

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 Proteinasen 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

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>VERZEICHNIS DER IM TEXT VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>EINLEITUNG.....</b>   | <b>3</b>  |
| 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        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>   | <b>21</b> |
| 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    | Reagenzien und Geräte.....   | 28        |
| 3.4.2    | Probenbestimmung.....  | 29        |
| 3.5      | RT-PCR Analyse.....  | 29        |
| 3.5.1    | RNA-Isolierung.....  | 29        |
| 3.5.2    | Reverse Transkription.....   | 29        |
| 3.5.3    | Polymerase Chain Reaction (PCR).....   | 29        |
| 3.5.4    | Reagenzien und Geräte.....   | 31        |
| 3.6      | Aktivitätsbestimmung der lysosomalen Proteinase Cathepsin L und B.....   | 32        |
| 3.6.1    | Prinzip.....   | 32        |
| 3.6.2    | Probenbestimmung.....  | 32        |
| 3.6.3    | Geräte.....  | 33        |
| 3.7      | Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....   | 33        |
| 3.7.1    | Prinzip des ELISA.....   | 33        |
| 3.7.2    | Reagenzien und Geräte.....   | 34        |
| <b>4</b> | <b>ERGEBNISSE.....</b>   | <b>34</b> |
| 4.1      | Messenger RNA-Nachweis von Cathepsin L, B und D mittels RT-PCR.....  | 34        |
| 4.2      | Analysen auf Proteinebene.....   | 35        |
| 4.2.1    | Proteingehalt der Zellhomogenate.....  | 35        |
| 4.2.2    | Western Blot: Cathepsin L-, B- und D-Konzentration im Zytoplasma.....  | 37        |
| 4.2.3    | ELISA: Procathepsin L- und Cathepsin L-Konzentration im Zytoplasma.....  | 41        |
| 4.2.4    | Nachweis von sezerniertem Cathepsin L im konditionierten Medium durch Western Blot.....                                      | 44        |
| 4.2.5    | Quantitative Bestimmung von sezerniertem Procathepsin L und Cathepsin L im Kulturmedium durch ELISA.....                     | 44        |
| 4.2.6    | Aktivität der sezernierten Cathepsine L und B.....   | 47        |
| 4.3      | Zellproliferationsassay.....   | 49        |
| <b>5</b> | <b>DISKUSSION.....</b>   | <b>50</b> |
| 5.1      | Wachstumsfaktoren und ihre Bedeutung für maligne Tumoren.....  | 50        |
| 5.1.1    | Der Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Proteinsynthese und Proliferation von Tumorzellen.....                                | 50        |
| 5.1.2    | Wachstumsfaktoren und der Grad der Tumordifferenzierung.....   | 51        |
| 5.1.3    | Der Einfluß von Wachstumsfaktoren auf Cathepsinexpression und -sekretion.....  | 52        |
| 5.1.4    | Wachstumsfaktoren als Malignitätskriterien und Prognosefaktoren.....   | 54        |
| 5.2      | Die Beteiligung der Cathepsine L, B und D an nichtmalignen Prozessen der Gewebeinfiltration, -destruktion und -invasion..... | 55        |
| 5.2.1    | Physiologische Invasionsprozesse.....  | 55        |
| 5.2.2    | Pathologie der Entzündung.....   | 56        |
| 5.2.3    | Parasitäre Invasion.....   | 56        |
| 5.3      | Die Rolle von Cathepsin L, B und D und ihrer Inhibitoren in malignen Tumoren.....  | 57        |
| 5.3.1    | Die Überexpression lysosomaler Proteinase – ein typisches Phänomen maligner Tumoren.....                                     | 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        |
| <b>6</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....   | <b>68</b> |
| <b>7</b> | <b>ANHANG</b> .....   | <b>I</b>  |
| 7.1      | Chemikalienverzeichnis .....  | I         |
| 7.2      | Thesen .....  | III       |
| 7.3      | Publikationsverzeichnis .....   | V         |
| 7.4      | Lebenslauf.....   | VI        |
| 7.5      | Selbstständigkeitserklärung .....   | VIII      |
| 7.6      | Danksagung .....  | IX        |

## 1 Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

|                       |  |
|-----------------------|--|
| ABTS                  | 2,2-Azino-bis-[3-ethylbenzthiazolinesulfonat(6)]-diammoniumsalz      |
| AML M3                | Akute Myeloische Leukämie M3   |
| AS                    | Aminosäure   |
| ATP                   | Adenosintriphosphat  |
| cAMP                  | Zyklisches Adenosinmonophosphat                                      |
| c-DNA                 | Komplementäre DNA  |
| <i>c-myc</i> -Oncogen | <b>Myelocytomatosis-cellular-Oncogene</b>                            |
| DAG                   | Diacylglycerol   |
| DEPC                  | Diethylpyrocarbonat  |
| DMEM-Ham`s F12        | Dulbecco`s-Minimal-Essential-Medium mit HAM`s-F12-Nährstoffergänzung |
| DMSO                  | Dimethylsulfoxid   |
| DNA                   | Desoxyribonukleinsäure   |
| dNTP-Mix              | Deoxyribonukleotidtriphosphat-Mix                                    |
| DTE                   | Dithioerythritol   |
| DTT                   | Dithiothreitol   |
| EdGF                  | Endothelium-derived Growth Factor                                    |
| EDTA                  | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| EGF                   | Epidermal Growth Factor  |
| EGFR                  | Epidermal Growth Factor Receptor                                     |
| ELISA                 | Enzyme Linked Immunosorbent Assay                                    |
| erbB                  | Familie von Tyrosinkinaserzeptoren für EGF                           |
| FCS                   | Fetales Kälberserum (fetal calf serum)                               |
| FGF                   | Fibroblast Growth Factor   |
| FTC                   | Follikuläres Schilddrüsenkarzinom                                    |
| HLA-DR1               | Humane Leukozytenantigen Klasse II                                   |
| HSP70                 | Heat-Shock Protein 70  |
| $I^{131}$             | Iodisotop zur Radiojodtherapie                                       |
| IGF                   | Insulin-like Growth Factor   |
| IgG                   | Immunglobulin G  |
| IL                    | Interleukin  |
| IP3                   | Inositol-1,4,5-trisphosphat  |
| LDPI                  | Lysosomale Dipeptidase I   |
| LMP                   | lysosomale Membranpermeabilisierung                                  |
| MAP                   | Mitogen-activated Protein  |
| MAP-K                 | Mitogen-activated Protein Kinase                                     |
| MMP                   | Matrix Metalloproteinase   |
| MODY                  | Multi-Organ-Dysfunktion  |
| MOF                   | Multi-Organ-Failure  |
| MPS                   | Mononukleäres-Phagozytose-System                                     |
| mRNA                  | Messenger-RNA  |
| NADH                  | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid                                  |

|                     |   |
|---------------------|---|
| PAI                 | Plasminogen activator inhibitor                                       |
| PBS-BSA             | Phosphate buffered Saline (PBS) containing Bovine Serum Albumin (BSA) |
| PBS-TWEEN®20        | TWEEN®20 in Phosphate buffered saline (PBS)                           |
| PC                  | Pneumocystis Carinii  |
| PCI                 | Potato-Carboxypeptidase-Inhibitor                                     |
| PCR                 | Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)                 |
| PDGF                | Platelet-derived Growth Factor  |
| PKA                 | Proteinkinase A   |
| PKB                 | Proteinkinase B   |
| PKC                 | Proteinkinase C   |
| PMA                 | Phorbol-Myristat-Azetat   |
| PTC                 | Papilläres Schilddrüsenkarzinom                                       |
| <i>PTC</i> -Oncogen | Papillary Thyroid Carcinoma-Oncogen                                   |
| <i>ras</i> -Oncogen | <b>Rat-Sarcoma-Proto-Oncogen</b>                                      |
| <i>ret</i> -Oncogen | <b>Rearranged-during-transfection-Protooncogen</b>                    |
| RFU                 | Relative Fluorescence Units   |
| RNA                 | Ribonukleinsäure  |
| RT-Mix              | Mix für Reverse Transkription   |
| RT-PCR              | Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion                       |
| SD                  | Schilddrüse   |
| SDS                 | Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)                         |
| T3                  | Triiodthyronin  |
| T4                  | Tetraiodthyronin (Thyroxin)   |
| Taq-DNA Polymerase  | DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>                |
| TBE-Puffer          | Tris-Borsäure-EDTA -Puffer  |
| TEMED               | Tetramethylethylendiamin  |
| TE-Puffer           | Tris, EDTA -Puffer  |
| TGF                 | Transforming Growth Factor  |
| TIMP                | Tissue Inhibitor of Metalloproteinases                                |
| TM                  | Tumor   |
| TNF $\alpha$        | Tumornekrosefaktor- $\alpha$  |
| TPO                 | Schilddrüsenperoxidase (Thyroid peroxidase)                           |
| TRH                 | Thyreotropin-releasing Hormon   |
| Tris                | Trishydroxymethylaminomethan  |
| <i>trk</i> -Oncogen | <b>Tropomyosin-Rezeptorkinase-Oncogen</b>                             |
| TSH                 | Thyreoid-stimulierendes Hormon, Thyreotropin                          |
| TSHR                | Thyreotropin-/TSH-Rezeptor  |
| TWEEN® 20           | Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat                                |
| uPA                 | Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator                                   |



## 2 Einleitung

### 2.1 Grundlagen der Tumorbiologie

Existenz, Wachstum und Fortpflanzung höherer Organismen basieren auf zwei wesentlichen Voraussetzungen, der Kompartimentierung der einzelnen Zelle sowie der Spezialisierung verschiedener Zelltypen auf definierte Aufgaben innerhalb des Organismus. Realisiert wird diese diffizile Organisation von Zellen durch rigide Kontrollmechanismen, denen sich die spezialisierte Zelle nicht entziehen kann. Tumorzellen jedoch können diese normalen Regulationsprozesse umgehen. Die Zellen eines Tumors stammen von einer gemeinsamen Ursprungszelle ab, die meist Jahrzehnte, bevor das Malignom manifest wird, erstmals Genmutationen aufweist. Proto-Onkogene und Tumorsuppressor-Gene dirigieren in ihrer nativen Form den Lebenszyklus der Zelle und steuern Vorgänge wie Proliferation und Wachstum. Mutationen dieser Gene werden für eine Überstimulation der zellulären Teilungsmaschinerie in malignen Tumoren verantwortlich gemacht [232].

Neben Autonomie ist Unsterblichkeit ein weiteres Phänomen malignen Wachstums. Mutationen, die den physiologischen Prozess der Zellalterung hemmen, ermöglichen es prämaligen Zellen, über lange Zeiträume Mutationen zu akkumulieren und damit die Entstehung der Tumorzelle zu fördern [73, 214, 232].

Darüber hinaus ist Malignität gekennzeichnet durch die Fähigkeit zu Infiltration, Invasion und Metastasierung. Tumorzellen brechen aus ihrem Zellverband aus und gelangen in benachbartes gesundes Gewebe. Auf diesem Weg lösen sie Strukturen der extrazellulären Matrix auf. Da das Gerüst des extrazellulären Raumes hauptsächlich aus Proteinen besteht, sind proteolytische Enzyme essentiell für Infiltration und Invasion [184].

Zusätzlich greifen Mechanismen, die die Veränderung von zellulären Regulationsprozessen, Adhärenzeigenschaften, Angiogenese, ‚Immunescape‘-Phänomenen, interzellulärer Kommunikation und die Synthese von Stromaproteinen betreffen, in das Malignitätsgeschehen ein.

### 2.2 Tumorassoziierte Proteolyse

Die gerichtete tumorassoziierte Proteolyse der extrazellulären Matrix und der Basalmembranen spielt bei infiltrativen, invasiven Prozessen und bei der Metastasierung solider Tumoren eine zentrale Rolle [32, 45, 66, 121, 209]. Vier verschiedene Klassen von Proteasen sind in diese Vorgänge involviert:

|                     |                                |
|---------------------|--------------------------------|
| Serin-Proteasen:    | z.B.: Urokinase (uPA), Plasmin |
| Cystein-Proteasen:  | z.B.: Cathepsine L, B, H, S, V |
| Aspartat-Proteasen: | z.B.: Cathepsin D              |

Matrixmetalloproteasen (MMP): z.B.: Kollagenasen, Gelatinasen

Limitiert wird das Ausmaß der Proteolyse durch spezifische Proteinaseinhibitoren, wie bestimmte Cystatine (für die Cathepsine L, B, H und S), TIMPs (Tissue Inhibitor of MMP),  $\alpha$ 2-Makroglobulin als Plasmin-Inhibitor und Plasminogenaktivator-Inhibitoren PAI-1/2.

Die Proteinase können im Interstitium in Form komplexer proteolytischer Kaskaden ineinander greifen und entfalten so ein potentes Werkzeug der Gewebedegradierung. Cathepsine nehmen hierbei neben uPA eine Schlüsselrolle ein. Am Beginn einer Kaskade scheint oft die Aspartatproteinase Cathepsin D zu stehen, die sich autokatalytisch aktiviert und in einem weiteren Schritt die Cysteinproteinase Cathepsin L und B aktiviert. Cathepsine L und B scheinen darüber hinaus auch autokatalytischen Aktivierungsprozessen zu unterliegen. Sie vermögen es, u. a., noch inaktiven Pro-uPA in seine aktive Form zu überführen, welche wiederum Plasmin freisetzt. Aktives Plasmin und Cathepsin L und B wirken einerseits selbst stromadegradierend, andererseits aktivieren sie MMPs, welche an der Auflösung der Basalmembranen essentiell beteiligt sind [66, 104, 121, 128, 145, 151, 175, 208].

Diese extrazellulär initiierten proteolytischen Kaskaden sind keine rein tumorspezifischen Prozesse, vielmehr bemächtigt sich die Tumorzelle biologischer Prozesse, die Teil vieler physiologischer Vorgänge sind, und alteriert sie. So lassen sich komplexe proteolytische Vorgänge in Prozessen des Proteinumbaus, der Wundheilung, der Inflammation, des Wachstums, der Angiogenese, der Metastasenbildung und Trophoblasteninvasion nachweisen.

## 2.3 Lysosomale Proteinase

### 2.3.1 Die lysosomalen Proteinase Cathepsin L , B und D

Der Terminus „Cathepsin“ wurde erstmalig 1928 benutzt, um ganz allgemein zelluläre Proteinase zu beschreiben, die im sauren Milieu aktiv sind [238]. Das Wort leitet sich aus dem Altgriechischem ab und bedeutet Verdauung ( $\kappa\alpha\tau$ ,-: gänzlich;  $\pi\epsilon\psi\iota\zeta$ : die Verdauung). Heute steht die Bezeichnung Cathepsine für eine Gruppe von Proteinase, die unterschiedlichen Enzymklassen angehören und deren intrazelluläre Aktivität primär auf das lysosomale Kompartiment beschränkt ist. Nach der für die Katalyse essentiellen Aminosäure im aktiven Zentrum der Cathepsine werden Cystein- (Cathepsin L, B, H, S, C, V), Serin- (Cathepsin A, G) und Aspartatproteinase (Cathepsin D, E) unterschieden. Hinsichtlich ihrer proteolytischen Wirkung gibt es sowohl Endopeptidasen (Cathepsin L und D), Exopeptidasen (Cathepsin A und C) als auch Proteinase mit Endo- und Exopeptidaseaktivität (Cathepsin B und H). Als Endopeptidasen leiten Cathepsine den Proteinabbau ein. Die entstehenden Proteinfragmente können anschließend effektiv über Exopeptidasen abgebaut werden.

Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit analysierten Cathepsine aus biochemischer Sicht näher charakterisiert:

*Cathepsin L (EC 3.4.22.15)*

Cathepsin L, 1974 erstmals in Extrakten aus Rattenleberlysosomen nachgewiesen [101], ist eine Cysteinproteinase mit ausschließlicher Endopeptidaseaktivität. Es ist codiert auf Chromosom 9q21-q22 [146]. Als Präproenzym zählt Cathepsin L 334 Aminosäuren (AS). Nach N-terminaler Abspaltung eines aus 17 AS bestehenden Signalpeptids und durch Cathepsin D oder bei niedrigem pH autokatalytisch vermittelter Abtrennung des 96 AS zählenden Propeptids [85, 127, 202] entsteht die reife Form des Cathepsin L von 217 [166] bzw. 221 AS [91]. Das reife Enzym besitzt eine Molmasse von 27 kDa und besteht als Zweikettenform aus einer über Disulfid-Brücken verbundenen schweren (175 AS; 24 kDa) und einer leichten Kette (42 AS; 4 kDa). Darüber hinaus läßt sich das reife Enzym in Geweben als aktive Einkettenform (217 AS, 27 kDa) nachweisen. Die größte proteolytische Aktivität zeigt das Enzym in einem pH-Bereich von pH 4,0 bis 6,0. In einem Milieu von pH-Werten oberhalb pH 7,0 wird es inaktiviert. Es zeigt sich jedoch, dass Cathepsin L als Proenzym oder durch Komplexierung mit spezifischen Inhibitoren (Cystatine) eine pH-stabile Form einnehmen kann. Diese ermöglicht eine spätere Freisetzung des aktiven Enzyms [26, 36, 40, 106, 157, 217, 240].

*Cathepsin B (EC 3.4.22.1)*

Humanes Cathepsin B ist eine lysosomale Proteinase, die zur Gruppe der Cysteinproteinasen zählt. Es ist codiert im Genlokus 8p22-23 und wird als Präproenzym bestehend aus 339 AS (37 kDa) synthetisiert. Nach Abspaltung eines Signalpeptids (17 AS) entsteht die Proform von 322 AS und infolge der Aktivierung durch Cathepsin D oder autokatalytisch in saurem Milieu schließlich die reife Enzymform (260 AS, 28 bis 30 kDa). Reifes Cathepsin B liegt wie Cathepsin L je nach Gewebe als Ein-Ketten- oder als Doppelkettenenzym vor. Die beiden Ketten, eine schwere Kette von 209 AS (23 kDa) und eine leichte Kette von 47 AS (5 kDa), werden über Disulfidbrücken verbunden. Das Enzym besitzt ein pH-Optimum zwischen pH 6,0 bis 6,5 und ist funktionell sowohl Endo- als auch Peptidyl-dipeptidase [71, 167, 189, 242].

*Cathepsin D (EC 3.4.23.5)*

Die lysosomale Proteinase Cathepsin D, erstmalig beschrieben durch Hedin 1904, wurde 1960, als den Cathepsinen zugehörig, wiederentdeckt [6, 204]. Sie zählt zu den Aspartatproteasen und ist funktionell eine Endopeptidase. Ihr pH-Optimum liegt zwischen pH 3,0 bis 5,0. Das Proenzym (52 kDa) wird meist autokatalytisch durch N-terminale Abspaltung der 44 AS Prosequenz in die reife Enzymform (48 kDa) überführt. Diese kann sowohl einkettig bleiben oder in eine leichte (14 kDa) und eine schwere Kette (34 kDa) gespalten werden, ohne dabei an Aktivität zu verlieren. Das Cathepsin D-Gen ist auf Chromosom 11q lokalisiert. Zu den Cystein-Cathepsinen bestehen nur wenige Gemeinsamkeiten, hingegen findet sich eine strukturelle Verwandtschaft mit Renin, Pepsin und Chymosin. Dies legt die Vermutung nahe, dass

Cathepsin D ein phylogenetisch sehr altes Enzym und Vorläufer der Verdauungsenzyme ist, das bei Einzellern als intrazelluläres Verdauungsenzym fungierte [7].

### **2.3.2 Die physiologische Rolle von Cathepsinen im Zellstoffwechsel**

Lysosomen sind membranumschlossene Zellorganellen, die im Dienst kataboler Stoffwechselvorgänge der Zelle stehen. Sie besitzen die höchste proteolytische Kapazität aller Zellorganellen [100]. Ihr reiches Repertoire an hydrolytischen Enzymen ermöglicht es ihnen, fast alle Zellsubstanzen abzubauen. Der intralysosomale pH beträgt 4 - 5 und wird durch eine ATP-abhängige Protonenpumpe aufrechterhalten [177]. Im sauren Milieu entfalten die lysosomalen Proteinase ihre optimale Aktivität. Gleichzeitig wird die Suszeptibilität der Substratproteine gegenüber einem proteolytischen Angriff gesteigert [10]. Es ist anzunehmen, dass die lysosomale Proteolyse durch Endopeptidasen (Cathepsin L, D, B, H) initiiert und durch Exopeptidasen (Cathepsin B, H) fortgesetzt wird [10].

Die Funktion der lysosomalen Proteinase Cathepsin B, L und D geht jedoch über eine einfache Beteiligung am terminalen intrazellulären Proteinabbau hinaus [148]. Sie sind Mediatoren spezifischer, proteolytischer Prozessierungsschritte, wie in der Melaninsynthese von Melanozyten [21, 25, 42]. So konnten Cathepsine auch in den Sekretgranula verschiedener hormonproduzierender Zellen, wie Thyreozyten [14, 47, 50, 205], Leydigzellen [11], Nierentubulusepithel (Reninliberation), Mikrogliazellen des Rückenmarks, die in die Regulation von Neuropeptiden involviert sind [201], und Hypophysenzellen [230] nachgewiesen werden [33]. Sie nehmen unter Beteiligung von Cathepsin L eine Schlüsselposition in der Antigenprozessierung der MHC II-Komplexe ein [55, 154] und sind beteiligt am regulären Umbau der glomerulären Basalmembran [5]. Daneben ist bekannt, dass die Enzyme unter physiologischen Bedingungen sezerniert werden können. Cathepsin L wirkt, von Sertolizellen sezerniert, komplex regulierend auf die Spermatogenese ein und wird als Proform im Epididymis in das Sperma abgegeben [96, 153, 211, 239]. Im Unterschied zu Matrix-Metalloproteasen (MMP) werden Cathepsine (L, B und D) von Makrophagen und Stromazellen sezerniert, um am physiologischen Remodeling der extrazellulären Matrix teilzunehmen [164]. Die Nidation einer Blastozyste in der Uterusschleimhaut und die damit verbundene Gewebedegradierung und –destruktion des Trophoblasten lassen sich als ein kontrollierter, infiltrativer Prozess auffassen, der extrazellulär maßgeblich von Cathepsinen getragen wird [138]. Die Cathepsine L, B und D werden darüber hinaus von Ratten-Osteoklasten synthetisiert, wobei Cathepsin L und B im Gegensatz zu Cathepsin D rasch in die extrazelluläre Matrix sezerniert werden, um an der Degradierung der Knochenmatrix partizipieren zu können [65, 94, 109, 152]. Im humanen Organismus scheint Cathepsin K die Rollen von Cathepsin L und B im Knochen zu übernehmen [44].

Weiterhin verlangen Vorgänge der Zelldifferenzierung eine Beteiligung von Cathepsin L, B und D. Dies ließ sich in der Differenzierung von Keratinozyten [198], in der Metamorphose von Insekten [83] und den Zellfusionsprozessen der Entwicklung von Myoblasten [51, 87] darstellen.

### 2.3.3 Pathophysiologische Funktionen von Cathepsinen bei nichtmalignen Erkrankungen

Lysosomale Proteasen sind zusätzlich in eine Vielzahl pathophysiologischer Prozesse involviert, wie Speichererkrankungen, Entzündungen, Infektionen und Regenerationsvorgängen. Eine Zusammenstellung pathologischer Prozesse unter Beteiligung der Cathepsine L, B und D ist in *Tabelle 1* aufgeführt.

*Tabelle 1: Pathologische Prozesse unter Beteiligung der Cathepsine L, B und D.*

| Prozess                                 | Details  | Literatur          |
|---|--|--------------------|
| Pankreatitis                            | Cathepsin B aktiviert Trypsinogen im exokrinen Pankreas als zentraler Pathomechanismus im Rahmen einer Pankreatitis.   | [72, 154]          |
| Arthritis                               | Cathepsin L, B und D sind an der Interleukin 1-aktivierten proteolytischen Degradierung von Knorpel-Proteoglykanen beteiligt.  | [18, 98, 102, 163] |
| Pneumocystis carinii (PC) Pneumonie     | Die Aktivitäten der Cathepsine L, B und H waren deutlich erhöht in PC -infizierten Lungen.   | [77]               |
| Chronische Transplantatabstoßung        | In Nierenpatienten ließen sich im Rahmen einer chronischen Abstoßungsreaktion intraglomerulär deutlich erhöhte Aktivitäten der lysosomalen Proteinase Cathepsin L und B nachweisen, als Mediatoren der proteolytische Zerstörung der glomerulären Strukturen. (Cathepsine als Effektoren der chronischen Inflammation) | [149, 150]         |
| Chronisch destruierendes Lungenemphysem | Elastinolytische Enzyme, wie Cathepsin L und B, sezerniert von Alveolarmakrophagen, zeigten deutlich erhöhte Spiegel bei Rauchern mit chronisch destruierendem Lungenemphysem.   | [195]              |
| Morbus Alzheimer                        | In senilen Plaques des Morbus Alzheimer lassen sich extrazellulär hohe Konzentrationen an aktiven Cathepsinen L, B und D nachweisen.   | [4, 9]             |
| AIDS-Enzephalopathie                    | Die Freisetzung von Cathepsin L und B durch aktivierte Mikroglia scheint eine zentrale Rolle im Pathomechanismus zahlreicher entzündlicher und demyelinisierender Erkrankungen des Gehirns zu spielen.   | [4]                |
| Leberzirrhose                           | Erhöhte Cathepsin L- und B- Spiegel in humanen Leberzirrhosen  | [241]              |
| Tumorkachexie                           | Gesteigerte Expression von Cathepsin L, B und D in Muskelzellen, vermittelt durch Interleukin 6, spielt möglicherweise eine wichtige Rolle in der Genese der Tumorkachexie, die sich durch Anti-IL6-Antikörper inhibieren lässt.   | [59]               |
| Gingivitis, Periodontitis               | Deutliche Korrelation zwischen Cathepsin L-, B- und D-Aktivität im gingivalen Sekret und Schwere der Periodontitis.  | [29, 53, 213]      |
| Neuronale Zeroid-Lipofuszinose          | Abnormale lysosomale Cathepsin-Aktivitäten lassen sich in zahlreichen Fällen neurodegenerativer Speicherkrankheiten finden, mit z.T. deutlich verminderten Enzymaktivitäten.   | [8]                |
| Myopathien                              | Erhöhte Aktivitäten von Cathepsin L und B in Myozyten von Myopathie-Patienten.   | [89, 215, 216]     |

|  |   |            |
|--|---|------------|
| MODY/MOF   | Im Rahmen eines MODY oder MOF und der damit verbundenen systemischen Inflammationsreaktion lassen sich erhöhte Spiegel an Cathepsin B im Serum nachweisen.  | [90]       |
| Mukolipidosen, Mukopolysaccharidosen, Gangliosidosen | Patienten mit lysosomalen Speicherkrankheiten weisen häufig eine hochgradig reduzierte Kapazität ihrer endogenen lysosomalen Proteindegradierung auf, die Resultat deutlich verminderter Cathepsin-Aktivitäten zu sein scheint. | [105, 171] |

### 2.3.4 Cathepsine in malignen Tumoren

Zusätzlich zu den gewebespezifischen Funktionen sind Cathepsin L, B und D eng mit den Prozessen der Tumor-Infiltration, -Invasion und -Metastasierung verknüpft. Cathepsin L, B und D vermögen es, intrazellulär und extrazellulär, Komponenten der Basalmembran, wie Laminin und Kollagen Typ IV, aber auch viele extrazelluläre Matrixkomponenten, einschließlich Kollagen Typ I, Elastin, Fibronectin und Proteoglykane, zu degradieren [68]. Die Degradierung dieser Basalmembranen und des dichten Geflechts extrazellulärer Matrixkomponenten ist essentiell für die Mobilität maligner Zellen. Cathepsine sind neben MMPs, uPA und Kollagenasen zentraler Bestandteil eines verzweigten Proteasenetzes [63]. Die exponierte Stellung der Cathepsine wird zusätzlich durch ein saures Mikromilieu im Tumorstroma, das im pH-Optimum der Enzyme liegt, verdeutlicht. Es konnten erhöhte Niveaus an Cathepsin L, B und D für zahlreiche Tumoren, wie Kolon-, Nieren-, Hoden-, Bronchial-, Harnblasen-, Schilddrüsen-, Pankreas- und Magenkarzinome, sowie für die von ihnen abgeleiteten Zelllinien beschrieben werden [22, 126, 184]. Wesentliche Voraussetzung für die Aktivierung einer solch komplexen extrazellulären Proteolysekaskade ist die Fähigkeit der Tumorzelle, Prozessierungswege, die in einer Sekretion der lysosomalen Proteasen münden, zu rekrutieren. In transformierten Maus-Fibroblasten ließ sich unter dem Einfluß von Wachstumsfaktoren (PDGF) eine Verschiebung des intrazellulären Cathepsin L-Transportweges von lysosomal nach extrazellulär-sekretorisch bewirken [159]. Viele Malignome besitzen die Kompetenz, Cathepsine sowohl zu sezernieren, als auch auf ihrer Oberfläche zu binden [184, 242]. Derart in die Plasmamembran eingebettete, enzymatisch aktive Cathepsine (B, D), vermögen es, durch direkten Kontakt mit Basalmembranen oder anderen Makromolekülen diese zu fragmentieren und anschließend ihre Fragmente endozytotisch der terminalen lysosomalen Proteolyse zuzuführen [242].

Darüberhinaus scheint die Expression der o.g. Cathepsine vom Stadium der neoplastischen Transformation abhängig zu sein [243]. Zusätzlich lässt sich in vielen Malignomen eine Korrelation zwischen dem Grad der Cathepsinexpression und dem Tumorstadium, dem Malignitätsgrad sowie der Prognose der Erkrankung zeigen [116]. In *Tabelle 2* sind wichtige Befunde, die Zusammenhänge zwischen Cathepsin L, B, D und malignen Tumoren beschreiben, aufgeführt.

Tabelle 2: Zusammenhänge zwischen den Cathepsinen L, B, D und malignen Tumoren

| Tumor                     | Befund  | Literatur                   |
|---------------------------|---|-----------------------------|
| Kolorektales Karzinom     | Korrelation der intrazellulären Cathepsin L- und B-Konzentration mit dem Malignitätsgrad.   | [185, 192, 242]             |
| Melanom                   | Cathepsin B-, D- und L-Aktivitäten erhöht in Melanomzellen, sowie in Metastasen höher als im Primärtumor.   | [43, 93]                    |
| Magenkarzinom             | Die Expression von Cathepsin L und B sowie uPA in Magenkarzinomen korreliert direkt mit dem Grad der Entdifferenzierung, dem histologischen Typ, der Malignität und dem Metastasierungspotential.   | [158]                       |
| Hybridoma-Zellen          | Anti-Cathepsin L-Antikörper hemmen die Tumorprogression.  | [231]                       |
| Ovariakarzinom            | Erhöhte Cathepsin L-Spiegel   | [144]                       |
| Mammakarzinom             | Erhöhte Cathepsin L-, B- und D-Spiegel im Tumorgewebe;<br>Cathepsin D korreliert indirekt mit der Prognose und ist heute etablierter, unabhängiger prognostischer Marker<br>Cathepsin L und B korrelieren direkt mit dem Grad der Entdifferenzierung und der Malignität | [20, 60, 61, 114, 115, 207] |
| Larynxkarzinom            | Cathepsin L- und B-Aktivitäten stehen in direkter Beziehung zum Entdifferenzierungsgrad und zur Rezidivwahrscheinlichkeit   | [170]                       |
| Fibrosarkome              | Gesteigerte Expression der lysosomalen Proteinasen Cathepsin L und B  | [3]                         |
| Bronchialkarzinom         | Gesteigerte Expression von Cathepsin L, B und D im Karzinom; keine Korrelation mit Tumorstadium, histologischer Differenzierung oder Prognose   | [221, 222, 233]             |
| Hepatozelluläres Karzinom | deutlich erhöhte Cathepsin B-, L- und Cystatin A-Serumspiegel korrelierten positiv mit dem Ausmaß der Tumorprogression.   | [118]                       |
| Ratten-Fibroblasten       | Eine Transfektion von Ratten-Embryo-Fibroblasten mit ras-Oncogen induzierte eine Verstärkung der Cathepsin L- und B-Expression  | [190]                       |
| Osteosarkom-Zelllinie     | Antisense-Cathepsin B-cDNA reduziert die Cathepsin B- und L-Synthese um bis zu 70%, was im Vergleich zur unbehandelten Zellgruppe in einem signifikant geringeren Invasions- und Motilitätsvermögen mündete.  | [112, 113]                  |
| Schilddrüsenkarzinome     | Gesteigerte Expression von Cathepsin L, B und D   | [108, 130, 131, 184]        |

## 2.4 Die Schilddrüse im Zentrum endokriner und parakriner Regelkreise

### 2.4.1 Die Stellung der Schilddrüse im endokrinen System

Die Schilddrüse, das größte endokrine Organ unseres Körpers, ist U-förmig, wiegt etwa 25-30g und besteht aus zwei seitlich des Kehlkopfes angeordneten Lappen, Lobi, die über ein Mittelteil, den Isthmus, miteinander verbunden sind. Histologisch besteht das Organ aus einer Vielzahl von Follikeln, die in ein dichtes Netzwerk aus Lymph- und Blutgefäßen eingebettet sind. Die Schilddrüsenfollikel setzen sich aus einschichtigem Epithel, das einen mit Kolloid gefüllten

Innenraum umschließt, zusammen. Das Kolloid entspricht kovalent quervernetztem Thyreoglobulin, dem Synthese- und Speicherbaustein der Schilddrüsenhormone.

Die Schilddrüse produziert drei Hormone: L-Thyroxin(T4), L-Triiodthyronin(T3) und Calcitonin. Calcitonin wird jedoch nicht von Thyreozyten, sondern von den sekundär eingewanderten parafollikulären (C-) Zellen gebildet.

Die Schilddrüse nimmt eine Ausnahmestellung unter den endokrinen Organen ein. Sie besitzt keine Sekretionspolarität. Es laufen in ihr mit Sekretion und Resorption simultan zwei entgegengesetzte Vorgänge ab. Hinsichtlich ihrer Regulation ist sie eingebunden in der endokrinen Achse: Hypothalamus – Adenohypophyse – Schilddrüse – Effektororgan. Vom Hypothalamus sezerniertes Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH), ein Peptidhormon, stimuliert in den thyreotropen Zellen der Adenohypophyse die Freisetzung von Thyreotropin (TSH), einem Glykoprotein, welches zirkadianen und pulsatischen Sekretionsrhythmen unterliegt. TSH besitzt seinerseits, vermittelt durch den TSH-Rezeptor (TSHR) an der basolateralen Membran der Thyreozyten, einen stimulierenden Effekt auf die Schilddrüse mit Steigerung der T3/T4-Synthese. T3 und T4 erzeugen eine ubiquitäre Stoffwechselaktivierung ohne klare Effektororganspezifitäten. Hierzu dringen die freien Hormone teils über Diffusion, teils vermittelt durch Carriersysteme in die Zellen ein und binden an nukleäre und mitochondriale Bindungsproteine. Dies verursacht eine Modulation der Transkription und somit Expression von Proteinen mit Einfluss auf die Stoffwechsellage und den Grundumsatz. Die bedarfsorientierte, diffizile Anpassung dieser hormonellen Achse erfolgt über zahlreiche Rückkopplungsmechanismen, vermittelt von den synthetisierten Hormonen an die übergeordneten Zentren.

Ferner greifen kortikale Impulse, verschiedene Neurotransmitter sowie Iod in die Steuerkaskade ein oder wirken unabhängig von diesem Mechanismus.

Betrachtet man einen Thyreozyten und die durch ihn realisierte Schilddrüsenhormonsynthese, ist eine bidirektionale Polarität zu erkennen. Stimuliert durch basolateral gelegene TSHR kommt es zur Aktivierung des basalen Natrium-Iodid-Symporters mit Steigerung der Iodaufnahme (Iodination), zur Steigerung der Thyreoglobulinsynthese und –sekretion in das Follikellumen und zur vermehrten Iodierung von Tyrosinresten des Thyreoglobulins (Iodisation) an den apikalen, villösen Zelloberflächen. Darüber hinaus führt es zur Aktivierung der Schilddrüsenperoxidase (TPO), die als Schlüsselenzym sowohl Iodination als auch Iodisation katalysiert. Zeitgleich geht die TSH-Stimulation mit einer gesteigerten Schilddrüsenhormonfreisetzung einher. Durch Sekretion von lysosomalen Proteasen und anschließender Endozytose werden Thyreoglobulinfragmente intrazellulär aufgenommen, um anschließend intralysosomal mittels proteolytischer Kaskaden degradiert zu werden. Hierbei kommt es zu Freisetzung von T3 und T4 an der basalen Membran, wobei T4 als eine wenig aktive Vorstufe von T3 anzusehen ist. Dieses wird am Effektororgan durch Konversion, eine Deiodierung, in T3 überführt. Die Schilddrüsenhormone werden zu über 99% an Protein gebunden im Blut transportiert, was sie



vor Degradierung, renaler Elimination und zu rascher Abwanderung ins Gewebe schützt. Als wichtigste Vehikelproteine gelten das Thyroxinbindende-Globulin und Praealbumin.

Erkrankungen der Schilddrüse sind weltweit die häufigste Erkrankung eines endokrinen Organs. Sie manifestieren sich durch eine qualitative oder quantitative Alteration der Hormonsekretion, einer Vergrößerung der Schilddrüse (Struma) oder beidem. Eine insuffiziente Hormonsekretion resultiert in einem Hypothyreoidismus mit Myxödem, dem ein Hypometabolismus zu Grunde liegt. Dagegen mündet eine exzessive Sekretion in einem Hypermetabolismus mit Symptomen einer Thyreotoxikose, wie Kachexie.

#### **2.4.2 Endokrine und parakrine Beeinflussungen der Schilddrüse**

Die Regulation der Schilddrüse war einst ein klassisches Beispiel für das Konzept: Ein Hormon - ein Zelltyp - ein second messenger mit seinen pleotropen Effekten.

Nach aktuellen Erkenntnissen sollte sie jedoch eher als ein komplexes, querverzweigtes Netzwerk von Regulationsmechanismen intra- und extrazellulärer Signalmoleküle betrachtet werden. Solche Netzwerke differieren von einem Zelltyp zum anderen je nach spezifischer Funktionsanforderung und -intensität im Organismus.

So lassen sich in und auf Thyreozyten neben TSHR eine Vielzahl anderer Rezeptoren nachweisen. Rezeptoren für Sexualhormone wie Östrogen und Progesteron [139] liegen neben Rezeptoren für Gonadotropine, Schilddrüsenhormone selbst [182], Katecholamine, Cytokine [12] und zahlreiche Wachstumsfaktoren. Letztere bestehen aus einer heterogenen Gruppe von Peptidhormonen, wie Insulin, Insulin-like Growth Factors (IGF I und II), Fibroblast Growth Factor (FGF), Epidermal Growth Factor (EGF), Endothelium-derived Growth Factor (EdGF) und Transforming Growth Factor (TGF) [76], die zusammen eine sehr komplexe Wirkung in der Schilddrüse entfalten. Vermittelt wird dies durch unterschiedliche Wirkungsmechanismen, wobei sich autokrine, parakrine und intrakrine Mechanismen unterscheiden lassen.

#### **2.4.3 Wachstumsfaktoren und ihre Transduktionsmechanismen**

Für das Verständnis der hier vorliegenden Dissertation, bedarf es einer erläuternden Betrachtung der zur experimentellen Stimulation verwandten Wachstumsfaktoren und ihrer Wirkmechanismen.

##### *Epidermal Growth Factor (EGF)*

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), erstmalig beschrieben 1962 von *Rita Levi-Montalcini* und *Stanley Cohen*, ist ein Polypeptid aus 53 Aminosäuren und war für viele Jahre der Prototyp der wachstumsstimulierenden Faktoren.

Als erster Vertreter einer Gruppe von über 10 verschiedenen Wachstumsfaktoren, die durch eine gemeinsame *EGF-like-Domain* charakterisiert sind, bindet er an Rezeptoren der erbB-Familie. Diese typische *EGF-like-Domain* ist definiert durch 6 Cysteinreste, die mit Hilfe dreier

Disulfidbrücken einen molekularen Spalt bilden. Dieses spezifische Merkmal findet sich auch in einer Vielzahl weiterer Polypeptide der extrazellulären Matrix, in Zelladhäsionsmolekülen, in Cholesteroltransportmolekülen sowie in Faktoren der Blutgerinnungskaskade. Anhand dieser typischen Domäne lässt sich eine gesamte Superfamilie abgrenzen mit stark unterschiedlichen Eigenschaften und pathogenem Potential. So führt eine Mutation der *EGF-like-Domain* im Strukturprotein Fibrillin zum Bild eines Marfansyndrom.

EGF wird stets als transmembranes Precursormolekül synthetisiert, von welchem schließlich die reife hydrophile Form proteolytisch abgespalten wird. Als Ligand binden EGF-artige Wachstumsfaktoren an Rezeptoren der *erbB-Familie* mit ihren 4 Vertretern *erbB1-4*, wobei *erbB1* als der klassische EGF-Rezeptor bekannt ist. Die *erbB-Familie* sind Tyrosinkinase-Rezeptoren, die durch Ligandenbindung und Konformationsänderung zu einer Phosphorylierung von Tyrosinresten der zytoplasmatischen Rezeptorregion mit anschließender Aktivierung eines komplexen Signalnetzwerkes wie Phospholipase C – Inositoltrisphosphat (IP3) – Proteinkinase C oder MAP-Kinasen führen [120]. *ErbB1* Rezeptoren lassen sich in vielen humanen Geweben finden, insbesondere werden sie von epithelialen Zellen exprimiert, in denen sie ein zentraler Stimulationsmechanismus von Proliferation und Wachstum sind. Neben der Zellproliferation führt eine Aktivierung des Rezeptors zur Modulation wichtiger physiologischer Prozesse, wie Zelldifferenzierung, Apoptose, Zellmigration [99] und Zellverformung. Eine Aktivierung von autokrinen Wachstumsschleifen, die in Tumoren häufig auf einer vermehrten Expression von EGF-Rezeptoren und spezifischen Liganden beruhen, lässt eine zentrale Rolle im autonomen Tumorwachstum vermuten [119]. So zeigen sich deutliche Überexpressionen von *erbB1* in vielen epithelialen Tumoren, wie Mamma-, Bronchial-, Plattenepithel- und Urothelkarzinomen [69, 141] sowie Leukämien [99]. Häufig geht eine Überexpression von *erbB1* in Malignomen mit zunehmender Entdifferenzierung [99, 143, 168], Rezidivhäufigkeit [140, 160] und einer schlechten Prognose [142, 172, 188] einher. So liegt es nahe, diese Rezeptoren als Ziel neuer Therapiestrategien auszuwählen. Aktuelle Befunde von *erbB1*-Rezeptorantagonisten, wie des *Potato-Carboxypeptidase-Inhibitor (PCI)* [226], sowie Anti-*erbB*-Antikörpern [52, 183] könnten ein wichtiger Durchbruch hinsichtlich neuer Therapiekonzepte sein.

### *Thyreotropin (TSH)*

TSH ein Adenohypophysenhormon, erstmalig beschrieben 1932, gehört zur Gruppe der Glykoproteinhormone, weist ein Molekulargewicht von 28000 Da auf und setzt sich aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette zusammen. Die biologische Aktivität vermittelt die  $\beta$ -Kette. TSH bindet an spezifische TSH-Rezeptoren (TSHR) der Schilddrüsenfollikelzellen mit nachfolgender Stimulation von Second messenger Systemen. TSHR ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor und besteht aus drei Domänen. Diese setzen sich aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne, einer transmembranen und einer intrazellulären C-terminalen Domäne zusammen. Die Transmembranregion ist dabei in die G-Protein-vermittelte Signaltransduktion involviert. Es

kommt zur Stimulation der cAMP-Kaskade (Adenylatcyclase – cAMP - Proteinkinase A), sowie bei sehr hohen TSH-Konzentrationen, vermittelt durch ein differentes G-Protein, auch zu Aktivierung der IP3-Kaskade (Phospholipase C - IP3, DAG-Ca<sup>2+</sup> - Proteinkinase C). TSH ist sowohl stärkster Stimulator der T3/4- und der Thyreoglobulinsynthese als auch Induktor von Zellwachstum und Proliferation [58, 81]. Benigne und differenzierte maligne Schilddrüsentumoren weisen TSHR auf, die sich nicht in Tumoren anderer Gewebe finden lassen [24]. Papilläre Schilddrüsenkarzinome scheinen im Allgemeinen etwa so viele TSHR wie normales Schilddrüsengewebe oder Schilddrüsenadenome zu enthalten [199, 200]. Trotzdem zeigen benigne und differenzierte maligne Neoplasmen der Schilddrüse eine stärkere Adenylatcyclase-Antwort auf TSH im Vergleich zum umgebenden Normalgewebe [23]. Mit zunehmender Entdifferenzierung und Prognoseverschlechterung der Malignome sinkt jedoch die TSHR-Expression mit Aufhebung des zellulären Verteilungsmusters [70, 199, 200].

#### *Insulin und Insulinähnliche Wachstumsfaktoren (IGF 1/2)*

Insulin, ein Polypeptidhormon von 6500 Da, besteht aus insgesamt 51 Aminosäuren (AS), welche zwei Ketten, eine A-Kette mit 21 AS und eine B-Kette mit 30 AS, bilden. Beide Ketten werden kovalent durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden [107].

Physiologischerweise wird Insulin von den Betazellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas freigesetzt und seine Hauptfunktion liegt in der Regulierung des Blutglukosespiegels. Letztere ist als Folge der eigentlichen Insulinfunktion anzusehen, die darin besteht, den alimentär über die Verdauung in das Blut aufgenommenen biologischen Brennstoff Glukose in die Zielorgane und -zellen zu transferieren. Hierzu aktiviert Insulin über einen Tyrosinkinase-Rezeptor und nachfolgende Signaltransduktionssysteme anabole Stoffwechselfvorgänge, wie Glykogen-, Protein-, Lipid-, DNA- und RNA-Synthese sowie Membrantransportsysteme.

IGF besitzen eine ca. 40%-ige Strukturhomologie zum Insulin und zeigen eine ähnliche Wirkung vermittelt über IGF1- und Insulinrezeptoren. Insulin- und IGF1-Rezeptoren gehören zur Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren, welche nach Ligandenbindung und nachfolgender Konformationsänderung über Autophosphorylierungen zur Aktivierung der Proteinkinase B (PKB), von MAP-Kinasen und der Inositoltrisphosphatkaskade (IP3) führen [107, 174]. Hierdurch nehmen sie Einfluss auf den Metabolismus, das Wachstum, die Replikation und die Differenzierung der Zelle [41]. So mündet ein Fehlen der IGF-Wirkung beispielsweise in transgenen Mäusen in ausgeprägter Wachstumsretardierung [67]. Auf Grund dieser ubiquitären, anabolen und mitogenen Wirkungsweise lag es nah, Insulin und IGF als wichtige Wachstumsfaktoren in vielen Tumortypen [34, 123] anzusehen. So ließen sich in vielen Malignomen, wie Bronchial-, Schilddrüsen-, Pankreas- und Endometriumkarzinomen sowie Osteosarkomen [62, 124, 133, 147, 155, 156, 173, 197] erhöhte IGF-Spiegel nachweisen.

### *Forskolin*

Forskolin ist in der Wurzel von *Coleus forskohlii* (*Buntnessel*) enthalten und gehört zur Gruppe der Terpene. Es besitzt antimikrobielle Wirkungen, die in fast allen Kulturkreisen bekannt waren. Berichten aus dem 17. Jahrhundert zufolge, vermochten Hindu-Mönche die klinischen Symptome einer Herzinsuffizienz nach Kauen homogener Blätter und Wurzeln der Pflanze *Coleus forskohlii* zu bessern. Darüber hinaus ist es in der indischen Volksmedizin als Mittel gegen Hypertonie, Asthma bronchiale, Psoriasis, Glaukom und Impotenz bekannt.

Seine Wirkung entwickelt Forskolin über eine direkte Aktivierung der Adenylatcyclase, was zu deutlich erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegeln führt und konsekutiv in einer gesteigerten Proteinkinase A-Aktivität mündet. Experimentell ermöglicht Forskolin eine selektive, G-Protein unabhängige Aktivierung der cAMP-Kaskade.

### *Phorbol-Myristat-Azetat (PMA)*

PMA, ein Phorbol-ester, ist der aktive Bestandteil des Crotonöls aus dem Samen des indischen *Croton tiglium*, das früher als drastisches Abführmittel eingesetzt wurde und von dem 0,5-1 mL für den Erwachsenen tödlich sind. In Mitteleuropa finden sich chemisch verwandte Phorbol-ester in der Rinde und den Früchten des Seidelbast, sowie in Schneeballarten. Ihren biologischen Effekt entwickeln diese Substanzen über eine direkte Aktivierung der Proteinkinase C, indem sie die Wirkung von Diacylglycerin (DAG) nachahmen. Aus experimenteller Sicht ermöglichen Phorbol-ester eine selektive, G-Protein und Tyrosinkinase unabhängige Aktivierung der Proteinkinase C [67, 180].

#### **2.4.4 Die Bedeutung von Wachstumsfaktoren in normalem Schilddrüsengewebe sowie bei malignen und nichtmalignen Schilddrüsenerkrankungen**

Die Schilddrüse steht als endokrin aktives Organ im Zentrum eines komplexen Netzwerks von zahlreichen Wachstumsfaktoren und Hormonen. So exprimieren Thyreozyten signifikante Mengen an Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren, worin möglicherweise eine Ursache für die geschlechtsspezifischen Differenzen benigner und maligner Schilddrüsenerkrankungen begründet liegt [139].

TSH als regulierendes Adenohypophysenhormon und sein Agonist Forskolin bewirken, vermittelt durch cAMP und Proteinkinase A (PKA), allein keine Steigerung der Proteinkonzentration (Hypertrophie) in Thyreozyten, besitzen jedoch ein mitogenes Potential. Darüber hinaus stimuliert TSH neben der T3/T4-Synthese eine Expression von Differenzierungsmarkern in Thyreozyten, wie Thyreoglobulin, TSH-Rezeptoren und Thyreoperoxidase. Ebenso kommt es zu einer TSH-induzierten Expression von Insulin- und EGF-Rezeptoren [28, 224, 236].

Insulin führt zu einer Aktivierung von IP3-Kinasen, Proteinkinase B (PKB) und MAP-Kinasen und induziert hierdurch als anaboler Faktor die Proteinsynthese und somit Zellhypertrophie ohne mitogene Potenz zu entfalten. Insulin- und IGF1-Rezeptoren erscheinen dabei bezüglich ihrer

biologischen Wirkung funktionell äquivalent. Obwohl Insulin die direkte proliferative Fähigkeit fehlt, kommt ihm doch eine Schlüsselposition in der Vermittlung proliferativer Signale in Thyreozyten zu. So besitzt Insulin einen permissiven Effekt (über MAP-Kinasen und PKB) auf die mitogene Potenz von TSH, so dass TSH nur bei simultaner Stimulation durch Insulin eine Proliferation induziert [28, 39, 46].

EGF, vermittelt durch Rezeptor-Tyrosinkinasen, PKC und MAP-Kinasen, sowie PMA, vermittelt durch PKC und MAP-Kinasen, zeigten die stärkste Proliferationspotenz in normalen humanen Schilddrüsenzellen [139, 236]. Ursächlich scheint eine MAP-Kinasen-induzierte Aktivierung des Ras-Systems [225] zu sein. EGF vermag dabei analog zu TSH nur in Anwesenheit von Insulin die DNA-Synthese und Proliferation zu aktivieren ohne selbst die Proteinsynthese zu stimulieren. Weiterhin induzieren EGF und PMA im Gegensatz zu TSH eine Dedifferenzierung der Thyreozyten [28].

Zusammenfassend betrachtet, stimulieren TSH, Forskolin (über cAMP, PKA), EGF (über Tyrosinkinase, PKC, MAP-Kinase) und PMA (über PKC, MAP-Kinase) jeweils die DNA-Synthese. Ihr Effekt benötigt jedoch die Kostimulation durch Insulin/IGF1. Der Transduktionsweg, vermittelt durch IP3-Kinasen und PKB, scheint in differenzierten Thyreozyten Faktoren wie TSH, EGF und PMA nicht zugänglich zu sein, weshalb zu Realisierung ihrer mitogenen Potenz die Kostimulation mit Insulin notwendig ist [27, 28, 38, 84].

In Strumagewebe, Schilddrüsenadenomen und Schilddrüsenkarzinomen findet sich mit zunehmendem Grad der Entdifferenzierung eine abnehmende Expression des TSH-Rezeptors [70]. TSH scheint in anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzelllinien keinen oder sogar einen wachstumshemmenden Effekt zu besitzen [70, 79]. Andererseits unterstützt TSH aber auch das Wachstum der Karzinome durch Induktion der Synthese von endothelialeem Wachstumsfaktor (EdGF), einem starken Aktivator der Angiogenese [139]. Insgesamt scheint TSH unterschiedliche Proliferationseffekte auf Schilddrüsenkarzinome zu haben, was auf tumorspezifische Alterationen der TSH-Transduktionswege hinweist [137].

EGF besitzt die stärkste Proliferationspotenz sowohl für normale als auch maligne SD-Zellen. Der Effekt war in SD-Karzinomzellen am ausgeprägtesten und graduell über Adenom- und Strumagewebe abnehmend schließlich in Normalgewebe am niedrigsten. Dies ist am ehesten auf ein entdifferenzierungsbedingtes Wiedererlangen von erbB-Rezeptoren zurückzuführen und unterstreicht die zentrale Rolle von EGF in malignen SD-Geweben [139]. Diese erneute EGF-Kompetenz ist jedoch nicht verwunderlich, entstammt die Schilddrüse doch ontogenetisch einer Epithelknospe am Boden des Schlunddarmes. Darüber hinaus ließ sich zeigen, dass die in normalen Thyreozyten vorhandene zelluläre Polarisierung der EGFR mit basolateraler Lokalisation in Schilddrüsenkarzinomen aufgehoben und die EGFR-Bindungsaffinität in Schilddrüsenmalignomen im Vergleich zu Normalgewebe erhöht ist [16, 236]. Die Expression von IGF- und Insulin-Rezeptoren scheint ähnlichen Mechanismen zu unterliegen wie die von EGFR. So findet sich auch hier eine zunehmende Rezeptordichte und Wirkung mit Fortschreiten

der Entdifferenzierung vom Normalgewebe zum anaplastischen Karzinom [64, 212]. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass Schilddrüsenkarzinome mit zunehmender Autonomie und Malignität eine Vielzahl von weiteren Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren im Sinne einer intra-, auto- und parakrinen Stimulation synthetisieren. Anaplastische Schilddrüsenkarzinome besitzen so die Fähigkeit neben den oben genannten Faktoren auch den transformierenden Wachstumsfaktor TGF- $\alpha$  sowie EdGF und Platelet-derived Growth Factor (PDGF) zu exprimieren [80, 223, 236].

## 2.5 Die exponierte Stellung von Cathepsinen in der Schilddrüse

Cathepsine sind lysosomale Proteinasen, die sich in nahezu jeder Zelle nachweisen lassen. Sie sind involviert in die unspezifische lysosomale Degradierung von zellulären und endozytierten Proteinen. Zusätzlich scheinen sie in vielen Zelltypen eine spezifischere Rolle durch Aktivierung von Stoffwechselwegen über Proproteinprozessierung, Wachstumsfaktoren und Hormone zu spielen. Diese exponierte Stellung der Cathepsine lässt sich auch in der Schilddrüse belegen, finden sich doch im Vergleich zu anderen Geweben deutlich erhöhte Aktivitätsniveaus und Enzymkonzentrationen. Unter 17 Gewebetypen, darunter Leber-, Lungen-, Milz-, Kolon-, Prostata-, Nieren-, Herz-, Muskel-, Haut-, Nerven-, Hirn-, Brustdrüsen- und Nebennierengewebe, enthielt Schilddrüsengewebe den höchsten Cathepsin L- und zweithöchsten Cathepsin B-Gehalt [184]. Cathepsin L, B, H und D lassen sich sowohl in basalen Lysosomen als auch unter erhöhter TSH-Stimulation im Bereich der apikalen Zellmembran, dem Ort der Thyreoglobulin-Degradierung nachweisen [97, 117, 219, 220].

Es ließ sich zeigen, dass die Pro-Cathepsine D, B und L sowie deren reife Formen von Thyreozyten in das Follikellumen sezerniert sowie an der apikalen Zelloberfläche in Form von reifem Cathepsin B und D membrangebunden exprimiert werden. Diese Endopeptidasen ermöglichen eine initiale, limitierte und selektive extrazelluläre Proteolyse des kovalent quervernetzten Thyreoglobulin im Follikel, wobei Cathepsin L und B eine größere Rolle zukommen soll als der Aspartatproteinase Cathepsin D [13, 14, 47-49, 243]. Darüber hinaus scheint Cathepsin K in noch unbekanntem Ausmaß in diesen Prozess involviert zu sein [205, 206]. Die so entstandenen T3/T4 enthaltenden Intermediate werden anschließend mittels Endozytose der finalen intrazellulären Prozessierung durch Exopeptidasen zugeführt. Neben der Lysosomalen Dipeptidase I (LDPI) nimmt auch hier Cathepsin B eine zentrale Stellung ein und führt durch seine zusätzliche Exopeptidase-Funktion zur Freisetzung eines T4-Dipeptids, der direkten Vorstufe der T4-Liberation [50]. Das Ausmaß der Schilddrüsenhormonsynthese wird durch TSH über eine Aktivierung der cAMP-Kaskade stimuliert und unterliegt in Abhängigkeit vom physiologischen Bedarf hemmenden Rückkopplungsmechanismen [184].

Die Schilddrüse ist somit eines der wenigen Beispiele für die Relevanz lysosomaler Enzyme für die extrazelluläre Proteolyse unter nicht pathologischen Bedingungen.

## 2.6 Cathepsine bei nichtmalignen Schilddrüsenerkrankungen

Bezüglich nichtmaligner Schilddrüsenerkrankungen findet sich ein sehr inhomogenes Bild der Cathepsinexpression. Cathepsin D zeigt im Vergleich zu Normalgewebe von Strumagewebe bis hin zu toxischen Adenomen zunehmende Aktivitäten und erhöhte Expressionsniveaus. Cathepsin L und B hingegen weisen weder in einer Struma nodosa noch in entzündlichen Schilddrüsenerkrankungen wie der Hashimoto Thyreoiditis eine erhöhte Aktivität auf [106, 108, 130, 131].

## 2.7 Epidemiologische und klinische Aspekte maligner Schilddrüsenerkrankungen

Schilddrüsenkarzinome, obgleich die häufigsten Neoplasmen des endokrinen Systems, repräsentieren 0,6-1,6 % aller humanen Krebserkrankungen und gehören damit zu den selteneren Malignomen. Die jährliche Inzidenz in Europa liegt bei 3 pro 100.000 Einwohner mit einem Verhältnis Frauen : Männer von 2,5 : 1, wobei die relative Häufigkeit der einzelnen Karzinomtypen zwischen Strumaendemiegebieten und den übrigen Regionen schwankt. Weiße sind insgesamt häufiger betroffen als Schwarze.

Eine Klassifikation aller Schilddrüsenkarzinome ist in *Abb.: 1* wiedergegeben.

Das medulläre Schilddrüsenkarzinom soll hierbei nicht Gegenstand der Betrachtung sein, geht es doch nicht vom Follikelepithel sondern von den sekundär eingewanderten parafollikulären C-Zellen aus.

Differenzierte Schilddrüsenkarzinome besitzen normalerweise eine gute Prognose bei langsamer Progression und niedriger Metastasierungstendenz. Die 10-Jahres-Überlebensrate für das papilläre Schilddrüsenkarzinom (PTC) beträgt 95% und für das follikuläre Schilddrüsenkarzinom (FTC) 90%. Das PTC ist mit ca. 80% aller Schilddrüsenkarzinome das häufigste Schilddrüsenneoplasma und besitzt einen Erkrankungsgipfel in der 5. bis 6. Lebensdekade. Es kommt häufig multifokal vor und metastasiert bevorzugt lymphogen. Histologisch zeigt es neben charakteristischen malignen Zellveränderungen Zeichen der Follikelepitheleddifferenzierung mit papillärem und follikulärem Bau. Das FTC ist ein Tumor des fortgeschrittenen Alters, wird bevorzugt in Jodmangel-Endemiegebieten angetroffen und repräsentiert ca. 15 bis 20% der Schilddrüsenkarzinome. Es metastasiert nahezu ausschließlich hämatogen und besitzt histologisch ein rein follikulär-differenziertes Erscheinungsbild, was eine Unterscheidung vom Adenom erschwert.

Eine Ursache für das differente Verhalten von papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinomen ist in unterschiedlichen genetischen Mutationen zu suchen. So findet sich das aktivierte *ret*-Oncogen von Chromosom 10 (10q11.2) ausschließlich bei PTC in ca. 33% der Fälle. Darüber hinaus scheinen das *Tropomyosin-Rezeptorkinase-* (*trk*) und das *Papillary Thyroid Carcinoma-* (PTC) Oncogen-System, die auf einer Aktivierung der Tyrosinkinase

beruhen, eine Rolle zu spielen. In FTC dagegen ist in ca. 80% der Fälle eine *ras*-Oncogenmutation nachzuweisen. Insgesamt handelt es sich bei Schilddrüsenkarzinomen um

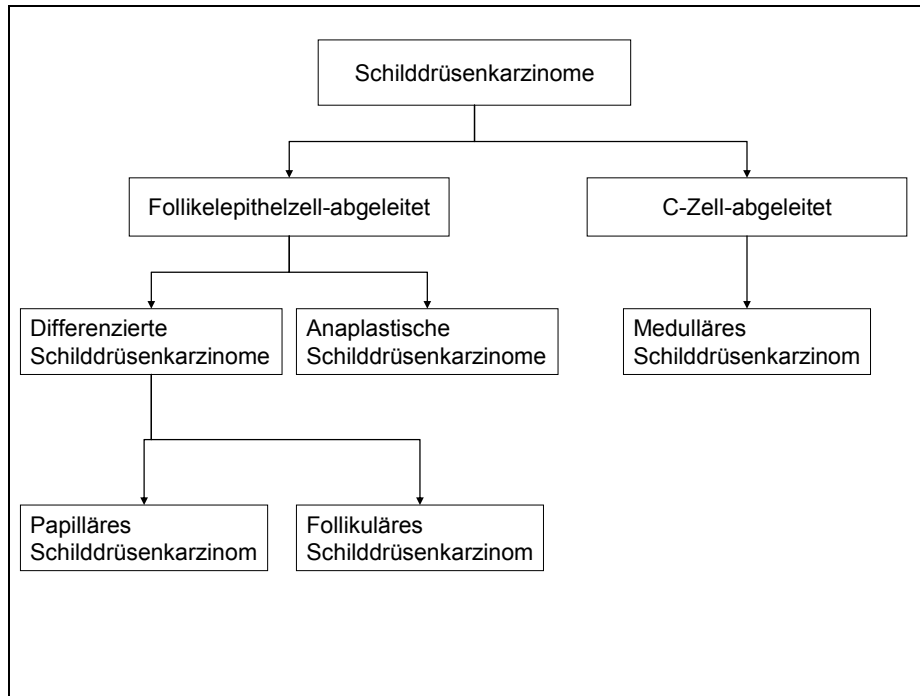


Abbildung 1: Klassifikation der Schilddrüsenkarzinome

eine multifaktorielle Genese unter dem Einfluß genetischer Prädisposition (HLA-DR1) und Umweltfaktoren, wie Jodmangel, Hormonen und Strahlung, die in mehreren Etappen zur Transformation führen [88, 92, 122, 235, 237]. TSH scheint diesbezüglich keinen Effekt zu haben.

Im prolongierten Verlauf eines differenzierten Schilddrüsenkarzinoms kann es z.T. über Dekaden unter Einwirkung chemischer, physikalischer, hormoneller und infektiöser Noxen durch Anhäufung von Mutationen zur Transformation in ein entdifferenziertes anaplastisches Schilddrüsenkarzinom kommen. Anaplastische Schilddrüsenkarzinome entstehen meist auf dem Boden eines PTC und gehören zu den aggressivsten Malignomen des menschlichen Körpers mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 6 Monaten. Es metastasiert rasch lympho- und hämatogen in Mediastinum, Lunge, Knochen und Gehirn. Genetisch lässt sich neben den o. g. und anderen, zufälligen Mutationen nahezu immer eine Punktmutation des Tumorsuppressorgens p53 nachweisen [126, 176, 196].

Sowohl beim füllikulären als auch beim papillären Schilddrüsenkarzinom besteht die Therapie der Wahl in der totalen Thyreoidektomie unter Einbeziehung der paratrachealen und parajugulären Lymphknoten. Bei allen Formen der differenzierten Schilddrüsenkarzinome schließt sich an die Operation die ablative Radiojodtherapie ( $I^{131}$ ) zur Elimination verbleibenden Schilddrüsenngewebes an. Voraussetzung für eine erfolgreiche Radiojodtherapie ist die noch vorhandene Fähigkeit des Malignoms Jod aufzunehmen. Nach der Thyreoidektomie soll eine



lebenslange Substitution mit etwas überdosierten Schilddrüsenhormonen erfolgen, um TSH zu supprimieren und damit seinen wachstumsfördernden und proliferativen Effekt zu minimieren.

## **2.8 Cathepsine in malignen Schilddrüsenerkrankungen**

Zusätzlich zu ihren gewebespezifischen Funktionen in der Schilddrüse sind die proteolytischen Enzyme Cathepsin L, B und D eng mit den Prozessen der Tumorinvasion und -Metastasierung verknüpft. Cathepsin L und B vermögen es, Komponenten der Basalmembran aber auch viele extrazelluläre Matrixkomponenten zu degradieren. Dieser Abbau ist essentiell für die invasiven Eigenschaften und die Mobilität maligner Zellen. In der normalen Schilddrüse produzieren die Follikel epithelzellen Schilddrüsenhormone und setzen diese unter dem Einfluss von TSH frei. In Schilddrüsenkarzinomen jedoch gehen im Rahmen der malignen Transformation eine Vielzahl dieser spezifischen Funktionen, wie Jodaufnahme, Thyreoglobulin-Expression, Schilddrüsenhormonsynthese und Thyreoperoxidase-Expression, einschließlich der TSH-abhängigen Regulationsprozesse verloren. Die Expression der lysosomalen Proteinasen Cathepsin L, B und D steigt in Schilddrüsenkarzinomen um ein Vielfaches an und scheint nicht länger streng TSH-abhängig mit der Thyreoglobulin-Synthese oder anderen schilddrüsenspezifischen Funktionen koreguliert zu werden [108, 130, 131, 184]. Auf diese Weise spiegelt der Cathepsin-Gehalt nicht mehr den funktionellen Status eines Thyreozyten wieder, sondern weist auf einen invasiven Phänotyp hin.

In papillären Schilddrüsenkarzinomen fiel eine Anreicherung von Cathepsin L und B entlang der basalen Zellmembran auf. Wie schon für andere Karzinome beschrieben [242], ist dies hinweisend auf die Sekretion und die Membranassoziation der Enzyme zur proteolytischen Degradierung der Basalmembran [184].

Darüber hinaus fand sich eine gesteigerte Cathepsin B- und L-mRNA-Expression, die eine Transformations-bedingte Dysregulation der Transkription, möglicherweise über die Aktivierung von Protooncogenen, nahe legt [184].

## **2.9 Das therapeutische und prognostische Dilemma der Entdifferenzierung in Schilddrüsenkarzinomen**

Die Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren in Tumorzellen erscheint als ein wichtiger Malignitätsfaktor. Mechanismen, wie die Modulation para- und autokriner Regulationsvorgänge und das Aktivieren von Protooncogenen führen zu einer entfesselten Tumorpheriferation und -progression. Der Malignitätsgrad korreliert dabei häufig indirekt mit dem Differenzierungsgrad der Tumoren. Je entdifferenzierter ein Malignom ist, desto autonomer erscheint es im Zellverband. Da es sich dank mangelnder Differenzierungsmarker den stringenten, organotopen Regulationsmechanismen entziehen kann, resultiert ein ungehemmtes Wachstum.

Differenzierte Schilddrüsenkarzinome sind durch noch vorhandene Differenzierungsmarker häufig Therapieansätzen, die physiologische Funktionen und Regelmechanismen nutzen, wie der Thyroxin-vermittelten TSH-Suppression und Radiojodtherapie, zugänglich, während anaplastische Schilddrüsenkarzinome sich einer derartigen Therapie vollständig entziehen [24]. Es verbleibt eine meist nur ineffektive chirurgische Intervention.

Offensichtlich sind neue Therapieansätze wünschenswert. Einige neue Therapieprinzipien finden sich in der klinischen Phase I-IV Testung:

1. Reintroduktion von Tumorsuppressorgen p53 in Tumorzellen
2. Transfektion des thyreoidalen Na/Jodid-Transporter-Gens, um Schilddrüsenkarzinome einer Radiojodtherapie zugänglich zu machen
3. Blockierung der Expression des *c-myc*-Oncogens durch Antisense-Oligonukleotide
4. Exposition mit Retin-Säure, um eine Redifferenzierung der Tumor-Zellen zu erzielen
5. Therapie mit Anti-Östrogenen, wie Tamoxifen
6. Immunologische Therapie mit Anti-EGFR-Antikörpern.

Es bleibt zu hoffen, dass die eine oder andere Strategie die aktuellen eingeschränkten Therapieoptionen erweitern wird und Patienten mit bisher infauster Prognose eine neue Perspektive geben kann [1, 92, 176].

## 2.10 Konzept und Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in Schilddrüsenkarzinomzelllinien unterschiedlicher Herkunft, Expression und Sekretion der Cathepsine L, B und D unter dem Einfluß verschiedener Stimulationsfaktoren zu untersuchen und zu beurteilen.

Für die Untersuchung verwendet wurden die Zelllinie FTC 133, die aus einem follikulären Schilddrüsenkarzinom stammt, und die Linie 8505C, die von einem anaplastischen Schilddrüsenkarzinom abgeleitet wurde. Die Ursprungstumoren, follikuläres und anaplastisches Schilddrüsenkarzinom, unterscheiden sich stark in ihrer Progressionsgeschwindigkeit, ihrer Metastasierungsneigung und in ihrer Prognose – Eigenschaften, die mit der Expression der Cathepsine L, B und D korreliert sein könnten und die beide Zelllinien deshalb zu wertvollen Untersuchungsobjekten für die Klärung der Zusammenhänge zwischen Expression und Sekretion der Cathepsine und der Malignität von Tumoren machen.

Darüber hinaus ist die Schilddrüse als hormonell aktives Organ eng in ein komplexes endokrines Regulationssystem aus Metaboliten, Cytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen integriert. In den von ihr abstammenden Tumorzellen könnten Teile dieses Systems erhalten geblieben sein und die Charakteristika dieser Zellen mitbestimmen. Zellen beider Linien, FTC 133 und 8505C, wurden deshalb über definierte Zeitintervalle mit Hormonen bzw. Wachstumsfaktoren (*TSH*, *EGF* und *Insulin*) oder aber mit spezifischen Aktivatoren verschiedener Transduktionssysteme (*Forskolin* und *PMA*) stimuliert. Anschließend erfolgte die Analyse der Cathepsin L-, B- und D-

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 adhärenz wachsende, humane Zellen, welche bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> 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].

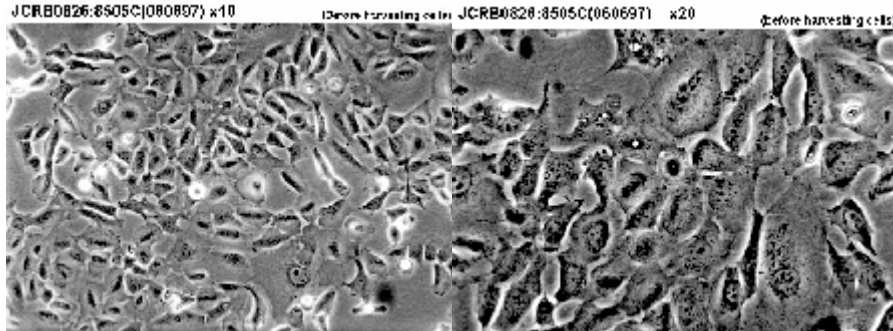


Abbildung 2: Zelllinie 8505C in Kultur

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  $\mu\text{U}$  / mL), Forskolin ( $10^{-5}$  mol / L), EGF (5 ng / mL), PMA (10 ng / mL) oder Insulin (5  $\mu\text{g}$  / 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  $-25^{\circ}\text{C}$  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:<br>1. Adenylatcyclase-System $\Rightarrow$ via Konzentrationserhöhung von cAMP zur Aktivierung der Proteinkinase A<br>2. Phospholipase-C-System $\Rightarrow$ vermehrte Bildung von DAG und $\text{IP}_3 \Rightarrow \text{Ca}^{2+}\uparrow$ 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<br>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 adhärenten 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  $-80^{\circ}\text{C}$ . 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  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.1.3 Geräte

Zellkulturflaschen  $75 \text{ cm}^2$  und  $150 \text{ cm}^2$  (Greiner bio-one, Kremsmünster)

$\text{CO}_2$ -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 ( $\beta$ -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. Zugewetztes 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                      | -          | -           | -             | -              |
| $\text{H}_2\text{O}$ , 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%)<br>(für 2 Gele) |         | Sammelgel (4%)                  |        |
|----------------------------------|---------|---------------------------------|--------|
| Acrylamid-Bisacrylamidlösung (A) | 12,5 mL | Acryl-Bisacrylamidlösung (B)    | 1,5 mL |
| H <sub>2</sub> O                 | 10 mL   | Tris-HCl, pH 6,8                | 2,5 mL |
| Tris-HCl, 1,5 M; pH 8,8          | 7,5 mL  | H <sub>2</sub> O                | 6 mL   |
| NH <sub>4</sub> -Persulfat, 10%  | 100 µL  | TEMED                           | 10 µL  |
| TEMED (Tetramethylethyldiamin)   | 20 µL   | NH <sub>4</sub> -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 <sub>2</sub> O       |         | ad 250 mL H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 (Hybond<sup>TM</sup>-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 <sub>2</sub> O    |       | ad 2000 mL H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 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,<br>Peroxidase-markiert | polyklonal | Ziege | 1:1000 | Dianova, Hamburg |
| Anti-Maus-IgG,<br>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 eingelesen. Anschließend konnten mit Hilfe des Programms SigmaGel, Jandel Scientific, die Grauwert-Intensitäten der Blot-Banden mittels Integralbestimmung ermittelt werden. Nach Äquilibration 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.



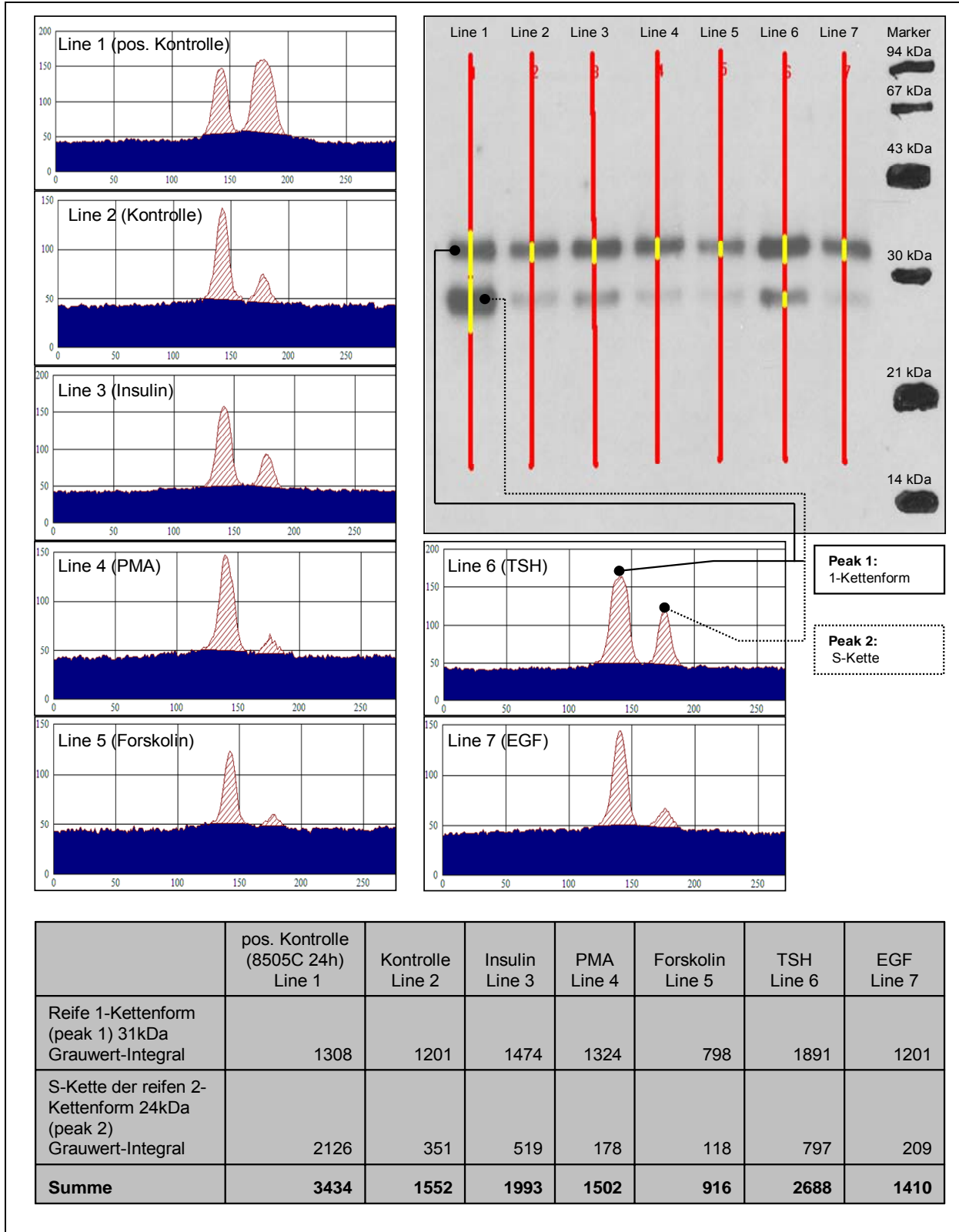


Abbildung 3: Cathepsin B-Expression pro Zelle der Zelllinie 8505C in Grauwertintensitätsintegralen des Western Blot nach 24h Stimulation.

### 3.3 Proliferationsassay und Zellzählung

Nach Aussaat von  $2 \times 10^5$  Zellen je 25 cm<sup>2</sup>-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. Cu<sup>2+</sup>-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 <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 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. CuSO<sub>4</sub>

43 mmol/L (1 g CuSO<sub>4</sub> x 4 H<sub>2</sub>O / 100 mL)

##### 4. CuSO<sub>4</sub>-Puffer-Lösung

50 mL Lowry-Puffer + 1 mL CuSO<sub>4</sub>-Lösung 1%

##### 5. Eichwert

Albuminlösung (14,0 mg / 20 mL)

## 6. Leerwert

destilliertes Wasser + CuSO<sub>4</sub>-Lösung + Phenolreagenz

### Geräte:

Eppendorf-Photometer mit Mikroabsaugküvette und Drucker

### 3.4.2 Probenbestimmung

20 µl Probenlösung + 200 µl CuSO<sub>4</sub>-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 <sub>2</sub> O      | 2,7 µL |

#### PCR-Mix:

Tabelle 15: PCR-Mix

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| H <sub>2</sub> 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-CHN<sub>2</sub> 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<sup>-2</sup> M / 8 mL H<sub>2</sub>O)

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<sup>-2</sup> M / 4 mL H<sub>2</sub>O)

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 <sub>67</sub> SEEFQVMNGFQ         | Pro-Peptid          |
| CPLH-33/1  | 1:300      | F <sub>241</sub> YKE <sub>244</sub> | Reifes Cathepsin L  |

### 3.7.2 Reagenzien und Geräte

#### Chemikalien:

Tabelle 18: ELISA, Chemikalien

|   |        |
|---|--------|
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>   | 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)

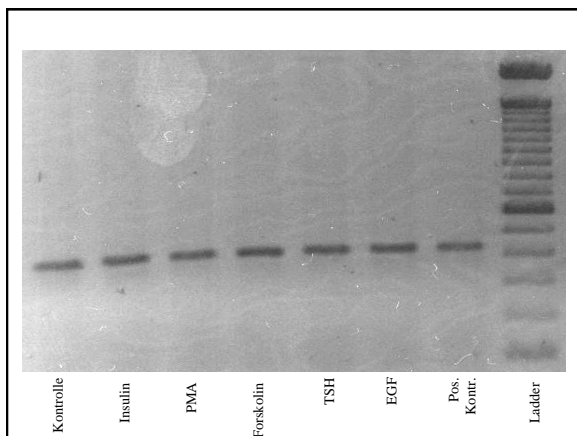


Abbildung 4: Cathepsin L, Zelllinie FTC 133, PCR, 24h Stimulation

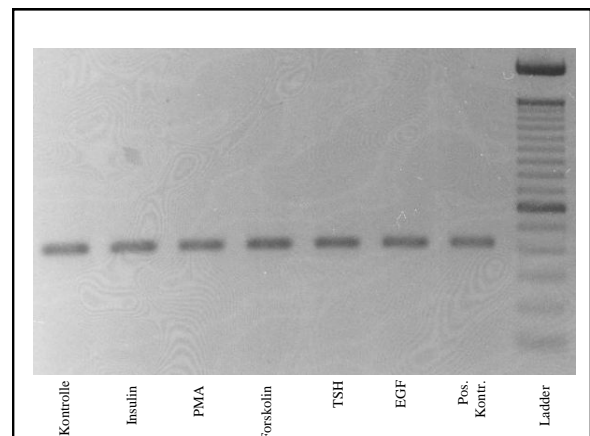


Abbildung 5: Cathepsin L, Zelllinie 8505C, PCR, 24h Stimulation



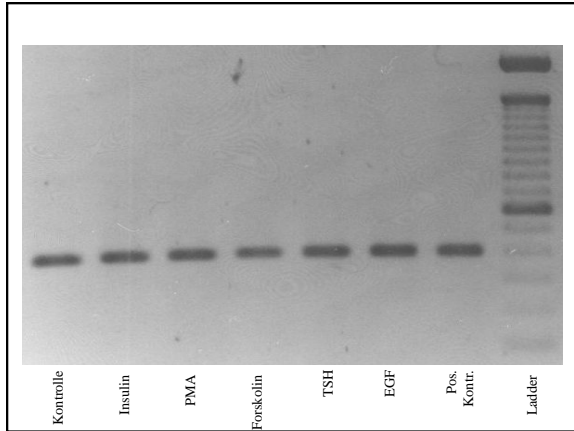


Abbildung 6: Cathepsin B, Zelllinie FTC 133, PCR, 72h Stimulation

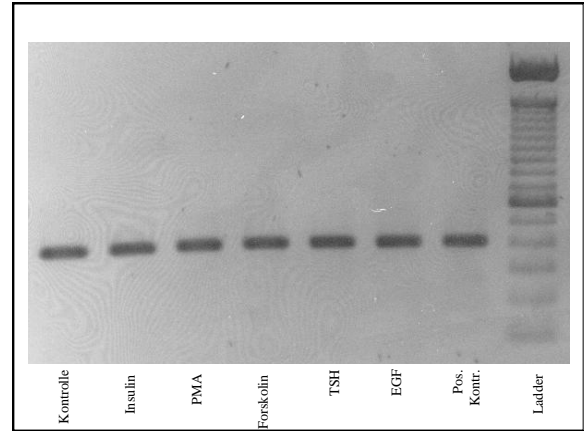


Abbildung 8: Cathepsin B, Zelllinie 8505C, PCR, 72h Stimulation

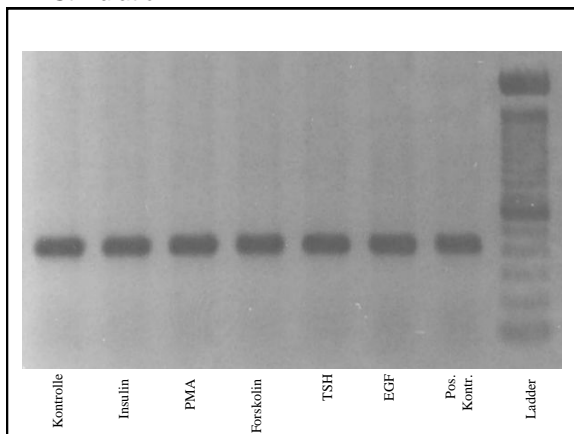


Abbildung 7: Cathepsin D, Zelllinie FTC 133, PCR, 48h Stimulation

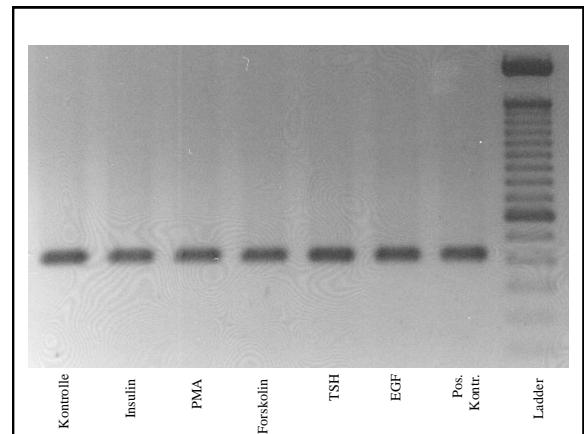


Abbildung 9: Cathepsin D, Zelllinie 8505C, PCR, 48h Stimulation

## 4.2 Analysen auf Proteinebene

### 4.2.1 Proteingehalt der Zellhomogenate

Nach Abtrennung der Membrananteile des Zellhomogenates beider Zelllinien mittels Ultrazentrifugation wurde die zytoplasmatische Phase gewonnen. Ihr Proteingehalt wurde bestimmt. Korreliert man ihn mit den Daten des Zellproliferationsassays, sind Angaben über den Proteingehalt einer einzelnen Zelle und dessen Alteration durch die Stimulanzen möglich.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry mit einer unteren Detektionsgrenze von  $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ . In der folliculären Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC 133 ließ sich durch alle Stimulanzen eine Steigerung der Proteinkonzentration der zytoplasmatischen Fraktion im Vergleich zur Kontrollgruppe induzieren. Über die Stimulationsintervalle betrachtet, ist ein maximaler Effekt nach 24h mit Annäherung an das Kontrollniveau während der folgenden Intervalle erkennbar. Berücksichtigt man den Proliferationseffekt und bestimmt den zytoplasmatischen Proteingehalt einer Zelle (Abb. 10) (im Vergleich zum zytoplasmatischen Proteingehalt der Kontrolle), ergibt

sich eine initiale zelluläre Proteinanreicherung durch die Stimulationsfaktoren. Insulin besitzt hierbei mit einer ca. 99% Steigerung nach 24h die stärkste Wirkung. Der vermehrte Proteingehalt der Zellen lässt sich am ehesten durch eine gesteigerte Syntheseleistung erklären. Der Abfall der Syntheseleistung mit Verlängerung des Stimulationsintervalls ist möglicherweise dem Substratmangel eines FCS-freien Mediums geschuldet.

Zelllinie 8505C zeigt ein zu FTC 133 konträres Verhalten. Eine Steigerung des Proteingehalts der zytoplasmatischen Fraktion durch sämtliche Stimulationsfaktoren analog zu FTC133 ließ sich nicht belegen. Stattdessen scheinen Forskolin einen mäßigen, TSH und EGF einen nur geringen und Insulin keinen Syntheseeffekt zu besitzen. PMA jedoch führt zu einer ausgeprägten Zunahme der Proteinkonzentration im Zytosol. Berücksichtigt man auch hier die Daten des Proliferationsassays, steigert PMA die zytoplasmatische Proteinkonzentration einer Zelle, was am ehesten einer Hypertrophie der Zellen der Zelllinie 8505C entspricht (*Abb. 11*). Insulin zeigt im Kontrast zur Zelllinie FTC 133 einen ausgeprägten proliferativen Effekt auf 8505C ohne dabei die Proteinsyntheseleistung im Vergleich zur Kontrollgruppe zu steigern, so dass der Proteingehalt pro Zelle abnimmt (*Hypotrophie, Abb. 11*).

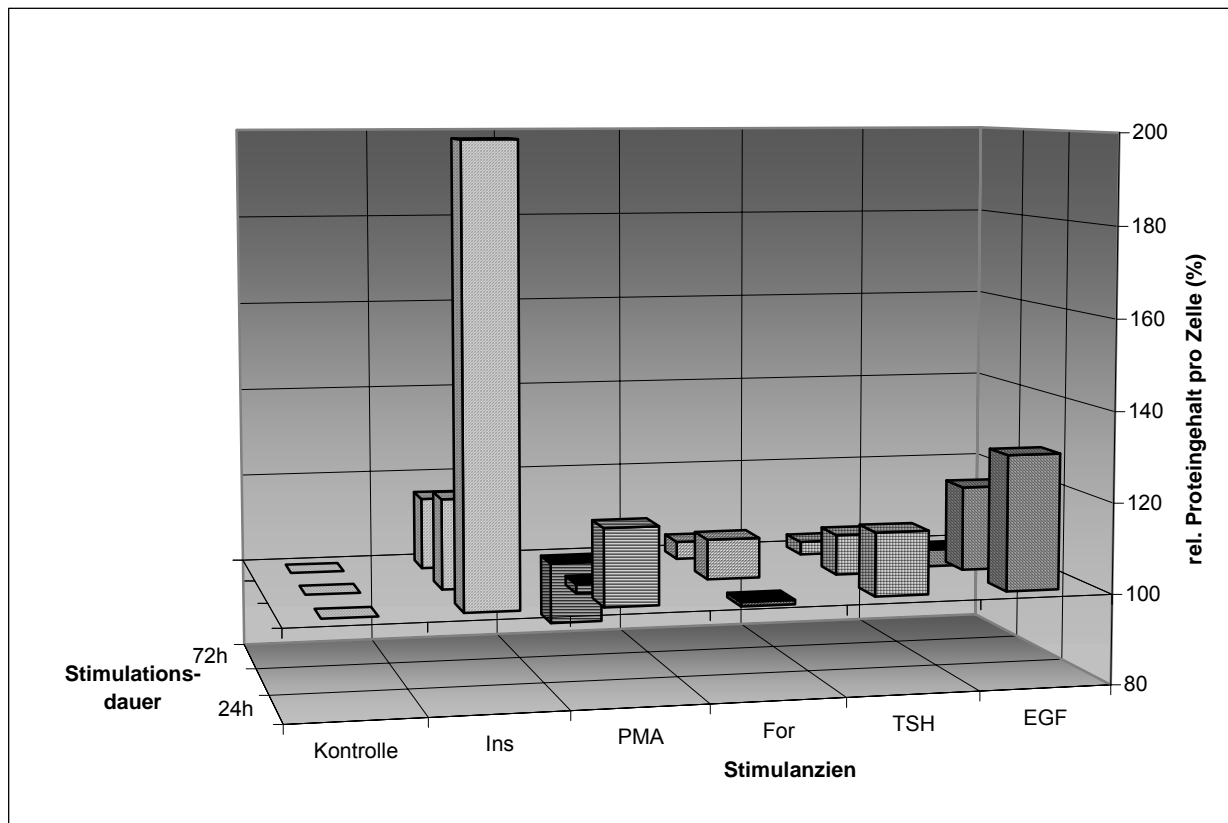


Abbildung 10: Proteingehalt pro Zelle der Zelllinie FTC 133 nach Stimulation, relativ zur Kontrollgruppe (Ko)

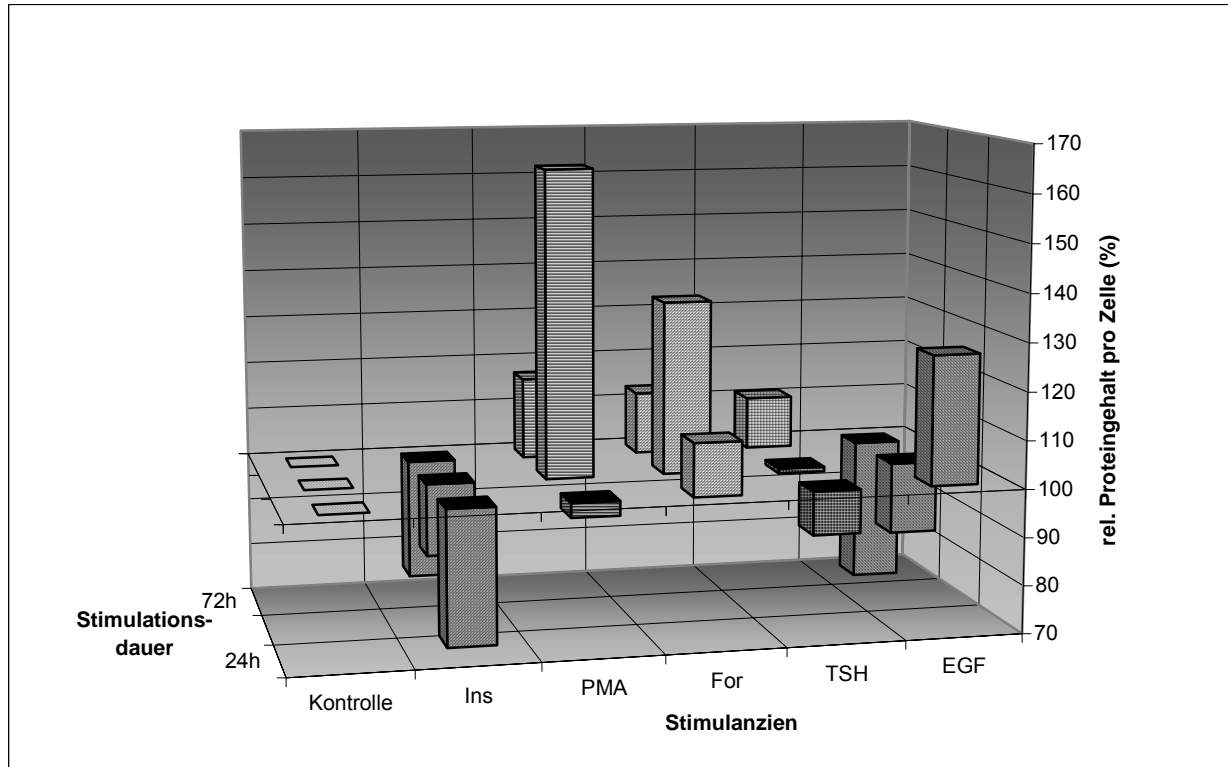


Abbildung 11: Proteingehalt pro Zelle der Zelllinie 8505C nach Stimulation, relativ zur Kontrollgruppe (Ko)

#### 4.2.2 Western Blot: Cathepsin L-, B- und D-Konzentration im Zytoplasma

Auf Grund der unterschiedlichen proliferativen Effekte der Stimulanzen waren zwei unterschiedliche Western Blot Ansätze sinnvoll:

1. Unter Einbeziehung des Proliferationseffekts eine Nivellierung entsprechend der Zellzahl. Konsekutiv kommt die Cathepsinmenge zur Darstellung, die in einer definierten, konstanten Zellzahl enthalten ist.
2. Applikation einer konstanten Proteinmenge der zytoplasmatischen Fraktion je Slot. Es kommt der Cathepsingehalt zur Darstellung, der in einer definierten Gesamtproteinmenge vorhanden ist. (Bei der Cathepsin L-Bestimmung wurden 40 µg Gesamtprotein je Slot eingesetzt; Cathepsin D: 15 µg Gesamtprotein / Slot; Cathepsin B: 10 µg Gesamtprotein / Slot)

Die im Western Blot erhaltenen unterschiedlichen Cathepsin-Profile sind in *Tabelle 19* sowie den *Abbildungen 12-14* aufgeführt. Auf Grund differenter, artspezifischer Glykosilierungen weisen die Cathepsine und ihre Expressionsformen ein der errechneten Molmasse divergentes Laufverhalten auf.

Legt man die Bandenintensitäten, hier ermittelt als Integral (*Abb. 3*), zugrunde, lassen sich vergleichende Aussagen treffen. So ließ sich belegen, dass Zelllinie FTC 133 im Vergleich deutlich weniger Cathepsin L, B oder D exprimiert als 8505C. Dies ließ sich sowohl bezogen auf die Gesamtproteinmenge als auch für den zellulären Anteil der Cathepsine bestätigen.

Abbildung 15 stellt den Anteil Cathepsin L pro Zelle im Vergleich beider Zelllinien dar. Es lässt sich eine deutlich vermehrte Expression von Cathepsin L in der Zelllinie 8505C erkennen.

Tabelle 19: Relative Molmasse der Cathepsine im Western Blot

| Humane lysosomale Protease | Precursor (ProCathepsin) | Reifes 1-Ketten-Enzym | Reifes 2-Ketten-Enzym |         |
|----------------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|---------|
|                            |                          |                       | s-Kette               | l-Kette |
| Cathepsin B                | 37000                    | <b>31000</b>          | 24000                 | 5000    |
| Cathepsin L                | <b>37000 – 42000</b>     | <b>31000</b>          | 24000                 | 4000    |
| Cathepsin D                | 51-, 53- u. 54000        | <b>44000</b>          | <b>31000</b>          | 13000   |

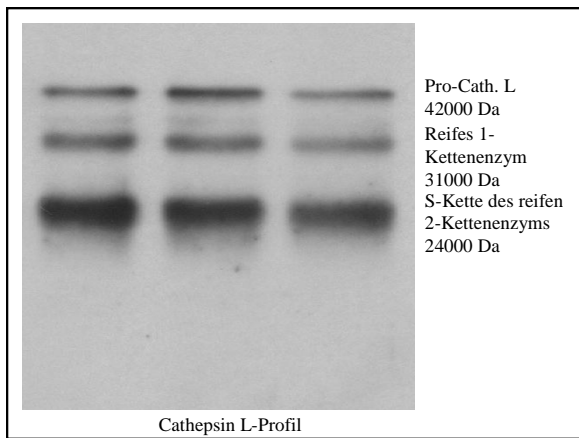


Abbildung 12: Cathepsin L, Western Blot

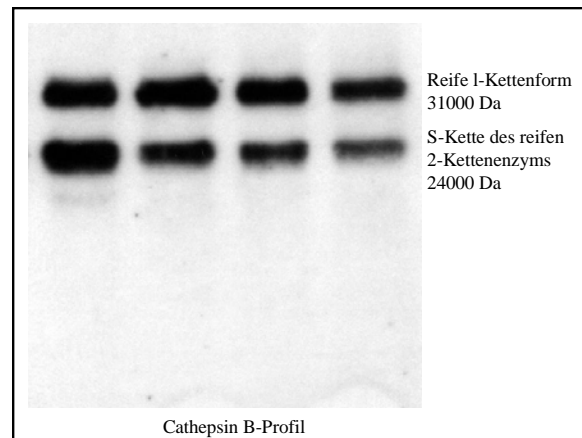


Abbildung 13: Cathepsin B, Western Blot

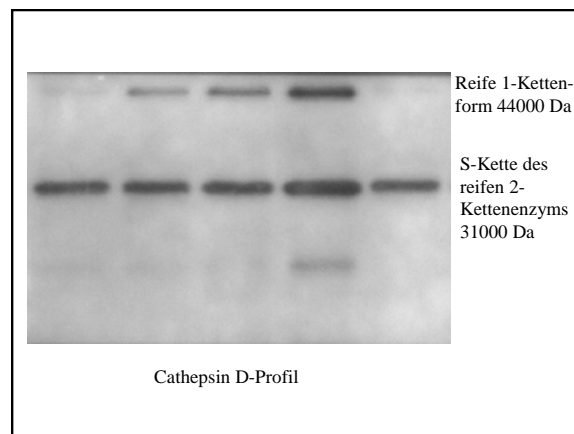


Abbildung 14: Cathepsin D, Western Blot

Der Effekt der einzelnen Stimulanzen auf die verschiedenen Zelllinien ist eher inhomogen. Zelllinie FTC 133 scheint hinsichtlich ihrer getesteten Stimulationsfähigkeit eine nur geringe Sensitivität der Cathepsin B- und Cathepsin D- Expression zu besitzen. Es lassen sich keine eindeutigen Expressionsdifferenzen darstellen (Abb. 18/19). Die Cathepsin-L-Synthese hingegen scheint in FTC 133 anderen Transduktionsmechanismen zu unterliegen. Abgesehen von Insulin, welches einen nur initialen synthesessteigernden Effekt zu haben scheint, vermögen

die übrigen Stimulanzien (PMA, Forskolin, TSH und EGF) über alle Expositionsintervalle hinweg eine gesteigerte Expression von Cathepsin L zu bewirken (Abb. 16/17).

Zelllinie 8505C weist neben einer im Vergleich zu FTC 133 höheren Expression der untersuchten Cathepsine auch ein akzentuiertes Ansprechverhalten der verschiedenen Transduktionswege auf. Sämtliche Stimulatoren führen mit Betonung von PMA, Insulin und EGF zu einer gesteigerten Expression aller drei Cathepsine (Abb. 20-24). Darüber hinaus zeigte der Einfluss von PMA auf die Cathepsin L-Synthese ein exponiertes Verhalten. Keines der hier getesteten Stimulanzien hatte eine stärkere Aktivierung der Cathepsin L-Expression zur Folge als PMA (Abb. 20-22). Diesen Befunden zufolge ist in der anaplastischen Zelllinie 8505C die IP3-vermittelte Aktivierung der Proteinkinasen B und C durch Faktoren wie Insulin, EGF oder PMA ein wesentlicher Stimulus der Cathepsinsynthese [169]. Eine cAMP-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase A hingegen besitzt nur untergeordnete Bedeutung in der Regulation der Cathepsinsynthese.

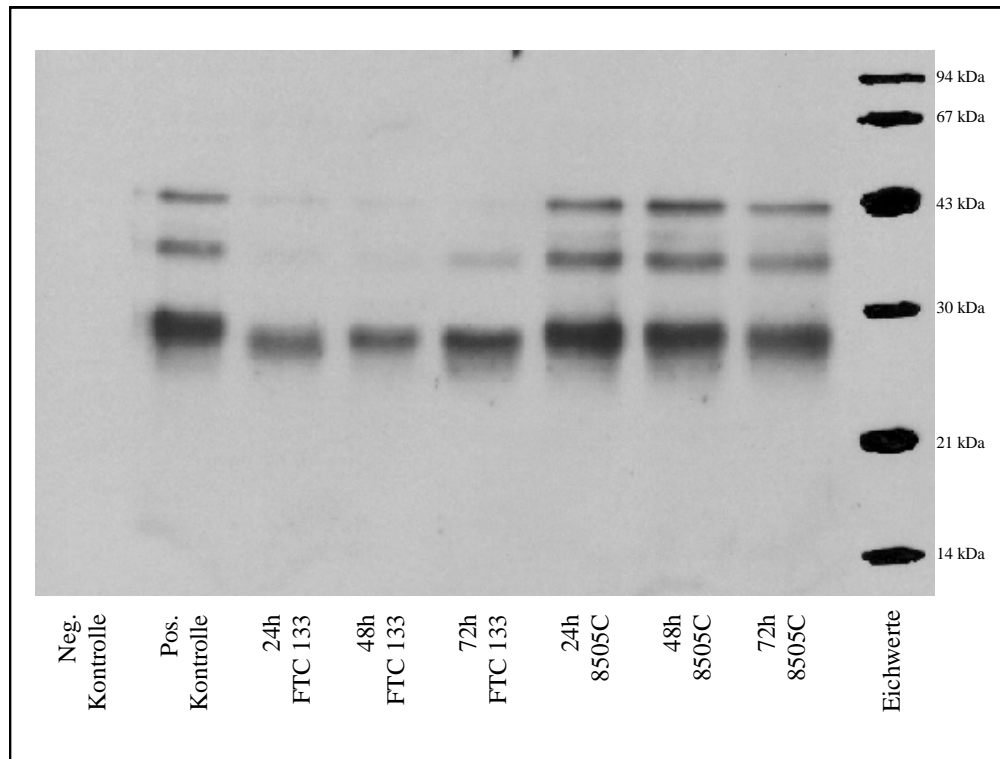


Abbildung 15: Cath. L: zeitabhängige Expression der Zelllinien FTC 133 und 8505C ohne Stimulation, nivelliert nach Zellzahl, Western Blot; neg. Kontrolle: Aqua dest.; pos. Kontrolle: 8505C, 24h

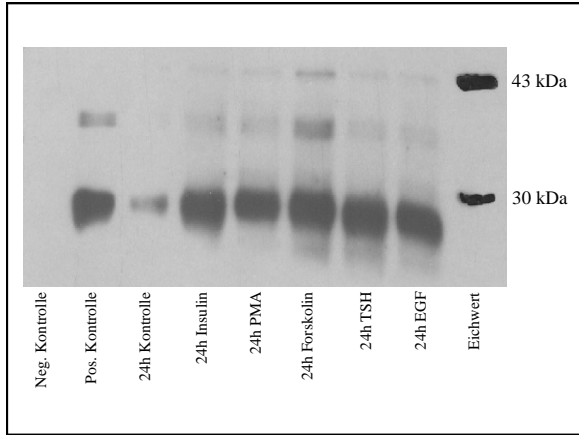


Abbildung 16: Cathepsin L: Expression der Zelllinie FTC 133, nivelliert nach Zellzahl, 24h Stimulation, Western Blot; neg. Kontrolle: Aqua dest.; pos. Kontrolle:8505C, 24h

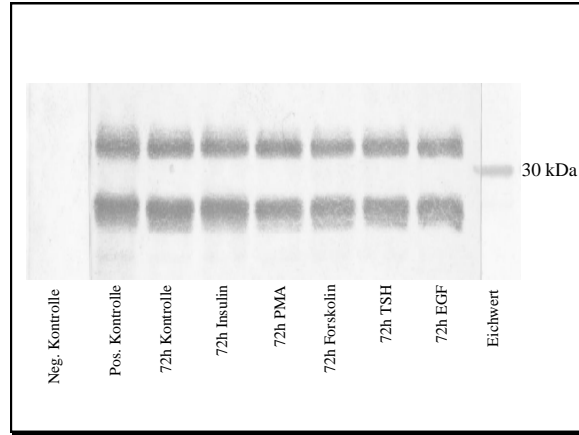


Abbildung 18: Cathepsin B: Expression der Zelllinie FTC 133, nivelliert nach Zellzahl, 72h Stimulation, Western Blot; neg. Kontrolle: Aqua dest.; pos. Kontrolle:8505C, 24h

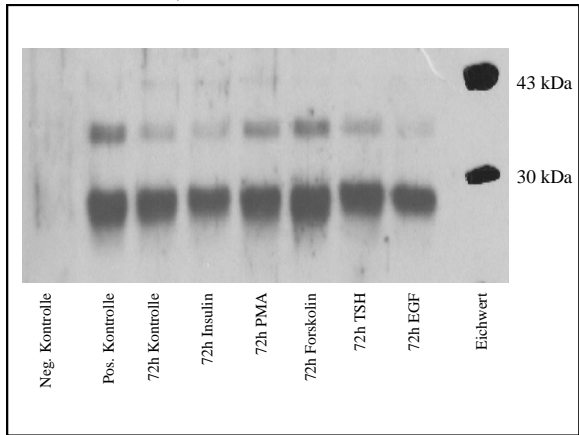


Abbildung 17: Cathepsin L: Expression der Zelllinie FTC 133, nivelliert nach Zellzahl, 72h Stimulation, Western Blot; neg. Kontrolle: Aqua dest.; pos. Kontrolle:8505C, 24h

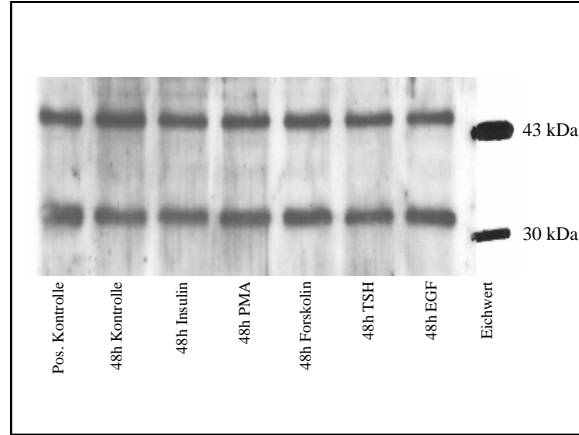


Abbildung 19: Cathepsin D: Expression der Zelllinie FTC 133, nivelliert nach Zellzahl, 48h Stimulation, Western Blot; neg. Kontrolle: Aqua dest.; pos. Kontrolle:8505C, 24h

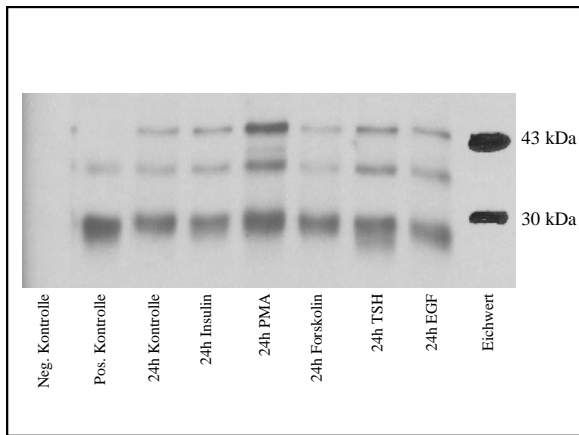


Abbildung 20: Cathepsin L: Expression der Zelllinie 8505C, nivelliert nach Zellzahl, 24h Stimulation, Western Blot; neg. Kontrolle: Aqua dest.; pos. Kontrolle:8505C, 24h

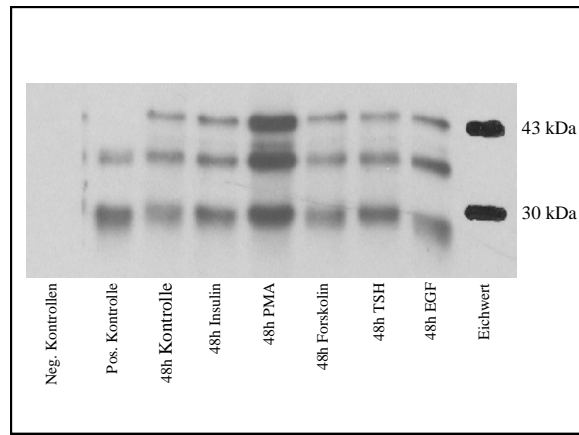


Abbildung 21: Cathepsin L: Expression der Zelllinie 8505C, nivelliert nach Zellzahl, 48h Stimulation, Western Blot; neg. Kontrolle: Aqua dest.; pos. Kontrolle:8505C, 24h

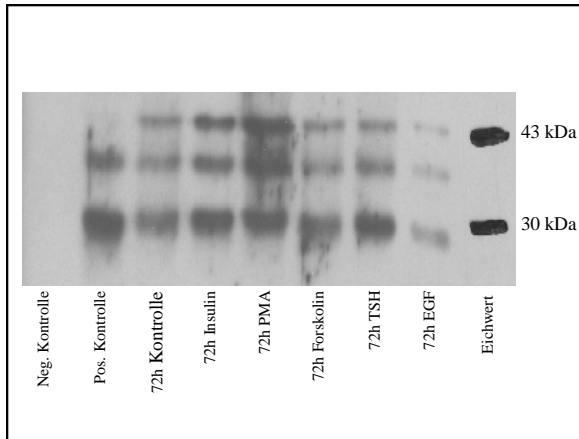


Abbildung 22: Cathepsin L: Expression der Zelllinie 8505C, nivelliert nach Zellzahl, 72h Stimulation, Western Blot; neg. Kontrolle: Aqua dest.; pos. Kontrolle: 8505C, 24h

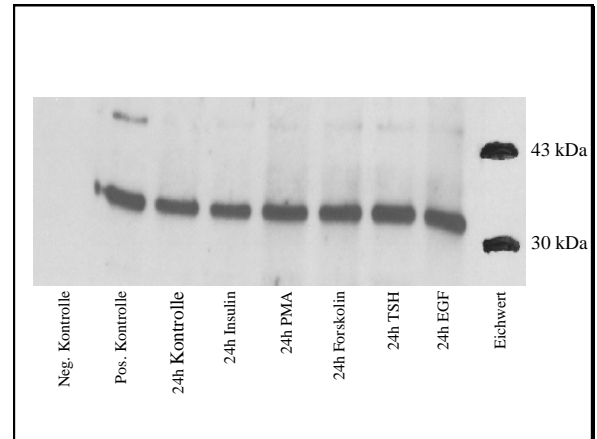


Abbildung 23: Cathepsin D: Expression der Zelllinie 8505C, nivelliert nach Zellzahl, 24h Stimulation, Western Blot; neg. Kontrolle: Aqua dest.; pos. Kontrolle: 8505C, 24h

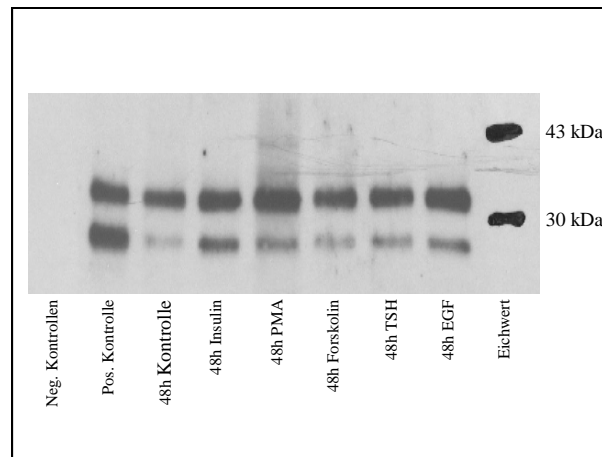


Abbildung 24: Cathepsin B: Expression der Zelllinie 8505C, nivelliert nach Zellzahl, 48h Stimulation, Western Blot; neg. Kontrolle: Aqua dest.; pos. Kontrolle: 8505C, 24h

#### 4.2.3 ELISA: Procathepsin L- und Cathepsin L-Konzentration im Zytoplasma

Zur Überprüfung der im Western Blot erhaltenen semiquantitativen Aussagen kam ein in unserer Arbeitsgruppe entwickelter Cathepsin L- und ProCathepsin L-ELISA zur Anwendung. Eingesetzt wurde ein monoklonaler Antikörper (CPLH-33/1) gegen ein Epitop im Abschnitt des reifen Enzyms, was eine Erfassung des Proenzym und der reifen Form ermöglichte.

Im Vergleich beider Zelllinien bestätigt sich das Ergebnis der Western Blot-Analyse mit einer deutlich gesteigerten Expression von Cathepsin L in Zelllinie 8505C. Dies bezieht sich sowohl auf den prozentualen Anteil der Protease an der Gesamtproteinmenge des Homogenats als auch auf den Anteil des Enzyms am Proteingehalt einer Zelle (Abb. 25).

Die Analyse der verschiedenen Stimulationen auf die Cathepsin-L-Synthese bestätigt ebenfalls das im Western Blot dargestellte Ergebnis: Cathepsin L lässt sich in FTC 133 durch alle Faktoren in seiner Synthese steigern, wobei Insulin einen nur initialen Stimulationseffekt hat (Abb. 26).

Zelllinie 8505C hingegen reagiert auf alle Stimulationsfaktoren mit einer vermehrten Cathepsin L-Produktion bei deutlicher Akzentuierung des PMA-Effekts. Dies entspricht ebenfalls exakt den Ergebnissen der Western Blot-Analyse (Abb. 27).

Darüber hinaus ist festzustellen, dass die Stimulationseffekte, insbesondere in Zelllinie FTC 133 zeitabhängig abnehmen. Dies scheint am ehesten dem FCS-freien Medium geschuldet, welches den Zellen nutritives Substrat vorenthält.

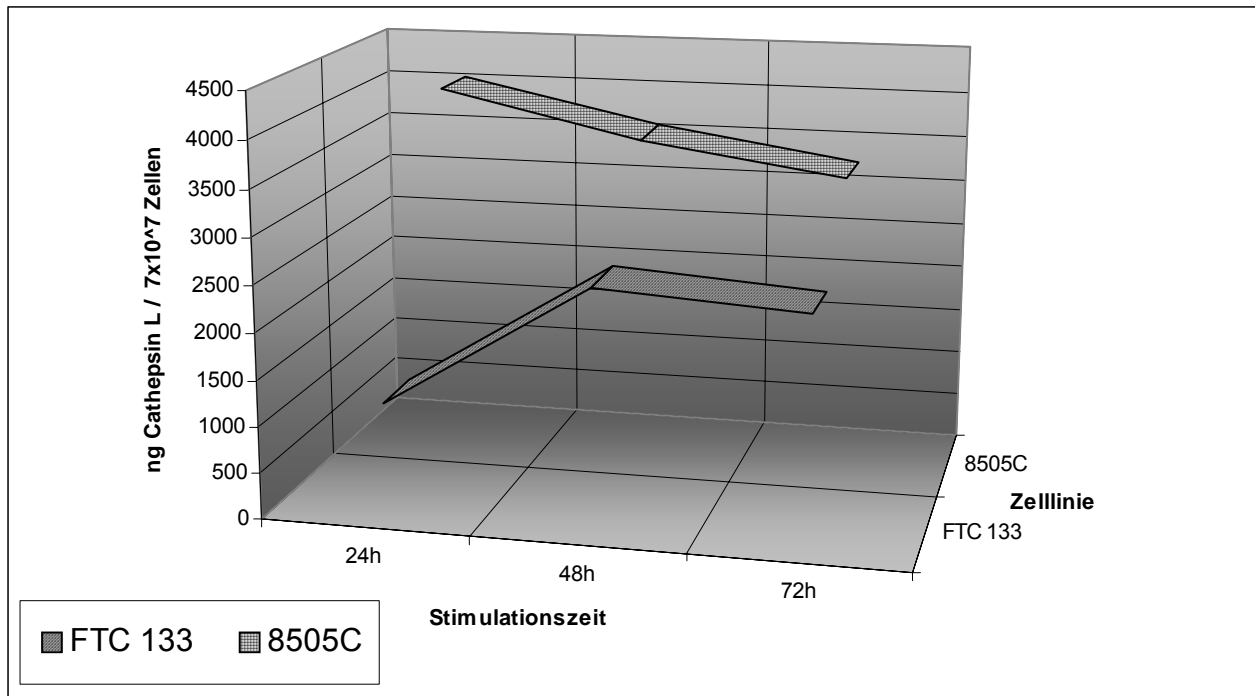


Abbildung 25: Cathepsin L: zeitabhängige zytoplasmatische Expression pro  $7 \times 10^7$  Zellen der Zelllinien FTC 133 und 8505C ohne Stimulation, ELISA



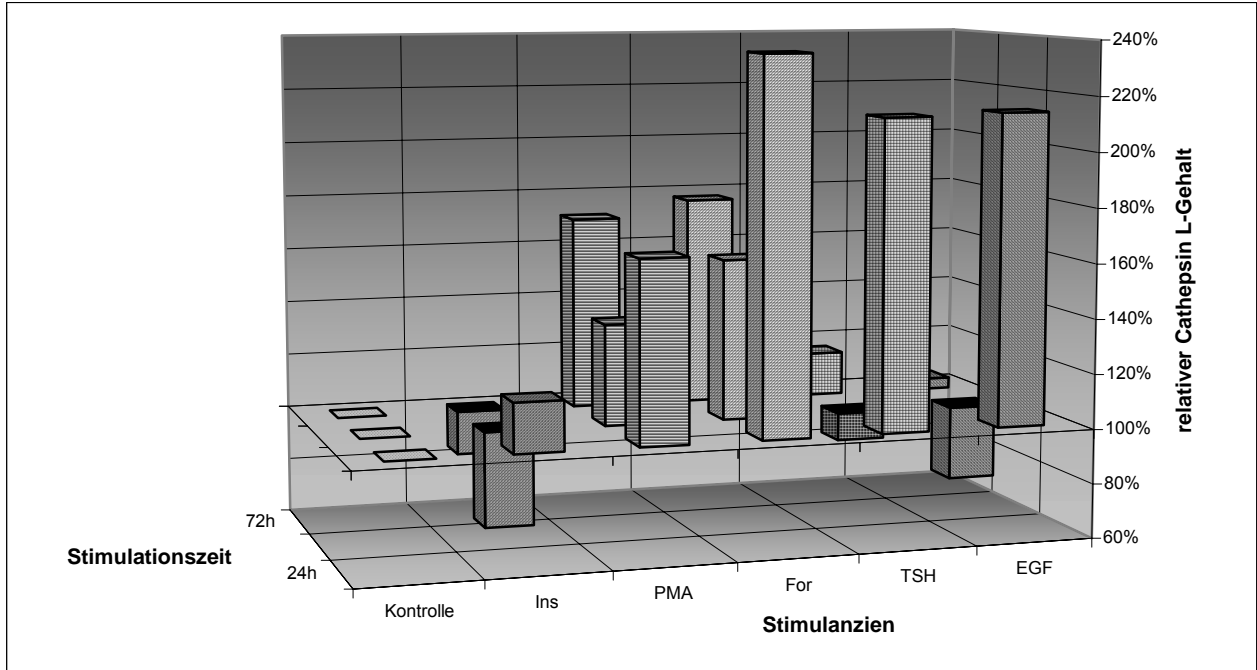


Abbildung 26: Cathepsin L: Anteil am zytoplasmatischen Proteingehalt einer Zelle der Zelllinie FTC 133 relativ zur Kontrollgruppe (Ko), ELISA

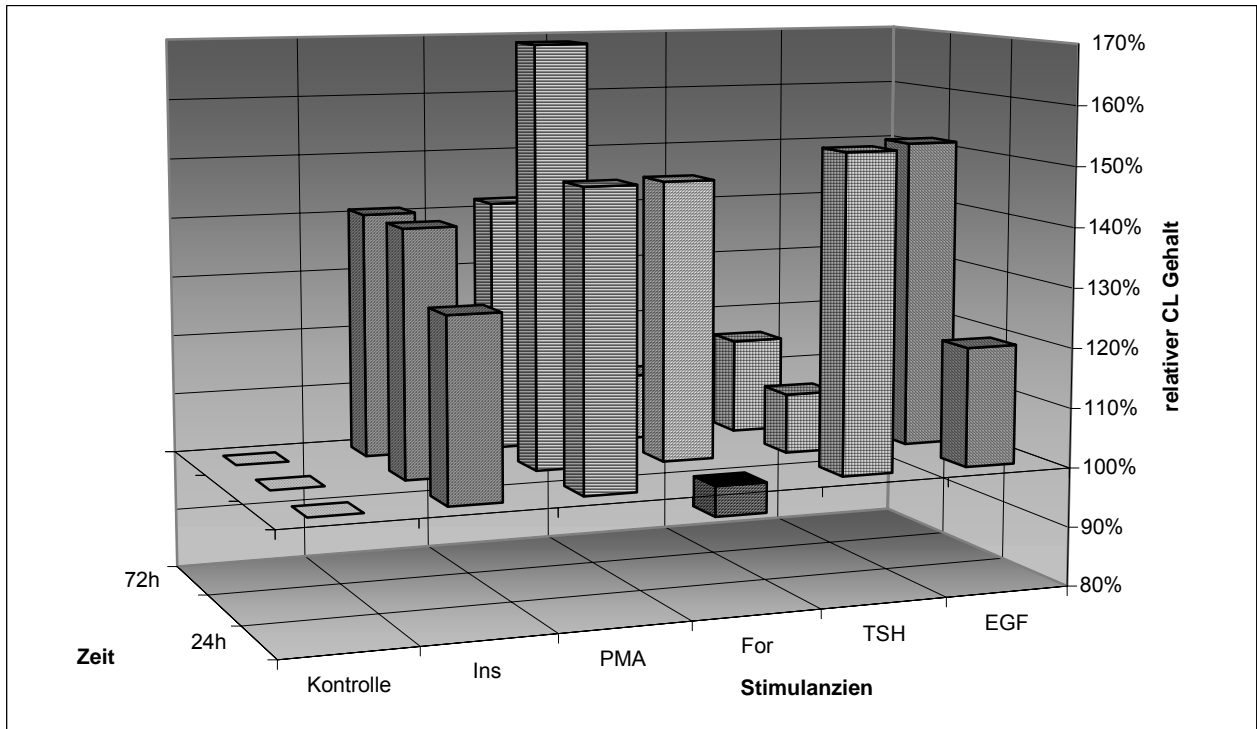


Abbildung 27: Cathepsin L: Anteil am zytoplasmatischen Proteingehalt einer Zelle der Zelllinie 8505C relativ zur Kontrollgruppe (Ko), ELISA

#### 4.2.4 Nachweis von sezerniertem Cathepsin L im konditionierten Medium durch Western Blot

Maligne Zellen definieren sich u.a. durch ihre Fähigkeit zur Infiltration und Invasion. Werkzeuge zur Realisierung dieser Mechanismen sind u.a. proteolytische Enzyme, welche von malignen Zellen in das Interstitium sezerniert werden, um Basalmembranen penetrieren und Zellverbände lösen zu können.

Deshalb erfolgte eine Analyse der Kulturüberstände beider Zelllinien. Im Western Blot gelang der Nachweis von Cathepsin L im konditionierten Medium der anaplastischen Zelllinie 8505C mittels polyklonalem Antikörper (RD-Laboratories). Wie der *Abbildung 28* zu entnehmen, findet sich auch hier nach Exposition mit PMA, in Analogie zur zytoplasmatischen Cathepsin L-Expression, eine deutlich gesteigerte Sekretion von Cathepsin L.

In der Zelllinie FTC 133 hingegen ließ sich mittels Western Blot des konditionierten Mediums kein Cathepsin L nachweisen. Im Vergleich zu 8505C beweist dies eine fehlende oder sehr viel geringere Cathepsin L-Sekretion.

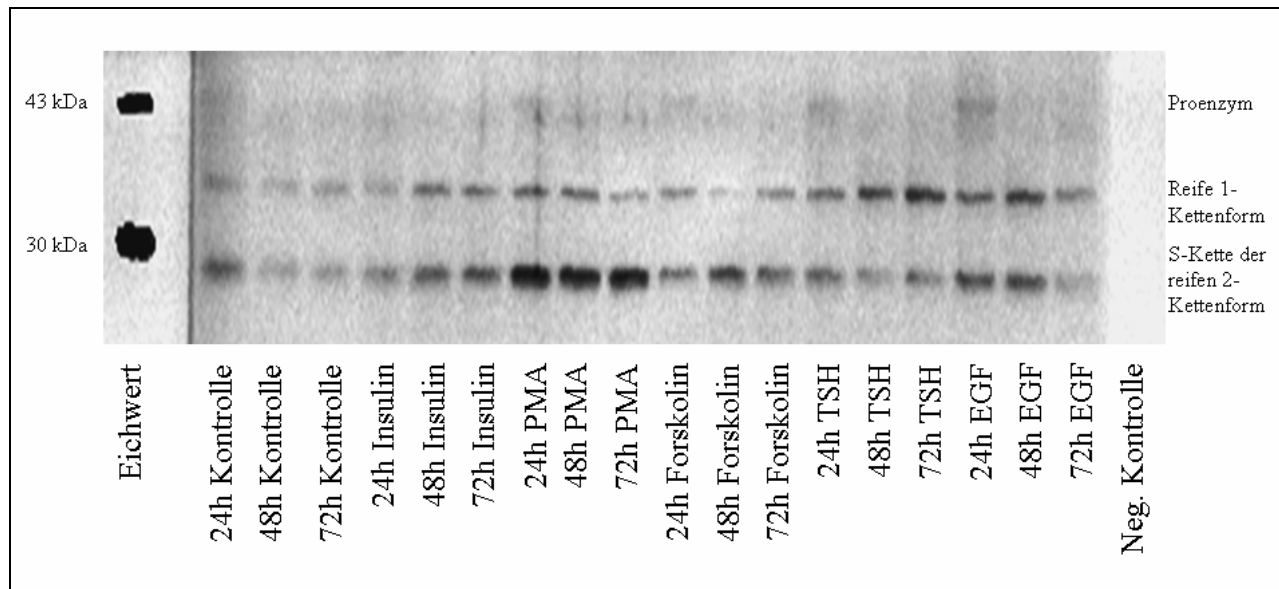


Abbildung 28: Cathepsin L: Kulturmedium der Zelllinie 8505C, Western Blot; Negativkontrolle: Aqua dest.

#### 4.2.5 Quantitative Bestimmung von sezerniertem Procathepsin L und Cathepsin L im Kulturmedium durch ELISA

Um die Ergebnisse der Western Blot Analyse zu quantifizieren, wurde die Untersuchung des Mediums mittels ELISA ergänzt. Durch Verwendung monoklonaler Antikörper, spezifisch für Epitope der Prosequenz (2D4) und der reifen Cathepsin-L-Sequenz (33/1), ließen sich differenzierte Aussagen zur extrazellulären Form des Enzyms Cathepsin L treffen.

Die follikuläre Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC 133 wies einen geringen Cathepsin-L-Gehalt im Kulturmedium auf. Die nachgewiesene Menge lag unterhalb der Detektionsschwelle des

Western Blot, weshalb mit dieser Methode kein Nachweis gelang. Im Vergleich beider Zelllinien ließ sich ein deutlich höherer Gehalt von Cathepsin L im Medium der anaplastischen Zelllinie 8505C bestätigen (Abb. 29). Wie im Western Blot schon zu erkennen, bezieht PMA unter den Stimulanzen der Zelllinie 8505C eine exponierte Stellung, da es eine signifikant gesteigerte Sekretion der lysosomalen Protease bewirkt (Abb. 30/31).

Differenziert man das nachgewiesene Cathepsin L mit Hilfe der o.g. monoklonalen Antikörper in seine reife Form sowie sein Proenzym, so ist zu erkennen, dass die Sekretion überwiegend als Proenzym erfolgt (Abb. 31).

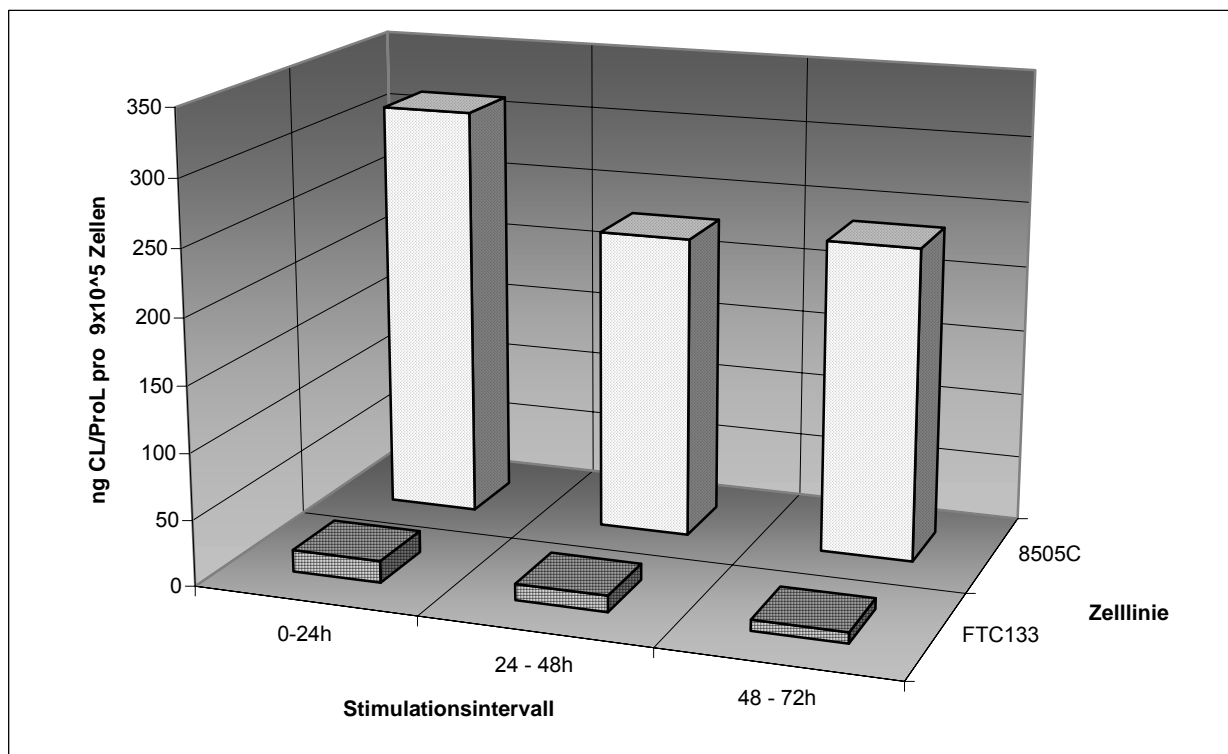


Abbildung 29: Cathepsin L / Procathepsin L (mAK 33/1): zeitabhängiger Gehalt im Kulturmedium der nicht stimulierten Zelllinien FTC 133 und 8505C pro  $9 \times 10^5$  Zellen, ELISA

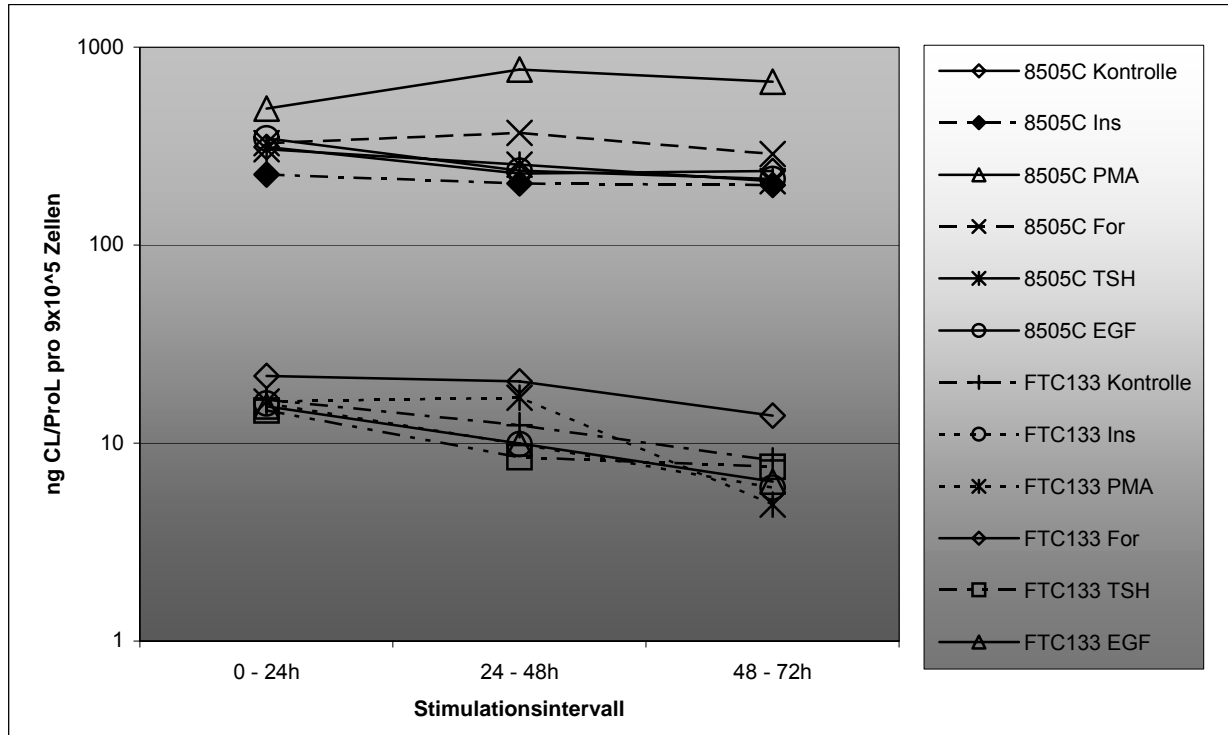


Abbildung 30: Cathepsin L / Procathepsin L (mAK33/1): Zeit- und Stimulanzen- abhängiger Gehalt im Kulturmedium der Zelllinien FTC 133 und 8505C pro  $9 \times 10^5$  Zellen, ELISA

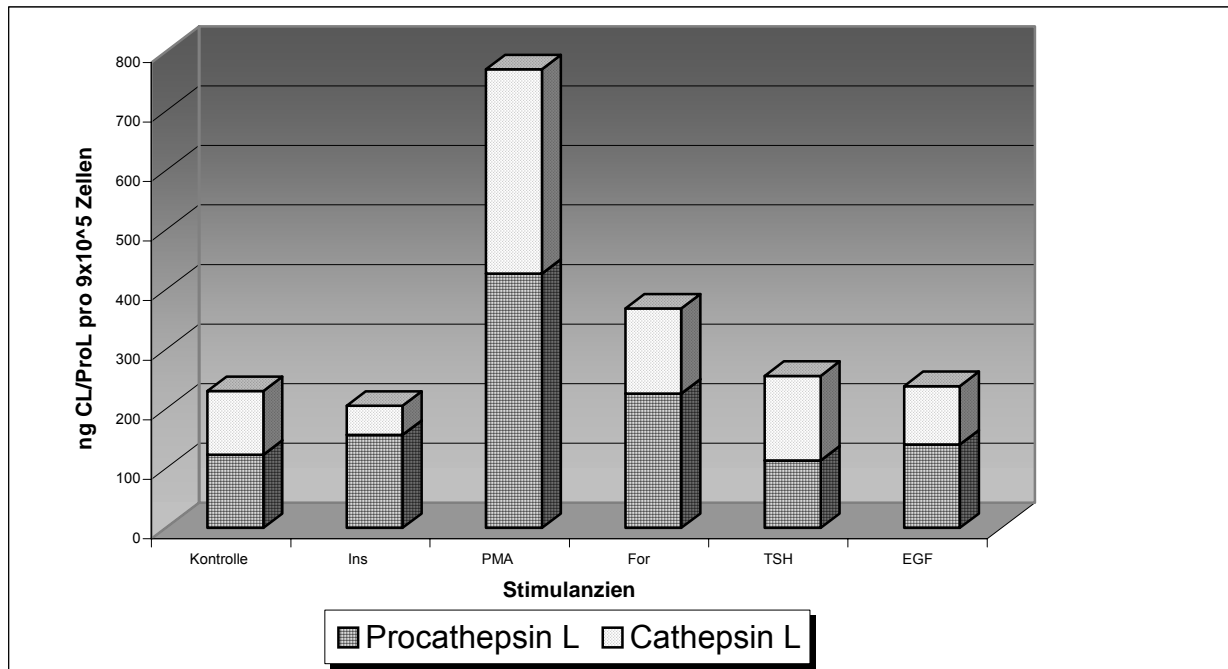


Abbildung 31: Procathepsin L und Cathepsin L (mAK 33/1 & 2D4): Stimulanzen- abhängiger Gehalt im Kulturmedium der Zelllinie 8505C nach 24 - 48h Stimulation pro  $9 \times 10^5$  Zellen, ELISA

#### 4.2.6 Aktivität der sezernierten Cathepsine L und B

Werden Enzyme von Zellen sezerniert, so lassen sich diese mittels Western Blot und ELISA sensitiv erfassen, eine Aussage hinsichtlich ihrer biochemischen Funktionsfähigkeit ist mit diesen Methoden jedoch nur schwer zu treffen. Deshalb erfolgte eine Bestimmung der Aktivitäten von Cathepsin L und Cathepsin B im Kulturmedium.

Im Vergleich beider Zelllinien spiegeln sich die Ergebnisse der semiquantitativen und quantitativen Cathepsin-Bestimmung im Medium wieder mit deutlich höheren Aktivitäten der Cathepsine L und B im Medium der Zelllinie 8505C. Zusätzlich lässt sich anhand der Aktivitätsmuster zeigen, dass auch Cathepsin B wie schon Cathepsin L (siehe Kapitel 4.2.5.) zu einem großen Anteil als Propeptid sezerniert wird (Abb. 34). Dies verdeutlicht, dass anaplastische Tumorzellen der Zelllinie 8505C deutlich mehr aktives Cathepsin L und B einschließlich ihrer Pro-Formen sezernieren als die differenzierten follikulären Zellen der Linie FTC 133 (Abb. 32-34).

Darüber hinaus zeigte keines der angewandten Stimulanzien eine signifikante Erhöhung der Cathepsinaktivitäten im Kulturmedium der Zelllinie FTC 133. 8505C verhält sich diesbezüglich erneut konträr. Während Stimulationsfaktoren wie Insulin, Forskolin, TSH und EGF keinen eindeutigen Einfluss auf die Höhe der Aktivitäten der Enzyme haben, weist PMA erneut eine exponierte Position mit signifikant elevierten Aktivitätsniveaus beider Cathepsine auf (Abb. 32/33).

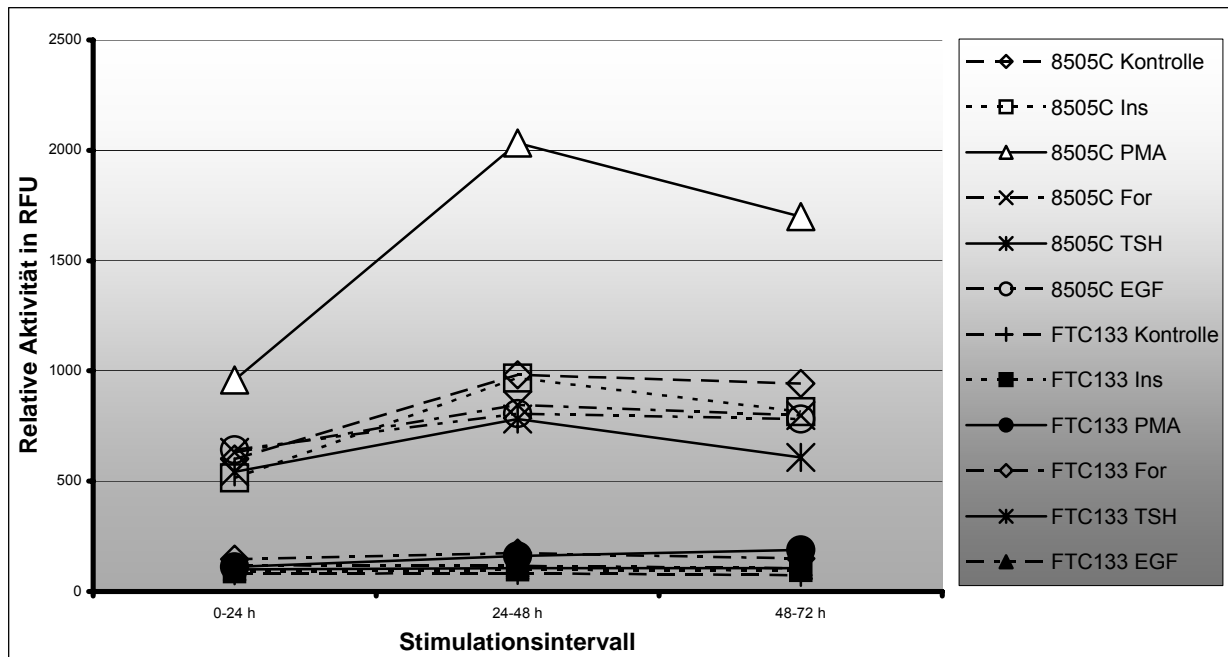


Abbildung 32: Cathepsin L: Aktivität im Kulturmedium der Zelllinien FTC 133 und 8505C in Abhängigkeit von Stimulationsfaktoren und Stimulationsintervallen.

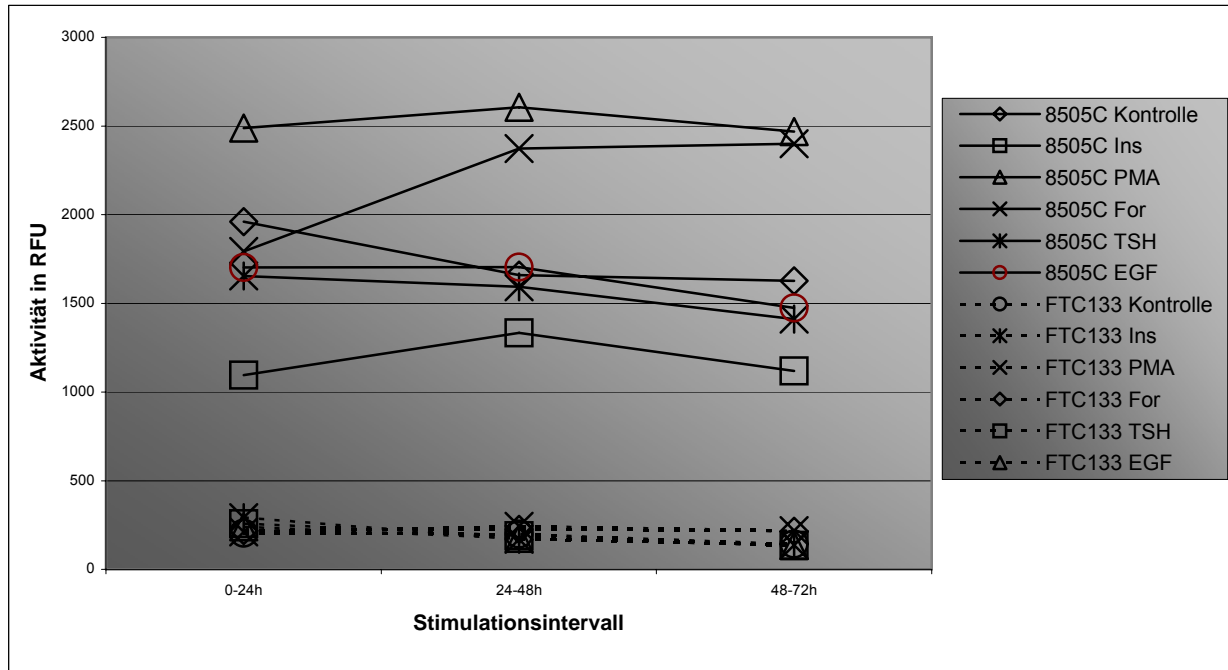


Abbildung 33: Cathepsin B: Aktivität im Kulturmedium der Zelllinien FTC 133 und 8505C in Abhängigkeit von Stimulationsfaktoren und Stimulationsintervallen (nach Pepsinaktivierung des Proenzym).

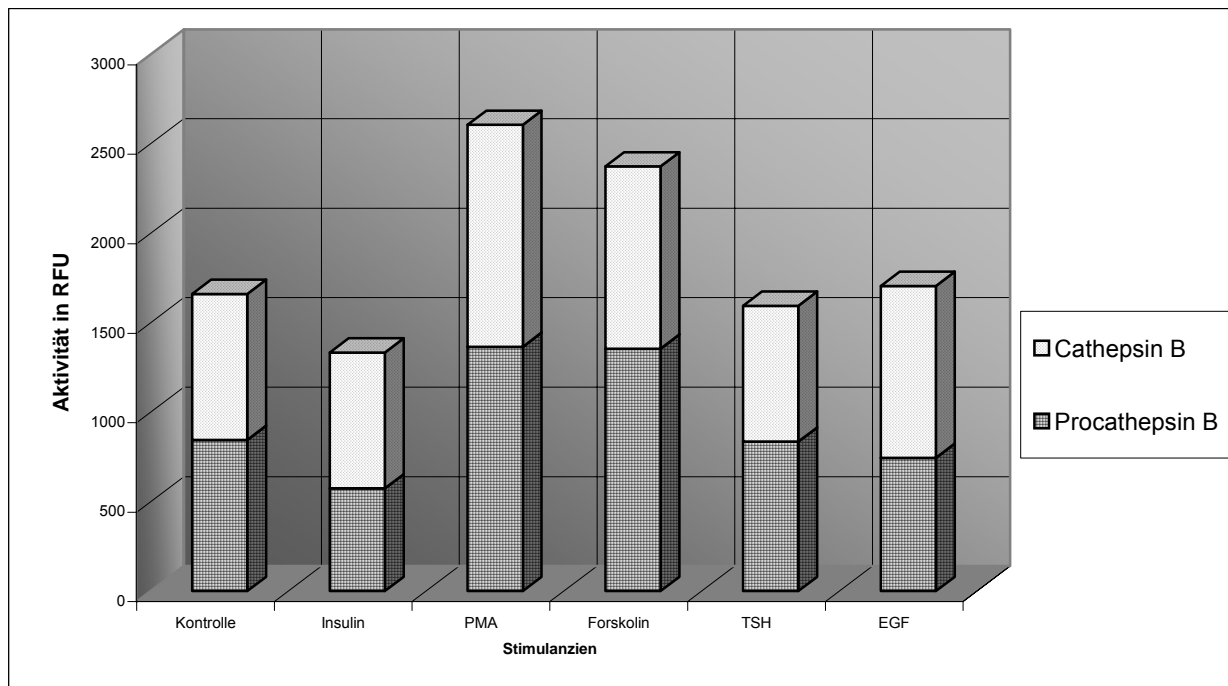


Abbildung 34: Cathepsin B und Procathepsin B: Aktivität im Kulturmedium der Zelllinie 8505C in Abhängigkeit der Stimulationsfaktoren, 24 – 48h Stimulationsintervall, vor und nach Aktivierung des Proenzym.

### 4.3 Zellproliferationsassay

Wachstumsfaktoren können sowohl Einfluss auf den Proteingehalt einer Zelle (Hypertrophie) als auch ihre proliferativen Eigenschaften haben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte ergänzend eine Analyse des proliferativen Effekts der Stimulationsfaktoren.

Beide Zelllinien (FTC 133 und 8505C) ließen sich in ihrer proliferativen Eigenschaft durch die Stimulanzen beeinflussen, verhielten sich dabei jedoch deutlich divergent.

FTC 133 zeigte initial nach Exposition mit PMA, Forskolin, TSH und EGF eine deutlich gesteigerte Proliferation, während die Insulin-Stimulation diesbezüglich ohne Effekt blieb. Über die Stimulationsintervalle betrachtet, schwächte sich diese Wirkung bei allen Faktoren ab, möglicherweise als Folge des FCS-freien Mediums oder einer Down-Regulation (*Abb. 35*).

8505C ließ sich durch Forskolin in seiner mitotischen Aktivität nicht beeinflussen. Die übrigen Faktoren PMA, Insulin, TSH und EGF wiesen, über die Stimulationsintervalle betrachtet, eine deutliche Steigerung der Proliferation auf (*Abb. 36*). Insulin ist hierbei hervorzuheben, da es in Zelllinie FTC 133 als einziger Faktor ohne mitotischen Effekt bleibt, hingegen in Zelllinie 8505C den potentesten Proliferationsfaktor darstellt.

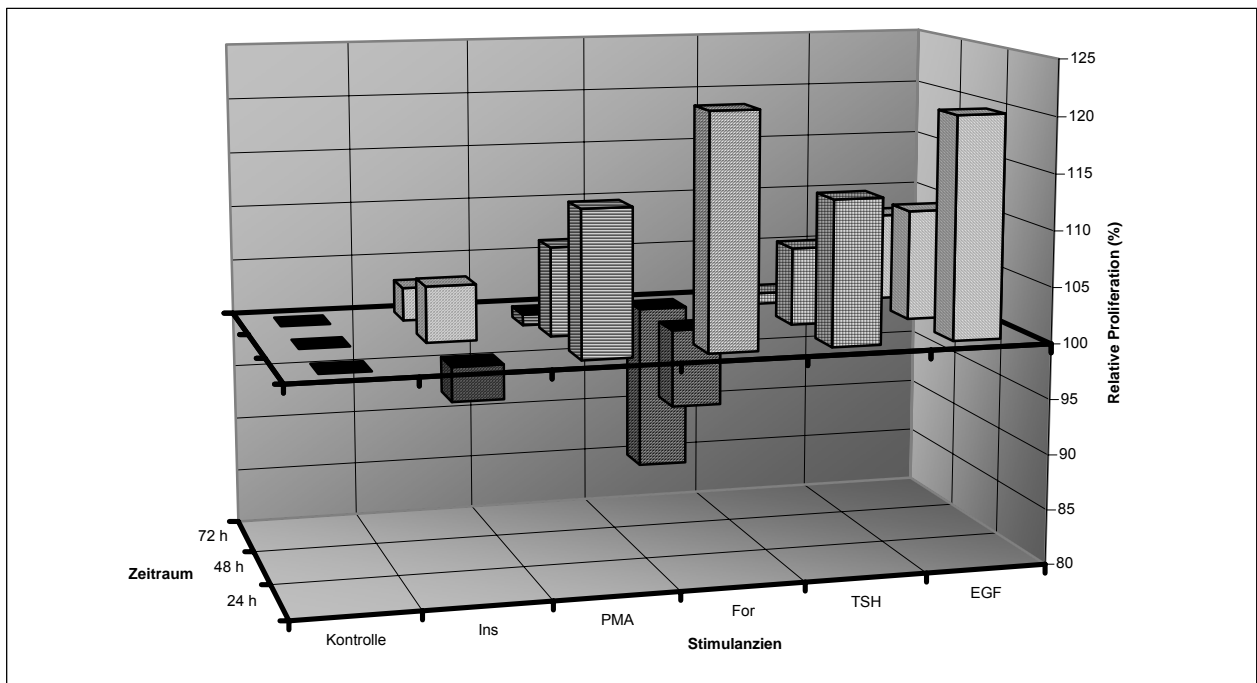


Abbildung 35: Zeitabhängige Proliferation der Zelllinie FTC 133 relativ zur nicht stimulierten Kontrollgruppe.

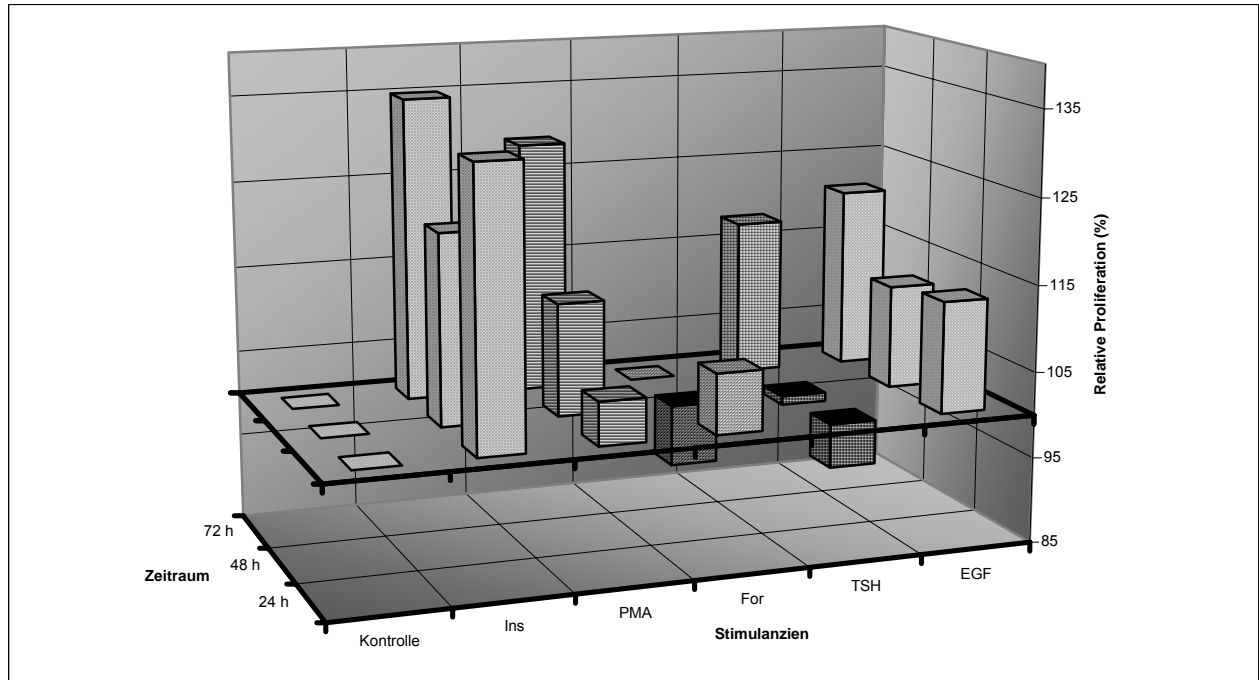


Abbildung 36: Zeitabhängige Proliferation der Zelllinie 8505C relativ zur nicht stimulierten Kontrollgruppe.

## 5 Diskussion

### 5.1 Wachstumsfaktoren und ihre Bedeutung für maligne Tumoren

#### 5.1.1 Der Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Proteinsynthese und Proliferation von Tumorzellen

Ausgang der Tumorgenese ist die Bildung von Onkogenen durch Mutationen im Bereich von Proto-Onkogenen. Proto-Onkogene kodieren Proteine, die in der Regel eine wichtige Rolle bei der physiologischen Proliferation und Differenzierung der Zelle spielen. Das Onkogen v-erbB ist beispielsweise eine verstümmelte Variante des c-erbB, welches für eine verkürzte Form des EGF-Rezeptors kodiert. Bedingt durch die genetische Alteration von Proto-Onkogenen kann es zu einer Überexpression von Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren kommen [24, 162, 179]. Unter Aufhebung einer zumeist strengen Zelltopographie führt die permanente zelleigene Produktion von Wachstumsfaktoren und/oder ihrer Rezeptoren, vermittelt durch autokrine, parakrine und intrakrine Effekte, zur Daueraktivierung. Durch den konstanten Reiz für kontinuierliches Wachstum und Zellproliferation werden die Zellen von ihrer normalen physiologischen Kontrolle befreit – es resultiert Autonomie.

So heterogen die nachgewiesenen tumorassoziierten Genalterationen sind, so heterogen erscheinen auch ihre Transkripte. Stimulationsuntersuchungen mit Wachstumsfaktoren an unterschiedlichen Tumoren und von ihnen abgeleiteten Zelllinien stützen diese Befunde und



lassen unterschiedliche, spezifische Repertoires an Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren vermuten. TSH hatte in differenzierten Schilddrüsenkarzinomen unterschiedliche Proliferationseffekte, was auf tumorspezifische Modifikationen des TSH Transduktionsweges hinweist [137]. Für EGF ließ sich in malignen Schilddrüsenzellen eine starke Proliferationssteigerung nachweisen [139], was möglicherweise auf ein entdifferenzierungsbedingtes Wiedererlangen von erbB-Rezeptoren zurückzuführen ist. Zusätzlich zeigen TSH, Insulin und IGF, z.T. mit additiver Wirkung, proliferative Effekte in differenzierten Schilddrüsentumoren [64]. Anaplastische Schilddrüsenkarzinome sind hoch maligne, schnell wachsende Neoplasmen, welche eine effiziente Neovaskularisation verlangen, vermittelt beispielsweise durch die Synthese und Sekretion von Angiogenesefaktoren wie PDGF [223].

Zieht man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Betracht, weist die differenzierte Zelllinie FTC 133 noch typische Merkmale von Thyreozyten auf. Insulin ist ohne Proliferationseffekt. Hingegen vermögen TSH und EGF ohne permissiven Effekt von Insulin (Siehe 2.4.4) eine Proliferation zu induzieren. Gleiches gilt für PMA und Forskolin, möglicherweise über die neu gewonnene Kompetenz, MAP-Kinasen oder PKB zu aktivieren oder IGF-ähnliche Faktoren zu synthetisieren. Wachstumsfaktoren können, je nach Tumorart, unterschiedliche Effekte induzieren. Ursächlich liegt dieser Eigenschaft am ehesten eine variable Rekrutierung von Transduktionswegen zu Grunde.

8505C gilt als anaplastische Schilddrüsenkarzinomzelllinie, was eine zunehmende Bedeutungslosigkeit des cAMP-Weges, der in Thyreozyten zelluläre Differenzierung vermittelt, mitzubringen scheint. Das würde erklären, warum Forskolin keinen Effekt auf die Proliferation der Zelllinie hatte. Der von EGF und insbesondere PMA aktivierte PKC-Transduktionsweg scheint mit zunehmender Entdifferenzierung an Signifikanz zu gewinnen. PMA wies hierbei die stärksten Proliferationseffekte auf.

Transduktionswege, die in Thyreozyten für die Aufrechterhaltung spezifischer Funktionen wichtig waren, werden im Rahmen der malignen Transformation modifiziert und inhibiert. Andere Signaltransduktionswege (MAP-K, PKC), die möglicherweise embryonal eine größere Rolle spielten und Prozesse der Proliferation und Proteinsynthese vermitteln, werden neu rekrutiert.

### **5.1.2 Wachstumsfaktoren und der Grad der Tumordifferenzierung**

Der Malignitätsgrad korreliert häufig indirekt mit dem Differenzierungsgrad von Tumoren. Je entdifferenzierter ein Malignom ist, desto autonomer erscheint es im Zellverband, da es sich dank mangelnder Differenzierung den stringenten, organotopen Regulationsmechanismen entziehen kann. Es resultiert u. a. ein ungehemmtes Wachstum.

Wachstumsfaktoren können sowohl differenzierend als auch entdifferenzierend auf Zellen wirken. So fördern TSH und Forskolin über eine Aktivierung des cAMP/PKA-Transduktionssystems in Schilddrüsenkarzinomen die Expression von Differenzierungsmarkern,

was unter anderem inhibierende Wachstumseffekte nach sich zieht [39, 70]. EGF und PMA hingegen initiieren eine Entdifferenzierung der Tumorzellen [39, 79]. Im Zuge der Entdifferenzierung kommt es darüber hinaus zu einer verstärkten Expression von EGF-Rezeptoren, so dass anaplastische Schilddrüsenkarzinome eine deutlich höhere Dichte an EGFR auf ihrer Oberfläche aufweisen als differenzierte Karzinome oder Normalgewebe [79]. Die Expression von TSH-Rezeptoren als Ausdruck der differenzierten Funktion verhält sich diesbezüglich indirekt proportional [70, 218]. Dieses Phänomen bleibt nicht auf Schilddrüsenkarzinome beschränkt, sondern ist in zahlreichen Malignomen anzutreffen [74]. So exprimieren Erythroblasten der Erythroleukämie verstärkt EGFR, reife Erythrozyten jedoch nicht [99]. Ähnlich Korrelationen zwischen EGF/EGFR-Expression und histologischem Grad der Differenzierung fanden sich für Pankreas- und Mammakarzinome sowie Melanome [95, 161, 210].

### **5.1.3 Der Einfluß von Wachstumsfaktoren auf Cathepsinexpression und -sekretion**

#### **Expression der Cathepsine L, B und D**

Viele Malignome, wie Mamma-, Kolon- und Schilddrüsenkarzinome, weisen neben erhöhten Expressionsniveaus von Wachstumshormonen und ihren Rezeptoren auch erhöhte Spiegel an Proteasen auf. Häufig korrelieren die Niveaus mit klinisch relevanten Faktoren wie Malignität und Entdifferenzierung. So ließ sich an Schilddrüsenkarzinomzelllinien zeigen, dass eine Aktivierung der Proteinkinase C über PMA oder EGF, im Gegensatz zu normalen Thyreozyten, eine Steigerung der MMP-1-Expression induziert. TSH und Forskolin hingegen waren von inhibierendem Effekt [159]. Diese Daten lassen eine enge Verknüpfung von Wachstumsfaktoren und tumorassoziierten proteolytischen Systemen vermuten.

Die Schilddrüse liegt physiologischerweise im Brennpunkt 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. TSH stimuliert in Thyreozyten über cAMP die Cathepsin L-, B- und D-Expression, was eine vermehrte Thyroxinsynthese bewirkt [130]. Die Datenlage hinsichtlich des Einflusses von Wachstumsfaktoren auf die tumorassoziierte Proteolyse in Schilddrüsenmalignomen ist jedoch aktuell noch eingeschränkt.

Im Rahmen unserer Untersuchungen an Schilddrüsenkarzinomzellen unterschiedlichen Differenzierungsgrades führte in Zelllinie FTC 133 kein Faktor zu einer nennenswerten Beeinflussung der Cathepsin B- und D-Synthese. Die Cathepsin L-Expression wird insbesondere initial durch alle Faktoren gesteigert. Diese im Western Blot gewonnenen Daten ließen sich hinsichtlich der Cathepsin L-Expression im ELISA bestätigen. Die entdifferenzierte Zelllinie 8505C hingegen, zeigte ein komplett differentes Verhalten. Sämtliche Stimulatoren führten im Western Blot, mit Betonung von PMA, Insulin und EGF, zu einer gesteigerten Expression aller drei Cathepsine. PMA als direkter Aktivator der Proteinkinase C stellte sich als

potentester Faktor der Cathepsin L-Synthese dar. Diese gesteigerte Sensibilität der anaplastischen Zelllinie gegenüber Wachstumsfaktoren und die deutliche Akzentuierung des PMA-Effekts auf die Cathepsin L-Synthese spiegelte sich ebenfalls im ELISA wider.

Lysosomale Enzyme scheinen somit Teil der Wachstumsfaktor-vermittelten Regelkreise zu sein. Sind diese, wie in malignen Zellen, durch Oncogenaktivierungen alteriert und überstimuliert, kann eine vermehrte Expression von lysosomalen Proteasen die Folge sein. Lysosomale Enzyme realisieren schließlich als proteolytische Werkzeuge des Tumors einen Teil der Zellantwort, wie Migration, Infiltration, Invasion und Metastasierung.

### **Sekretion der Cathepsine L, B und D**

Wie in Kapitel 5.3.5 dargestellt, scheinen die Fähigkeit der Membranassoziation und der Sekretion von Cathepsinen prädisponierende Faktoren für Prozesse der Tumordinvasion und -infiltration zu sein. Analog der intrazellulären Expression von Cathepsinen ist bei den untersuchten Schilddrüsenkarzinomzelllinien auch eine signifikante Steigerung der Sekretion lysosomaler Enzyme zu finden.

Während in der differenzierten Zelllinie FTC 133 die Sekretionsmengen an Cathepsinen im Western Blot unterhalb der Detektionsgrenzen lagen, konnten im ELISA signifikante Mengen an Cathepsin L im Medium nachgewiesen werden. Aktivitätsmessungen bestätigten, dass sowohl Cathepsin L als auch Cathepsin B und sein Proenzym sezerniert werden. Sekretionsunterschiede nach Inkubation mit den Stimulationsfaktoren ließen sich jedoch weder auf Protein- noch auf Aktivitätsebene finden.

Die anaplastische Schilddrüsenkarzinomzelllinie 8505C verhält sich auch bezüglich der Sekretion proteolytischer Enzyme deutlich different. Bereits in der semiquantitativen Western Blot-Analyse fand sich eine signifikante Sekretion von Cathepsin L. Analog der zytoplasmatischen Cathepsin L-Expression vermittelte PMA eine signifikante Sekretionssteigerung des Enzyms. Der ELISA als sensitiveres Verfahren bestätigte die deutliche Zunahme der Konzentration von Pro- und reifem Cathepsin L im Medium nach PMA-Stimulation, während die übrigen Faktoren keinen Einfluss auf die Sekretion der Protease hatten. Auch auf Aktivitätsniveau reflektierte sich das in der Proteinanalyse gewonnene Bild. PMA führte als einziges Stimulans zu erhöhten Cathepsin L- und B-Aktivitäten im Kulturmedium. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass beide Cathepsine als reifes Enzym und als Proenzym sezerniert werden.

Native Thyreozyten besitzen unter physiologischen Bedingungen die Fähigkeit, unter TSH-Stimulus lysosomale Proteinase wie Cathepsin L, B und D am apikalen Zellpol zu sezernieren. Ziel ist hierbei die Thyreoglobulindegradierung zur Schilddrüsenhormonfreisetzung. Im Verlauf des Transformationsprozesses zum differenzierten und schließlich entdifferenzierten Schilddrüsenkarzinom scheint es zur Alteration bestehender und Rekrutierung ursprünglicher Transduktionssysteme zu kommen. Die Eigenschaft des Thyreozyten, Proteinase sezernieren

zu können, bleibt grundsätzlich bestehen, dient aber neuen Bestimmungen und unterliegt modifizierten Regulationsmechanismen. So induzierte die Stimulation mit TSH weder in der differenzierten noch in der entdifferenzierten Schilddrüsenkarzinomzelllinie eine Sekretionssteigerung der Proteasen. In der anaplastischen Zelllinie 8505C bewirkte die Transformation neben einer hohen basalen Sekretion von lysosomalen Proteasen möglicherweise auch eine Wiedereröffnung im Rahmen der Differenzierung verlassener Transduktionswege. Wie bereits an Bronchial-Karzinom-Zelllinien 1993 beobachtet [78], stimuliert PMA als direkter Aktivator der Proteinkinase C auch in der Schilddrüsenkarzinomzelllinie 8505C einen potenten Weg der Synthese- und Sekretionssteigerung von lysosomalen Proteasen. Ähnliche Ergebnisse konnten an transformierten murinen Fibroblasten gezeigt werden, die nach Stimulation mit PDGF (Platelet-derived Growth Factor) eine deutliche Steigerung der Cathepsin L-Synthese und Verschiebung des intrazellulären Transportweges von lysosomal nach extrazellulär-sekretorisch aufwiesen [159]. Prostatakarzinomzellen zeigten gleiche Eigenschaften mit vermehrter Sekretion von Kollagenasen (MMP-9 und MMP-2), inkubierte man sie mit TGF-beta1 [181]. Es ist anzunehmen, dass diese Befunde ein erklärendes, wenn auch inkomplettes Modell geben, klinische Charakteristika der verschiedenen Schilddrüsenkarzinome zu verstehen. So ist es plausibel, dass die Zelllinie 8505C des hochmalignen, anaplastischen Karzinoms mit hoher Metastasierungs- und Progressionstendenz ein deutlich höheres Sekretionsvermögen lysosomaler Proteinase aufweist als die differenzierte Tumorzelllinie FTC 133.

#### **5.1.4 Wachstumsfaktoren als Malignitätskriterien und Prognosefaktoren**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass in Schilddrüsenkarzinomen der Grad der Entdifferenzierung und Malignität mit der Fähigkeit einer gesteigerten Cathepsin-Synthese und -Sekretion korreliert. Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren sind hierbei Regulatoren, die Proteasen einer tumorassoziierten Degradierungskaskade synthetisieren und sezernieren lassen. Häufig, wenn auch nicht immer, findet sich das Merkmal der Entdifferenzierung in hochmalignen Tumoren, welches meist mit einer Rekrutierung ursprünglicher Transduktions- und Regelmechanismen einhergeht. So sind EGF und EGFR als wichtige Faktoren der embryonalen Entwicklung häufig nicht nur vermehrt in Malignomen anzutreffen [74, 120, 183], sondern scheinen oft mit dem Grad der Entdifferenzierung, Malignität, Prognose und dem Metastasierungsvermögen korreliert zu sein. Colonkarzinome zeigten eine gesteigerte EGFR-Expression, die an das metastatische Potential der Tumoren gekoppelt war [160]. Darüber hinaus ging eine Überexpression an EGFR in Mammakarzinomen mit einer schlechten Prognose und einem verminderten Ansprechverhalten auf Chemo- und Hormontherapie einher [74, 141, 142, 172, 188, 210]. Ähnliche Befunde – gesteigerte Rezidivhäufigkeit, invasiver Phänotyp und reduzierte Überlebenszeit – ließen sich für Urothel-

[140], nichtkleinzellige Bronchialkarzinome [228], Melanome [161] und Glioblastome [178] erheben.

Analog der Expression lysosomaler Proteasen scheinen in vielen Malignomen erhöhte Spiegel an Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren mit einem gesteigerten Infiltrations-, Invasions- und Metastasierungsvermögen verbunden zu sein. Legt man die exponierte Stimulationsfähigkeit des Proteinkinase C-Transduktionsweges der anaplastischen Zelllinie 8505C zugrunde, kann auch für Schilddrüsenkarzinome mit zunehmender Malignität eine Überexpression von Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren angenommen werden. Ob EGF und EGFR hierbei wie in anderen Neoplasien eine Schlüsselrolle einnehmen oder jeder Tumor eine eigene Entität mit spezifischem Wachstumsfaktorprofil definiert, bleibt zu klären.

## **5.2 Die Beteiligung der Cathepsine L, B und D an nichtmalignen Prozessen der Gewebeeinfiltration, -destruktion und -invasion.**

### **5.2.1 Physiologische Invasionsprozesse**

Vorgänge der Gewebeeinvasion, des Remodeling von extrazellulärer Matrix und der Gewebedestruktion sind nicht allein pathologischen Prozessen, wie der Tumorprogression, vorbehalten, sondern elementare Eigenschaft multipler physiologischer Abläufe. So liegen der gesamten humanen embryonalen Entwicklung Vorgänge permanenten Gewebeumbaus mit Ab- und Aufbau extrazellulärer Matrix zugrunde. Cathepsine sind als Proteasen zentraler Bestandteil dieser Modulationen. Im adulten Organismus aktivieren Cathepsin L und B Plasminogenaktivator (uPA), der eine Schlüsselrolle bei der Follikelruptur und Invasion des Trophoblasten in das mütterliche Endometrium einnimmt [53, 193]. Im Knochen wird die Plastizität des Gewebes durch kontinuierliche, trajektorie orientierte Umbauvorgänge erreicht. Osteoklasten, eingebettet in Resorptionslacunen, sezernieren große Mengen an Cathepsin K, V, L, B und D, die im vorherrschenden sauren Milieu hoch effizient Kollagen Typ I, Osteokalzin, Osteonektin und andere Glykoproteine der Knochenmatrix hydrolysieren können [44, 65, 94, 109, 152]. Cysteinproteinaseinhibitoren wie E-64 und Leupeptin hemmen den Knochenresorptionsprozess signifikant. Auch in der Spermatogenese scheinen gezielte proteolytische Modifikationen der extrazellulären Matrix Voraussetzung für eine regelrechte Reifung und Freisetzung der Spermien zu sein. Cathepsin L, sezerniert von Sertolizellen, kommt dabei eine zentrale Rolle zu [96, 211, 239].

Physiologische Destruktions- und Abbauprozesse scheinen auf kontrollierte Weise Eigenschaften malignen Wachstums widerzuspiegeln. Ein Versagen physiologischer Kontrollprozesse und die Rekrutierung extrazellulärer proteolytischer Mechanismen finden sich häufig im Zuge der malignen Transformation.

### 5.2.2 Pathologie der Entzündung

Stimuliert durch chemotaktische Entzündungsmediatoren wandern Monozyten und neutrophile Granulozyten aus dem Blut in entzündliches Gewebe ein und differenzieren zu Gewebsmakrophagen. Diese besitzen die Fähigkeit der Gewebeinfiltration und –invasion, die an die Aktivität proteolytischer Enzyme gekoppelt ist. Stimuliert durch Interleukine (IL1), TNF $\alpha$  und andere Cytokine sezernieren Makrophagen Cathepsin D sowie große Mengen an Cathepsin L und B, die im sauren Milieu der Inflammation Träger der Proteolyse sind [18, 164]. MMPs scheinen eine nur untergeordnete Rolle zu spielen.

Cathepsine sind als Werkzeuge eines universellen Proteolyse-Apparates in zahlreichen spezifischen und unspezifischen Entzündungsprozessen involviert. Sie werden in periodontitischem Gewebe mit erhöhter Aktivität nachgewiesen und korrelieren hierbei mit dem Grad der Entzündung [29, 53, 213]. Im Entzündungsprozess einer chronischen Transplantatabstoßung lassen sich intraglomerulär deutlich erhöhte Aktivitäten der lysosomalen Proteinase Cathepsin L und B nachweisen, die an der glomerulären Basalmembran-Destruktion beteiligt sind [149, 150]. Pneumocystis Carinii-Pneumonien (PCP) sowie chronisch-destruierende Lungenemphyse weisen ebenfalls erhöhte Aktivitäten der Cathepsine L, B und H auf, die eine Destruktion der Lungenarchitektur zur Folge haben [77, 195]. Auch der fibrosierende Prozess der Leberzirrhose scheint an erhöhte Cathepsin L- und B-Spiegel geknüpft zu sein [241]. Gelenkerkrankungen wie die Rheumatoide Arthritis und Osteoarthritis führen zu einer inflammationsbedingten Destruktion von Gelenkknorpel. Cathepsin L, B und D werden von Synovialzellen und Entzündungszellen in den Gelenkspalt sezerniert und vermitteln die proteolytische Degradierung von Knorpel-Proteoglykanen [18, 98, 102, 163]. Entzündungsprozesse der Schilddrüse hingegen wiesen keine erhöhten Cathepsinaktivitäten auf [184].

### 5.2.3 Parasitäre Invasion

Parasiten haben die Fähigkeit, Wirtsorganismen zu penetrieren und zur Energiegewinnung zu nutzen. Viele ihrer Vertreter vermögen es, proteolytische Enzyme, überwiegend lysosomalen Ursprungs, zu synthetisieren. So exprimieren die Nematode *Haemonchus contortus*, die einzellige Zilliate *Paramecium tetraurelia*, Plasmodien, sowie *Entamoeba histolytica* lysosomale Proteinase (Cathepsin L, B und D) und sezernieren große Mengen an Cathepsin L-artigen Proteinase. Dies dient sowohl der nutritiven Versorgung aus extrazellulären soliden Proteinstrukturen als auch der Erleichterung einer Gewebeinvasion [165, 229]. Die Bilharzien *Schistosoma mansoni* und *japonicum* synthetisieren und sezernieren die Cystein-Proteinase Cathepsin L und B, die u.a. in der parasitären Hämoglobinverdauung eine Rolle zu spielen scheinen [17, 30, 35, 132]. Zusätzlich verhindert die Cathepsin L-Sekretion in Larven von *Fasciola hepatica* durch Spaltung der Wirts-Immunglobuline eine Antikörper vermittelte

Anbindung von eosinophilen Granulozyten und damit eine Aktivierung der zellulären Immunantwort [19, 193, 194]. Die Identifikation der Signifikanz von Cathepsinen im parasitären Stoffwechsel schafft eine neue Basis für therapeutische Ansätze. So gelang mittels irreversibler Cystein-Proteinase-Inhibitoren in vivo eine deutliche Inhibition der Erregerreplikation von *Trypanosoma cruzi*, was eine neue Perspektive in der Chemotherapie der Chagaskrankheit und anderen Parasitosen eröffnet [31, 75, 129].

Die Beteiligung lysosomaler Proteinasen an Prozessen der Invasion und Infiltration ist ein ubiquitär verbreiteter Mechanismus und sowohl in Viren [187], Bakterien, Pflanzen als auch höheren Organismen nachzuweisen. Parasiten nehmen hierbei eine ähnliche Stellung wie Tumorzellen ein, nutzen sie doch autonom und eigennützig den Wirtsorganismus für Wachstum und Fortpflanzung aus.

### **5.3 Die Rolle von Cathepsin L, B und D und ihrer Inhibitoren in malignen Tumoren**

#### **5.3.1 Die Überexpression lysosomaler Proteinasen – ein typisches Phänomen maligner Tumoren**

Erhöhte Spiegel der Cysteinproteinase Cathepsin L und B sowie der Aspartatproteinase Cathepsin D ließen sich in Homogenaten zahlreicher maligner Tumoren im Vergleich zu Normalgewebe nachweisen. Neben Karzinomen zeigen auch Sarkome, Neuroblastome, Melanome und Leukämiezellen erhöhte Cathepsinaktivitäten [3, 22, 43, 61, 112, 185].

Schilddrüsenkarzinome weisen im Vergleich zu Adenomen und Normalgewebe ebenfalls deutlich erhöhte Cathepsinaktivitäten auf. Diese scheinen Folge einer transformationsbedingten Dysregulation der Transkription, mit gesteigerter mRNA-Expression der Cathepsine L, B und D, zu sein [108, 184].

#### **5.3.2 Korrelation zwischen maligner Transformation und Cathepsintranskription**

Erhöhte mRNA-Spiegel der Cathepsine L, B und D finden sich in zahlreichen humanen Neoplasien, wie Glioblastomen, Kolon-, Prostata- und Schilddrüsenkarzinomen. Die erhöhten Transkriptionsniveaus scheinen hierbei häufig mit einer erhöhten Expression der Cathepsine auf Proteinebene zu korrelieren. Darüber hinaus ließ sich für einige Malignome zeigen, dass das Ausmaß der Cathepsintranskription mit klinischen Malignitätsmerkmalen (Entdifferenzierungsgrad, Metastasierungspotential, Prognose) verknüpft ist. So exprimierten Glioblastome ca. zehnmals mehr Cathepsin B-mRNA als normales Hirngewebe oder niedrig maligne Astrozytome [186]. Gleiches ließ sich für kolorektale und Schilddrüsenkarzinome zeigen [184, 242].

Ursächlich lässt sich die gesteigerte Cathepsin-mRNA-Expression auf eine graduelle Transformation mit Aktivierung von Oncogensystemen und/oder dem Verlust von

Tumorsuppressorgenfunktionen zurückführen. In der Schilddrüse führt das Zusammenwirken multipler Faktoren (Jodmangel, ionisierende Strahlung, Wachstumsfaktoren, Hormone) auf dem Boden genetischer Prädisposition in mehreren Etappen zur Transformation. Follikuläre (FTC) und papilläre (PTC) Schilddrüsenkarzinome durchlaufen dabei verschiedene Transformationswege. PTC weisen häufig Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens und eine Aktivierung des *PTC*-Oncogen-Systems sowie des *ret*-Protooncogens auf, während in FTC *ras*-Oncogen Mutationen überwiegen [88, 176, 235]. Anaplastische Schilddrüsenkarzinome scheinen sich nach einer Vielzahl von Mutationen, die unter anderem den p53-Genlocus betreffen, auf dem Boden eines differenzierten PTCs zu entwickeln [126, 196]. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass Oncogen-Aktivierungen eine Verstärkung der Cathepsin L- und B-Expression auf mRNA und Proteinebene induzieren [190]. In der vorliegenden Arbeit konnten keine Differenzen der Cathepsin-mRNA Expression zwischen den differenzierten und anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzellen FTC 133 und 8505C festgestellt werden. Die Ergebnisse auf Proteinebene mit Überexpression der Cathepsine in der anaplastischen Zelllinie 8505C lassen jedoch einen direkten Zusammenhang zwischen dem Grad der Oncogenaktivierung und dem invasiven Phänotyp einer Tumorzelle vermuten.

### **5.3.3 Korrelation der Cathepsinexpression mit dem Grad der Entdifferenzierung, der Malignität sowie dem Metastasierungspotential**

Zahlreiche Malignome lösen sich im Rahmen ihrer Transformation von ihren ursprünglichen spezifischen Zelleigenschaften und –funktionen. Dieser Prozess der Entdifferenzierung geht häufig mit einem gesteigerten Potential der Infiltration, Invasion und Metastasierung einher. Ermöglicht wird diese neu erworbene Kompetenz unter anderem durch eine erhöhte Expression von Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren und von proteolytischen Enzymen.

Anhand zahlreicher maligner Tumoren ließ sich zeigen, dass der Grad der Expression von lysosomalen Proteinasen häufig mit dem Grad der Entdifferenzierung und Malignität korreliert. So wiesen Mamma- oder Larynxkarzinome mit hohen Konzentrationen an Cathepsin L, B und D einen hohen histologischen Malignitäts- und Entdifferenzierungsgrad sowie ein deutlich erhöhtes Rezidivrisiko auf [60, 170]. Ähnliche Zusammenhänge ließen sich für Magen- und kolorektale Karzinome darstellen [158, 185, 192, 242], in Bronchialkarzinomen jedoch fand sich kein solches Verhältnis [233]. Mammakarzinomzelllinien scheinen wesentliche Charakteristika der in-vivo-Tumore zu behalten, zeigen sie doch ebenfalls eine mit dem Grad der histologischen Entdifferenzierung korrelierende Cathepsinexpression [114].

Auch in Schilddrüsenkarzinomen geht eine Vielzahl organspezifischer Funktionen im Rahmen der malignen Transformation verloren. Im Gegensatz zu den Differenzierungsmarkern vermindern sich die Aktivitäten der lysosomalen Proteasen Cathepsin L, B und D nicht. So steigen die Aktivitäten dieser Cathepsine in Schilddrüsenkarzinomen um ein Vielfaches an und scheinen nicht länger streng TSH-abhängig mit schilddrüsenspezifischen Funktionen koreguliert



zu werden. Auf diese Weise spiegelt der Cathepsin-Gehalt nicht mehr den funktionellen Status eines Thyreozyten wider, sondern weist auf einen invasiven Phänotyp hin [184]. Im Vergleich zweier Schilddrüsenkarzinomzelllinien unterschiedlicher Primärtumor-Differenzierung konnten in der vorliegenden Arbeit die mit Mammakarzinomen und ihren Zelllinien erhobenen Daten bestätigt werden. 8505C, abgeleitet von einem hoch malignen anaplastischen Schilddrüsenkarzinom, exprimierte deutlich mehr Cathepsin L, B und D als die von einem niedrig malignen follikulären Schilddrüsenkarzinom gewonnene Zelllinie FTC 133. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch in Schilddrüsenkarzinomen der Cathepsin L-, B- und D-Gehalt mit dem Malignitäts- und Entdifferenzierungsgrad sowie dem Metastasierungspotential zu korrelieren scheint.

#### **5.3.4 Aufhebung der intrazellulären Cathepsintopographie als Malignitätsmerkmal**

Neben einer erhöhten Expression von Cathepsinen wurden in Tumoren atypische Lokalisationen dieser Enzyme nachgewiesen.

In Kolonepithelzellen ließ sich zeigen, dass die subzelluläre Lokalisation von Cathepsin B funktionellen Gesichtspunkten unterliegt [184]. So weist physiologisches Kolonepithel ein apikales Anreicherungsmuster von Cathepsin B auf, um potentiellen Resorptionsprozessen gerecht werden zu können. Im Rahmen der Transformation zur Tumorzelle kommt es, am ehesten durch alternatives Splicing, zu einer Alteration dieses funktionellen Verteilungsmusters. Kolonpräkanzerosen weisen so eine Verlagerung der Cathepsin B-Anreicherung nach basal auf. Kolonkarzinome schließlich zeichnen sich im Sinne einer Entdifferenzierung und Lösung aus der Zellformation durch eine vollständig aufgehobene Polarität der Cathepsin B-Verteilung aus [192].

Im Schilddrüsengewebe lassen sich ähnliche subzelluläre Verteilungsmuster beobachten. So weisen Thyreozyten funktionell bedingt in ihren apikalen, follikelnahen Zellregionen vermehrt Cathepsin B- und L-Granula auf [117, 219, 220]. Im Zuge der malignen Transformation zum papillären Schilddrüsenkarzinom fällt eine zunehmende Anreicherung von Cathepsin B entlang der basalen Zellmembran auf. Wie schon in kolorektalen Karzinomen und Blasenkarzinomen beschrieben, scheint dies auf eine Beteiligung an der proteolytischen Degradierung der Basalmembran und eine zunehmende Entdifferenzierung hinzuweisen [234, 242].

#### **5.3.5 Sekretion von Cathepsinen durch maligne transformierte Zellen**

In Normalgewebe werden proteolytische Vorgänge durch Cathepsine in der Regel lysosomal vermittelt. Einzelne physiologische Situationen verlangen jedoch auch eine Sekretion von Cathepsinen, um spezifischen Funktionen, wie Knochenresorption, Schilddrüsenhormonsynthese und Inflammation, gerecht zu werden. Neben ihrer direkten proteolytischen Aktivität entfalten Cathepsin L, B und D ihre Wirkung im extrazellulären Raum über komplexe Proteolysekaskaden. Bei Tumorzellen scheinen die Membranassoziation und die extrazelluläre

Sekretion von Cathepsinen prädisponierende Faktoren für Prozesse der Tumorinvasion und -infiltration zu sein.

So sezernieren zahlreiche Malignome, wie Melanome, Mamma-, hepatozelluläre, Bronchial- und kolorektale Karzinome, vermehrt Cathepsine [63, 71, 192, 242]. Die Cathepsine werden überwiegend als Proformen sezerniert und entwickeln sich erst durch Autoaktivierung im saueren Mikromilieu, durch Oberflächenkontakt oder durch Einwirken weiterer Proteasen zu aktiven Enzymen [136, 189]. Ein weiterer Indikator für die Cathepsinsekretion von Tumorzellen sind erhöhte Serumspiegel in Tumorpatienten. Eine Korrelation zwischen Serumspiegel der Cathepsine und Malignitätsgrad, Metastasierungspotential sowie Prognose ließ sich jedoch bisher nur für wenige Malignome nachweisen (Melanom, Mammakarzinom, hepatozelluläres Karzinom) [20, 60, 61, 118, 170, 207].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien bezüglich ihrer Cathepsinsekretion ein ähnliches Transformationsverhalten aufweisen. So ließen sich im konditionierten Medium der follikulären Zelllinie FTC 133 nur geringe Mengen an Cathepsin L und B sowie deren Aktivitäten nachweisen. 8505C hingegen, von anaplastischer Genese, sezernierte große Mengen beider Cathepsine, wobei diese überwiegend als Proenzym abgegeben werden. Aktivitätsassays stützen das im ELISA und Western Blot gewonnene Bild und bestätigen die enzymatische Aktivität der Enzyme im konditionierten Medium.

Die gewonnenen Daten legen die Vermutung nahe, dass Schilddrüsenkarzinome und ihre Zelllinien wie andere Malignome als Ausdruck ihrer zunehmenden Transformation, Entdifferenzierung und Malignität vermehrt Cathepsin L und B sezernieren. Ursächlich sind dabei multiple Oncogen-vermittelte Alterationen der zellulären Proteinsynthese und -prozessierung. Diese bewirken beispielsweise durch eine Modifikation des Mannose-6-Phosphat-Rezeptorweges sowie eine alternative Glykosylierung eine Sekretion und veränderte intrazelluläre Verteilung der lysosomalen Enzyme [125, 159].

### **5.3.6 Membranbindung der Cathepsine und ihre Rolle in der Tumorinvasion**

Neben der Sekretion von lysosomalen Proteinase konnte gezeigt werden, dass Cathepsine unter bestimmten, teils physiologischen, teils pathologischen Bedingungen auf der Oberfläche von Zellen exprimiert werden [71]. Dorthin werden sie entweder aus dem intrazellulären Kompartiment primär membrangebunden transloziert oder nach initialer Sekretion und folgender Bindung an Oberflächenproteine in die Zellmembran integriert. In beiden Fällen liegt eine enzymatisch aktive Cathepsinform in die Plasmamembran eingebettet vor. In humanen Thyreozyten finden sich unter physiologischen Bedingungen membrangebundene Formen von Cathepsin B und D im Bereich der apikalen, follikulären Zellmembran [13, 117, 219, 220]. Hier tragen sie, neben Cathepsin L, zur follikulären, limitierten Proteolyse von Thyreoglobulin im Rahmen der SD-Hormonliberation bei.

Auch im direkten Invasionsprozess von Tumorzellen mit Ausbildung von Pseudopodien spielen membranassoziierte Cathepsine eine Schlüsselrolle, vermitteln sie doch eine direkte, zirkumskripte extrazelluläre Proteolyse. Hierbei vermögen Cathepsin L und B u.a. freies, lösliches Pro-uPA zu aktivieren und komplexe extrazelluläre Proteolysekaskaden auszulösen, die Komponenten der extrazellulären Matrix und der Basalmembran abbauen. Zusätzlich können Cathepsin L, B und D auch direkt Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie Laminin, Fibronectin, Elastin, Kollagen und Proteoglykane degradieren. Ist ein extrazelluläres Matrixfragment mittels direkter Invasion mobilisiert und abgetrennt, kann die Tumorzelle dieses durch Phagozytose inkorporieren und hydrolysieren. Dabei gleitet die Zelle in die entstehende Matrixlücke, was man als indirekte Tumordinvasion bezeichnet [192]. Auch hierbei vermitteln membranassoziierte Cathepsine neben sezernierten Formen den Proteinabbau. In vitro Untersuchungen an Mamma-, Bronchial- und Urothelkarzinomzelllinien sowie Glioblastomen konnten im Vergleich zu Normalgewebe zeigen, dass die physiologische lysosomale Lokalisation von Cathepsin B durch maligne Transformation aufgehoben werden kann. Sie mündet unter anderem in einer membrangebundenen Expression von Cathepsin B [242]. Dies deutet auf eine direkte Korrelation zwischen Malignität und membrangebundener Expression von Cathepsinen hin.

### 5.3.7 Die Rolle der Cathepsine in tumorassoziierten Zellen

Es ist heute bekannt, dass Cathepsine in einer Vielzahl von tumorassoziierten Zellen, wie Zellen des Stroma (Fibroblasten), des MPS (Makrophagen) und anderen Entzündungszellen (Granulozyten), überexprimiert werden. So führen Interaktionen zwischen Kolonkarzinom- und tumorassoziierten Zellen zu einer beträchtlichen Steigerung der Cathepsin B-Expression in beiden Geweben. Das invasive Potential der Kolonkarzinom-Zellen in einem Matrigel-System, ließ sich nach Addition von monozytären Zellen um ein Vielfaches steigern, welches maßgeblich auf eine erhöhte Cathepsinexpression zurückzuführen war [111, 191]. In den pulmonalen Metastasen eines Mamma-Karzinoms tragen sowohl die Cathepsin B-Expression der Tumorzellen als auch die der begleitenden Makrophagen zur Tumorprogression bei [191, 227]. *M. Mohamed et al.* zeigten in den Zelllinien eines hoch-malignen, inflammatorischen Mamma-Karzinoms eine gesteigerte Invasivität und Cathepsin B-Expression nach Inkubation mit humanen Monozyten [134].

Tumorzellen vermögen es, tumorassoziierte Zellen zum proteolytischen Abbau der extrazellulären Matrix zu rekrutieren, indem sie unterschiedliche Mechanismen nutzen (*Abb. 37*). Einerseits sezernieren nichtmaligne Begleitzellen verstärkt Cathepsin L und B, die sowohl direkt als auch indirekt, gebunden an Oberflächenproteine des Tumors, an der extrazellulären Proteolyse teilhaben. Andererseits steigern Zytokine und Wachstumsfaktoren der tumorassoziierten Zellen die Expression lysosomaler Proteasen in den Tumorzellen und somit die Tumorprogression [135].

### 5.3.8 Die tumorassoziierte extrazelluläre Proteolyse

Verschiedene Klassen von Proteasen sind an der extrazellulären Proteolyse beteiligt: 1. Matrixmetalloproteasen (MMP), 2. Aspartatproteasen (z. B. Cathepsin D), 3. Cysteinproteasen (z.B. Cathepsin L, B, H) und 4. Serinproteasen (z.B. Plasmin, Urokinase).

Cathepsine und Urokinase-Plasminogenaktivator (uPA) sind zentrale Moleküle der perizellulären Proteolyse. Am Beginn der Kaskaden scheint häufig Cathepsin D zu stehen, welches als Proform neben Pro-Cathepsin L und B sowohl in das Interstitium sezerniert als auch auf der Membranoberfläche exprimiert wird. Nach autokatalytischer Aktivierung vermag Cathepsin D die Cysteinproteinasen Cathepsin L und B zu aktivieren [145, 151]. Beide stellen hochpotente Aktivatoren des Pro-uPA dar [63, 104, 208], vermögen aber auch selbst Komponenten der extrazellulären Matrix effektiv zu hydrolysieren (Siehe 5.3.6). Aktives Plasmin und Cathepsin L/B aktivieren zusätzlich MMPs, welche an der Auflösung von Basalmembranen essentiell beteiligt sind [66, 121, 128]. Darüber hinaus binden aktives Plasmin und uPA an spezifische Oberflächenrezeptoren von Tumor und Stroma und realisieren so eine gerichtete, lokalisierte Proteolyse. Kontrolliert und reguliert werden diese proteolytischen Enzyme durch die Anwesenheit spezifischer Antagonisten: Cystatine inhibieren Cathepsin L und B, PAI-1/2 hemmen uPA, Plasmine werden durch alpha-2-Makroglobulin und MMPs durch TIMPs inaktiviert.

Die aktuelle Modellvorstellung der extrazellulären tumorassoziierten Proteolyse geht von einem Tumor-Entität-abhängigen kaskadenartigen Ablauf aus. Dieser unterliegt diffizilen Steuerungsmechanismen, welche von der Tumorzelle zur Realisierung von Nutrition sowie Infiltrations-, Invasions und Metastasierungsprozessen genutzt werden (*Abb. 37*).

### 5.3.9 Cathepsine und ihre Inhibitoren

Wie in *Abbildung 37* dargestellt, unterliegt die perizelluläre, tumorassoziierte Proteolyse einer Vielzahl von Regulierungsprozessen, in denen insbesondere spezifische Protease-Inhibitoren eine übergeordnete Rolle spielen. Cathepsine werden spezifisch durch Cystatine gehemmt und lange galt die Beeinträchtigung der Enzym-Inhibitor-Balance als ein zentrales Moment der malignitätsvermittelnden Proteolyse von Tumoren. So korrelierte in humanen Mammakarzinomen ein schwacher immunhistochemischer Nachweis von Cystatin A mit erhöhter Malignität und Dedifferenzierung [115]. Kolorektale Karzinome hingegen zeigen im Vergleich zur normalen Kolonmukosa keine Unterschiede des Cystatin-Gehalts. Hepatozelluläre Karzinome, Melanome und Bronchialkarzinome wiesen wiederum eine deutliche Steigerung der Cystatinexpression auf [103, 118]. Diese sehr heterogenen Befunde verdeutlichen die ambivalente Funktion der Cystatine. Einerseits sind sie eine Gruppe spezifischer Cathepsin-Antagonisten, die hemmend auf die Proteolyse wirken. Andererseits bilden sie durch reversible Komplexbildung mit Cathepsinen ein schützendes Reservoir lysosomaler Cysteinproteinasen insbesondere bei physiologischem pH-Wert [40]. Endogene Inhibitoren können geeignete

extrazelluläre Carrier sein, um Cysteinproteinasen vor irreversibler Inaktivierung zu schützen. Dieses Modell erklärt die häufig in malignen Neoplasien anzutreffende Koexistenz gesteigerter Cathepsin- und Cystatin-Spiegel.

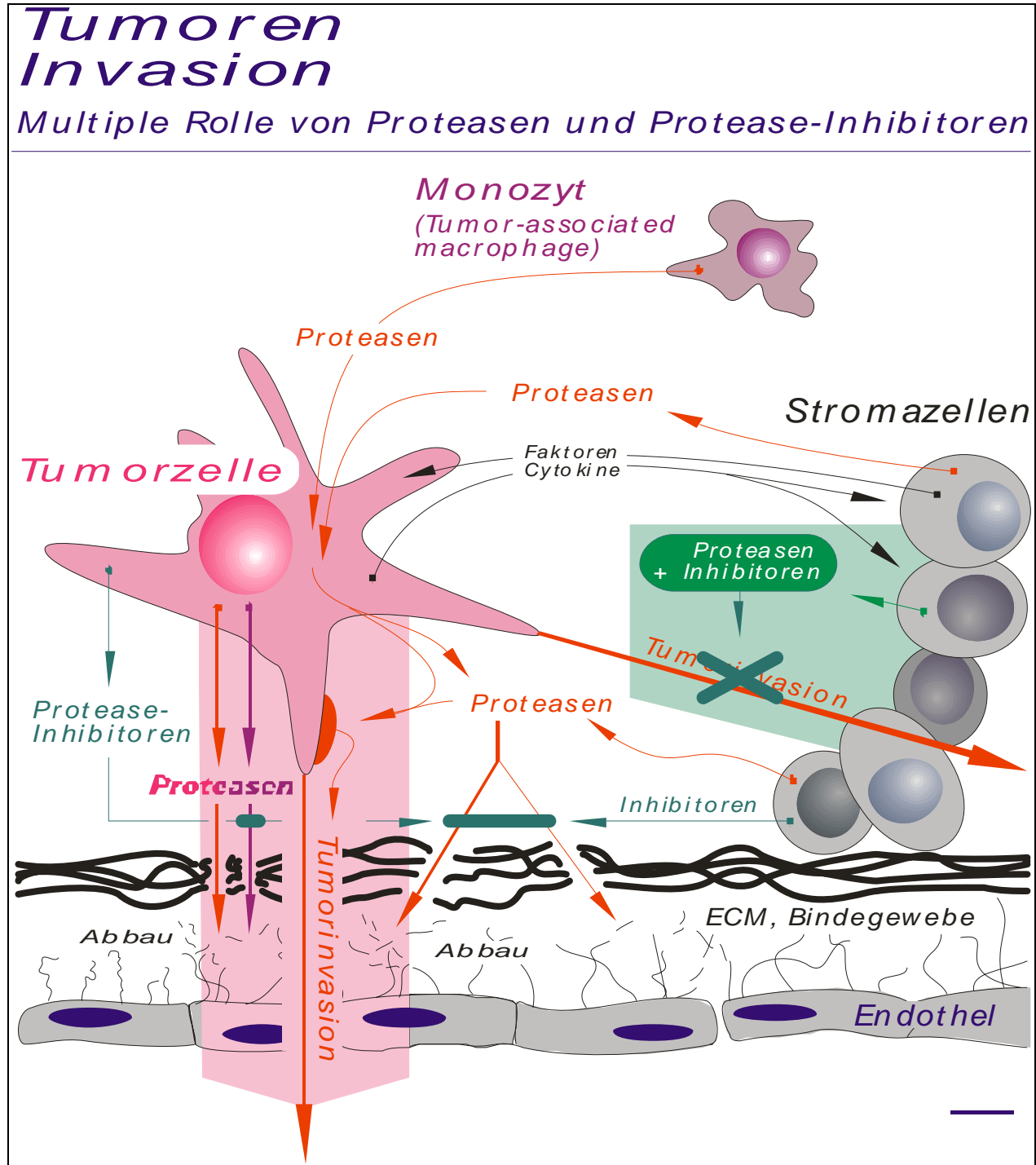


Abbildung 37: Tumordinvasion

### 5.3.10 Cathepsine als prognostische Faktoren

Zusammenhänge zwischen dem Ausmaß tumorassoziierter Proteolyse und Erkrankungsverlauf konnten für verschiedene solide Tumoren, wie Urothel-, Larynx-, Magen-, Kolon-, Zervix-, Mamma-, Bronchial- und Nierenkarzinome, beschrieben werden [43, 63, 158, 208, 242]. Erhöhte Spiegel von Cathepsin L, B und D scheinen Indikatoren aggressiven Verhaltens in humanen Tumoren zu sein. Es gilt heute als gesichert, dass Cathepsin D bei Mammakarzinomen ein unabhängiger prognostischer Marker im Stadium I der Erkrankung ist und indirekt mit der Prognose korreliert [20]. Darüber hinaus sind in diesen Tumoren erhöhte Cathepsin L und B-Aktivitäten verknüpft mit einem fortgeschrittenen histologischen Entdifferenzierungs- und Malignitätsgrad sowie dem Rezidivrisiko [60, 61, 114, 207]. Cathepsin L und B könnten neben klinisch bereits etablierten Faktoren wie Cathepsin D und uPA eine Rolle als prognostische Marker in Mammakarzinomen spielen.

Schilddrüsenkarzinome weisen im Vergleich zu Normalgewebe oder Adenomen deutlich erhöhte Cathepsin L-, B- und D-Aktivitäten auf [108, 130, 131, 184]. Eine Korrelation zum histologischen Typ, dem Grad der Entdifferenzierung oder zur Krankheitsprognose ließ sich bislang nicht belegen. Wie auch für Larynx- und Mammakarzinome und ihre Zelllinien beschrieben [170], konnte die vorliegende Arbeit deutlich erhöhte Cathepsin L-, B- und D-Niveaus in der anaplastischen Zelllinie 8505C zeigen. Die differenzierte Zelllinie FTC 133 hingegen wies signifikant niedrigere Cathepsin-Spiegel auf. Diese Befunde verdeutlichen, dass die Cathepsin-Aktivitäten mit dem Grad der Entdifferenzierung ansteigen. Da in Schilddrüsenkarzinomen Differenzierungsgrad und Prognose eng korrelieren, scheint auch eine dem Mammakarzinom ähnliche Korrelation von Cathepsin-Aktivität und Prognose nahe liegend.

### 5.3.11 Hemmung von Malignität durch Antisense-Oligonukleotide und Anti-Cathepsin Antikörper

Gesteigerte Aktivitäten, Membranassoziation und Sekretion von Cathepsin L und B korrelieren in multiplen Tumorentitäten positiv mit ihrer Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung. *Krüger et al.* demonstrierten die zentrale Schlüsselposition beider lysosomalen Proteasen in der Tumorbiologie, indem sie humane Osteosarkomzelllinien mit Antisense Cathepsin L- und B-Oligonukleotiden transfizierten. Hierdurch waren Transskription und Translation um bis zu 70% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe hemmbar. Anschließend ließ sich in Invasions- und Motilitätsassays auf Matrigel zeigen, dass die Fähigkeit der Tumor-Zellen, Filter zu passieren um ca. 35-75% inhibiert werden konnte [112, 113].

Anti-Cathepsin L-Antikörper induzierten einen ähnlichen Effekt in Hybridomazellen aus murinen Myelomzellen und Milzzellen Cathepsin L-immunisierter Mäuse, wiesen diese doch ein deutlich reduziertes Tumorwachstum auf [231].

Diese Daten demonstrieren die zentrale Bedeutung von Cathepsin L und B für Vorgänge der zellulären Malignität und Tumorprogression.

Die Identifizierung und Charakterisierung von Schlüsselenzymen der tumorassoziierten Proteolyse, deren Wirk- und Inhibierungsmechanismen geben Hoffnung auf zukünftige innovative spezifische Therapieoptionen.

### **5.3.12 Cathepsine als Mediatoren des programmierten Zelltods**

Der Tod maligner Zellen beeinflusst die Tumorentwicklung und –progression, sowie ihr therapeutisches Ansprechverhalten. Cathepsin L, B und D sind als lysosomale Proteasen sowohl direkt als auch indirekt im programmierten Zelltod involviert. Einerseits vermitteln sie im autophagischen Weg der Apoptose (Typ II des programmierten Zelltods) die intrazelluläre Digestion, andererseits vermögen sie, nach lysosomaler Membranpermeabilisierung ins Zytosol entlassen, direkt einen alternativen lysosomalen Weg der Apoptose auszulösen. Auf diesem Wege bewirken die zytosolischen Cathepsine eine mitochondriale Membranpermeabilisierung sowie hydrolytische Caspase-Aktivierung mit Induktion des Zelltods [37, 203].

Maligne Zellen zeigen sich häufig resistent gegenüber einer lysosomalen Membranpermeabilisierung (LMP) und entziehen sich somit einem apoptotischen Mechanismus. Als eine Ursache dieser Membranresistenz fand sich die vermehrte Expression von HSP70 (Heat-Shock Protein 70), welche eine LMP verhindert und das lysosomale Kompartiment resistent gegenüber Einwirkungen von TNF, Gamma-Strahlen und Chemotherapeutika macht. Klinisch korreliert die gesteigerte Expression von HSP70 in Mamma- und Endometriumkarzinomen mit einer schlechten Prognose der Patienten [110].

Die Rolle der Cathepsine in der Apoptose maligner Zellen ist heterogen und entitätenspezifisch. Sowohl der Mangel als auch die Überexpression lysosomaler Proteasen können einen programmierten Zelltod induzieren [56]. So zeigen Cathepsin L- und B-defiziente Mäuse eine durch massive Apoptose hervorgerufene Hirnatrophie [54], während sich Cathepsin L-defiziente Maus-Fibroblasten resistent gegenüber einem TNF $\alpha$ -induzierten Zelltod erwiesen [203].

## **5.4 Die Zelllinien FTC 133 und 8505C im direkten Vergleich**

Die Zelllinien 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. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und dem aktuellen Wissen bezüglich der Cathepsinexpression in malignen Tumoren, ihrer Beeinflussung durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sowie der Tumorprogression lassen sich folgende vergleichende Aussagen treffen:

- Insulin führt - am ehesten über Aktivierung der PKB - zu einem stark erhöhten Proteingehalt (Hypertrophie) der Zelllinie FTC 133 ohne mitogene Effekte aufzuweisen.

- In 8505C induziert Insulin - möglicherweise primär über MAP-K - den stärksten mitogenen Effekt der angewandten Faktoren ohne gleichzeitig die Proteinsynthese zu steigern, was in einer Hypotrophie der Zellen mündet.
- Mit zunehmender Entdifferenzierung scheint der PKC-Transduktionsweg an Bedeutung für die Tumor-Malignität zu gewinnen [74, 79, 95, 139, 161, 210]. So entwickelt PMA in Zelllinie 8505C deutlich stärkere proliferative und anabole Effekte als in FTC 133.
- Das Fortschreiten der Tumortransformation geht häufig mit einem Verlust differenzierender Merkmale einher [70, 95, 161, 210, 218]. 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.
- Der Grad der Expression lysosomaler Proteinasen korreliert häufig mit dem Grad der Entdifferenzierung und Malignität von Tumoren [60, 158, 170, 185, 192, 242]. 8505C exprimiert als Zelllinie eines hoch-malignen Schilddrüsen-Karzinoms signifikant mehr Cathepsin L, B und D als die Zellen der FTC 133.
- Mit zunehmender Entdifferenzierung und Malignität scheint in Tumoren die Stimulationsfähigkeit der Cathepsin-Synthese durch Wachstumsfaktoren zu steigen [70, 79, 95, 161, 190, 210, 218]. 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.
- Die verstärkte Sekretion von Cathepsinen ist ein akzeptiertes Malignitäts- und Prognosekriterium zahlreicher Tumoren [20, 57, 60, 61, 118, 125, 159, 170, 207]. Analog hierzu weist die anaplastische Zelllinie 8505C eine deutlich höhere basale Cathepsin L- und B-Sekretion auf als die differenzierte Zelllinie FTC 133.
- 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 [159, 169, 181, 190]. Die Aktivierung des PKC-Wegs im Rahmen der Transformation zum anaplastischen Schilddrüsenkarzinom scheint in Zelllinie 8505C ein signifikantes Malignitätskriterium zu sein. So induziert das Stimulans 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.

## 5.5 Schlussfolgerung und klinischer Ausblick

Die Malignität eines Tumors ist gekennzeichnet durch seine Fähigkeit, umgebendes Gewebe zu infiltrieren, Gefäße zu invadieren und in entfernte Geweberegionen zu metastasieren. Diese



Eigenschaften werden in Tumoren von aktivierten Oncogenen oder inhibierten Tumorsuppressorgenen unter anderem auf stimulierte, Wachstumsfaktor-vermittelte Regelkreise übertragen. Je nach Tumorentität werden verschiedene, zum Teil embryonale Transduktionssysteme rekrutiert, die ihrerseits häufig eine gesteigerte Expression und Sekretion lysosomaler Proteinase induzieren. Es folgt die Aktivierung extrazellulärer Proteolysekaskaden, die elementare Voraussetzung der Tumorprogression sind.

Anhand der untersuchten Schilddrüsenkarzinomzelllinien konnte die Abhängigkeit der Expression lysosomaler Proteasen in Tumorzellen von Wachstumsfaktor-vermittelten Regelkreisen dargestellt werden. Mit zunehmendem Malignitätsgrad, histologischer Entdifferenzierung und eingeschränkter klinischer Prognose werden auch in Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien vermehrt Cathepsine synthetisiert und sezerniert. Darüber hinaus geht ein zunehmend invasives Potential in Schilddrüsenkarzinomen mit einer Sensibilisierung gegenüber Wachstumsfaktoren einher. Die vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren, sowie die Aktivierung spezifischer Transduktionswege, wie der Proteinkinase C-Kaskade, führen zu einem erhöhten Gehalt an lysosomalen Proteinase.

Neue immunologische Therapieprinzipien mit spezifischer Hemmung des EGF-Rezeptors haben bereits Einzug in den klinischen Therapiealltag gehalten. Ihr Anwendungsbereich beschränkt sich aber bisher auf EGFR-positive Kolonkarzinompatienten [2]. Da erhöhte EGFR-Niveaus auch in anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen nachzuweisen sind [236], wäre eine Therapieausweitung denkbar. Andere hypothetische Ansätze umfassen die immunologische Inhibierung von weiteren Wachstumsfaktoren, ihren Transduktionsmechanismen aber auch von lysosomalen Proteinase. Positive therapeutische Effekte sind zusätzlich von einer Applikation synthetischer Cathepsinanaloga, einer Hemmung der Cathepsin-Translation durch spezifische Antisense-Oligonukleotide sowie der Initialisierung von Redifferenzierungsmechanismen zu erwarten. Das Phänomen der Entdifferenzierung ist ein ubiquitäres Problem in der Tumorthherapie, entzieht sich das Malignom doch hierdurch spezifischen Therapieansätzen. Insbesondere in Schilddrüsenkarzinomen könnten Faktoren, die eine Redifferenzierung induzieren, von großem therapeutischen Nutzen sein. Neoplasien wären so einer spezifischen Tumorthherapie, wie der Radiojodtherapie, wieder zugänglich. Im Klinikalltag haben solche Therapiekonzepte bereits Einzug gehalten. So führt in der Behandlung der Promyelozytenleukämie (AML M3) die Gabe von Retinolen zu Redifferenzierung und einem deutlich verbesserten Therapieverhalten.

Die Frage nach dem präzisen Zusammenwirken von Wachstumsfaktoren und dem lysosomalen proteolytischen System als einem Effektor der Tumorzellantwort bedarf weitergehender Untersuchungen. Es ist jedoch bereits heute offensichtlich, dass sowohl Wachstumsfaktoren als auch Cathepsine ein viel versprechendes diagnostisches und therapeutisches Betätigungsfeld sind.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Aicher T: Experimentelle Untersuchungen zur Wachstumsbeeinflussung von Monolayerzellen der oxyphilen, papillären Schilddrüsenkarzinomzelllinie ONCO-DG-1 durch TSH, EGF und den Anti-EGF-Rezeptor-Antikörper MAK 425. Med. Dissertation, Fakultät für Medizin, TU München, 1998.
- [2] ASCO 2003: Cetuximab (C225, EGF-Antikörper) wirksam allein und in Kombination mit Irinotecan auch bei Irinotecan-resistentem, EGFR+ metastasierten colorektalen Karzinom. Chicago, Innere Klinik-Tumorforschung 2003;S. 1012.
- [3] Asokan R, Reddy GK, Dhar SC: Studies on the intracellular degradation of newly synthesized collagen in 3-methylcholanthrene induced fibrosarcoma cells. *Life Sci* 1992; 51(13):1065-1071.
- [4] Banati RB, Rothe G, Valet G et al.: Detection of lysosomal cysteine proteinases in microglia: flow cytometric measurement and histochemical localization of cathepsin B and L. *Glia* 1993; 7(2):183-191.
- [5] Baricos WH, Cortez SL, Le QC et al.: Glomerular basement membrane degradation by endogenous cysteine proteinases in isolated rat glomeruli. *Kidney Int* 1990; 38(3):395-401.
- [6] Barrett AJ: Proteinases in mammalian cells and tissues. North-Holland, Biochemical Press 1977; 123(2):134-138.
- [7] Barrett AJ: Cathepsin D: the lysosomal aspartic proteinase. *Ciba Found Symp* 1979; 75: 37-50.
- [8] Bennett MJ, Chern L, Carpenter KH et al.: Abnormal lysosomal cathepsin activities in leukocytes and cultured skin fibroblasts in late infantile, but not in juvenile neuronal ceroid-lipofuscinosis (Batten disease). *Clin Chim Acta* 1992; 208(1-2):111-117.
- [9] Bernstein HG, Kirschke H, Wiederanders B et al.: Lysosomal proteinases as putative diagnostic tools in human neuropathology: Alzheimer disease (AD) and schizophrenia. *Acta Histochem (Suppl)* 1992; 42:19-24.
- [10] Bohley P, Seglen PO: Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia* 1992; 48(2):151-157.
- [11] Boujrad N, Ogwuegbu SO, Garnier M et al.: Identification of a stimulator of steroid hormone synthesis isolated from testis. *Science* 1995; 268(5217):1609-1612.
- [12] Bourke JR, Murdoch S, Manley SW et al.: Epidermal growth factor (EGF) inhibits the secretomotor response of the thyroid: effects of EGF on radioiodine turnover and fluid transport in cultured porcine thyroid cells. *J Endocrinol* 1991; 128(2):213-218.
- [13] Brix K, Lemansky P, Herzog V: Evidence for extracellularly acting cathepsins mediating thyroid hormone liberation in thyroid epithelial cells. *Endocrinology* 1996; 137(5):1963-1974.
- [14] Brix K, Lemansky P, Herzog V: Evidence for extracellularly acting cathepsins mediating thyroid hormone liberation in thyroid epithelial cells. *Endocrinology* 1996; 137(5):1963-1974.
- [15] Brock TD, Freeze H: *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J Bacteriol* 1969; 98(1):289-297.
- [16] Brzezinski J, Lewinski A: Increased plasma concentration of epidermal growth factor in female patients with non-toxic nodular goitre. *Eur J Endocrinol* 1998; 138(4):388-393.
- [17] Butkiewicz NJ, Wendel M, Zhang R et al.: Enhancement of hepatitis C virus NS3 proteinase activity by association with NS4A-specific synthetic peptides: identification of sequence and critical residues of NS4A for the cofactor activity. *Virology* 1996; 225(2):328-338.
- [18] Buttle DJ, Saklatvala J: Lysosomal cysteine endopeptidases mediate interleukin 1-stimulated cartilage proteoglycan degradation. *Biochem J* 1992; 287 (Pt 2):657-661.
- [19] Carmona C, Dowd AJ, Smith AM et al.: Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 62(1):9-17.
- [20] Castiglioni T, Merino MJ, Elsner B et al.: Immunohistochemical analysis of cathepsins D, B, and L in human breast cancer. *Hum Pathol* 1994; 25(9):857-862.

- 
- [21] Chapman HA, Jr., Munger JS, Shi GP: The role of thiol proteases in tissue injury and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150(6 Pt 2):S155-S159.
- [22] Chauhan SS, Goldstein LJ, Gottesman MM: Expression of cathepsin L in human tumors. *Cancer Res* 1991; 51(5):1478-1481.
- [23] Clark OH, Gerend PL, Davis M et al.: Estrogen and thyroid-stimulating hormone (TSH) receptors in neoplastic and nonneoplastic human thyroid tissue. *J Surg Res* 1985; 38(2):89-96.
- [24] Clark OH, Siperstein AE, Miller R et al.: Receptors and Receptor-Transducing Systems in Normal and Neoplastic Human Thyroid Tissue. 2005.
- [25] Conover CA, De Leon DD: Acid-activated insulin-like growth factor-binding protein-3 proteolysis in normal and transformed cells. Role of cathepsin D. *J Biol Chem* 1994; 269(10):7076-7080.
- [26] Coulombe R, Grochulski P, Sivaraman J et al.: Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *EMBO J* 1996; 15(20):5492-5503.
- [27] Coulonval K, Vandeput F, Stein RC et al.: Phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B and ribosomal S6 kinases in the stimulation of thyroid epithelial cell proliferation by cAMP and growth factors in the presence of insulin. *Biochem J* 2000; 348 (Pt 2):351-358.
- [28] Coulonval K, Vandeput F, Stein RC et al.: Phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B and ribosomal S6 kinases in the stimulation of thyroid epithelial cell proliferation by cAMP and growth factors in the presence of insulin. *Biochem J* 2000; 348 (Pt 2):351-358.
- [29] Cox SW, Eley BM: Cathepsin B/L-, elastase-, tryptase-, trypsin- and dipeptidyl peptidase IV-like activities in gingival crevicular fluid. A comparison of levels before and after basic periodontal treatment of chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1992; 19(5):333-339.
- [30] Dalton JP, Clough KA, Jones MK et al.: Characterization of the cathepsin-like cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun* 1996; 64(4):1328-1334.
- [31] Dalton JP, McGonigle S, Rolph TP et al.: Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infect Immun* 1996; 64(12):5066-5074.
- [32] Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J et al.: Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* 1985; 44:139-266.
- [33] Danser AH, Saris JJ, Schuijt MP et al.: Is there a local renin-angiotensin system in the heart? *Cardiovasc Res* 1999; 44(2):252-265.
- [34] Daughaday WH: The possible autocrine/paracrine and endocrine roles of insulin-like growth factors of human tumors. *Endocrinology* 1990; 127(1):1-4.
- [35] Day SR, Dalton JP, Clough KA et al.: Characterization and cloning of the cathepsin L proteinases of *Schistosoma japonicum*. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 217(1):1-9.
- [36] Dehrmann FM, Coetzer TH, Pike RN et al.: Mature cathepsin L is substantially active in the ionic milieu of the extracellular medium. *Arch Biochem Biophys* 1995; 324(1):93-98.
- [37] Deiss LP, Galinka H, Berissi H et al.: Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J* 1996; 15(15):3861-3870.
- [38] Deleu S, Pirson I, Clermont F et al.: Immediate early gene expression in dog thyrocytes in response to growth, proliferation, and differentiation stimuli. *J Cell Physiol* 1999; 181(2):342-354.
- [39] Deleu S, Pirson I, Coulonval K et al.: IGF-1 or insulin, and the TSH cyclic AMP cascade separately control dog and human thyroid cell growth and DNA synthesis, and complement each other in inducing mitogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 149(1-2):41-51.
- [40] Dennison C, Pike R, Coetzer T et al.: Characterisation of the activity and stability of single-chain cathepsin L and of proteolytically active cathepsin L/cystatin complexes. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1992; 373(7):419-425.
- [41] Dieling-Mavridis B: Insulin-like Growth Factor I (IGF-1) als Serummarker bei Malignomen. *Med. Dissertation, Fakultät für Medizin, TU München, 1998.*
- [42] Diment S, Eidelman M, Rodriguez GM et al.: Lysosomal hydrolases are present in melanosomes and are elevated in melanizing cells. *J Biol Chem* 1995; 270(9):4213-4215.

- [43] Donatien PD, Diment SL, Boissy RE et al.: Melanosomal and lysosomal alterations in murine melanocytes following transfection with the v-rasHa oncogene. *Int J Cancer* 1996; 66(4):557-563.
- [44] Drake FH, Dodds RA, James IE et al.: Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem* 1996; 271(21):12511-12516.
- [45] Duffy MJ: The role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis* 1992; 10(3):145-155.
- [46] Dumont JE, Lefort A, Libert F et al.: Transducing systems in the control of human thyroid cell function, proliferation and differentiation. *Adv Exp Med Biol* 1989; 261:357-372.
- [47] Dunn AD, Crutchfield HE, Dunn JT: Proteolytic processing of thyroglobulin by extracts of thyroid lysosomes. *Endocrinology* 1991; 128(6):3073-3080.
- [48] Dunn AD, Crutchfield HE, Dunn JT: Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsins B, D, and L. *J Biol Chem* 1991; 266(30):20198-20204.
- [49] Dunn AD, Dunn JT: Cysteine proteinases from human thyroids and their actions on thyroglobulin. *Endocrinology* 1988; 123(2):1089-1097.
- [50] Dunn AD, Myers HE, Dunn JT: The combined action of two thyroidal proteases releases T4 from the dominant hormone-forming site of thyroglobulin. *Endocrinology* 1996; 137(8):3279-3285.
- [51] Ebisui C, Tsujinaka T, Morimoto T et al.: Changes of proteasomes and cathepsins activities and their expression during differentiation of C2C12 myoblasts. *J Biochem (Tokyo)* 1995; 117(5):1088-1094.
- [52] Eccles SAMH, Court Wea: Preclinical Studies with Human Tumour Xenografts Using Rat Monoclonal Antibodies Directed Against the Epidermal Growth Factor Receptor. In: Lichtner RB, (Ed.): *EGF Receptor in Tumor Growth and Progression*. Springer, Berlin - Heidelberg - New York - Barcelona - Budapest - Hong Kong - London - Milan - Paris - Santa Clara - Singapore - Tokyo, 1997, pp. 185-251.
- [53] Eley BM, Cox SW: Correlation of gingival crevicular fluid proteases with clinical and radiological measurements of periodontal attachment loss. *J Dent* 1992; 20(2):90-99.
- [54] Felbor U, Kessler B, Mothes W et al.: Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(12):7883-7888.
- [55] Fineschi B, Sakaguchi K, Appella E et al.: The proteolytic environment involved in MHC class II-restricted antigen presentation can be modulated by the p41 form of invariant chain. *J Immunol* 1996; 157(8):3211-3215.
- [56] Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D et al.: Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* 2001; 153(5):999-1010.
- [57] Frade R, Rodrigues-Lima F, Huang S et al.: Procathepsin-L, a proteinase that cleaves human C3 (the third component of complement), confers high tumorigenic and metastatic properties to human melanoma cells. *Cancer Res* 1998; 58(13):2733-2736.
- [58] Führer DPR: Mutationen im TSH-Rezeptorgen: Pathogenetische Bedeutung und klinische Relevanz. *Deutsche Medizinische Wschr* 1999; 124(21):662-669.
- [59] Fujita J, Tsujinaka T, Yano M et al.: Anti-interleukin-6 receptor antibody prevents muscle atrophy in colon-26 adenocarcinoma-bearing mice with modulation of lysosomal and ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathways. *Int J Cancer* 1996; 68(5):637-643.
- [60] Gabrijelcic D, Svetic B, Spaic D et al.: Cathepsins B, H and L in human breast carcinoma. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30(2):69-74.
- [61] Gabrijelcic D, Svetic B, Spaic D et al.: Cathepsins B, H and L in human breast carcinoma. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30(2):69-74.
- [62] Gerstner AOH: Untersuchungen zum Einfluß von Insulin, IGF-1 und IGF-2 auf Proliferation und Differenzierung von Zelllinien kleinzelliger Bronchialkarzinome. *Med. Dissertation, Fachbereich Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg*, 1996.
- [63] Goretzki L, Schmitt M, Mann K et al.: Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L. *FEBS Lett* 1992; 297(1-2):112-118.

- [64] Goretzki PE, Frilling A, Simon D et al.: Growth Regulation of Human Thyrocytes by Thyrotropin, Cyclic Adenosine Monophosphate, Epidermal Growth Factor and Insulin-Like Growth Factor. In: Goretzki PE, Röher HD (Eds): *Frontiers of Hormone Research: Growth Regulation of Thyroid Gland and Thyroid Tumors*. Karger, Basel 1989, pp. 56-80.
- [65] Goto T, Kiyoshima T, Moroi R et al.: Localization of cathepsins B, D, and L in the rat osteoclast by immuno-light and -electron microscopy. *Histochemistry* 1994; 101(1):33-40.
- [66] Graeff H, Janicke F, Schmitt M: Clinical and prognostic significance of tumor-associated proteases in gynecologic oncology. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1991; 51(2):90-99.
- [67] Graf N: Alveoläre Permeabilitätsstörung nach Granulozytenstimulation durch Phorbol-Myristat-Azetat (PMA) im Kaninchen. Med. Dissertation, Fachbereich Humanmedizin, Georg-August-Universität zu Göttingen, 1991.
- [68] Guinec N, Dalet-Fumeron V, Pagano M: "In vitro" study of basement membrane degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B, B-like and L. Digestion of collagen IV, laminin, fibronectin, and release of gelatinase activities from basement membrane fibronectin. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1993; 374(12):1135-1146.
- [69] Gullick WJ: Prevalence of aberrant expression of the epidermal growth factor receptor in human cancers. *Br Med Bull* 1991; 47(1):87-98.
- [70] Gustavsson B, Hermansson A, Andersson AC et al.: Decreased growth rate and tumour formation of human anaplastic thyroid carcinoma cells transfected with a human thyrotropin receptor cDNA in NMRI nude mice treated with propylthiouracil. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 121(2):143-151.
- [71] Haas A: Quantitative Untersuchungen tumorassoziierter Proteolysefaktoren (Kathepsin B und D, uPA, uPA-Rezeptor, PAI-1) mittels Durchflußzytofluorometrie (FACScan). Med. Dissertation, Fakultät für Medizin, TU München, 1997.
- [72] Halangk W: Cathepsin B-induced versus trypsin-induced protease activation in the exocrine pancreas. 2nd Symposium of Cellular peptidases in immune functions and diseases, Magdeburg 1999;21.
- [73] Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC et al.: Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* 1996; 236(1):1-26.
- [74] Harris AL: EGF Receptors as a Target for Therapy and Interactions with Angiogenesis. In: Lichtner RB, (Ed): *EGF Receptor in Tumor Growth and Progression*. Springer, Berlin - Heidelberg - New York - Barcelona - Budapest - Hong Kong - London - Milan - Paris - Santa Clara - Singapore - Tokyo, 1997, pp. 89-103.
- [75] Harth G, Andrews N, Mills AA et al.: Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 58(1):17-24.
- [76] Haugen DR, Akslen LA, Varhaug JE et al.: Demonstration of a TGF- $\alpha$ -EGF-receptor autocrine loop and c-myc protein over-expression in papillary thyroid carcinomas. *Int J Cancer* 1993; 55(1):37-43.
- [77] Hayes DJ, Stubberfield CR, McBride JD et al.: Alterations in cysteine proteinase content of rat lung associated with development of *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun* 1991; 59(10):3581-3588.
- [78] Heidtmann HH, Salge U, Havemann K et al.: Secretion of a latent, acid activatable cathepsin L precursor by human non-small cell lung cancer cell lines. *Oncol Res* 1993; 5(10-11):441-451.
- [79] Heldin NE, Cvejic D, Smeds S et al.: Coexpression of functionally active receptors for thyrotropin and platelet-derived growth factor in human thyroid carcinoma cells. *Endocrinology* 1991; 129(4):2187-2193.
- [80] Heldin NE, Gustavsson B, Claesson-Welsh L et al.: Aberrant expression of receptors for platelet-derived growth factor in an anaplastic thyroid carcinoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(23):9302-9306.
- [81] Hoang-Vu C, Bull K, Schwarz I et al.: Regulation of CD97 protein in thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(3):1104-1109.

- [82] Hofmann A, Laue S, Rost AK et al.: mRNA levels of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP), MMP-2, and MMP-9 and of their inhibitors TIMP-2 and TIMP-3 in normal thyrocytes and thyroid carcinoma cell lines. *Thyroid* 1998; 8(3):203-214.
- [83] Homma K, Kurata S, Natori S: Purification, characterization, and cDNA cloning of procathepsin L from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly), and its involvement in the differentiation of imaginal discs. *J Biol Chem* 1994; 269(21):15258-15264.
- [84] Howie AF, Arthur JR, Nicol F et al.: Identification of a 57-kilodalton selenoprotein in human thyrocytes as thioredoxin reductase and evidence that its expression is regulated through the calcium-phosphoinositol signaling pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(6):2052-2058.
- [85] Ishidoh K, Kominami E: Multi-step processing of procathepsin L in vitro. *FEBS Lett* 1994; 352(3):281-284.
- [86] Ito T, Seyama T, Hayashi Y et al.: Unique association of p53 mutations with undifferentiated carcinoma of the thyroid. *Nippon Rinsho* 1994; 52(4):1069-1074.
- [87] Jane DT, Dufresne MJ: Expression and regulation of three lysosomal cysteine protease activities during growth of a differentiating L6 rat myoblast cell line and its nonfusing variant. *Biochem Cell Biol* 1994; 72(7-8):267-274.
- [88] Jhiang SM: The RET proto-oncogene in human cancers. *Oncogene* 2000; 19(49):5590-5597.
- [89] Jimi T, Satoh Y, Takeda A et al.: Strong immunoreactivity of cathepsin L at the site of rimmed vacuoles in diseased muscles. *Brain* 1992; 115 (Pt 1):249-260.
- [90] Jochum M, Gippner-Steppert C, Machleidt W et al.: The role of phagocyte proteinases and proteinase inhibitors in multiple organ failure. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150 (Pt 2):123-S130.
- [91] Joseph LJ, Chang LC, Stamenkovich D et al.: Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of human and murine preprocathepsin L. An abundant transcript induced by transformation of fibroblasts. *J Clin Invest* 1988; 81(5):1621-1629.
- [92] Jungheim C: Effekte von TSH, TSH-Rezeptor-Antikörpern und Interferon-alpha-2b auf die Proliferation von differenzierten Schilddrüsenkarzinomen im Nacktmausversuch. Med. Dissertation, Fachbereich Humanmedizin, J.-W.-Goethe-Universität, 1999.
- [93] Kageshita T, Yoshii A, Kimura T et al.: Biochemical and immunohistochemical analysis of cathepsins B, H, L and D in human melanocytic tumours. *Arch Dermatol Res* 1995; 287(3-4):266-272.
- [94] Kakegawa H, Nikawa T, Tagami K et al.: Participation of cathepsin L on bone resorption. *FEBS Lett* 1993; 321(2-3):247-250.
- [95] Kantak M: Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) im Serum von Patienten mit benignen und malignen Erkrankungen. Med. Dissertation, Fachbereich Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität Giessen, 1997.
- [96] Kasai M, Shirasawa T, Kitamura M et al.: Proenzyme form of cathepsin L produced by thymic epithelial cells promotes proliferation of immature thymocytes in the presence of IL-1, IL-7, and anti-CD3 antibody. *Cell Immunol* 1993; 150(1):124-136.
- [97] Kayser L, Perrild H, Thomsen J et al.: Microfluorometric kinetic analysis of cathepsin B activity in single human thyroid follicular epithelial cells using image analysis and continuous monitoring. *Histochem J* 1996; 28(4):257-263.
- [98] Keyszer GM, Heer AH, Kriegsmann J et al.: Comparative analysis of cathepsin L, cathepsin D, and collagenase messenger RNA expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis, by in situ hybridization. *Arthritis Rheum* 1995; 38(7):976-984.
- [99] Khazaie K: The Role of Epidermal Growth Factor Receptor in the Initiation and Progression of Malignancy. In: Lichtner RB, (Ed) *GF Receptor in Tumor Growth and Progression*. Springer, Berlin -Heidelberg - New York - Barcelona - Budapest - Hong Kong - London - Milan - Paris - Santa Clara - Singapore - Tokyo, 1997, pp. 165-184.

- [100] Kirschke H, Langner J, Wiederanders B et al.: Intrazellulärer Proteinabbau. IV. Isolierung und Charakterisierung von Peptidasen aus Rattenleberlysosomen. *Acta Biol Med Germ* 1972; 28:305-322.
- [101] Kirschke H, Langner J, Wiederanders B et al. Cathepsin L and proteinases with cathepsin B1-like activity from rat liver lysosomes. *Intracellular Protein Catabolism* , 210-217. 1974. Leipzig, Barth, J.A.
- [102] Kiyoshima T, Kido MA, Nishimura Y et al.: Immunocytochemical localization of cathepsin L in the synovial lining cells of the rat temporomandibular joint. *Arch Oral Biol* 1994; 39(12):1049-1056.
- [103] Knoch H: Die Cysteinproteinase Cathepsin B und Cysteinproteinase-Inhibitoren in Tumor- und Lungengewebe von Patienten mit Bronchialkarzinom und ihre mögliche Rolle bei der Tumorerkrankung und der Tumormetastasierung. Med. Dissertation, Fakultät für Klinische Medizin I, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 1996.
- [104] Kobayashi H, Schmitt M, Goretzki L et al.: Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (Pro- uPA). *J Biol Chem* 1991; 266(8):5147-5152.
- [105] Kopitz J, Arnold A, Meissner T et al.: Protein catabolism in fibroblasts cultured from patients with mucopolysaccharidosis II and other lysosomal disorders. *Biochem J* 1993; 295 (Pt 2):577-580.
- [106] Korem S, Resnick MB, Kraiem Z: Similar and divergent patterns in the regulation of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and tissue inhibitor of MMP-1 gene expression in benign and malignant human thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(9):3322-3327.
- [107] Korte S, Rauscher M: Wachstumshormone - STH/hGH/IGF-1/Insulin. 1 ed. ISP Verlag, Arnsberg, 2000.
- [108] Kraimps JL, Metaye T, Millet C et al.: Cathepsin D in normal and neoplastic thyroid tissues. *Surgery* 1995; 118(6):1036-1040.
- [109] Kremer M, Judd J, Rifkin B et al.: Estrogen modulation of osteoclast lysosomal enzyme secretion. *J Cell Biochem* 1995; 57(2):271-279.
- [110] Kroemer G, Jaattela M: Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(11):886-897.
- [111] Krueger S, Kalinski T, Wolf H et al.: Interactions between human colon carcinoma cells, fibroblasts and monocytic cells in coculture--regulation of cathepsin B expression and invasiveness. *Cancer Lett* 2005; 223(2):313-322.
- [112] Krüger S e a: Cathepsin L antisense oligonucleotides in a human osteosarcoma cell line: Studies of uptake, toxicity and effects on the invasive phenotype. 2nd Symposium of Cellular peptidases in immune functions and diseases, Magdeburg 1999;31.
- [113] Krüger S e a: Inhibitory effects of antisense cathepsin B cDNA transfection on invasion and motility in a human osteosarcoma cell line. 2nd Symposium of Cellular peptidases in immune functions and diseases, Magdeburg 1999;32.
- [114] Lah TT, Calaf G, Kalman E et al.: Cathepsins D, B and L in breast carcinoma and in transformed human breast epithelial cells (HBEC). *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376(6):357-363.
- [115] Lah TT, Kokalj-Kunovar M, Drobnic-Kosorok M et al.: Cystatins and cathepsins in breast carcinoma. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1992; 373(7):595-604.
- [116] Lah TT, Kokalj-Kunovar M, Strukelj B et al.: Stefins and lysosomal cathepsins B, L and D in human breast carcinoma. *Int J Cancer* 1992; 50(1):36-44.
- [117] Lemansky P, Brix K, Herzog V: Iodination of mature cathepsin D in thyrocytes as an indicator for its transport to the cell surface. *Eur J Cell Biol* 1998; 76(1):53-62.
- [118] Leto G, Tumminello FM, Pizzolanti G et al.: Lysosomal cathepsins B and L and Stefin A blood levels in patients with hepatocellular carcinoma and/or liver cirrhosis: potential clinical implications. *Oncology* 1997; 54(1):79-83.
- [119] Lichtner RB, Harkins RN: EGF Receptor in Tumor Growth and Progression. Springer, Berlin - Heidelberg - New York - Barcelona - Budapest - Hong Kong - London - Milan - Paris - Santa Clara - Singapore - Tokyo, 1997.

- [120] Lichtner RB, Harkins RN: Signal Transduction by EGF Receptor Tyrosine Kinase. In: Lichtner RB, (Ed): EGF Receptor in Tumor Growth and Progression. Springer, Berlin - Heidelberg - New York - Barcelona - Budapest - Hong Kong - London - Milan - Paris - Santa Clara - Singapore - Tokyo, 1997, pp. 1-17.
- [121] Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S et al.: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980; 284(5751):67-68.
- [122] Lui WO, Kytola S, Anfalk L et al.: Balanced translocation (3;7)(p25;q34): another mechanism of tumorigenesis in follicular thyroid carcinoma? *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 119(2):109-112.
- [123] Macaulay VM: Insulin-like growth factors and cancer. *Br J Cancer* 1992; 65(3):311-320.
- [124] Macaulay VM, Teale JD, Everard MJ et al.: Serum insulin-like growth factor-I levels in patients with small cell lung cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988; 24(7):1241-1242.
- [125] Mainferme F, Wattiaux R, von Figura K: Synthesis, transport and processing of cathepsin C in Morris hepatoma 7777 cells and rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 1985; 153(1):211-216.
- [126] Mark J, Ekedahl C, Dahlenfors R et al.: Cytogenetical observations in five human anaplastic thyroid carcinomas. *Hereditas* 1987; 107(2):163-174.
- [127] Mason RW, Massey SD: Surface activation of pro-cathepsin L. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189(3):1659-1666.
- [128] Mazzieri R, Masiero L, Zanetta L et al.: Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO J* 1997; 16(9):2319-2332.
- [129] McKerrow JH: Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. *Int J Parasitol* 1999; 29(6):833-837.
- [130] Metaye T, Kraimps JL, Goujon JM et al.: Expression, localization, and thyrotropin regulation of cathepsin D in human thyroid tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(10):3383-3388.
- [131] Metaye T, Millet C, Kraimps JL et al.: Estrogen receptors and cathepsin D in human thyroid tissue. *Cancer* 1993; 72(6):1991-1996.
- [132] Michel A, Ghoneim H, Resto M et al.: Sequence, characterization and localization of a cysteine proteinase cathepsin L in *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 73(1-2):7-18.
- [133] Minuto F, Barreca A, Del Monte P et al.: Immunoreactive insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-I-binding protein content in human thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68(3):621-626.
- [134] Mohamed MM, Cavallo-Medved D, Sloane BF: Human monocytes augment invasiveness and proteolytic activity of inflammatory breast cancer. *Biol Chem* 2008.
- [135] Mohamed MM, Sloane BF: Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(10):764-775.
- [136] Mort JS, Recklies AD: Interrelationship of active and latent secreted human cathepsin B precursors. *Biochem J* 1986; 233(1):57-63.
- [137] Müller-Gärtner HW, Baisch H, Garn M et al.: Individually Different Proliferation Responses of Differentiated Thyroid Carcinomas to Thyrotropin. In: Goretzki PE, Röher HD, (Eds): *Frontiers of Hormone Research: Growth Regulation of Thyroid Gland and Thyroid Tumors*. Karger, Basel, 1989, pp. 137-151.
- [138] Mullins DE, Rohrich ST: The role of proteinases in cellular invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1983; 695(3-4):177-214.
- [139] Nagy N, Camby I, Decaestecker C et al.: The influence of L-triiodothyronine, L-thyroxine, estradiol-17beta, the luteinizing-hormone-releasing hormone, the epidermal growth factor and gastrin on cell proliferation in organ cultures of 35 benign and 13 malignant human thyroid tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125(6):361-368.
- [140] Neal DE, Sharples L, Smith K et al.: The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer* 1990; 65(7):1619-1625.



- [141] Nicholson RI, Gee JMW, et al: erbB Signaling and Endocrine Sensitivity of Human Breast Cancer. In: Lichtner RB, (Hrsg): EGF Receptor in Tumor Growth and Progression. Springer, Berlin ; Heidelberg ; New York ; Barcelona ; Budapest ; Hong Kong ; London ; Milan ; Paris ; Santa Clara ; Singapore ; Tokyo, 1997, S 105-128.
- [142] Nicholson S, Halcrow P, Sainsbury JR et al.: Epidermal growth factor receptor (EGFr) status associated with failure of primary endocrine therapy in elderly postmenopausal patients with breast cancer. *Br J Cancer* 1988; 58(6):810-814.
- [143] Nicholson S, Sainsbury JR, Halcrow P et al.: Expression of epidermal growth factor receptors associated with lack of response to endocrine therapy in recurrent breast cancer. *Lancet* 1989; 1(8631):182-185.
- [144] Nishida Y, Kohno K, Kawamata T et al.: Increased cathepsin L levels in serum in some patients with ovarian cancer: comparison with CA125 and CA72-4. *Gynecol Oncol* 1995; 56(3):357-361.
- [145] Nishimura Y, Kawabata T, Furuno K et al.: Evidence that aspartic proteinase is involved in the proteolytic processing event of procathepsin L in lysosomes. *Arch Biochem Biophys* 1989; 271(2):400-406.
- [146] Nishimura Y, Kawabata T, Yano S et al.: Inhibition of intracellular sorting and processing of lysosomal cathepsins H and L at reduced temperature in primary cultures of rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 1990; 283(2):458-463.
- [147] Ohmura E, Okada M, Onoda N et al.: Insulin-like growth factor I and transforming growth factor alpha as autocrine growth factors in human pancreatic cancer cell growth. *Cancer Res* 1990; 50(1):103-107.
- [148] Olbricht CJ: Distribution of cathepsins B and L in the kidney and their role in tubular protein absorption. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30(10):675-681.
- [149] Paczek L, Bartłomiejczyk I, Gradowska L et al.: Intraglomerular protein accumulation in chronically rejected human kidney allografts. *Transplant Proc* 1996; 28(6):3449-3451.
- [150] Paczek L, Pazik J, Gradowska L et al.: Intraglomerular cathepsin B and L activity in chronic kidney allograft rejection. *Transplant Proc* 1995; 27(1):932-933.
- [151] Pagano M, Capony F, Rochefort H: [Pro-cathepsin D can activate in vitro pro-cathepsin B secreted by ovarian cancers]. *C R Acad Sci III* 1989; 309(1):7-12.
- [152] Page AE, Hayman AR, Andersson LM et al.: Degradation of bone matrix proteins by osteoclast cathepsins. *Int J Biochem* 1993; 25(4):545-550.
- [153] Penttila TL, Hakovirta H, Mali P et al.: Follicle-stimulating hormone regulates the expression of cyclic protein-2/cathepsin L messenger ribonucleic acid in rat Sertoli cells in a stage-specific manner. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 113(2):175-181.
- [154] Peters C e a: In Vivo Functions of Lysosomal Cysteine Proteinases. 2nd Symposium of Cellular peptidases in immune functions and diseases, Magdeburg 1999;53.
- [155] Peyrat JP, Bonnetterre J, Beuscart R et al.: Insulin-like growth factor 1 receptors in human breast cancer and their relation to estradiol and progesterone receptors. *Cancer Res* 1988; 48(22):6429-6433.
- [156] Pietrzkowski Z, Mulholland G, Gomella L et al.: Inhibition of growth of prostatic cancer cell lines by peptide analogues of insulin-like growth factor 1. *Cancer Res* 1993; 53(5):1102-1106.
- [157] Pike RN, Coetzer TH, Dennison C: Proteolytically active complexes of cathepsin L and a cysteine proteinase inhibitor; purification and demonstration of their formation in vitro. *Arch Biochem Biophys* 1992; 294(2):623-629.
- [158] Plebani M, Herszenyi L, Cardin R et al.: Cysteine and serine proteases in gastric cancer. *Cancer* 1995; 76(3):367-375.
- [159] Prencz EM, Dong JM, Sahagian GG: Modulation of the transport of a lysosomal enzyme by PDGF. *J Cell Biol* 1990; 110(2):319-326.
- [160] Radinsky R, Risin S, Fan D et al.: Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1995; 1(1):19-31.

- [161] Rassner UA: Das maligne Melanom der Haut und der epidermale Wachstumsfaktor (EGF): Ultrastrukturelle Lokalisierung des EGF im Melanom und Literaturübersicht. Med. Dissertation, Medizinische Fakultät, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, 1999.
- [162] Rauschnabel U: RGD-spezifische Bindung von insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor Bindungsprotein 2 (IGFBP-2) an  $\alpha 5\beta 1$ -Integrinrezeptoren auf der Oberfläche von Ewingsarkom Zellen und IGF-unabhängige Effekte. Dissertation, Fakultät für Biologie, Eberhards-Karls-Universität Tübingen, 2000.
- [163] Reddy GK, Dhar SC: Purification and characterization of collagenolytic property of renal cathepsin L from arthritic rat. *Int J Biochem* 1992; 24(9):1465-1473.
- [164] Reddy VY, Zhang QY, Weiss SJ: Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(9):3849-3853.
- [165] Rhoads ML, Fetterer RH: Developmentally regulated secretion of cathepsin L-like cysteine proteases by *Haemonchus contortus*. *J Parasitol* 1995; 81(4):505-512.
- [166] Ritonja A, Popovic T, Kotnik M et al.: Amino acid sequences of the human kidney cathepsins H and L. *FEBS Lett* 1988; 228(2):341-345.
- [167] Ritonja A, Popovic T, Turk V et al.: Amino acid sequence of human liver cathepsin B. *FEBS Lett* 1985; 181(1):169-172.
- [168] Rocchi P, Ferreri AM, Simone G et al.: Inhibitors of protein kinases induce differentiation in human neuroblastoma cell lines. *Anticancer Res* 1995; 15(4):1381-1385.
- [169] Ruettinger A, Schueler S, Mollenhauer JA et al.: Cathepsins B, K, and L Are Regulated by a Defined Collagen Type II Peptide via Activation of Classical Protein Kinase C and p38 MAP Kinase in Articular Chondrocytes. *J Biol Chem* 2008; 283(2):1043-1051.
- [170] Russo A, Bazan V, Gebbia N et al.: Flow cytometric DNA analysis and lysosomal cathepsins B and L in locally advanced laryngeal cancer. Relationship with clinicopathologic parameters and prognostic significance. *Cancer* 1995; 76(10):1757-1764.
- [171] Saftig P et al.: Studies on the in vivo functions of cathepsins using mouse knockout models. 2nd Symposium of Cellular peptidases in immune functions and diseases, Magdeburg 1999;60.
- [172] Sainsbury JR, Farndon JR, Needham GK et al.: Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet* 1987; 1(8547):1398-1402.
- [173] Scheven BA, Hamilton NJ, Fakkeldij TM et al.: Effects of recombinant human insulin-like growth factor I and II (IGF-I/-II) and growth hormone (GH) on the growth of normal adult human osteoblast-like cells and human osteogenic sarcoma cells. *Growth Regul* 1991; 1(4):160-167.
- [174] Schmid U: Untersuchungen zur Rezeptorbindung und biologischen Wirkung von Insulin, Lispro-Insulin und Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) an proximalen Nierentubuluszellen. Med. Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität Ulm, 1999.
- [175] Schmitt M, Jänicke F, Graeff H: Tumor-associated proteases. *Fibrinolysis* 1992; Suppl.4(6):3-26.
- [176] Schmutzler C, Koehrle J: Innovative strategies for the treatment of thyroid cancer. *Eur J Endocrinol* 2000; 143(1):15-24.
- [177] Schneider DL: ATP-dependent acidification of intact and disrupted lysosomes. Evidence for an ATP-driven proton pump. *J Biol Chem* 1981; 256(8):3858-3864.
- [178] Schober R, Bilzer T, Waha A et al.: The epidermal growth factor receptor in glioblastoma: genomic amplification, protein expression, and patient survival data in a therapeutic trial. *Clin Neuropathol* 1995; 14(3):169-174.
- [179] Schott-Göttelmann D: Expression von EGF, EGF-R und c-erbB-2 im humanen Pankreaskarzinom - klinische Bedeutung. Med. Dissertation, Medizinische Fakultät, Universität Ulm, 1999.
- [180] Schultz H: Phosphorylierung des kleinen Säugerhitzeschockproteins - Erzeugung und Charakterisierung von Antikörpern gegen Hsp25 und Hsp25-Phosphopeptid und Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung der Hsp27-Phosphorylierung bei der PMA-induzierten Differenzierung von HL60-Zellen. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Humbolt-Universität, 1999.

- [181] Sehgal I, Thompson TC: Novel regulation of type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9 and -2) activities by transforming growth factor-beta1 in human prostate cancer cell lines. *Mol Biol Cell* 1999; 10(2):407-416.
- [182] Sheflin LG, Fucile NW, Ozawa S et al.: Thyroxine increases the levels of epidermal growth factor messenger ribonucleic acid (EGF mRNA) in the thyroid in vivo, as revealed by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction with an internal control EGF mRNA. *Endocrinology* 1993; 132(6):2319-2324.
- [183] Shin DM, Perez-Soler RHWNHWK: Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Head and Neck Tumorigenesis and Saturation of EGFR with Monoclonal Antibody RG83852. In: Lichtner RB, (Ed): *EGF Receptor in Tumor Growth and Progression*. Springer, Berlin, 1997, pp. 65-87.
- [184] Shuja S, Murnane MJ: Marked increases in cathepsin B and L activities distinguish papillary carcinoma of the thyroid from normal thyroid or thyroid with non-neoplastic disease. *Int J Cancer* 1996; 66(4):420-426.
- [185] Shuja S, Sheahan K, Murnane MJ: Cysteine endopeptidase activity levels in normal human tissues, colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer* 1991; 49(3):341-346.
- [186] Sivaparvathi M, Sawaya R, Wang SW et al.: Overexpression and localization of cathepsin B during the progression of human gliomas. *Clin Exp Metastasis* 1995; 13(1):49-56.
- [187] Slack JM, Kuzio J, Faulkner P: Characterization of v-cath, a cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol* 1995; 76 ( Pt 5):1091-1098.
- [188] Slamon DJ, Clark GM, Wong SG et al.: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235(4785):177-182.
- [189] Sloane BF: Cathepsin B and cystatins: evidence for a role in cancer progression. *Semin Cancer Biol* 1990; 1(2):137-152.
- [190] Sloane BF, Rozhin J, Moin K et al.: Cysteine endopeptidases and their inhibitors in malignant progression of rat embryo fibroblasts. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1992; 373(7):589-594.
- [191] Sloane BF, Yan S, Podgorski I et al.: Cathepsin B and tumor proteolysis: contribution of the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol* 2005; 15(2):149-157.
- [192] Sloane B F e a: Observing Proteases and proteolysis in living tumor cells. 2nd Symposium of Cellular peptidases in immune functions and diseases, Magdeburg 1999;65.
- [193] Smith AM, Carmona C, Dowd AJ et al.: Neutralization of the activity of a *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase by anti-cathepsin L antibodies. *Parasite Immunol* 1994; 16(6):325-328.
- [194] Smith AM, Dowd AJ, Heffernan M et al.: *Fasciola hepatica*: a secreted cathepsin L-like proteinase cleaves host immunoglobulin. *Int J Parasitol* 1993; 23(8):977-983.
- [195] Takahashi H, Ishidoh K, Muno D et al.: Cathepsin L activity is increased in alveolar macrophages and bronchoalveolar lavage fluid of smokers. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147(6 Pt 1):1562-1568.
- [196] Takashi Ito YHTHea: Establishment of two human thyroid carcinoma cell lines (8305C, 8505C) bearing p53 gene mutations. *International Journal of Oncology* 1994;(4):583-586.
- [197] Talavera F, Reynolds RK, Roberts JA et al.: Insulin-like growth factor I receptors in normal and neoplastic human endometrium. *Cancer Res* 1990; 50(10):3019-3024.
- [198] Tanabe H, Kumagai N, Tsukahara T et al.: Changes of lysosomal proteinase activities and their expression in rat cultured keratinocytes during differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1094(3):281-287.
- [199] Tanaka K, Inoue H, Miki H et al.: Heterogeneous distribution of thyrotrophin receptor messenger ribonucleic acid (TSH-R mRNA) in papillary thyroid carcinomas detected by in situ hybridization. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996; 44(3):259-267.
- [200] Tanaka K, Inoue H, Miki H et al.: Relationship between prognostic score and thyrotropin receptor (TSH-R) in papillary thyroid carcinoma: immunohistochemical detection of TSH-R. *Br J Cancer* 1997; 76(5):594-599.

- [201] Taniguchi K, Tomita M, Kominami E et al.: Cysteine proteinases in rat dorsal root ganglion and spinal cord, with special reference to the co-localization of these enzymes with calcitonin gene-related peptide in lysosomes. *Brain Res* 1993; 601(1-2):143-153.
- [202] Tao K, Stearns NA, Dong J et al.: The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch Biochem Biophys* 1994; 311(1):19-27.
- [203] Tardy C, Codogno P, Autefage H et al.: Lysosomes and lysosomal proteins in cancer cell death (new players of an old struggle). *Biochim Biophys Acta* 2006; 1765(2):101-125.
- [204] Tchoupe JR, Moreau T, Gauthier F et al.: Photometric or fluorometric assay of cathepsin B, L and H and papain using substrates with an aminotrifluoromethylcoumarin leaving group. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1076(1):149-151.
- [205] Tepel C, Bromme D, Herzog V et al.: Cathepsin K in thyroid epithelial cells: sequence, localization and possible function in extracellular proteolysis of thyroglobulin. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 24):4487-4498.
- [206] Tepel C et al.: Sequence, localization and function of Cathepsin K in thyroid epithelial cells. 2nd Symposium of Cellular peptidases in immune functions and diseases, Magdeburg 1999;71.
- [207] Thomssen C, Schmitt M, Goretzki L et al.: Prognostic value of the cysteine proteases cathepsins B and cathepsin L in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 1995; 1(7):741-746.
- [208] Thomsson C: Tumorasoziierte Proteolyse: Untersuchungen zur prognostischen Bedeutung der Zysteinprotease Kathepsin L bei Patientinnen mit Mammakarzinom. Med. Dissertation, Fakultät für Medizin, TU München, 1997.
- [209] Thorgeirsson UP, Turpeenniemi-Hujanen T, Neckers LM et al.: Protein synthesis but not DNA synthesis is required for tumor cell invasion in vitro. *Invasion Metastasis* 1984; 4(2):73-83.
- [210] Timmermann M: Die Bedeutung des EGF-Rezeptors für die Prognose des primär nodal negativen Mammakarzinoms hinsichtlich des Auftretens von Fernmetastasen und lokoregionären Rezidiven. Med. Dissertation, Fachbereich Medizin, Universität Hamburg, 1999.
- [211] Tomomasa H, Waguri S, Umeda T et al.: Lysosomal cysteine proteinases in rat epididymis. *J Histochem Cytochem* 1994; 42(3):417-425.
- [212] Torre G, Barreca A, Borgonovo G et al.: Goiter recurrence in patients submitted to thyroid-stimulating hormone suppression: possible role of insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding proteins. *Surgery* 2000; 127(1):99-103.
- [213] Trabandt A, Muller-Ladner U, Kriegsmann J et al.: Expression of proteolytic cathepsins B, D, and L in periodontal gingival fibroblasts and tissues. *Lab Invest* 1995; 73(2):205-212.
- [214] Tsao MS, Zhu H, Viallet J: Autocrine growth loop of the epidermal growth factor receptor in normal and immortalized human bronchial epithelial cells. *Exp Cell Res* 1996; 223(2):268-273.
- [215] Tsujinaka T, Ebisui C, Fujita J et al.: Muscle undergoes atrophy in association with increase of lysosomal cathepsin activity in interleukin-6 transgenic mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 207(1):168-174.
- [216] Tsujinaka T, Ebisui C, Fujita J et al.: Autocatalytic inactivation of lysosomal cathepsins is associated with inhibition of protein breakdown by insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in myotubes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 208(1):353-359.
- [217] Turk B, Dolenc I, Turk V et al.: Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry* 1993; 32(1):375-380.
- [218] Turman MA, Apple CA: Human proximal tubular epithelial cells express somatostatin: regulation by growth factors and cAMP. *Am J Physiol* 1998; 274(Pt 2):1095-1101.
- [219] Uchiyama Y, Watanabe M, Watanabe T et al.: Variations in immunocytochemical localization of cathepsin B and thyroxine in follicular cells of the rat thyroid gland and plasma TSH concentrations over 24 hours. *Cell Tissue Res* 1989; 256(2):355-360.
- [220] Uchiyama Y, Watanabe T, Watanabe M et al.: Immunocytochemical localization of cathepsins B, H, L, and T4 in follicular cells of rat thyroid gland. *J Histochem Cytochem* 1989; 37(5):691-696.

- [221] Ulbricht B, Hagmann W, Ebert W et al.: Differential secretion of cathepsins B and L from normal and tumor human lung cells stimulated by 12(S)-hydroxy-eicosatetraenoic acid. *Exp Cell Res* 1996; 226(2):255-263.
- [222] Ulbricht B, Spiess E, Schwartz-Albiez R et al.: Quantification of intracellular cathepsin activities in human lung tumor cell lines by flow cytometry. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376(7):407-414.
- [223] Usuki K, Heldin NE, Miyazono K et al.: Production of platelet-derived endothelial cell growth factor by normal and transformed human cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(19):7427-7431.
- [224] Van Keymeulen A, Dumont JE, Roger PP: TSH induces insulin receptors that mediate insulin costimulation of growth in normal human thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279(1):202-207.
- [225] Van Keymeulen A, Roger PP, Dumont JE et al.: TSH and cAMP do not signal mitogenesis through Ras activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273(1):154-158.
- [226] Van Zoelen EJ, Stortelers C, Lenferink AE et al.: The EGF domain: requirements for binding to receptors of the ErbB family. *Vitam Horm* 2000; 59:99-131.
- [227] Vasiljeva O, Papazoglou A, Kruger A et al.: Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res* 2006; 66(10):5242-5250.
- [228] Veale D, Kerr N, Gibson GJ et al.: The relationship of quantitative epidermal growth factor receptor expression in non-small cell lung cancer to long term survival. *Br J Cancer* 1993; 68(1):162-165.
- [229] Volkel H, Kurz U, Linder J et al.: Cathepsin L is an intracellular and extracellular protease in *Paramecium tetraurelia*. Purification, cloning, sequencing and specific inhibition by its expressed propeptide. *Eur J Biochem* 1996; 238(1):198-206.
- [230] Waguri S, Sato N, Watanabe T et al.: Cysteine proteinases in GH4C1 cells, a rat pituitary tumor cell line, are secreted by the constitutive and regulated secretory pathways. *Eur J Cell Biol* 1995; 67(4):308-318.
- [231] Weber E, Gunther D, Laube F et al.: Hybridoma cells producing antibodies to cathepsin L have greatly reduced potential for tumour growth. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120(9):564-567.
- [232] Weinberg RA: *Wie Krebs entsteht. Spektrum der Wissenschaft*, Heidelberg, 1996.
- [233] Werle B, Ebert W, Klein W et al.: Assessment of cathepsin L activity by use of the inhibitor CA-074 compared to cathepsin B activity in human lung tumor tissue. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376(3):157-164.
- [234] Werle B: *Cathepsin B aus Humanen Lungentumoren*. Med. Dissertation, Medizinische Fakultät, Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg, 1997.
- [235] Werner SC, Ingbar SH, Braverman LE et al.: *Werner & Ingbar's the thyroid a fundamental and clinical text*. 8th ed ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000.
- [236] Westermarck K: Epidermal Growth Factor Receptors and Receptor Localization in Thyroid Follicle Cells. In: Goretzki PE, Röher HD (Eds): *Frontiers of Hormone Research: Growth Regulation of Thyroid Gland and Thyroid Tumors*. Karger, Basel, 1989, pp. 28-34.
- [237] Williams D: Childhood Thyroid Cancer and Chernobyl. *Topical Endocrinology* 1996;(2):10-12.
- [238] Willstätter R, Bamann E: Über die Proteasen der Magenschleimhaut. Eine erste Abhandlung über die Enzyme der Leukozyten. *Hoppe-Seylers Z physiologische Chemie*, Berlin, 1929.
- [239] Wright WW, Zabudoff SD, Penttila TL et al.: Germ cell-Sertoli cell interactions: regulation by germ cells of the stage-specific expression of CP-2/cathepsin L mRNA by Sertoli cells. *Dev Genet* 1995; 16(2):104-113.
- [240] Yamaguchi N, Chung SM, Shiroeda O et al.: Characterization of a cathepsin L-like enzyme secreted from human pancreatic cancer cell line HPC-YP. *Cancer Res* 1990; 50(3):658-663.
- [241] Yamamoto H, Murawaki Y, Kawasaki H: Collagenolytic cathepsin B and L activity in experimental fibrotic liver and human liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1992; 76(1):95-112.

- [242] Yan S, Sameni M, Sloane BF: Cathepsin B and human tumor progression. *Biol Chem* 1998; 379(2):113-123.
- [243] Yoshinari M, Taurog A: Lysosomal digestion of thyroglobulin: role of cathepsin D and thiol proteases. *Endocrinology* 1985; 117(4):1621-1631.

## 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 <sub>2</sub>                      | 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 <sub>2</sub>             | 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  
„2<sup>nd</sup> 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“

## 7.4 Lebenslauf

Familienname: Plehn  
 Vorname: Alexander  
 Geburtsdatum: 04.03.1975  
 Geburtsort: Halle/Saale  
 Eltern: PD Dr. phil. Werner Plehn, Philologe  
 Ilona Plehn, geb. Büttner, Lehrer im Hochschuldienst  
 Wohnort: Geiststrasse 27, 06108 Halle/Saale  
 Ausbildung:  
 1980-1982 Auslandsaufenthalt mit Eltern in Leeds, Großbritannien  
 1981 Einschulung in der 12. POS  
 1983-1989 Besuch der POS Martin Schwantes  
 1989-1993 Besuch der Altsprachenklasse des Landesgymnasiums Latina August Hermann  
 Francke  
 1993 Hochschulreife mit Auszeichnung  
 1993 Abschluss `Großes Latinum`  
 1993-1994 Zivildienst im St. Barbara Krankenhaus Halle  
 1994- Medizinstudium an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg  
 1995 Cambridge First Certificate (Grade A)  
 1996 Ärztliche Vorprüfung  
 1996-1997 Fachkurs „Englisch für Mediziner“ (Grade A)  
 1997 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
 1997-1998 Erweiterter Fachkurs „Communication Skills in Medicine“  
 1998 Erstes Amerikanisches Staatsexamen (USMLE Step1)  
 1998 Sechswöchige Famulatur im Riverside Mercy Hospital, Toledo (USA), Affiliated  
 Hospital des Medical College of Ohio, Emergency Medicine  
 2000 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
 2000 Zweites Amerikanisches Staatsexamen (USMLE Step 2)  
 07-11/2000 Praktisches Jahr in den USA:  
 Mount Sinai School of Medicine, New York City (Kinderkardiologie,  
 Infektionsmedizin)  
 New York University (Hämatologie/Onkologie)  
 Medical College of Ohio (Notfallmedizin), Toledo  
 2001 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
 2001-2002 Arzt im Praktikum, Klinik der Inneren Medizin III MLU Halle

|      |   |
|------|---|
| 2002 | Arzt im Praktikum, 2. Medizinische Klinik St. Elisabeth KH Halle        |
| 2002 | Clinical Skills Assessment Test Philadelphia USA erfolgreich absolviert |
| 2002 | Erwerb des Amerikanischen Staatsexamens des ECFMG USA                   |
| 2002 | Ausbildungsassistent, 2. Medizinische Klinik St. Elisabeth KH Halle     |
| 2005 | Fachkunde Arzt im Rettungsdienst  |
| 2006 | Fachkunde im Strahlenschutz   |
| 2007 | Facharzt Innere Medizin   |

## 7.5 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, daß ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater und andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Es gab keine früheren Promotionsversuche.

Halle, den

Alexander Plehn

## 7.6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem wissenschaftlichen Lehrer Herrn Dr. Ekkehard Weber für die Überlassung des Themas und die intensive Betreuung in allen Phasen meiner Dissertationsarbeit. Den zahlreichen mit ihm geführten fachlichen Diskussionen und einem hohen Maß seiner Geduld ist es zu verdanken, dass die Odyssee dieses Werkes einen erfolgreichen Abschluß nimmt. Höchste fachliche Kompetenz sowie besondere Freundlichkeit ließen seine Begeisterung für wissenschaftliche Arbeit auf mich übertragen und Teil meines weiteren Lebensweges werden.

Daneben möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Cuong Hoang-Vu bedanken, der das interdisziplinäre Projekt von Seiten des Labors für chirurgische Forschung förderte und mir stets mit freundlichem Rat und großzügiger Hilfe zur Seite stand.

Für die ständige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und bei der Lösung unzähliger Probleme bedanke ich mich bei Frau R. Medek, Frau K. Hammje, Frau U. Broghammer, Frau B. Oelke und Frau C. Rupf. Die aufgeschlossene Arbeitsatmosphäre in den biochemischen Labors der Hollystraße sowie den Labors für experimentelle Chirurgie hat entscheidend das Gelingen der Arbeit gefördert.

Mein herzlicher Dank gehört nicht zuletzt meinen Eltern, meiner Verlobten und meinem Bruder für die immer gewährte, viel zu selbstverständlich erscheinende Hilfe und die zahlreichen Entbehrungen, die das Gelingen dieser Arbeit erst ermöglichten.

Die Arbeit wurde im Rahmen der vom Kultusministerium des Landes Sachsen-Anhalt geförderten Projekte N. 2792A/0087H und 2795A/0087H durchgeführt. Ich danke dem Kultusministerium für die Unterstützung.