

Anja Stremmer

Dr. sc. hum.

Molekulare Expression von Cathepsin B und Stefin B in Tumoren des humanen Bronchialkarzinoms

Geboren am 10.01.1972 in Neckarsulm

Reifeprüfung am 26.05.1992 in der Gustav-von-Schmoller Schule Heilbronn

Studiengang der Fachrichtung Pharmazie vom WS 1992/93 bis WS 1996/97

Praktisches Jahr in der Central Apotheke Kullmer in Sinsheim und der Mauritius Apotheke in Trochtelfingen

Staatsexamen am 02.06.1998 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Labormedizin (Klinische Chemie)

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Werner Ebert

Das Vorliegen eines Ungleichgewichtes zwischen Cysteinproteinasen und ihren physiologischen Inhibitoren, den Cystatinen, in Tumorzellen kann als eine der Ursachen für Tumordinvasion und Metastasierung angesehen werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde das Vorkommen der mRNA von sowohl Cathepsin B als auch des überwiegend intrazellulär wirksamen Inhibitors Cystatin B (Stefin B) in Lungentumorgewebe untersucht. Völlig unbekannt war bislang der Beitrag der Histiozyten und Lymphozyten in diesem komplexen Mechanismus. Daher wurde zusätzlich die molekulare Expression von Cathepsin B und Stefin B in diesen Zellpopulationen untersucht und mit den klinisch-pathologischen Parametern in Beziehung gesetzt.

Zunächst wurden die beiden molekularbiologischen Techniken *in-situ* Hybridisierung und *in-situ* RT PCR an Gewebeschnitten etabliert. Bei der Auswahl der Gewebeschnitte standen Kryostat- und Paraffinpräparate zur Verfügung. Wir entschieden uns für die Verwendung von in Paraffin eingebettetem Gewebe, da damit die Möglichkeit bestand, retrospektive Studien zur Untersuchung der mRNA-Expression durchzuführen.

Als wesentliche Parameter zur erfolgreichen Durchführung der *in-situ* Hybridisierung erwies sich eine optimal eingestellte Konzentration der Proteinase K, eine optimal gewählte

Hybridisierungstemperatur auf dem Gewebeschnitt sowie der spezifische Nachweis der Reaktionsprodukte. Für die notwendige Penetration der 789 b langen Cathepsin B-mRNA Sonde ermittelten wir eine Proteinase K Konzentration von 50 µg/ml. Die Hybridisierungstemperatur betrug 50 °C. Der Nachweis der Hybridisierungsprodukte erfolgte durch Verstärkung des Reaktionssignales mit Tyramin.

Zur Lokalisation geringster Mengen von Cathepsin B- und Stefin B-mRNA nutzten wir die sensitive Methode der *in-situ* RT PCR. Für die Aufbereitung der Gewebeschnitte, um die Diffusion der 30 b kurzen Primer in die Zellkompartimente zu ermöglichen, genügte bereits eine Proteinase K Konzentration von 25 µg/ml. Die experimentell ermittelten Temperaturen zur Anlagerung der Primer für Cathepsin B und Stefin B betrug 61 °C bzw. 63 °C. Sowohl die reverse Transkription als auch die Amplifikation erfolgte unter Verwendung der rTth-Polymerase. Der Nachweis der Reaktionsprodukte erforderte hier keine aufwendige Verstärkungsreaktion mit Tyramin.

Durch Anwendung der *in-situ* Hybridisierung wurden insgesamt 32 Tumorgewebeschnitte unterschiedlicher Histologie auf die Expression der Cathepsin B-mRNA untersucht. Mit *in-situ* RT PCR wurden 99 Gewebeschnitte auf Cathepsin B-mRNA und 82 Gewebeschnitte auf Stefin B-mRNA getestet. Sowohl mit *in-situ* Hybridisierung als auch mit *in-situ* RT PCR konnte in Tumorzellen und in Histozyten in 83,3 % - 90,6 % der untersuchten Präparate eine Expression der Cathepsin B-mRNA nachgewiesen werden. Die Lokalisation von Stefin B-mRNA in Tumorzellen gelang lediglich in 53,7 % der untersuchten Primärtumoren, während Histozyten in 81,4 % der untersuchten Präparate Stefin B-mRNA aufwiesen.

Für Plattenepithel- und Adenokarzinome ergab sich in 83,8 % und in 85,4 % der Primärtumore eine positive Expression von Cathepsin B-mRNA in den Tumorzellen. Im Gegensatz dazu zeigten Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome in 47,1 % und in 48,4 % der untersuchten Präparate eine Expression der Stefin B-mRNA in den Tumorzellen.

Die Ergebnisse dieser Experimente belegen somit, dass die Stefin B-mRNA lediglich in ca. 50 % der untersuchten Gewebeschnitte in Tumorzellen vorhanden ist, während die Expression von Cathepsin B-mRNA in ca. 80 % der Präparate auftrat. Dies lässt auf ein bestehendes Ungleichgewicht zwischen Cathepsin B und Stefin B in den Tumorzellen schließen. In den Histozyten der untersuchten Gewebeschnitte fanden wir hinsichtlich der Expression von Cathepsin B-mRNA und Stefin B-mRNA keinen Unterschied. Eine eindeutige Korrelation zwischen dem Tumorstadium und der Expression von Cathepsin B- und Stefin B-mRNA war

nicht erkennbar. Dennoch ergab sich für die Expression der Cathepsin B-mRNA eine auffällige Tendenz. Bei steigendem Lymphknotenbefall der Patienten stieg die Expression der Cathepsin B-mRNA in den Tumorzellen.

Überraschend war für uns der Nachweis der Cathepsin B-mRNA in Lymphozyten. Durch *in-situ* Hybridisierung konnten wir in 27,3 % der untersuchten Gewebeschnitte Cathepsin B-mRNA in diesen Zellen nachweisen. Nach Amplifikation geringster Mengen von Cathepsin B-mRNA durch *in-situ* RT PCR steigerte sich die Anzahl der positiven Präparate mit Cath B-mRNA auf 76,6 %. Damit scheint die Cathepsin B-mRNA in der Mehrzahl der untersuchten Präparate in Lymphozyten in geringsten Mengen exprimiert zu sein. Die Untersuchung der Gewebeschnitte auf Stefin B-mRNA Expression in Lymphozyten erfolgte in 81 Primärtumoren. Hier zeigten 56,8 % der Präparate positive Lymphozyten. Betrachtet man die beiden häufigsten Tumorhistologien nämlich das Plattenepithelkarzinom und das Adenokarzinom, zeigten die Lymphozyten in 74,2 % der Gewebeschnitte der Plattenepithelkarzinome eine Stefin B-mRNA Expression. Im Gegensatz dazu gelang der Nachweis der Stefin B-mRNA in Gewebeschnitten von Adenokarzinomen nur in 50,0 % der untersuchten Fälle in Lymphozyten. Das Vorliegen von Cathepsin B-mRNA und Stefin B-mRNA in Lymphozyten lässt eine wichtige Regulationsfunktion dieser beiden Proteine beim Ablauf der Immunantwort vermuten. Unsere Ergebnisse zeigen ferner, dass es zwischen der Immunantwort in Patienten mit Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom einen Unterschied zu geben scheint.

Zusammenfassend deuten unsere Ergebnisse auf ein Ungleichgewicht zwischen Cathepsin B und Stefin B auf transkriptioneller Ebene in Tumorzellen von Plattenepithel- und Adenokarzinomen hin.

