

Bernd Werle
Dr. sc. hum.

Cathepsin B aus humanen Lungentumoren: Kinetische und molekulare Charakterisierung - Regulation und Klinische Bedeutung

Geboren am 18.01.1963 in Heidelberg
Reifeprüfung am 07.06.1983 in Heidelberg
Studiengang der Fachrichtung Chemie vom WS 1984/1985 bis WS 1991/1992
Vordiplom am 26.11.1987 an der Universität Heidelberg
Diplom am 27.09.1991 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Klinische Chemie
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. W. Ebert

Die Beteiligung der Cysteinpeptidase Cathepsin B im Prozeß der Tumordinvasion und Metastasierung kann heute als gesichert gelten. Mit Hilfe der konfokalen Laserscanningmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die lysosomale Peptidase Cathepsin B in Tumorzellen auch Zellmembran-gebunden, vornehmlich in den sogenannten Filopodien, in aktiver Form vorkommt. Dies gibt Anlass zur Vermutung, dass Cathepsin B einmal in mehreren molekularen Formen existieren kann, und zum anderen ein Teil dieser Formen auch bei einem physiologischen pH-Wert, wie er in der Umgebung der Zellmembran herrscht, katalytisch wirksam ist.

Um letztere Hypothese zu belegen, wurden grundlegende Experimente zur Untersuchung der Aktivität und Stabilität von Cathepsin B in Abhängigkeit vom pH-Wert vorgenommen. Neben dem Aktivitätsmaximum bei pH 6,0 - 6,5 konnten zwei Schultern bei pH 4,5 - 5,5 und bei pH 7,0 - 7,5 beobachtet werden. Bemerkenswert ist der Befund, dass im Tumorgewebe eine Zunahme der Cathepsin B-Aktivität im sauren pH-Bereich auftritt. Die Überprüfung der Stabilität von Cathepsin B nach Inkubation beim pH-Wert von 7,5 ergab eine Konservierung der Enzym-Aktivität von 82 - 100 % der Ausgangswerte bei pH 5,0 - 5,5, wohingegen im Bereich von pH 5,5 - 7,4 die Aktivität drastisch auf 26 - 42 % abgesunken ist. Bei pH 7,5 waren jedoch immer noch 20 - 34 % Cathepsin B-Aktivität vorhanden. Diese Aktivität war gegenüber normalem Lungenparenchym im Tumorgewebe signifikant erhöht. Zwangsläufig stellt sich die Frage, inwieweit die nachgewiesene veränderte pH-Abhängigkeit auf konformelle Strukturveränderungen in einer Cathepsin B - Spezies zurückzuführen ist, oder ob sich dahinter tatsächlich tumor-assoziierte Cathepsin B-Isomere verbergen. Die gelelektrophoretische Auftrennung verbunden mit Westernblot-Analyse ergab für Cathepsin B sowohl aus Tumor- als auch aus Lungengewebe zwei Einfachketten- und zwei Doppelketten-Formen mit einer molekularen Masse von 31/32 kDa bzw. 26/5 und 27/5 kDa. An beiden Einfach- bzw. Doppelketten ist an der schweren Kette von Cathepsin B ein 1 kDa schweres Oligosaccharid vom "high-Mannose"-Typ N-glycosidisch gebunden. Ein Unterschied in der molekularen Masse konnte auf der Basis dieser Untersuchungen zwischen Tumor- und Lungengewebe nicht nachgewiesen werden. Auf der Suche nach sehr viel diskreteren strukturellen Unterschieden wurde Cathepsin B durch die Anwendung der 2-dimensionalen Gelelektrophorese-Technik analysiert. Cathepsin B liegt im normalen Lungenparenchym in 1 - 3 Einzelketten-Formen mit einer molekularen Masse von 32 kDa und zugehörigen isoelektrischen Punkten von 4,98; 5,21 sowie 5,32 vor. Weiterhin konnten die 1 - 2 schweren Ketten der Doppelketten-Formen mit einer molekularen Masse von 32 kDa und den isoelektrischen Punkten von 5,21 und 5,29 gefunden werden. Im Lungentumorgewebe dagegen wurden 3 - 7 Einzelketten-Formen des Cathepsin B mit einer molekularen Masse von 32 kDa mit zugehörigen isoelektrischen Punkten von 4,98; 5,07; 5,21; 5,28; 5,32; 5,40; 5,50 identifiziert. Den 2 - 3 nachweisbaren schweren Ketten der Doppelketten-Form mit einer Masse von 27 kDa konnten isoelektrische Punkte von 5,21; 5,29, und 5,40 zugeordnet werden. Diese Ergebnisse belegen eine höhere Anzahl von Cathepsin B-Isomeren im Lungentumorgewebe im Vergleich zu normalem Parenchym der Lunge. Auffällig ist weiterhin eine höhere Zahl von Einfachketten-Formen mit einer Masse von 32 kDa im Tumorgewebe.

Anhand von 91 Gewebepaaren konnte gezeigt werden, daß die bei einem pH-Wert von 7,5 stabile Cathepsin B-Fraktion in Lungentumoren signifikant erhöht war. Es stellt sich zwangsläufig die Frage, ob diese tumor-

assoziierte Cathepsin B-Fraktion mit klassischen Prognosefaktoren in Beziehung steht. Die Untersuchung ergab jedoch, daß die Expression der Cathepsin B-Aktivität bei pH 7,5 weder mit der Histologie und dem Tumorstadium (TNM-Stadien) noch mit sekundären Prognosefaktoren wie Geschlecht, Alter oder Rauchverhalten korreliert. Daß diese Cathepsin B-Fraktion dennoch mit dem malignen Wachstum assoziiert ist, beweist die Tatsache, daß Patienten mit Plattenepithelzellkarzinomen und Cathepsin B-Aktivitäten größer als 292 [@EU/mg] eine signifikant ($p < 0,05$) kürzere postoperative Überlebenszeit aufwiesen als solche mit Enzymaktivitäten unterhalb dieses Schwellenwertes.

Die Bestimmung der Substratumsatzrate objektiviert durch den K_m - Wert ergab 0,4 mM für die Einzelketten-Form und 0,2 mM für die Doppelketten-Form von Cathepsin B. Unterschiede in den K_m -Werten für Cathepsin B aus Tumor- und Lungengewebe konnten nicht nachgewiesen werden. Trotzdem finden wir eine schnellere Umwandlung der Einfachketten-Form in die Doppelketten-Form von Cathepsin B aus Tumorgewebe im Vergleich zum jeweils zugehörigen Lungenparenchym.