

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 zu 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 aufwies [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 α 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. zehnmal 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 Proteinasen 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.

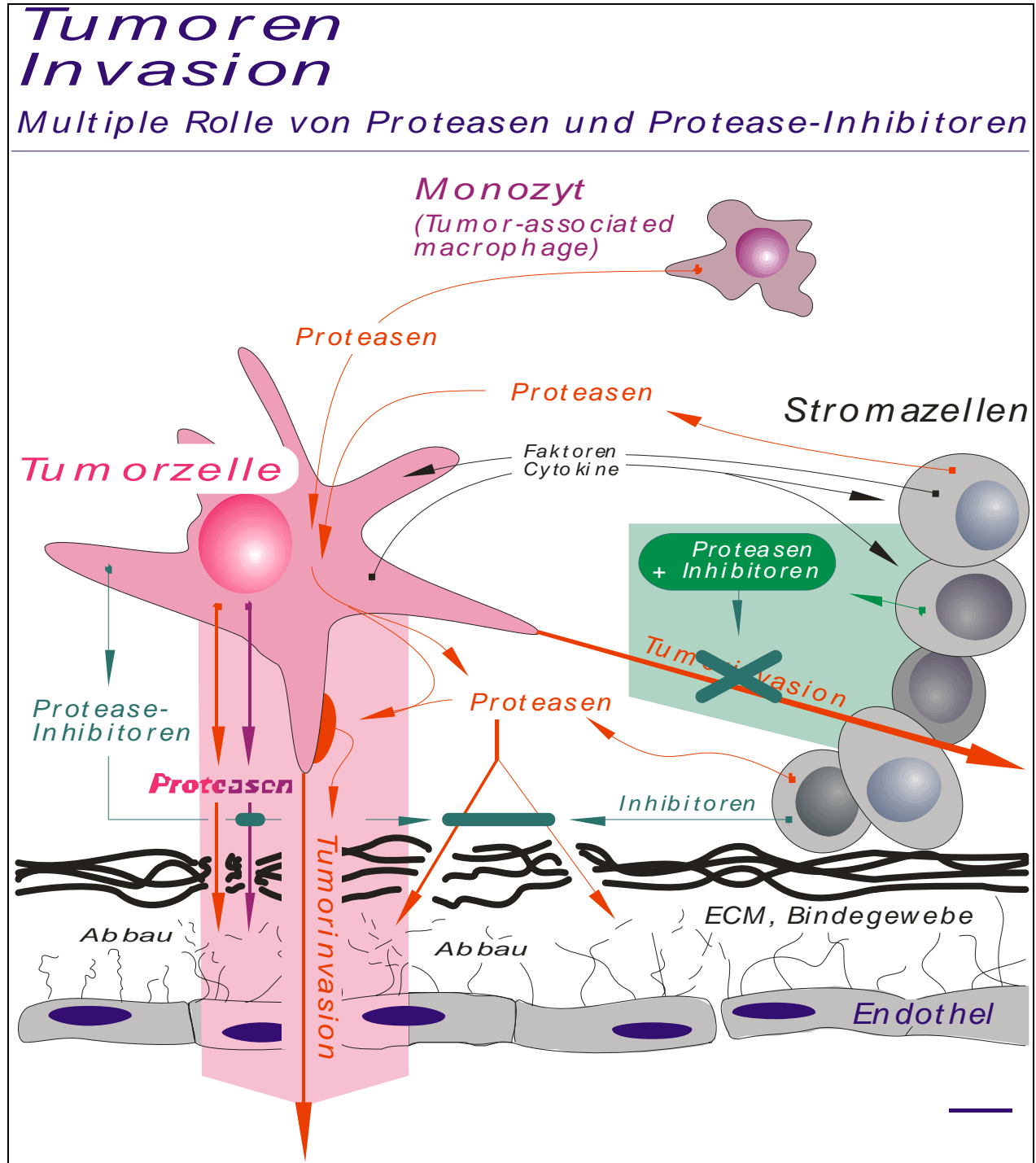


Abbildung 37: Tumordinvasion

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 Tumorbilogie, 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 α -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.