

## 2 Einleitung

### 2.1 Grundlagen der Tumorbilogie

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 Stoffwechselfvorgänge 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]
Ovarialkarzinom	Erhöhte Cathepsin L-Spiegel	[144]
Mammakarzinom	Erhöhte Cathepsin L-, B- und D-Spiegel im Tumorgewebe; Cathepsin D korreliert indirekt mit der Prognose und ist heute etablierter, unabhängiger prognostischer Marker 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 Schilddrüsen-erkrankungen 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 Follikelepitheldifferenzierung 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-Rezeptor kinase-* (*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

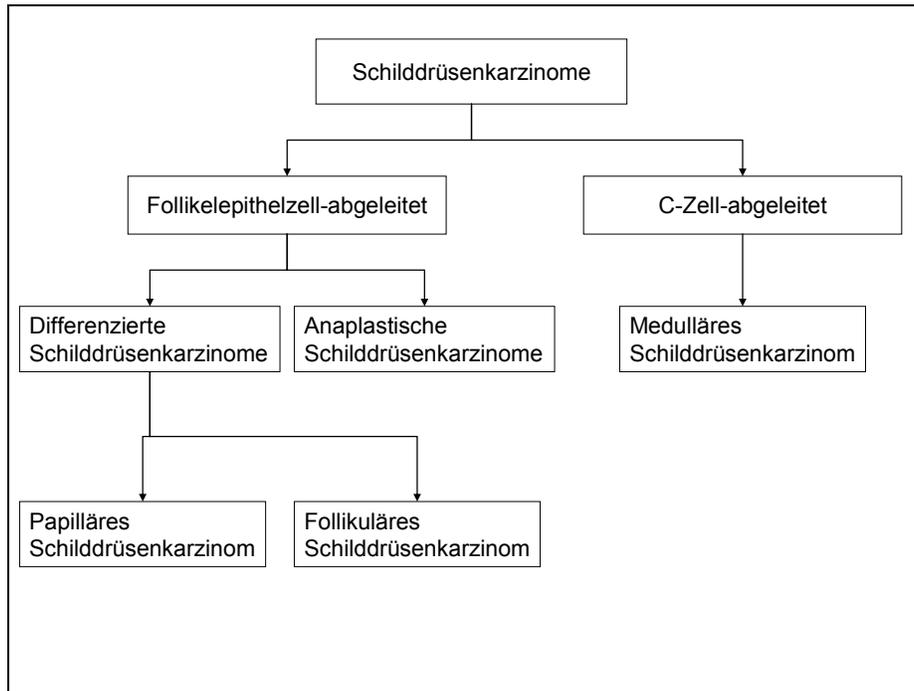


Abbildung 1: Klassifikation der Schilddrüsenkarzinome

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 follikulären 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 Schilddrüsengewebes 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].