

**Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

(Direktor: Prof. Dr. med. Rolf-Edgar Silber)

**Identifikation von prognostisch relevanten Cathepsinexpressionen zur
Verbesserung von Diagnostik und Therapie des Nichtkleinzelligen
Bronchialkarzinoms**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von: Colja Friedrich Peter Cordes

geboren am 28. Januar 1978 in Herford

Verteidigung am:

Betreuer: Prof. Dr. med. H.-S. Hofmann

Gutachter: 1.

2.

Referat und bibliographische Beschreibung

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Identifikation von prognostisch relevanten Cathepsinexpressionen zu Verbesserung der Diagnostik und Therapie des Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms.

Material und Methoden: Unter der Verwendung von DNA-microarray-Chips wurden die Expressionen von 13 Cathepsinen in 89 chirurgisch behandelten Patienten mit Nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom ermittelt. Als Kontrollgruppe dienten 15 Proben aus korrespondierendem Lungengewebe der Patienten. Die durchschnittliche Beobachtungszeit betrug 27.7 Monate (2.1-69.5). Die Daten wurden dann benutzt um differentiell expremierte Cathespine mit prognostischer Relevanz für die Patienten zu identifizieren. Anschließend wurden die identifizierten Gene mit bekannten prognostischen Faktoren verglichen. Darüber hinaus wurde die Auswirkung der gleichzeitigen Expression mehrerer prognostisch signifikanter Cathepsinexpressionen erörtert.

Wesentliche Ergebnisse: 1. Kein Cathepsin wies eine signifikante Überexpression im Tumorgewebe auf. 2. Eine Überexpression des Cathepsin C war mit einer erhöhten Rezidivrate verbunden. 3. Die Expression der Cathepsine B und K korrelierte signifikant mit dem rezidivfreien Intervall und der Gesamtüberlebenszeit der Patienten. Eine hohe Expression der beiden Cathepsine ging sowohl univariat, als auch multivariat mit einer deutlich schlechteren Prognose einher. Die hohe Expression beider Cahepsine gleichzeitig stellte einen Prädiktor für eine erheblich geringere Überlebenszeit (mittlere Überlebenszeit: 26.7 Monate) im Vergleich zu einer niedrigen Expression beider Gene (mittlere Überlebenszeit: 60.1 Monate) dar.

Schlußfolgerungen: Die Bestimmung der Cathepsine B und K mittels DNA-microarray bei Patienten mit Nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom kann verwendet werden, um Patienten mit einem hohen Rezidivrisiko und schlechter Überlebensprognose zu identifizieren. In Kombination mit anderen genetischen Einzelfaktoren könnte so ein individuelles Risikoprofil für jeden Patienten erstellt werden, welches in Hinblick auf Therapieplanung und Risikoabschätzung dem aktuellen TNM-Stadiierungssystem überlegen wäre.

Cordes, Colja Friedrich Peter: Identifikation von prognostisch relevanten Cathepsin-expressionen zur Verbesserung von Diagnostik und Therapie des Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms
Halle, Martin-Luther-Universität, Med. Fak.,Diss., 68 Seiten, 2008

1	EINLEITUNG	1
1.1	ZIELSETZUNG.....	1
1.2	GRUNDLAGEN.....	1
1.2.1	<i>Aktuelles Stadiensystem.....</i>	4
2	THEORETISCHER TEIL.....	9
2.1	GENOMIK.....	9
2.2	DNA ARRAY TECHNOLOGIE.....	10
2.3	CATHEPSINE UND IHRE INHIBITOREN	11
2.3.1	<i>Vorkommen, Synthese und Funktion von Cathepsinen.....</i>	11
2.3.2	<i>Regulation der Enzymaktivität</i>	12
2.3.3	<i>Charakterisierung spezifischer Cysteinprotease-Inhibitoren.....</i>	13
2.3.4	<i>Biologische Funktionen der Cathepsine.....</i>	14
2.4	CATHEPSINE UND TUMORE	15
2.5	FRAGESTELLUNG	16
3	MATERIAL UND METHODEN.....	17
3.1	BESCHREIBUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS	19
3.2	DATENANALYSE	23
3.2.1	<i>t-Test.....</i>	23
3.2.2	<i>Bestimmung des Vielfachen (fold change)</i>	24
3.2.3	<i>Statistische Aufarbeitung der Genexpressionsdaten und klinischer Parameter.....</i>	24
4	ERGEBNISSE	26
4.1	ÜBERLEBENSPROGNOSE UND REZIDIV- / METASTASIERUNGSRATEN	26
4.1.1	<i>Überlebensprognose</i>	26
4.1.2	<i>Rezidiv- und Fernmetastasierungsrate.....</i>	27
4.2	DIFFERENTIELL EXPRIMIERTE GENE	29
4.2.1	<i>Lunge versus NSCLC</i>	29
4.2.2	<i>Expression von Cathepsinen (Lunge versus NSCLC).....</i>	31
4.2.3	<i>Expression von Cathepsinen (Lunge versus Adenokarzinom).....</i>	32
4.2.4	<i>Expression von Cathepsinen (Lunge versus Plattenepithelkarzinom).....</i>	32
4.3	CATHEPSINVERTEILUNG IN PHYSIOLOGISCHEN UND MALIGNEN GEWEBEN.....	33
4.4	CATHEPSINE UND TUMORREZIDIVE	35
4.4.1	<i>Einfluss der Cathepsine auf das rezidivfreie Intervall</i>	36
4.5	CATHEPSINE UND ÜBERLEBENSZEIT	39
4.6	KORRELATIONEN DER CATHEPSINEXPRESSION IM BRONCHIALKARZINOM	42
4.7	GLEICHZEITIGE EXPRESSION VON CATHEPSIN B UND CATHEPSIN K	43
5	DISKUSSION	45
5.1	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	45
5.2	AUSWAHL DIFFERENTIELL EXPRIMIERTER GENE	46
5.3	GENAUIGKEIT DER MIKROARRAY TECHNIK.....	47
5.4	EXPRESSION VON CATHEPSINEN	48
5.4.1	<i>Expression des Cathepsin B.....</i>	49
5.4.2	<i>Expression von Cathepsin K</i>	50
5.4.3	<i>Expression von Cathepsin L.....</i>	51
5.5	EINFLUSS DER CATHEPSINE AUF FERNMETASTASIERUNG UND LOKALREZIDIVE.....	52
5.6	EINFLUSS DER CATHEPSINE AUF DIE ÜBERLEBENSZEIT	54
5.7	GLEICHZEITIGE EXPRESSION MEHRER CATHEPSINE.....	57
5.8	AUSBLICK	58
6	LITERATURVERZEICHNIS	59
7	THESEN.....	64

Verzeichnis der Abkürzungen

CGAP	Cancer Genome Anatomy Project
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CPI	Cysteinprotease-Inhibitor
DFI	disease free interval (rezidivfreies Intervall)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EST	Expressed sequence tag
EU	Europäische Union
kDA	kilo Dalton
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
NCI	National Cancer Institute
NSCLC	Non-small cell lung cancer (Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom)
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
SAGE	Serial analysis of gene expression
SCLC	Small cell lung cancer (Kleinzelliges Bronchialkarzinom)
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
TNM	Tumor, Node, Metastasis
UICC	Union internationale contre le cancer
uPA	Urokinase Plasminogen Aktivator
WHO	World health organisation

1 Einleitung

1.1 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die genetischen Expressionsprofile von Patienten mit Nicht-Kleinzelligem-Bronchialkarzinom (Non-Small-Cell-Lung-Cancer, NSCLC) in Hinblick auf prognostisch relevante Gene zu untersuchen. Hierbei stand die Expression einer Gruppe von proteolytisch wirksamen Enzymen, der Cathepsine, im Mittelpunkt der Untersuchungen. Klinisch könnten die Ergebnisse dazu genutzt werden, um einen genetischen Screening-Test für NSCLC-Patienten zu entwerfen, der eine individuelle Risikoabschätzung und Therapieplanung für jeden einzelnen Patienten ermöglicht. Die Genauigkeit und Aussagekraft dieses Tests könnte die des aktuellen Stadiierungssystems (TNM-Stadien) übertreffen.

Hierfür wurde mittels DNA-Microarray-Technik eine Genexpressionsanalyse von 59.620 Genen an insgesamt 99 Patienten durchgeführt. Nach Anwendung von Ausschlusskriterien verblieben 82 für die Studie geeignete Patienten, bei denen wir die Expression von insgesamt 13 verschiedenen Cathepsinen in Tumorgewebe untersuchten und statistisch aufarbeiteten. Zur Prognoseabschätzung wurden die Expressionsergebnisse mit klinischen Parametern korreliert. Als Kontrollgruppe dienten 15 aus angrenzendem Lungengewebe der Tumorpatienten entnommene Biopsien.

1.2 Grundlagen

Bösartige Neubildungen der Lunge gehören in Deutschland sowohl bei Männern, als auch bei Frauen zu den drei häufigsten Krebsarten [1]. Die Sterberate ist bei Männern mit Lungenkrebs mit weitem Abstand höher als bei jeder anderen Krebsart und auch bei Frauen steht das Bronchialkarzinom hinter Brust- und Darmkrebs an dritter Stelle des prozentualen Anteils an Krebssterbefällen. Etwa 31.800 Neuerkrankungen am Bronchialkarzinom jährlich entsprechen knapp 16% aller Krebserkrankungen bei den Männern.

Bei Frauen macht das Bronchialkarzinom mit mittlerweile 10.400 Neuerkrankungen im Jahr 5.4% aller bösartigen Neubildungen aus. Noch höher fällt der Anteil der Bronchialkarzinome an allen Krebstodesfällen mit 26.8% bei Männern beziehungsweise 9.8% bei den Frauen aus. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt für Männer und Frauen bei etwa 67 bzw. 68 Jahren, was etwa dem Erkrankungsalter von Patienten mit Krebserkrankungen insgesamt entspricht [1].

Im europäischen Vergleich liegt die Inzidenzrate in Deutschland für Männer und Frauen im mittleren Bereich. Die höchsten Raten finden sich für Männer in Belgien, den Niederlanden und Italien, für Frauen in Dänemark, Großbritannien und Irland. Die niedrigsten Inzidenzen wurden für Männer in Schweden und Portugal ermittelt, für Frauen in Spanien und Portugal [1].

Die höchste Inzidenz wurde bei Männern Mitte der 70er bis Ende der 80er Jahre erreicht. Seitdem ist ein rückläufiger Trend erkennbar. Bei den Frauen hingegen steigt die Inzidenz weiterhin kontinuierlich an. Die unterschiedliche Trendentwicklung wird auf veränderte Rauchgewohnheiten der Frauen und Männer zurückgeführt [1].

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate nach Diagnose eines Bronchialkarzinoms liegt für beide Geschlechter etwa gleich hoch mit 13% bei Männern und 14% für Frauen. Damit gehört das Bronchialkarzinom zu den prognostisch ungünstigsten Krebserkrankungen.

Das Bronchialkarzinom gehört zu denjenigen bösartigen Tumoren, für die der Hauptrisikofaktor lange belegt ist. Bei Männern sind bis zu 90 %, bei Frauen zurzeit bis zu 60 % der Lungenkrebserkrankungen auf das aktive Zigarettenrauchen zurückzuführen. Dabei steigt das Erkrankungsrisiko mit der Anzahl der gerauchten Zigaretten, der Dauer des Rauchens sowie der Inhalationstiefe und der Teer- und Nikotinkonzentration der gerauchten Zigaretten. Ein vergleichsweise geringer Teil aller Lungenkrebsfälle wird auf berufliche Expositionen gegenüber verschiedenen kanzerogenen Stoffen (Asbest, Arsen, Chrom, Nickel, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe) zurückgeführt.

Synergistische Effekte von Schadstoffen und Rauchen sind nachgewiesen [1]. Das Risiko des Rauchers, ein Bronchialkarzinom zu entwickeln, ist bei männlichen Rauchern 22-mal und bei Frauen 12-mal höher als bei Nichtrauchern [1, 66].

Auch nach Einstellen des Nikotinkonsums fällt das Risiko nach 5 Jahren lediglich auf das 15-fache und nach 5 bis 9 Jahren auf das 7-fache ab, wonach es auf einem Plateau zwischen dem 2- bis 5-fachen verbleibt, was verdeutlicht, dass das Lungenkrebsrisiko bei ehemaligen Rauchern nie mehr zum Risiko der Nichtraucher zurückkehrt [12, 15, 23]. Auch wenn es nach Einstellung des Rauchens meist zu einer Rückbildung von histologischen Abnormalitäten im Bronchialepithel kommt, persistieren die molekular-genetischen Veränderungen [82]. Es sind also viele präneoplastische Veränderungen auch bei lange abstinenten Rauchern zu finden. Auch das Passivrauchen erhöht nach neusten Erkenntnissen das Lungenkrebsrisiko auf das 1.1- bis 1.3-fache gegenüber nicht-exponierten Personen [60]. Die Zahl der jährlich durch passives Tabakrauchen verursachten Todesfälle wird in der EU auf 1.146 geschätzt [52].

Die Entstehung des Bronchialkarzinoms ist ein multifaktorielles Geschehen. Sowohl Umweltfaktoren als auch genetische Polymorphismen spielen eine entscheidende Rolle, wobei heute bereits individuelle genetische Konstellationen bekannt sind, die das Lungenkrebsrisiko senken oder steigern. So kann es zum Beispiel bei lebenslangen Nichtrauchern durch Umweltexposition oder Passivrauchen aufgrund einer genetischen Prädisposition zur Ausbildung einer neoplastischen Veränderung kommen. Gleichzeitig erklärt diese Tatsache, dass auch unter den exzessiven Rauchern nur ein relativ geringer Anteil an Lungenkrebs erkrankt [37]. Trotzdem können keinesfalls alle Entstehungen von Karzinomen auf eine genetische Exposition zurückgeführt werden. Vielmehr gibt es verschiedene Theorien, die versuchen, die Entstehung der Bronchialkarzinome zu erklären. Eines dieser Modelle geht davon aus, dass Karzinome nicht durch eine einmalige genetische Veränderung entstehen, sondern zwischen 3 und 6 aufeinanderfolgende Genveränderungen notwendig sind, um ein Karzinom entstehen zu lassen [79]. Dieses Modell geht davon aus, dass jede Mutation mit einer Erhöhung der Tumorgröße, Entdifferenzierung und Malignität einhergeht.

Ein weiteres Modell sieht den Tumor als Zellpopulation, die sich entsprechend den Selektionstheorien nach Darwin entwickelt [17]. Hierbei wird davon ausgegangen, dass Tumorzellen miteinander konkurrieren und die Selektion diejenigen Zellen bevorzugt, die eher zur Angiogenese oder weniger zur Apoptose neigen. Somit überleben letztendlich nur die Zellen, die gegen die körpereigene Abwehr weitgehend resistent sind.

1.2.1 Aktuelles Stadiensystem

Um den Umfang der Tumorbehandlung, aber auch die Prognose abschätzen zu können, nutzt man bisher histopathologische und klinische Kriterien. Die klinische Einteilung erfolgt nach der TNM-Klassifikation der Union International Contre Le Cancer (UICC). Hierbei stehen die Kriterien der lokalen Tumorausbreitung, -infiltration und -größe, sowie des Lymphknotenbefalls und der Fernmetastasierung im Vordergrund [80].

Die zur Zeit gültige UICC-Version (1997/ 6. Fassung) lautet wie folgt [29]:

- T
- x: Tumor kann nicht beurteilt werden, oder Tumor wurde anhand von Tumorzellen im Sputum, oder einer Bronchiallavage diagnostiziert, kann bei der Bronchoskopie aber nicht nachgewiesen werden
 - 0: Kein Nachweis eines Primärtumors
 - is: Carcinoma in situ
 - 1: Tumorausdehnung bis 3 cm, kein Hinweis auf Infiltration
 - 2: Tumor jeder Größe mit Infiltration des Hauptbronchus, Invasion der Pleura visceralis und tumorassoziierte Atelektase oder Pneumonie, aber ohne Befall der gesamten Lunge
 - 3: Tumor jeder Größe mit direkter Invasion einer der folgenden Strukturen: Brustwand, Zwerchfell, mediastinale Pleura, Perikard (nicht Herz), sonst wie T2, jedoch mit größerer Ausdehnung
 - 4: Tumor mit Invasion einer der folgenden Strukturen: Mediastinum, Herz, große Gefäße, Trachea, Ösophagus, Wirbelsäule, Carina oder Tumor mit malignem Erguss

- N x: Lymphknoten sind nicht beurteilbar
- 0: Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- 1: Metastasen in ipsilateralen, peribronchialen Hiluslymphknoten
- 2: Metastasen in ipsilateralen mediastinalen und/oder subcarinalen Lymphknoten
- 3: Metastasen in kontralateralen Lymphknoten und ipsi- und kontralateralen Skalenuslymphknoten oder supraklavikulären Lymphknoten
- M x: Die Minimalerfordernisse zur Feststellung von Fernmetastasen liegen nicht vor
- 0: Keine Fernmetastasen
- 1: Fernmetastasen

Die Stadieneinteilung lautet dementsprechend [29]:

Tabelle 1: Stadieneinteilung Bronchialkarzinom

Stage Ia:	T1, N0, M0
Stage Ib:	T2, N0, M0
Stage IIa:	N1, M0
Stage IIb:	T2, N1, M0 or T3, N0, M0
Stage IIIa:	T1-2, N2, M0 or T3, N1-2, M0
Stage IIIb:	T(jedes), N3, M0 or T4, N(jedes), M0
Stage IV:	T(jedes), N(jedes), M1

Histopathologisch werden Lungentumoren gemäß der Empfehlung der WHO in folgende Hauptgruppen unterteilt [19]:

- I. Nichtkleinzellige Karzinome (NSCLC):
 - a. Plattenepithelkarzinome:
 - verhornend
 - nicht verhornend
 - b. Adenokarzinome:
 - azinär
 - papillär
 - bronchiolo-alveolär
 - solide
 - c. Großzellige Karzinome:
 - Riesenzellkarzinom
 - Hellzelliges Bronchialkarzinom
 - d. Adenosquamöse Karzinome
- II. Kleinzellige Karzinome (SCLC)
 - a. Haferzelltyp ('oat-cell-type')
 - b. Intermediärer Zelltyp ('intermediate-cell type')
 - c. Kombiniertes Haferzellkarzinom ('combined oat-cell carcinoma')
- III. Andere:
 - a. Karzinoid
 - b. Mischtumore und Karzinosarkome
 - c. Sarkome
 - d. Unklassifizierte Karzinome
 - e. Melanome

Die Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinome (NSCLC) bilden mit 75% den größten Anteil an den primären Bronchialkarzinomen, wobei das Kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC) 20% ausmacht. Das SCLC unterscheidet sich genetisch, biochemisch, aber auch klinisch von den NSCLC [75].

Die Chirurgie stellt bis zum Stadium II bei den SCLC und Stadium IIIA bei den NSCLC die Therapie der Wahl dar, wobei die teilweise Resektion des Tumors das Risiko eines Lokalrezidivs verdreifacht [41].

Bei vollständiger Resektion des Tumors mit Lymphknotendissektion hingegen ließen sich insgesamt für SCLC und NSCLC zusammen 5-, 10-, und 15-Jahres-Überlebensraten von jeweils 38.8%, 31.6% und 21.8% erzielen, wobei die Überlebensraten abhängig vom Tumorstadium und der Tumordifferenzierung sind [87]. Für NSCLC wurde über alle operierten Tumorstadien nach kompletter Resektion sogar eine 5-Jahres-Überlebensrate von 49.6 % beschrieben, wobei danach 91.0 % der Überlebenden auch nach 10 Jahren noch tumorfrei waren [58].

Eine der größten follow-up-Studien von operierten Patienten mit NSCLC wurde 1997 von Mountain publiziert [54]:

Tabelle 2: Mountain Studie 1997

UICC	TNM	Mountain (1997)	
		n=	5-JÜR
IA	T1N0M0	511	67.0
IB	T2N0M0	549	57.0
IIA	T1N1M0	76	55.0
IIB	T2N1M0	288	39.0
	T3N0M0	87	38.0
IIIA	T3N1M0	55	25.0
	jedesTN2M0	344	23.0

Die Überlebenskurven der Patienten mit einem Bronchialkarzinom zeigen in den ersten beiden postoperativen Jahren in allen Tumorstadien einen typischen Abfall der Überlebensraten, welcher von seiner Höhe stadienabhängig ist. Ursache dafür ist meist eine frühzeitige Fernmetastasierung des Tumors, die in einigen Fällen auch schon zum Zeitpunkt der Operation besteht, aber mit der derzeit verfügbaren Standarddiagnostik nicht evaluiert werden kann. So erbrachten Knochenmarksuntersuchungen bei bis zu 59% der chirurgisch therapierten Patienten im Stadium I-III okkulte Metastasen, welche im weiteren Verlauf prognosebestimmend waren [59].

Dies zeigt, dass Mikrometastasen, die zu jedem Zeitpunkt vorhanden sein können, einen starken Einfluss auf die Überlebensrate haben. Diese Tatsache wiederum lässt die Frage nach einer erweiterten Indikationsstellung für neoadjuvante bzw. adjuvante Chemotherapien auch in frühen Stadien der Erkrankung zu.

Aktuelle Studien veranschlagen den Überlebensvorteil von Patienten, die im Stadium I-II nach kompletter Resektion adjuvant mit platin-basierten Chemotherapeutika behandelt wurden mit 12-15% [26]. Dem gegenüber stehen nicht nur die direkten unerwünschten Wirkungen der gängigen Chemotherapeutika wie Übelkeit, Neuro- und Nephrotoxizität (Cisplatin), Immunsuppression und mutagene sowie kanzerogene Wirkungen. Studien belegen, dass neoadjuvante Chemotherapien das perioperative Risiko für lebensbedrohliche Komplikationen und die postoperative Mortalität signifikant erhöhen [62]. Dies ist der Grund warum die neoadjuvante Chemotherapie einer strengen Indikationsstellung unterliegt. Um die Indikation individueller und genauer stellen zu können bedarf es einer moderneren Risikoabschätzung. Histomorphologische Kriterien und Klinik geben nur wenig Auskunft über die Aggressivität des Tumors und berücksichtigen nicht das individuelle Risiko eines Rezidivs, das zu einem großen Anteil genetisch determiniert ist. Sicherlich kann man den komplexen Vorgang der Tumorentstehung, -infiltration, und -metastasierung keinesfalls durch Einzelfaktoren weder klinischer, noch histomorphologischer oder genetischer Art beurteilen. Dennoch sollte ein wichtiger Teil der Forschung sich der Identifikation und Bewertung solcher Einzelfaktoren widmen und diese in Korrelation zu bereits bekannten Risikofaktoren setzen. Da heute kein Zweifel mehr daran besteht, dass die Entwicklung und Ausbreitung von malignen Neubildungen auf Veränderungen im Genom der Tumorzelle zurückzuführen sind, sollte sich der Versuch der Identifizierung neuer Prognosefaktoren auf diese genetischen Veränderungen konzentrieren.

2 Theoretischer Teil

2.1 Genomik

Seit über 80 Jahren wird die Gesamtheit aller genetische Information der Zelle als Genom bezeichnet. Für die Wissenschaft, die sich mit der Analyse und Sequenzierung, sowie mit der Kartierung des Genoms beschäftigt prägte Thomas Roderick dann später den Begriff Genomik.

1990 begann in den USA das ehrgeizige „Human Genome Project“, dessen Ziel es war, sämtliche Gene des Menschen zu entschlüsseln.

Am 14.04.2003 verkündeten Wissenschaftler des internationalen Sequenzierungskonsortiums in Washington D.C. die Vollendung der Sequenzierung von 99% des menschlichen Genoms, womit das Projekt zwei Jahre früher als geplant endete. Das menschliche Erbgut besteht aus 30.000 – 35.000 Genen und insgesamt 3.2 Milliarden Buchstaben und wurde mit einer Genauigkeit von 99.99% entschlüsselt. Der noch verbleibende Anteil umfasst Gene, die mit heutigen Methoden nicht zugänglich sind und die erst in Zukunft entschlüsselt werden können. Ziel des „Human Genome Project“ war es nicht nur das menschliche Erbgut zu entschlüsseln, sondern auch diese Informationen der Öffentlichkeit uneingeschränkt zugänglich zu machen. Alle Sequenzierungsdaten sind dieser Devise folgend unverzüglich in öffentliche Datenbanken gespeist worden und sind seither für jedermann frei nutzbar. Das ist auch der Grund, warum die Zahl der krankheitsrelevanten Gene kontinuierlich auf inzwischen über 1500 angestiegen ist.

Die Genomik beschäftigt sich nun mit dem eigentlichen Ziel des „Human Genome Project“ nämlich der Analyse der Funktion der einzelnen Gene. Von über 80% der Gene sind heute weder die Funktion noch die Expression oder Regulation bekannt. Die funktionelle Genomik versucht diese Lücke zu füllen und dies insbesondere durch Bestimmung der Genexpression.

2.2 DNA Array Technologie

Als Genexpression wird das Umschreiben eines Gens in seine Genprodukte bezeichnet. Dieser Vorgang ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Zellintegrität und des physiologischen Wachstums jeder Zelle.

Kommt es zu einer Fehlregulation dieses Vorgangs, werden die Genprodukte und somit die Funktion der Zelle gestört, was bedeuten kann, dass eine „gesunde“ Zelle beispielsweise in eine Tumorzelle übergeht. Es gibt von den 30.000 – 35.000 Genen nur wenige, die ubiquitär exprimiert werden und sich somit eventuell als Prognosefaktor geeignet erweisen könnten, indem sie beispielsweise in Tumorzellen hoch- oder herunterreguliert werden. Um gleichzeitig eine hohe Anzahl an einzelnen Genen analysieren zu können, bedarf es einer Technik, die es ermöglicht in relativ kurzer Zeit eine große Anzahl an Genen durch Hybridisierung auf differentielle Expression hin zu untersuchen [21]. Die DNA-Array Technologie bietet durch die spezifische Hybridisierung von Transkripten an geordnete, immobilisierte DNA-Moleküle eine Möglichkeit, die Häufigkeit eines Transkriptes innerhalb einer mRNA-Population zu quantifizieren. Da im Gegensatz zur konventionellen Blottechnik bei diesem Verfahren fest auf dem Trägermaterial gebundene DNA-Moleküle die Sonde darstellen, ist es möglich Tausende Genaktivitäten in einem einzelnen Versuch zu messen. Hierbei werden als Trägermaterial entweder Nylon- oder Nitrosezellmembranen („Macro-Array“) oder aber Glaschips („Micro-Array“) verwendet. Die Detektion erfolgt dann radioaktiv oder durch Chemiefloreszenz sowie Chemielumineszenz.

Die onkologische Forschung versucht mit DNA-arrays Gene zu evaluieren, die einen Einfluss auf Tumorentstehung, -wachstum und Metastasierung besitzen. Dabei stehen dazu derzeit häufig nur globale Chips zur Verfügung, die einen Großteil des gesamten menschlichen Genoms widerspiegeln.

2.3 Cathepsine und ihre Inhibitoren

2.3.1 Vorkommen, Synthese und Funktion von Cathepsinen

Cathepsine sind eine Gruppe von ubiquitär vorkommenden Proteasen, deren biologische Funktion jahrzehntelang unterschätzt wurde. Sie wurden schon 1929 von Willstätter und Baumann entdeckt, die auch ihren Namen prägten (gr.: kathepsin – verdauen, zerkochen). Jedoch wurde ihnen lediglich eine Funktion im Bereich der terminalen Zelldegradation zugeschrieben. Erst in den letzten 10 Jahren gelang es wesentlich spezifischere Funktionen der Cathepsine zu erforschen [83].

Proteolytische Enzyme werden primär in vier Gruppen eingeteilt [10]:

1. Serinproteasen
2. Metalloproteasen
3. Aspartylproteasen
4. Cysteinproteasen

Die meisten Cathepsine gehören zu der Gruppe der Cysteinproteasen, die insgesamt aus 11 Enzymen besteht. Cysteinproteasen (unter ihnen die Cathepsine K und L) sind in jedem Gewebe des menschlichen Körpers nachweisbar. Besonders hohe Konzentrationen findet man in der Leber, der Milz und in Makrophagen, was dadurch zu erklären ist, dass diese Organe eine zentrale Rolle im Proteinstoffwechsel inne haben.

Cysteinproteasen sind in den Lysosomen lokalisiert. Unbrauchbare Eiweißmoleküle werden extrazellulär in ihre Bestandteile aufgelöst, welche dann in die Zelle geschleust werden. Intrazellulär werden diese Bruchstücke dann mittels Lysosomen und unter anderem mit Hilfe der Cathepsine restlos denaturiert.

Die Synthese der Cathepsine erfolgt zunächst als Prä-Pro-Enzym 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 [32]. In welcher Weise die in den Lysosomen gespeicherten Vorstufen der Cathepsine aktiviert werden, ist weitestgehend unbekannt. Man hat jedoch herausgefunden, dass Proformen der Cathepsine im sauren Milieu autoaktiviert werden. Cathepsin D, eine Aspartylprotease, funktioniert außerdem als Konversionsenzym für Cysteinproteasen [32, 36]. 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.

2.3.2 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 [10, 44, 45, 77].

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. Zu Ihnen gehören die Cystatine Stefin A und B.

2.3.3 Charakterisierung spezifischer Cysteinprotease-Inhibitoren

Die vermutlich ersten Daten über spezifische Inhibitoren zellulärer Proteasen stammen von Finkelstaedt aus dem Jahre 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 [3]. Die Aminosäuresequenz des Cystatin ist seit 1983 bekannt [77]. 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.

2.3.4 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 [39].

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 und Mitarbeiter [72] 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 [5, 50]. Cathepsin L ist beteiligt am Abbau von Knochen [34]. 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 [65].

Beispiele für entzündliche Erkrankungen, bei denen Cathepsine eine Rolle spielen, sind Pankreatitis, Parodontose [74], Glomerulonephritis und rheumatoide Arthritis [43, 55] sowie die Multiple Sklerose [6]. Es wurde ein Zusammenhang zwischen der Beschädigung von Proteasen und der Entstehung von COPD festgestellt [9]. Mutationen und Defekte der genetischen Regulation von Cathepsinen sind verantwortlich für Krankheiten wie Pycnodysostose und das Papillon-Lefevre-Syndrom (Genodermatose mit palmoplantarer Hyperkeratose und peridontaler Destruktion) [18, 24, 61, 73].

2.4 Cathepsine und Tumore

Es ist bekannt, dass Cathepsine in dem komplexen Prozess der Tumordinfiltration und –metastasierung eine kausale Rolle spielen [30]. Um die Umgebung zu infiltrieren und die Metastasierung zu ermöglichen, muss die Tumorzelle zahlreiche Barrieren wie Basalmembranen, die extrazelluläre Matrix und interstitielles Gewebe überwinden. Cathepsine zersetzen die Bestandteile dieser Barrieren wie Kollagen, Proteoglykane, Elastin, Laminin und andere Glykoproteine und begünstigen so die Tumordinfiltration in das umliegende Gewebe [20]. Darüber hinaus wird den Proteasen und im speziellen dem Cathepsin B eine wichtige Rolle im Prozess der Angiogenese von cerebralen, gastrointestinalen, sowie Prostata- und Mammatumoren zugeschrieben [36]. Zahlreiche Untersuchungen zur Aktivitätsbestimmung von Cathepsinen in Tumorgewebe zeigen, dass Tumorzellen Cathepsine und andere Proteasen vermehrt produzieren und sezernieren und eine erhöhte Aktivität mit schlechter Prognose einhergeht [20, 64]. Neuere Studien messen den Matrix-Metallo-Proteasen (MMPs) und den Cathepsinen B, L und D ebenfalls eine zentrale Rolle in der Infiltration und Metastasierung bei und diskutieren Proteaseinhibitoren als Chemotherapeutika [31]. Insbesondere die mRNA des Cathepsin B wurde in erhöhter Konzentration in infiltrierenden Tumorrändern nachgewiesen, was die These der Bedeutung der Protease für die Tumorprogression stützt [84]. Demgegenüber ist eine geringe Konzentration der Stefine A und B, den endogenen Inhibitoren der Cathepsine B und L, mit einem signifikant erhöhten Risiko für Lokalrezidive und tumorbedingten Sterberaten assoziiert [70].

Diese Kenntnisse legen nahe, dass Cathepsine und ihre Inhibitoren in der Diagnose und Therapie von Tumorleiden eine wichtige Rolle übernehmen. Bisher gab es jedoch noch keine detaillierten Untersuchungen, die die molekulare Regulation der Genexpression beider Stoffklassen mit klinischen Daten wie Überlebenszeit und individuellen Risikofaktoren korreliert haben.

2.5 Fragestellung

Zusammenfassend können für die vorliegende Arbeit folgende Fragen formuliert werden:

1. Wie verhält sich die Genexpression der Cathepsine in Tumor- bzw. Lungengewebe bei Patienten mit einem NSCLC?
2. Ist die genetische Expression eines oder mehrerer Cathepsine von prognostischer Relevanz und wie korreliert die Aussagekraft mit bekannten Risikofaktoren?
3. Stellt die Cathepsinexpression einen prognostischen Einzelfaktor dar, der in Kombination mit anderen Faktoren zukünftig einen speziellen Screening-Test zur individuellen Risikoabschätzung und Therapieplanung bei NSCLC-Patienten möglich machen könnte?

3 Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit wurde in enger Zusammenarbeit mehrerer Institutionen durchgeführt (Abb.1).

Der Einschluss der Patienten in die Untersuchungen erfolgte in der Klinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie (Direktor: Prof. Dr. R.E. Silber) nach entsprechender Aufklärung und Einwilligung. Hierzu lag für die Studie ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vor. Während der Operation wurde entsprechend des Ausmaßes der Tumorerkrankung eine Resektion des tumorbefallenen Lungenabschnitts mit anschließender systematischer Lymphknotendissektion durchgeführt. Stellte sich während der Operation eine technische Inoperabilität des Tumors heraus, so wurde neben der Tumorprobenentnahme zur Sicherung der Histologie auch ein Stück Tumor zur Genexpressionsanalyse entnommen.

Im Schnellschnittlabor des Pathologischen Instituts (damaliger Direktor: Prof. Dr. F.W. Rath) sind aus dem Operationspräparat repräsentative Tumor- und normale Lungengewebsanteile entnommen worden, welche einerseits für die standardisierte histo-morphologische Gewebediagnostik als auch die Arrayuntersuchungen bestimmt waren. Nach Paraffineinbettung des Tumorgewebes ist zur histologischen Subklassifizierung der NSCLC in Platten- bzw. Adenokarzinome neben der histomorphologischen Aufarbeitung auch in vielen Fällen eine immunhistochemische Färbung vom Pathologen ausgeführt worden. Nur bei eindeutiger Klassifizierung der Tumorgewebeprobe als Platten- bzw. Adenokarzinom wurden die nachfolgenden Untersuchungen durchgeführt.

Die weitere Aufarbeitung der tiefgefrorenen Tumor- bzw. Lungengewebe erfolgte in den Forschungslaboratorien der Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde (damaliger Direktor: Prof. Dr. St. Burdach). Hier wurden die Arbeitsschritte von der Gesamt-RNA Präparation bis zum Scannen der Microarraychips ausgeführt. Die Chips sind danach bei der Firma EOS Biotechnology Inc. ausgewertet und normiert worden.

Die Patienten wurden nach der Entlassung aus dem Krankenhaus in der Ambulanz der Klinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie nachbetreut. Durch die routinemäßige Vorstellung einschließlich symptombezogener Diagnostik sind lokoregionale Rezidive und Fernmetastasierungen erfasst worden.

Die Planung und Organisation von notwendigen adjuvanten Therapien wurde über die Ambulanz durchgeführt. Die Mitteilungen über den Tod des Patienten und mögliche Todesursachen sind über den behandelnden Hausarzt oder das Tumorzentrum erfolgt.

Die Zusammenführung und Auswertung der klinischen, inklusive follow up Daten und der Ergebnisse aus der Chipuntersuchung wurde in einer Access-Datenbank durch die beteiligten Kliniken (Klinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie, Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde) und der Firma EOS Biotechnology Inc. realisiert.



Abbildung 1:: Kooperationsschema zur Analyse der Genomik des Bronchialkarzinoms

3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Zwischen dem 01.07.1999 und 31.12.2001 wurden in der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie 186 Patienten an einem Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom operiert. Die genetischen Untersuchungen wurden an histomorphologisch gesicherten Plattenepithel- und Adenokarzinomen durchgeführt. Die histologische Einstufung erfolgte nach den Kriterien der WHO.

Bei 99 Patienten (79 Männer und 20 Frauen) konnte eine eindeutige Zuordnung des Tumors in Plattenepithel- bzw. Adenokarzinom erfolgen. Das mittlere Alter der Patienten lag bei 65.5 (SD±8.3) Jahren. 64 Patienten waren Raucher, wobei die durchschnittliche Dauer des Nikotinabusus bei 33.2 (SD±9.4) Jahren lag. Anamnestisch gaben 8 Patienten an, vor dem Bronchialkarzinom schon einmal an einem extrapulmonalen (n=6) bzw. pulmonalen (n=2) Ersttumor erkrankt gewesen zu sein. Für die beiden pulmonalen Tumoren konnte der Nachweis erbracht werden, dass es sich um pulmonale Zweitkarzinome handelte. Ebenfalls ist für alle NSCLC mit extrapulmonalem Ersttumor (je ein Larynxkarzinom, B-Zell-Lymphom, Blasenkarzinom, Mammakarzinom, Hauttumor und ein Carcinoma in situ der Mamma) immunhistologisch der Beweis erbracht worden, dass keine Metastasierung des Ersttumors vorlag. Bei 29 (29%) Patienten bestanden familiäre Krebsbelastungen, wobei in 45% (n=13) der Fälle primäre Bronchialkarzinome erhebbar waren. Exogenen Noxen (z.B. Asbestkontakt, Strahlenbelastung), für die ein ursächlicher Zusammenhang zu pulmonalen Malignomen besteht, waren 23 (23%) Patienten ausgesetzt. Die mittlere Expositionsdauer für diese Noxen lag bei 21.2 (SD ± 14.3) Jahren. Auf Grund eines fortgeschrittenen Tumorstadiums wurden 8 Patienten neoadjuvant chemotherapiert. Im Mittel lag die Anzahl der präoperativ durchgeführten Chemotherapiezyklen bei 3.1 Zyklen. Des Weiteren hatten zwei Patienten bei der Anamneseerhebung angegeben, früher wegen eines anderen Tumors schon eine Strahlentherapie erhalten zu haben.

Die am häufigsten ausgeführte Operation war die Lobektomie (n=71). Weiterhin wurden 15 Pneumonektomien, sechs diagnostische Thorakotomien mit Tumormaterialentnahme, fünf Segmentresektionen und zwei Bilobektomien vorgenommen. Nach erfolgtem chirurgischen Eingriff hatten 83 (84%) Patienten keinerlei Tumorreste (R0-Situation) im Resektionsgebiet bzw. keinen Hinweis auf eine noch bestehende Fernmetastasierung.

Bei acht (8%) Patienten war durch den Pathologen noch ein mikroskopischer Tumorrest (R1-Situation) in den Resektionsrändern des Operationspräparates nachweisbar. Bei ebenfalls acht Patienten lag ein makroskopischer Tumorrest im Operationsgebiet bzw. eine bekannte noch nicht resezierte Fernmetastase (R2-Situation) vor. Auf der Basis der intraoperativen Befunde sowie den Ergebnissen der histomorphologischen Aufarbeitung der Tumor-, Lungen- und Lymphknotenpräparate wurden folgende Tumorstadien entsprechend der UICC von 1997 postoperativ (pTNM) festgelegt: Stadium IA – 18 (18%) Patienten, Stadium IB – 19 (19%), Stadium IIA – 5 (5%), Stadium IIB – 21 (21.5%), Stadium IIIA – 21 (21.5%) , Stadium IIIB – 9 (9%) , Stadium IV – 6 (6%). Der Pathologe hat hinsichtlich des Differenzierungsgrads 27 Tumore als mäßig (G2) bzw. 68 Tumore als schlecht (G3) differenziert sowie 4 Tumore als undifferenziert (G4) eingestuft. Ein hoch differenziertes Karzinom (G1) lag in keinem Fall vor.

Tabelle 3: Patientencharakteristik

	alle	Plattenepithelkarzinome	Adenokarzinome	Signifikanz
n	99	56	43	
Alter	65.5 ±8.3	66.1±7.3	64.7±9.3	0.45
Geschlecht				
Frauen	20 (20%)	5 (9%)	15 (35%)	
Männer	79 (80%)	51 (91%)	28 (65%)	
Frauen : Männer	1:4	1:10	1:1.9	0.001
Nikotinverhalten				
Nichtraucher	33 (33%)	17 (30%)	16 (37%)	
Raucher	64 (65%)	37 (66%)	27 (63%)	
Keine Angabe	2 (2%)	2 (4%)	0 (0%)	0.38
Dauer des Nikotingenuss (in Jahren)	33.2±9.4	33.4±9.9	33.1±9.0	0.96
Krebsbelastung				
Eigener Ersttumor	8 (8%)	7 (12%)	1 (2%)	0.02
Familäre Krebsbelastung				
Insgesamt	29 (29%)	18 (32%)	11 (26%)	0.48
davon Lunge	13 (45%)	9 (50%)	4 (36%)	
Exogene Noxen				
Asbestkontakt				
Strahlenbelastung	18 (18%)	10 (18%)	8 (19%)	
Passivrauchen	2 (2%)	1 (2%)	1 (2%)	
	3 (3%)	0 (0%)	3 (7%)	
Expositions-dauer (in Jahren)	21.2±14.3	19.2±13.7	3.0±14.6	0.54

	alle	Plattenepithelkarzinome	Adenokarzinome	Signifikanz
Neoadjuvante Therapien insg.	10 (10%)	7 (12%)	3 (7%)	0.47
Neoadjuvante Chemotherapie	8 (8%)	5 (9%)	3 (7%)	
Zyklen (mittel)	3.1	3.1	3.3	
Präoperative Bestrahlung	2 (2%)	2 (4%)	0 (0%)	
Operativer Umfang				0.31
PE/diagnostische T.	6 (6%)	4 (7%)	2 (5%)	
Segmentresektion	5 (5%)	2 (3.5%)	3 (7%)	
Lobektomie	71 (72%)	37 (66%)	34 (78%)	
Bilobektomie	2 (2%)	2 (3.5%)	0 (0%)	
Pneumonektomie	15 (15%)	11 (20%)	4 (10%)	
Resektionsart				0.28
R0	83 (84%)	44 (78%)	39 (90%)	
R1	8 (8%)	6 (11%)	2 (5%)	
R2	8 (8%)	6 (11%)	2 (5%)	
T-Status				0.0005
T1	29 (29%)	8 (14%)	21 (48%)	
T2	41 (42%)	29 (52%)	12 (28%)	
T3	18 (18%)	14 (25%)	4 (10%)	
T4	11 (11%)	5 (9%)	6 (14%)	
N-Status				0.9
N0	46 (47%)	25 (45%)	21 (48%)	
N1	28 (28%)	16 (28%)	12 (28%)	
N2	21 (21%)	12 (22%)	9 (21%)	
N3	1 (1%)	1 (2%)	0 (0%)	
NX	3 (3%)	2 (3%)	1 (3%)	
M-Status				0.61
M0	93 (94%)	52 (93%)	41 (95%)	
M1	6 (6%)	4 (7%)	2 (5%)	
Stadium				0.08
IA	18 (18%)	5 (9%)	13 (30%)	
IB	19 (19%)	14 (25%)	5 (11%)	
IIA	5 (5%)	2 (3%)	3 (7%)	
IIB	21 (21.5%)	15 (27%)	6 (14%)	
IIIA	21 (21.5%)	11 (20%)	10 (23%)	
IIIB	9 (9%)	5 (9%)	4 (10%)	
IV	6 (6%)	4 (7%)	2 (5%)	
Differenzierung				0.67
G1	0	0	0	
G2	27 (27%)	13 (23%)	14 (33%)	
G3	68 (69%)	40 (72%)	28 (65%)	
G4	4 (4%)	3 (5%)	1 (2%)	
Adjuvante Therapien	49 (49.5%)	26 (46.5%)	23 (53.5%)	
Radiotherapie	28	14	14	
Chemotherapie	14	9	5	
Radio-/Chemotherapie	7	3	4	
Concomitant	6	3	3	
Sequentiel	1	0	1	

	alle	Plattenepithelkarzinome	Adenokarzinome	Signifikanz
Ursachen (Mehrfachnennung möglich)				
Intraoperativ: T3	8	7	1	
T4	7	3	4	
N2	20	9	11	
N3	1	1	0	
M1	4	4	0	
Postoperativ: R1	5	3	2	
R2	8	6	2	
Fortführung der neoadjuv. Th.	3	3	0	
Follow up: Lokoreg. Rezidiv	1	0	1	
Fernmetast.	13	5	8	

Die auf Grundlage der histomorphologischen und immunhistochemischen Aufarbeitung erfolgte Einteilung der Tumore in Plattenepithel- bzw. Adenokarzinome erbrachten zwei Patientengruppen mit 56 Patienten (Plattenepithelkarzinome) bzw. 43 Patienten (Adenokarzinome). Diese beiden Patientengruppen unterschieden sich hinsichtlich ihrer klinischen und tumorspezifischen Daten in 2 Merkmalen signifikant, welche auch deutlich zur Charakterisierung dieser beiden histologischen Typen beitragen (Tab.3). Mit 1:1.9 (weiblich:männlich) bestand die Adenokarzinompatientengruppe anteilmäßig aus signifikant ($p=0.001$) mehr Frauen, als die Gruppe der Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom (1:10). Ein weiteres signifikantes Unterscheidungsmerkmal zwischen beiden histologischen Gruppen war die Tumorgröße (T-Status). Fast die Hälfte (48%) aller operierten Adenokarzinome war kleiner als 3 cm (T1-Status), wohingegen die Plattenepithelkarzinome nur zu 14% kleiner als 3 cm maßen ($p=0.0005$). Bei Zusammenführung von Tumor-, Lymphknoten- bzw. Fernmetastasierungs-Status zum TNM-System, konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinompatienten nachgewiesen werden. Alle anderen klinischen Daten unterschieden sich nicht in ihrer Ausprägung zwischen den beiden histologischen Subtypen der NSCLC.

Da sowohl Chemo- als auch Strahlentherapie einen Einfluss auf das menschliche Genom haben können, wurden für die weitere Auswertung der Genexpression nur Expressionsprofile von Patienten ohne neoadjuvante Chemotherapie bzw. präoperative Bestrahlung verwendet. Somit erfolgte die weitere Auswertung der Genchipdaten an 89 Patienten (Tab.4).

Tabelle 4: Zusammensetzung des Datensatzes für die fortführende Auswertung der Microarrays

Gewebeproben	n
Adenokarzinom	40
Plattenepithelkarzinom	49
Summe der Tumorproben	89
Lunge (Kontrolle)	15

3.2 Datenanalyse

Nach Normierung der Rohdaten der Affymetrixchips sind alle Signalintensitäten kleiner 60 auf einen Wert von 60 gesetzt worden, um nicht mit Null- bzw. Negativwerten rechnen zu müssen [38]. Gene die eine Signalintensität von 60 in allen Experimenten (allen Gewebeproben) hatten, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen (absent calls) [69].

3.2.1 t-Test

Zur Bestimmung von signifikant unterschiedlich exprimierten Genen wurde als Inferenzstatistik der *t*-Test verwendet. Die Festlegung des Signifikanzniveaus (*p*-Wert) war von entscheidender Bedeutung. Zur Vermeidung einer hohen Anzahl von falsch positiven Targets wurde eine Korrektur des *p*-Wertes nach Bonferroni [63] durchgeführt. Dazu ist der *p*-Wert (0.05) durch die Gesamtzahl der Sonden auf dem Chip ($n=59\ 620$) dividiert worden. Somit wurde ein *p*-Wert als cut-off von 8×10^{-7} berechnet.

3.2.2 Bestimmung des Vielfachen (fold change)

Zur Untersuchung von Expressionsunterschieden wurden die Mittelwerte der Tumorproben durch die Mittelwerte der Kontrollgewebe (Lunge) dividiert. Die somit erhaltenen Werte waren das Vielfache der Expression des Tumor- zum Lungengewebe, wobei ein Quotient von 1 eine unveränderte Expression zwischen Tumor und Lunge angab, ein Wert unter 1 herunter-/down regulierte Gene und ein Wert größer 1 herauf-/up regulierte Gene im Tumor auswies. Als signifikant differentiell exprimierte Gene wurden solche Gene definiert, bei denen einerseits die Unterschiede im *t*-Test einem Signifikanzniveau von $p < 8 \times 10^{-7}$ entsprachen und Zweitens das Vielfache (fold-change) der Mittelwerte mindestens 2 für herauf regulierte bzw. 0.5 für herab regulierte Gene war.

3.2.3 Statistische Aufarbeitung der Genexpressionsdaten und klinischer Parameter

Zusammenhänge zwischen zwei Variablen z.B. Genexpression und Metastasierungsverhalten wurden mittels Chi-Quadrat-Tests geprüft. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde univariat nach der Kaplan-Meier-Methode berechnet. Um die Überlebenskurven auf einen signifikanten Unterschied zu testen, wurde der Log-Rank-Test ausgeführt. Dieser Test gründet sich auf Unterschiede zwischen beobachteten und erwarteten Ereignishäufigkeiten zu den einzelnen Zeitpunkten. Mit Hilfe der Cox-Regressionsanalyse wurde geprüft, wie bestimmte Variablen (z.B. potentielle Prognosefaktoren) die Überlebenswahrscheinlichkeit beeinflussen.

Zunächst wurden allgemeine Überlebensstatistiken aller Patienten mittels der Kaplan-Meier-Methode erstellt, die anschließend mit klinischen Daten wie Alter, Geschlecht und TNM-Stadium korreliert wurden.

In ähnlicher Weise wurde mit der Lokalrezidiv- und Fernmetastasierungsrate verfahren, wobei auch hier eine graphische Darstellung der rezidivfreien Zeitintervalle mittels der Kaplan-Meier-Methode erfolgte.

Anschließend erfolgte die Einteilung der individuellen Genexpressionen aller Cathepsine in hoch oder niedrig. Als „cut-off“ diente hierbei jeweils der mediane Expressionswert, wobei Expressionen über dem Median als hoch und entsprechend Werte unter dem Median als niedrig eingestuft wurden.

Mit den erhaltenen Expressionsewerten führten wir weitere vergleichende Berechnungen in Hinblick auf prognostische Relevanz durch.

Für die Bewertung, der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Expressionsdaten, hielten wir es für relevant, diese mit bereits bekannten Expressionsprofilen des menschlichen Körpers zu vergleichen. Mit Hilfe von sogenannten Körperatlanten (body maps) die vom „Cancer Genome Anatomy Project“ (CGAP) zur Verfügung gestellt werden, war es möglich die gefundenen Expressionsprofile mit dem aktuellen Wissensstand zu vergleichen.

Sämtliche statistische Berechnungen wurden mit dem Programm SPSS 11.0 durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Überlebensprognose und Rezidiv- / Metastasierungsraten

Insgesamt wurden die Chip-Analyse bei 99 Patienten durchgeführt. Die nachfolgende Analyse der Überlebenszeiten beinhaltet diejenigen Patienten, die präoperativ weder einer Chemotherapie (n=8) noch einer Bestrahlung (n=2) zugeführt wurden, da diese Therapien einen Einfluss auf die klinische Entwicklung und genetische Veränderungen im Tumorgewebe haben. Desweiteren wurden Patienten ausgeschlossen, die an einer nicht direkt mit dem Tumor assoziierten Krankheit verstorben sind. Hierunter zählten ein Zweitkarzinom der Lunge, ein Myokardinfarkt, eine Ösophagusvarizenblutung und eine Sepsis. Weitere 3 Patienten verstarben innerhalb der ersten 30 Tage nach der Operation, was einer 30-Tage-Letalität von 3.0% entspricht. Die übrigen 82 Patienten sind Gegenstand der nachfolgenden Berechnungen.

4.1.1 Überlebensprognose

Die mittlere Überlebenszeit aller Patienten betrug 27.7 Monate (Abb. 2). Dabei lagen die 1-, 3- und 5-Jahresüberlebensraten bei 78%, 47% und 35%.

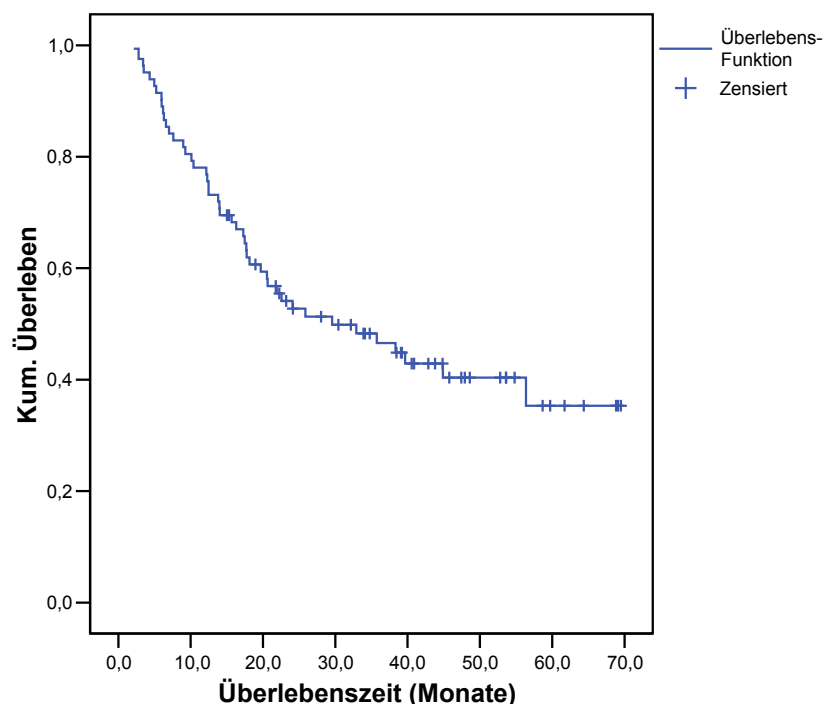


Abbildung 2: Überlebensfunktion aller operierten Patienten (n=82)

Die univariate Analyse (Tabelle 5) zeigte, dass das Tumorstadium ($p=0.002$) und der Resektionsstatus ($p=0.055$) einen erheblichen Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten hatten. Keinen Einfluss auf das Überleben hatten die klinischen Parameter Geschlecht, Alter, Histologie und familiäre Belastung hinsichtlich einer Tumorerkrankung.

Tabelle 5: Einfluss ausgewählter klinischer Parameter auf die Überlebenszeit

		n	Mediane Überlebenszeit	Univariat (log rank) p=
Geschlecht	M	66	22.2	0.58
	W	16	24.1	
Alter	<65	32	23.3	0.75
	>65	50	21.8	
Histologie	Adeno-Ca	36	24.1	0.78
	Plattenepithel-Ca	46	22.2	
TNM	I	30	24.4	0.002
	II	18	21.3	
	III	28	14.9	
	IV	6	15.8	
R-Situation	R0	67	24.1	0.055
	R1	4	22.0	
	R2	9	6.3	
Familienanamnese	negativ	58	20.6	0.54
	positiv	24	28.8	

4.1.2 Rezidiv- und Fernmetastasierungsrate

Nach der Operation waren 81.7% (67/82 Patienten) tumorfrei (R0-Resektion). Während der ambulanten Nachbeobachtungsphase traten bei 41 Patienten (61.2%) keine Lokalrezidive oder Fernmetastasen auf. Bei 10 Patienten (14.9%) entwickelten sich lokale Rezidive, bei 19 Patienten (28.4%) wurden Fernmetastasen festgestellt. 11 Patienten (16.4%) bildeten sowohl lokoregionale Rezidive als auch Fernmetastasen aus. Der Chi-Quadrat-Test zeigte keine Korrelation zwischen ausgewählten klinischen Parametern und der Lokalrezidiv- und Fernmetastasierungsrate (Tabelle 6), wobei Patienten mit einem Adenokarzinom tendenziell zu einer höheren Rate an Rezidiverkrankungen neigten.

Tabelle 6: Häufigkeiten des Auftretens von Lokalrezidiven und/oder Fernmetastasen bei R0-resezierten Patienten in Abhängigkeit von klinischen Parametern

		n	Kein Rezidiv	Lokalrezidiv	Fernmetastasen	Beides	p=
Geschlecht	M	52	29 (55.8%)	4 (7.7%)	13 (25%)	6 (11.5%)	0.9
	W	15	8 (53 %)	1 (6.7%)	5(33.3%)	1(6.7%)	
Alter	<65	23	11 (47.8%)	0	7 (30.4%)	5 (21.7%)	0.06
	>65	44	26 (59.1%)	5 (11.4%)	11 (25%)	2 (4.5%)	
Histologie	Adeno-Ca	32	13 (40.6%)	2 (6.3%)	12 (37.5%)	5 (15.6%)	0.08
	Plattenep.-Ca	35	24 (68.6%)	3 (8.6%)	6 (17.1%)	2 (5.7%)	
TNM	I	28	15 (53.6%)	2 (7.1%)	8 (28.6%)	3 (10.7%)	0.5
	II	18	13 (72.2%)	0	3 (16.7%)	2 (11.1%)	
	III	21	9 (42.9%)	3 (14.3%)	7 (33.3%)	2 (9.5%)	
Familienanamnese	negativ	45	25 (55.6%)	3 (6.7%)	10 (22.2%)	7 (15.6%)	0.2
	positiv	22	12 (54.4%)	2 (9.1%)	8 (36.4%)	0	

Bei allen R0-resezierten Patienten betrug der durchschnittliche Zeitraum bis zur Ausbildung von Lokalrezidiven und/oder Fernmetastasen 22.7 Monate (Abb.3). Hierbei waren nach einem, zwei und fünf Jahren jeweils 70%, 58% bzw. 48% der Patienten immer noch rezidivfrei.

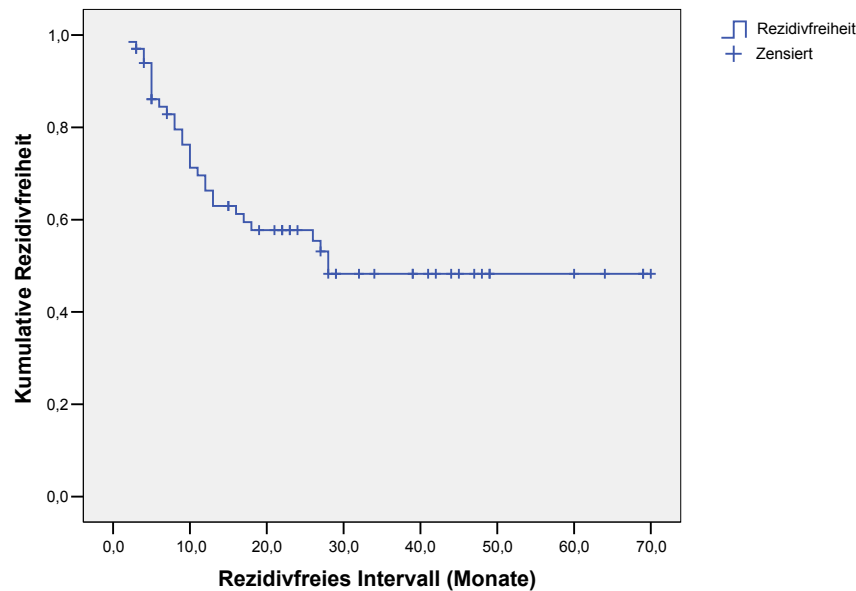


Abbildung 3: Rezidivfreies Intervall aller R0-resezierten Patienten (n=67)

Die univariate Analyse zeigte einen erheblichen Einfluss des Tumorstadiums (TNM) auf das rezidivfreie Intervall ($p=0.01$). So konnte mit Zunahme des Tumorstadiums auch eine Verkürzung des Zeitraums zwischen Operation und Auftreten eines ersten Rezidivs nachgewiesen werden. Die übrigen ausgewählten klinischen Parameter korrelierten univariat nicht mit der Länge des rezidivfreien Intervalls (Tabelle 7).

Tabelle 7: Einfluss ausgewählter klinischer Parameter auf das rezidivfreie Intervall (DFI)

		n	medianes DFI (Monate)	Univariat (log rank) p=
Geschlecht	w	15	22.0	0.60
	m	52	16.5	
Alter	<65	23	15.0	0.78
	>65	44	21.5	
Histologie	Adeno	32	16.5	0.54
	Plattenep.	35	19.0	
TNM	I	28	23.5	0.01
	II	18	19.5	
	III	21	8.0	
Familienanamnese	negativ	45	16.0	0.78
	positiv	22	24.5	

4.2 Differentiell exprimierte Gene

4.2.1 Lunge versus NSCLC

Die genomischen Untersuchungen mittels Oligonukleotidarrays (K-Chip) wurden an Plattenepithelkarzinomen ($n=56$), Adenokarzinomen ($n=43$) und Lungengeweben ($n=19$) durchgeführt (Total: 118 Proben). Zur Berechnung von Expressionsunterschieden zwischen Lunge und Tumor wurden nur Gewebeproben von Patienten ($n=89$) ohne neoadjuvante Chemotherapie oder adjuvante Radiotherapie verwendet. Die sieben bei der Überlebensstatistik vorher exkludierten Patienten, die an einer nicht tumorassoziierten Erkrankung oder innerhalb von 30 Tagen verstorben sind, wurden in die Bestimmung der differentiell exprimierten Gene miteinbezogen, wodurch sich der Unterschied der Fallzahlen erklärt.

Von den auf den K-chips enthaltenen 59 620 Sondensätzen hatten 14 317 (24%) sowohl in allen Lungen- als auch in allen Tumorgewebeproben eine Signalintensität von 60, was bedeutet, daß an diesen Sondensätzen keine Expression stattgefunden hat (absent calls).

Diese Gene wurden von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen, da sie keine Informationen zur Differenzierung der Gewebe enthalten.

In 73.5% (n=43 770) der auf dem Chip enthaltenen Sondensätze lagen Expressionsunterschiede zwischen den Gewebeproben vor, wobei die Unterschiede zwischen Lungen- und Tumorproben im t-Test nicht signifikant waren (Abb.4). Bei 1533 (2.5%) Genen lagen die p-Werte zwischen den Lungen- und Bronchialkarzinomgewebeexpressionen unter dem gewählten Signifikanzniveau ($p=8 \times 10^{-7}$). Davon hatten 979 (1.6%) Gene eine erhöhte Expression im Tumor im Vergleich zur Lunge und 554 (0.9%) Gene eine erniedrigte Expression. Unter Berücksichtigung eines Expressionsunterschieds von 2.0 konnten nur 344 von 59.620 (0.6%) Sondensätzen als signifikant exprimierte Gene (fold-change: ≥ 2 bzw. ≤ 0.5 , $p < 8 \times 10^{-7}$) zwischen Lunge und Tumor bezeichnet werden. Von diesen 344 Sondensätzen bzw. Genen waren im Tumor im Vergleich zur Lunge 187 (0.3%) signifikant herauf bzw. 157 (0.3%) im Tumor herunterreguliert (Abb. 5).

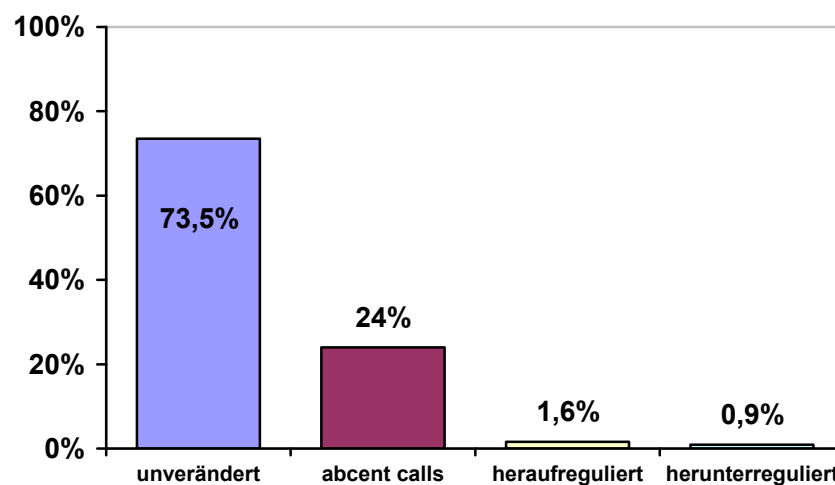


Abbildung 4: Relative Unterschiede der Expression aller untersuchten Gene in Tumor- Lungengewebe

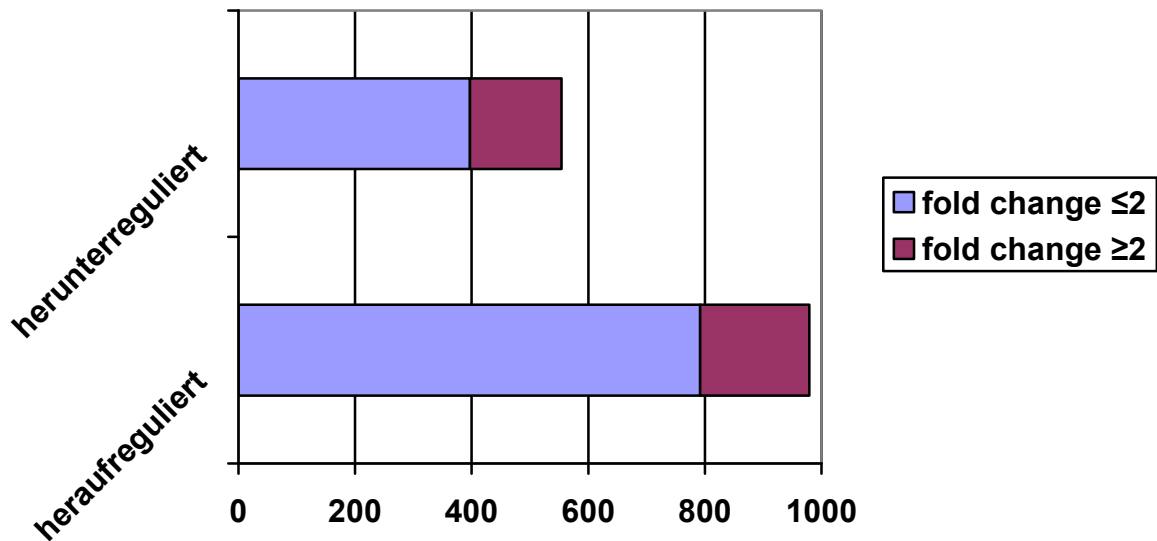


Abbildung 5: differentiell exprimierte Gene (Lunge vs. Tumor) in Abhängigkeit vom fold-change der Expressionsmittelwerte ($p=8 \times 10^{-7}$)

4.2.2 Expression von Cathepsinen (Lunge versus NSCLC)

Insgesamt wurden 13 verschiedene Cathepsine untersucht von denen nur zwei (Cathepsin O und H) das oben genannte Signifikanzniveau im t-Test in Bezug auf differentielle Expression zwischen Lunge und Karzinom erreichten. Der fold-change zwischen Lunge und Karzinom lag zwischen maximal 1.46 beim Cathepsin D und minimal 0.61 beim Cathepsin H (Tabelle 8). Somit entsprach keines der Cathepsine bei der Expression zwischen Tumor- und Lungengewebe den gewählten Signifikanzkriterien.

Tabelle 8: Expression von Cathepsinen in Lunge und NSCLC

Name des Gens	Expression (Lunge)	Expression (NSCLC)	fold-change	t-Test (p=)
Cathepsin B	1044	1098	1.05	2.7×10^{-1}
Cathepsin C	541	451	0.83	3.7×10^{-3}
Cathepsin D	458	671	1.46	3.9×10^{-6}
Cathepsin E	183	172	0.94	7.7×10^{-1}
Cathepsin F	295	232	0.79	7.6×10^{-4}
Cathepsin G	340	296	0.87	7.9×10^{-3}
Cathepsin H	1575	961	0.61	1.7×10^{-8}
Cathepsin K	283	373	1.32	4.3×10^{-3}
Cathepsin L	707	621	0.88	9.9×10^{-4}
Cathepsin O	342	215	0.63	1.3×10^{-9}
Cathepsin S	303	184	0.61	9.7×10^{-6}
Cathepsin W	336	262	0.78	1.3×10^{-6}
Cathepsin Z	344	237	0.69	1.3×10^{-2}

4.2.3 Expression von Cathepsinen (Lunge versus Adenokarzinom)

Beim Vergleich der Expression der Cathepsine zwischen Lungengewebe und Adenokarzinom ergaben sich in keinem Fall signifikante Expressionsunterschiede. Der fold-change lag hierbei zwischen 0.72 beim Cathepsin Z und 1.51 beim Cathepsin D (Tabelle 9).

Tabelle 9: Expression von Cathepsinen in Lunge und Adenokarzinom

Name des Gens	Expression (Lunge)	Expression (Adeno-Ca)	fold-change	t-Test (p=)
Cathepsin B	1044	1132	1.08	1.0×10^{-1}
Cathepsin C	541	491	0.91	1.4×10^{-1}
Cathepsin D	458	692	1.51	2.3×10^{-6}
Cathepsin E	183	241	1.32	2.4×10^{-1}
Cathepsin F	295	245	0.83	1.2×10^{-2}
Cathepsin G	340	300	0.88	1.6×10^{-2}
Cathepsin H	1575	1143	0.73	1.5×10^{-5}
Cathepsin K	283	381	1.35	5.9×10^{-3}
Cathepsin L	707	687	0.97	5.2×10^{-1}
Cathepsin O	342	262	0.77	2.4×10^{-5}
Cathepsin S	303	236	0.78	6.4×10^{-3}
Cathepsin W	336	280	0.83	1.9×10^{-4}
Cathepsin Z	344	249	0.72	2.8×10^{-2}

4.2.4 Expression von Cathepsinen (Lunge versus Plattenepithelkarzinom)

Im Vergleich zum Lungengewebe waren im Plattenepithelkarzinom die Cathepsine S, O, W und H mit signifikantem p-Wert im t-Test niedriger exprimiert. Die fold-changes lagen dabei für das Cathepsin S bei 0.47, Cathepsin O bei 0.52, Cathepsin W bei 0.74 bzw. für das Cathepsin H bei 0.52 (Tabelle 10). Somit entsprach nur das Cathepsin S dem Signifikanzniveau und wurde im Lungengewebe signifikant höher exprimiert.

Tabelle 10: Expression von Cathepsinen in Lunge und Plattenepithelkarzinom (PE)

Name des Gens	Expression (Lunge)	Expression (PE)	fold-change	t-Test (p=)
Cathepsin B	1044	1072	1.03	7.9×10^{-1}
Cathepsin C	541	420	0.78	3.2×10^{-4}
Cathepsin D	458	655	1.43	4.3×10^{-5}
Cathepsin E	183	118	0.65	3.0×10^{-2}
Cathepsin F	295	222	0.75	1.5×10^{-4}
Cathepsin G	340	293	0.86	6.1×10^{-3}
Cathepsin H	1575	819	0.52	3.5×10^{-10}
Cathepsin K	283	366	1.29	1.6×10^{-2}
Cathepsin L	707	569	0.80	2.2×10^{-5}
Cathepsin O	342	178	0.52	2.9×10^{-12}
Cathepsin S	303	143	0.47	9.7×10^{-8}
Cathepsin W	336	248	0.74	5.5×10^{-8}
Cathepsin Z	344	227	0.66	1.1×10^{-2}

4.3 Cathepsinverteilung in physiologischen und malignen Geweben

Cathepsine sind als lysosomale Enzyme eine ubiquitär vorkommende Stoffgruppe. Dennoch gibt es erhebliche Unterschiede in der Höhe der Expression in den verschiedenen Geweben des Körpers. Das Cancer Genome Anatomy Project (CGAP) ist ein interdisziplinäres Programm, welches vom National Cancer Institute (NCI) eingerichtet wurde. Ziel des Projektes ist es sogenannte ‚Bodymaps‘ also Körperatlanten für Gene zur Verfügung zu stellen. Die Expressionslevel der verschiedenen Gene werden hierbei farbkodiert und sowohl für gesundes, als auch für maligne verändertes Gewebe dargestellt. Die Ergebnisse des CGAP sind im Internet unter <http://cgap.nci.nih.gov> mit dem sogenannten SAGE-Viewer grafisch dargestellt und der Öffentlichkeit zugänglich gemacht worden.

Mit Hilfe des SAGE-Viewers ist es möglich die Ergebnisse der DNA-Array-Chip-Analyse zu validieren. In Abbildung 6 sind Bodymaps für ausgewählte Cathepsine und der jeweilige mediane Expressionslevel aus den von uns durchgeführten Chip-Analyse dargestellt. Hierbei wurden die Expressionslevel, die mit dem SAGE-Viewer ermittelt wurde farblich, die Ergebnisse der Chip-Analyse von Lungen- und Tumorgewebe numerisch dargestellt.

Die Ergebnisse sind bis auf wenige Ausnahmen durchaus vergleichbar. Wie auch in der DNA-Array-Analyse zu sehen, wird beispielsweise Cathepsin B sowohl im Lungengewebe als auch im Karzinom relativ hoch exprimiert, wobei sogar noch eine Steigerung der Expression im Karzinomgewebe zu verzeichnen ist.

Auch die hohe Expression des Cathepsin H sowohl im Lungen- als auch im Tumorgewebe konnte durch den SAGE-Viewer validiert werden. Die relativ niedrigen Expressionswerte für die Cathepsine K und S werden ebenfalls durch die Ergebnisse des SAGE-Viewers bestätigt. Lediglich beim Cathepsin Z weichen die Ergebnisse der beiden Untersuchungen voneinander ab. Während im SAGE-Viewer das Cathepsin Z schon im Lungengewebe eine relativ hohe Expression aufweist, die sich im Tumorgewebe nochmals erhöht, wurden bei der Chip-Analyse relativ niedrige Expressionswerte verzeichnet, die sich tendenziell im Tumorgewebe noch niedriger darstellten. Insgesamt konnten die Ergebnisse des SAGE-Viewers die vorliegenden Daten jedoch verifizieren.

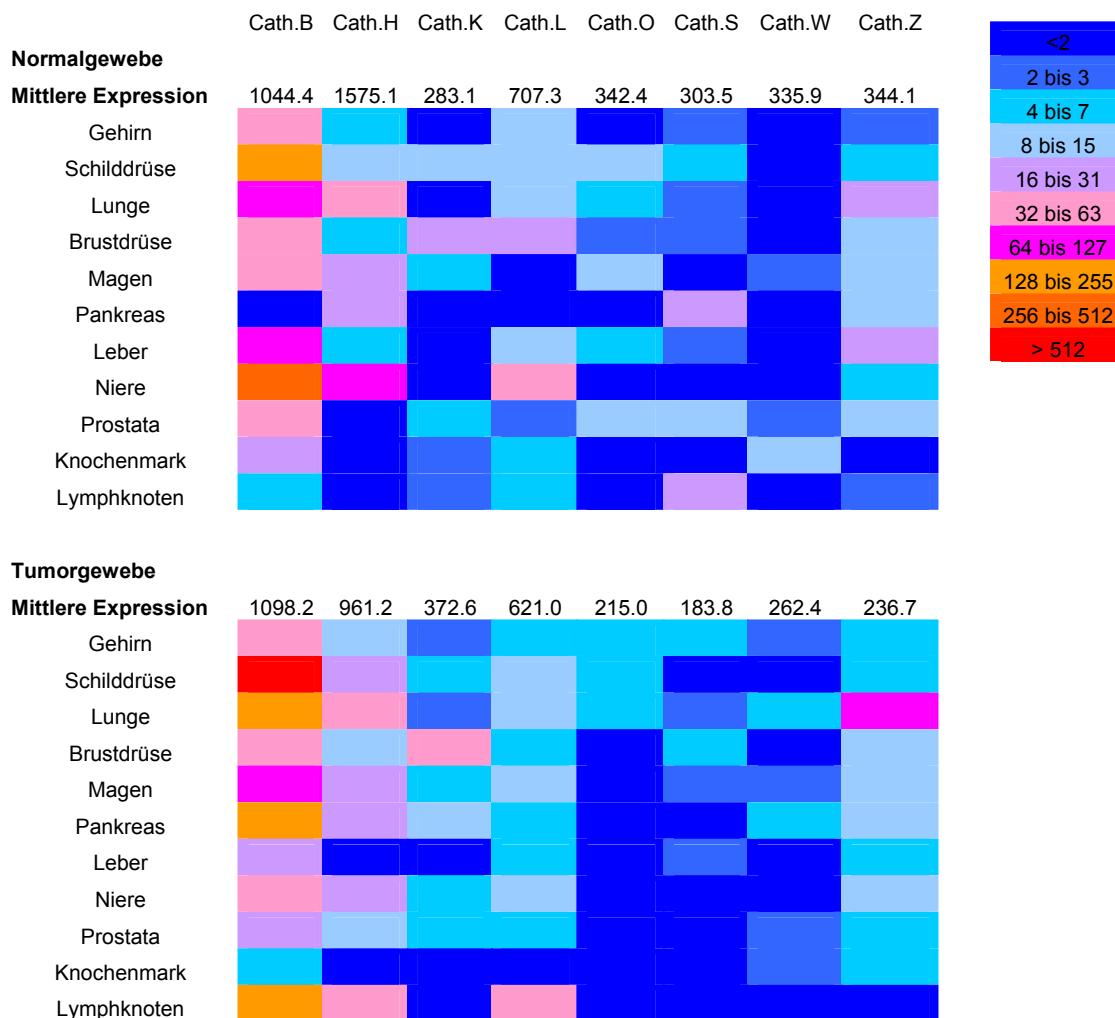


Abb. 6: SAGE-Viewer Daten (farblich kodiert) beziehen sich auf tags pro 200 000. Chip-Daten (numerisch dargestellt) beziehen sich auf Mittelwerte der Expression in Lungengewebe und NSCLC.

4.4 Cathepsine und Tumorrezidive

Um den Einfluss der Höhe der Genexpression auf Tumorrezidive untersuchen zu können, teilten wir die individuellen Expressionswerte in hoch- und niedrigexprimiert ein. Der Median aller Genexpressionen eines Cathepsins diente uns hierbei als „cut-off“, wobei alle Werte über dem Median als hoch-, und alle Werte darunter als niedrigexprimiert eingestuft wurden.

Korrelierte man die unterschiedlich hohe Genexpression der einzelnen Cathepsine mit dem Auftreten von Lokalrezidiven und/oder Fernmetastasen, so ergab sich für das Cathepsin C ein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p=0.02$). Erhöhte Expressionswerte des Cathepsin C im Tumorgewebe gingen hierbei mit einer erhöhten Rate an Lokalrezidiven und Fernmetastasen einher. Erniedrigte Expressionswerte waren mit einer erniedrigten Zahl an Rezidiverkrankungen assoziiert. Auch bei anderen Cathepsinen war diese Korrelation zwischen erhöhter Expression und Tumorrezidiverkrankung zu eruieren, auch wenn hier die statistische Signifikanzgrenze nicht erreicht wurde. So erlitten nur 11 Patienten mit einer erniedrigten Cathepsin K Expression eine Rezidiverkrankung, während die übrigen 21 rezidivfrei blieben. Über die Hälfte der Patienten mit einer hohen Cathepsin K Expression bildeten hingegen ein Lokalrezidiv und/oder Fernmetastasen aus. Bei den Cathepsinen B und L verhielt es sich ähnlich. Diejenigen Patienten mit einer erniedrigten Cathepsinexpression bildeten zumeist seltener Rezidiverkrankungen aus als Patienten mit erhöhter Expression. Gleichzeitig erlitten mehr hochexprimierende Patienten eine Rezidiverkrankungen als niedrigexprimierende. Tabelle 11 fasst die wesentlichen Ergebnisse zusammen.

Tabelle 11: Einfluss der Cathepsinexpression auf Lokalrezidive und Fernmetastasen

Gene	Expression	n	Kein Rezidiv	Rezidiv	Chi-Quadrat (p=)
Cathepsin B	niedrig	29	19	10	0.14
	hoch	38	18	20	
Cathepsin C	niedrig	35	24	11	0.02
	hoch	32	13	19	
Cathepsin D	niedrig	32	20	12	0.25
	hoch	35	17	18	
Cathepsin E	niedrig	31	19	12	0.35
	hoch	36	18	18	
Cathepsin F	niedrig	33	20	13	0.38
	hoch	34	17	17	
Cathepsin G	niedrig	35	20	15	0.74
	hoch	32	17	15	
Cathepsin H	niedrig	31	21	10	0.056
	hoch	36	16	20	
Cathepsin K	niedrig	32	21	11	0.1
	hoch	35	16	19	
Cathepsin L	niedrig	34	22	12	0.11
	hoch	33	15	18	
Cathepsin O	niedrig	32	20	12	0.25
	hoch	35	17	18	
Cathepsin S	niedrig	30	20	10	0.09
	hoch	37	17	20	
Cathepsin W	niedrig	33	19	14	0.7
	hoch	34	18	16	
Cathepsin Z	niedrig	35	20	15	0.7
	hoch	32	17	15	

4.4.1 Einfluss der Cathepsine auf das rezidivfreie Intervall

Mehrere Cathepsinexpressionen scheinen einen Einfluss auf die Länge des rezidivfreien Intervalls zu besitzen. Bei der Korrelation der Höhe der einzelnen Cathepsinexpressionen mit dem mittleren rezidivfreien Zeitintervall (Disease Free Intervall, DFI) zeigte sich ein hochsignifikanter Zusammenhang für die Cathepsine K, B und L.

Bei allen drei Cathepsinen führte eine hohe Expression dazu, dass sich das rezidivfreie Intervall erheblich verkürzt (siehe Tabelle 12). Somit war die Hochregulation der Expression der Cathepsine K, B und L im Tumorgewebe ein Zeichen für das relativ schnelle Auftreten einer Rezidivkrankung.

Tabelle 12: Einfluss der unterschiedlichen Cathepsinexpression auf das rezidivfreie Intervall (DFI)

Gene	Expression	n	Rezidivrate	Mittleres DFI (Monate)	P=
Cathepsin B	niedrig	29	10	47.7	0.04
	hoch	38	20	33.5	
Cathepsin C	niedrig	35	11	47.2	0.08
	hoch	32	19	32.9	
Cathepsin D	niedrig	32	12	44.4	0.13
	hoch	35	18	35.6	
Cathepsin E	niedrig	31	12	42.7	0.53
	hoch	36	18	37.6	
Cathepsin F	niedrig	33	13	45	0.19
	hoch	34	17	32.9	
Cathepsin G	niedrig	35	15	40	0.86
	hoch	32	15	39.7	
Cathepsin H	niedrig	31	10	48.5	0.06
	hoch	36	20	25.4	
Cathepsin K	niedrig	32	11	47.3	0.04
	hoch	35	19	32.4	
Cathepsin L	niedrig	34	12	45.5	0.05
	hoch	33	18	34	
Cathepsin O	niedrig	32	12	43.5	0.32
	hoch	35	18	36.9	
Cathepsin S	niedrig	30	10	47.3	0.06
	hoch	37	20	33.8	
Cathepsin W	niedrig	33	14	39.7	0.79
	hoch	34	16	39.7	
Cathepsin Z	niedrig	35	15	40.6	0.78
	hoch	32	15	39.1	

Auch die Analysen nach Kaplan-Meier zeigten gut den Zusammenhang zwischen der Expression der Cathepsine K, B und L und dem rezidivfreien Überleben (Abb. 7 – 9). Alle drei Cathepsinexpressionen wiesen hier einen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Intervall auf, wobei eine hohe Expression immer mit einer reduzierten rezidivfreien Überlebensdauer einherging.

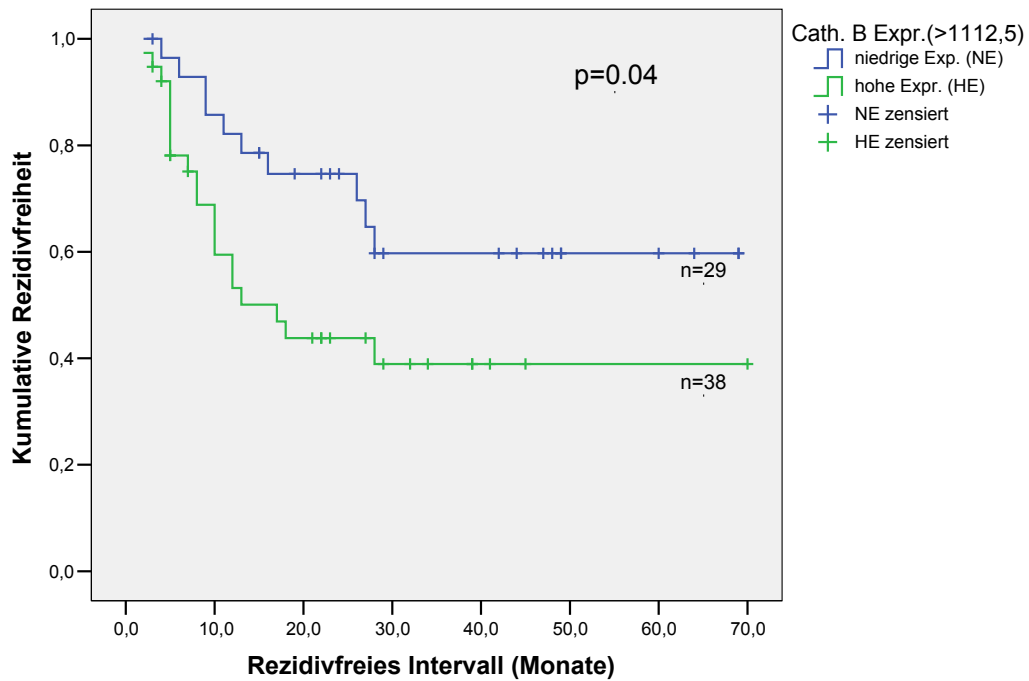


Abbildung 7: Einfluss der Cathepsin B Expression auf das rezidivfreie Intervall (n=67)

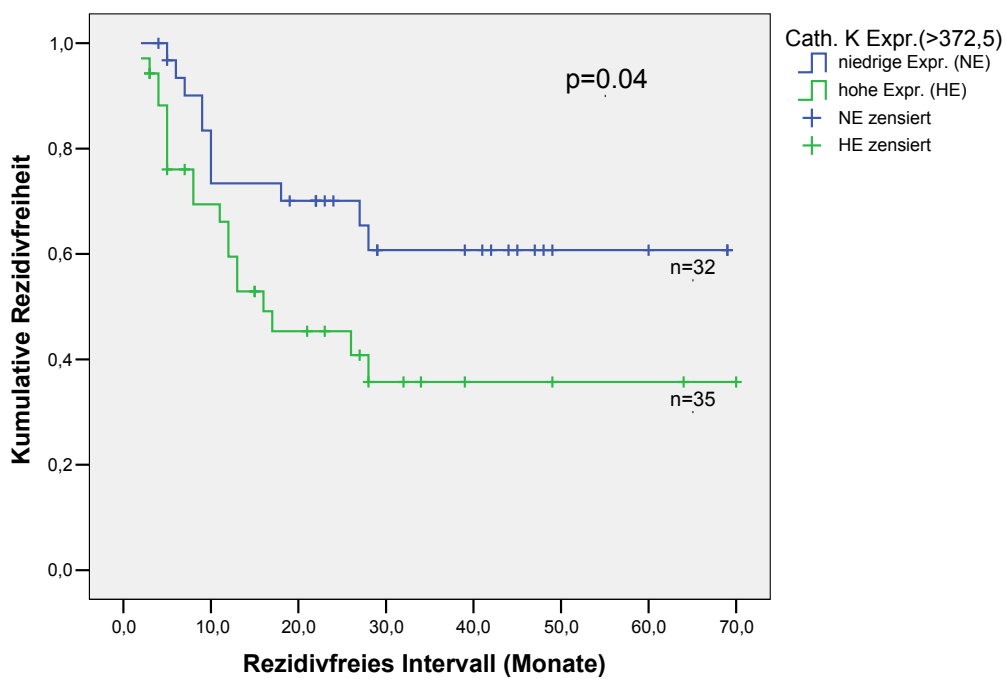


Abbildung 8: Einfluss der Cathepsin K Expression auf das rezidivfreie Intervall (n=67)

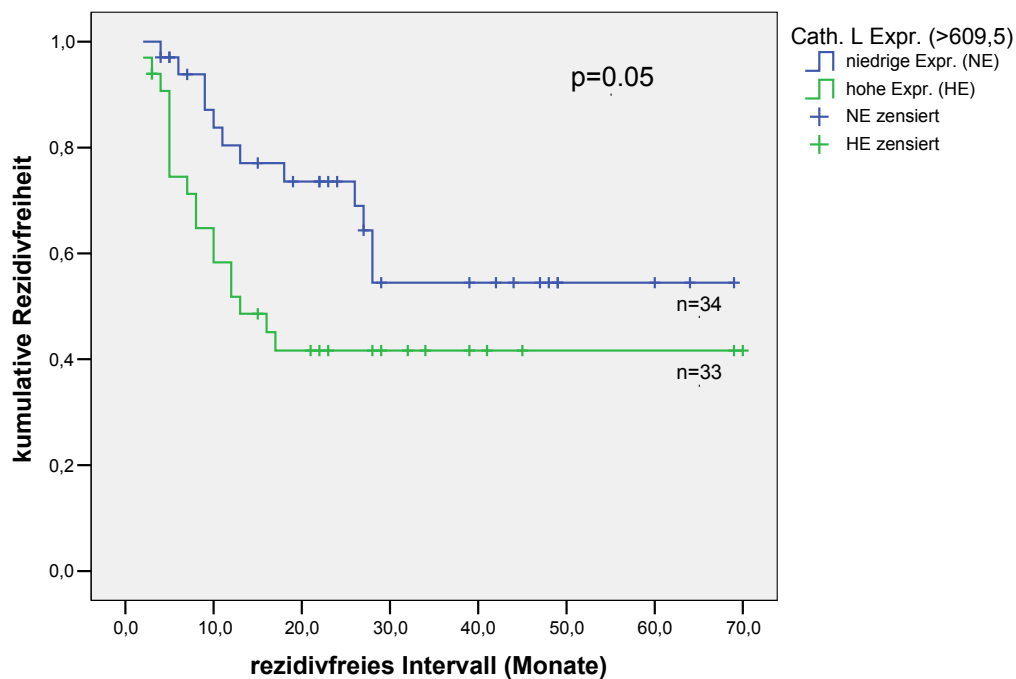


Abbildung 9: Einfluss der Cathepsin L Expression auf das rezidivfreie Intervall (n=67)

4.5 Cathepsine und Überlebenszeit

Untersuchte man den Einfluss dieser Cathepsine auf das Gesamtüberleben, so zeigte sich univariat, dass bei den Cathepsinen B und K ebenfalls ein entsprechender Zusammenhang bestand. Eine hohe Expression der Cathepsine B bzw. K ging mit einer verringerten Überlebensprognose einher (Abb. 10 und 11). Der Zusammenhang zwischen Cathepsin L-Expression und der Überlebenszeit erreichte univariat keine Signifikanz, obwohl an den Überlebenskurven ein sicherlich klinisch bedeutsamer Unterschied hinsichtlich der Überlebenszeit abzulesen ist. (Abb. 12).

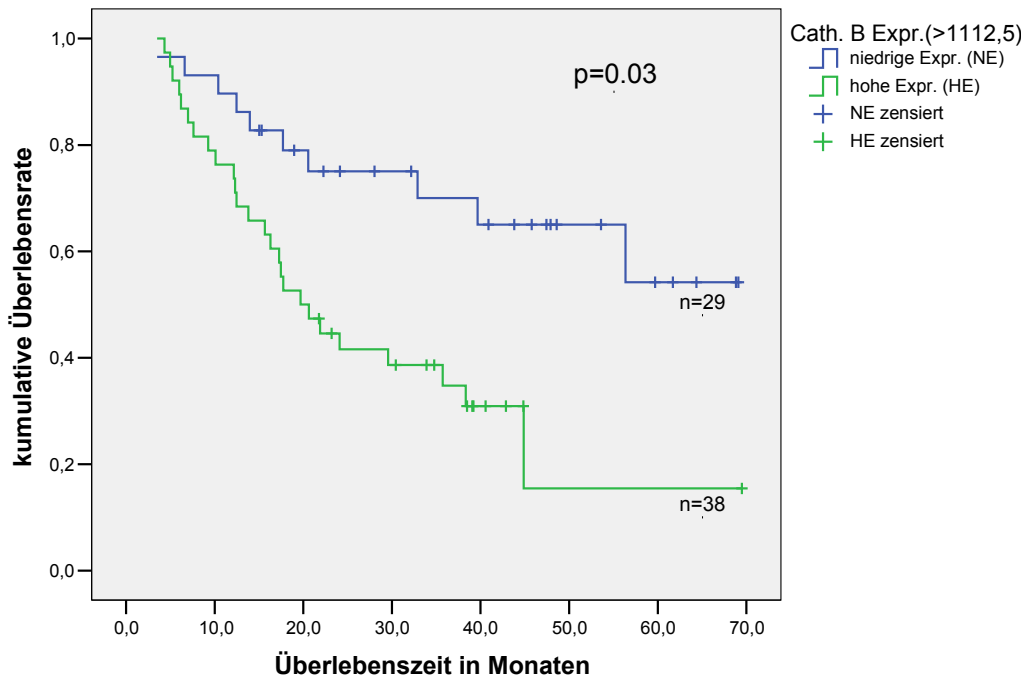


Abbildung 10: Einfluss der Cathepsin B Expression auf die Überlebenszeit (n=67)

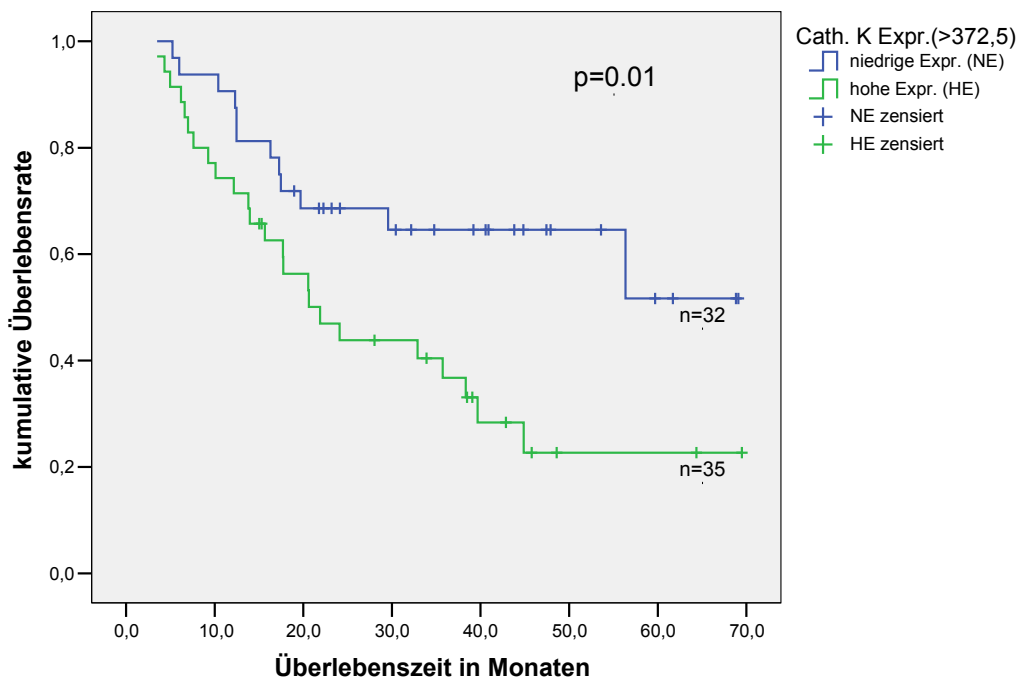


Abbildung 61: Einfluss der Cathepsin K Expression auf die Überlebenszeit (n=67)

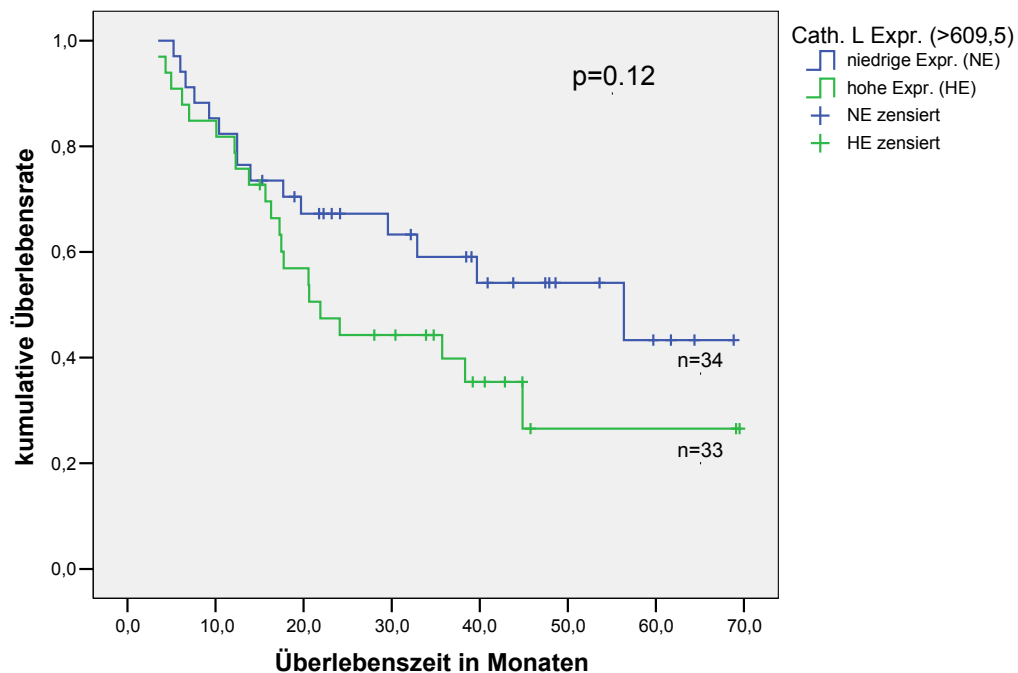


Abbildung 7: Einfluss der Cathepsin L Expression auf die Überlebenszeit (n=67)

Die multivariate Analyse nach Cox bestätigte den Zusammenhang zwischen der Expression von Cathepsine B und K und dem Überleben ($p=0.01$ bzw. $p=0.04$), während Cathepsin L auch in der multivariaten Analyse die Signifikanzgrenze nicht erreichte ($p=0.07$). Wie in den Tabellen 13-15 zusammengefasst, hatte ein Patient mit einer hohen Expression von Cathepsin B, K bzw. L jeweils eine 2.3-, 1.9- bzw. 1.8-fach erniedrigte Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zu einem Patienten mit erniedrigter Expression dieser Cathepsine im Tumor.

Tabelle 13 : Multivariate Cox-Regression für Cathepsin B

		Relatives Risiko	95 % Konfidenzintervall	Multivariat Cox-Regression ($p =$)
Geschlecht	weiblich			
	männlich	1.18	0.46 - 3.08	0.73
Alter	< 65			
	>65	1.27	0.67 - 2.38	0.47
Histologie	Adeno-Ca.			
	Plattenep.-Ca.	1.22	0.61 - 2.46	0.58
TNM	I			0.004
	II	1.27	0.51 - 3.18	0.61
	III	3.12	1.48 - 6.62	0.003
	IV	4.14	1.41 - 12.18	0.01
Cathepsin B Expression Im Tumor	gering			
	hoch	2.29	1.21 - 4.36	0.01

Tabelle 14: Multivariate Cox-Regression für Cathepsin K

		Relatives Risiko	95 % Konfidenzintervall	Multivariat Cox-Regression (p =)
Geschlecht	weiblich	1.55	0.58 - 4.13	0.38
	männlich			
Alter	< 65	1.54	0.79 - 3.01	0.21
	>65			
Histologie	Adeno-Ca. Plattenep.- Ca.	0.94	0.48 - 1.81	0.84
TNM	I			0.003
	II	1.45	0.59 - 3.58	0.42
	III	3.25	1.54 - 6.85	0.002
	IV	5.1	1.67 - 15.57	0.004
Cathepsin K Expression Im Tumor	gering hoch	1.92	1.02 - 3.63	0.04

4.6 Korrelationen der Cathepsinexpression im Bronchialkarzinom

Da hohe Expressionen der Cathepsine B, K und L mit einer erheblichen Verkürzung des rezdivfreien Intervalls einhergehen, untersuchten wir, ob diese Cathepsine in ihrer Expression korrelieren, was eventuell auf eine gemeinsame Regulation Rückschlüsse zuließe. Die Cathepsine B, K und L wiesen sowohl im Lungen- als auch im Tumorgewebe eine sehr unterschiedliche Expression auf.

Bei der Korrelation der Cathepsin L Expression mit der Expression der beiden anderen Cathepsine fiel auf, dass diese überwiegend gleichsinnig exprimiert wurden. Patienten mit hoher Cathepsin L Expression wiesen in 68.3% der Fälle auch eine hohe Expression der Cathepsine B und K auf. Entsprechendes galt für niedrige Expressionslevel (Tab.16).

Tabelle 15: Einfluss der Cathepsin L Expression auf Cathepsin B und K

		Cathepsin L <i>low</i>	Cathepsin L <i>high</i>	Chi-Square (p=)
Cathepsin B	<i>low</i>	28 (68.3%)	13 (31.7%)	0.001
	<i>high</i>	13 (31.7%)	28 (68.3%)	
Cathepsin K	<i>low</i>	28 (68.3%)	13 (31.7%)	0.001
	<i>high</i>	13 (31.7%)	28 (68.3%)	

Einen Überblick über die gegenseitige Expressionsbeeinflussung aller untersuchten Cathepsine bietet die Tabelle 13.

Tabelle 16: Korrelationskoeffizienten aller Cathepsinexpressionen

Cathepsin-expression	B	C	D	E	F	G	H	K	L	O	S	W	Z
B													
C	0.51												
D	0.31	0.11											
E	0.18	0.12	0.11										
F	-0.04	0.08	0.03	0.17									
G	0.18	0.21	0.04	0.14	0.30								
H	0.07	0.25	0.11	0.37	0.52	0.38							
K	0.41	0.21	0.41	0.02	0.16	0.22	0.07						
L	0.57	0.57	0.16	0.16	0.11	0.47	0.29	0.38					
O	0.21	0.40	0.03	0.34	0.51	0.50	0.68	0.33	0.42				
S	0.27	0.42	0.10	0.17	0.25	0.35	0.63	0.21	0.58	0.67			
W	0.23	0.36	0.13	0.11	0.19	0.29	0.59	0.05	0.33	0.52	0.64		
Z	0.34	0.27	0.04	0.01	0.13	0.29	0.30	0.23	0.39	0.31	0.40	0.24	

Bei der Bestimmung der Korrelationskoeffizienten aller Cathepsinexpressionen untereinander, konnten einige Korrelationstrends bestätigt werden, wobei keine Cathepsinexpression statistisch signifikant mit der eines anderen Cathepsins korrelierte. Für die Berechnung wurden absolute Expressionswerte benutzt, welche sich von Cathepsin zu Cathepsin stark unterschieden.

Die Expression des Cathepsin K korrelierte am stärksten mit derer der Cathepsine D, B und L (Korrelation von 41, 41 und 38%). Die Expression der Cathepsine B und L wies eine 57%ige Korrelation auf. Die Expressionen der Cathepsine S und O zeigten insgesamt am häufigsten hohe Korrelation mit anderen Cathepsinen. Besonders hervorzuheben waren hier die Korrelation der Expressionen von Cathepsin S und O untereinander mit 67% und die der Cathepsine O und H mit 68%.

Zusammenfassend deutet die Korrelationstabelle daraufhin, dass bestimmte Gruppen von Cathepsinen gleichsinnig reguliert werden. Wenn ein Cathepsin einer Gruppe hinauf- oder hinunterreguliert wird, so geschieht dies auch mit den anderen Cathepsinen dieser Gruppe. Ebenfalls nicht auszuschließen ist, dass sich die Cathepsine gegenseitig in ihrer Expression beeinflussen.

4.7 Gleichzeitige Expression von Cathepsin B und Cathepsin K

Um die Aussagefähigkeit der Cathepsinexpression noch weiter zu erhöhen, teilten wir alle R0-resezierten Patienten in drei Gruppen ein, in Abhängigkeit von der Expression der beiden für die Überlebenszeit signifikantesten Cathepsine B und K.

Gruppe A bestand aus Patienten, die sowohl Cathepsin B als auch Cathepsin K niedrig exprimierten. Patienten in Gruppe B exprimierten eines der beiden Cathepsine hoch, während die Gruppe C eine hohe Expression beider Cathepsine aufwies. Ziel dieser Einteilung war es, die Aussagekraft der gleichzeitigen Expression zweier in Hinblick auf die Überlebenszeit hochrelevanter Gene zu kombinieren. Insgesamt wiesen 16 Patienten eine niedrige Expression beider Cathepsine auf. Eines der beiden Cathepsine wurde von insgesamt 29 Patienten hoch exprimiert und die übrigen 22 wiesen eine hohe Expression beider Gene auf (n=67). Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 zusammengefasst.

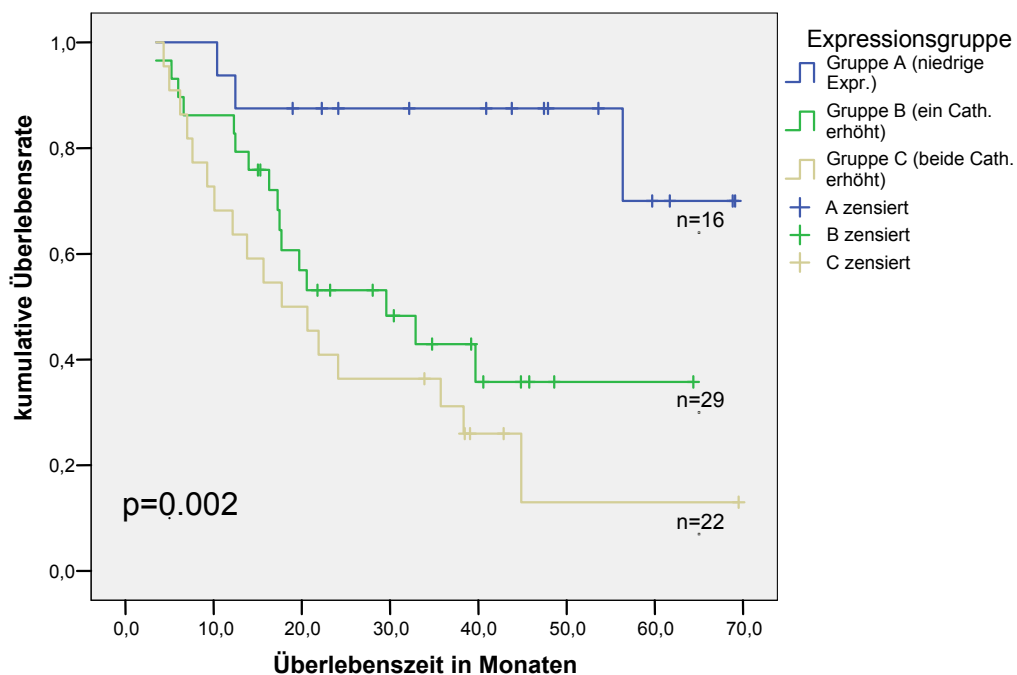


Abbildung 83: Einteilung der Patienten nach Expressionsgruppen (A=niedrige Expression von Cath.B und K; B=Expression eines Cathepsin erhöht; C=Expression beider Cathepsine erhöht)

5 DISKUSSION

Die fortwährende Weiterentwicklung der Molekulargenetik von der Genentdeckung bis zum humanen Genomprojekt bietet die Grundlagen für die strukturelle Genomik. Heute befinden wir uns in einer Phase, in der die Veränderungen im Genom mit funktionellen Änderungen in Verbindung gebracht werden. Dies erweitert die bisherigen Möglichkeiten die Ursachen, Diagnostik und Therapie von vielen Erkrankungen auf eine molekulare Ebene zu überführen.

Mit der DNA-Mikroarraytechnologie sind die technischen Voraussetzungen gegeben, über die Genexpression ein genomweites Bild von Zellen und Geweben zu erhalten. Die mikroarray-basierte Bestimmung von Genexpressionsprofilen könnte einerseits neue krankheitsrelevante Targets und Signalwege identifizieren. Andererseits eröffnet sich im Bereich der Onkologie die Chance der Schaffung neuer Tumorklassifikationen und Stadiierungssysteme. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression von Cathepsinen bei Patienten mit NSCLC als möglichen Prognosefaktor in Bezug auf das Überleben und die Metastasierungswahrscheinlichkeit zu identifizieren. Dies könnte dazu beitragen in naher Zukunft tumorspezifische Gen-Chips zu entwerfen, die eine vom genetischen Profil des einzelnen Patienten abhängige Therapieplanung und Risikoeinschätzung erlauben.

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Tabelle 17 zeigt eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse für alle Cathepsine.

Tabelle 17: Zusammenfassung der Hauptergebnisse für alle Cathepsine

	Cath. B	Cath. C	Cath. D	Cath. E	Cath. F	Cath. G	Cath. H	Cath. K	Cath. L	Cath. O	Cath. S	Cath. W	Cath. Z
Expr. Lunge vs. NSCLC	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓
p-Werte	2.7×10^{-1}	3.7×10^{-3}	3.9×10^{-6}	7.7×10^{-1}	7.6×10^{-4}	7.9×10^{-3}	1.7×10^{-8}	4.3×10^{-3}	9.9×10^{-4}	1.3×10^{-9}	9.7×10^{-6}	1.3×10^{-6}	1.3×10^{-2}
Expr. Lunge vs. Adeno-Ca.	↑	↓	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓
p-Werte	1.0×10^{-1}	1.4×10^{-1}	2.3×10^{-6}	2.4×10^{-1}	1.2×10^{-2}	1.6×10^{-2}	1.5×10^{-5}	5.9×10^{-3}	5.2×10^{-1}	2.4×10^{-5}	6.4×10^{-3}	1.9×10^{-4}	2.8×10^{-2}
Expr. Lunge vs. Plattenep.-Ca.	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓
p-Werte	7.9×10^{-1}	3.2×10^{-4}	4.3×10^{-5}	3.0×10^{-2}	1.5×10^{-4}	6.1×10^{-3}	3.5×10^{-10}	1.6×10^{-2}	2.2×10^{-5}	2.9×10^{-12}	9.7×10^{-8}	5.5×10^{-8}	1.1×10^{-2}
Einfluß auf Häufigkeit von Lokalrez. / Fernm.	Nein	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
p-Werte	0.14	0.02	0.25	0.35	0.38	0.74	0.056	0.1	0.11	0.25	0.09	0.7	0.7
Einfluss auf rezidivfreies Intervall	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein
p-Werte	0.04	0.08	0.13	0.53	0.19	0.86	0.06	0.04	0.05	0.32	0.06	0.79	0.78
Einfluss auf Überlebenszeit	Ja	-	-	-	-	-	-	Ja	Ja	-	-	-	-
p-Werte	0.035							0.014	0.12				

5.2 Auswahl differentiell exprimierter Gene

Mit Hilfe eines von EOS Biotechnology designten DNA Microchips auf der Basis der Affymetrix Genechip© Technologie wurden 99 Nichtkleinzellige Bronchialkarzinome und 15 korrespondierende Lungengewebe untersucht. Zur Evaluierung der in Tumor- und Lungengewebe differentiell exprimierten Gene wurde der *t*-Test unter Anpassung des p-Werts nach Bonferoni verwendet. Im Ergebnis waren von den 59 620 Genen bzw. ESTs nur 187 (0.3%) signifikant im Tumor herauf bzw. 157 (0.3%) herunter reguliert. Hierbei schwanken in der Literatur die Anteile differentiell exprimierter Gene zwischen 0.08 % beim Prostatakarzinom [49] und 20 % beim Mammakarzinom [78]. Diese Unterschiede sind weniger von der Tumorentität als von der Auswahl der untersuchten Gene abhängig.

Tumorspezifische Chips [28], auf denen nur eine kleine Anzahl von Sonden vorhanden sind, besitzen einen wesentlich höheren Anteil an differentiell exprimierten Genen, als Chips, die einen größeren Teil des Genoms repräsentieren. Der prozentual vergleichsweise geringe Anteil an differentiell exprimierten Genen ist in vorliegender Arbeit auf die mit 59.620 Genen sehr hohe Anzahl an untersuchten Genen zurückzuführen.

5.3 Genauigkeit der Mikroarray Technik

Die in der vorliegenden Arbeit registrierten Expressionsunterschiede für Cathepsine lagen zwischen fold-changes von 0.47 und 1.51. Hierbei lag nur ein fold-change unter 0.5 (Cathepsin S: Lunge vs. Plattenepithelkarzinom). Dies wirft die Frage auf, ob die DNA-Mikroarray-Technik beim heutigen Stand der Technik bereits akkurat genug ist um fold-changes unter 2 bzw. über 0.5 zu registrieren. Eine Publikation aus dem Jahre 2004 von Yao beschäftigt sich mit diesem Thema [85]. Yao und Mitarbeiter fanden heraus, dass moderne DNA-Array-Untersuchungen im Vergleich zu einer Kontrolle, die mittels Northern Blot durchgeführt wurde, die fold-changes unterschätzten. D.h. die in den DNA-Array-Untersuchung erhaltenen fold-changes, die immer unter 2 lagen, waren dennoch aussagekräftig, um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren. Eine ältere Studie aus dem Jahre 2001 schreibt dem DNA-Mikroarray-Chip eine sehr hohe Genauigkeit ab einem fold-change von 1.4 zu [86].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass auch kleinere Expressionsunterschiede mit den heute erhältlichen Mikro-Array-Chips mit sehr hoher Genauigkeit untersucht werden können. Damit dürften die vorliegenden fold-changes ausreichend sein, um suffiziente Aussagen über differentielle Expression der Cathepsine zu treffen.

Das Ausmaß der Unterschiede in der Expression ist möglicherweise durch die Art der Untersuchung geringfügig niedriger ausgefallen, als dies mit der konventionellen Northern Blot Technik der Fall gewesen wäre. Dennoch lassen die vorliegenden Daten Rückschlüsse auf relevante Expressionsunterschiede zu.

5.4 Expression von Cathepsinen

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse der Cathepsin-Expression können die Ergebnisse früherer Studien teilweise bestätigen. In dem größten Teil der veröffentlichten Studien wird eine Überexpression, insbesondere von cysteinspaltenden Cathepsinen, im Tumorgewebe beschrieben, welche mit einer Verschlechterung der Prognose einhergeht [30, 33, 53]. Alle diese Studien schreiben den Cathepsinen eine zentrale Rolle in der Entstehung und Progression von Tumoren zu. Auch ist die prognostische und therapeutische Bedeutung der Cathepsine in diesen Publikationen unumstritten. Ihre Funktion in der Apoptose und Angiogenese von Tumorzellen, sowie ihre lysosomale Lokalisation machen die Cathepsine nach Ansicht von Fehrenbacher und Mitarbeiter möglicherweise zu der „Achillessehne“ von Tumoren [14], wobei er Tumorlysosomen als mögliche Targets der Tumorthherapie vorschlägt.

Einige Autoren sehen die Rolle der Cathepsine als Teil der Immunantwort auf ein Tumorgeschehen [40, 57]. Hierbei werden den Cathepsinen in unterschiedlichen Phasen der Tumorenstehung und –progression tumorsuppressive Eigenschaften zugesprochen. Kopitar-Jerala und Mitarbeiter sahen vor allem die Cystatine, als natürliche Inhibitoren der Cathepsine, als wichtige protektive Faktoren an, was wiederum die Cathepsinexpression als negativen Prognosefaktor bestätigt [40].

Die in der vorliegenden Arbeit signifikant unterschiedlich in Tumor- und Lungengewebe exprimierte Cathepsine H und O (siehe Tabelle 17) weisen beide eine niedrigere Expression im Tumor auf. Die Cathepsine K, D und B sind zwar leicht höher im Tumorgewebe exprimiert, jedoch erreicht keines der hochregulierten Cathepsine statistische Signifikanz. Im folgenden wird ausschließlich auf die Expression der Cathepsine B, K und L eingegangen, da diese Proteasen nach Einteilung in Expressionsgruppen (hoch bzw. niedrig exprimiert) Einfluß auf die Überlebenszeit und das rezidivfreie Intervall haben.

5.4.1 Expression des Cathepsin B

In der vorliegenden Arbeit gab es keine signifikanten Expressionsunterschiede von Cathepsin B zwischen Tumor- und Lungengewebe. Die fold-changes zwischen allen NSCLC bzw. Adeno- und Plattenepithelkarzinomen und Lunge lagen bei 1.05 bzw. 1.08 und 1.03.

In gesundem und pathologisch verändertem Schilddrüsengewebe wurde die Expression von Cathepsin B bereits bestimmt [68]. Die Untersuchungen mittels Massenspektrometer ergaben, dass Cathepsin B in neoplastisch verändertem Schilddrüsengewebe stark hochreguliert war. Die Autoren schlugen daraufhin die Bestimmung von Cathepsin B mittels Massenspektrometrie zur Unterscheidung von mikroskopisch nicht eindeutigen Histologiebefunden bei verändertem Schilddrüsengewebe vor.

Auch bei Patienten mit einem Magenkarzinom konnte in 60% der Fälle eine Hochregulierung des Cathepsin B als Protein im Tumor belegt werden [13].

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass auch der Serumspiegel von Cathepsin B in Patienten mit einem Magenkarzinom signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe war ($p=0.0026$). Dabei korrelierte der Serumspiegel mit dem T-Stadium und dem Vorhandensein von Fernmetastasen.

Auch wurde eine hochsignifikante Erhöhung der Cathepsin B Expression in Knochenmetastasen eruiert [2]. Arkona und Mitarbeiter konnte in einer Untersuchung zur Expression von den Cathepsinen B, D, H, L und S sowie einiger weiterer Proteasen in Knochenmetastasen, Basalzellkarzinomen und gesunder Plazenta nachweisen, dass die Cathepsine B und L in Knochenmetastasen überexprimiert waren. Daraus schlußfolgerten sie, dass die Proteasen eine Rolle im Metastasierungsprozess spielen.

Beim Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom wurde in einer Publikation von Delebecq und Mitarbeitern eine Expressionszunahme von Cathepsin B im Tumorgewebe im Vergleich zum umliegenden Lungengewebe festgestellt [11]. Hierbei wurden Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) und Cathepsine auf RNA-Ebene mittels Northern-Blot untersucht. Als Ergebnis fand man für die MMP 11 eine 83.5-fache und für das Cathepsin B eine 2.2-fache Expressionserhöhung im Tumorgewebe.

Weiterhin stellte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen hoher MMP 11 Expression und einer Lymphknotenmetastasierung heraus. Die Autoren schlussfolgerten, dass mehrere Proteasen das Metastasierungspotential des Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms beeinflussen und die Bestimmung der MMP 11-Expression einen prognostischen Marker darstellen könnte.

Die Ergebnisse bezüglich der Cathepsin B Expression fielen in der vorliegenden Arbeit wesentlich geringfügiger aus. Der fold-change zwischen Lunge und NSCLC der Cathepsin B Expression betrug 1.05.

5.4.2 Expression von Cathepsin K

Unter physiologischen Bedingungen spielt das Cathepsin K bei der Knochenresorption eine entscheidende Rolle [76]. Menschen, die unter einem Mangel an Cathepsin K leiden, entwickeln die Pycnodysostose. Dieses Krankheitsbild ist durch eine kleine, gedrungene Statur und ausgeprägte Osteosklerose gekennzeichnet. Cathepsin K spielt somit eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung des physiologischen Gleichgewichts zwischen Knochenaufbau und -abbau. So fand man heraus, dass Mäuse, deren Cathepsin K Synthese ausgeschaltet wurde, zur Osteopetrose neigten. Osteoklasten, die von diesen Mäusen isoliert wurden, wiesen in vitro eine stark verminderte Osteolysefähigkeit auf. Faktoren wie Cytokine (Interferon Gamma, TNF- α), Hormone (Retinoat, Östrogen) und nukleäre Transkriptionsfaktoren (c-jun, Mitf), die direkte Wirkung auf die osteoklastische Knochenresorption haben, können auch die Cathepsin K Expression regulieren. Daraus ergibt sich Cathepsin K als eventuelles therapeutisches Target bei der Behandlung von altersbedingter Osteoporose.

Cathepsin K wurde bereits 2004 von Lindeman in Zusammenhang mit der Ausbildung von Riesenzelltumoren des Knochens gebracht [48]. Mittels mRNA-Profilen wurde die Expression von verschiedenen Proteasen in den osteolytischen Anteilen der Riesenzelltumoren untersucht. Hierbei stellten sich die Cathepsine K und L sowie die Matrixmetalloproteinase 9 als die bevorzugt exprimierten Proteasen heraus. Eine genauere Untersuchung der spezifischen Enzymaktivitäten und dem kompartimentellen Verteilungsmusters der Proteasen ergab große Unterschiede zwischen den einzelnen Enzymen.

Die Aktivität des Cathepsin K war insgesamt sehr hoch und seine Expression, sowie die der assoziierten Protonenpumpe, war auf osteoklastartige Riesenzellen beschränkt, die primär für die Osteolyse im Tumor verantwortlich sind.

Auch das MMP-9 wurde fast ausschließlich in den osteoklastartigen Riesenzellen exprimiert, lag dort jedoch zu 98% in seiner inaktiven Proenzymform vor.

Das Cathepsin L wurde hingegen primär in mononukleären Zellen des Tumors exprimiert. Eine Untersuchung der osteolytischen Aktivität des Cathepsin L durch Kultivierung der Protease auf Dentinscheiben, ergab kein osteolytisches Potential des Cathepsin L.

Die Autoren schlussfolgerten, daß Cathepsin K eine zentrale Rolle bei der Osteolyse in Riesenzelltumoren des Knochens einnimmt und schlugen das Cathepsin K und die damit assoziierte Protonenpumpe als therapeutische Targets vor.

Auffallend ist, dass in der vorliegenden Arbeit alle Patienten mit ossären Fernmetastasen (n=2) eine hohe Cathepsin K Expression aufwiesen, was die Rolle des Cathepsin K im Knochentumorstoffwechsel unterstreicht.

Unsere Untersuchungen ergaben für das Cathepsin K eine 1.32-fache Überexpression im Tumorgewebe gegenüber Lungengewebe, wobei der p-Wert von 4×10^{-3} das gewählte Signifikanzniveau nicht erreichte.

5.4.3 Expression von Cathepsin L

Die Rolle von Cathepsin L bei der Tumorprogression ist der des Cathepsin B sehr ähnlich. Aus diesem Grund wurden die beiden Proteasen in der Vergangenheit sehr häufig zusammen untersucht. Ähnlich wie beim Cathepsin B ist eine Beteiligung des Cathepsin L bei physiologischen Prozessen wie der Knochenresorption bereits belegt [34]. Die Rolle von Cathepsin L beim invasiven Wachstum von Tumoren wurde bisher für Karzinome im Kopf und Halsbereich [7], neoplastische und entzündliche Hautprozesse [8], Mammakarzinome [42], hepatozelluläre Karzinome [46], Pankreaskarzinome [56]; kolorektale Karzinome [67], Gliome und Meningiome [71] sowie bei operativ versorgten Bronchialkarzinomen [35] untersucht. Ähnlich dem Cathepsin B wurde auch hier in allen Studien eine Hochregulierung der Protease in maligne oder entzündlich verändertem Gewebe festgestellt, die mit schnellerer Tumorprogression und schlechterer Prognose einherging.

In der vorliegenden Arbeit konnte zwar keine signifikant erhöhte Expression im Tumorgewebe, wohl aber ein gleichsinniger Trend in Hinblick auf die Prognose bestätigt werden.

Auch wenn im Gegensatz zu Cathepsin B und K die statistische Signifikanzgrenze beim Einfluss auf das rezidivfreie Intervall nur knapp ($p=0.05$) und auf die Überlebensrate nicht erreicht wurde ($p=0.77$), so konnte doch ein klinischer Trend zu schlechterem Outcome bei hoher Cathepsin L Expression dokumentiert werden.

5.5 Einfluss der Cathepsine auf Fernmetastasierung und Lokalrezidive

Bei der Untersuchung der Einflüsse von Cathepsinexpressionen auf die Häufigkeit der Ausbildung von Rezidiverkrankungen ergab sich ein statistisch relevanter Einfluß der Expression von Cathepsin C. Eine hohe Expression der Protease ging mit einem erhöhten Risiko der Ausbildung von Rezidiverkrankungen einher ($p=0.02$). Alle anderen untersuchten Cathepsine wiesen keinen statistischen Zusammenhang mit der Neigung zu Rezidiven auf.

Eine analoge Untersuchung bei Patienten mit Chondrosarkomen [22] hatte einen Zusammenhang von einer hohen Cathepsin B Expression mit der Ausbildung von Lokalrezidiven und Fernmetastasen ergeben. Dabei sind Tumore von 114 Patienten mit Chondrosarkomen des Knochens immunhistochemisch untersucht worden und mit klinischen und pathologischen Parametern sowie Langzeitüberlebens- und Rezidivdaten in Korrelation gesetzt worden. Neben Cathepsin B sind auch die Expressionslevel von Cathepsin L und Urokinase Plasminogenaktivator, sowie von MMP 1, 2 und 9 bestimmt worden. Die Autoren wiesen nach, dass die Überexpression von Cathepsin B mit einer hohen Lokalrezidivrate ($p=0.006$) und einem reduzierten rezidivfreien Intervall ($p=0.005$) assoziiert waren. Sowohl univariat, als auch multivariat stellten die Überexpression des Cathepsin B und die lokale Ausbreitung des Tumors in benachbartes Weichteilgewebe einen unabhängigen Prediktor für ein schlechtes Überleben dar.

Hackel und Mitarbeiter schlossen daraus, dass die Überexpression sowohl von Urokinase Plasminogenaktivator, als auch von Cathepsin B helfen könnte, diejenigen Patienten mit ossärem Chondrosarkom zu identifizieren, die ein erhöhtes Risiko zur Ausbildung von Lokalrezidiven und Fernmetastasen aufweisen und somit gegebenenfalls aggressiver therapiert werden müssten [22].

Ziel einer Untersuchung bei Patientinnen mit Mammakarzinom [51] war die Darlegung eines Zusammenhangs zwischen einer erhöhten Fernmetastasierungsrate bei Patientinnen mit bereits erlittenem Lokalrezidiv und dem Cathepsin D Spiegel im Zytosol. Hierbei wurden 1630 Patientinnen mit brusterhaltender chirurgischer und Radiotherapie beobachtet, von denen 171 ein Lokalrezidiv entwickelten. Untersucht wurden neben Cathepsin D auch Urokinase Plasminogenaktivator (uPA) und dessen Inhibitor, Plasminogenaktivator Inhibitor 1 (PAI-1). Es wurde festgestellt, dass ein kurzes rezidivfreies Intervall und eine Hautbeteiligung beim Primärtumor mit einem reduzierten metastasenfreien und Gesamtüberleben assoziiert waren. Die untersuchten Proteasen einschließlich dem Cathepsin D hatten bei der multivariaten Analyse eine untergeordnete Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Cathepsinexpression auf das rezidivfreie Intervall (DFI) nach Kaplan-Meier untersucht. Dies geschah, um nicht nur die Ausbildung von Lokalrezidiven im gesamten Untersuchungszeitraum zu betrachten, sondern auch den Zeitpunkt des Rezidivs zu untersuchen. Die Untersuchung ergab, dass die Cathepsine B, K und L bei hoher Expression eine hochsignifikante Verkürzung des DFI mit sich brachten. Somit neigen Patienten mit einer hohen Expression der oben genannten Cathepsine besonders früh zu Fernmetastasen und Lokalrezidiven. Auch wenn die Cathepsine B, K und L im vorliegenden Patientenkollektiv keinen Einfluss auf die kumulative Ausbildung von Rezidiven zu haben scheinen, sind sie dennoch an der frühen Zellinvasion und Metastasierung der Karzinome beteiligt und stellen somit prognostische Faktoren dar.

Der hochsignifikante Zusammenhang zwischen hoher Cathepsin K Expression und erheblich verkürztem DFI ist bisher für keine Tumorart dokumentiert worden. Gleiches gilt für Cathepsin L, welches in früheren Studien überhaupt keine Signifikanz in Bezug auf das rezidivfreie Intervall aufwies [42, 71].

5.6 Einfluss der Cathepsine auf die Überlebenszeit

Eine hohe Expression der Cathepsine B und K geht mit einer signifikant schlechteren Überlebensprognose einher. Ein gleichsinniger Zusammenhang bestand bei hoher Cathepsin L Expression, obwohl hier die Signifikanzgrenze nicht erreicht wurde.

Für das Cathepsin B ist ein Zusammenhang mit einem reduzierten Gesamtüberleben der Patienten mit NSCLC bereits in einer früheren Studie belegt worden [81]. Hierbei wurden neben mehreren anderen Serin- und Cysteinproteasen der Proteinspiegel und die enzymatische Aktivität der Cathepsine B und L bei 147 Patienten mit NSCLC eruiert. Die Aktivität des Cathepsin B war im Tumorgewebe um das 5.1-fache erhöht, die Konzentration um das 8.5-fache. Entsprechendes galt für die Konzentration des Cathepsin L, die im Tumor um das 6.6-fache erhöht war. Sowohl Konzentration, als auch Aktivität des Cathepsin B hatten signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten. Cathepsin L wies keine Assoziation mit einer schlechteren Prognose auf.

In vorangegangenen Studien wurde bereits mehrfach ein Zusammenhang zwischen der Expression von Cathepsin B und der Gesamtüberlebenszeit bei Patienten mit Gliomen [71], Magenkarzinomen [13], Melanomen [16], Adenokarzinomen des Pankreas [56] und Mammakarzinomen [47] festgestellt.

Strojnik und Mitarbeiter veröffentlichten 2005 eine Arbeit, in der die differentielle Expression und prognostische Relevanz der Cathepsine B und L bei Patienten mit astrozytären Tumoren untersucht wurden [71]. Die Untersuchung fand mittels immunhistochemischer Färbung statt. Hierbei stellten die Autoren fest, dass sowohl Cathepsin B, als auch Cathepsin L in höherem Maße in malignen als in benignen Tumoren nachweisbar waren. Bei der Korrelation der Cathepsinnachweise mit der Überlebenszeit ergab sich für das Cathepsin B, nicht aber für das Cathepsin L, ein signifikanter Zusammenhang. Ein vermehrter Nachweis von Cathepsin B ging hierbei mit einer signifikant schlechteren Überlebensprognose einher. Die Autoren schlussfolgerten, dass Cathepsin L zwar vorzugsweise in Tumorzellen exprimiert wird und seine Expression mit der Tumorprogression zunimmt, es jedoch eine untergeordnete Rolle bei der Vaskularisierung und damit bei der Metastasierung und Überlebensprognose innehat.

Eine ähnliche Untersuchung sollte 2005 die Rolle unterschiedlicher Proteinexpressionen beim Magenkarzinom herausstellen [13]. Serumspiegel von Cathepsin B in Patienten mit einem Magenkarzinom über 129 pmol/l waren mit einer reduzierten Überlebensrate assoziiert. Die Autoren schlussfolgerten, dass die serologische Bestimmung des Cathepsin B dazu dienen kann Magenkarzinompatienten genau zu klassifizieren und Untergruppen zu identifizieren, die einer aggressiveren Therapie zugeführt werden sollten.

Freitas und Mitarbeiter untersuchten die Heterogenität von Melanomen und versuchten zu erörtern, warum einige Melanomzellen zur Metastasierung neigten, während andere eher selten metastasierten [16]. Es wurden mehrere Zellklone von derselben Melanomzelllinie hergestellt, welche dann Mäusen intravenös zugeführt wurden. Hierbei wiesen zwei Zellklone unterschiedliche Metastasierungsneigungen auf, von denen der eine (Nex2B) kontinuierlich proteolytische Enzyme, wie Cathepsin B, absonderte, während der andere (Nex2D) diese intrazellulär speicherte. Sezernierende Zellen konnten mittels Cysteinproteaseninhibitoren an der Metastasierung gehindert werden, während proteasespeichernde Zellen nicht auf Inhibition reagierten. Die Autoren gehen von einer Dissoziation der Tumorzellen in metastatische und nicht-metastatische Zellen aus und schlagen die Speicherung bzw. das Freiwerden von den Cathepsinen B, D und L als ein Unterscheidungsmerkmal dieser beiden Subtypen vor.

Niedergethmann untersuchte 2004 die prognostische Bedeutung der Expression von Cathepsin B und L bei Patienten mit Adenokarzinomen des Pankreas [56]. Die statistische Analyse zeigte eine Korrelation zwischen der Expression beider Cathepsine und dem Tumorstadium ($p < 0.05$) und zwischen der Cathepsin B Expression und der lymphatischen Invasion ($p = 0.05$). Beide Cathepsine hatten einen negativen Einfluss auf die Überlebenszeit nach der R0-Resektion ($p < 0.05$). In der multivariaten Analyse erwiesen sich beide Cathepsine als starke prognostische Marker für die kumulative Überlebenszeit nach der Resektion ($p = 0.0001$). Die statistische Signifikanz übertraf eindeutig die des UICC-Stadiums, Lymphknotenstatus, der Tumorgöße und des Tumorgadings ($p < 0.05$). Zudem erwies sich die Cathepsin B Expression als unabhängiger Marker für Lokalrezidive innerhalb von 6 Monaten nach der R0-Resektion in der multivariaten Analyse ($p = 0.0001$).

Schlussfolgernd hielten die Autoren fest, dass die Expression der Cathepsine B und L bei Patienten mit duktalem Pankreaskarzinom als sehr aussagekräftige und unabhängige prognostische Marker genutzt werden können. Die Aussagekraft der Cathepsinexpression übersteige hierbei bei weitem die der üblichen Stadiensysteme wie dem TNM-System.

Eine weitere Studie befasste sich mit dem Einfluss von Cystein- und Serinproteasen bzw. deren Inhibitoren auf klinische und pathologische Faktoren bei 150 Patienten mit primär-invasivem Mammakarzinom [47]. Mit Hilfe von ELISA wurden hier Expressionslevel von den Cysteinproteasen Cathepsin B und L und deren endogenen Inhibitoren Stefin A und B, sowie der Serinprotease Urokinase (u-PA) und deren Inhibitor Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) bestimmt. Die Expressionslevel von u-PA, PAI-1 und Stefin B ging mit einer erheblichen Verkürzung des rezidivfreien Intervalls einher, wohingegen beide Cathepsinexpressionen und die des Stefins A unabhängig vom frühen Auftreten eines Tumorrezidivs waren. Allerdings hatten die Expressionen der Cathepsine B und L einen verkürzenden Effekt auf das rezidivfreie Intervall bei Patienten ohne Lymphknotenbeteiligung. Insgesamt wurde jedoch der Expression der Serinprotease u-PA ein höherer prognostischer Stellenwert bei Patienten mit Mammakarzinom beigemessen als den Cysteinproteasen Cathepsin B und L.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine hohe Aussagekraft der Cathepsinexpressionsprofile für die Cathepsine B und K bei Patienten mit NSCLC im Sinne der Arbeit von Niedergethmann aus dem Jahre 2004 bestätigt werden. Zwar erreichte die Expression des Cathepsin L in unserer Arbeit keine statistische Relevanz, aber die Ergebnisse bezüglich des Cathepsin B verhielten sich inhaltlich analog. Die Untersuchungen am Adenokarzinom des Pankreas bestätigen somit die These, dass die Bestimmung von Cathepsinexpressionen eine individuelle Risikoabschätzung erlauben, die in ihrer Aussagekraft der TNM-Klassifikation entsprechen, oder diese gar übersteigen können.

Kayser veröffentlichte 2003 eine Arbeit, in der die Cathepsine B und L auf ihre prognostische Relevanz bei operierten Bronchialkarzinompatienten untersucht wurden [35]. Analog zur vorliegenden Arbeit wurde hier eruiert, dass Cathepsin B einen relevanten prognostischen Aussagewert hat, während dies für Cathepsin L nicht der Fall ist.

Die in der vorliegenden Arbeit jedoch aussagekräftigste Protease, Cathepsin K, wurde bisher nicht in Zusammenhang mit der Überlebenszeit von Tumorpatienten gebracht. Es wurde lediglich eine allgemeine Rolle in der Ausbildung verschiedener Tumoren und anderen Erkrankungen beschrieben [4].

5.7 Gleichzeitige Expression mehrerer Cathepsine

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einzelne Cathepsine bei NSCLC-Patienten zu identifizieren, die in Kombination mit anderen eine genaue Risikoabschätzung und Therapieplanung ermöglichen. Wie effektiv die Aussagekraft einzelner Gene gesteigert werden kann, zeigten bereits Hofmann und Mitarbeiter [27]. Mit der gleichzeitigen Expression von MMP12 und uPA konnten hier detaillierte prognostische Aussagen über Patienten mit NSCLC getroffen werden. Die gleichzeitige Überexpression von MMP12 und uPA war auch hier ein aussagekräftiger Prediktor für frühe Tumormetastasierung und schlechte Überlebensprognose der Patienten. In neusten Arbeiten wird die Kombination mehrerer Prognosefaktoren auch genutzt, um die Sensibilität von Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen auf bestimmte Chemotherapeutika vorherzusagen [25]. Hirsch und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass die Mutation des epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGFR) in Kombination mit einem positiven immunhistochemischen Nachweis des Rezeptors eine Aussage über die Empfindlichkeit gegenüber Gefitinib zulassen. Hierbei konnte die Signifikanz gegenüber der Einzelfaktoren durch deren Kombination deutlich gesteigert werden. Auch am durchgeführten Beispiel konnte die Aussagekraft einzelner Expressionswerte durch Kombination derselben gesteigert werden. Durch die Kombination der Expressionswerte von Cathepsin B und Cathepsin K, die in der vorliegenden Arbeit die aussagekräftigsten Proteasen darstellen, konnten die Patienten in Gruppen eingeteilt werden, die eine hochsignifikante Einschätzung zum individuellen Risiko erlauben. Mit einem p-Wert von 0.002 ist die Überlebensprognose anhand einer Kombination nur zweier genetischer Tumormarker (Cathepsin B und K) in dem vorliegenden Patientenkollektiv ebenso aussagekräftig wie die des TNM-Stadiums ($p=0.002$).

5.8 Ausblick

Die Identifikation weiterer genetischer Targets würde eine Risikoeinschätzung erlauben, die der heute üblichen Stadiierung weit überlegen sein könnte.

Im Verlauf der nächsten Jahre sollte ein Teil der Forschung sich darauf konzentrieren weitere genetische Tumormarker zu identifizieren, damit in naher Zukunft Gen-Chips hergestellt werden können, die die Erkenntnisse der modernen Genomik nutzen, um aussagekräftige Genprofile für jeden einzelnen Patienten zu entwerfen. Diese könnten, besser als heute möglich, helfen eine individuelle Risikoabschätzung und Therapieplanung des Patienten zu erstellen.

6 Literaturverzeichnis

1. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister, *Krebs in Deutschland. 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe*. 4 ed. 2004, Saarbrücken: Robert-Koch-Institut, Berlin. 41-44.
2. Arkona, C. and B. Wiederanders, *Expression, subcellular distribution and plasma membrane binding of cathepsin B and gelatinases in bone metastatic tissue*. Biol Chem, 1996. **377**(11): p. 695-702.
3. Barrett, A.J., *The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors*. Biomed Biochim Acta, 1986. **45**(11-12): p. 1363-74.
4. Berdowska, I., *Cysteine proteases as disease markers*. Clin Chim Acta, 2004. **342**(1-2): p. 41-69.
5. Bernstein, H.G., et al., *The possible place of cathepsins and cystatins in the puzzle of Alzheimer disease: a review*. Mol Chem Neuropathol, 1996. **27**(3): p. 225-47.
6. Bever, C.T., Jr. and D.W. Garver, *Increased cathepsin B activity in multiple sclerosis brain*. J Neurol Sci, 1995. **131**(1): p. 71-3.
7. Budihna, M., 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**(6): p. 385-90.
8. Bylaite, M., et al., *Expression of cathepsin L and its inhibitor hurpin in inflammatory and neoplastic skin diseases*. Exp Dermatol, 2006. **15**(2): p. 110-8.
9. Chapman, H.A., Jr. and G.P. Shi, *Protease injury in the development of COPD: Thomas A. Neff Lecture*. Chest, 2000. **117**(5 Suppl 1): p. 295S-9S.
10. Chapman, H.A., R.J. Riese, and G.P. Shi, *Emerging roles for cysteine proteases in human biology*. Annu Rev Physiol, 1997. **59**: p. 63-88.
11. Delebecq, T.J., et al., *Overexpression level of stromelysin 3 is related to the lymph node involvement in non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(3): p. 1086-92.
12. Doll, R. and R. Peto, *Cigarette smoking and bronchial carcinoma: dose and time relationships among regular smokers and lifelong non-smokers*. J Epidemiol Community Health, 1978. **32**(4): p. 303-13.
13. Ebert, M.P., et al., *Overexpression of cathepsin B in gastric cancer identified by proteome analysis*. Proteomics, 2005. **5**(6): p. 1693-704.
14. Fehrenbacher, N. and M. Jaattela, *Lysosomes as targets for cancer therapy*. Cancer Res, 2005. **65**(8): p. 2993-5.
15. Freedman, D.A. and W.C. Navidi, *Ex-smokers and the multistage model for lung cancer*. Epidemiology, 1990. **1**(1): p. 21-9.
16. Freitas, Z.F., et al., *Melanoma heterogeneity: differential, invasive, metastatic properties and profiles of cathepsin B, D and L activities in subclones of the B16F10-NEX2 cell line*. Melanoma Res, 2004. **14**(5): p. 333-44.
17. Gatenby, R.A. and T.L. Vincent, *An evolutionary model of carcinogenesis*. Cancer Res, 2003. **63**(19): p. 6212-20.
18. Gelb, B.D., et al., *Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency*. Science, 1996. **273**(5279): p. 1236-8.
19. Gibbs, A.R. and F.B. Thunnissen, *Histological typing of lung and pleural tumours: third edition*. J Clin Pathol, 2001. **54**(7): p. 498-9.

20. Goel, A. and S.S. Chauhan, *Role of proteases in tumor invasion and metastasis*. Indian J Exp Biol, 1997. **35**(6): p. 553-64.
21. Granjeaud, S., F. Bertucci, and B.R. Jordan, *Expression profiling: DNA arrays in many guises*. Bioessays, 1999. **21**(9): p. 781-90.
22. Hackel, C.G., et al., *Overexpression of cathepsin B and urokinase plasminogen activator is associated with increased risk of recurrence and metastasis in patients with chondrosarcoma*. Cancer, 2000. **89**(5): p. 995-1003.
23. Halpern, M.T., B.W. Gillespie, and K.E. Warner, *Patterns of absolute risk of lung cancer mortality in former smokers*. J Natl Cancer Inst, 1993. **85**(6): p. 457-64.
24. Hart, T.C., et al., *Mutations of the cathepsin C gene are responsible for Papillon-Lefevre syndrome*. J Med Genet, 1999. **36**(12): p. 881-7.
25. Hirsch, F.R., et al., *Combination of EGFR gene copy number and protein expression predicts outcome for advanced non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib*. Ann Oncol, 2007. **18**(4): p. 752-60.
26. Hoffmann, H., *Resected non-small-cell lung cancer stage I/II: indication for adjuvant/neoadjuvant therapy?* Lung Cancer, 2004. **45 Suppl 2**: p. S91-7.
27. Hofmann, H.S., et al., *Identification and classification of differentially expressed genes in non-small cell lung cancer by expression profiling on a global human 59.620-element oligonucleotide array*. Oncol Rep, 2006. **16**(3): p. 587-95.
28. Inoue, H., et al., *Prognostic score of gastric cancer determined by cDNA microarray*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(11): p. 3475-9.
29. International Union Against Cancer, *TNM Classification of Malignant Tumours*. 5 ed. 1997, New York.
30. Jedeszko, C. and B.F. Sloane, *Cysteine cathepsins in human cancer*. Biol Chem, 2004. **385**(11): p. 1017-27.
31. Jedinak, A. and T. Maliar, *Inhibitors of proteases as anticancer drugs*. Neoplasma, 2005. **52**(3): p. 185-92.
32. Jessup, J.M., *Cathepsin B and other proteases in human colorectal carcinoma*. Am J Pathol, 1994. **145**(2): p. 253-62.
33. Joyce, J.A. and D. Hanahan, *Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer*. Cell Cycle, 2004. **3**(12): p. 1516-619.
34. Kakegawa, H., et al., *Participation of cathepsin L on bone resorption*. FEBS Lett, 1993. **321**(2-3): p. 247-50.
35. Kayser, K., et al., *Expression, proliferation activity and clinical significance of cathepsin B and cathepsin L in operated lung cancer*. Anticancer Res, 2003. **23**(3C): p. 2767-72.
36. Keppler, D., et al., *Tumor progression and angiogenesis: cathepsin B & Co*. Biochem Cell Biol, 1996. **74**(6): p. 799-810.
37. Kiyohara, C., et al., *Genetic polymorphisms and environmental risk of lung cancer: a review*. Rev Environ Health, 2004. **19**(1): p. 15-38.
38. Knudsen, S., *Basic Data Analysis*, in *A Biologist's Guide to Analysis of DNA Microarray Data*. 2002, John Wiley & Sons. p. 17-32.
39. Koolman, R., *Taschenatlas der Biochemie*. 1994, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 146-147.
40. Kopitar-Jerala, N., *The role of cystatins in cells of the immune system*. FEBS Lett, 2006. **580**(27): p. 6295-301.
41. Korst, R.J. and R.J. Ginsberg, *Appropriate surgical treatment of resectable non-small-cell lung cancer*. World J Surg, 2001. **25**(2): p. 184-8.
42. Lah, T.T., et al., *Cells producing cathepsins D, B, and L in human breast carcinoma and their association with prognosis*. Hum Pathol, 2000. **31**(2): p. 149-60.

43. Lenarcic, B., et al., *Human cathepsin B and cysteine proteinase inhibitors (CPIs) in inflammatory and metabolic joint diseases*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1988. **369 Suppl**: p. 257-61.
44. Lenarcic, B., et al., *Differences in specificity for the interactions of stefins A, B and D with cysteine proteinases*. FEBS Lett, 1996. **395**(2-3): p. 113-8.
45. Leonardi, A., B. Turk, and V. Turk, *Inhibition of bovine cathepsins L and S by stefins and cystatins*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1996. **377**(5): p. 319-21.
46. Leto, G., et al., *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**(1): p. 79-83.
47. Levicar, N., et al., *Comparison of potential biological markers cathepsin B, cathepsin L, stefin A and stefin B with urokinase and plasminogen activator inhibitor-1 and clinicopathological data of breast carcinoma patients*. Cancer Detect Prev, 2002. **26**(1): p. 42-9.
48. Lindeman, J.H., et al., *Cathepsin K is the principal protease in giant cell tumor of bone*. Am J Pathol, 2004. **165**(2): p. 593-600.
49. Magee, J.A., et al., *Expression profiling reveals hepsin overexpression in prostate cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(15): p. 5692-6.
50. Mantle, D., et al., *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**(1): p. 65-70.
51. Meijer-van Gelder, M.E., et al., *Breast-conserving therapy: proteases as risk factors in relation to survival after local relapse*. J Clin Oncol, 1999. **17**(5): p. 1449-57.
52. Merletti, F., L. Richiardi, and P. Boffetta, *[Health effects of passive smoking]*. Med Lav, 1998. **89**(2): p. 149-63.
53. Mohamed, M.M. and B.F. Sloane, *Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(10): p. 764-75.
54. Mountain, C.F., *Revisions in the International System for Staging Lung Cancer*. Chest, 1997. **111**(6): p. 1710-7.
55. Muller-Ladner, U., *Molecular and cellular interactions in rheumatoid synovium*. Curr Opin Rheumatol, 1996. **8**(3): p. 210-20.
56. Niedergethmann, M., et al., *Prognostic impact of cysteine proteases cathepsin B and cathepsin L in pancreatic adenocarcinoma*. Pancreas, 2004. **29**(3): p. 204-11.
57. Obermajer, N., B. Doljak, and J. Kos, *Cysteine cathepsins: regulators of antitumour immune response*. Expert Opin Biol Ther, 2006. **6**(12): p. 1295-309.
58. Okada, M., et al., *Long-term survival and prognostic factors of five-year survivors with complete resection of non-small cell lung carcinoma*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003. **126**(2): p. 558-62.
59. Pantel, K., et al., *Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases*. Lancet, 1996. **347**(9002): p. 649-53.
60. Radon, K. and D. Nowak, *[Passive smoking--current position of science]*. Dtsch Med Wochenschr, 2004. **129**(4): p. 157-62.
61. Riese, R.J. and H.A. Chapman, *Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(1): p. 107-13.
62. Roberts, J.R., et al., *Induction chemotherapy increases perioperative complications in patients undergoing resection for non-small cell lung cancer*. Ann Thorac Surg, 2001. **72**(3): p. 885-8.
63. S. Dudoit, Y.Y., M. Callow, T. Speed, *Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments*. 2000, UC Berkeley.

64. Scambia, G., et al., *Clinical significance of cathepsin D in primary ovarian cancer*. Eur J Cancer, 1994. **30A**(7): p. 935-40.
65. Schaefer, L., et al., *Alterations of cathepsins B, H and L in proximal tubules from polycystic kidneys of the Han:SPRD rat*. Kidney Int, 1996. **50**(2): p. 424-31.
66. Shopland, D.R., *Changes in tobacco consumption and lung cancer risk: evidence from studies of individuals*. IARC Sci Publ, 1990(103): p. 77-91.
67. Shuja, S., K. Sheahan, and M.J. Murnane, *Cysteine endopeptidase activity levels in normal human tissues, colorectal adenomas and carcinomas*. Int J Cancer, 1991. **49**(3): p. 341-6.
68. Srisomsap, C., et al., *Detection of cathepsin B up-regulation in neoplastic thyroid tissues by proteomic analysis*. Proteomics, 2002. **2**(6): p. 706-12.
69. Stoeckert, G.G.E.M.C., *Methods of Microarray Data Analysis*. Using non-parametric methods in the context of multiple testing to determine differentially expressed genes, ed. L.S.J. K. 2002, Boston: Kluwer Academic. 37-55.
70. Strojan, P., et al., *Prognostic significance of cysteine proteinases cathepsins B and L and their endogenous inhibitors stefins A and B in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(3): p. 1052-62.
71. Strojnik, T., et al., *Cathepsin L in glioma progression: comparison with cathepsin B*. Cancer Detect Prev, 2005. **29**(5): p. 448-55.
72. Takahashi, S., K. Murakami, and Y. Miyake, *Activation of kidney prorenin by kidney cathepsin B isozymes*. J Biochem (Tokyo), 1982. **91**(1): p. 419-22.
73. Toomes, C., et al., *Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis*. Nat Genet, 1999. **23**(4): p. 421-4.
74. Trabandt, A., et al., *Expression of proteolytic cathepsins B, D, and L in periodontal gingival fibroblasts and tissues*. Lab Invest, 1995. **73**(2): p. 205-12.
75. Travis, W.D., et al., *United States lung carcinoma incidence trends: declining for most histologic types among males, increasing among females*. Cancer, 1996. **77**(12): p. 2464-70.
76. Troen, B.R., *The role of cathepsin K in normal bone resorption*. Drug News Perspect, 2004. **17**(1): p. 19-28.
77. Turk, B., 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**(4): p. 225-30.
78. van 't Veer, L.J., et al., *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer*. Nature, 2002. **415**(6871): p. 530-6.
79. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *The multistep nature of cancer*. Trends Genet, 1993. **9**(4): p. 138-41.
80. Watanabe, Y., *TNM classification for lung cancer*. Ann Thorac Cardiovasc Surg, 2003. **9**(6): p. 343-50.
81. Werle, B., et al., *Cathepsin B, plasminogenactivator-inhibitor (PAI-1) and plasminogenactivator-receptor (uPAR) are prognostic factors for patients with non-small cell lung cancer*. Anticancer Res, 2004. **24**(6): p. 4147-61.
82. Wistuba, II, L. Mao, and A.F. Gazdar, *Smoking molecular damage in bronchial epithelium*. Oncogene, 2002. **21**(48): p. 7298-306.
83. Wolters, P.J. and H.A. Chapman, *Importance of lysosomal cysteine proteases in lung disease*. Respir Res, 2000. **1**(3): p. 170-7.
84. Yan, S., M. Sameni, and B.F. Sloane, *Cathepsin B and human tumor progression*. Biol Chem, 1998. **379**(2): p. 113-23.
85. Yao, B., et al., *Accuracy of cDNA microarray methods to detect small gene expression changes induced by neuregulin on breast epithelial cells*. BMC Bioinformatics, 2004. **5**: p. 99.

86. Yue, H., et al., *An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(8): p. E41-1.
87. Zhang, D., R. Zhang, and G. Cheng, *The surgical treatment of lung cancer: a retrospective analysis of 2004 cases*. *Chin Med J (Engl)*, 1999. **112**(1): p. 25-8.

7 Thesen

1. Bösartige Neubildungen der Lunge gehören zu den häufigsten und prognostisch ungünstigsten Krebsformen. Das mittlere Erkrankungsalter lag in unserer Studie bei 65.5 Jahren bei einer 1-,3- und 5-Jahresüberlebensrate von 78%, 47% und 35%. Hierbei handelte es sich um chirurgisch therapierte Patienten mit Nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom
2. Hauptrisikofaktor für die Ausbildung eines Bronchialkarzinoms ist das inhalative Zigarettenrauchen. In unserer Studie waren 65% der Patienten Raucher mit einer durchschnittlichen Dauer des Nikotinabusus von 33.2 Jahren.
3. Der multifaktorielle Prozess der Tumorentstehung beinhaltet neben Umweltfaktoren vor allem genetische Polymorphismen und Konstellationen, die die Ausbildung eines Bronchialkarzinoms, oder dessen Metastasierung, begünstigen können. Somit gibt es genetische Faktoren, anhand derer patientenspezifische Prognosen erstellt werden können.
4. Cathepsine sind eine Gruppe von lysosomalen Enzymen, die eine zentrale Rolle im Proteinstoffwechsel von gesunden, aber auch neoplastisch veränderten Zellen spielen. Die Expression von bestimmten Cathepsinen lässt Rückschlüsse auf die Aggressivität des Tumors und somit auf die Überlebensprognose von NSCLC-Patienten zu.
5. Die moderne DNA-Micro-array-Technik erlaubt die gleichzeitige Untersuchung einer Vielzahl von Genexpressionen und ist dazu geeignet Expressionsunterschiede ab einem fold-change von 1.4 sicher zu differenzieren.
6. In unserer Arbeit hatte von den klinischen Faktoren nur das TNM-Stadium einen signifikanten Einfluss auf die Überlebenszeit und das rezidivfreie Intervall.

7. Die Cathepsine O und H wurden in der vorliegenden Studie signifikant niedriger im Tumorgewebe im Vergleich zu angrenzendem Lungengewebe exprimiert. Keines der 13 untersuchten Cathepsine wies eine im Vergleich zum Lungengewebe erhöhte Expression im Tumor auf.
8. Eine hohe Expression des Cathepsin C im Tumor geht mit einer erhöhten Rate von Fernmetastasen und Lokalrezidiven einher.
9. Die hohe Expression der Cathepsine B, K und L führt zu einer erheblichen Verkürzung des rezidivfreien Intervalls. Patienten mit einer hohen Expression neigen wesentlich früher zu Rezidiven und der Ausbildung von Fernmetastasen.
10. Eine hohe Expression der Cathepsine B und K im Tumorgewebe geht mit einer deutlichen Verringerung der Überlebenszeit von Patienten mit NSCLC einher. Diese Aussage konnte univariat und multivariat bestätigt werden.
11. Die gleichzeitige Expression von Cathepsin B und K erlaubt eine Einteilung der Patienten in drei hochsignifikant unterschiedliche Expressionsgruppen. Die kumulative Überlebensrate sinkt erheblich in Abhängigkeit von der hohen Expression von keinem, einem oder beider Cathepsine. Hierbei lag der p-Wert in der vorliegenden Studie mit 0.002 ebenso niedrig wie der des TNM-Stadiensystems.
12. Die Expression der Cathepsine S, B und K könnte, in Kombination mit weiteren genetischen Faktoren, eine patientenspezifische Einteilung, Prognoseerstellung und Therapieplanung ermöglichen, welche den Möglichkeiten der heutigen Stadieneinteilungen deutlich überlegen sein könnte.

Colja Cordes
Gütchenstr. 01
06108 Halle (Saale)
Tel. 0345/2905809
e-mail: coljacordes@aol.com

CURRICULUM VITAE

Schulbildung

- 1984 - 1988 Grundschule Schwerte-Wandhofen
1989 - 1998 Ruhrtal-Gymnasium Schwerte

Hochschulbildung

- 1998 - 2005 Studium der Humanmedizin an der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Praktisches Jahr

- 2004 – 2005 Universitätsklinikum Halle Kröllwitz
Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie
Station HTC 2
2005 Universitätsklinikum Halle Kröllwitz
Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie
KIM I Station 4
2005 Universitätsklinik und Poliklinik für Psychiatrie und
Psychotherapie
Stationen „Ziehen“ und „Kleist“

Facharztausbildung

- Seit 01.März 2006 BG Kliniken Bergmannstrost Halle
Klinik für Plastische und Handchirurgie /
Brandverletzentrum

Halle, den 28.08.2008

Colja Cordes

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle, den 28. August 2008

Colja Cordes

Erklärung über Promotionsversuche

Ich erkläre hiermit, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe und dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Halle, den 28. August 2008

Colja Cordes

Publikation von Ergebnissen der Dissertation

Cordes C, et al. *Simultaneous expression of Cahepsin B and K in pulmonary adenocarcinomas and squamous cell carcinomas predicts poor recurrence-free and overall survival*, „Lung Cancer“ (2008) , doi:10.1016/j.lungcan.2008.07.05

Danksagung

Für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit und Dissertation an der Universitätsklinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg möchte ich dem Direktor der Klinik, Herrn Prof. Dr. med. R.-E. Silber, herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. H.-S. Hofmann für eine über die Maßen engmaschige und vorbildliche Betreuung und Unterstützung im gesamten Verlauf der Arbeit. Keinem Doktoranden kann man einen routinierteren und zuverlässigeren Doktorvater wünschen.

Des weiteren bedanke ich mich bei dem fleißigen Team des Archives und des Tumorzentrums des Universitätsklinikums Kröllwitz für die schnelle Beschaffung von Patientenakten und die kontinuierliche Koordination der Datenerhebung.

Meiner Lebensgefährtin Yasmina, danke ich für die Geduld und das Verständnis, sowie die moralische Unterstützung, die sie mir in der Zeit der Promotion entgegengebracht hat.

Mein Dank gilt auch meinen Eltern, die mich stets auf die Wichtigkeit einer Dissertation hinwiesen und einen nicht unerheblichen Anteil an der Regelmäßigkeit meiner Bemühungen tragen. Ihr habt mich immer motiviert und bei der Stange gehalten.

Zuletzt möchte ich meinem alten Freund Dr. med. Daniel Koch für seine Unterstützung beim Promotionsverfahren danken. Seine Erfahrungen haben für mich vieles leichter gemacht.