

Eileen Katja Ebert

Dr. med.

Expression und klinische Bedeutung der Cysteinproteaseinhibitoren Stefin A, Stefin B und Cystatin C in Lungentumorgewebe und Lungenparenchym

Geboren am 17.07.1971 in Heidelberg

Reifeprüfung am 16.05.1990 in Schriesheim

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1990 bis SS 1997

Physikum am 07.09.1992 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in St. Josefskrankenhaus Heidelberg, Mc Gill University Montreal, Kanada

Staatsexamen am 14.05.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. P. Drings

Beim invasiven Wachstum maligner Tumoren wird proteolytischen Enzymen eine wesentliche Rolle zugeschrieben, da sie in der Lage sind, Komponenten der extrazellulären Matrix abzubauen. In normalen Zellen unterliegen Expression, Prozessierung sowie Aktivität der Proteasen einem subtilen Regulationsmechanismus, bei dem spezifischen physiologischen Inhibitoren eine besondere Bedeutung zukommt. So erfolgt die Regulierung der Cysteinproteasen durch Inhibitoren der Cystatin-Superfamilie, wobei intrazellulär die Stefine A und B und extrazellulär Cystatin C sowie Kininogene ihre Wirkung entfalten. In malignen Zellen scheint diese Regulation zu versagen, so daß es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Proteasen und ihren Inhibitoren auf die Seite der Proteasen beispielsweise durch Verminderung des Inhibitorengehalts kommen kann.

Ziel dieser Dissertation war es deshalb, die Expression der Cysteinproteaseinhibitoren in Lungentumorgewebe im Vergleich zu Lungenparenchym (gepaarte Proben) zu untersuchen. Im 1. Teil der Arbeit sollten die Cysteinproteaseinhibitoren in den Gewebehomogenaten nach SDS-PAGE durch Immunoblotting dargestellt werden. Im 2. Teil der Arbeit sollten die

Gewebespiegel der Cysteinproteaseinhibitoren mit Hilfe von Enzymimmunoassays in einer größeren Serie quantifiziert und mit klinischen Prognosefaktoren korreliert werden.

1. Durch Transfer von Proteinen, die in der SDS-PAGE aufgetrennt wurden, auf Nitrozellulose und anschließendem immunologischem Nachweis mit monoklonalen Antikörpern konnten Stefin A, Stefin B und Cystatin C in Tumor- und Lungengewebe nachgewiesen werden. Infolge der geringen Inhibitoren-Mengen in den Gewebehomogenaten gelang die Visualisierung nur durch Anwendung der hochempfindlichen „Enhanced“-Chemolumineszenz-Technik. Die Stefin-Banden wurden bei 11 kDa und die Cystatin C-Bande bei 13 kDa detektiert.
2. Die quantitative Bestimmung der Cysteinproteaseinhibitoren in 78 gepaarte Proben ergab, daß in den Lungentumoren im Vergleich zum tumorfreien Lungengewebe die medianen Gewebespiegel 1.9-fach ($p < 0.0001$) und von Stefin B 1.3-fach ($p < 0.001$) erhöht waren. Bei Cystatin C war dagegen die mediane Konzentration im Lungengewebe um den Faktor 1.4 insignifikant höher als im Tumorgewebe. Cystatin C spielt mengenmäßig jedoch nur eine untergeordnete Rolle, denn im molaren Verhältnis verhielt sich Cystatin C zu den Stefinen im Tumorgewebe wie 1 : 49 und im Lungengewebe wie 1 : 26. Die erhöhten Stefin-Konzentrationen betrafen ausschließlich die primären Lungentumoren, denn in den Lungenmetastasen anderer Organtumoren fand sich kein Unterschied zum korrespondierenden Normalgewebe. Die Cysteinproteaseinhibitoren-Expression unterschied sich hinsichtlich der Haupthistologien des Bronchialkarzinoms. Während beim Plattenepithelkarzinom sowohl Stefin A als auch Stefin B gegenüber dem Kontrollgewebe erhöht waren, war dies beim Adenokarzinom nur für Stefin A der Fall. Die Inhibitoren-Spiegel korrelierten nicht mit den einzelnen pT-, pN-, pM-Kategorien noch mit den pTNM-Stadien. Von großem Einfluß auf die Inhibitoren-Expression war aber das Vorliegen einer Entzündungsreaktion, denn sowohl Stefin A als auch Stefin B waren im Tumorgewebe mit Stromareaktion infolge Infiltration mit Cysteinproteaseinhibitoren-enthaltenden Makrophagen oder Lymphozyten signifikant höher als im Tumorgewebe ohne Entzündungsreaktion ($p = 0.011$). Trotzdem waren die Stefin-Spiegel - für Stefin A signifikant ($p = 0.03$) - im entzündungsfreien Tumorgewebe immer noch höher als im Kontrollgewebe. Die Gewebespiegel der Stefine in den primären Lungentumoren korrelierten mit der postoperativen Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten. Als

prognostisch ungünstig ($p=0.012$) erwiesen sich niedrige Werte für die Differenz der Stefin B-Konzentrationen zwischen Lungentumoren und korrespondierendem Lungengewebe, d.h. in Fällen, bei denen die Stefin-Konzentration im Tumorgewebe im gleichen Bereich oder kleiner war als diejenige im Lungengewebe. Für Stefin A ließ sich allerdings nur ein diesbezüglicher Trend erkennen ($p=0.2$).

Die Kontrolle der Lungentumor-assoziierten Cysteinproteasen wird im wesentlichen von den Inhibitoren Stefin A und Stefin B getragen. Cystatin C ist von untergeordneter Bedeutung. Trotz erhöhter Stefinkonzentrationen im Lungentumorgewebe besteht auf molarer Basis ein Ungleichgewicht zwischen den Inhibitoren und den Cathepsinen B und L zugunsten der Proteasen, wenn man die an anderer Stelle mit dem gleichen Probenmaterial gemessenen Cathepsinkonzentrationen hinzuzieht. Im tumorfreien Lungengewebe dominieren dagegen die Inhibitoren über die Cysteinproteasen. Die Gewebespiegel der Stefine eignen sich prinzipiell zur Einschätzung der Überlebenswahrscheinlichkeit nach erfolgter Operation und können somit als zusätzliche prognostische Faktoren herangezogen werden. Die Assoziation der Stefine mit der Überlebenswahrscheinlichkeit belegt indirekt ihre Beteiligung beim Invasionsgeschehen.