

**Bedeutung der *Helicobacter pylori* - induzierten
Cathepsin X-Expression für die Magenkarzinogenese:
Untersuchung am transgenen Mausmodell**

DISSERTATION

von Diplom-Biologin Anja Bernhardt

ZUSAMMENFASSUNG

H. pylori wurde im Jahr 1994 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zum Klasse-I-Karzinogen erklärt. Das Bakterium ist ein extrazelluläres Pathogen, welches die humane Magenschleimhaut besiedelt und eine lokale Immunantwort induziert. Die Infektion mit dem *H. pylori* führt zur Entstehung von chronischer Gastritis, Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren oder der Ausbildung maligner Tumore des Magens. Die Cathepsine B, L, K, W und ebenfalls das untersuchte Cathepsin X, werden unterschiedlich stark in der entzündeten und neoplastischen Magenschleimhaut exprimiert. Eine zunehmende Zahl von Daten aus der Fachliteratur weist immer deutlicher darauf hin, dass zwar das CTSB die dominante Cysteinprotease ist, jedoch ausschließlich für das CTSX konnte eine signifikante Induktion in Magenbiopsien bei *H. pylori*-infizierten Patienten nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu vielen anderen Cysteinproteasen ist die Funktion, Regulation, die *H. pylori*-spezifische Induktion von CTSX und deren Bedeutung in der Magenkarzinogenese *in vivo* und *in vitro* unverstanden und wurde daher im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung eines transgenen Mausmodells evaluiert. Es wurden zusätzlich zu den etablierten Zellkulturmodellen primäre Zellkulturen direkt aus der Maus (primäre Epithelzellen aus WT- und C57BL/6*ctsx*^{-/-}) etabliert, um der Situation *in vivo* zu entsprechen. Mit diesem Zellsystem konnten *in vivo*-nah spezifische Funktionen des induzierten CTSX im Rahmen der *H. pylori*-induzierten Magenkarzinogenese identifiziert und bereits beobachtete Effekte *in vivo* bestätigt werden. Des Weiteren konnte in den *ctsx*^{-/-}-Epithelzellen nach *H. pylori*-Infektion eine Tendenz zur stärkeren Induktion der proinflammatorischen Zytokine gezeigt werden. Außerdem konnte in Konfrontations-Zellkulturen der Einfluss von CTSX auf die Makrophagen-Migration über den Faktor MIF-1 nachgewiesen werden. Über eine cDNA-Mikroarray-Analyse wurde CTSX ebenfalls mit Faktoren der T-Zell- und B-Zell-Proliferation in Verbindung gebracht, so dass eine gut koordinierte und eindeutige Wirkung von CTSX in den entzündlichen Prozessen gegeben ist.

Die Forschung zielt mittlerweile auf eine möglichst komplette Inventur der Proteine sowie die Beschreibung des Netzwerkes an Protein-Wechselwirkungen in einer Zelle oder einem Organismus ab, welche charakteristisch sind für den spezifischen zellulären Zustand und die

Funktion der Proteine. Die Laser-Mikrodissektion (LCM) in Kombination mit der PCR-Array-Technologie stellt hierfür ein ideales Werkzeug dar. Über drei verschiedene Zeitpunkte (24, 36, 50 Wochen nach *H. pylori*-Stimulation) in vier verschiedenen Magenzellpopulationen wurden sechs Zytoskelett-assoziierte Gene identifiziert, die differentielle Expressionsmuster in *ctsx*^{-/-}- versus WT-Zellpopulationen aufzeigten. WASP, MYLK sowie PP2A wurden als Interaktionsmoleküle von CTSX postuliert und stellen die Basis für zukünftige Struktur-/Funktionsanalysen zur Klärung der funktionellen Bedeutung des CTSX im Rahmen der Magenkarzinogenese dar.

SUMMARY

In 1994 *H. pylori* was declared class I carcinogen by the WHO. The bacterium is an extracellular pathogen which colonizes the human stomach in the area of the antrum and corpus region and induces a local immune reaction in the stomach lining. The infection with *H. pylori* leads to the generation of chronic gastritis, stomach and duodenal ulcers or the formation of malignant tumors of the stomach. The cathepsin B, L, K, W and CTSX, which was analysed here, are differently expressed in the inflamed and neoplastic stomach. An increasing number of data from the literature show a significant induction exclusively for the CTSX in stomach biopsies from *H. pylori* infected patients, although CTSB is the dominant cysteine protease. Unlike many other cysteine proteases the function, regulation, the *H. pylori*-specific induction of the CTSX and its meaning are largely not understood in stomach carcinogenesis *in vivo* and *in vitro* and therefore we used *ctsx*-deficient mice in a *H. pylori* gastritis mouse model. In addition to the established cell culture model we isolated mouse primary epithelial cells directly from WT and C57BL/6 *ctsx*^{-/-} -mice, to mimic the *in vivo* situation. With this cell system we could identify *in vivo*-near the specific functions of the induced CTSX in the context of *H. pylori*-induced stomach carcinogenesis and thus we could confirm former results *in vivo*. In addition, *ctsx*^{-/-} -epithelial cells show a tendency for higher proinflammatory cytokine induction after *H. pylori* infection. Furthermore the influence of CTSX on macrophage migration could be proved with the factor MIF-1 in confrontation cell cultures. By using cDNA microarray assays we also found a connection between CTSX and the factors of T- and B-cell proliferation, so that there is a well coordinated and clear effect of CTSX in the inflammatory processes.

Meanwhile, the research is aimed at a complete description of the protein as well as an analysis of protein interaction in cells or organisms, which are characteristic for the specific cellular condition and the function of the proteins. The laser-microdissection (LCM) in combination with the PCR array technology represents an ideal model for this investigation. Using four different stomach cell populations and 3 different time points (24, 36, 50 weeks after *H. pylori*-stimulation), we identified 6 cytoskeleton-associated genes, that show differential expression patterns in *ctsx*^{-/-} - versus WT cell populations. WASP, MYLK as well as PP2A were postulated as interaction molecules of CTSX and represent the baseline for future structure-/ functional analyses for the clarification of the functional meaning of CTSX in the context of the gastric carcinogenesis.