

Aus der Klinik für Urologie  
des Universitätsklinikums Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin  
Direktor Prof. Dr. med. S.A. Loening

## DISSERTATION

„Cathepsine B, H, L und ihre Inhibitoren im Gewebe  
und in Zellkulturen der Prostata“

Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae  
(Dr. med.)

Medizinische Fakultät Charité,  
der Humboldt-Universität zu Berlin

vorgelegt von  
Frau Beate Friedrich  
geb. am 4. April 1972 in Zwickau/Sa.

Dekan: Prof. Dr. med. M. Dietel

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. K. Jung  
2. Prof. Dr. med. habil. H. Seiter  
3. PD Dr. med. A. Sokolowski

eingereicht: Januar 1998

Datum der Promotion: 28.01.1999

## **Abstract**

The cathepsins B, H and L (CB, CH, CL) are lysosomal proteolytic enzymes belonging to the cysteine protease family. Elevated cathepsin levels and decreased concentration of their endogenous inhibitors have been demonstrated in a variety of tumors, suggesting a contribution to invasion and metastasis. The situation for prostate cancer was so far unknown.

Using fluorimetric assays, catalytic activities of the cathepsins B, H, L were measured in prostatic tissue samples obtained from different groups of patients, in primary cell cultures established from human prostate and in the immortalized cell lines LNCaP, PC3 and DU145. Inhibitory activities of cysteine protease inhibitors (CPI) were tested against purified cathepsin B.

Comparing matched pairs of normal and cancerous tissue samples from the prostate, significantly decreased levels of CB and CL were found in malignant samples. In contrast, primary cell cultures from malignant tissue showed elevated levels of all three cathepsins and increased ratios of cathepsins to CPI when compared to cell cultures from non-malignant prostate. The permanent cell lines showed a similar distribution of cathepsin levels, DU145 with the highest activity, followed by LNCaP and PC3.

These results suggest that elevated cathepsin activities and increased ratios of cathepsins to CPI in malignant cell cultures compared to non-malignant samples may be an indication for a cellular proteolytic imbalance in prostatic cancer cells. Regarding different results, determinations in primary cell cultures should be preferred to tissue samples.

Keywords: cathepsins, cysteine protease inhibitor, prostate carcinoma, LNCaP, PC3, DU145

## Zusammenfassung

Die Cathepsine B, H und L sind lysosomale Enzyme, die zur Gruppe der Cysteinproteasen gehören. Erhöhte Aktivitäten dieser Proteasen fand man in Gewebeproben verschiedener Tumore, vermutlich Hinweis auf eine Beteiligung an Invasion und Metastasierung. Unter physiologischen Bedingungen werden die Cathepsine von endogenen Inhibitoren kontrolliert, eine Verminderung dieser Cysteinprotease-Inhibitoren (CPI) würde die proteolytische Dysbalance verstärken und zur Ausbreitung des malignen Prozesses beitragen. Für das Prostatakarzinom gab es bisher keine Untersuchungen.

Die Aktivität der Cathepsine wurde mit Hilfe spezifischer Substrate bestimmt, die zur Bildung fluorogener Produkte führten. Zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der CPI wurden die Proben nach einer Hitzeaktivierung gegen reines Cathepsin B getestet. Untersucht wurden Gewebeproben verschiedener Patientengruppen, Primärzellkulturen, die aus normalem und maligne veränderten Prostatagewebe angezüchtet wurden und vergleichend dazu die drei immortalisierten Zelllinien LNCaP, PC3 und DU145.

Die Ergebnisse der Gewebeproben zeigten höhere Aktivitäten der Cathepsine B und L im nichterkrankten Gewebe, nicht wie erwartet im Tumorgewebe der Prostata. Hingegen waren bei den Primärzellkulturen alle drei Cathepsine und der Quotient Cathepsine/CPI in den Tumorproben erhöht. Die immortalisierten Zelllinien zeigten die gleiche Verteilung bei allen Cathepsinen, DU145 mit der höchsten Aktivität, gefolgt von LNCaP und PC3.

Anhand der Ergebnisse schlußfolgern wir, daß die Untersuchung von Gewebeproben der Prostata hinsichtlich der Beteiligung der Cathepsine am Tumorgeschehen keine eindeutigen Erkenntnisse erbringt. Dies ist vermutlich auf die Heterogenität des Gewebes zurückzuführen, das nicht nur epitheliale, sondern auch stromale Zellen enthält. Die aus dem Gewebe angezüchteten Primärzellkulturen scheinen ein genaueres Bild des Verhältnisses von Cathepsinen und den Inhibitoren zu geben und sind unserer Meinung nach den Bestimmungen in Gewebeproben vorzuziehen.

Schlagworte: Cathepsine, Cysteinprotease-Inhibitor, Prostatakarzinom, LNCaP, PC3, DU145

1	Einleitung und Problemstellung	8
2	Theoretischer Teil: Cathepsine B, H, L und ihre Inhibitoren	12
2.1	Eigenschaften, Synthese und Vorkommen der Cathepsine B, H, L	12
2.2	Biologische Funktionen der Cathepsine	14
2.3	Regulation der Enzymaktivität	15
2.4	Charakterisierung der Cysteinprotease-Inhibitoren	16
2.4.1	Vorkommen, Eigenschaften und Struktur	16
2.4.2	Rolle der Cysteinprotease-Inhibitoren bei pathologischen Prozessen	18
2.5	Rolle der Cathepsine und ihrer Inhibitoren bei malignen Erkrankungen	18
2.6	Cathepsine in Prostatagewebe und Zellkulturen	21
3	Material und Methoden	23
3.1	Patientengruppen	23
3.1.1	Prostatakarzinompatienten	23
3.1.2	Adenomektomiepatienten	23
3.1.3	Patienten mit transurethraler Resektion der Prostata	23
3.1.4	Patienten mit Zystoprostatektomien	24
3.2	Materialgewinnung und Lagerung	24
3.3	Aufbereitung der Gewebeproben	24
3.4	Vorbereitung der Zellkulturen	25
3.4.1	Kulturmedien und Materialien	25
3.4.2	Primärzellkulturen	25
3.4.3	Permanente Zellkulturen	26
3.5	Bestimmung der Cathepsine, Cysteinprotease-Inhibitoren und des Proteingehaltes	27
3.5.1	Testprinzip	27
3.5.2	Aktivitätsbestimmung der Cathepsine B, H und L	28
3.5.2.1	Geräte, Reagenzien, Probenmaterialien	28
3.5.2.2	Testdurchführung	31
3.5.2.3	Berechnung der Aktivität	32
3.5.3	Bestimmung der Inhibitoren	33
3.5.4	Bestimmung des Proteingehaltes	34

3.5.5	Statistische Auswertung	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Zuverlässigkeit der Enzymaktivitätsbestimmungen	36
4.1.1	Intraserielle Präzision	36
4.1.2	Interserielle Präzision	36
	Überprüfung der Enzymextraktionen	38
4.3	Korrelation der Bezugsgrößen	38
4.4	Cathepsine B, H, L und Cysteinprotease-Inhibitoren in Prostatagewebeproben	43
4.4.1	46	
4.4.2	Vergleich von normalem und Tumorgewebe	46
4.4.3	Adenomektomien, Zystoprostatektomien, transurethrale Resektionen	47
4.5	Cathepsine B, H, L und Cysteinprotease-Inhibitoren in Zellkulturen	47
4.5.1	50	
4.5.2	Vergleich der Primärzellkulturen	50
4.5.3	Permanente Zellkulturen	51
4.5.3.1	Ammoniumchlorid-stimulierte Zellkulturen	52
5	Diskussion	55
5.1	Methodik	56
5.2	Cathepsine B, H, L und Cysteinprotease-Inhibitoren in Gewebeproben der Prostata	58
5.2.1	Korrelation mit anderen Tumormerkmalen	60
5.3	Cathepsine B, H, L und Cysteinprotease-Inhibitoren in Primärzellkulturen	61
5.3.1	Korrelation mit anderen Tumormerkmalen	62
5.4	Permanente Zellkulturen	62
5.4.1	Ammoniumchlorid-stimulierte Zellkulturen	64
6	Ausblick	66
7	Zusammenfassung	68

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ad	Gewebeproben von Adenomektomien der Prostata
AMC	Amino-Methylcoumarin (Standard)
Arg-AMC	L-Arginyl-7-Amino-4-Methylcoumarin (Substrat H)
BPH	benigne Prostatahyperplasie
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CPI	Cysteinprotease-Inhibitoren
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung
DTE	Dithiothreitol
ECL	Zellanheftungsmatrix mit Enaktin, Kollagen IV und Laminin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E-64	L-trans-Epoxysuccinyl-Leucylamido(4-guanidino)butan (Inhibitor der Cathepsine B, H, L)
Fa.	Firma
g	Erdbeschleunigung
Int	Intensität
kDa	Kilo-Dalton
KSFM	Keratinocyten Medium, serumfrei
min	Minute
mRNA	Messenger-RNA
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
PAP	prostataspezifische Phosphatase
PC	Gewebeproben maligne veränderter Prostata
PCC	Primärzellkulturen von maligne veränderter Prostata
PCN	Primärzellkulturen von nichterkrankter Prostata

PIN	intraepitheliale Neoplasie der Prostata
PN	Gewebeproben nichterkrankter Prostata
PSA	prostataspezifisches Antigen
PPCC	Medium für primäre Prostatazellkulturen
RPMI 1640	Kulturmedium
s	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TURP	transurethrale Resektion der Prostata
VK	Variationskoeffizient
I	arithmetischer Mittelwert
Z-Arg-Arg-AMC	Benzyloxycarbonyl-L-Arginyl-L-Arginyl-7-Amido-4-Methylcoumarin (Substrat B)
Z-Phe-Arg-AMC	Benzyloxycarbonyl-L-Phenylalanyl-L-Arginyl-7-Amido-4-Methylcoumarin (Substrat L)
Z-Phe-Phe-CHN <sub>2</sub>	Benzyloxycarbonyl-L-Phenylalanyl-L-Phenylalanyl-Diazomethylketon (Hemmstoff Cathepsin L)
z.B.	zum Beispiel
Zy	Gewebeproben von Zystoprostatektomien

# 1 Einleitung und Problemstellung

In der Bundesrepublik Deutschland verstarben im Jahre 1994 107.266 Männer an malignen Erkrankungen [1]. Bei 11.719 von ihnen war die Ursache ein Prostatakarzinom bzw. seine Folgen, das entspricht einer Sterbeziffer von 29,4 je 100.000. Die Inzidenz dieser Erkrankung hat sich in den letzten 15 Jahren verdreifacht. In der Krebsmortalität der Männer steht das Prostatakarzinom damit an 2. Stelle nach bösartigen Neubildungen der Luftröhre, Bronchien und der Lunge [1].

In den USA wird das Prostatakarzinom seit 1994 an erster Stelle der Mortalitätsstatistiken geführt. Für 1997 wurde eine Entdeckungsrate von 33.450 bei einer Mortalität von 41.800 prognostiziert [2]. Die Unterschiede zur Inzidenz in Deutschland sind sowohl auf unterschiedliche diagnostische und therapeutische Strategien, als auch auf besondere geografische und rassische Verteilungsmuster zurückzuführen. So sind Angehörige asiatischer Bevölkerungsgruppen am seltensten betroffen, während der Anteil unter den Afroamerikanern der USA besonders hoch ist. So beläuft sich die Sterbeziffer der kalifornischen Afroamerikaner auf 63 je 100.000 [3].

Zu den seit langem bekannten Risikofaktoren zählen Alter, Rassenzugehörigkeit und positive Familienanamnese. Neue Studien haben jedoch auch einen Zusammenhang zwischen Inzidenz und einer stattgehabten Vasektomie (Sterilitätseingriff) und Ernährungsgewohnheiten, vor allem Fettkonsum, gezeigt [4]. In den nächsten Jahren wird die Anzahl der Neuerkrankungen weiter steigen, was unter anderem auf den immer größer werdenden Teil der älteren Bevölkerung zurückzuführen ist. Damit wird die Bedeutung dieses Karzinoms, nicht nur für das Gesundheitssystem, deutlich.

Die Diagnostik des Prostatakarzinoms hat in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. Parameter wie histologische Merkmale, Tumolvolumen, Systeme zum Grading des Tumors (z.B. nach Gleason) und Tumormarker (PAP, PSA), sowie digitale rektale Palpation und transrektaler Ultraschall werden zur Tumorklassifizierung und -diagnostik genutzt [5]. Tumormarker dienen sowohl zur Früherkennung, als auch zur Kontrolle der Therapie [6].

Alle diese Parameter erlauben jedoch keine zuverlässige Aussage hinsichtlich der Prognose der Krankheit.

Man unterscheidet inzwischen drei verschiedene Arten des Prostatakarzinoms: eine latente Form, die als harmlos eingestuft wird, eine progressive Form, die mit Fortschreiten der Erkrankung klinisch symptomatisch wird und zum Tode führen kann und eine hochmaligne Form, die so progredient ist, daß sie in den meisten Fällen zum Tod führt [7]. Mit Vorsorgeuntersuchungen kann man die Erkrankung als solche feststellen, aber nicht zwischen den drei Formen differenzieren. Unabhängige prognostische Marker würden hier auch hinsichtlich der Therapieplanung eine sinnvolle Ergänzung bilden.

Weitestgehend unklar bleiben auch die biochemischen Mechanismen, die zu Bildung und Ausbreitung des Tumors führen. Bekannt ist, daß das Wachstum eines Tumors gewisse Mechanismen erfordert, an denen proteolytische Enzyme maßgeblich beteiligt sind [8]. Die Möglichkeit der Ausbreitung eines malignen Prozesses ist an die vorherige Überwindung natürlicher Barrieren gebunden. Die von uns untersuchten Cathepsine sind in der Lage, Komponenten der extrazellulären Matrix und Basalmembranen zu zerstören, außerdem können sie andere Enzyme aktivieren, indem sie auf ihre Vorstufen einwirken und so eine proteolytische Kaskade auslösen [9-12].

Aufgrund dieser Fakten untersuchte man Proben aus karzinomatösem und normalem Gewebe und verglich beide miteinander. Erhöhte Cathepsinwerte im Tumorgewebe fand man u.a. bei Brust-, Lungen-, Magen-, Darm-, Harnblasen- und Hautkrebs.

Einen Überblick gibt Tabelle 1.

**Table 1** Überblick über die Cathepsine B, H, L und Cysteinprotease-Inhibitoren (CPI) in Gewebeproben verschiedener maligner Tumore des Menschen.

↑ dient als Symbol für erhöhte Aktivität, vermehrte immunhistochemische Anfärbung bzw. vermehrten Gehalt an mRNA. ↓ symbolisiert verminderte Aktivität, mRNA, immunhistochemische Anfärbung bzw. inhibitorische Kapazität. Nicht untersuchte Parameter sind mit – gekennzeichnet, n.s. bedeutet, daß der Unterschied zwischen normalem und Tumorgewebe statistisch nicht signifikant war.

Maligne Tumore	Cathepsin B	Cathepsin H	Cathepsin L	CPI	Literaturstellen
Kopf-Halsbereich	↑	↓	↑	n.s.	[13,14]
Gehirn (Gliome)	-	-	↑	↓	[15,16]
Schilddrüse	↑	-	↑	-	[17]
Brustdrüse	↑	↑	↑	↓	[18-25]
Lunge	↑	-	-	-	[26-29]
Magen	↑	-	↑	-	[30-32]
Kolon, Rektum	↑	n.s.	↑	=	[33-40]
Harnblase	↑	-	-	-	[41]
Gebärmutterhals	↑	-	-	-	[42]
Niere	↓	-	↑	-	[28,43]
Prostata	↑	-	-	↓	[44,45]
Haut (Melanom)	↑	-	↑	-	[46,47]

Die Beteiligung der Cathepsine am Tumorgeschehen der Prostata ist noch weitestgehend unbekannt [48].

Die Aktivität der Cathepsine wird unter physiologischen Bedingungen von endogenen Inhibitoren kontrolliert- Cystatine, Stefine und Kininogene [49], zusammengefaßt unter dem Begriff CPI (Cysteinprotease-Inhibitoren). Eine erhöhte Enzymaktivität kann auch als Folge einer verminderten Konzentration dieser Hemmstoffe auftreten. Bisher sind CPI, vor allem in Zusammenhang mit Cathepsinen, kaum untersucht worden.

Aus diesen Angaben leiteten wir folgende Fragestellung ab:

- Gibt es Unterschiede in der Aktivität der Cathepsine B, H, L zwischen Tumorgewebe und normalem Gewebe ?
- Wie verhalten sich die endogenen Inhibitoren dazu ?
- Sind die Ergebnisse der Gewebeproben der Prostata mit Primärzellkulturen, etabliert aus dem gleichen Gewebe, vergleichbar ?
- Ist die Sekretion von Cathepsinen und CPI aus Zellen provozierbar ?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Cathepsingehalt und histopathologischen Tumormerkmalen (Grading) oder der Stadieneinteilung (Staging) ?

## 2 Theoretischer Teil: Cathepsine B, H, L und ihre Inhibitoren

### 2.1 Eigenschaften, Synthese und Vorkommen der Cathepsine B, H, L

Die Cathepsine bilden eine große Gruppe ubiquitär vorkommender lysosomaler Enzyme.

Proteolytische Enzyme werden nach den katalytischen Zentren in 4 Klassen unterteilt: Serin-, Cystein- (auch Thiol-), Aspartyl- und Metalloproteinasen. Die Cathepsine B, H und L gehören zur Cysteinproteasen-Familie [50].

Der Begriff Cathepsin hat seinen Ursprung im Griechischen (kathepsein- verdauen, zerkochen) und wurde im Jahre 1929 von Willstätter und Baumann geprägt.

Man hat Cathepsine in fast allen Geweben des menschlichen Körpers nachgewiesen. Besonders hohe Konzentrationen fand man in Niere, Milz, Leber und Makrophagen [51]. Das erklärt sich aus der Beteiligung dieser Organe am Proteinkatabolismus. Hauptfunktion der Cathepsine ist der intrazelluläre Proteinstoffwechsel. Gealterte bzw. unbrauchbare Eiweißmoleküle werden dabei außerhalb der Zelle von Serin- und Metalloproteasen gespalten und nach Einschleusung in die Zelle von den lysosomalen Cathepsinen völlig katabolisiert.

Die Synthese der Cathepsine erfolgt zunächst als Präproform an den membrangebundenen Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums. Unter Abspaltung einer Signalsequenz gelangen sie in den Golgi-Apparat. Die N-terminale Glykosilierung, die im endoplasmatischen Retikulum beginnt, wird im Golgi-Apparat weiter modifiziert. Oligosaccharide, die mit den Enzymen verbunden sind, enthalten Mannose-6-Phosphatgruppen, die wichtig für die Aufnahme in die Endosomen über spezielle Mannose-6-phosphat-Rezeptoren sind. Diese Bindung an die Rezeptoren ist wichtig, weil dadurch die Glykoproteine in die Endosomen geleitet werden, die nach Ansäuerung zu Lysosomen reifen. Während dieser Reifung werden Cathepsine und andere Glykoproteine vom Rezeptor getrennt, der dann im Golgi-Apparat zurückgewonnen (recycelt) wird. Es gibt jedoch auch eine rezeptorunabhängige Form der Cathepsine, die an die Plasmamembran gebunden ist und sezerniert werden kann [34]. In welcher Weise die in den Lysosomen

gespeicherten Vorstufen der Cathepsine aktiviert werden, ist weitestgehend unbekannt. Man hat jedoch gefunden, daß Proformen der Cathepsine B, H und L im sauren Milieu autoaktiviert werden. Cathepsin D, eine Aspartylprotease, funktioniert

außerdem als Konversionsenzym für diese Cysteinproteasen [34,52].

Die molekulare Struktur (cDNA) der Formen B, H und L wurden bei mehreren Spezies untersucht [53]. Dabei fielen zahlreiche strukturelle Homologien untereinander und mit der pflanzlichen Protease Papain auf. Man nimmt deshalb einen gemeinsamen evolutionären Ursprung an. Die DNA- und Aminosäuresequenzen weisen vor allem im Bereich der aktiven Zentren Ähnlichkeiten auf [54,55]. Das Genom dieser drei Proteasen ist jedoch nicht auf einen Ort beschränkt, sondern auf jeweils verschiedene Chromosomen verteilt. Das Gen für Cathepsin B findet sich auf dem Chromosom 8, für Cathepsin H auf 15 und für Cathepsin L auf Chromosom 9 [56-58].

Gemeinsamkeiten finden sich auch in den biochemischen Eigenschaften, die in Tabelle 2 zusammengefaßt sind.

Tabelle 2 Biochemische Charakteristika der Cathepsine B, H und L, zusammengestellt aus mehreren Arbeiten [59-61].

Angegeben sind Molekulargewicht, die Anzahl der Aminosäuren (AS), aus denen das reife Enzym besteht, pH-Optimum und die Punkte der isoelektrischen Fokussierung (pI).

	Cathepsin B (EC 3.4.22.1)	Cathepsin H (EC 3.4.22.16)	Cathepsin L (EC 3.4.22.15)
Molekulargewicht Proformen (kDa)	39	41	39
Reifes Enzym (kDa)	29, 25+5	28, 24	29, 22
Anzahl AS	254	220	221
pH-Optimum	6,0-6,2	5,5-6,8	4,0-6,0
pI	4,9-5,3	6,0; 6,4	5,8; 6,1

Die höchste Aktivität erreichen die Cathepsine bei sauren pH-Werten. Unter neutralen und basischen Bedingungen sind sie instabil aufgrund irreversibler Veränderungen ihrer Tertiärstruktur. Eine Erklärung für dieses pH-Optimum ist eine Anpassung an die Funktion, vorwiegend im sauren Milieu der Lysosomen katalytisch zu wirken. Es kann sich aber auch um einen Schutzmechanismus für die umliegenden Zellen und Gewebe vor freigesetzten Enzymen handeln.

Cathepsin H unterscheidet sich im Mechanismus der proteolytischen Aktivität von den beiden anderen. Allen gemeinsam ist die Endopeptidase-Aktivität, d.h. ein Eiweißmolekül wird zerlegt, indem die Bindungen im Inneren des Moleküls gespalten werden. Cathepsin H agiert zusätzlich dazu auch als Exopeptidase, indem es das Protein von seinem Ende her aufspaltet.

## 2.2 Biologische Funktionen der Cathepsine

Proteine bilden mengenmäßig die wichtigste Gruppe der Biomoleküle. Ein 70 kg schwerer Mensch enthält ca. 10 kg Eiweiß, das meiste in Form der Muskulatur. Man schätzt, daß täglich bis zu 400 g dieser Proteine zu Aminosäuren abgebaut und die gleiche Menge neu synthetisiert wird [62].

Der Auf- und Abbau von Proteinen und Peptiden bilden die Basis vieler physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge. Diese Prozesse werden von proteolytischen Enzymen katalysiert. In einer Regulierung zu höheren bzw. niedrigeren Aktivitäten (up/down regulation) spiegeln sich Adaptationsvorgänge, aber auch sich entwickelnde oder bereits manifeste Erkrankungen wider.

Die Hauptfunktion der lysosomalen Proteasen ist es, die Homöostase zwischen Eiweißaufbau und -abbau aufrechtzuerhalten. In den Lysosomen werden Stoffe abgebaut, die durch Pinozytose oder Phagozytose ins Zellinnere aufgenommen wurden, sowie auch zelleigene Organellen (Zytolysosomen).

Die Cathepsine B, H und L sind mit ihren Endo- und Exoprotease-Aktivitäten am Abbau von Proteinen beteiligt. Die verschiedenen hohen Konzentrationen in den einzelnen Geweben sind Ausdruck der Spezialisierung zellulärer Funktionen bzw. des Vorhandenseins unterschiedlicher Substrate.

Neben der unspezifischen Proteolyse besitzen Cathepsine auch die Fähigkeit zur limitierten Abspaltung von Enzymanteilen, die dann zu biologisch aktiven Proteinen und Hormonen führt. Takahashi et al. [63] konnten zeigen, daß Cathepsin B Prorenin in aktives Renin umwandelt.

Cathepsine sind jedoch auch an pathophysiologischen Vorgängen beteiligt, z.B. an degenerativen und entzündlichen Prozessen. Bei der Alzheimerschen Krankheit ist die lysosomale Protease Cathepsin S im Hirngewebe erhöht und am Abbau der Neurone beteiligt [64,65]. Cathepsin L ist beteiligt am Abbau von Knochen [66]. Beim Krankheitsbild der polyzystischen Niere zeigte sich, daß die Cathepsine B, H und L in den proximalen Tubuli vermindert waren, weil sie vermehrt sezerniert wurden. Die so freigesetzten Cathepsine sind wahrscheinlich an der Bildung der Zysten beteiligt [67]. Beispiele für entzündliche Erkrankungen sind Pankreatitis, Parodontose [68], Glomerulonephritis und rheumatoide Arthritis [69,70] sowie die Multiple Sklerose [71].

## 2.3 Regulation der Enzymaktivität

Für viele Proteasen, vor allem solche mit limitiertem proteolytischen Potential, besteht die Regulation in der Balance zwischen der Menge des aktiven Enzyms und der Menge aktiver Inhibitoren.

Die proteolytische Aktivität der Cysteinproteasen wird neben dem Faktor der Genexpression bei der Proteinbiosynthese durch mehrere andere Mechanismen kontrolliert [50,59,72,73].

1. **pH-Wert.** Bei neutralen pH-Werten sind die Cysteinproteasen instabil und nur schwach aktiv. Optimale Funktion erreichen sie im sauren Milieu der intrazellulären Vesikel.
2. **Redoxpotential.** In reduzierender Umgebung wird das Cystein des aktiven Zentrums schnell oxidiert und trägt zur enzymatischen Aktivität bei. Endosomen akkumulieren Cystein, um diese Umgebung aufrechtzuerhalten.
3. **Synthese als inaktive Proform.** Alle Enzyme benötigen eine proteolytische Aktivierung, d.h. die Abspaltung eines Teils des Moleküls. Dieser Schritt setzt einen sauren pH-Wert voraus und verhindert damit eine Aktivierung versehentlich sezernierter Vorstufen.

**4. Endosomen und Lysosomen als Kompartimente der Enzyme.** Alle bekannten Enzyme sind glykosiliert und besitzen einen Mannoserest, der mit dem Rezeptor der Lysosomen eine Bindung eingeht. Somit gelangen sezernierte Enzyme in ihr vorbestimmtes Kompartiment.

**5. Anwesenheit von Cysteinprotease-Inhibitoren (CPI).** Die o.g. Faktoren dienen dazu, die Kompartimentierung der Cysteinproteasen zu kontrollieren. Die Inhibitoren sind vor allem im Zytoplasma und Extrazellulärraum vorhanden und scheinen vorwiegend die Funktion zu haben, die Enzyme zu hemmen, die außerhalb des Kompartiments gelangt sind.

## 2.4 Charakterisierung der Cysteinprotease-Inhibitoren

Die vermutlich ersten Daten über spezifische Inhibitoren zellulärer Proteasen stammen von Finkelstaedt (1957), der einen hitzestabilen Inhibitor des Cathepsin B aus Rattenleberzytosol isolierte. Barrett machte 1981 den Vorschlag, ein aus Hühnereiweiß isoliertes Protein, das ebenfalls Cathepsin B hemmt, Cystatin zu benennen, da es spezifisch Cysteinproteasen inhibiert [49]. Die Aminosäuresequenz des Cystatin ist seit 1983 bekannt [74]. Die Isolierung und Charakterisierung weiterer Inhibitoren aus verschiedenen Geweben zeigte Ähnlichkeiten zum Cystatin in den physikochemischen Eigenschaften und im Molekulargewicht um 12 kDa. Alle bis jetzt bekannten CPI gehören zur Oberfamilie der Cystatine und haben zahlreiche gemeinsame Merkmale.

### 2.4.1 Vorkommen, Eigenschaften und Struktur

Man unterteilt die Inhibitoren in 4 Familien: zur ersten gehören die Stefine, die zweite beinhaltet die Cystatine, die dritte bilden die Kininogene und die letzte Cystatin- verwandte Proteine (z.B. C-Ha-ras-Onkogen p21) [75]. Die Gene für die Cystatinfamilie sind auf Chromosom 20 lokalisiert, alle anderen auf dem Chromosom 3 [10].

Stefine sind einkettige Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 11 kDa. Sie bestehen aus 98 Aminosäuren und besitzen weder Kohlenhydratanteile noch Disulfidbrücken. Gegenüber alkalischen pH-Werten und Hitze sind sie extrem stabil. Hohe Konzentrationen fand man in epithelialen Zellen, polymorph-kernigen Leukozyten, Lymphozyten und im Zytosol von Leber, Milz, Plazenta und Uterus. Ihr Vorkommen in Epithelien und Leukozyten legt die Vermutung nahe, daß sie primär eine Verteidigung gegen Cysteinproteasen darstellen, die von invadierenden Mikroorganismen sezerniert werden. Zwei Angehörige dieser Gruppe sind Stefin A und B [76,77].

Die Cystatine der Familie II bestehen aus 115-120 Aminosäuren und haben Molekulargewichte zwischen 13 und 14 kDa. Ihre Struktur weist zwei Disulfid-brücken nahe dem carboxyterminalen Ende auf. Aber auch sie sind bis auf eine Ausnahme nicht glykosiliert. Man hat Cystatine in relativ hohen Konzentrationen in verschiedensten Körperflüssigkeiten nachgewiesen, jedoch nicht in Ge-weben. Der Gehalt in Tränenflüssigkeit, Speichel und Plasma ist mit der Regu-lation und Abwehr eigener und fremder Cysteinproteasen erklärbar. Unbekannt bleibt die Funktion der Cystatine in Samenflüssigkeit, Liquor cerebrospinalis, Amnion, Muttermilch und Synovialflüssigkeit. Cystatin C und S sind zwei Beispiele aus dieser Familie [77].

Kininogene sind zirkulierende multifunktionelle Proteine, die in der Leber synthetisiert und an das Blutplasma abgegeben werden. Man unterscheidet niedrigmolekulare (50-68 kDa) von hochmolekularen (88-114 kDa) Formen. Hohe Konzentrationen findet man im Blutplasma und in der Gelenkflüssigkeit. Neben der Inhibition von Proteasen sind sie bekannt als Vorstufen der vasoaktiven Kinine und der Beteiligung an der Gerinnungskaskade [77].

CPI üben eine reversible Hemmung der Cysteinproteasen aus, indem sie das aktive Zentrum blockieren. Die Inhibition erfolgt im Verhältnis 1:1, d.h. ein Cystatinmolekül hemmt ein Molekül der jeweiligen Protease. Cystatin C ist der universellste und stärkste Hemmstoff aller Cysteinproteasen, inklusive der lysosomalen. Die Stefine A und B zeigen Bindung zu Cathepsin B, H und L. Die Kininogene hemmen Cathepsin L am stärksten, H weniger und B kaum.

Die Cystatine der Familien I und II sind unter extremen pH-Werten und hohen Temperaturen sehr stabil. Kininogene hingegen werden bei pH-Werten unter 4 und Temperaturen über 50°C instabil [77].

## 2.4.2 Rolle der Cysteinprotease-Inhibitoren bei pathologischen Prozessen

Man hat die Konzentrationen der Cystatine bei verschiedenen pathologischen Prozessen untersucht. Sie sind beteiligt an entzündlichen, infektiösen und malignen Erkrankungen.

Eine Punktmutation des Cystatin C ist verantwortlich für eine autosomal dominant vererbte Erkrankung von Isländern, der hereditären Cystatin-C-Amyloid-Angiopathie (HCCAA). Dabei kommt es zur Ablagerung des mutierten Cystatins in fast allen Geweben, einschließlich der Zerebralarterien. Dies führt zu massiven Hirnblutungen, die meist zum Tod der unter 40-jährigen Patienten führen [75]. Auch in den Plaques der Alzheimerschen Erkrankung fand sich Cystatin C als Bestandteil [64].

Bei entzündlichen Prozessen, wie der Parodontose fand man erhöhte Konzentrationen der im Speichel sezernierten Cystatine als Ausdruck der Erhöhung des protektiven Potentials gegenüber Cathepsinen, die Gewebe und Knochen zerstören [68]. Auch bei entzündlichen Gelenkerkrankungen fand man sowohl erhöhte Werte von Cathepsin B als auch Cystatin C [70].

Für die Replikation von Viren ist die Aufnahme von Präkursorproteinen notwendig, um neue Viruspartikel zu replizieren. Cysteinproteasen sind an dieser Aufnahme beteiligt. Werden sie durch Cystatine gehemmt, verringert sich die Virusproduktion in polioinfizierten Zellen [75]. Daraus ergibt sich die Möglichkeit eines antiviralen Chemotherapeutikums.

Eine praktische Anwendung der Cystatin-C-Konzentration ergibt sich bei der Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate. Als niedrigmolekulares Protein wird Cystatin C durch glomeruläre Filtration eliminiert. Man fand, daß die Serumkonzentration des Cystatins konstanter ist als die des Kreatinins und nur ansteigt, wenn sich die glomeruläre Filtrationsrate verschlechtert [78,79].

## 2.5 Rolle der Cathepsine und ihrer Inhibitoren bei malignen Erkrankungen

Die Entwicklung maligner Tumoren ist durch drei Schritte charakterisiert: neoplastische Transformation, Invasion durch Tumorzellen und Metasta-

sierung [80]. Die Beteiligung der Cysteinproteasen an diesen Vorgängen ist bereits in mehreren Studien ausführlich untersucht worden (s. Tab. 1).

Die Invasion durch Tumorzellen beinhaltet notwendigerweise die Überwindung natürlicher Barrieren, wie der Basalmembran und der extrazellulären Matrix.

Die Basalmembran bildet eine Grenzfläche zwischen Epithelien bzw. Epithelium und Bindegewebe, bestehend aus Kollagen (Typ IV), Glykoproteinen (Laminin, Fibronectin, Enaktin) und sauren Proteoglykanen (Heparansulfat). Guinec et al. [11] zeigten, daß die Cathepsine B, H und L in der Lage sind, Kollagen IV, Laminin und Fibronectin unter Bedingungen eines neutralen pH-Werts abzubauen. Neben der direkten Einwirkung setzen sie außerdem aus dem endogenen Fibronectin Enzyme wie Kollagenase und Gelatinase frei, die zusätzlich zur Zerstörung der Basalmembran beitragen.

Werle et al. [29] untersuchten Cathepsin B bei verschiedenen hohen pH-Werten und fanden neben dem typischen Optimum bei 6,0 noch 2 Gipfel bei 4,5-5,5 und beim physiologischen pH von 7,0-7,5. Damit zeigt sich, daß Cathepsin B auch außerhalb des lysosomalen Milieus aktiv ist und eventuell von Tumorzellen sezerniert wird. Dafür spricht auch, daß die bei physiologischen pH-Wert aktive Fraktion mit der postoperativen Überlebensrate korrelierte und dort als Prognosefaktor gewertet wurde [29].

Die extrazelluläre Matrix, auch Interzellulärsubstanz, füllt den Raum zwischen den Zellen. Kollagene sind verantwortlich für die Stabilität. Ankerproteine sind Laminin, Fibronectin und Elastin. Weitere Bestandteile sind Proteoglykane und Hyaluronsäure, die die Grundsubstanz bilden. Diese Strukturen muß die Tumorzelle auf ihrem Weg der Invasion ebenfalls durchdringen [9]. Die Beteiligung der Cysteinproteasen wies man mittels immunhistochemischer Methoden nach. So beschreiben Weiss et al. [41] Cathepsin B an der Fläche zwischen Tumor und noch gesundem Gewebe. Im Vergleich einer invasiven mit einer nichtinvasiven Zelllinie zeigten sich folgende Unterschiede: die nicht invasiv wachsenden Tumoren waren von intaktem Laminin umgeben, Cathepsin B war auf die Lysosomen beschränkt und zumeist als Proenzym vorhanden. Die invasive Zelllinie zeigte ausgereiftes Enzym, das plasmamembran-gebunden war und das umliegende Laminin zerstörte.

Das Überwiegen dieser proteolytischen Vorgänge, besonders an den Rändern primär invasiv wachsender Tumoren, führt zum Verlust der dreidimensionalen

Gewebestruktur. Der entstandene Defekt und die exzessiven proteolytischen Vorgänge könnten Ursache der Ausschüttung angiogener Zytokine und Wachstumsfaktoren sein, die zum weiteren Tumorwachstum beitragen [81].

Der Metastasierungsvorgang ist ein kontinuierlicher Prozeß, der mit der Proliferation des Primärtumors beginnt und mit dem Wachstum von Metastasen den Kreis schließt. Ein notwendiger Schritt auf diesem Weg ist die Neubildung von Gefäßen und die drei Schritte der Invasion: Adhäsion, lokale Proteolyse und die Migration von Tumorzellen [82]. Nachdem sich die Tumorzelle angelagert hat, wird die Auflösung der Basalmembran durch Enzyme vollzogen, die von der Tumorzelle selbst oder von ihr stimulierten umliegenden Zellen sezerniert werden. Dem folgt die Translokation der Tumorzelle.

Die erhöhten Cathepsinwerte, bedingt durch vermehrte intrazelluläre Produktion, Sekretion oder intrazelluläre Umverteilung, führen zu einer Erhöhung der Cathepsinkonzentration in Tumoren. Der Nachweis erhöhter Werte wurde in Geweben, Zellkulturen und anderen Körperflüssigkeiten wie Blut [83-85], bronchoalveolärer Lavage [86] und Urin [87] durchgeführt.

Man fand erhöhte Werte der Cathepsine B, H und L in Tumorgeweben von Brust-, Magen-Darm-, Kopf-Hals-, Lungen-, Kolorektal- und Hautkrebs (s. a. Tab. 1). Erhöhte Cathepsin-B-Konzentrationen fand man auch im Plasma von Patienten mit septischen Schock [85] und im Serum und Urin von Patienten mit Fernmetastasen gastrointestinaler Tumore [87].

Es gibt jedoch auch gegensätzliche Ergebnisse. Kos et al. [14] berichten, daß die Konzentration von Cathepsin H bei Patienten mit Tumoren im Kopf- Halsbereich im Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Gewebe niedriger ist.

Werle et al. [28] fanden eine ähnliche Relation bei Nierentumoren, diskutierten dieses Ergebnis jedoch nicht weiter. Die Arbeitsgruppe um Kirschke veröffentlichte kürzlich eine Studie über den Gehalt der Cathepsine B, H, L, C und S im Gewebe von Nierenzellkarzinomen [88]. Dabei waren die Konzentrationen der Cathepsine B, H, L und C im Tumorgewebe signifikant geringer als im normalen Parenchym.

In mehreren Arbeiten wurde der Versuch unternommen, die ermittelten Cathepsinwerte mit klinischen Parametern, wie dem histopathologischen Grading oder dem TNM-System zu korrelieren.

Benitez-Bribiesca et al. [18] fanden bei 73 untersuchten Proben von Mammakarzinompatienten eine direkte Korrelation zwischen Cathepsin-B-Gehalt und den klinischen Stadien I-III. Budinha et al. [19] fanden, daß Cathepsin B, vergleichbar mit dem Status befallener Lymphknoten, ein unabhängiger prognostischer Faktor des Mammakarzinoms ist. Campo et al. [33] untersuchten die Korrelation von Cathepsin-B-Konzentration und Überlebenszeit der Patienten bei kolorektalen Karzinomen. Patienten mit hohen Cathepsin-B-Werten hatten eine verringerte Überlebenszeit.

Da die Aktivität der Cysteinproteasen von den endogenen Inhibitoren geregelt wird, kann auch ein verschobenes Gleichgewicht zwischen Enzym und Hemmstoff zur Invasivität des Tumors beitragen. Bisher gibt es nur wenige Studien, in denen beide Parameter bestimmt wurden. Zudem sind diese Aussagen widersprüchlich. Lah et al. [23] fanden in 50 untersuchten Gewebe-proben von Mammakarzinompatienten bei 2/3 eine geringere CPI-Aktivität im Tumorgewebe, während der Rest höhere CPI-Werte zeigte. Cathepsin-B- und L-Aktivitäten waren im Tumorgewebe signifikant erhöht.

Sheahan et al. [36] fanden keine Unterschiede im CPI-Gehalt von tumorösen und normalen Proben kolorektalen Gewebes. Auch Kos et al. [14] und Budinha et al. [13] fanden im Gewebe von Tumoren im Kopf-Halsbereich keinen Unterschied zwischen normalem und Tumorgewebe.

## 2.6 Cathepsine in Prostatagewebe und Zellkulturen

Bisher gibt es nur wenige Untersuchungsergebnisse über die Aktivität der Cysteinproteasen in der Prostata.

Eine Medline-Recherche, mit der Suchstrategie „cathepsins and prostatic neoplasms“ (Thesaurus), über den Zeitraum 1966-10/1997 ergab 11 Treffer. Die meisten Arbeiten nutzten immunhistochemische Methoden, um den Cathepsingehalt der Zellen darzustellen.

Sinha et al. [89] untersuchten formalinfixierte Schnitte benigner Prostatahyperplasien (BPH), intraepithelialer Neoplasien (PIN) und Adenokarzinomen. Die malignen Veränderungen zeigten eine Umverteilung des Enzyms an die basale und luminale Plasmamembran, während BPH-Proben vorwiegend lysosomale Anfärbungen aufwiesen. Außerdem fand sich Cathepsin B in Kollagen- und glatten

Muskelfasern nahe der Kapillaren. Dies weist auf ein Austreten des Enzyms im neoplastisch veränderten Gewebe hin. Die Dichte von Kapillaren war im Vergleich zur benignen Prostatahyperplasie um das 2-3 fache vermehrt. In einer anderen Arbeit dieser Gruppe untersuchte man die Verteilung des Cathepsin B in normaler, hyperplastischer und neoplastischer Prostata [90]. Die Synthese des Enzyms wurde in den epithelialen Zellen nachgewiesen. Während in normaler und hyperplastisch veränderter Prostata Cathepsin B in den azinären und kuboiden/Säulenzellen vorhanden ist, fand sich in der neoplastischen Prostata Cathepsin B meist in den kuboiden und in den Gruppen invasiver Zellen. Sinha et al. [44] fanden auch eine Korrelation zwischen der Intensität der immunhistochemischen Anfärbung des Cathepsin B und dem histologischen Gleason Score. Mit zunehmender Entdifferenzierung des Gewebes stieg auch der Enzymgehalt an.

Shuja et al. [37] untersuchten den Gehalt von Cathepsin B und L in Proben 17 verschiedener Gewebe. Die Cathepsin-B-Werte wurden in drei Gruppen unterteilt: hohe, mittlere, niedrige Aktivität, die des Cathepsin L in 2 Gruppen. Die Prostata findet sich in beiden Fällen in den Gruppen mit niedriger Enzymaktivität.

Außerdem gibt es noch Studien über den Cathepsin-D-Gehalt (Aspartylprotease) der Prostata mit verschiedenen Methoden [91-94].

Ebenfalls immunhistochemisch untersuchten Söderström et al. [45] normale, hyperplastische und neoplastische Gewebeproben der Prostata auf ihre Verteilung von Cystatin A. Die vorwiegend basale Verteilung bei der normalen Prostata war in BPH-Proben vermindert und mehr fokal ausgeprägt, während die malignen Anteile der Adenokarzinomproben gar keine Färbung zeigten.

Bisher gibt es keine Studie über die von uns untersuchten Cathepsine in Zusammenhang mit ihren hitzestabilen Inhibitoren.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Patientengruppen

Alle Gewebeproben stammten von Patienten der Klinik für Urologie der Charité. Die Nutzung dieser Gewebeproben für Forschungszwecke wurde von der Ethikkommission der Charité gebilligt.

#### 3.1.1 Prostatakarzinompatienten

Insgesamt wurden jeweils zwei Gewebeproben von 15 Patienten entnommen. Das Durchschnittsalter dieser Gruppe lag bei 63,8 Jahren, im Bereich von 55 bis 70 Jahren. Nach der TNM-Klassifikation [95] hatte 1 Patient Stadium T 1, 9 Patienten T 2, 5 Patienten T 3. Bei allen war der Lymphknotenstatus (N) negativ und auch Fernmetastasen (M) wies keiner der Patienten zum Zeitpunkt der Operation auf. Das histologische Grading (Differenzierung des Gewebes) ergab folgende Verteilung: zwei mal G 1, 8 mal G2 und 5 mal G 3. Es handelte sich in allen Fällen um Adenokarzinome.

#### 3.1.2 Adenomektomiepatienten

Von 9 Patienten, die sich einer Adenomektomie unterzogen, wurden Proben entnommen. Das Durchschnittsalter dieser Gruppe lag bei 71,2 Jahren, im Bereich von 63 bis 81 Jahren.

#### 3.1.3 Patienten mit transurethraler Resektion der Prostata

Die 6 Patienten von denen Material durch transurethrale Resektion der Prostata gewonnen wurde, hatten ein Durchschnittsalter von 69,8 Jahren im Bereich von 64 bis 76 Jahren.

### 3.1.4 Patienten mit Zystoprostatektomien

Den Patienten dieser Gruppe wurde die Prostata im Rahmen einer Zystoprostatektomie aufgrund eines Blasenkarzinoms entfernt. Das Durchschnittsalter der 6 Patienten lag bei 60 Jahren, im Bereich von 44 bis 67 Jahren.

### 3.2 Materialgewinnung und Lagerung

Alle Proben wurden sofort nach Entfernung der Prostata entnommen. Die Schnittländer in der Prostata wurden mit farbiger Tusche markiert, so daß entnommene Proben genau zugeordnet werden konnten. Durch die histopathologische Untersuchung wurde abgesichert, daß das Probenmaterial aus dem malignen bzw. nichttumorösen Anteil der Drüse stammte. Anschließend wurden die Gewebeproben in flüssigem Stickstoff bis zur Präparation eingefroren oder sofort zur Anzucht von primären Zellkulturen genutzt.

### 3.3 Aufbereitung der Gewebeproben

Insgesamt wurden 41 Gewebeproben analysiert. Gewebe der Prostatakarzinompatienten wurde in Paaren untersucht: 10 Proben des Tumorgewebes (PC) und jeweils Anteile des zugehörigen nichttumorösen Gewebes (PN). Die restlichen 21 Proben stammten von benignen Läsionen der Prostata: 9 Proben von Adenomektomien (Ad), 6 Proben von Zystoprostatektomien (Zy) aufgrund eines Blasenkarzinoms und 6 Proben von transurethralen Resektionen der Prostata (TURP).

Zur Extraktion der Enzyme nutzten wir eine Tritonextraktion. Dafür wurden die Gewebeproben (~30-50 mg) aufgetaut, zerkleinert und in einen Wheaton-Homogenisator gegeben. 150 µl einer 10 mmol/l  $\text{CaCl}_2$ -Lösung, die 0,25 % Triton X-100 enthielt wurden hinzugefügt. Nach sorgfältiger Homogenisierung wurde dieses Gemisch in Eppendorf-Röhrchen (1,5 ml) überführt. Der Homogenisator wurde 2 mal mit 150 µl der  $\text{CaCl}_2$ -Lösung nachgespült und dieser Homogenatrest mit dem bereits gewonnenen Homogenat vereinigt. Anschließend wurde bei 4°C und

23.100x g für 15 Minuten in einer Zentrifuge (Fa. Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Der Niederschlag wurde, wie vorangehend beschrieben, noch einmal mit Tritonlösung extrahiert und zentrifugiert. Beide Überstände wurden vereinigt und dienten zur Eiweiß-, Enzym- und Inhibitorbestimmung.

### 3.4 Vorbereitung der Zellkulturen

#### 3.4.1 Kulturmedien und Materialien

Die Kulturmedien RPMI-1640 und KSFM (Keratinocyten-Serumfreies-Medium; cat.no. 17005-34; mit 5 µg/l epidermalem Wachstumsfaktor und 50 mg/l Rinderhypophysenextrakt), sowie Trypsin/EDTA Lösung (0,05 %, 0,02 %) und Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS; cat.no. 14190) bezogen wir von der Firma Gibco Life Technologies (Eggenstein). Dem KSFM Medium wurden zugesetzt: Rinderserumalbumin (Endkonzentration 250 mg/l; Behring AG, Marburg), Transferrin (10 mg/l von Boehringer), Dihydrotestosteron (5 µg/l von Sigma), nicht-essentielle Aminosäurelösung (1 %; Gibco, cat.no. 11140-35) und Penicillin/Streptomycin (125 kU bzw. 125 mg/l von Gibco). Dieses diente als Medium für die primären Prostatazellkulturen (PPCC).

Triton X-100, Kollagenase Typ IA (245 units/mg) und fetales Kälberserum von Sigma; Hyaluronidase (1000 units/mg) von Boehringer; Zellanheftungsmatrix (ECL) bestehend aus Enaktin, Kollagen IV und Laminin von Biozol (Echting) wurden benutzt. Falcon-Primaria Kulturflaschen bezogen wir von Becton/Dickinson (Heidelberg) und Plastikkulturflaschen von Costar (Cambridge, MA, USA).

#### 3.4.2 Primärzellkulturen

Aus 5 Paaren zusammengehöriger Gewebeproben (nichtkrankes und Tumorgewebe) wurden Primärzellkulturen nach der Methodik von Cronauer et al. [96] und Peehl [97] angezüchtet.

Dafür wurden ~100 mg Gewebe mit einem Skalpell zerkleinert und in 2 ml PPCC-Medium mit 2 mg Kollagenase und 2 mg Hyaluronidase auf einem Rotator bei 37°C für 16 Stunden inkubiert. Diese Lösung wurde durch ein 100 µm Nylonsieb gegeben und nochmals mit 2 ml PPCC-Medium nachgespült. Dieses Filtrat wurde bei 270x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der so entstandene Niederschlag wurde erneut in 6 ml PPCC-Medium aufgewirbelt und wieder zentrifugiert. Diesem Pellet wurden 4 ml PPCC-Medium mit 50 µg/ml ECL-Lösung zugegeben und in 25 cm<sup>2</sup> Primaria-Kulturflaschen überführt. Die Zellen wurden unter einem angefeuchteten 5 % CO<sub>2</sub>/95 % Luftgemisch bei 37°C inkubiert. Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt und bis zur Konfluenz kultiviert. Daraufhin wurde das Kulturmedium entfernt und die Monolayer zweimal mit 2 ml phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %; 0,02 %) unter mikroskopischer Kontrolle innerhalb von 2-5 Minuten abgelöst. Subkultivierungen wurden im Verhältnis 1:3 durchgeführt. Die resultierenden epithelialen Zellen wiesen die dafür typischen Merkmale auf [97].

### 3.4.3 Permanente Zellkulturen

Die drei von uns untersuchten Zelllinien [98] wurden bereits zwischen 1977 und 1980 entwickelt. Die Etablierung dieser immortalisierten malignen Epithel-zelllinien der Prostata hat seitdem zum Verständnis der Mechanismen des Prostatakarzinoms beigetragen [99,100]. Die nachfolgend beschriebene Stimulierung mit Ammoniumchlorid führten wir in Anlehnung an eine Arbeit von Keppler et al. [52] durch.

Die PC3-Zelllinie wurde 1976 aus der Knochenmetastase eines 62-jährigen Kaukasiers, der an einem Prostatakarzinom erkrankt war, gewonnen [101]. DU145 stammt von der Hirnmetastase eines 60-jährigen Prostatakarzinompatienten ab [102] und die LNCaP-Linie wurde aus der Lymphknoten-metastase eines Prostatakarzinoms gezüchtet [103].

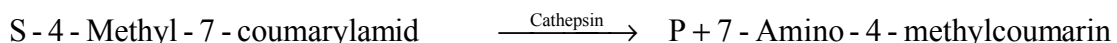
Die Zellen stammen von der American Type Culture Collection. Ihre Anzucht erfolgte in RPMI-Medium, das 10 % fetales Kälberserum, Penicillin und Streptomycin enthielt. PC3 und DU145 wurden in Kulturflaschen der Firma Costar, LNCaP-Zellen in Primaria-Flaschen der Firma Falcon kultiviert.

Nach etwa 3 Tagen war die Semikonfluenz erreicht und das Medium wurde entfernt. Nach zweimaligem Waschen mit RPMI-Medium wurden jeweils 5 Kulturen jeder Zelllinie mit RPMI-Medium, das 10 mmol/l NH<sub>4</sub>Cl enthielt, versetzt, während fünf andere RPMI-Medium ohne Zusatz erhielten. Daraus resultierten je 5 Paare von stimulierten und unstimulierten Kulturen. Vom Medienüberstand wurden nach 24 Stunden 10 ml entnommen, 10 min bei 300x g zentrifugiert und dieser Überstand bei -80°C eingefroren. Die verbleibenden Zellen wurden gewaschen, mit Trypsin/EDTA-Lösung von den Kulturflaschen gelöst, erneut mit RPMI gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Um die Zellen zu lysieren, wurde 1 ml eines 10 mmol/l Natriumphosphatpuffers mit 0,2 % Triton X-100, pH 4,6 dazugegeben, gemischt und für 15 min bei 10.000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bis zur Analyse bei -80°C eingefroren.

### 3.5 Bestimmung der Cathepsine, Cysteinprotease-Inhibitoren und des Proteingehaltes

#### 3.5.1 Testprinzip

Wir benutzten spezifische Substrate für jedes Cathepsin sowie synthetische Hemmstoffe (E-64, Z-Phe-Phe-CHN<sub>2</sub>), um den Substratumsatz durch andere Enzyme zu eliminieren [104,105]. Eine enzymatische Reaktion nach folgendem Schema wurde gestartet und nach genau 20 min wieder gestoppt.



Die endständige Gruppe bei jedem Substrat (S) ist 4-Methyl-7-coumarylamid. Nach der enzymatischen Reaktion wird als Produkt (P) 7-Amino-4-methyl-coumarin freigesetzt- ein Fluorogen. Die Aktivitätsbestimmung wird über die Quantifizierung dieses Produktes vorgenommen.

Die Fluoreszenz ist eine Form elektromagnetischer Strahlung, die beim Übergang eines Moleküls aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand emittiert wird. Ein Teil der Energie wird als strahlungsfreie Energie abgegeben, deshalb hat das Licht der Fluoreszenz eine längere Wellenlänge (kleinere Frequenz, kleinere Energie) als die Strahlung, die zur Anregung benutzt wurde (Stokessche Regel). Damit ein Stoff

fluoreszieren kann, muß er zuerst Licht absorbieren. Im allgemeinen ist die Wellenlänge des emittierten Lichts größer als die des anregenden Lichtes.

Zur Messung der Proben nutzen wir ein Fluoreszenzspektrophotometer der Firma Shimadzu (Abb. 1), in dem die Probe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird und gleichzeitig die dabei auftretende Fluoreszenz für die quantitative Analyse gemessen wird.

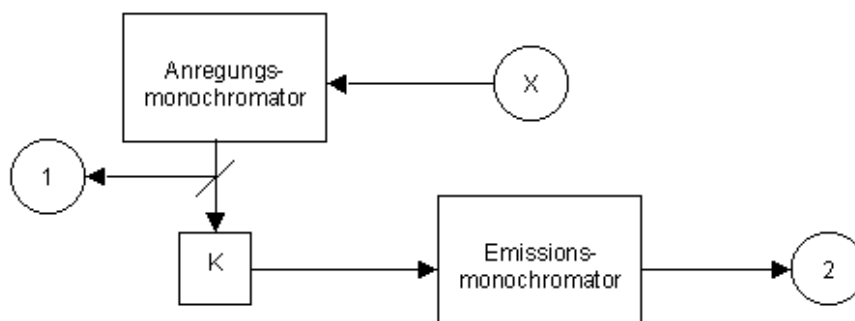


Abb. 1. Schematischer Aufbau des Fluoreszenzspektrophotometers RF-1502.

Im Anregungsmonochromator wird aus dem von der Xenonlampe (X) erzeugten Licht die Ausgangswellenlänge von 370 nm herausgefiltert. Im Kuvettenhalter (K) wird die zu messende Probe eingebracht. Der rechtwinklig zum Anregungsmonochromator angebrachte Emissionsmonochromator zerlegt das von der Probe emittierte Licht ( $\lambda$  460 nm), das dann vom Photomultiplier 2 (2) aufgefangen wird. Die Aufgabe des Monitor-Photomultipliers (1) ist es, Intensitätsschwankungen des Lichts der Xenonlampe zu kompensieren und das Signal/Rauschverhältnis zu verbessern.

### 3.5.2 Aktivitätsbestimmung der Cathepsine B, H und L

Die Bestimmung der Aktivität der Enzyme erfolgte im wesentlichen nach der Methodik von Barrett und Kirschke [106-108].

#### 3.5.2.1 Geräte, Reagenzien, Probenmaterialien

Um alle Proben unter konstanten Temperaturbedingungen zu bestimmen, nutzten wir die Thermomixer 5435 und 5436 der Firma Eppendorf (Eppendorf Gerätebau, Hamburg).

Zur Messung der Proben diente ein Spektrofluorophotometer der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan), das über einen PC mit Drucker gesteuert wurde.

Verwendet wurden Substrate (Z-Arg-Arg-AMC, Arg-AMC, Z-Phe-Arg-AMC), Standard (AMC), E-64 als spezifischer Hemmstoff der Cysteinproteasen und Cathepsin B (cat.no. C 0150) von Sigma (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA). Der Hemmstoff für Cathepsin L (Z-Phe-Phe-CHN<sub>2</sub>) wurde von Bachem (Heidelberg) bezogen.

Alle anderen Chemikalien waren von analytischer Qualität und wurden von Sigma oder Boehringer Mannheim bezogen.

### **Folgende Lösungen wurden für die Bestimmung vorbereitet:**

#### **1. Inkubationspuffer**

a.) für Cathepsin B, pH 6,0: 352 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 48 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 mmol/l EDTANa<sub>2</sub>. Für den täglichen Gebrauch wurde Cystein zu 8 mmol/l hinzugefügt. Die Anwesenheit einer Sulfhydrylgruppe (Cystein, Dithiothreitol [DTE]) und EDTA ist für die Aktivität der Enzyme notwendig [108].

b.) für Cathepsin H, pH 6,8: 200 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 mmol/l EDTANa<sub>2</sub> und 40 mmol/l Cystein.

c.) für Cathepsin L, pH 5,5: 340 mmol/l CH<sub>3</sub>COONa, 60 mmol/l CH<sub>3</sub>COOH 100%, 4 mmol/l EDTANa<sub>2</sub> und 8 mmol/l DTE. Puffer 1 wurde für den täglichen Gebrauch mit 1,23 mg DTE/ml Puffer versehen, zu Puffer 2 gibt man 1,85 mg DTE/ml Puffer.

#### **2. Substratlösungen**

Die Substrate Z-Arg-Arg-AMC für Cathepsin B, Arg-AMC für Cathepsin H und Z-Phe-Arg-AMC für Cathepsin L wurden in DMSO zu einer Konzentration von 1 mmol/l gelöst und bei -20°C gelagert. Zur täglichen Nutzung wurden sie mit destilliertem Wasser auf 20 µmol/l verdünnt.

#### **3. Stoppuffer**

Für den Stoppuffer wurden Monochloressigsäure (CH<sub>2</sub>ClCOOH) zu 100 mmol/l,

CH<sub>3</sub>COONa zu 30 mmol/l und Essigsäure (CH<sub>3</sub>COOH) zu 70 mmol/l zu einem Puffer gemischt und auf pH-Wert 4,3 eingestellt.

#### **4. Standard**

AMC wurde in DMSO zu einer Konzentration von 1 mmol/l gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Zum täglichen Gebrauch wurde es auf 0,5 µmol/l verdünnt. Als Verdünnungsflüssigkeit diente ein 1:1 Gemisch aus dem jeweiligen Puffer und Stoppuffer.

#### **5. Hemmstoff E-64**

E-64 ist ein spezifischer Hemmstoff der Cathepsine B, H und L. Er wurde den Reaktionsgemischen zugesetzt, um den Umsatz des Substrates durch andere Proteasen zu kontrollieren [104].

Die E-64-Lösung wurde ebenfalls mit DMSO hergestellt und bei einer Konzentration von 1 mmol/l bei -20°C aufbewahrt. Zum täglichen Gebrauch wurde diese Lösung mit Aqua dest. auf 65 µmol/l verdünnt. Die Endkonzentration im Inkubationsansatz betrug 5 µmol/l.

#### **6. Hemmstoff Z-Phe-Phe-CHN<sub>2</sub>**

Dieser Inhibitor hemmt speziell Cathepsin L [109]. Zur Aktivitätsbestimmung wurden 2 Testreihen durchgeführt, mit und ohne Hemmstoff. Aus der Differenz ergibt sich die Aktivität des Cathepsin L.

Der Hemmstoff wurde in DMSO zu 1 mmol/l gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Zum täglichen Verbrauch wurde diese Lösung mit Inkubationspuffer verdünnt, so daß im Testansatz eine Konzentration von 0,5 µmol/l vorlag.

#### **7. Proben und Kontrollmaterial**

Die Proben wurden je nach Aktivität verdünnt. Die Lösung zum Verdünnen bestand zu unterschiedlichen Anteilen aus dem jeweiligen Puffer, 0,1 % Brij 35-Lösung und Aqua dest.- für Cathepsin B 1:2:7, für Cathepsin H 2:2:6 und für Cathepsin L 1:2:7.

Zur intraserialen Präzision diente Rattenleberhomogenat, das 1:101, 1:61 und 1:701

für die Bestimmung der Cathepsine B, H und L eingesetzt wurde.

Zur interseriellen Präzision stellten wir ein Kontrollmaterial aus Rattenleberhomogenat her, das in Verdünnungen 1:606 für die Bestimmung von Cathepsin B und L und 1:51 für Cathepsin H eingesetzt wurde. Das verdünnte Homogenat wurde portioniert bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.5.2.2 Testdurchführung

Das Volumen im Inkubationsansatz betrug 300  $\mu\text{l}$ . Das Endvolumen nach Stop der Reaktion 600  $\mu\text{l}$ . Die Proben wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Es wurde ein Leerwert mitgeführt, indem der Stoppuffer vor dem Substrat zugefügt wurde. Ein zusätzlicher Wert ergab sich durch Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  E-64-Lösung vor der Substratzugabe.

Pipettierschema für die Bestimmung von Cathepsin B und H

in 1,5 ml Eppendorf Röhrchen werden nacheinander pipettiert:		Konzentration im Inkubationsansatz (Cathepsin B) in mmol/l	Konzentration im Inkubationsansatz (Cathepsin H) in mmol/l
Probe/Standard (4,7)	150 $\mu\text{l}$	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 88 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 12 EDTA $\text{Na}_2$ 1 Cystein 2	50 50 1 10
Inkubationspuffer (1)	75 $\mu\text{l}$		
etwa 2 min bei $30^{\circ}\text{C}$ inkubieren lassen			
Substrat (2)	75 $\mu\text{l}$		
mischen, genau 20 min bei $30^{\circ}\text{C}$ inkubieren lassen		5 $\mu\text{mol/l}$	5 $\mu\text{mol/l}$
Stoppuffer (3)	300 $\mu\text{l}$	$\text{CH}_2\text{ClCOOH}$ 50 $\text{CH}_3\text{COONa}$ 15 $\text{CH}_3\text{COOH}$ 35	50 15 35
Fluoreszenz bei $\lambda$ 370/460 nm messen			

### Pipettierschema für Cathepsin L

Bei der Aktivitätsbestimmung des Cathepsin L wurden zwei Testreihen parallel durchgeführt, in An- und Abwesenheit des spezifischen Hemmstoffes Z-Phe-Phe-CHN<sub>2</sub>. Dazu wurden Puffer mit unterschiedlichem DTE-Gehalt benutzt. Aus der Differenz beider Meßreihen ergab sich der Wert der Cathepsin-L-Aktivität.

in 1,5 ml Eppendorf Röhrchen werden nacheinander pipettiert:			Konzentrationen im Inkubationsansatz in mmol/l
Probe/Standard (4,7)	150 µl	150 µl	
Puffer 1 (1)	75 µl	-	CH <sub>3</sub> COONa 85
Puffer 2 (1)	-	50 µl	CH <sub>3</sub> COOH 15
			EDTA Na <sub>2</sub> 1
			DTE 2
L-Inhibitor (6)	-	25 µl	0,5 µmol/l
etwa 2 min bei 30°C inkubieren lassen			
Substrat (2)	75 µl	75 µl	5 µmol/l
mischen, genau 20 min bei 30°C inkubieren lassen			
Stoppuffer (3)	300 µl	300 µl	CH <sub>2</sub> ClCOOH 50
			CH <sub>3</sub> COONa 15
			CH <sub>3</sub> COOH 35
Fluoreszenz bei λ 370/460 nm messen			

### 3.5.2.3 Berechnung der Aktivität

Da Standard und Proben gleich behandelt wurden, erfolgt die Berechnung über die direkte Proportion:

$$\frac{\text{Konzentration}_{\text{Standard}}}{\text{Intensität}_{\text{Standard}}} = \frac{\text{Konzentration}_{\text{Probe}}}{\text{Intensität}_{\text{Probe}}}$$

Unter Berücksichtigung der Reaktionszeit und des Verdünnungsverhältnisses der Probe ergibt sich daraus folgende Formel:

$$\text{Aktivität} \left( \frac{U}{I} \right) = c_{\text{Standard}} \times \frac{\text{Int}_{\text{Probe}}}{\text{Int}_{\text{Standard}}} \times \frac{1}{20 \text{ min}} \times VV$$

### 3.5.3 Bestimmung der Inhibitoren

Um die alleinige Aktivität der Cysteinprotease-Inhibitoren zu bestimmen, ist es erforderlich, die Proben durch Hitze zu „aktivieren“. Damit erreicht man, daß die Inhibitoren sich von eventuell gebildeten Komplexen mit den Cathepsinen lösen, die Cathepsine durch die Hitze denaturiert werden und allein die Aktivität der hitzestabilen Cystatine erhalten bleibt [23]. Die inhibitorische Aktivität testeten wir gegen reines Cathepsin B, isoliert aus Plazenta. Hierzu wurde jeweils die Cathepsin-B-Konzentration mit dem synthetischen Inhibitor E-64 titriert und über eine Regressionsanalyse errechnet. Aus dieser Kurve wurde die Hemmung der Proben errechnet.

#### Vorbereitung der Proben:

Die Inaktivierung der Cysteinproteasen erfolgte durch Kochen. Dazu wurden 100 µl Probe in 0,5 ml Eppendorf-Safelock-Röhrchen gegeben und 10 min im Wasserbad bei 100°C belassen. Nach Abkühlung wurden die Proben für 10 min bei 19.000x g zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand diente zur CPI-Bestimmung.

Die E-64-Stammlösung (1 mmol/l) wurde mit 0,1 % Brij-35-Lösung auf Konzentrationen von 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 20 und 40 nmol/l verdünnt. Um die Aktivität des völlig ungehemmten Cathepsin B zu ermitteln, wurde diesem Ansatz statt verdünnter E-64-Lösung, Brij-Verdünnungslösung zugefügt.

Das Cathepsin B (Sigma) wurde in 0,1 % Brij aufgelöst, portioniert und bei -80°C eingefroren.

Außerdem benötigt man Inkubationspuffer für Cathepsin B.

### Pipettierschema zur Vorbereitung der CPI-Proben

in 1,5 ml Eppendorf Röhrchen werden nacheinander pipettiert:		
Inkubationspuffer	20 µl	20 µl
inaktivierte Probe	50 µl	-
verdünnte E-64-Lösung	-	10 µl
Cathepsin-B-Lösung	4 µl	4 µl
vorsichtig mischen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen		
0,1 % Brij-Lösung	396 µl	436 µl
mischen, Aktivität des Cathepsin B in dieser Probe bestimmen, Testdurchführung s.o., Reaktionszeit auf 60 min verlängert		

#### 3.5.4 Bestimmung des Proteingehaltes

Der Eiweißgehalt in den homogenisierten und extrahierten Gewebeproben und Zellen wurde nach der Methode von Bradford mittels des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue bestimmt [110].

Die Herstellung der Lösung erfolgte, indem 7 mg des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G 250 in 5 ml reinem Ethanol gelöst wurden und über Nacht bei 4°C belassen wurden. Dazu gibt man 10 ml Phosphorsäure (85 %) und füllt auf 100 ml mit Aqua dest. auf. Nach Filtration lagerten wir diese Lösung bis zum Gebrauch bei 4°C.

Als Standard diente Rinder-Serumalbumin in einer Konzentration von 1 mg Eiweiß pro ml.

Zur Bestimmung wurden die Proben 1:5 verdünnt und 10 µl davon in K-Küvetten (Eppendorf) mit 500 µl Coomassie-Lösung gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben erneut gemischt und bei einer Wellenlänge von 578 nm im Spektrophotometer ECOM 6122 (Eppendorf) gemessen. Alle Werte wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

### 3.5.5 Statistische Auswertung

Die Meßergebnisse wurden mittels des Statistikprogrammes Statgraphics 5.01 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD, USA) ausgewertet. Genutzt wurden der t-Test nach Student und der U-Test nach Mann-Whitney für unabhängige Stichproben, sowie der t-Test für gepaarte Daten und der Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben. Die Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Spearman wurden mit der Software von GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) ermittelt.

Unterschiede von  $p < 0,050$  wurden als statistisch signifikant gewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 4.1. Zuverlässigkeit der Enzymaktivitätsbestimmungen

#### 4.1.1 Intraserielle Präzision

Die intraserielle Präzision wurde mittels einer Zehnfachbestimmung des in Material und Methoden angegebenen Kontrollmaterials bestimmt. Der Variationskoeffizient ergab sich aus Mittelwert und Standardabweichung. Die Werte sind verzeichnet in Tabelle 3.

Tabelle 3 Intraserielle Präzision der Cathepsinbestimmungen.

Parameter	Mittelwert (l ) (mU/l)	Standard- abweichung (s) (mU/l)	VK= s/l * 100 (%)
Cathepsin B	11,71	0,13	1,10
Cathepsin H	7,21	0,21	2,94
Cathepsin L	1,69	0,17	9,88

#### 4.1.2 Interserielle Präzision

Es erfolgte eine interserielle Qualitätskontrolle. Dazu wurde in jeder Serie die Cathepsinkonzentration eines selbsthergestellten Kontrollmaterials bestimmt, dessen Herstellung im Kapitel Material und Methodik beschrieben wurde. Aus Mittelwert und Standardabweichung ergab sich der jeweilige Variations-koeffizient. Eine Zusammenfassung der Werte zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4 Interserielle Präzision der Cathepsinbestimmungen

Parameter (Anzahl)	Mittelwert (l ) (mU/l)	Standard- abweichung (s) (mU/l)	VK= s/l * 100 (%)
Cathepsin B (12)	4,29	0,29	6,71
Cathepsin H (7)	17,06	2,64	15,47
Cathepsin L (13)	12,74	1,53	12,01



## 4.2 Überprüfung der Enzymextraktionen

In der Literatur sind verschiedene Homogenisationsverfahren unter Verwendung unterschiedlicher Extraktionspuffer beschrieben, mit denen die Gewebscathepsine für die Enzymaktivitätsbestimmung gewonnen wurden. Wir entschieden uns, ausgehend von Vorversuchen, für eine Homogenisierung im Wheaton-Homogenisator mit einer 10 mmol/l  $\text{CaCl}_2$ -Lösung, die 0,25 % Triton X-100 enthielt. Hierzu wurden 30-50 mg Gewebe mit jeweils 150  $\mu\text{l}$  Lösung homogenisiert und im Überstand die Aktivität gemessen. Die Extraktion wurde dreimal wiederholt. Die Summe der in den drei Extraktionsschritten gewonnenen Aktivitäten wurde 100 % gesetzt. Die zweifache Gewebeextraktion mit Triton führte zu nahezu vollständiger Extraktion der Enzyme. Proben, die mit der zweifachen Tritonextraktion behandelt wurden, hatten die in Tabelle 5 aufgeführten Anteile an der Gesamtaktivität von 100 %.

Tabelle 5 Anteil der Aktivität der zweifachen Tritonextraktion in Proben, die dreifach extrahiert wurden.

Parameter	Mittelwert (l ) (%)	Standard- abweichung (s) (%)	VK = $s/l \cdot 100$ (%)
Cathepsin B	99,76	0,2	0,15
Cathepsin H	99,66	0,4	0,42
Cathepsin L	97,30	3,4	3,55

## 4.3 Korrelation der Bezugsgrößen

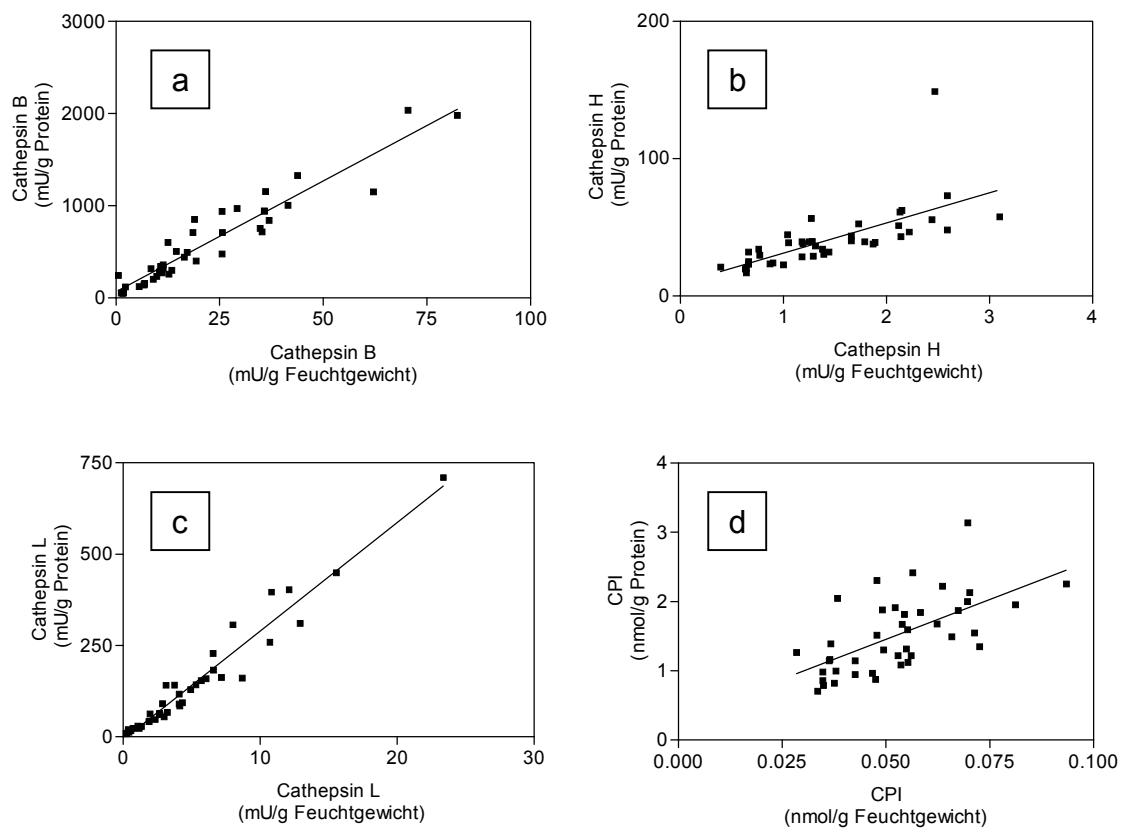
Die errechneten Cathepsinaktivitäten wurden auf den Eiweißgehalt der Probe bezogen. Bei den Gewebeproben erfolgte der Bezug zusätzlich noch auf das Feuchtgewicht und bei den Zellkulturen auf die jeweilige Zellzahl ( $10^6$ ). Abbildung 2 (Seite 32) zeigt den Zusammenhang zwischen Cathepsinwerten bezogen auf Gramm Protein, zu Cathepsinwerten bezogen auf Gramm Feuchtgewicht (Gewebeproben). Die Korrelation bei den Primärzellkulturen ist in Abbildung 3 (Seite 33) dargestellt, bei den permanenten Zellkulturen in Abbildung 4 (Seite 34).

Die Koeffizienten der linearen Korrelation zwischen den Bezugsgrößen sind

zusammengefaßt in Tabelle 6.

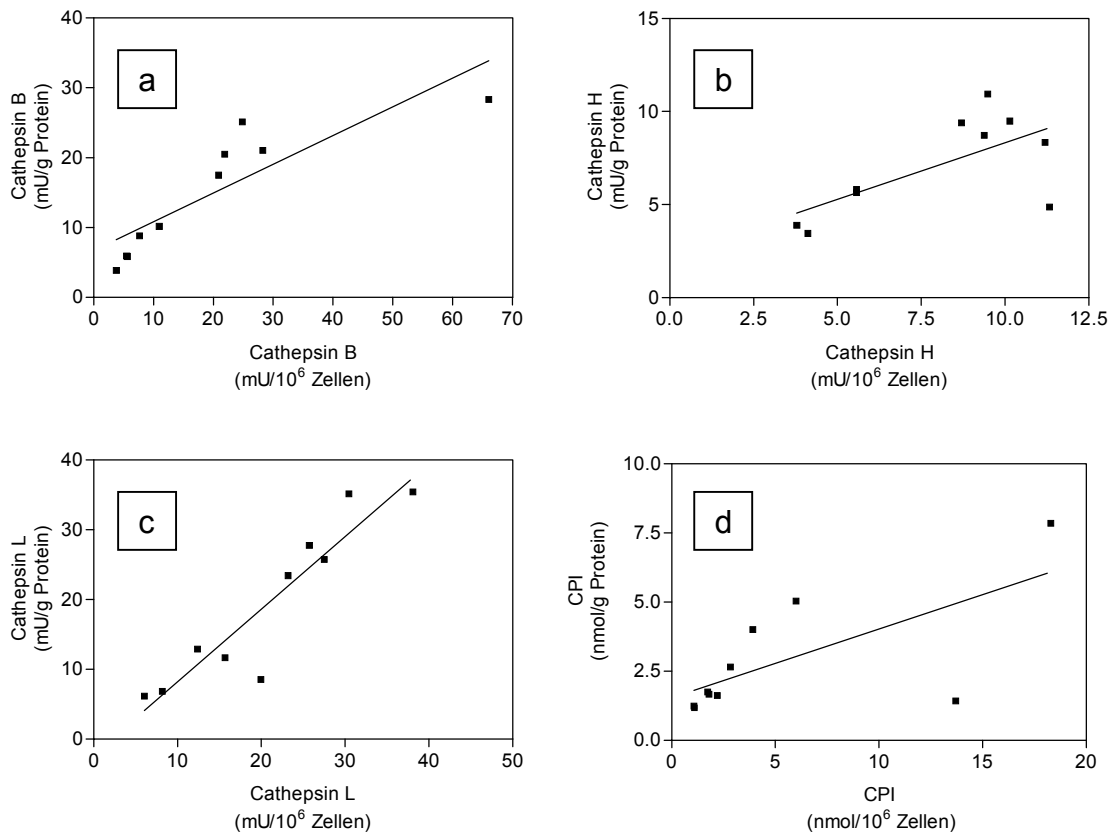
Tabelle 6 Korrelation zwischen den Bezugsgrößen, lineare Korrelations-koeffizienten.

	<b>Gewebeproben</b>	<b>Primärzellkulturen</b>	<b>Permanente Zellkulturen</b>
	Korrelation Eiweiß/ Feuchtgewicht	Korrelation Eiweiß/ Zellzahl	Korrelation Eiweiß/ Zellzahl
Cathepsin B	0,949	0,868	0,955
Cathepsin H	0,677	0,666	0,978
Cathepsin L	0,974	0,927	0,969
CPI	0,621	0,679	0,861

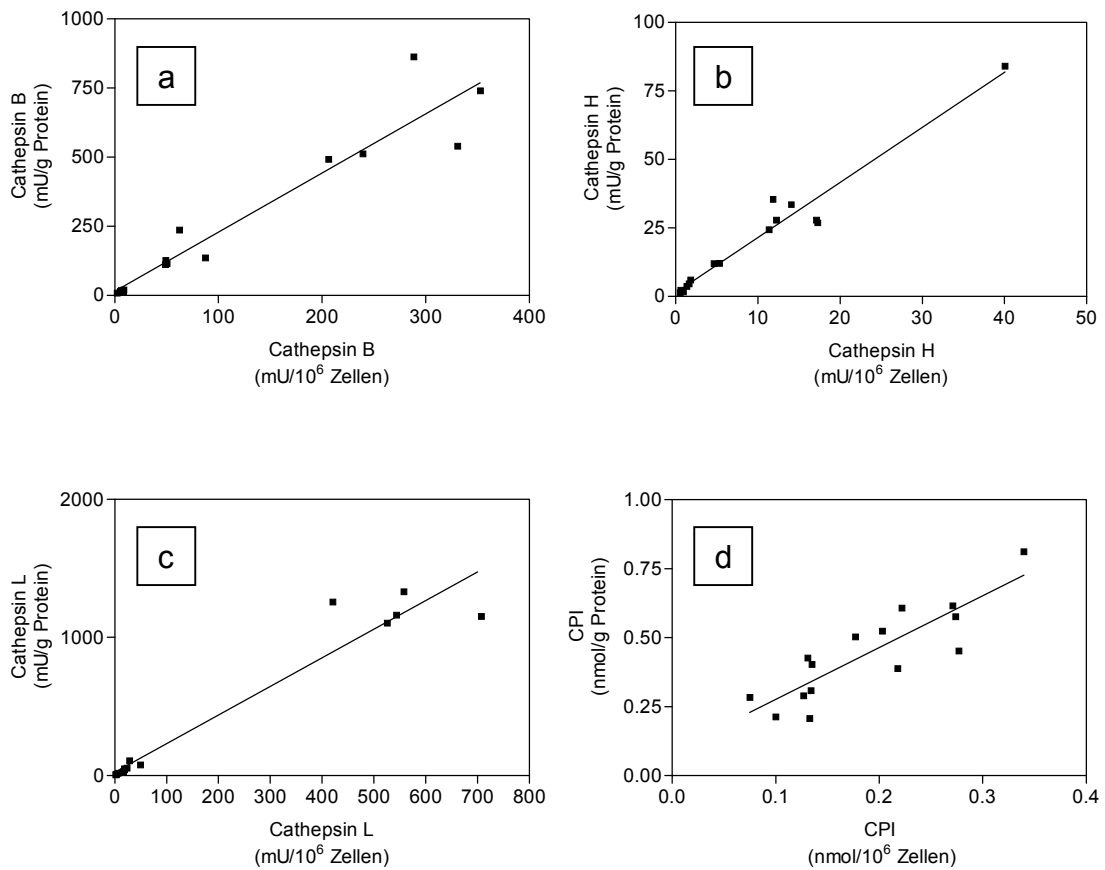


**Abb. 2.** Korrelation der Bezugsgrößen in den Gewebeproben von Prostataktomien, Adenomektomien, Zystoprostataktomien und transurethralen Resektionen der Prostata.

Dargestellt ist das Verhältnis von Cathepsinen B, H, L (Abb. a-c) und CPI (Abb. d) pro Gramm Protein zu Cathepsinen bzw. CPI pro Gramm Feuchtgewicht. Die Koeffizienten der linearen Korrelation sind in Tabelle 6 (Seite 31) aufgeführt.



**Abb. 3.** Korrelation der Bezugsgrößen in den Primärzellkulturen der Prostata. Dargestellt ist das Verhältnis von Cathepsinen B, H, L (Abb. a-c) und CPI (Abb. d) pro Gramm Protein zu Cathepsinen bzw. CPI pro eine Million Zellen. Die Koeffizienten der linearen Korrelation sind in Tabelle 6 (Seite 31) aufgeführt.



**Abb. 4.** Korrelation der Bezugsgrößen in den immortalisierten Zelllinien LNCaP, DU145 und PC3.

Dargestellt ist das Verhältnis von Cathepsinen B, H, L (Abb. a-c) und CPI (Abb. d) pro Gramm Protein zu Cathepsinen bzw. CPI pro eine Million Zellen. Die Koeffizienten der linearen Korrelation sind in Tabelle 6 (Seite 31) aufgeführt.

Außerdem zeigte sich, daß sich die einzelnen Gruppen der Gewebeproben im Proteingehalt untereinander bezogen auf das Feuchtgewicht nicht signifikant unterscheiden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Proteingehalte der Gewebeproben sind dargestellt in Abbildung 5.

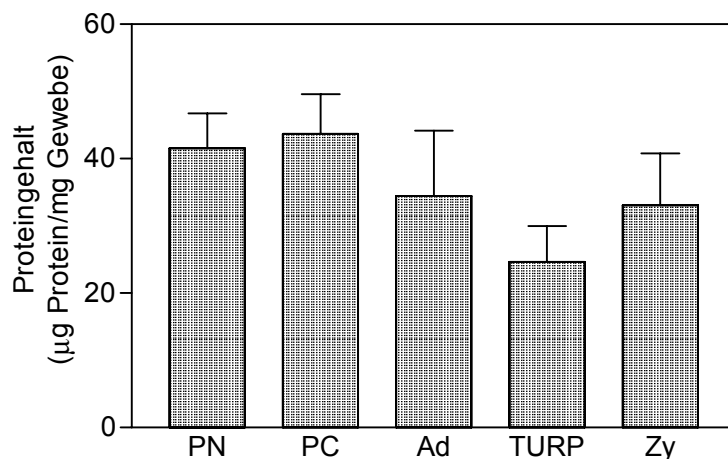


Abb. 5. Prostata-Gewebeproben von nichterkranktem (PN) und Karzinom-gewebe (PC), Adenomektomien (Ad), transurethralen Resektionen der Prostata (TURP) und von Zystoprostatektomien (Zy). Die Säulen zeigen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Proteingehaltes in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Gewebe. Die statistische Analyse mit dem t-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Aufgrund der Unabhängigkeit der Menge des extrahierten Proteins von der Art der Gewebegewinnung und der engen Korrelation zwischen Eiweißgehalt und den anderen Bezugsgrößen, ist es gerechtfertigt, die Ergebnisse jeweils bezogen auf den Proteingehalt darzustellen.

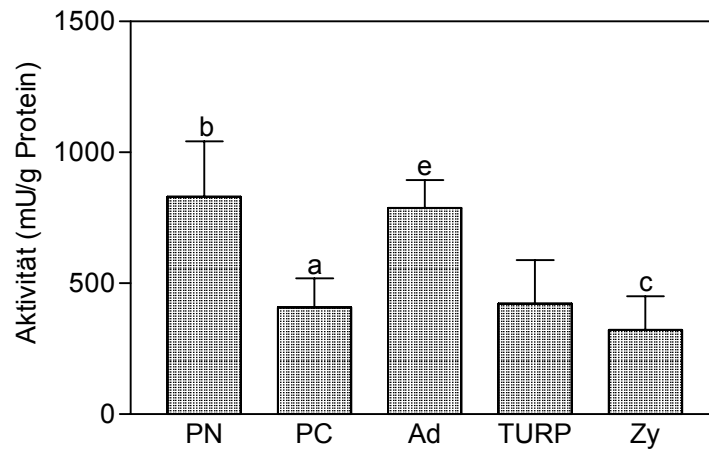
Die im folgenden präsentierten Ergebnisse zeigen die Aktivität der Cathepsine bezogen auf den Eiweißgehalt der Proben.

#### 4.4 Cathepsine B, H, L und Cysteinprotease-Inhibitoren in Prostatagewebeproben

Eine grafische Darstellung der Parameter aller Gewebeproben beinhaltet Abbildung 6 (Seite 36-37).

Allgemein trifft zu, daß Cathepsin B die höchsten Aktivitätswerte zeigte, gefolgt von Cathepsin L und Cathepsin H.

a). Cathepsin B



b). Cathepsin H

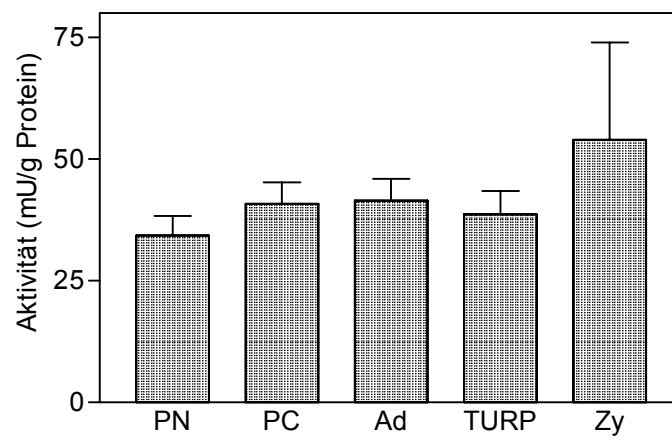
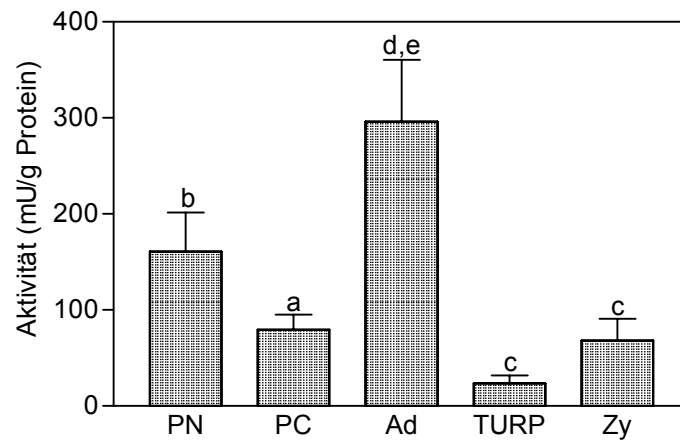
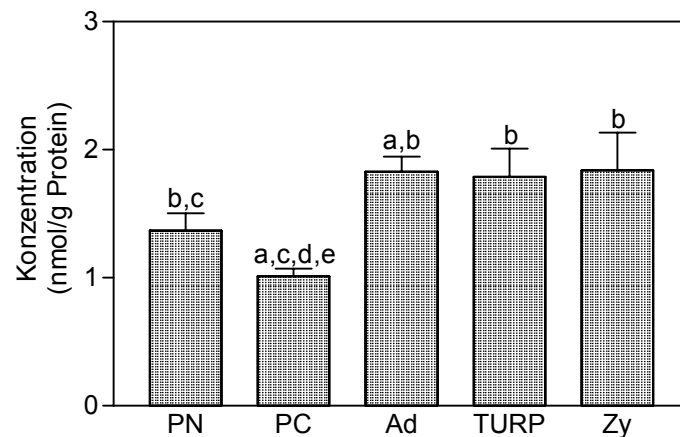


Abb. 6 a-b. Cathepsine B und H in Gewebeproben der Prostata. Ausführliche Legende auf der nächsten Seite.

c). Cathepsin L



d). Cysteinprotease-Inhibitoren



**Abb. 6.** Cathepsine B, H, L (6 a-c) und Cysteinprotease-Inhibitoren (6 d) in Prostata-Gewebeproben. PN und PC bezeichnen jeweils 10 zusammengehörende Paare, die bei Prostataektomien von nichterkranktem (PN) und malignem (PC) Gewebe gewonnen wurden. Die mit Ad bezeichneten Proben stammen von Adenomektomien (n=9), TURP von transurethralen Resektionen der Prostata, Zy von Zystoprostataektomien. Von beiden Gruppen wurden je 6 Proben untersucht.

Die Säulen repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Im t-Test signifikante Unterschiede sind mit den Buchstaben a-e gekennzeichnet. Dabei bedeutet (a) signifikant unterschiedlich zu PN, (b) zu PC, (c) zu Adenomektomien, (d) zu transurethralen Resektionen und (e) zu den Zystoprostataektomien.

#### 4.4.1 Vergleich von normalem und Tumorgewebe

Die Cathepsine B und L zeigten signifikante Unterschiede zwischen nicht-erkranktem (PN) und maligne verändertem Gewebe (PC).

Im normalen Gewebe fand sich eine zweifach höhere Aktivität im Vergleich zum malignen Gewebe: Cathepsin B: 830,4/407,7; Cathepsin L: 160,9/79,4 mU/g Eiweiß . Auch in der Konzentration der Cysteinprotease-Inhibitoren (CPI) unterschieden sich normale und maligne Proben signifikant. Der Unterschied war jedoch nicht so deutlich wie im Cathepsingehalt: PN 1,37; PC 1,01 nmol/g Eiweiß.

Beim Cathepsin-H-Gehalt zeigte sich kein Unterschied im Vergleich beider Gruppen. Wir errechneten die Quotienten zwischen dem jeweiligen Cathepsin und den Cysteinprotease-Inhibitoren. Diese Werte sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7 Verhältnis von Cathepsinen zu Cysteinprotease-Inhibitoren. Die angegebenen Quotienten entsprechen den arithmetischen Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung von jeweils 10 Gewebeprobe.

Quotient	Nichtkranktes Gewebe (PN)		Tumorgewebe der Prostata (PC)	
	Mittelwert	Standardabweichung	Mittelwert	Standardabweichung
CB/CPI (mU/nIU)	567,8	$\pm 351,9$	417,9	$\pm 391,6$
CH/CPI (mU/nIU)	26,8	$\pm 10,8$	42,6	$\pm 18,4$
CL/CPI (mU/nIU)	109,7	$\pm 68,5$	81,5	$\pm 53,0$

Ein signifikanter Unterschied zwischen den normalen und Tumorproben besteht nur beim Quotient Cathepsin H/CPI, der im t-Test 0,050 erreichte.

Der Quotient zwischen allen Cathepsinen und CPI beträgt für PN  $234,8 \pm 143,7$  und für PC  $180,7 \pm 154,3$ . Im Paarvergleich ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Außerdem wurden die Aktivitäten der einzelnen Cathepsine mit anderen Tumormerkmalen korreliert. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient zeigte eine signifikante Abhängigkeit zwischen dem Gehalt an Cathepsin H und dem TNM-Staging (0,7490). Der Cathepsin-L-Gehalt korrelierte negativ mit dem histologischen Grading (Pearson  $r = -0,6713$ ; Spearman  $r = -0,6742$ ).

#### 4.4.2 Adenomektomien, Zystoprostatektomien, transurethrale Resektionen

Von diesen 3 Gruppen zeigten die Adenomektomieproben die höchste Cathepsin-B-Aktivität (788,3 mU/g Protein), vergleichbar mit PN (830,4), gefolgt von TURP (423,4) und Zystektomien (323,7). Signifikant unterscheiden sich die Adenomektomie- von den Zystoprostatektomieproben.

Im Cathepsin-H-Gehalt liegen die Zystoprostatektomieproben am höchsten mit 54,0 mU/g Eiweiß, danach folgen die Adenomektomien mit 41,4 mU/g Eiweiß und die transurethralen Resektionen mit 38,6 mU/g Eiweiß. Weder untereinander, noch zu PN und PC gibt es Unterschiede.

Die Verteilung der drei Gruppen im Cathepsin-L-Gehalt zeigt deutlichere Unterschiede. Die Adenomektomieproben liegen mit einem Mittelwert von 296,2 vor den Zystektomien mit 68,1 und den TURP mit 23,6 mU/g Protein. Daraus ergibt sich eine signifikante Differenz des Cathepsin-L-Gehaltes bei Adenomektomieproben im Vergleich zu Proben von TURP und Zystektomien.

Bei der CPI-Konzentration liegen die drei Gruppen der benignen Prostata-proben mit Mittelwerten von 1,83 nmol/g Eiweiß (Ad), 1,79 nmol/g Eiweiß (TURP), 1,84 nmol/g Eiweiß (Zy), eng beisammen. So unterscheiden sie sich untereinander nicht, sondern alle nur zu PC (1,01 nmol/g Eiweiß) und die Adenomektomien zusätzlich noch zu PN (1,37 nmol/g Eiweiß).

#### 4.5 Cathepsine B, H, L und Cysteinprotease-Inhibitoren in Zellkulturen

Die grafische Darstellung aller untersuchten Zellkulturen findet sich in Abbildung 7 (Seite 40-41).

Sowohl primäre als auch permanente Zellkulturen (LNCaP, DU145, PC3) weisen die höchsten Aktivitäten beim Cathepsin L auf, gefolgt von Cathepsin B und Cathepsin H, das wie bei den Gewebeproben den geringsten Gehalt zeigt.

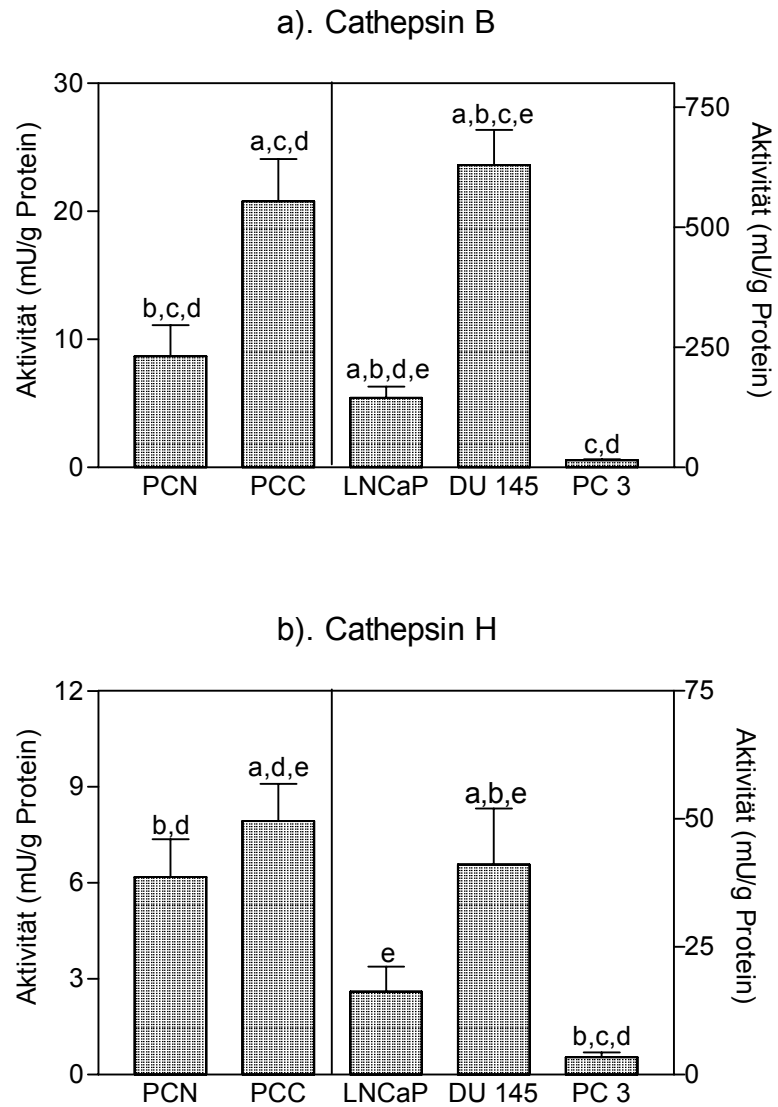
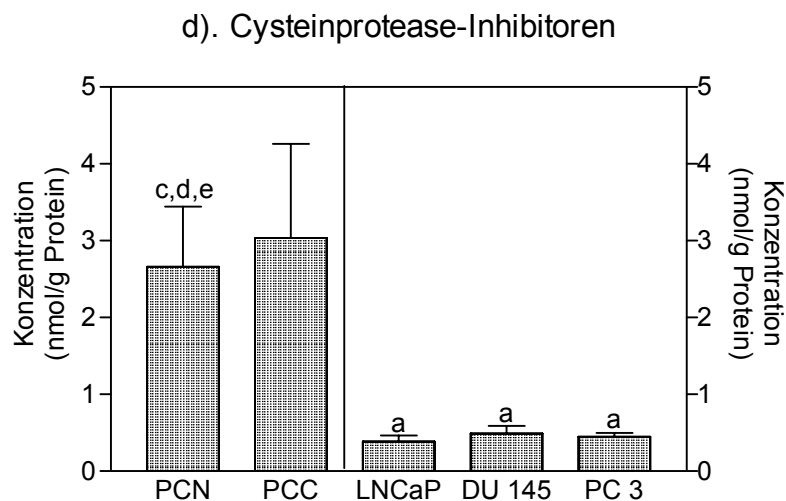
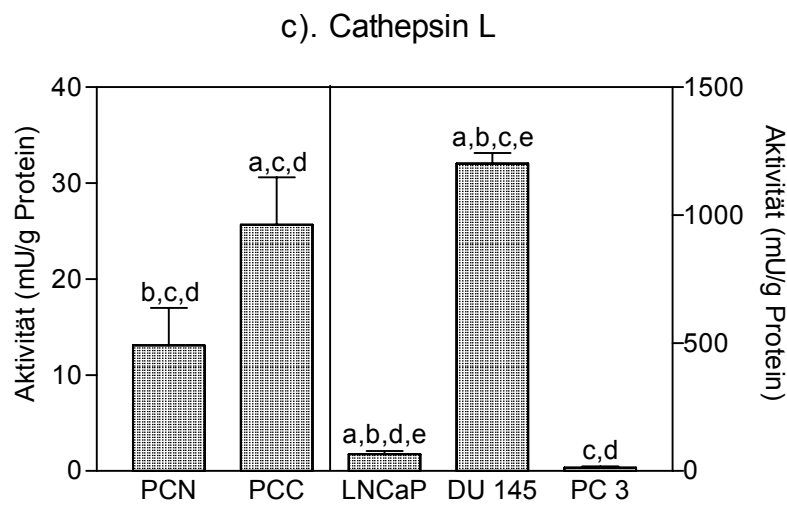


Abb. 7 a-b. Cathepsine B und H in Zellkulturen der Prostata. Ausführliche Legende auf der nächsten Seite.



**Abb. 7.** Cathepsine B, H, L (7 a-c) und Cysteinprotease-Inhibitoren (7 d) in Zellkulturen der Prostata. PCN und PCC bezeichnen 5 jeweils zusammengehörende Paare von Primärzellkulturen, die aus nichterkranktem (PCN) und malignem (PCC) Gewebe angezchtet wurden. Von den drei immortalisierten Zelllinien LNCaP, DU145 und PC3 wurden jeweils 5 Proben untersucht.

Die Säulen repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Im t-Test signifikante Unterschiede sind mit den Buchstaben a-e gekennzeichnet. Dabei bedeutet (a) signifikant unterschiedlich zu PCN, (b) zu PCC, (c) zu LNCaP, (d) zu DU145 und (e) zu den PC3.

#### 4.5.1 Vergleich der Primärzellkulturen

Die aus normalem Prostatagewebe und aus Karzinomgewebe gezüchteten Primärzellkulturen (PCN und PCC) unterscheiden sich in der Aktivität aller drei Cathepsine.

Im Gegensatz zu den Gewebeprobe sind hier jedoch in den Tumorzellkulturen die signifikant höheren Aktivitäten vorhanden.

Diese liegen für Cathepsin B und Cathepsin L um ca. das Doppelte höher als in den Zellkulturen von der normalen Prostata, beim Cathepsin H ist der Unterschied geringer, aber trotzdem signifikant. In der CPI-Konzentration gibt es keine statistisch signifikante Differenz zwischen den Kulturen des normalen und malignen Gewebes.

Auch hier ermittelten wir den Quotienten aus den einzelnen Cathepsinen zu den CPI. Die daraus resultierenden Werte sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tabelle 8 Verhältnis von Cathepsinen zu Cysteinprotease-Inhibitoren. Die angegebenen Quotienten entsprechen den arithmetischen Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung von jeweils 5 Gewebeprobe.

Quotient	Primärzellkulturen von nichterkranktem Prostatagewebe (PCN)		Primärzellkulturen vom Tumorgewebe der Prostata (PCC)	
CB/CPI (mU/nIU)	3,93	$\pm 1,93$	9,15	$\pm 4,41$
CH/CPI (mU/nIU)	3,76	$\pm 3,03$	4,29	$\pm 3,02$
CL/CPI (mU/nIU)	8,53	$\pm 9,07$	14,76	$\pm 10,51$

Auch hier ergab der t-Test keine Signifikanzen für die einzelnen Quotienten.

Der Quotient aus allen Cathepsinen und CPI betrug für die Primärzellkulturen des normalen Gewebes (PCN)  $5,41 \pm 4,68$  gegenüber  $9,40 \pm 5,98$  des Tumorgewebes (PCC). Diese für die malignen Zellen erhöhte Relation war mit 0,047 im t-Test signifikant.

Die Korrelation der Cathepsin-Aktivitäten mit anderen klinischen Tumormerkmalen (TNM, Grading) mittels des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten ergab keine signifikanten Werte.

#### 4.5.2 Permanente Zellkulturen

Für alle drei Zelllinien zeigt sich ein ähnliches Verteilungsmuster der Cathepsine B, H und L. DU145-Zellen haben die höchsten Aktivitäten, gefolgt von LNCaP- und PC3-Zellen. Untereinander zeigen sich daher in jedem Fall zu einer, meistens aber zu beiden anderen Zelllinien signifikante Unterschiede. Generell liegen die Aktivitäten im Vergleich zu den primären Zellkulturen um ein Vielfaches höher. Daraus ergibt sich, daß DU145 zu den normalen und malignen Primärzellkulturen (PCN und PCC) bei allen drei Cathepsinen; LNCaP bei Cathepsin B und Cathepsin L und PC3 bei Cathepsin H signifikant verschieden sind.

Die Konzentration der Cysteinprotease-Inhibitoren beträgt bei den permanenten Zelllinien nur etwa ein Viertel von der in den Primärzellkulturen. Untereinander gibt es keine Differenzen, nur zu den Primärzellkulturen des normalen Gewebes (PCN).

#### 4.5.2.1 Ammoniumchlorid-stimulierte Zellkulturen

Die grafische Darstellung der Ammoniumchlorid-stimulierten Zellkulturen findet sich in Abbildung 8 auf den folgenden beiden Seiten.

In den Zellysaten der unstimulierten Zellen finden sich höhere Aktivitäten der Cathepsine B, H und L als nach der Stimulierung. Eine Ausnahme bilden die PC3-Zellen, die beim Cathepsin H in den stimulierten Proben einen höheren Gehalt aufweisen.

Die Überstände verhalten sich gegensinnig, d.h. nach Stimulation durch  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Zusatz zeigen sie eine höhere Aktivität der Cathepsine B, H und L. Dies gilt für alle Proben bis auf LNCaP im Cathepsin-B-Gehalt.

Bei den Cysteinprotease-Inhibitoren verhalten sich Zellysate und Überstände gleichsinnig. Bei allen drei Zelllinien sind sowohl im Zellysat, als auch im Überstand der stimulierten Zellen die höheren Werte der CPI-Konzentration zu finden.

In Tabelle 9 ist die Verteilung von Cathepsinen und CPI zwischen Zellysat und Überstand prozentual ausgedrückt.

Tabelle 9 Prozentuale Anteile der einzelnen Cathepsine im Überstand und Zellysat der drei permanenten Zelllinien DU145, LNCaP und PC3 ohne und mit Ammoniumchlorid-Stimulierung. Die Summe der Aktivitäten (Mittelwerte) in Zellysat und Überstand wurde 100 % gesetzt und dann der jeweilige prozentuale Anteil errechnet. SD bezeichnet die Standardabweichung.

		ohne $\text{NH}_4\text{Cl}$				mit $\text{NH}_4\text{Cl}$			
		Zellysat		Überstand		Zellysat		Überstand	
		%	SD	%	SD	%	SD	%	SD
DU145	Cathepsin B	73	19	27	26	41	17	59	72
	Cathepsin H	77	45	23	24	64	51	36	32
	Cathepsin L	94	7	6	5	88	26	12	12
	CPI	0,5	0,2	99,5	64	0,5	0,3	99,5	103
LNCaP	Cathepsin B	96	35	4	6	80	51	20	12
	Cathepsin H	48	33	52	61	14	7	86	55
	Cathepsin L	92	37	8	3	52	40	48	26
	CPI	0,4	0,2	99,6	67	0,6	0,1	99,4	47
PC3	Cathepsin B	88	28	12	6	33	6	67	84
	Cathepsin H	48	27	52	20	29	8	71	78
	Cathepsin L	66	49	34	25	6	4	94	175
	CPI	0,3	0,1	99,7	86	0,5	0,1	99,5	84

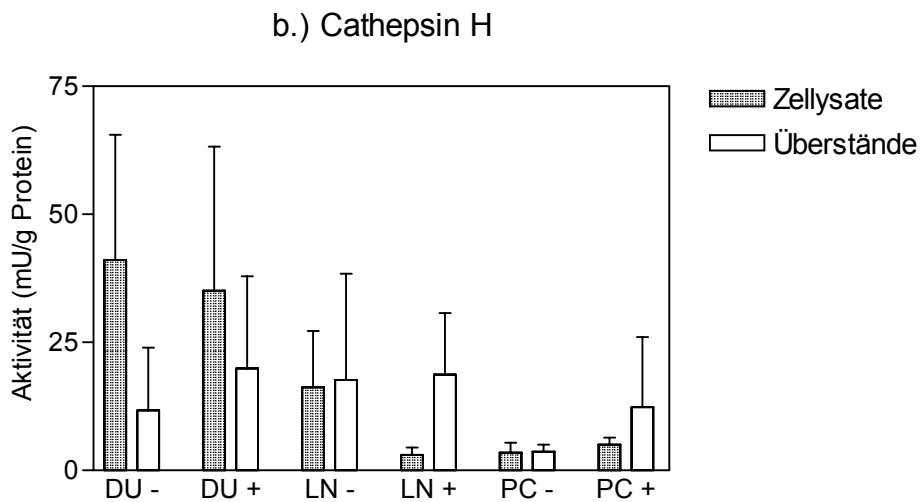
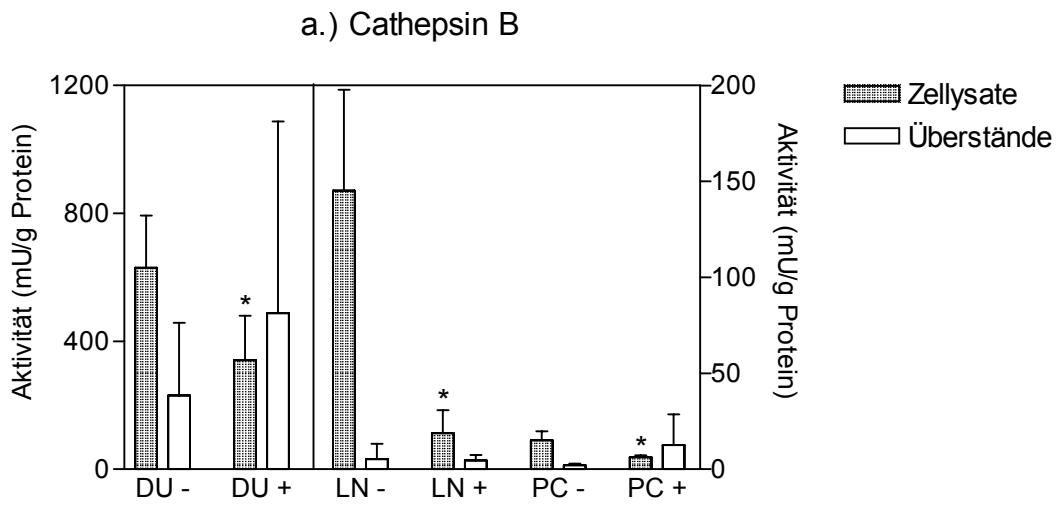
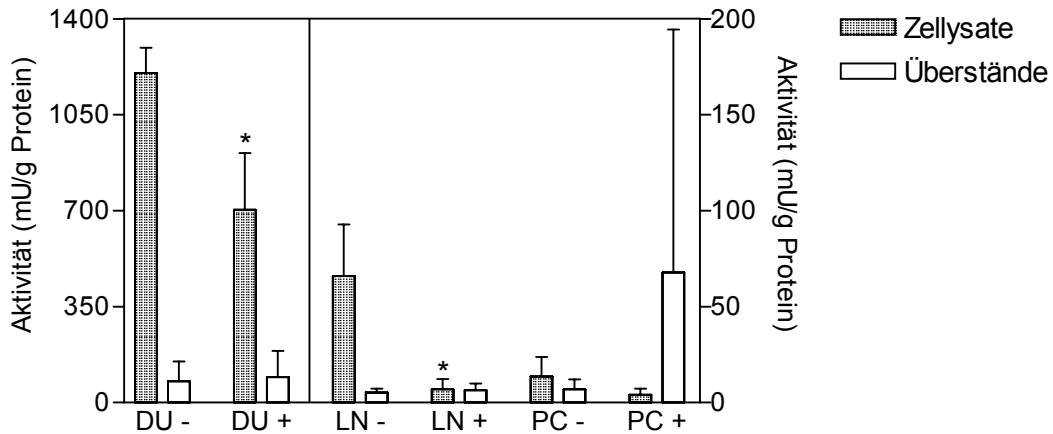
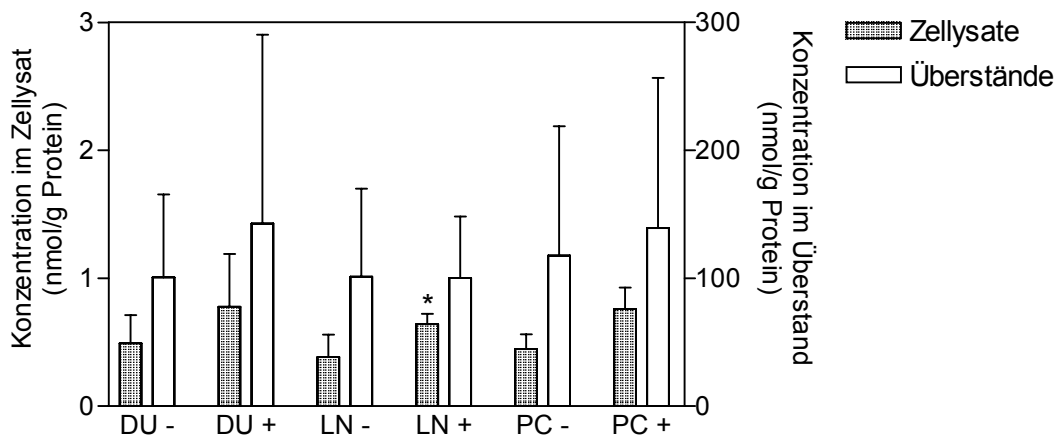


Abb. 8 a-b. Cathepsine B und H in den drei immortalisierten Zelllinien DU145 (DU), LNCaP (LN) und PC3 (PC) vor (-) und nach (+) Stimulierung mit Ammoniumchlorid. Ausführliche Legende auf der nächsten Seite.

### c.) Cathepsin L



### d.) Cysteinprotease-Inhibitoren



**Abb. 8.** Darstellung der drei immortalisierten Zelllinien DU145 (abgekürzt DU), LNCaP (LN) und PC3 (PC) vor (–) und nach (+) Stimulierung mit Ammoniumchlorid. Es wurden jeweils Zellysate (schraffiert) und Überstände (leer) untersucht.

Die Säulen repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von je 5 gemessenen Werten. Im t-Test signifikante Unterschiede zwischen stimulierten und unstimulierten Zellysaten (bzw. Überständen) einer Zelllinie sind mit (\*) gekennzeichnet.

Die Abbildungen 8 a-c zeigen die Aktivitäten der Cathepsine B, H und L. In Abbildung 8 d ist die Konzentration der Cysteinprotease-Inhibitoren dargestellt.

## 5 Diskussion

Die Cysteinproteasen Cathepsin B, H und L sind an verschiedenen Krankheitsbildern und an neoplastischen Vorgängen beteiligt.

In der Gruppe der entzündlichen Gelenkerkrankungen sind sie an der Zerstörung des Gelenkknorpels beteiligt. Der Gehalt im Serum, in Synovialflüssigkeit und synovialen Gewebeproben ist erhöht und kann als Marker für die Aktivität der Krankheit genutzt werden [69]. Bei einer Form der Muskeldystrophie scheint die Aktivierung eines intramyofibrillären lysosomalen Systems für die erhöhte Cysteinprotease-Aktivität verantwortlich zu sein. Damit verbunden ist die gesteigerte proteolytische Zerstörung der Muskelfasern [111]. Andere nicht-maligne Erkrankungen mit nachgewiesener Beteiligung der Cathepsine sind z.B. die Alzheimersche Krankheit [64], Multiple Sklerose [71], Nierenerkrankungen, wie die polyzystische Niere [67], Glomerulonephritis, Otitis media, Sinusitis, Pankreatitis und Parodontose [69].

Der erhöhte Cathepsingehalt maligner Gewebe (s. a. Tabelle 1) ist in den verschiedensten Tumoren nachgewiesen worden [60]. Unterstützt und erweitert durch Studien an Tiermodellen [112] und Zellkulturen [113,114] zeigte sich auch ein Zusammenhang mit anderen Tumormerkmalen, wie Differenzierungsgrad des Gewebes [19,20], dem Stadium der Erkrankung [18], der Überlebensrate [19,26,27,33] und dem metastatischen Potential [47,114-116]

Sloane et al. [117] wiesen nach, daß die Erhöhung im Cathepsin-B-Gehalt primär in Form einer plasmamembran-assoziierten Fraktion auftritt, d.h. es kommt zu einer Umverteilung des Enzyms auf subzellulärer Ebene während des malignen Geschehens. Die höchste Aktivität fand sich in den kleinsten, am schnellsten wachsenden Tumoren, was als Zeichen der Invasivität dieser Tumoren gewertet wird. Außerdem konnte eine verminderte Konzentration der hitzestabilen CPI nachgewiesen werden, die somit nicht mehr in der Lage sind, die Aktivität des Cathepsin B ausreichend zu hemmen.

In dieser Arbeit sind die Hauptmechanismen, die den Cathepsinen bei der Tumorausbreitung zugeschrieben werden, zusammengefaßt. Einerseits die Umverteilung vom lysosomalen Kompartiment zur Plasmamembran und andererseits die verschobene Balance zwischen Enzym und Inhibitor.

## 5.1 Methodik

Die meisten der uns bekannten Studien über den Cathepsingehalt der Prostata wurden mit immunhistochemischen Methoden durchgeführt. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, daß Antikörper nicht in der Lage sind, verschiedene Konformationen der Enzyme nachzuweisen. Die Kreuzreaktion mit anderen nahe verwandten Enzymen der selben Proteinfamilie stellt ebenfalls eine Fehlerquelle dar. Eine dritte Möglichkeit der Beeinflussung besteht durch die Anwesenheit gemeinsamer Epitope auf anderen, nichtverwandten Proteinen [118]. Zudem bleibt unklar, ob die angefärbten Proteine auch funktionell intakt sind. Das läßt sich nur über eine Bestimmung der Enzymaktivität aussagen.

Die von uns angewandte Methodik der Cathepsin-Aktivitätsbestimmung wurde bereits 1980 von Barrett entwickelt [106,107]. Wir haben sie übernommen und unseren technischen Bedingungen angepaßt. Die intra- und interseriellen Kontrollen zeigten mit Werten von 1,10 bis 9,88 bzw. 6,71 bis 12,01 % zufriedenstellende Werte. Vergleichbare Werte waren bis auf die intraserielle Präzision für die Cathepsin-H-Bestimmung von 2-4 % nicht zu finden [108]. Diese Angabe stimmt aber mit unseren Ergebnissen überein.

Die Messung der katalytischen Aktivität kann aufgrund einer weiten und überlappenden Substratspezifität zum Problem werden. Außerdem gibt es wahrscheinlich in jedem Gewebe unbekannte Proteasen, deren katalytische Eigenschaften störenden Einfluß ausüben können. Die von uns eingesetzten Substrate sind zwar für das jeweilige Cathepsin spezifisch, werden aber zum Teil auch von anderen umgesetzt. Z-Arg-Arg-AMC zur Bestimmung von Cathepsin B wird auch von Kallikrein umgesetzt [85]. Das Cathepsin-H-Substrat Arg-AMC wird von Cathepsin B und L nicht angegriffen, kann aber anderen Arylamidasen als Substrat dienen. Z-Phe-Arg-AMC wird nicht nur vom Cathepsin L, sondern auch von Cathepsin B und den Kallikreinen umgesetzt [106].

Um diese, wenn auch geringen, Interferenzen auszuschalten, nutzten wir zwei verschiedene Inhibitorstoffe. E-64 (L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido[4-guanidino]butane) ist ein synthetischer Hemmstoff, gewonnen aus Kulturen des *Aspergillus japonicus*, der die drei von und untersuchten Cysteinproteasen hemmt [104]. Die Inhibition der Cathepsine B und L wird als exzellent, die des Cathepsin H als ausreichend beschrieben. Zur Bestimmung des Cathepsin L setzten wir den dafür

spezifischen Hemmstoff Z-Phe-Phe-CHN<sub>2</sub> ein [109].

Die Messung der Aktivität kann auch durch die Anwesenheit von Inhibitoren oder inaktiven Enzymvorstufen behindert sein [118].

ELISA-Tests, die in den vergangenen Jahren zur Analyse des Cathepsin-gehaltes entwickelt wurden, haben den Vorteil, auch geringe Mengen des Enzymes nachzuweisen. Doch auch diese Methode bietet nicht die Möglichkeit zwischen proteolytisch aktiven und nicht funktionsfähigen Enzymen zu unterscheiden. Gabrijelcic et al. [20] fanden, daß der Cathepsin-H-Gehalt im Serum 50-100fach höher lag als Cathepsin B und L. Das deutet darauf hin, daß der verwendete polyklonale ELISA-Test den Cathepsin-H-Gehalt überschätzte.

Eine weitere Möglichkeit der Bestimmung der Enzymexpression besteht in der Messung des mRNA-Gehaltes [118]. Mit dieser Methode kann man Unterschiede in den Transkriptionsaktivitäten der verschiedenen Proteinase-Gene nachweisen. Die Transkription stellt den ersten Schritt der Proteinbiosynthese dar. Im weiteren Verlauf kann es jedoch auch hier zu Veränderungen kommen, die zu strukturell intakten, aber nicht funktionsfähigen Enzymen führen. Diese posttranslationalen Veränderungen werden durch die mRNA-Bestimmung nicht erfaßt. Somit ist auch der mRNA-Gehalt kein Indikator für die proteolytische Aktivität der Enzyme.

Chambon et al. [94] analysierten den Cathepsin-D-Gehalt der Prostata mit Hilfe zytosolischer und immunhistochemischer Methoden. In der quantitativen Analyse des Zytosols enthielten die Proben aus dem Karzinomgewebe die höchste Aktivität, gefolgt von Adenomen und normalem Gewebe. Die Verteilung der Proben nach immunhistochemischer Analyse hingegen zeigte die stärkste Färbung bei den Adenomproben und einen niedrigeren, fast gleichen Gehalt bei den normalen und Karzinomproben. Die Autoren konnten sich diese Diskrepanz der beiden Methoden nicht erklären.

Von den beschriebenen Verfahren zeigt die von uns genutzte quantitative Aktivitätsbestimmung deutliche Vorteile gegenüber der Immunhistochemie, da sie genauere, nicht nur semiquantitative Daten liefert und gegenüber dem ELISA-Test und der mRNA-Bestimmung vor allem die aktiven Komponenten erfaßt.

## 5.2 Cathepsine B, H, L und Cysteinprotease-Inhibitoren in Gewebeproben der Prostata

Zur Beurteilung des individuellen malignen Potentials eines Prostatakarzinoms wurden bestimmte Methoden entwickelt, die Tumorcharakteristika wie DNA-Ploidie oder die Proliferationsrate mittels zytophotometrischer und immun-histochemischer Verfahren erfaßt [93]. Doch auch unter Berücksichtigung dieser Faktoren konnte man keine, die klassischen histopathologischen Merkmale erweiternde Aussage hinsichtlich des Aggressivitätspotentials treffen [93].

Untersuchungen zur Invasion und Metastasierung verschiedener Tumore deuteten auf die Beteiligung proteolytisch wirkender Enzyme an diesen Vorgängen hin [82].

Die drei von uns untersuchten Cathepsine wurden im Zusammenhang mit ihren endogenen Inhibitoren bis jetzt nur in zwei Studien untersucht, die im folgenden näher beschrieben werden.

Kos et al. [14] untersuchten in ihrer 1995 veröffentlichten Studie die Cathepsine D, B, H, L und die Inhibitoren Stefin A und B im Gewebe von Tumoren des Kopf-Halsbereiches. Gewebeproben von 53 Patienten wurden jeweils paar-weise (normales und tumoröses Gewebe) mittels ELISA-Tests analysiert. Die Aktivitäten der Cathepsine D, B, L waren im Tumorgewebe signifikant höher, die des Cathepsin H dagegen im normalen Gewebe. Stefin A und B zeigten keine Unterschiede. Eine Korrelation mit anderen Merkmalen wie dem Alter der Patienten, Größe des Tumors, Lymphknotenbeteiligung und histologischem Grading wurde nicht gefunden.

In der zweiten Studie aus dem Jahr 1996 wurden ebenfalls Patienten mit Malignomen im Kopf-Halsbereich untersucht [13]. Cathepsin B, D und die Stefine A und B wurden bei 45 Patienten, Cathepsin L bei 24 und Cathepsin H bei 21 Patienten gemessen. Die Ergebnisse entsprechen ebenfalls der erst- genannten Studie- Cathepsine B, L, D im Tumorgewebe erhöht, Cathepsin H erniedrigt und kein Unterschied bei den Stefinen. Kleine Tumore wiesen geringere Konzentrationen der beiden Stefine auf als bereits infiltrierend wachsende. Die Überlebensrate war bei Patienten mit niedrigen Cathepsin-L-Aktivitäten besser als bei hohen Aktivitäten. Diese Relation war für die Stefine genau umgekehrt, d.h. je höher die Konzentration der Inhibitoren, desto besser die Überlebensrate.

Eine Studie über die Cathepsine B, H, L und ihre endogenen hitzestabilen Inhibitoren im Prostatagewebe wurde bisher nicht veröffentlicht.

In den von uns untersuchten Gewebeproben zeigten die Cathepsine B und L im normalen Gewebe die höhere Aktivität bzw. Konzentration. Im Cathepsin-H-Gehalt stellte sich kein signifikanter Unterschied dar. Dies steht in Widerspruch zu den meisten Studien, die im Tumorgewebe höhere Enzymaktivitäten fanden (s. Tabelle 1).

Eine mögliche Erklärung dafür ist die Heterogenität des Prostatagewebes.

Der charakteristische Aufbau besteht aus Drüsenepithel, umgeben von Bindegewebe mit zahlreichen kollagenen und elastischen Fasern sowie glatten Muskelzellen und Nervenfasern [97]. Die drei histologischen Haupt-komponenten sind Epithel, Stroma und Drüsenlumina, wobei das Stroma den größten Anteil ausmacht. Die Relation zwischen Stroma und Epithel wird mit 5:1 [119] bzw. 3,9:1 im Bereich von 1,6:1-7,6:1 [120] angegeben. Diese Relation vergrößert sich noch im Fall der benignen Prostatahyperplasie (BPH), da die epitheliale zugunsten der Stromalen Komponente abnimmt. Es scheint, daß dieses Verhältnis die Cathepsinaktivitäten, die wir in den Gewebeproben ermittelten, beeinflußt. Das Überwiegen der Stromakomponente mit ihren Fibroblasten und glatten Muskelzellen hat somit wohl den größeren Anteil an der Aktivität der Enzyme.

Auch die Verteilung der Cathepsine in den verschieden gewonnen Proben ist uneinheitlich und bedarf der Interpretation.

Adenomektomieproben enthielten zumeist mehr Cathepsin als das tumor-umgebende normale Gewebe oder das von Zystoprostatektomien gewonnene. Die geringsten Aktivitäten fanden sich in den Proben von transurethralen Re-sektionen der Prostata (TURP).

Diese Unterschiede lassen sich zum einen aus der Art der Probengewinnung erklären, möglicherweise sind sie aber auch charakteristisch für den jeweiligen Zustand des Gewebes. Bei radikalen Prostatektomien wird das ganze Organ entnommen und es bietet sich die Möglichkeit, Proben zu entnehmen, die auch histologisch eindeutig gesichert werden können. Somit erhält man normales (nichterkranktes) bzw. benigne und maligne verändertes Gewebe.

Zystoprostatektomien werden als operative Therapie bei Blasenkrebs vorgenommen. Die dabei entfernte Prostata ergibt Proben, die als normal angesehen werden, doch auch hier muß eine sorgfältige histologische Analyse durchgeführt werden, um BPH oder ein Karzinom auszuschließen. Die geringeren Cathepsinaktivitäten im Material der transurethralen Resektionen (TURP) sind sicherlich Folge der Elektroresektion, bei der durch direkten Hitzeeinfluß die Aktivitäten der Enzyme beeinträchtigt werden. Dies ist wahrscheinlich die Ursache der Unterschiede zum Adenomektomie-Gewebe, das ja histologisch gleich ist und demzufolge vergleichbare Aktivitäten zeigen müßte. Die durch Adenomektomie erhaltenen Proben enthalten durchgehend die höchsten Aktivitäten. Eine erhöhte Cathepsinaktivität bei benigner Prostata-hyperplasie ist bis jetzt noch nicht beschrieben worden.

Erklärung bietet eine Studie von Guenette et al. [121], die erhöhte Cathepsin-B-Aktivitäten während der Regression der Prostata der Ratte beschreibt. 3-4 Tage nach Hormonentzug, wenn die Rückbildung der Drüse maximal war, fanden sich die höchsten mRNA-Werte für das RSG-2 Gen. Dieses Gen ist homolog zu Cathepsin B. Es kommt zu einer Umverteilung an die basale Zellmembran und zu einem späteren Zeitpunkt finden sich vermehrte Mengen des Proteins in den apoptotischen Zellen.

### 5.2.1 Korrelation mit anderen Tumormerkmalen

Bei der Korrelation mit den anderen Tumormerkmalen zeigte sich eine Korrelation zwischen Cathepsin H und dem TNM-Staging und eine negative Korrelation zwischen Cathepsin L und dem histologischen Grading. Eine Korrelation zwischen Cathepsin H und TNM-Stadien fand sich in der Literatur nicht. Budinha et al. [13] beschrieben einen Zusammenhang zwischen Höhe der Cathepsin-H-Aktivität und einer verbesserten Überlebensrate bei der Untersuchung von Kopf-Halstumoren. Dies widerspricht dem von uns errechneten Zusammenhang, da Patienten mit fortgeschrittenerem Karzinom im allgemeinen eine schlechtere Überlebensrate haben.

Lah et al. [23] fanden eine negative Korrelation zwischen erhöhter Cathepsin-L-Aktivität und rezidivfreier Überlebenszeit. Das würde heißen, daß geringe Cathepsin-L-Aktivitäten mit einer Verbesserung der Überlebensrate einhergehen. In unserem Fall korrelieren niedrige Aktivitäten des Enzyms mit den undifferenzierteren Tumoren.

Auch dies widerspricht einer verbesserten Überlebensrate.

Betrachtet man die Verteilung der Patienten im Grading und Staging, zeigen sich Ungleichgewichte. Die TNM-Stadien verteilen sich in den 10 Proben folgendermaßen: 1 mal T1, 6 mal T2 und 3 mal T3. Im Grading gibt es 2 mal G1, 7 mal G2 und nur 1 mal G3. Aufgrund dieser Verteilung sind die gefundenen Korrelationen im Hinblick auf die geringe Anzahl der Proben kritisch zu betrachten. Um eine echte Aussage hinsichtlich der Korrelation unserer Cathepsinwerte mit anderen Tumormerkmalen treffen zu können bedarf es sicherlich einer größeren Gruppe und einer Verlaufskontrolle.

### 5.3 Cathepsine B, H, L und Cysteinprotease-Inhibitoren in Primärzellkulturen

Wir fanden in den primären Zellkulturen andere Relationen der Cathepsin-aktivitäten als im Gewebe.

Auch andere Autoren beschreiben Unterschiede zwischen Gewebe und primären Zellkulturen. Festuccia et al. [122] untersuchten die Aktivität des Plasminogen-Aktivators in Primärzellkulturen. Sie empfahlen, die Bestimmung in Primärzellkulturen und nicht in Gewebeproben vorzunehmen.

Die für die Gewebeproben erwartete Erhöhung der Cathepsine in den Tumorproben fand sich erstaunlicherweise in den Primärzellkulturen. Alle drei Cathepsine waren in den Zellkulturen, die aus dem malignen Gewebe etabliert wurden, signifikant erhöht. Das bedeutet, daß bei jedem der 5 Paare, die aus Tumorgewebe angezüchteten Zellen höhere Aktivitäten zeigten, als die aus normalem Gewebe gewonnenen.

Wir schlußfolgern daraus, daß die Untersuchung der Primärzellkulturen genauere und zuverlässigere Ergebnisse bringt, als die Analyse der Gewebeproben. Grund hierfür scheint zu sein, daß die Heterogenität des Gewebes durch die Anzucht primärer Zellkulturen aufgehoben wird. Es wachsen lediglich die epithelialen Zellen, deren Cathepsinaktivitäten ein genaueres Bild des Tumorgeschehens darstellen. Die Charakterisierung dieser Zellen ist nur in Hinsicht auf ihren epithelialen Ursprung möglich.

Es gibt bis jetzt keine zuverlässigen Marker, die zwischen gesunden und malignen Zellen zuverlässig unterscheiden können [97]. So obliegt der sorgfältigen

histologischen Untersuchung des benutzten Gewebes in diesem Fall eine besondere Bedeutung.

Die Konzentration der Cysteinprotease-Inhibitoren zeigte keine Unterschiede zwischen normalen und malignen Zellkulturen. Nachdem wir aber die Relation für alle Cathepsine insgesamt zu den CPI errechnet hatten, stellte sich diese für die Tumorzellen signifikant erhöht dar. Das unterstützt die Theorie, daß auch dem Prostatakarzinom ein verschobenes proteolytisches Gleichgewicht, im Sinne von erhöhten Cathepsinwerten und unzureichend vorhandenen Inhibitoren, zugrundeliegt. Im Hinblick auf Invasion und Metastasierung des Tumors scheint dieses Verhältnis eine größere Bedeutung zu haben als Aktivität der Cathepsine oder der CPI allein [123].

Ein ähnliches Ungleichgewicht wurde bereits für Metalloproteasen und ihre Gewebsinhibitoren beschrieben [124].

### 5.3.1 Korrelation mit anderen Tumormerkmalen

In Bezug auf andere Tumormerkmale (Grading und Staging) konnten wir bei den Primärzellkulturen keine Korrelation finden. Das liegt sicherlich an der sehr kleinen Anzahl der Patienten und der damit verbundenen Verteilung der Patienten im Grading und Staging. Von den 5 Proben wiesen beim Grading vier ein G3 auf, 1 ein G2. G1 war in dieser Gruppe gar nicht vertreten. In der TNM-Klassifizierung sieht die Verteilung ähnlich aus: 3 mal T3 und 2 mal T2, T1 war wiederum nicht vertreten.

## 5.4 Permanente Zellkulturen

Die Cathepsine B, H und L sind bis jetzt noch nicht systematisch in den drei immortalen Zelllinien LNCaP, PC3 und DU145 untersucht worden. Es gibt daher keine direkt vergleichbaren Studien.

Weiss et al. [125] untersuchten die Expression verschiedener Proteasen in den

Zelllinien LNCaP und DU145. Sie fanden, daß Cathepsin B in den androgen-insensitiven DU145 erhöht war. Da die LNCaP-Zelllinie androgen-sensitiv ist, schlußfolgern die Autoren daraus, daß die erhöhte Cathepsinaktivität mit dem aggressiveren, entdifferenzierten Phänotyp einhergeht. Androgen-insensitive Zelllinien entstehen unter dem Einfluß einer antiandrogenen Therapie und sind dann zumeist kennzeichnend für ein fortgeschrittenes Prostatakarzinom.

Dies entspricht nur zum Teil unseren Ergebnissen. Die DU145-Zellen zeigten bei allen drei Cathepsinen höhere Aktivitäten als die LNCaP-Zellen. Die ebenfalls androgen-insensitive PC3-Zelllinie lag aber im Cathepsingehalt noch niedriger als die LNCaP-Zellen. Der angenommene Unterschied, daß die androgen-insensitiven Zellkulturen ein größeres malignes Potential besitzen, spiegelt sich im Cathepsingehalt nicht wieder.

Neben der Androgen-Sensitivität gibt es noch andere Merkmale, die diese Zelllinien charakterisieren. Tumorsuppressorgene sind ein bedeutender Faktor in der Ätiologie vieler Krebsarten, gekennzeichnet durch den Verlust oder Mutationen der kodierten Proteine in den malignen Zellen. Produkte der Tumorsuppressorgene, z.B. p53 und Rb, sind negative Regulatoren des Zellzyklus. Änderungen ihrer Expression tragen zur Entwicklung der malignen Transformation bei. Mutationen des p53 sind assoziiert mit metastatisierenden Prostatakarzinomen [126]. Mutationen des p53 lagen bei DU145 und PC3 vor, jedoch nicht in LNCaP-Zellen. Also bietet sich auch hier keine Erklärung der von uns gefundenen Cathepsinverteilung, da wiederum DU145 und PC3 Zeichen einer höheren Malignität zeigen, die sich nicht in der Aktivität der Cathepsine widerspiegelt. Das Verteilungsschema scheint in etwa mit dem anderen Tumorsuppressorprotein, dem Rb, zu korrelieren. LNCaP und PC3 exprimieren ein normales Rb-Protein, während das Gen in den DU145-Zellen eine Mutation mit einem Verlust von 105 Nukleotiden zeigt [98].

Da jedoch verschiedene Mechanismen bei der Invasivität und Metastasierung zusammenspielen, bleibt bisher ungeklärt, warum sich die beiden androgen-insensitiven Zelllinien so im Cathepsingehalt unterscheiden.

Eine andere mögliche Erklärung wäre, daß sich die Zelllinien nach so langer Kultivierung in ihren Merkmalen verändert haben und deshalb die Cathepsin-werte nicht mehr mit den bekannten Malignitätskriterien übereinstimmen. Solche veränderten Expressionen sind möglich und wurden z.B. für das Verhältnis der antioxidativen Enzyme in den drei von uns untersuchten Prostatazelllinien

beschrieben [127]. Aus diesem Grund haben wir beide androgen-insensitiven Zelllinien (PC3 und DU145) mitgeführt, um einen Vergleich zu haben.

Der Einfluß spezifischer Bedingungen in der Kultur ist unserer Ansicht auch dafür verantwortlich, daß kein Zusammenhang zu den Primärzellkulturen erkennbar ist. Die in den immortalisierten Zellen gemessenen Aktivitäten liegen um ein vielfaches höher als in den primären Zellkulturen. Betrachtet man hingegen die CPI-Konzentrationen, so liegen diese unter den Werten der Primärzellkulturen. Diese Diskrepanzen erschweren einen Vergleich von primären mit immortalisierten Zellkulturen der Prostata.

Wir sind daher der Ansicht, daß sich die permanenten Zelllinien LNCaP, DU145 und PC3 nicht für Untersuchungen über eine mögliche Beziehung zwischen Proteasen und der Entwicklung des Prostatakarzinoms eignen.

#### 5.4.1 Ammoniumchlorid-stimulierte Zellkulturen

Neben der Erhöhung der Cathepsine in Tumorgeweben hat man auch gefunden, daß maligne Zellen in Kultur vermehrt Cathepsine sezernieren [25]. Die Menge des sezernierten Enzyms war in Adenokarzinomzellen signifikant höher als in Fibroadenomzellen.

Die Stimulierung der drei immortalisierten Zelllinien LNCaP, PC3 und DU145 erfolgte in Anlehnung an eine Studie von Keppler et al. [52], die ihre Untersuchungen an Kolonkarzinomzelllinien durchführten. Deren Ziel war es, festzustellen, ob die Akkumulierung des latenten Cathepsin B im Kulturmedium im Zusammenhang mit der begleitenden Sekretion des Inhibitors Cystatin C steht.

Ammoniumchlorid ist eine azidophile Substanz, von der bekannt ist, daß sie in sauren Kompartimenten akkumuliert. Dadurch steigt der pH-Wert auf über 8,0 und somit ist die Aufnahme der lysosomalen Enzyme über Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren blockiert. Aus diesem Grund wird neusynthetisiertes Cathepsin B sezerniert.

Die Untersuchung 10 verschiedener Kolonkarzinomzelllinien ergab, daß durch Stimulierung mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  die Cathepsin-B-Sekretion erhöht wurde, die Sekretion des Cystatin C jedoch unbeeinflusst blieb. Die Autoren schlußfolgerten, daß latentes Cathepsin B ein echtes Proenzym ist und kein Enzym-Inhibitor-Komplex. Die

Behandlung mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  resultierte in einer erhöhten Sekretion von Cathepsin B in 9 von 10 Fällen und als Folge in einen Abfall des intrazellulären Cathepsingehaltes in 7 von 10 Fällen. Die Cystatin-C-Konzentration änderte sich nicht signifikant.

In unserem Fall diente die Stimulierung mit Ammoniumchlorid als Modell für den Einfluß exogener Substanzen auf das proteolytische Verhältnis.

Bei den von uns untersuchten Zelllinien zeigte sich wieder ein ähnliches Verteilungsmuster der drei Zelllinien vor und nach Stimulierung. Generell sezernierten DU145-Zellen die meisten Cathepsine gefolgt von LNCaP und PC3. Die Stimulierung führte in den meisten Fällen zu einem Abfall der Cathepsin-Konzentration im Zellysatz und einem Anstieg im Überstand. Diese Differenz war aber in nur wenigen Fällen signifikant.

Das Bild bei den Cysteinprotease-Inhibitoren sieht anders aus. Hier kommt es in den stimulierten Zellen sowohl intra- als auch extrazellulär zu einem Anstieg der Konzentration. Bemerkenswert ist hier auch, daß die Konzentration im Überstand um zwei Größenordnungen über der im Zellysatz liegt.

Aus diesen Ergebnissen leitet sich ab, daß die Sekretion der Cathepsine wahrscheinlich andere Mechanismen beinhaltet als die Sekretion der Inhibitoren. Außerdem scheint eine Stimulierung durch exogene Substanzen vor allem die Sekretion der Inhibitoren und weniger der Cathepsine zur Folge zu haben.

## 6 Ausblick

Wir haben mit dieser Arbeit einen ersten Versuch unternommen, die Cathepsine und ihre Inhibitoren hinsichtlich ihrer Beteiligung am Prostatakarzinom und als mögliche Prognosefaktoren einzuschätzen.

Dabei hat sich gezeigt, daß eine einfache Analyse der bei Operationen gewonnenen Gewebeproben keine eindeutig interpretierbaren Aktivitätswerte ergibt.

Die wichtigste Aussage, die sich aus unseren Ergebnissen ableitet ist, daß sich Gewebeproben der Prostata in der Cathepsinaktivität umgekehrt verhalten wie Primärzellkulturen.

Durch die Anzucht von Primärzellkulturen erreichten wir eine Verbesserung der Aussagekraft hinsichtlich des proteolytischen Gleichgewichts. Da die Aufzucht der Zellen sehr aufwendig und nicht immer erfolgreich ist, empfiehlt sich dieses Verfahren nicht für den klinischen Gebrauch. Auch in der Korrelation mit anderen Tumormerkmalen zeigten sich keine klaren Zusammenhänge, dies sicherlich aufgrund der kleinen Fallzahlen.

Bei anderen Karzinomen war es möglich, erhöhte Enzymaktivitäten in Geweben und Kulturen mit Stadien der malignen Transformation und Metastasierung zu korrelieren. Für das Mammakarzinom wurde Cathepsin B, vergleichbar mit dem Lymphknotenstatus, als unabhängiger prognostischer Faktor eingeschätzt [19]. In einer anderen Studie über Brustkrebs zeigte sich eine direkte Korrelation zwischen Cathepsin-B-Gehalt und dem Tumorstadium [18]. Diesen Zusammenhang fand man auch für kolorektale Tumoren [33]. Auch bei Adenokarzinomen der Lunge war Cathepsin B korreliert mit der 5-Jahres-Überlebensrate und wurde als unabhängiger Prognosefaktor gewertet [27].

Größere, besser kontrollierte Studien mit standardisierter Methodik sind nötig, um die genaue Rolle der Cathepsinbestimmung als klinischen Parameter mit Sicherheit zu etablieren [60].

Die Rolle der Proteaseinhibitoren als potentielle Therapeutika tritt immer mehr in den Vordergrund [128]. Bjornland et al. [129] haben in einem in vitro Modell des malignen Melanoms nachgewiesen, daß die Invasivität der Zellen durch den synthetischen Inhibitor E-64 gehemmt wird.

Man vermutet, daß Protease-Inhibitoren eine signifikante zytostatische Aktivität gegen den Primärtumor und bereits etablierte metastatische Läsionen haben. Die

Blockade der proteolytischen Aktivität des Tumors kann dann zu einer Stimulation der Stromalen Komponente führen, die zu einer Einkapselung des Tumors führt, der dann leichter resezierbar wäre [128].

Der entscheidende Schritt beim Einsatz der Proteaseinhibitoren ist weniger die Entdeckung eines effektiven Inhibitors, als die Untersuchung der genauen Wirkmechanismen und eventueller Langzeitnebenwirkungen.

Anhand unserer Ergebnisse schlußfolgern wir, daß Untersuchungen an Primärzellkulturen der Prostata im Forschungsbereich auch weiterhin sinnvoll sind. Die Anzucht von Stromazellen würde dabei einen wichtigen Beitrag leisten und den Vergleich mit den epithelialen Zellkulturen ermöglichen.

## 7 Zusammenfassung

Die Cathepsine B, H und L sind lysosomale Enzyme aus der Familie der Cysteinproteasen. Die Hauptfunktion der Cathepsine besteht im intrazellulären Abbau von Eiweißmolekülen, deren Bausteine dann wieder zur Synthese neuer Proteine dienen.

Normalerweise befinden sich die Cathepsine in den Lysosomen der Zellen. Unter besonderen Bedingungen ist es jedoch möglich, daß sie sezerniert oder freigesetzt werden. Die daraus resultierende extrazelluläre Proteolyse führt zu pathologischen Veränderungen des Gewebes. In vielen Studien konnte ein erhöhter Cathepsingehalt mit verschiedenen entzündlichen, degenerativen und malignen Erkrankungen assoziiert werden.

Bei den bisher untersuchten Gewebeproben verschiedener Neoplasien (Lunge, Magen-Darm, Brustdrüse) zeigte Tumorgewebe, im Vergleich zu nicht-erkranktem Gewebe des selben Organs, signifikant höhere Konzentrationen der Cathepsine B, H und L.

Unter physiologischen Bedingungen wird die Aktivität der Cysteinproteasen von endogenen Inhibitoren (Cystatine, Stefine, Kininogene) kontrolliert. Eine Verminderung dieser Cysteinprotease-Inhibitoren (CPI) würde die proteo-lytische Dysbalance verstärken und zur Ausbreitung des malignen Prozesses beitragen.

Wir untersuchten Gewebeproben und Zellkulturen der Prostata unter Einsatz spezifischer Substrate, die zur Bildung fluorogener Produkte führten. Über die Quantifizierung mit einem Spektrofluorophotometer wurde die Aktivität der Proben errechnet.

Die Gewebeproben beinhalteten 10 Paare von malignem und nichterkranktem Prostatagewebe (entnommen aus dem selben Organ), 9 Proben von Adenomektomien, 6 Proben von transurethralen Resektionen der Prostata und 6 Proben von Zystoprostatektomien. Weitere 5 Paare von tumorösem und nichterkranktem Gewebe wurden zur Anzucht von Primärzellkulturen genutzt. Vergleichend dazu untersuchten wir jeweils 5 Proben der immortalisierten Zelllinien LNCaP, DU145 und PC3.

Die Ergebnisse der Gewebeproben zeigten höhere Aktivitäten der Cathepsine B und L im normalen Gewebe, nicht wie erwartet im Tumorgewebe. Cathepsin H zeigte keine signifikanten Unterschiede. Gewebeproben von Adenomektomien und

Zystoprostatektomien wiesen höhere Aktivitäten als Proben von trans-urethralen Resektionen auf. Die Konzentration der Cysteinprotease-Inhibitoren war im normalen Gewebe signifikant höher als im Tumorgewebe.

Bei den Primärzellkulturen waren die Cathepsine B, H und L in den Tumor-proben signifikant erhöht. Die Cysteinprotease-Inhibitoren wiesen keine Unterschiede auf. Die drei immortalisierten Zelllinien zeigten die gleiche Verteilung bei allen Cathepsinen, DU145 mit der höchsten Aktivität, gefolgt von LNCaP und PC3.

Aus den ermittelten Werten wurden die Quotienten Cathepsine/CPI gebildet. Die 10 Probenpaare vom Gewebe der Prostata zeigten keinen signifikanten Unterschied. Die Quotienten bei den Primärzellkulturen unterschieden sich signifikant, im Sinne einer proteolytischen Dysbalance, zwischen nicht-befallenem und Tumorproben des selben Organs.

Anhand der Ergebnisse schlußfolgern wir, daß die Untersuchung von Gewebeproben der Prostata hinsichtlich der Beteiligung der Cathepsine am Tumorgeschehen keine eindeutigen Erkenntnisse erbringt. Dies ist vermutlich auf die Heterogenität des Gewebes zurückzuführen, das nicht nur epitheliale, sondern auch stromale Zellen enthält. Die aus dem Gewebe angezüchteten Primärzellkulturen scheinen ein genaueres Bild des Verhältnisses von Cathepsinen und den Inhibitoren zu geben und sind unserer Meinung nach den Bestimmungen in Gewebeproben vorzuziehen.

## Literaturverzeichnis

1. Statistisches Jahrbuch für die Bundesrepublik Deutschland. Stuttgart: Verlag Metzler-Poeschel, 1996:430-3.
2. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer Statistics, 1997. *CA Cancer J Clin* 1997;47:5-27.
3. Männliche Geschlechtsorgane. In: Bühling KJ, Lepenies J, Witt K, eds. *Intensivkurs: Allgemeine und Spezielle Pathologie*. München, Wien, Baltimore: Urban&Schwarzenberg, 1995:290-7.
4. Pienta KJ, Esper PS. Risk factors for prostate cancer. *Ann Intern Med* 1993;118:793-803.
5. Hall RR. Screening and early detection of prostate cancer will decrease morbidity and mortality from prostate cancer: the argument against. *Eur Urol* 1996;29 Suppl. 2:24-6.
6. Marley GM, Miller MC, Kattan MW, Zhao G, Patton KP, Vessela RL, et al. Free and complexed prostate-specific antigen serum ratios to predict probability of primary prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Urology* 1996;48 (6A Suppl.):16-22.
7. Waterbor JW, Bueschen AJ. Prostate cancer screening (United States). *Cancer Causes Control* 1995;6:267-74.
8. Siewinski M, Gutowicz J, Zarzycki A, Mikulewicz W. Role of Cysteine Endopeptidases in Cancerogenesis. *Cancer Biother Radiopharm* 1996; 11:169-76.
9. Buck MR, Karustis DG, Day NA, Honn KV, Sloane BF. Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem J* 1992;282:273-8.
10. Calkins CC, Sloane BF. Mammalian cysteine protease inhibitors: biochemical properties and possible roles in tumor progression. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995;376:71-80.
11. Guinec N, Dalet Fumeron V, Pagano M. "In vitro" study of basement membrane degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B, B-like and L. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1993;374:1135-46.
12. Noel A, Emonard H, Polette M, Birembaut P, Foidart JM. Role of

matrix, fibroblasts and type IV collagenases in tumor progression and invasion. *Pathol Res Pract* 1994;190:934-41.

13. Budihna M, Strojjan P, Smid L, Skrk J, Vrhovec I, Zupevc A, et al. Prognostic value of cathepsins B, H, L, D and their endogenous inhibitors stefins A and B in head and neck carcinoma. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1996;377:385-90.

14. Kos J, Smid A, Krasovec M, Svetic B, Lenarcic B, Vrhovec I, et al. Lysosomal proteases cathepsins D, B, H, L and their inhibitors stefins A and B in head and neck cancer. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376:401-5.

15. Sivaparvathi M, Yamamoto M, Nicolson GL, Gokaslan ZL, Fuller GN, Liotta LA, et al. Expression and immunohistochemical localization of cathepsin L during the progression of human gliomas. *Clin Exp Metastasis* 1996;14:27-34.

16. Sivaparvathi M, McCutcheon I, Sawaya R, Nicolson GL, Rao JS. Expression of cysteine protease inhibitors in human gliomas and meningiomas. *Clin Exp Metastasis* 1996;14:344-50.

17. Shuja S, Murnane MJ. Marked increases in cathepsin B and L activities distinguish papillary carcinoma of the thyroid from normal thyroid or thyroid with non-neoplastic disease. *Int J Cancer* 1996;66:420-6.

18. Benitez Bribiesca L, Martinez G, Ruiz MT, Gutierrez Delgado F, Utrera D. Proteinase activity in invasive cancer of the breast. *Arch Med Res* 1995;26 Spec No:S163-8.

19. Budihna M, Skrk J, Zakotnik B, Gabrijelcic D, Lindtner J. Prognostic value of total cathepsin B in invasive ductal carcinoma of the breast. *Eur J Cancer* 1995;31A:661-4.

20. Gabrijelcic D, Svetic B, Spaic D, Skrk J, Budihna M, Dolenc I, et al. Cathepsins B, H and L in human breast carcinoma. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992;30:69-74.

21. Krepela E, Vicar J, Cernoch M. Cathepsin B in human breast tumor tissue and cancer cells. *Neoplasma* 1989;36:41-52.

22. Lah TT, Kokalj Kunovar M, Drobnic Kosorok M, Babnik J, Golouh R, Vrhovec I, et al. Cystatins and cathepsins in breast carcinoma. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1992;373:595-604.

23. Lah TT, Kokalj Kunovar M, Strukelj B, Pungercar J, Barlic Maganja

D, Drobnic Kosorok M, et al. Stefins and lysosomal cathepsins B, L and D in human breast carcinoma. *Int J Cancer* 1992;50:36-44.

24. Lah TT, Calaf G, Kalman E, Shinde BG, Russo J, Jarosz D, et al. Cathepsins D, B and L in breast carcinoma and in transformed human breast epithelial cells (HBEC). *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376:357-63.

25. Recklies AD, Tiltman KJ, Stoker TA, Poole AR. Secretion of proteinases from malignant and nonmalignant human breast tissue. *Cancer Res* 1980;40:550-6.

26. Ebert W, Knoch H, Werle B, Trefz G, Muley T, Spiess E. Prognostic value of increased lung tumor tissue cathepsin B. *Anticancer Res* 1994;14:895-9.

27. Inoue T, Ishida T, Sugio K, Sugimachi K. Cathepsin B expression and laminin degradation as factors influencing prognosis of surgically treated patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 1994;54:6133-6.

28. Werle B, Ebert W, Klein W, Spiess E. Cathepsin B in tumors, normal tissue and isolated cells from the human lung. *Anticancer Res* 1994;14:1169-76.

29. Werle B, Julke B, Lah T, Spiess E, Ebert W. Cathepsin B fraction active at physiological pH of 7.5 is of prognostic significance in squamous cell carcinoma of human lung. *Br J Cancer* 1997;75:1137-43.

30. Farinati F, Herszenyi L, Plebani M, Carraro P, De Paoli M, Cardin R, et al. Increased levels of cathepsin B and L, urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type-1 as an early event in gastric carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1996;17:2581-7.

31. Plebani M, Herszenyi L, Cardin R, Roveroni G, Carraro P, Paoli MD, et al. Cysteine and serine proteases in gastric cancer. *Cancer* 1995;76:367-75.

32. Watanabe M, Higashi T, Hashimoto M, Tomoda I, Tominaga S, Hashimoto N, et al. Elevation of tissue cathepsin B and L activities in gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 1987;34:120-2.

33. Campo E, Munoz J, Miquel R, Palacin A, Cardesa A, Sloane BF, et al. Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlates with tumor progression and shortened patient survival [see comments]. *Am J Pathol* 1994;145:301-9.

34. Jessup JM. Cathepsin B and other proteases in human colorectal carcinoma [comment]. *Am J Pathol* 1994;145:253-62.
35. Satoh Y, Higashi T, Nouse K, Shiota T, Kinugasa N, Yoshida K, et al. Cathepsin B in the growth of colorectal cancer: increased activity of cathepsin B in human colorectal cancer. *Acta Med Okayama* 1996;50:305-11.
36. Sheahan K, Shuja S, Murnane MJ. Cysteine protease activities and tumor development in human colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1989; 49:3809-14.
37. Shuja S, Sheahan K, Murnane MJ. Cysteine endopeptidase activity levels in normal human tissues, colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer* 1991;49:341-6.
38. Adenis A, Huet G, Zerimech F, Hecquet B, Balduyck M, Peyrat JP. Cathepsin B, L, and D activities in colorectal carcinomas: relationship with clinico- pathological parameters. *Cancer Lett* 1995;96:267-75.
39. Keppler D, Fondaneche MC, Dalet-Fumeron V, Pagano M, Burtin P. Immunohistochemical and Biochemical Study of a Cathepsin B-like Proteinase in Human Colonic Cancers. *Cancer Res* 1988;48:6855-62.
40. Corticchiato O, Cajot J-F, Abrahamson M, Chan SJ, Keppler D. Cystatin C and Cathepsin B in Human Colon Carcinoma: Expression by Cell Lines and Matrix Degradation. *Int J Cancer* 1992;52:645-52.
41. Weiss RE, Liu BC, Ahlering T, Dubeau L, Droller MJ. Mechanisms of human bladder tumor invasion: role of protease cathepsin B. *J Urol* 1990; 144:798-804.
42. Makarewicz R, Drewa G. A possible application of cathepsin B activity determination for estimating the spread of the cervix uteri carcinoma. *Acta Biochim Pol* 1996;43:521-4.
43. Chauhan SS, Goldstein LJ, Gottesman MM. Expression of cathepsin L in human tumors. *Cancer Res* 1991;51:1478-81.
44. Sinha AA, Wilson MJ, Gleason DF, Reddy PK, Sameni M, Sloane BF. Immunohistochemical localization of cathepsin B in neoplastic human prostate. *Prostate* 1995;26:171-8.
45. Söderström KO, Laato M, Wu P, Hopsu Havu VK, Nurmi M, Rinne A. Expression of acid cysteine proteinase inhibitor (ACPI) in the normal human prostate, benign prostatic hyperplasia and adenocarcinoma. *Int J Cancer*

1995;62:1-4.

46. Rozhin J, Wade RL, Honn KV, Sloane BF. Membrane-associated cathepsin L: a role in metastasis of melanomas [published erratum appears in *Biochem Biophys Res Commun* 1989 Dec 29;165(3):1444]. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;164:556-61.

47. Sloane BF, Honn KV, Sadler JG, Turner WA, Kimpson JJ, Taylor JD. Cathepsin B activity in B16 melanoma cells: a possible marker for metastatic potential. *Cancer Res* 1982;42:980-6.

48. Wilson MJ. Proteases in prostate development, function, and pathology. *Microsc Res Techniq* 1995;30:305-18.

49. Barrett AJ. The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. *Biomed Biochim Acta* 1986;45:1363-74.

50. Chapman HA, Riese RJ, Shi GP. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* 1997;59:63-88.

51. Uchiyama Y, Waguri S, Sato N, Watanabe T, Ishido K, Kominami E. Review: Cell and Tissue Distribution of Lysosomal Cysteine Proteinases, Cathepsins B, H, and L, and their Biological Roles. *Acta Histochem Cytochem* 1994;27:287-308.

52. Keppler D, Waridel P, Abrahamson M, Bachmann D, Berdoz J, Sordat B. Latency of Cathepsin B secreted by human colon carcinoma cells is not linked to secretion of cystatin C and is relieved by neutrophil elastase. *Biochim Biophys Acta* 1994;1226:117-25.

53. Mason RW. Species variations amongst lysosomal cysteine proteinases [published erratum appears in *Biomed Biochim Acta* 1987;46(7): following 650]. *Biomed Biochim Acta* 1986;45:1433-40.

54. Katunuma N, Kominami E. Lysosomal thiol cathepsins and their endogenous inhibitors. *Prog Clin Biol Res* 1985;180:71-9.

55. Chapman HA, Jr., Munger JS, Shi GP. The role of thiol proteases in tissue injury and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:S155-9.

56. Segundo BS, Chan SJ, Steiner DF. Identification of cDNA clones encoding a precursor of rat liver cathepsin B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:2320-4.

57. Ishido K, Imajoh S, Emori Y, Ohno S, Kawasaki H, Minami Y, et al. Molecular cloning and sequencing of cDNA for rat cathepsin H. *FEBS Lett*

1987;226:33-7.

58. Ishido K, Towatari T, Imajoh S, Kawasaki H, Kominami E, Katunuma N, et al. Molecular cloning and sequencing of cDNA for rat cathepsin L. *FEBS Lett* 1987;223:69-73.

59. Turk B, Bieth JG, Bjork I, Dolenc I, Turk D, Cimerman N, et al. Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995;376:225-30.

60. Schwartz MK. Tissue cathepsins as tumor markers. *Clin Chim Acta* 1995;237:67-78.

61. Mort JS, Buttle DJ. Molecules in focus: Cathepsin B. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:715-20.

62. Koolman J, Röhm K-H. *Taschenatlas der Biochemie*, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1994:146-7.

63. Takahashi S, Murakami K, Miyake Y. Activation of kidney prorenin by kidney cathepsin B isoenzyme. *J Biochem* 1982;91:419-22.

64. Bernstein HG, Kirschke H, Wiederanders B, Pollak KH, Zipress A, Rinne A. The possible place of cathepsins and cystatins in the puzzle of Alzheimer disease: a review. *Mol Chem Neuropathol* 1996;27:225-47.

65. Mantle D, Falkous G, Ishiura S, Perry RH, Perry EK. Comparison of cathepsin protease activities in brain tissue from normal cases and cases with Alzheimer's disease, Lewy body dementia, Parkinson's disease and Huntington's disease. *J Neurol Sci* 1995;131:65-70.

66. Kakegawa H, Nikawa T, Tagami K, Kamioka H, Sumitani K, Kawata T, et al. Participation of cathepsin L on bone resorption. *FEBS Lett* 1993;321:247-50.

67. Schaefer L, Han X, Gretz N, Schaefer RM. Alterations of cathepsins B, H and L in proximal tubules from polycystic kidneys of the Han:SPRD rat. *Kidney Int* 1996;50:424-31.

68. Trabandt A, Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Gay RE, Gay S. Expression of proteolytic cathepsins B, D, and L in periodontal gingival fibroblasts and tissues. *Lab Invest* 1995;73:205-12.

69. Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Cysteine proteinases in arthritis and inflammation. *Perspect Drug Discov Design* 1996;6:87-98.

70. Lenarcic B, Gabrijelcic D, Rozman B, Drobnic Kosorok M, Turk V. Human cathepsin B and cysteine proteinase inhibitors (CPIs) in inflammatory and metabolic joint diseases. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1988;369 Suppl:257-61.
71. Bever CT, Jr., Garver DW. Increased cathepsin B activity in multiple sclerosis brain. *J Neurol Sci* 1995;131:71-3.
72. Lenarcic B, Krizaj I, Zunec P, Turk V. Differences in specificity for the interactions of stefins A, B and D with cysteine proteinases. *FEBS Lett* 1996;395:113-8.
73. Leonardi A, Turk B, Turk V. Inhibition of bovine cathepsins L and S by stefins and cystatins. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1996;377:319-21.
74. Turk V, Brzin J, Longer M, Ritonja A, Eropekin M, Borchart U, et al. Protein inhibitors of cysteine proteinases. III. Amino-acid sequence of cystatin from chicken egg white. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem* 1983;364:1487-96.
75. Henskens YM, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Cystatins in health and disease. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1996;377:71-86.
76. Turk V, Brzin J, Kotnik M, Lenarcic B, Popovic T, Ritonja A, et al. Human cysteine proteinases and their protein inhibitors stefins, cystatins and kininogens. *Biomed Biochim Acta* 1986;45:1375-84.
77. Barrett AJ, Rawlings ND, Davies ME, Machleidt W, Salvesen G, Turk V. Cysteine proteinase inhibitors of the cystatin superfamily. In: Dingle JT, Gordon JL, eds. *Research monographs in cell and tissue physiology*. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier Science Publishers BV, 1986:515-69.
78. Filler G, Witt I, Priehm F, Ehrich JHH, Jung K. Are Cystatin C and b2-microglobulin better markers than serum creatinine for prediction of a normal glomerular filtration rate? *Clin Chem* 1997;43:1077-8.
79. Finney H, Newman DJ, Gruber W, Merle P, Price CP. Initial evaluation of Cystatin C measurement by particle-enhanced immunonephelometry on the Behring nephelometer systems (BNA, BN II). *Clin Chem* 1997; 43:1016-22.
80. Liotta LA, Stetler Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 1997;51 (Suppl):5054S-9S.
81. Keppler D, Sameni M, Moin K, Mikkelsen T, Diglio CA, Sloane BF.

Tumor progression and angiogenesis: cathepsin B & Co. *Biochem Cell Biol* 1996;74:799-810.

82. Kohn EC. Development and prevention of metastasis. *Anticancer Res* 1993;13:2553-9.

83. Leto G, Tumminello FM, Pizzolanti G, Montalto G, Soresi M, Gebbia N. Lysosomal cathepsins B and L and Stefin A blood levels in patients with hepatocellular carcinoma and/or liver cirrhosis: potential clinical implications. *Oncology* 1997;54:79-83.

84. Tumminello FM, Leto G, Pizzolanti G, Candiloro V, Crescimanno M, Crosta L, et al. Cathepsin D, B and L circulating levels as prognostic markers of malignant progression. *Anticancer Res* 1996;16:2315-9.

85. Assfalg Machleidt I, Jochum M, Klaubert W, Inthorn D, Machleidt W. Enzymatically active cathepsin B dissociating from its inhibitor complexes is elevated in blood plasma of patients with septic shock and some malignant tumors. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1988;369 Suppl:263-9.

86. Takahashi H, Ishidoh K, Muno D, Ohwada A, Nukiwa T, Kominami E, et al. Cathepsin L activity is increased in alveolar macrophages and bronchoalveolar lavage fluid of smokers. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:1562-8.

87. Hirano T, Manabe T, Takeuchi S. Serum cathepsin B levels and urinary excretion of cathepsin B in the cancer patients with remote metastasis. *Cancer Lett* 1993;70:41-4.

88. Kirschke H, Clausen T, Göhring B, Günther D, Heucke E, Laube F, et al. Concentrations of lysosomal cysteine proteases are decreased in renal cell carcinoma compared with normal kidney. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997;7:402-6.

89. Sinha AA, Gleason DF, Staley NA, Wilson MJ, Sameni M, Sloane BF. Cathepsin B in angiogenesis of human prostate: an immuno-histochemical and immunoelectron microscopic analysis. *Anat Rec* 1995;241:353-62.

90. Sinha AA, Gleason DF, Deleon OF, Wilson MJ, Sloane BF. Localization of a biotinylated cathepsin B oligonucleotide probe in human prostate including invasive cells and invasive edges by in situ hybridization. *Anat Rec* 1993;235:233-40.

91. Ross JS, Nazeer T, Figge HL, Fisher HA, Rifkin MD. Quantitative

immunohistochemical determination of cathepsin D levels in prostatic carcinoma biopsies. *Am J Clin Pathol* 1995;104:36-41.

92. Moul JW, Maygarden SJ, Ware JL, Mohler JL, Maher PD, Schenkman NS, et al. Cathepsin D and epidermal growth factor receptor immunohistochemistry does not predict recurrence of prostate cancer in patients undergoing radical prostatectomy. *J Urol* 1996;155:982-5.

93. Kuczyk MA, Serth J, Bokemeyer C, Höfner K, Anton P, Thon WF, et al. Expression der Aspartylprotease Kathepsin D an Prostatakarzinomen und benigner Prostatahyperplasie. *Akt Urol* 1995;26:270-4.

94. Chambon M, Rebillard X, Rochefort H, Brouillet JP, Baldet P, Guiter J, et al. Cathepsin D cytosolic assay and immunohistochemical quantification in human prostate tumors. *Prostate* 1994;24:320-5.

95. UICC. TNM Klassifikation maligner Tumoren. Berlin: Springer, 1992: 141-65.

96. Cronauer MV, Klocker H, Talasz H, Geisen FH, Hobisch A, Radmeyer C, et al. Inhibitory effects of the nucleoside analogue gemcitabine on prostatic cells. *Prostate* 1996;28:172-81.

97. Peehl DM. Culture of Human Prostatic Epithelial Cells. In: Freshney RI, ed. *Culture of Epithelial Cells*. New York: Wiley-Liss, 1992:159-80.

98. Webber MM, Bello D, Quader S. Immortalized and Tumorigenic Adult Human Prostatic Epithelial Cell Lines: Characteristics and Applications. Part 3. Oncogenes, Suppressor Genes, and Applications. *Prostate* 1997;30:136-42.

99. Webber MM, Bello D, Quader S. Immortalized and Tumorigenic Adult Human Prostatic Epithelial Cell Lines: Characteristics and Applications Part 2. Tumorigenic Cell Lines. *Prostate* 1997;30:58-64.

100. Webber MM, Bello D, Quader S. Immortalized and Tumorigenic Adult Human Prostatic Epithelial Cell Lines: Characteristics and Applications Part1. Cell Markers and Immortalized Nontumorigenic Cell Lines. *Prostate* 1997;29:386-94.

101. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 1979;17:16-23.

102. Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* 1978; 21:274-

81.

103. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 1983;43:1809-18.

104. Barrett AJ, Kembhavi AA, Brown MA, Kirschke H, Knight CG, Tamai M, et al. L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem J* 1982;201:189-98.

105. Murata M, Miyashita S, Yokoo C, Tamai M, Hanada K, Hatayama K, et al. Novel epoxy succinyl peptides. *FEBS Lett* 1991;280:307-10.

106. Barrett AJ, Kirschke H. Cathepsin B, Cathepsin H, and Cathepsin L. In: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1981:535-61.

107. Barrett AJ. Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. *Biochem J* 1980;187:909-12.

108. Turk V, Kregar I. Cathepsin B, Cathepsin H, and Cathepsin L. In: Bergemeyer HU, Bergemeyer J, Grassl M, eds. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim; Deerfield Beach, Florida; Basel: Verlag Chemie, 1984:195-210.

109. Riemann S, Kirschke H, Wiederanders B, Brouwer A, Shaw E, Bohley P. Inhibition of cysteine proteinase activity by Z-Phe-Phe-diazomethane and of aspartic proteinase activity by pepstatin in different organs from some animals and isolated cells from rat liver. *Acta Biol Med Ger* 1982;41:83-8.

110. Bradford M. A rapid sensitive method for the quantification of  $\mu\text{g}$  quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.

111. Sano M, Wada Y, Kominami E, Katunuma N, Tsukagoshi H. Immunolocalization of Cathepsins B, H and L in skeletal muscle of x-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol* 1988; 217:225-9.

112. Mickey DD, Stone KR, Wunderli H, Mickey GH, Vollmer RT, Paulson DF. Heterotransplantation of a human prostatic adenocarcinoma cell line in nude mice. *Cancer Res* 1977;37:4049-58.

113. Ulbricht B, Hagmann W, Ebert W, Spiess E. Differential Secretion of

Cathepsins B and L from Normal and Tumor Human Lung Cells Stimulated by 12(S)- Hydroxy- eicosatetraenoic Acid. *Exp Cell Res* 1996;226:255-63.

114. Scaddan PB, Dufresne MJ. Characterization of Cysteine Proteases and Their Endogenous Inhibitors in MCF-7 and Adriamycin- Resistant MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Invas Metastasis* 1993;13:301-13.

115. Koppel P, Baici A, Keist R, Matzku S, Keller R. Cathepsin B-like proteinase as a marker for metastatic tumor cell variants. *Exp Cell Biol* 1984;52:293-9.

116. Sloane BF, Dunn JR, Honn KV. Lysosomal Cathepsin B: Correlation with Metastatic Potential. *Science* 1981;212:1151-3.

117. Sloane BF, Rozhin J, Robinson D, Honn KV. Role for cathepsin B and cystatins in tumor growth and progression. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1990;371 Suppl:193-8.

118. Qian F, Chan SJ, Gong QM, Bajkowski AS, Steiner DF, Frankfater A. The expression of cathepsin B and other lysosomal proteinases in normal tissues and in tumors. *Biomed Biochim Acta* 1991;50:531-40.

119. Bartsch G, Muller HR, Oberholzer M, Rohr HP. Light microscopic stereological analysis of the normal prostate and of benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 1979;122:487-91.

120. Marks LS, Treiger B, Dorey FJ, Fu YS, de Kernion JB. Morphometry of the prostate: I. Distribution of tissue components in hyperplastic glands. *Urology* 1994;44:486-92.

121. Guenette RS, Mooibroek M, Wong K, Wong P, Tenniswood M. Cathepsin B, a cysteine protease implicated in metastatic progression, is also expressed during regression of the rat prostate and mammary glands. *Eur J Biochem* 1994;226:311-21.

122. Festuccia C, Vincentini C, di Pasquale AB, Aceto G, Zazzeroni F, Miano L, et al. Plasminogen activator activities in short-term tissue cultures of benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *Oncol Res* 1995; 7:131-8.

123. Twining SS. Regulation of proteolytic activity in tissues. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1994;29:315-83.

124. Jung K, Lein M, Ulbrich N, Rudolph B, Henke W, Schnorr D. Quantification of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of

metalloproteinases in prostatic tissue: analytical aspects. *Prostate* 1997;in print:

125. Weiss RE, Fair WR, Cordon-Cardo C. Characterization of protease expression in human prostate cancer cell lines. *Int J Oncol* 1994;5:973-8.

126. Eastham JA, Stapleton AMF, Gousse AE, Timme TL, Yang G, Slawin KM, et al. Association of p53 mutations with metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1995;1:1111-8.

127. Jung K, Seidel B, Rudolph B, Lein M, Cronauer MV, Henke W, et al. Antioxidant Enzymes in Malignant Prostate Cell Lines and in Primary Cultured Prostatic Cells. *Free Radic Biol Med* 1997;23:127-33.

128. DeClerck YA, Imren S. Protease Inhibitors: Role and Potential Therapeutic Use in Human Cancer. *Eur J Cancer* 1994;30A:2170-80.

129. Bjornland K, Buo L, Kjonniksen I, Larsen M, Fodstad O, Johansen HT, et al. Cysteine proteinase inhibitors reduce malignant melanoma cell invasion in vitro. *Anticancer Res* 1996;16:1627-31.

Teile dieser Dissertationsschrift wurden in folgenden Arbeiten publiziert:

1. Jung K, Friedrich B, Türk I, Roigas J, Lein M, Schnorr D, Loening SA. Cathepsins B, H, L and cysteine proteinase inhibitors in renal cell carcinoma: no evidence for dysregulated proteolytic balance. J Cancer Res Clin Oncol, in press
2. Friedrich B, Jung K, Lein M, Türk I, Rudolph B, Hampel G, Schnorr D, Loening SA. Cathepsins B, H, L and cysteine protease inhibitors in malignant prostate cell lines, primary cultured prostatic cells and prostatic tissue. Zur Veröffentlichung eingereicht
3. Eine Darstellung von Teilergebnissen erfolgte anlässlich der 8. Europäischen Studentenkonzferenz der Charité vom 15.-18. Oktober 1997.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt habe und keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel verwendet wurden.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt

Berlin, im Januar 1998

Beate Friedrich

## **Danksagung**

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Klaus Jung, für die Möglichkeit, diese Dissertation in der Forschungsabteilung der Klinik für Urologie der Charité (Direktor: Prof. Dr. med. S.A. Loening) anfertigen zu können.

Besonders herzlich danke ich Prof. Dr. med. Klaus Jung für die Beratung und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Frau Ing. Silke Klotzek bedanken, die mir bei den Vorbereitungen und Durchführungen der Experimente eine geduldige Hilfe und steter Ansprechpartner war.

Mein Dank gilt allen Mitarbeiterinnen des Forschungslabors der Klinik für Urologie, die stets für meine Fragen offen waren und für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre sorgten.

Ich möchte auch meinen Eltern und meiner Schwester für ihre Unterstützung und ihr stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit danken. Zuletzt gilt meinen Freunden großer Dank für all die Aufmunterung und Kritik, insbesondere Andreas Castrischer, auch für die Mithilfe bei der Lösung der Computerprobleme.

## **Lebenslauf**

Geburtstag: 4.4.1972  
Geburtsort: Zwickau/Sa.

### Schulbildung:

1978-1988 Polytechnische Oberschule „Juri Gagarin“ Glauchau  
1988-1990 Erweiterte Oberschule „Georgius Agricola“ Glauchau  
6.7.1990 Abitur  
  
1991-1992 Auslandsaufenthalt USA

### Hochschulbildung:

1992-1998 Medizinstudium an der Humboldt-Universität Berlin  
(Charité)  
20.9.1994 Ärztliche Vorprüfung  
19.9.1995 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### wissenschaftliche Entwicklung:

1996-1998 Anfertigung der vorliegenden Dissertationsschrift  
1997-1998 Veröffentlichungen:

Jung K, Friedrich B, Türk I, Roigas J, Lein M, Schnorr D, Loening SA. Cathepsins B, H, L and cysteine proteinase inhibitors in renal cell carcinoma: no evidence for dysregulated proteolytic balance. J Cancer Res Clin Oncol, in press

Friedrich B, Jung K, Lein M, Türk I, Rudolph B, Hampel G, Schnorr D, Loening SA. Cathepsins B, H, L and cysteine protease inhibitors in malignant prostate cell lines, primary cultured prostatic cells and prostatic tissue. Zur Veröffentlichung eingereicht

Berlin, im Januar 1998