau
Tween 20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt
Western Blocking Reagent	Roche Diagnostics, Penzberg
Z-Phe-Arg-NHMec	Bachem, Weil am Rhein
Z-Phe-Phe-CHN ₂	Bachem, Weil am Rhein

7.2 Thesen

1. Die vermehrte Expression und Sekretion lysosomaler Proteasen, wie Cathepsin L, B und D, sind Merkmale vieler maligner Tumoren und korrelieren mit dem Grad der Malignität sowie dem Metastasierungspotential.
2. Die Schilddrüse liegt physiologischerweise im Zentrum zahlreicher hormoneller Regelkreise, in denen Wachstumsfaktoren elementare Bestandteile sind. Für die Realisierung ihrer spezifischen Funktion, der Thyroxinsynthese, spielen die lysosomalen Proteasen Cathepsin L, B und D eine Schlüsselrolle.
3. Das Wissen hinsichtlich des Einflusses von Wachstumsfaktoren auf die tumorassoziierte Proteolyse in Schilddrüsenmalignomen ist jedoch aktuell noch eingeschränkt.
4. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, erstmalig den Einfluss von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (*EGF*, *Insulin*, *TSH*, *PMA*, *Forskolin*) auf Proteinsynthese und Proliferation der Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien FTC 133 und 8505C und deren Expression der Cathepsine B, D und L zu untersuchen.
5. Zelllinie FTC 133, abgeleitet von einem differenzierten, niedrig-malignen, noch typische Organmerkmale aufweisenden Schilddrüsenkarzinom, und 8505C, hervorgegangen aus einem hoch-malignen, anaplastischem Schilddrüsenkarzinom, sind Tumor-Zelllinien sehr verschiedener Entität, weshalb sie ein geeignetes Modell zum Vergleich ihres proteolytischen Enzymprofils darstellen.
6. FTC 133 und 8505C wurden über definierte Zeitintervalle mit Wachstumsfaktoren (*TSH*, *EGF* und *Insulin*) sowie spezifischen Aktivatoren ausgewählter Transduktionssysteme (*Forskolin* und *PMA*) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Analyse der Cathepsin L-, B- und D-Expression auf messenger RNA-Niveau (RT-PCR) sowie deren Expression und Sekretion auf Proteinebene (ELISA, Western Blot, enzymatische Aktivitäten). Zusätzlich bestimmten wir den Proteingehalt und die Proliferationsrate der Tumorzellen.
7. Insulin führt zu einem stark erhöhten Proteingehalt (Hypertrophie) der Zelllinie FTC 133 ohne mitogene Effekte aufzuweisen.
8. In 8505C induziert Insulin den stärksten mitogenen Effekt der eingesetzten Faktoren ohne gleichzeitig die Proteinsynthese zu steigern, was am ehesten in einer Hypotrophie der Zellen mündet.
9. Mit zunehmender Entdifferenzierung scheint der PKC-Transduktionsweg an Bedeutung für die Tumor-Malignität zu gewinnen. So entwickelt PMA in Zelllinie 8505C deutlich stärkere proliferative und anabole Effekte als in FTC 133.
10. Das Fortschreiten der Tumortransformation geht häufig mit einem Verlust differenzierender Merkmale einher. Die Aktivierung der PKA, in Thyreozyten Vermittler organspezifischer Funktionen, besitzt im differenzierten Karzinom FTC 133 noch mitogene Aktivität, welche mit Entdifferenzierung zum anaplastischen Karzinom 8505C verloren geht.

11. Mittels RT-PCR Analyse ließ sich die Expression von Cathepsin L, B und D auf mRNA Ebene in beiden Schilddrüsenkarzinomzelllinien bestätigen, jedoch fanden sich weder Zelllinien- noch Faktor-spezifische Differenzen in der mRNA-Expression.
12. Der Grad der Expression lysosomaler Proteinase korreliert häufig mit dem Grad der Entdifferenzierung und Malignität von Tumoren. 8505C exprimierte als Zelllinie eines hochmalignen Schilddrüsen-Karzinoms signifikant mehr Cathepsin L, B und D als die Zellen der FTC 133.
13. Mit zunehmender Entdifferenzierung und Malignität scheint in Tumoren die Stimulationsfähigkeit der Cathepsin-Synthese durch Wachstumsfaktoren zu steigen. Hinsichtlich der untersuchten Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien ließ sich der Cathepsin L-, B- und D-Gehalt in 8505C durch alle Faktoren erhöhen, während sich in FTC 133 lediglich die Cathepsin L-Synthese stimulieren ließ.
14. Die verstärkte Sekretion von Cathepsinen ist ein akzeptiertes Malignitäts- und Prognosekriterium zahlreicher Tumoren. Analog hierzu weist die anaplastische Zelllinie 8505C eine deutlich höhere basale Cathepsin L- und B-Sekretion auf als die differenzierte Zelllinie FTC 133.
15. Die zunehmende Rekrutierung embryonaler Transduktionswege mit Modifikation der Protein-Expression, der Prozessierung der Proteine und ihres Transports ist ein typisches Merkmal maligner Tumore und korreliert mit dem Grad der Entdifferenzierung und Malignität. Die Aktivierung des PKC-Wegs im Rahmen der Transformation zum anaplastischen Schilddrüsenkarzinom scheint in Zelllinie 8505C ein signifikantes Malignitätskriterium zu sein. So induziert PMA als Aktivator der PKC eine deutliche Steigerung sowohl der Expression als auch der Sekretion von Cathepsin L und B in 8505C. Der differenzierten Zelllinie FTC 133 bleibt dieser Aktivierungsweg verschlossen.
16. Die vorliegenden Befunde zeigen, dass auch in Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien mit zunehmendem Malignitätsgrad, histologischer Entdifferenzierung und eingeschränkter klinischer Prognose vermehrt Cathepsine synthetisiert und sezerniert werden. Darüber hinaus geht ein zunehmend invasives Potential in 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 an lysosomalen Proteinase Cathepsin L, B und D.
17. Das komplexe Zusammenwirken von Wachstumsfaktoren und dem lysosomalen proteolytischen System als Effektor der Tumorzellantwort in Schilddrüsenkarzinomen bedarf weitergehender Untersuchungen. Es ist jedoch bereits heute offensichtlich, dass sowohl Wachstumsfaktoren als auch Cathepsine ein viel versprechendes diagnostisches und therapeutisches Betätigungsfeld sind.

7.3 Publikationsverzeichnis

Publikation:

- Plehn A, Gunther D, Aurich H, Hoang-Vu C, Weber E. Influence of proliferation, differentiation and dedifferentiation factors on the expression of the lysosomal cysteine proteinase cathepsin L (CL) in thyroid cancer cell lines. Adv Exp Med Biol 2000; 477:487-495.

Posterpräsentation:

- Posterpräsentation auf dem
„2nd Symposium on Cellular peptidases in immune functions and diseases“
Magdeburg, 12.-14. September 1999, DFG-Sonderforschungsbereich 387,
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Poster III/9
“Modulation of the expression of the lysosomal proteases cathepsin B, D, L and H in
thyroid cancer cell lines”
Plehn, A.*, Günther, D.*, Aurich, H.*, Hoang-Vu, C.** & Weber, E.*
*Institute of Physiological Chemistry & **Department of Experimental and Surgical
Oncology, Clinic of General Surgery, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg

Vorträge:

- Vortrag auf der “14. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung”
Ratzeburg, 11./12. Dezember 1998, Medizinische Universität zu Lübeck
„Observation of lysosomal proteinases in thyroid cancer cell-lines“