

Ulrike Schanzenbächer

Dr. med.

## **Immunhistochemischer Nachweis der Cysteinprotease Cathepsin L und der Inhibitoren Cystatin A und Cystatin B in Lungentumoren**

Geboren am 27.09.1971 in Neustadt an der Weinstraße

Reifeprüfung am 29.05.1991 in Neustadt an der Weinstraße

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1991 bis SS 1998

Physikum am 25.08.1993 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg-Mannheim und Montpellier (Frankreich)

Praktisches Jahr in Mannheim

Staatsexamen am 12.05.1998 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Labormedizin

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Werner Ebert

Untersuchungen mit Gewebehomogenaten haben gezeigt, dass die Cysteinprotease Cathepsin L und die sie kontrollierenden Cysteinprotease-Inhibitoren Cystatin A und B bei vielen Tumorarten im Vergleich zu gesundem Gewebe überexprimiert sind. So stellt sich die Frage, inwieweit diese Substanzen bei Invasion und Metastasierung von malignen Tumoren beteiligt sind. Da Tumorgewebe zusätzlich zu den Tumorzellen benigne Zellpopulationen wie beispielsweise Entzündungszellen oder Endothelzellen enthält, ist die zelluläre Herkunft von Cathepsin L und seinen Inhibitoren bisher weitgehend unbekannt.

Deshalb hatte diese Studie den immunhistochemischen Nachweis von Cathepsin L, Cystatin A und Cystatin B in Gewebeschnitten von Lungentumoren zur Aufgabe.

Das erste Ziel dieser Arbeit lag in der Etablierung einer zuverlässigen Nachweismethode mittels der Peroxidase- und Alkalischen Phosphatase-Färbung. Durch Optimierung der immunhistochemischen Färbemethoden gelang es erstmalig, die Protease Cathepsin L und die sie kontrollierenden Inhibitoren, die aufgrund ihrer niedrigen Konzentration schwierig nachzuweisen sind, simultan im selben Tumorgewebeschnitt darzustellen.

Auf der Basis dieser Methode konnte eine deutliche Expression von Cathepsin L in Tumorzellen von Bronchialkarzinomen gezeigt werden: 81,8% der untersuchten Tumorgewebeschnitte enthielten die gesuchte Protease. Die Immunreaktivität war jedoch nicht auf die Tu-

morzellen beschränkt. In 96,9% der Schnitte ließ sich Cathepsin L auch in den Makrophagen nachweisen.

Bisher interpretierte man die Rolle von Cathepsin L überwiegend als eine Beteiligung bei Invasion und Metastasierung in malignen Prozessen. Folglich wäre eine verstärkte Expression vor allem in fortgeschrittenen Tumorstadien oder bei entdifferenzierten Tumoren logisch gewesen. Anders als erwartet korrelierte der Nachweis nicht mit dem Tumorstadium nach der TNM-Klassifikation oder dem Differenzierungsgrad (Grading). Die Expression von Cathepsin L war auch unabhängig von den untersuchten klinisch-pathologischen Parametern der Patienten wie Tumorhistologie, Alter, Geschlecht und Rauchverhalten.

Das Gleiche gilt für die Cysteinprotease-Inhibitoren Cystatin A und B, die nur exemplarisch angefärbt wurden: Sie wurden in den ausgewählten Tumorschnitten überwiegend exprimiert, Cystatin A in 93,3% und Cystatin B in 70,8% der Lungentumore. Ein Trend zur Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern ließ sich nicht erkennen.

Als nächstes wurde die Bedeutung von Cathepsin L als prognostischer Faktor bei Bronchialkarzinomen untersucht. Über einen Zeitraum von 3 Jahren unterschied sich die Überlebenszeit von Krebspatienten mit oder ohne Cathepsin L-Expression in Tumorzellen nicht signifikant.

In einer früheren Untersuchung an dem gleichen Patientenkollektiv unserer Forschungsgruppe konnte gezeigt werden, dass der immunhistochemische Nachweis von Cathepsin B in Tumorzellen von prognostischer Relevanz bei Bronchialkarzinomen ist. Kombiniert man diese Ergebnisse von Cathepsin B mit denen von Cathepsin L, hatten nicht die Patienten, die sowohl Cathepsin B als auch Cathepsin L in ihrem Tumorgewebe enthielten, die schlechteste Prognose, sondern diejenigen, welche Cathepsin B, aber kein Cathepsin L exprimierten. Patienten mit Cathepsin L-, aber ohne Cathepsin B-Expression hatten die zweitbeste Überlebenswahrscheinlichkeit über 3 Jahre. Der Expression von Cathepsin L in Bronchialkarzinomen kommt somit im Gegensatz zu Cathepsin B keine prognostische Bedeutung zu.

Die Frage, in welchen Zelltypen Cathepsin L, Cystatin A und Cystatin B vorhanden ist, wurde geklärt. Die größte Intensität der Färbung wurde in Makrophagen erzielt. Das Verteilungsmuster war granulär, passend zur Lokalisation in Lysosomen. Auch im Alveolar- und Bronchialepithel, im Endothel und im Knorpel zeigte sich eine positive Immunreaktivität, für Cystatine zusätzlich auch in neutrophilen Granulozyten. Auffallend war, dass sich Cathepsin L überwiegend in Zonen der Proliferation und Regeneration, wie z. B. in Nukleoli, in der Peripherie von Knorpel, in Basalzellen, aber auch apikal im Bronchialepithel fand.

In malignen Zellen war Cathepsin L unabhängig von der Histologie des Lungentumors deutlich exprimiert. Bemerkenswerterweise unterschied sich das Verteilungsmuster innerhalb der Zelle. Beim Adenokarzinom war es überwiegend feingranulär und perinukleär betont, im Plattenepithelkarzinom dagegen fein-diffus verteilt, was an unterschiedliche intrazelluläre Kompartimente oder Aufgaben denken lässt. Eine Betonung an der Grenze des Tumorgewebes zum umliegenden Bindegewebe hin im Sinne einer Invasionsfront ließ sich nicht zeigen.

Die Cystatine A und B, die vor allem auch in ausdifferenzierten Foci und bei großen aufge-lockerten, aktivierten Nuklei entdeckt wurden, waren im Tumorgewebe mit der zu regulierenden Protease überwiegend kolokalisiert, was eindrucksvoll durch Simultanfärbung bewiesen werden konnte.

Aufgrund der in dieser Studie anhand von Lungentumoren gewonnenen Erkenntnisse sollte die Rolle von Cathepsin L und seinen Inhibitoren Cystatin A und B in malignen Prozessen überdacht werden.

Wie auch aktuelle Studien an „Knock-out“-Mäusen, denen Cathepsin L fehlt, zeigen, hat Cathepsin L vermutlich keine wesentliche Bedeutung für Invasion und Metastasierung, im Gegensatz zu anderen Cathepsinen wie Cathepsin B. Es ist vielmehr im Zusammenwirken mit seinen Inhibitoren in physiologische Wachstumsprozesse, Proliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose eingebunden.