

Aus dem  
Institut für Arbeits- und Sozialmedizin  
Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin  
der Universität Tübingen  
Leiter: Professor Dr. F. W. Schmahl

**Natriumsalz der Monochloressigsäure:  
Wirkung auf  
Nierenzellen des Menschen  
unter besonderer Berücksichtigung  
der Cathepsin-Aktivitäten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von  
Cordula Christine Günter

2004

**Dekan:**

Professor Dr. C. D. Claussen

**1. Berichterstatter:**

Professor Dr. P. C. Dartsch

**2. Berichterstatter:**

Privatdozentin Dr. H. Schmid

*Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit*

# I INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	1
1.1	Intrazelluläre Proteolyse ist überwiegend lysosomale Proteolyse ...	1
1.2	Cathepsine (Cats)	2
1.2.1	Allgemeines	2
1.2.2	Funktionen der Cathepsine B, L und S	2
1.2.3	Regulierung der Cathepsin-Aktivitäten	5
1.2.4	Cathepsine B, L und S	6
1.2.4.1	Cathepsin B (EC 3.4.22.1)	7
1.2.4.2	Cathepsin L (EC 3.4.22.15)	9
1.2.4.3	Cathepsin S (3.4.22.27)	10
1.3	Cathepsine in A-498-Zellen	11
1.3.1	Cathepsine B, L und S in proximalen Tubuluszellen der Niere	11
1.3.2	Cathepsine B, L und S in Tumoren – Sonderfall Nierenzellkarzinom	12
1.4	Natriummonochloracetat (Na-MCA)	13
1.5	Thematik der vorliegenden Arbeit	18
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	21
2.1	Geräte	21
2.1.1	Geräte für Zellkultur, Zytotoxizitätstests und Herstellung von Gesamtzell-Lysaten	21
2.1.2	Geräte für die subzelluläre Fraktionierung	21
2.1.3	Geräte für die Proteinbestimmung	21
2.1.4	Geräte für die Bestimmung der Cathepsinaktivitäten	22
2.2	Chemikalien	22
2.2.1	Chemikalien für Zellkultur, Zytotoxizitätstests und Herstellung von Gesamtzell-Lysaten	22
2.2.2	Chemikalien für die subzelluläre Fraktionierung	22
2.2.3	Chemikalien für die Proteinbestimmung	23

2.2.4	Chemikalien für die Bestimmung der Cathepsinaktivitäten .....	23
2.3	Lösungen .....	23
2.3.1	Stammlösungen .....	23
2.3.2	Puffer .....	24
2.4	Untersuchungsmaterial .....	24
2.5	Zellkultur .....	25
2.5.1	Kulturmedium .....	25
2.5.2	Inkubationsbedingungen .....	25
2.5.3	Subkultivierung .....	25
2.5.4	Vorversuche zu den Zellkulturbedingungen .....	26
2.6	Zytotoxizitätstests .....	27
2.6.1	Konfluente A-498-Zellen .....	27
2.6.2	Proliferierende A-498-Zellen .....	28
2.7	Aufarbeitung der Proben für die Bestimmung der Cathepsinaktivitäten .....	28
2.7.1	Herstellung von Gesamtzell-Lysaten durch Zellaufschluss ...	28
2.7.2	Subzelluläre Fraktionierung .....	29
2.8	Proteinbestimmung .....	30
2.9	Bestimmung der Aktivitäten der Cathepsine B, L und S .....	31
2.9.1	Versuchsprotokoll zur Bestimmung der Cathepsinaktivitäten B+L+S, B und L .....	32
2.9.2	Versuchsprotokoll zur Bestimmung der Cathepsin S-Aktivität .....	34
2.9.3	Berechnung der Cathepsinaktivitäten .....	34
2.10	Statistische Analyse .....	35
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>36</b>
3.1	Vorversuche zu den Zellkulturbedingungen .....	36
3.2	Konfluente A-498-Zellen .....	38
3.2.1	Untersuchungen an Gesamtzell-Lysaten .....	38
3.2.1.1	Zytotoxizitätstests .....	39
3.2.1.2	Zellprotein .....	40
3.2.1.3	Cathepsinaktivitäten .....	41

3.2.1.4	Einfluss des in vitro-Alters .....	44
3.2.2	Untersuchungen an subzellulären Fraktionen .....	44
3.2.2.1	Subzelluläre Fraktionen im Vergleich .....	46
3.2.2.2	Angereicherte Cathepsinaktivitäten .....	49
3.2.2.3	Cathepsinaktivitäten in der Organellen-Fraktion ...	50
3.2.2.4	Cat-Aktivitäten in % der Cat B+L+S-Gesamtakti- vität .....	51
3.3	Untersuchungen an proliferierenden A-498-Zellen .....	53
3.3.1	Zytotoxizitätstests .....	53
3.3.2	Zellprotein .....	55
3.3.3	Cathepsinaktivitäten .....	56
3.4	Vergleich der Kontrollzellen mit den Zellen vor Beginn der Behandlung mit Na-MCA (sog. t0-Zellen) .....	58
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>61</b>
4.1	Vorversuche zu den Zellkulturbedingungen .....	61
4.1.1	Serum-Konzentration und lysosomale Proteolyse .....	44
4.1.2	Kulturmedium und Cathepsinaktivitäten .....	63
4.2	Zytotoxizität .....	63
4.3	Zellprotein .....	65
4.3.1	Konfluente A-498-Zellen .....	65
4.3.2	Proliferierende A-498-Zellen .....	67
4.4	Cathepsinaktivitäten .....	68
4.4.1	Cathepsinaktivitäten in Gesamtzell-Lysaten .....	68
4.4.1.1	Einfluss des in vitro-Alters .....	72
4.4.1.2	Vergleich der Kontrollzellen mit den Zellen vor Beginn der Behandlung mit Na-MCA (sog. t0-Zellen) .....	72
4.4.2	Cathepsinaktivitäten in subzellulären Fraktionen .....	74
4.4.2.1	Unbehandelte Kontrolle .....	74
4.4.2.2	Na-MCA Exposition .....	76
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>80</b>

<b>6 ANHANG</b> .....	81
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	84
<b>DANKSAGUNG</b> .....	102
<b>LEBENS LAUF</b> .....	103

## II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMC	7-Amino-4-methyl-cumarin
APCs	antigen-presenting cells (Antigen-präsentierende Zellen)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CA-074	L-3-trans-Propylcarbamyloxiran-2-Carbonyl-L-Isoleucyl-L-Prolin
Cat(s)	Cathepsin(e)
CPI(s)	Cysteinprotease-Inhibitor(en)
Cyt	Cytosol-Fraktion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
E-64	L-trans-Epoxy succinyl-Leucin-(4-Guanidino-) Butylamid
ED <sub>50</sub>	Effektivdosis einer Testsubstanz, die zu einem Vitalitätsverlust von 50 % der Zellen führt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZR	Extrazellulärraum
FCS	fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
G	Gesamtzell-Lysat
g	Erdbeschleunigung ( $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ ); Gramm
Ii	invariante Kette
K	K-Fraktion aus Zellkernen, Zelltrümmern und ganzen Zellen
K <sub>i</sub>	Inhibitor konstante
K <sub>M</sub>	Michaeliskonstante
LD <sub>50</sub>	Letaldosis einer Testsubstanz, die den Tod von 50 % der Versuchstiere zur Folge hat



LMW	low molecular weight (niedriges Molekulargewicht)
MCA	Monochloressigsäure
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MG	Molekulargewicht
MHC	major histocompatibility complex (Haupt-histokompatibilitätskomplex)
MV	mean value (Mittelwert)
Na-MCA	Natriummonochloracetat
Org	Organellen-Fraktion aus Endosomen, Lysosomen, Mikrosomen und Mitochondrien
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD	population doubling(s) (Populationsverdopplung(en))
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwerts)
U	Unit (1 U = 1 $\mu$ mol Substratumsatz/min; Einheit der Enzymaktivität)
Z-Phe-Arg-AMC	Benzyloxycarbonyl-L-Phenylalanyl-L-Arginyl-7-Amido-4-Methylcumarin
Z-Phe-Phe-CHN <sub>2</sub>	Benzyloxycarbonyl-Diphenylalanyl-Diazomethylketon

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Intrazelluläre Proteolyse ist überwiegend lysosomale Proteolyse

Es gibt über 20 verschiedene Abbauwege für Proteine in der Zelle (Bohley, 1995), wovon fast 2/3 auf das endosomal-lysosomale Kompartiment und fast 1/3 auf das Proteasom entfallen (Ahlberg et al., 1985; Otto und Schirmeister, 1997). Im Proteasom, einem Proteasenkomples im Zytoplasma (Rivett, 1998), läuft vor allem spezifische, limitierte Proteolyse ab, welche aber auch im endosomal-lysosomalen System anzutreffen ist, etwa im Rahmen der Antigenpräsentation und der Aktivierung bzw. Deaktivierung von Enzymen und Hormonen (Otto und Schirmeister, 1997). Unspezifischer Massenumsatz von Proteinen als Voraussetzung dauerhafter Zellintegrität (Debigare und Price, 2003) ist eine Domäne des endosomal-lysosomalen Proteolysewegs (Bohley und Seglen, 1992; Kadowaki und Kanazawa, 2003) und wird bewerkstelligt durch das Zusammenspiel von Endopeptidasen (= Proteinasen) und Exopeptidasen (= Peptidasen) (Bohley und Seglen, 1992). Über den endosomal-lysosomalen Abbauweg (frühe Endosomen → späte Endosomen → Lysosomen) werden hydrolysiert sowohl endogene Proteine nach Autophagozytose als auch durch Phagozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommene Fremdproteine (Knop et al., 1993; Seglen und Bohley, 1992). Lysosomen bieten mit ihrem sauren (um pH 5) und reduzierenden Milieu (Fineschi und Miller, 1997) sowie dem zumindest weitgehenden (Bohley und Seglen, 1992; Ebert et al., 2003) Fehlen von Cysteinproteasen-Inhibitoren optimale Bedingungen für die Aktivität ihrer wichtigsten Proteasen, der Cathepsine (Agarwal, 1990; Andreu und Schwartz, 1995; Schröter, 1999). Diese sind für 70–80 % der proteolytischen Aktivität in Lysosomen verantwortlich (Würl et al., 1997) bei hohen lysosomalen Konzentrationen von 10–40 mg/ml (Otto und Schirmeister, 1997).

## 1.2 Cathepsine (Cats)

### 1.2.1 Allgemeines

Die Bezeichnung „Cathepsin“ (auch „Kathepsin“, von griechisch „καθελειν“, verdauen) wurde zum ersten Mal 1929 von Willstätter und Bamann (1929) aufgebracht, die hiermit eine Nonpepsin-Protease in der Magenschleimhaut bezeichneten. Heute umfassen die nach Großbuchstaben unterteilten Cathepsine Aspartat-, Serin- und Cystein-Endopeptidasen sowie auch einige wenige (meist in zusätzlicher Funktion) Exopeptidasen. Die Cysteinproteasen als größte Gruppe gehören alle zur Papain-Superfamilie (Clan CA, Familie C1).

Den ersten Cathepsinen wurden aufgrund ihres überwiegend ubiquitären Vorkommens vor allem „housekeeping“-Funktionen zugeschrieben. Durch die bis heute fortdauernde Entdeckung immer neuer Cathepsine mit überwiegend eingeschränktem Gewebevorkommen rückten die spezifischen Enzymfunktionen ins Blickfeld (Chapman et al., 1997; Wiederanders, 2003).

### 1.2.2 Funktionen der Cathepsine B, L und S

Die Hauptaufgabe der lysosomalen Cathepsine *in vivo*, insbesondere der „housekeeping“-Enzyme Cats B und L (Petanceska und Devi, 1992) – Cats B und L sind involviert in bis zu 70 % der intrazellulären Proteolyse (Eisenberger et al., 1995) – ist der unspezifische, vollständige Abbau von Proteinen zu Aminosäuren. Darüber hinaus erfüllen Cathepsine, zumindest *in vitro* (Otto und Schirmeister, 1997), auch spezifische, limitierte Proteolysefunktionen, indem sie andere Proteine (Enzyme, Hormone) aktivieren oder deaktivieren. So katalysiert Cat B beispielsweise die Konversion von Proalbumin zu Albumin (Quinn und Judah, 1978), Prorenin zu Renin (Takahashi et al., 1982; Wang et al., 1991) und Trypsinogen zu Trypsin. Durch vorzeitige, d. h. bereits intrapankreatische Trypsinogen-Aktivierung ist Cat B entscheidend involviert in die Pathogenese der akuten Pankreatitis (Halangk et al., 2000; Steer, 1992). Zusammen mit Cat H katalysiert Cat B die Konversion von Proinsulin zu Insulin (Ansorge et al., 1977), und zusammen mit Cat L reguliert Cat B die Aktivität der Aldolase (Bond und Barrett, 1980). Cat L beispielsweise aktiviert die Nukleotid-Phosphodiesterase und katalysiert die Konversion von Kininogenen (Familie 3-CPIs, s. 1.2.3) in Ki-

nin (Desmazes et al., 2001). Auch die Solubilisierung und limitierte Proteolyse von Thyreoglobulin geschieht durch Cathepsine (vor allem Cats B, D, K und L) (Brix et al., 1996; Dunn et al., 1991 und 1996; Friedrichs et al., 2003).

Ein weiteres Beispiel von limitierter Proteolyse durch Cathepsine ist die MHC Klasse II-vermittelte Antigen- und Autoantigen-Präsentation durch Prozessierung der invarianten Kette (Ii) und Abbau von Antigenen zu Peptiden. Hauptverantwortlich hierfür ist in APCs exprimiertes Cathepsin S, welches in Epithelzellen des Menschen als einzige Cysteinprotease zum effektiven Ii-Abbau fähig ist (Bania et al., 2003; Nakagawa und Rudensky, 1999); nur in kortikalen Thymusepithelzellen der Maus wird diese Funktion von Cat L wahrgenommen (Nakagawa et al., 1998). Die selektive Hemmung von Cat S (z. B. durch den spezifischen Inhibitor Clk60 (Katunuma et al., 1999)) bietet sich deshalb als neue und vielversprechende therapeutische Strategie gegen Autoimmunerkrankungen an, indem sie die Autoantigen-Präsentation verhindert (Saegusa et al., 2002).

Außerhalb des endosomal-lysosomalen Kompartiments findet man die Cathepsine – oft in der stabileren Proform (Turk et al., 2000) – meist nur unter pathologischen Bedingungen (Turk et al., 2000). So werden Cathepsine etwa von Entzündungszellen (Cats B, L und S z. B. von Makrophagen) und Tumorzellen (Cats B und L) in den bei Entzündungen und malignen Prozessen sauren (Wolters und Chapman, 2000) EZR sezerniert (Chauhan et al., 1991; Heidtmann et al., 1993; Podgorski und Sloane, 2003; Reddy et al., 1995), wo sie unter Ausnutzung einer Imbalance zwischen sich und ihren endogenen Inhibitoren extrazelluläre Matrix abbauen (Calkins und Sloane, 1995).

Durch diesen Abbau von extrazellulärer Matrix und Basalmembranen fördern die Cats B, L und D die Tumorinvasion und Metastasierung (Turk et al., 2002), und Cat B unterstützt zusätzlich Tumorwachstum und -angiogenese durch die Aktivierung von TGF- $\beta$  (Koblinski et al., 2000; Strojnik et al., 1999). Cat S hingegen scheint eher an anti-Tumor-Immunreaktionen (Regulierung der Präsentation von Tumor-assoziierten Antigenen durch MHC II-Moleküle) beteiligt zu sein (Kos et al., 2001). Interessanterweise kommt dem für die Tumorprogression so wichtigen Cat B im malignen Geschehen auch noch eine völlig konträre Rolle zu: Cat B fungiert auch als essentieller Mediator einer TNF-induzierten Tu-

morzell-Apoptose und könnte sich hierdurch als nützlich für die Krebstherapie erweisen (Foghsgaard et al., 2001). Zunehmende Bedeutung gewinnen die Cats zudem als Prognosefaktoren bei den verschiedensten Tumorerkrankungen (Kos und Lah, 1998).

Cathepsine spielen durch den Abbau extrazellulärer Matrix eine Rolle bei entzündlichen Vorgängen (bzw. Erkrankungen mit Beteiligung von Entzündungszellen wie Makrophagen) im gesamten Körper; dazu zählen:

- entzündliche Knochen- und Gelenkerkrankungen wie Osteoarthritis und Rheumatoide Arthritis mit Cat B-Beteiligung (Hashimoto et al., 2001; Lang et al., 2000; Zwicky et al., 2002),
- entzündliche Myopathien (Polymyositis, Dermatomyositis) mit wichtiger Rolle der Cats B und L (Kumamoto et al., 1997),
- entzündliche Atemwegserkrankungen wie Asthma mit pathogenetisch bedeutsamem Cat S (Cimerman et al., 2001) und wie Lungenemphysem mit den elastinolytischen Cysteinproteasen Cats K, L und S, welche extrazelluläre Matrix, speziell Elastin der Lunge abbauen (Takahashi et al., 1993),
- Gingivitis und Periodontitis mit erhöhten Cats B, D und L-Spiegeln (Traubandt et al., 1995),
- entzündliche ZNS-Erkrankungen wie Multiple Sklerose mit erhöhter Cat B-Aktivität (Bever und Garver, 1995),
- septischer Schock mit pathogenetisch bedeutsamem Cat B (Assfalg-Machleidt et al., 1988) und
- Atherogenese mit zentraler Funktion des Cat S (Sukhova et al., 2003).

Ihre Beteiligung an den verschiedensten pathologischen Vorgängen im Körper – noch immer Gegenstand intensiver Forschungsarbeit – macht Cathepsine zu attraktiven Zielsubstanzen für die Entwicklung selektiver Inhibitoren als neue therapeutische Agentien mit z. T. noch ungeahnten Einsatzmöglichkeiten.

Beispiele für nicht-pathologischen, kontrollierten Abbau extrazellulärer Matrix durch Cathepsine sind ihre Beteiligung an der normalen Entwicklung und Funktion des Endometriums (Jokimaa et al., 2001) sowie an Implantation und Plazentation während der Schwangerschaft (Afonso et al., 1997).

Bei manchen Erkrankungen ist ein Kausalzusammenhang mit Cathepsinen umstritten, so etwa bei Cathepsin S in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit (Bernstein et al., 1996; Lemere et al., 1995).

Für die Erforschung der in vivo-Funktionen der Cathepsine erwiesen sich sogenannte „knockout“-Mäuse als besonders geeignet, denen einzelne Proteasen fehlen (Reinheckel et al., 2001). So zeigen etwa Cat L-defiziente Mäuse periodischen Haarverlust und epidermale Hyperproliferation, wodurch die entscheidende Rolle von Cat L für die Differenzierung der Epidermis und Regulierung des Haarzyklus deutlich wird (Roth et al., 2000). Ein interessantes Ergebnis der Untersuchungen an „knockout“-Mäusen war die Feststellung einer funktionellen Überlappung verschiedener lysosomaler Cysteinproteasen. So führt beispielsweise nur das Fehlen beider Cathepsine B und L – genauer, aller vier Allele – zu massiver Hirnatrophie mit letalem Ausgang und demonstriert damit die Kompensation der beiden Proteasen in vivo (Felbor et al., 2002).

### **1.2.3 Regulierung der Cathepsin-Aktivitäten**

Die Kontrolle der reifen Cysteinproteasen-Cathepsine erfolgt in erster Linie über Cysteinproteasen-Inhibitoren (= CPIs).

Hauptaufgabe der physiologischen Proteasen-Inhibitoren ist die Hemmung derjenigen aktiven Proteasen, die außerhalb ihres Kompartiments gelangt sind, hier also der extralysosomalen Cathepsine. Deshalb enthalten Zytoplasma und Extrazellulärraum größere Mengen CPIs, welche dort unkontrollierte Proteolyse – wie sie etwa bei chronischen Entzündungen und in Tumoren vorkommt – verhindern sollen (Chapman et al., 1997). Am weitesten verbreitet unter den endogenen CPIs ist die Cystatin-Superfamilie (Turk et al., 2002). Daneben gibt es mehrere andere strukturell abweichende CPIs, als deren wichtigste Gruppe die kürzlich entdeckten Thyropine gelten, zu denen auch das p41 Ii-Fragment gehört (Lenarcic und Bevec, 1998).

Die Inhibitoren der Cystatin-Superfamilie hemmen die Cysteinproteasen der Papain-Superfamilie durch kompetitive und reversible, aber enge Bindung (Lah und Kos, 1998; Nicklin und Barrett, 1984; Vray et al., 2002; Otto und Schirmeister, 1997). Sie werden unterteilt in drei Familien: die LMW-Proteine Stefine

(= Familie 1), die Cystatine (= Familie 2) sowie die höhermolekularen Glykoproteine Kininogene (= Familie 3) (Abrahamson, 1994; Otto und Schirmeister, 1997; Turk et al., 1997). Stefine (Stefin A und B) sind primär intrazelluläre Proteine im Zytosol vieler Zelltypen, kommen aber auch in mehreren Körperflüssigkeiten, also extrazellulär vor. Cystatine (Cystatin C, D, S, SN und SA) sind extrazellulär in relativ hohen Konzentrationen vorhanden, wobei Cystatin C als der am weitesten verbreitete, universellste und am stärksten hemmende (kleinste  $K_i$ -Werte) Vertreter der Superfamilie gilt (Abrahamson, 1994; Brömme et al., 1991). Was die in vorliegender Arbeit untersuchten Cathepsine B, L und S angeht, stellt Cystatin C insofern eine Ausnahme dar, als es Cathepsin L > Cathepsin S > Cathepsin B hemmt, während die übrigen Cystatine Cathepsin S > Cathepsin L > Cathepsin B inhibieren (Abrahamson, 1994; Kirschke et al., 1995; Musil et al., 1991). Die dritte Familie, die Kininogene findet man vor allem in Blut und Synovialflüssigkeit.

Während Kininogene bei pH-Werten unter 4 und Temperaturen über 50 °C instabil werden, zeigen Stefine und Cystatine eine im Vergleich zu anderen Proteinen außergewöhnliche Stabilität unter extremen pH-Werten und hohen Temperaturen (Barrett, 1986; Barrett et al., 1986).

Außer den beschriebenen natürlichen CPIs existiert eine zunehmende Zahl synthetisch hergestellter, zum Teil hochspezifischer CPIs. Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen CPIs sind unter 2.9 dargestellt.

#### **1.2.4 Cathepsine B, L und S**

Die in vorliegender Arbeit untersuchten Cathepsine B, L und S gehören – wie die meisten Cathepsine – zu den Cysteinproteasen der Papain-Superfamilie. Diese Papain-ähnlichen Cysteinproteasen zeigen Sequenzhomologien von 30 bis 60 % auf Proteinebene, die auf ein gemeinsames Ursprungsgen schließen lassen (Turk et al., 2000; Turk et al., 2002).

Die wichtigsten Fakten bezüglich der Cathepsine B, L und S sind in Tab. 1 zusammengestellt. Einige speziellere, für diese Arbeit relevante Gesichtspunkte werden anschließend gesondert ausgeführt.

**Tab. 1: Eigenschaften der Cathepsine B, L und S**

APCs = Antigen-präsentierende Zellen, EZR = Extrazellulärraum, AS = Aminosäuren, AMC = 7-Amino-4-methyl-cumarin,  $K_M$  = Michaeliskonstante

Cathepsin	B	L	S
Chromosom	8p22–p23.1	9q21–q22	1q21
Vorkommen	ubiquitär v. a. Lysosomen	ubiquitär v. a. Lysosomen	APCs späte Endosomen > Lysosomen
Art der Protease-Aktivität	Exo- (v. a. Lysosomen), Endopeptidase (v. a. EZR)	Endopeptidase	Endopeptidase
Signalpeptid	AS 1–17	AS 1–17	AS 1–15
N-Propeptid	AS 18–79	AS 18–113	AS 16–114
reifes Enzym	AS 80–333 ein- /zweikettig	AS 114–333 ein- / zweikettig	AS 115–331 einkettig
$M_{G_{berechnet}}$ (kDa)	37,807	37,564	37,479
$M_{G_{SDS-PAGE}}$ (kDa)	Proenzym: 38 reifes Enzym: 30	Proenzym: 38 reifes Enzym: 28	Proenzym: 37 reifes Enzym: 24
C-Propeptid	AS 334–339	–	–
isoelekt. Punkt	4,5–5,5	5,0–6,1	6,3–6,9
pH-Optimum (Z-Phe-Arg-AMC)	6,5	5,5–6	6–6,5
stabil bei pH 7,5	nein	nein	ja
$K_M$ gegen Z-Phe-Arg-AMC ( $\mu$ M)	$223 \pm 46$ (pH 6,0)	$2,8 \pm 0,5$ (pH 5,5)	$14,7 \pm 1,7$ (pH 6,5)

#### 1.2.4.1 Cathepsin B (EC 3.4.22.1)

Beim „housekeeping“-Enzym Cathepsin B (Cat B) (Qian et al., 1991) handelt es sich um die im Gewebe am weitesten verbreitete lysosomale Cysteinprotease (Chapman et al., 1997; Musil et al., 1991; Turk et al., 1997). In Lysosomen, d. h. um pH 5, besitzt Cat B vor allem Exopeptidaseaktivität als Carboxydipeptidase



(= Dipeptidyl-Carboxypeptidase, d. h. Peptidyl-dipeptidase und Carboxypeptidase) bei einer vergleichsweise geringen Endopeptidase-Wirkung. Das pH-Optimum der Endopeptidase-Aktivität liegt bei pH 7,4, also im extrazellulären Milieu (Linebaugh et al., 1999). Verantwortlich für die hauptsächliche Exopeptidase-Wirkung des Cat B ist die sog. „occluding loop“ aus 20/21 Aminosäureresten (Illy et al., 1997/Turk et al., 2002), die das Katalyse-Zentrum teilweise besetzt hält (Musil et al., 1991). Hierdurch wird die Bindung der Cystatine im aktiven Zentrum von Cat B erschwert, was seine im Vergleich zu anderen Cysteinproteasen nur schwache Inhibierung erklärt (Barrett et al., 1998). Flexibilität der „occluding loop“ ermöglicht die als evolutionäres Überbleibsel (Illy et al., 1997) angesehene Endopeptidase-Restaktivität (Turk et al., 2002). Cat B verfügt über mehrere Mechanismen, katalytische Aktivität im extralysosomalen bzw. extrazellulären Milieu aufrechtzuerhalten (Barrett et al., 1998), obgleich reifes Cat B bei neutralem und alkalischem pH spontan denaturiert infolge Autodegradation (Buck et al., 1992). Zu diesen Mechanismen gehören:

- bei alkalischem pH stabiles Procathepsin B (Barrett et al., 1998),
- höhermolekulare Spleiß-Varianten von Cat B als sezernierte Formen in einigen Tumoren mit erhöhter Translation und Stabilität (Otto und Schirmeister, 1997),
- nichtkovalente Komplexe aus Cat B und seinem Propeptid stabil bei neutralem pH (Barrett et al., 1998),
- Tumor-Cat B resistenter gegenüber seinen Inhibitoren (Turk et al., 2002) – bei sowieso schon schwacher Cystatinbindung an Cat B (Illy et al., 1997; Keppler et al., 1994) sowie
- durch Bindung an Membransysteme der Zelle vor Inaktivierung geschütztes Cat B (Otto und Schirmeister, 1997).

Erst so wird verständlich, wie u. a. von Tumor- und Entzündungszellen, z. B. Makrophagen (Wolters und Capman, 2000) in den alkalischen Extrazellulärraum sezerniertes Cat B dort dauerhaft am Abbau extrazellulärer Matrix-Proteine – wie Typ IV-Kollagen, Laminin und Fibronectin (Buck et al., 1992; Liuzzo et al., 1999) – mitwirken kann. Dabei sezernieren Tumorzellen in erhöhten Mengen vorzugsweise inaktives Procathepsin B – welches durch anschlie-

ßende Bindung an die Tumorzell-Oberfläche seine Konversion zur aktiven Form fördert (Roshy et al., 2003) – daneben aber auch beide aktiven Cat B-Formen, Einzel- und Doppelstrang-Form (Frosch et al., 1999; Podgorski und Sloane, 2003). Von „erhöhter Sekretion“ ist zu sprechen, da auch normale Zellen lysosomale Enzyme sezernieren, allerdings nur in sehr geringen Mengen von ca. 5 % (Frosch et al., 1999).

#### **1.2.4.2 Cathepsin L (EC 3.4.22.15)**

Das ebenfalls weitverbreitete Cathepsin L (Cat L) ist die aktivste Endopeptidase unter den lysosomalen Cysteinproteinasen (mindestens 10-mal schnellere Spaltung von Peptidbindungen als durch andere Cats einschließlich Cats B und H (Bohley und Seglen, 1992)) mit breitem Substrat-Spektrum (Barrett et al., 1998). Das pH-Optimum ist abhängig von der jeweiligen Spleiß-Variante – fünf wurden bisher entdeckt (Arora und Chauhan, 2002) – und liegt (für synthetische Substrate) um pH 5,5 (Turk et al., 1993). Bei neutralen und alkalischen pH-Werten erweist sich reifes Cat L als instabilste lysosomale Cysteinprotease (Turk et al., 1993). Seine größte Sequenz- und Strukturähnlichkeit zeigt Cat L mit Cat S (McGrath et al., 1998). Unterscheiden lassen sich die beiden Cats z. B. mittels p41, einer Isoform der MHC Klasse II-assoziierten invarianten Kette, welche nur Cat L, nicht aber Cat S inhibiert (Bevec et al., 1996). Dieses p41 Fragment fungiert auch als Chaperon für Cat L (Ebert et al., 2003; Lennon-Dumenil et al., 2001) und als Stabilisator für sezerniertes extrazelluläres Cat L z. B. bei Entzündungen und Tumoren (Fiebiger et al., 2002). Tumorzellen sezernieren die Proteinase außer in stabilisierender Assoziation mit p41 auch – in Analogie zu Cat B – als Procathepsin L (Heidtmann et al., 1993) sowie in Form einer höhermolekularen Spleiß-Variante mit im Vergleich zur lysosomalen Form größerer pH- und Thermostabilität (Yamaguchi et al., 1990). Im Extrazellulärraum dient Cat L – wie Cat B – zum Abbau extrazellulärer Matrix in Tumoren und bei chronischen Entzündungsprozessen: u. a. werden Kollagen, Elastin, Laminin und Fibronectin von Cat L degradiert (Bakhshi et al., 2001; Chauhan et al., 1991; Chauhan et al., 1993; Liuzzo et al., 1999).

### **1.2.4.3 Cathepsin S (EC 3.4.22.27)**

Die einkettige Endopeptidase Cathepsin S (Cat S) (Brömme et al., 1993) unterscheidet sich von den zweikettigen Cats B und L (Wiederanders et al., 1991) durch eine deutlich eingeschränkte Gewebeverteilung (Shi et al., 1994) sowie eine außergewöhnliche Stabilität und Aktivität des reifen Enzyms bei neutralen und leicht alkalischen pH-Werten: Cat S weist nach einstündiger Inkubation bei pH 7,5 (37 °C) noch 93 % seiner optimalen Aktivität bei pH 6,5 (Kirschke et al., 1989; Kirschke et al., 1995) auf, wogegen die Cats B und L keine Aktivität mehr zeigen (Brömme et al., 1993). Diese ungewöhnlich breite pH-Stabilität dürfte die in den meisten Geweben vergleichsweise geringe Expression teilweise aufwiegen (Petanceska und Devi, 1992). Zum Substrat-Spektrum des Cat S gehören auch die Proteine der extrazellulären Matrix Laminin, Fibronectin, Kollagen, Elastin und Chondroitinsulfat (Liuzzo et al., 1999), obwohl der Wirkungsschwerpunkt von Cat S in Tumoren nicht auf dem Abbau extrazellulärer Matrix liegen soll (s. 1.3.2). Das auf bestimmte Gewebe begrenzte Vorkommen von Cat S zeigt Speziesunterschiede zwischen dem Menschen und manchen anderen Säugetieren, z. B. was das Ausmaß seiner Expression in Niere (s. 1.3.1) und Gehirn angeht (Shi et al., 1994). Allen Spezies gemeinsam ist eine hohe Expression in der Milz und in (professionellen) APCs (= MHC Klasse II-positiven Zellen) (Riese et al., 1996; Saegusa et al., 2002; Villadangos und Ploegh, 2000), wobei Cat S auf Organellenebene v. a. in den späten Endosomen des endosomal-lysosomalen Abbauwegs zu finden ist (Claus et al., 1998). Das spezifische Expressionsmuster von Cat S verweist auf spezifische Funktionen, von denen seine entscheidende Rolle in der (MHC Klasse II) Antigen-Präsentation hier besondere Erwähnung finden soll. In Epithelzellen des Menschen ist Cat S die einzige Cysteinproteinase, die die invariante Kette (kurz Ii) degradieren kann, und dadurch MHC Klasse II-Moleküle zur Bindung antigener Peptide und damit zur Antigenpräsentation befähigt (Bania et al., 2003). In Thymus-Epithelzellen der Maus wird diese Aufgabe hingegen von Cat L wahrgenommen (Villadangos et al., 1999).

## **1.3 Cathepsine in A-498-Zellen**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Bestimmung der Aktivitäten der Cathepsine B, L und S in A-498-Zellen nach Na-MCA-Exposition. A-498-Zellen sind permanente menschliche Nierenkarzinom-Zellen. Aufgrund ihrer Cathepsin-Aktivitäten (Cat-Aktivitäten) sind sie als proximale Tubuluszellen anzusehen (Schmid et al., 1997; Schmid et al., 2004).

### **1.3.1 Cathepsine B, L und S in proximalen Tubuluszellen der Niere**

In proximalen Tubuli werden glomerulär filtrierte Proteine und Oligopeptide fast vollständig rückresorbiert, d. h. in Aminosäuren zerlegt, die basolateral wieder der Zirkulation zugeführt werden. Entsprechend enthalten die proximalen Tubuluszellen besonders viele Lysosomen (Christensen et al., 1998; Haga, 1989; Schaefer et al., 1994), deren saure Hydrolasen diesen Abbau leisten.

Cat L als aktivste lysosomale Cysteinproteinase hat in der Niere seine höchste Konzentration und auch Cat B ist hier in besonders hoher Konzentration vertreten (Baricos et al., 1987; Brando et al., 1986; Qian et al., 1991). Auch Cat S wird in der Niere exprimiert, und zwar wie die Cats B und L am stärksten in den proximalen Tubuli (Kirschke et al., 1997; Schmid et al., 1997), allerdings bei Mensch (und Ratte) auf niedrigem Niveau im Unterschied zum Rind beispielsweise (Kirschke et al., 1989). Eine Steigerung der Cat S-Aktivität lässt sich durch Interferon- $\gamma$  erreichen (Riese et al., 1996; Schwarz et al., 2002; Storm van's Gravesande et al., 2002), ein pro-inflammatorisches Immunmodulans, welches in fakultativ Antigen-präsentierenden Zellen wie den proximalen Tubuluszellen (Hagerty und Allen, 1992; Rubin-Kelley und Jevnikar, 1991; Wuthrich et al, 1990) die Expression von MHC Klasse II-Molekülen induziert (Haas et al., 1995; Rubin-Kelley und Jevnikar, 1991). MHC Klasse II-Moleküle präsentieren den CD4(+) T-Lymphozyten antigene Peptide.

Vom menschlichen Nierenzellkarzinom (s. 1.3.2) ist bekannt, dass es sich dieser immunologischen Kontrolle entzieht durch Herunterregulierung oder Verlust von MHC-Molekülen (Bukur et al., 2003).

### **1.3.2 Cathepsine B, L und S in Tumoren – Sonderfall Nierenzellkarzinom**

Wie erwähnt, werden einige Cats unter pathologischen Bedingungen, wie etwa in Tumoren vermehrt in den Extrazellulärraum sezerniert, wo sie am Abbau extrazellulärer Matrixproteine beteiligt sind. Für die Tumorausbreitung spielen neben dieser direkt Gewebe-zerstörenden Wirkung der Cats B und L auch deren aktivierende Wirkung auf andere Matrix-degradierende Proteasen sowie die Förderung der Tumorangio-genese durch Cat B (Cat B aktiviert TGF- $\beta$ ) eine Rolle (Kos et al., 1995; Turk et al., 2000; Turk et al., 2002; Würfl et al., 1997).

Eine Imbalance zwischen Cats und ihren CPIs zugunsten der Cats wird oft als entscheidend für Invasion und Metastasierung von Tumoren angesehen (Calkins und Sloane, 1995; Kos und Lah, 1998). Diese Imbalance erklärt sich durch die in vielen Tumoren (im Vergleich zu normalem Gewebe) erhöhte Menge der Cats B und L und zwar auf mRNA-, Protein- und Aktivitätsebene (Lah und Kos, 1998), sowie zum anderen durch erhöhte Widerstandsfähigkeit der Tumor-Cats, zumindest aber des Tumor-Cat B, gegen Inaktivierung durch CPIs (Turk et al., 2002). Was die CPI-Aktivitäten in Neoplasien im Vergleich mit normalen Geweben angeht, so finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben (Calkins und Sloane, 1995).

In einigen Tumoren besteht eine positive Korrelation zwischen Überexpression der Cats B und L und schlechterer Prognose (Lah und Kos, 1998): Beim Brustkrebs z. B. geht Überexpression der Cats B und L einher mit aggressivem Tumorverhalten, frühem Rückfall und kürzerer Überlebenszeit (Kos et al., 1995; Thomssen et al., 1995). Umgekehrt sind höhere Cat S-Aktivitäten mit besseren Überlebenschancen verbunden. Zudem ist Cat S beispielsweise in Lungen- und Prostata-Tumoren – im Unterschied zu den Cats B und L – nur leicht erhöht gegenüber gesundem Kontrollgewebe (Turk et al., 2002). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass Cat S kaum eine Rolle spielt beim Abbau extrazellulärer Matrix im Rahmen der Tumorausbreitung, sondern vielmehr immunologische Tumorabwehr-Funktionen erfüllt, die zu einem besseren Outcome führen (Kos et al., 2001).

*Das Nierenzellkarzinom* nimmt unter den übrigen Tumoren insofern eine Sonderstellung ein, als Protein- und Aktivitäts-Spiegel der Cats B, L und S signifikant niedriger sind als in normalem Nierengewebe (Jung et al., 1998; Kirschke et al., 1997; Werle et al., 1994). Dabei war die Cat S-Aktivität bei Kirschke et al. (1997) in den meisten Proben nicht mehr messbar. Die Cat L-mRNA-Konzentration jedoch war im Nierenzellkarzinom wie in anderen Tumoren erhöht (Chauhan et al., 1991). Dies erscheint unvereinbar mit den verminderten Enzymprotein- und Aktivitäts-Werten. Diesen scheinbaren Widerspruch lösten Abudula et al. (2001) durch Entdeckung von Cat L-mRNA-Spleiß-Varianten mit unterschiedlicher Expressionseffektivität und Verteilung in tumorösem und gesundem Gewebe.

Eine weitere Besonderheit des Nierenzellkarzinoms ist das Fehlen der – für Malignome sonst typischen (s. o.) – Cats-CPIs-Imbalance, indem die CPI-Aktivitäten im selben Ausmaß vermindert sind wie die Cat-Aktivitäten. Dies könnte bedeuten, dass die Cats B, L und S nicht an Invasion und Metastasierung des Nierenzellkarzinoms beteiligt sind im Unterschied zu anderen Tumoren (Jung et al., 1998). Auch bleibt zu untersuchen, ob etwa bestimmte Eigenschaften von renalen Tumoren wie z. B. ihr langsames Wachstum auf fehlende Überexpression der Cats zurückzuführen sind (Kirschke et al., 1997).

## **1.4 Natriummonochloracetat (Na-MCA)**

Natriummonochloracetat (Na-MCA,  $\text{ClCH}_2\text{-COONa}$ , CAS-Nr. 3926-62-3), das Na-Salz der Monochloressigsäure (MCA,  $\text{ClCH}_2\text{-COOH}$ , CAS-Nr. 79-11-8), wird industriell hergestellt durch Umsetzen von Monochloressigsäure mit Soda – in Chargen oder kontinuierlich (König et al., 1978; Risk Assessment, 2003).

Da es sich bei MCA um eine starke Säure handelt ( $\text{pK}_a$  2,86 bei 25 °C) liegen MCA und ihr Na-Salz, Na-MCA, unter normalen Umweltbedingungen (von pH 6–7) als Monochloracetat-Anion vor und können demzufolge wie eine Substanz behandelt werden (Risk Assessment, 2003). Dies gilt (näherungsweise) auch für die Na-MCA-Lösungen der vorliegenden Arbeit, welche einem Kulturmedium mit pH 7,2–7,4 zugesetzt waren.

**Tab. 2: Eigenschaften von MCA [Na-MCA]**

Wo nicht anders angegeben, gelten sie für beide chemischen Verbindungen.

n. v. = Daten nicht verfügbar

chemische und physikalische Daten	Summenformel	$C_2H_3ClO_2$ [ $C_2H_2ClNaO_2$ ]
	MG (g/mol)	94,5 [116,48]
	Siedepunkt	189 °C [n. v.]
	Schmelzpunkt	ca. 62 °C [120 °C]
	relative Dichte (fest)	1,58 g/cm <sup>3</sup> [1,71 g/cm <sup>3</sup> ]
	Löslichkeit	sehr hoch in H <sub>2</sub> O, hoch in organischen Lösungsmitteln
	Dampfdruck	mäßig hoch: 0,2 hPa (kristalline Substanz) bis 10 hPa (wässrige Lösung) [n. v.]
	physikal. Zustand	fest (kristallin), korrosiv [n. v.]
	Farbe	farblos [n. v.]
	Geruch	stechend [n. v.]
	pK <sub>a</sub> pH in H <sub>2</sub> O	2,85 (d. h. starke Säure) [Na-MCA = Salz!] 3,2 (100 mg/l) [5–9 (50 g/l)]
Wirkung auf die Umwelt	93/21/EWG 1993	gefährlich für die Umwelt [n. v.]
	VwV wassergefährdender Stoffe 1990	sehr giftig für Wasserorganismen (Wassergefährdungsklasse 2) [n. v.]
Wirkungen auf lebende Organismen	Gefahrstoffverordnung 1991	giftig beim Einatmen (Lungenödem), Verschlucken (Resorptionsgefahr) und Berührung mit Haut; verursacht schwere [nicht Na-MCA!] Verätzungen
	Kanzerogenität	keine (Ratten, Mäuse) [n. v.]
	Genotoxizität	keine, weder in vitro noch in vivo (Mäuse, Drosophila melanogaster) [n. v.]
	Reproduktionstoxizität	teilweise vorhanden (Ratten, Mäuse) [n. v.]
Arbeitsplatz- grenzwerte	TLV (1993/94)	nicht festgelegt [n. v.]
	MAK (1997)	nicht festgelegt [n. v.]

Die giftige MCA ist in der Umwelt ubiquitär verbreitet (Risk Assessment, 2003) in Atmosphäre/Luft, Boden und – aufgrund ihres geringen Dampfdrucks und hoher Wasserlöslichkeit – vor allem im Wasser (BUA-Stoffbericht 127, 1994; Risk Assessment, 2003). Erfreulicherweise ist mit keiner nennenswerten Bio- bzw. Geoakkumulation zu rechnen, MCA ist biologisch leicht abbaubar und zeigt geringe Bodensorption (Blume, 1990; BUA-Stoffbericht 127, 1994). Die Herkunft der MCA in der Umwelt ist im Detail noch umstritten. Einigkeit besteht aber darüber, dass der Anteil der bei industrieller Produktion, Transport und Weiterverarbeitung freigesetzten MCA am Gesamteintrag in die Umwelt marginal ist im Vergleich zu den sog. non-intentionalen Quellen (Risk Assessment, 2003). Dazu tragen vor allem die Produktion im geschlossenen System sowie schärfste Sicherheitsvorkehrungen bei. Unter non-intentionale Herkunft werden subsummiert die atmosphärische Entstehung von MCA via anthropogene Vorläufer wie chlorierte Kohlenwasserstoffe oder Salz-Aerosole in photochemischen Reaktionen (SIDS, 1994), der Anfall von MCA beim industriellen Bleichen von Papier (Lindström und Österberg, 1986) oder bei der Trinkwasserdesinfektion (Giller et al., 1997; Plewa et al., 2002) sowie das von manchen Autoren abgelehnte (z. B. ECETOC, 1999; Reimann et al., 1996) natürliche Vorkommen von MCA. Für nicht-anthropogene Vorkommen von MCA, z. B. seine Entstehung aus natürlich vorkommendem Äthylen bzw. aus Humus des Bodens, sprechen sein globales Vorhandensein in vergleichbaren Konzentrationen sowohl in entlegenen als auch in hochindustrialisierten Gegenden der nördlichen wie der südlichen Hemisphäre und vor allem sein Nachweis in vor-industriellen Gletscheris-Proben (Fahimi et al., 2003; Frank, 2001: unveröffentlichte Befunde nach Risk Assessment, 2003).

Die industrielle Produktionskapazität für MCA lag 1987 weltweit bei geschätzten 362 500 t (AEGs, 2001) und in der EU im Jahr 1999 bei 145 000 t MCA und 26 000 t Na-MCA (Risk Assessment, 2003). Der weltweit größte MCA/Na-MCA Produzent ist Akzo Nobel Chemicals, Niederlande mit über 66 000 Beschäftigten in 8 Ländern (laut Homepage). Akzo Nobel zählt mit Atofina, Frankreich und Clariant, Deutschland zu den drei MCA/Na-MCA herstellenden Unternehmen in der EU (Risk Assessment, 2003).



Industriell hergestellte MCA/Na-MCA finden hauptsächlich als Synthesewischenprodukte Verwendung für die Herstellung von (BUA-Stoffbericht 127, 1994; ECETOC, 1999; Risk Assessment, 2003)

- Carboxymethylcellulose und -stärke (mit 43 % quantitativ bedeutsamstes Endprodukt),
  - Pflanzenschutzmitteln/Herbiziden (z. B. in UK und USA, nicht aber in Deutschland zugelassen),
  - amphoteren Tensiden in Reinigungsmitteln (z. B. für Shampoos, Handwaschmittel und industrielle Reinigungsmittel, z. B. in USA, Schweden),
  - pharmazeutischen Produkten (z. B. Koffein, Vitamin B6),
  - Plastik,
  - Beschichtungen von Dosen für flüssige Nahrungsmittel,
  - antimikrobiellem Lebensmittel-/Wein-Zusatzstoff (z. B. in USA, nicht aber in Deutschland erlaubt),
  - Farben (Indigo), Lacken und Druckerschwärze und
  - säurehaltigem Farb- und Graffiti-Entferner
- sowie als
- Lösungsmittel im Zeugdruck,
  - Lösungs- und Gelatinierungsmittel für Polyacrylnitril-Verbindungen und
  - Ätzmittel zur Entfernung von Warzen (z. B. als Acetocaustin in Deutschland erhältlich).

MCA wird vermarktet als Feststoff (Puder oder Flocken), in flüssiger Konsistenz als konzentrierte Lösung oder Schmelze, als Na-Salz (= Na-MCA) oder als Methylester (Kirk-Othmer, 1982).

Vergiftungsfälle beim Menschen mit ausgeprägter Klinik bis hin zu letalem Ausgang sind nur aus Arbeitsunfällen bekannt – außer im Fall eines 5jährigen Mädchens, das 8 Stunden nach versehentlicher Einnahme eines Teelöffels eines 80 % MCA enthaltenden Warzenmittels verstarb (Feldhaus et al., 1993; Rogers, 1995).

MCA und Na-MCA sind giftig bei Kontakt mit Haut/Schleimhaut, beim Einatmen – allerdings keine Todesfälle nach Inhalation laut AEGs (2001) – und bei oraler Aufnahme (Risk Assessment, 2003). Auf Haut und Schleimhaut (Augen,

Atemtrakt) führt MCA im Unterschied zu Na-MCA zu Verätzungen 1.–3. Grades (BUA-Stoffbericht 127, 1994; Dartsch et al., 2000). MCA wird dermal sowie nach Verschlucken rasch resorbiert, schnell verteilt (Risk Assessment, 2003) und akkumuliert zunächst in hydrophilen Geweben und erst zu einem späteren Zeitpunkt in lipophilen Geweben (Bhat et al., 1990). Während der ersten 24 Stunden nach Applikation finden sich die höchsten MCA-Konzentrationen in Nieren, vor allem Nierencortex, und Leber (Risk Assessment, 2003). Hier führen MCA/Na-MCA zu Veränderungen klinisch-chemischer Parameter, Zunahme der Leber- und Nierengewichte (BUA-Stoffbericht 127, 1994), chronischer Nephropathie (Daniel et al., 1991) und Segmentnekrosen der Nierentubuli (Kulling et al., 1992) als histologische Diagnosen bis hin zum Nierenversagen (Kusch et al., 1990). MCA bzw. seine Hauptmetaboliten S-Carboxymethyl-L-Cystein und Thio-diessigsäure werden vom Körper schnell wieder ausgeschieden, vorzugsweise über den Urin (Risk Assessment, 2003).

Die Wirkungen von MCA auf den Organismus sind dosisabhängig. So wurde etwa bei Ratten in der niedrigen Dosisgruppe (5,8 mg/m<sup>3</sup> MCA-Inhalation/Tag über 4 Monate) eine gesteigerte Leistungsfähigkeit des ZNS beobachtet (Maksimov und Dubinina, 1974), und in Chang Liver-Zellen scheint die 24-stündige Inkubation mit 50 µg/ml Na-MCA den Zellmetabolismus zu stimulieren (Dartsch et al., 2000). Höhere Dosen MCA führen jedoch zu Atemnot, Übelkeit/Erbrechen, Erregung/Krämpfen, Schock/Koma und schwerer metabolischer Azidose. Die durch MCA hervorgerufene intra- und extrazelluläre metabolische Azidose erklärt sich aus der durch MCA hervorgerufenen (direkten und/oder indirekten) Inhibierung der aeroben Glykolyse (Pyruvat-Dehydrogenase) und des Zitratzyklus ( $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase) und in der Folge Umstellung auf anaerobe Glykolyse. Hierdurch kommt es zur Akkumulation und gesteigerten Sekretion (in den EZR bzw. ins Kulturmedium) von Pyruvat und Citrat sowie insbesondere Laktat (AEGs, 2001; Dartsch et al., 2000; Millischer et al., 1987; Mitroka, 1989). Der aus dieser metabolischen Blockade resultierende zelluläre ATP-Mangel schädigt vor allem Organe mit hohem Energiebedarf. Auch die beiden anderen Halogenessigsäuren Monoiodacetat und Monofluoracetat senken den ATP-Gehalt der Zelle (Kempson et al., 1991; Simonnet et

al., 1980). Die zerebrale Laktatazidose in Kombination mit der systemischen wird als Hauptursache für MCA-Letalität angesehen (ECETOC, 2001; BUA-Stoffbericht 127, 1994). Bezüglich letaler Effekte besteht eine geringe Intra- und Interspeziesvariabilität – ersichtlich aus der geringen Variabilität in den LD<sub>50</sub>-Werten – was insofern bedeutsam ist, als ausreichendes Datenmaterial nur für Ratten und Mäuse vorliegt (AEGLs, 2001): LD<sub>50</sub> Ratte: 55–277,5 mg/kg, LD<sub>50</sub> Maus: 260–300 mg/kg (Risk Assessment, 2003); zum Vergleich: oral tödliche Dosis für den Menschen laut Gosselin et al. (1976) etwa 50 mg/kg.

Wie bereits erwähnt sind Nieren und Leber die Zielorgane einer MCA/Na-MCA-Intoxikation. In diesen beiden Organen reduziert MCA (wie andere Halogenessigsäuren außer Monofluoracetat) die Sulfhydryl-Konzentration durch Alkylierung von Sulfhydrylgruppen (unter neutralen und alkalischen Bedingungen). Diese Reaktion ist aber vor allem in vivo beobachtbar, womöglich weil MCA bioaktiviert werden muss, um Metaboliten produzieren zu können, die SH-Gruppen alkylieren (Chaiken and Smith, 1969; Hayes et al., 1973). Auch die Cats B, L und S erfahren als Cysteinproteasen (hochreaktiver Cysteinrest im aktiven Zentrum) eine Alkylierung und damit Inhibierung durch MCA, allerdings vermutlich auch bevorzugt in vivo (AEGLs, 2001; BUA-Stoffbericht 127, 1994; Hayes et al., 1973; Risk Assessment, 2003; Sluyterman, 1968; Yllner, 1971).

## **1.5 Thematik der vorliegenden Arbeit**

Monochloressigsäure (MCA) und ihr Natriumsalz, Natriummonochloracetat (Na-MCA) sind akut toxisch wirkende ubiquitäre Umwelt-Kontaminanten. Als Synthesewerkszeugnisse aus weltweiter industrieller Produktion finden sie sehr breite Verwendung.

Cathepsine, endosomal-lysosomale Cysteinproteasen, sind für über 70 % des lysosomalen Proteinabbaus verantwortlich (Ahlberg et al., 1985), welcher über 70 % der gesamten intrazellulären Proteolyse ausmacht (Otto und Schirmeister, 1997). Zu den am besten untersuchten Cathepsinen gehören die Cathepsine B, L und S.

Die vorliegende Arbeit untersucht, inwieweit sich eine 24-stündige Exposition mit Na-MCA in akut toxischen Dosen (vergleiche LD<sub>50</sub> Ratte/Maus: ca. 50–300 µg/ml Na-MCA (s. 1.4) und Blutspiegel nach tödlicher Vergiftung beim Menschen: über 100 µg/ml Na-MCA (Rogers, 1995)) auswirkt auf die Aktivitäten der Cathepsine B, L und S in A-498-Zellen sowie auf Vitalität und Proteingehalt der A-498-Zellen.

A-498-Zellen sind permanente menschliche Nierenkarzinomzellen, vermutlich von proximalen Tubuli abstammend, und wurden aus folgenden Gründen für die Untersuchungen ausgewählt: Nierenzellen, insbesondere proximale Tubuluszellen, enthalten in ihren sehr zahlreichen Lysosomen (Bond und Butler, 1987) besonders hohe Konzentrationen der Cathepsine B, L und S (Baricos et al., 1987; Brando et al., 1986; Kirschke et al., 1997; Qian et al., 1991; Schmid et al., 1997). Daneben sind die Nieren zusammen mit der Leber die Zielorgane und Orte der größten Anreicherung von (Na-)MCA in den ersten 24 Stunden nach Applikation von (Na-)MCA (Risk Assessment, 2003), wobei Nierenzellen noch empfindlicher auf (Na-)MCA reagieren als Leberzellen (Dartsch et al. 2000; Schiek, 2001). Für die Verwendung karzinomatöser Nierenzellen spricht – trotz der niedrigeren Cathepsin-Aktivitäten im Vergleich zu gesunden Nierenzellen – dass Tumor-Zelllinien spezielle Funktionen meist besser erhalten als etablierte Zelllinien, die von normalem Gewebe abstammen. Dies bedingt eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Primärkulturen und damit auf in vivo-Verhältnisse.

Die Cathepsin-Aktivitäten wurden zunächst in Gesamtzell-Lysaten bestimmt mit Schwerpunkt auf optisch konfluenten Zellen. In Gesamtzell-Lysaten sind die lysosomalen Cathepsin-Aktivitäten aber durch die Hemmwirkungen cytosolischer Cysteinproteasen-Inhibitoren (v. a. Stefine) „verfälscht“, die zudem wie die Cathepsine dem Einfluss des Na-MCA ausgesetzt sind. Eine deshalb vorgenommene subzelluläre Fraktionierung mit Gewinnung einer Cytosol-freien Organellen-Fraktion (aus Lysosomen, Endosomen, Mitochondrien und Mikrosomen) ermöglicht die Bestimmung der ungehemmten lysosomalen Cathepsin-Aktivitäten und damit eine Erfassung des Ausmaßes der Cystatinwirkungen auf die einzelnen Cathepsine sowie Aussagen über eventuelle Beeinflussungen

der Aktivitäten der Cathepsine wie der Cysteinproteasen-Inhibitoren durch Na-MCA.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Geräte

#### 2.1.1 Geräte für Zellkultur, Zytotoxizitätstests und Herstellung von Gesamtzell-Lysaten

Begasungsbrutschrank, 156 l	WTB Binder Labortechnik, Tuttlingen
75 cm <sup>2</sup> -Kulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
225 cm <sup>2</sup> -Kulturflaschen	Integra Biosciences, Fernwald
6-Loch-Platten	Greiner, Frickenhausen
2 ml- und 5 ml-Messpipetten	Fisher Scientific, Ulm
Phasenkontrastmikroskop Nikon TMS	Nikon, Düsseldorf
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen
Zählkammer nach Neubauer, improved	Fisher Scientific, Ulm
Zentrifuge CR 422	Jouan, Unterhaching

#### 2.1.2 Geräte für die subzelluläre Fraktionierung

Beckman TL 100 Ultrazentrifuge	
+ Rotor TL 100.3	Beckman, Palo Alto, USA
Heraeus-Christ Minifuge T	Heraeus, Osterode
Potter-Elvehjem-Homogenisator, 5 ml	Schott, Mainz

#### 2.1.3 Geräte für die Proteinbestimmung

Mikrotiterplatten 96 well-Flachboden	Greiner, Frickenhausen
µl-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Spektralphotometer und -fluorometer	Tecan, Crailsheim

### 2.1.4 Geräte für die Bestimmung der Cathepsinaktivitäten

Feinwaage Mettler AE 160 A	Mettler, Zürich, Schweiz
Mikroprozessor pH-Meter	WTW, Weilheim i.OB
Pipetten 1–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Quarzküvetten	Bender und Hobein, Ulm
Schreiber	Kipp und Zonen, Delft, Niederlande
Spektralfluorometer Mark I	Farrand, New York, USA

## 2.2 Chemikalien

### 2.2.1 Chemikalien für Zellkultur, Zytotoxizitätstests und Herstellung von Gesamtzell-Lysaten

Eagle's MEM (1X), flüssig	Gibco BRL, Karlsruhe
FCS (hitzeinaktiviert)	Gibco BRL, Karlsruhe
L-Glutamin 200 mM (100 X), flüssig	Gibco BRL, Karlsruhe
MEM Nichtessentielle Aminosäure Lösung (100 X), flüssig	Gibco BRL, Karlsruhe
Na-MCA (CAS-Nr. 3926-62-3)	Hoechst, Frankfurt
PBS Tablets	Gibco BRL, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10 000 U/ml Penicillin, 10 000 µg/ml Streptomycin)	Gibco BRL, Karlsruhe
RPMI 1640	Gibco BRL, Karlsruhe
Trypsin-EDTA-Lösung (Trypsin 0,05 %, EDTA 0,02 %)	Gibco BRL, Karlsruhe

### 2.2.2 Chemikalien für die subzelluläre Fraktionierung

Saccharose	ICN, Eschwege
Tris/Essigsäure	USB, Cleveland, USA

### 2.2.3 Chemikalien für die Proteinbestimmung

BSA	Serva, Heidelberg
Roti <sup>®</sup> -Nanoquant-Lösung	Roth, Karlsruhe

### 2.2.4 Chemikalien für die Bestimmung der Cathepsin-aktivitäten

AMC	Bachem, Heidelberg
Aprotinin	Boehringer Mannheim, Mannheim
BSA, kristallisiert, reinst	Serva, Heidelberg
CA-074	Bachem, Heidelberg
Citronensäure × H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
DMSO	Merck, Darmstadt
DTT	Boehringer Mannheim, Mannheim
E-64	Bachem, Heidelberg
EDTA	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Tri-Natriumcitrat × 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Z-Phe-Arg-AMC	Bachem, Heidelberg
Z-Phe-Phe-CHN <sub>2</sub>	Bachem, Heidelberg

## 2.3 Lösungen

Alle wäßrigen Lösungen wurden mit durch reverse Osmose gereinigtem Wasser (Millipore, Eschborn) hergestellt, im Folgenden kurz H<sub>2</sub>O genannt.

### 2.3.1 Stammlösungen

Die Stammlösungen wurden in größeren Mengen hergestellt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert, bis sie in den Versuchen zum Einsatz kamen.



AMC (MG = 175,2) 17,5 mg/10 ml DMSO (10 mM)  
 Aprotinin (MG = 6500) 1 mg/ml H<sub>2</sub>O (0,154 mM)  
 BSA, kristallisiert, reinst 20 mg/200 µl H<sub>2</sub>O (10 %)  
 CA-074 (MG = 383,5) 1 mg/260 µl DMSO (10 mM)  
 Citronensäure × H<sub>2</sub>O (MG = 210,14) 2,1014 g/100 ml H<sub>2</sub>O (0,1 M)  
 DTT (MG = 154,3) 0,618 mg eingewogen pro ml Reaktionspuffer (4 mM)  
 E-64 (MG = 357,4) 3,57 mg/ml DMSO (10 mM)  
 EDTA (MG = 372,24) 93,1 mg/ml H<sub>2</sub>O (0,25 M)  
 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O (MG = 137,99) 2,7598 g/100 ml H<sub>2</sub>O (0,2 M)  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O (MG = 177,99) 3,5598 g/100 ml H<sub>2</sub>O (0,2 M)  
 Tri-Natriumcitrat × 2 H<sub>2</sub>O (MG = 294,1) 2,941 g/100 ml H<sub>2</sub>O (0,1 M)  
 Z-Phe-Arg-AMC (MG = 676,17) 4,225 mg/ml DMSO (6,25 mM)  
 Z-Phe-Phe-CHN<sub>2</sub> (MG = 470,53) 1,18 mg/5 ml DMSO (0,5 mM)

### 2.3.2 Puffer

Herstellung von 0,1 M Citratpuffer pH 5,0:

100 ml 0,1 M Tri-Natriumcitrat × 2 H<sub>2</sub>O (2,941 g/100 ml H<sub>2</sub>O) wurden mit 0,1 M Citronensäure × H<sub>2</sub>O (2,1014 g/100 ml H<sub>2</sub>O) auf pH 5,0 titriert.

Herstellung von 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,5:

100 ml 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O (3,5598 g/100 ml H<sub>2</sub>O) wurden mit 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O (2,7598 g/100 ml H<sub>2</sub>O) auf pH 7,5 titriert.

## 2.4 Untersuchungsmaterial

Untersucht wurde eine epithelähnliche kontinuierliche Zelllinie, die etabliert worden war aus dem Nierenkarzinom eines 52-jährigen Mannes. Sie trägt die Bezeichnung A-498 bzw. DSM ACC 55 bzw. ATCC HTB 44 (DSMZ, Braunschweig) und wächst adhärent im Monolayer. Der Versuchszeitraum erstreckte sich etwa über die internen Passagen 75 bis 90.

## **2.5 Zellkultur**

### **2.5.1 Kulturmedium**

Die A-498-Zellen wurden kultiviert in Eagle's MEM mit Earle's Salzen und 0,85 g/l Natriumbicarbonat. Dieses Minimalmedium war supplementiert mit 2 mM L-Glutamin als Energie- und Kohlenstoffquelle, 1 % nichtessentiellen Aminosäuren, 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung zur Vermeidung bakterieller Infektionen sowie 10 % hitzeinaktiviertem FCS als kaum definierte, chargenabhängige Mischung verschiedener wachstumsfördernder Substanzen. Essentielle Aminosäuren und Vitamine der B-Gruppe sind in Eagle's MEM enthalten.

### **2.5.2 Inkubationsbedingungen**

Die Inkubation der Zellkulturen erfolgte im mit 6 % CO<sub>2</sub> begasten Brutschrank bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre, die es erlaubte, das Kulturmedium der CO<sub>2</sub>-Atmosphäre auszusetzen, ohne dass eine hohe Verdunstung des Mediums zu befürchten war.

Durch das CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Puffersystem (CO<sub>2</sub>-Partialdruck von 45,6 mm Hg und NaHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Gehalt des Kulturmediums von 0,85 g/l) wurde der pH-Wert des Mediums auf 7,2–7,4 eingestellt.

### **2.5.3 Subkultivierung**

Zur Aussaat und routinemäßigen Subkultivierung müssen die Zellen unter sterilen Bedingungen in Suspension gebracht werden. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die adhärennten Zellen mit PBS pH 7,5 vorgewaschen zur Entfernung von Trypsin-Inhibitoren sowie Calcium- und Magnesiumionen. Danach wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung pH 7,2 inkubiert, bis sie sich abrundeten und ablösten (mikroskopische Kontrolle).

Dabei spaltet Trypsin als neutrale Protease die Adhäsionsproteine, mit deren Hilfe sich die Zellen am Substrat anheften, während EDTA alle zweiwertigen Kationen bindet, so auch Calcium- und Magnesiumionen, welche die Adhäsionsproteine stabilisieren.

Die nach Ablösung der Zellen durch Pipettieren hergestellte Einzelzellsuspension konnte unter dem Phasenkontrast-Mikroskop mit einer Zählkammer nach Neubauer ausgezählt werden.

Anschließend wurde die Zellsuspension mit Kulturmedium auf die gewünschte Aussaatdichte verdünnt und in neue Kulturgefäße ausgesät.

#### **2.5.4 Vorversuche zu den Zellkulturbedingungen**

Die Kultivierung der A-498-Zellen im Rahmen der Vorversuche erfolgte sowohl in supplementiertem Eagle's MEM (s. 2.5.1) als auch in dem komplexeren Basalmedium RPMI 1640, welches versetzt war mit hitzeinaktiviertem FCS (unterschiedliche Prozentsätze s. u.) und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung. Die Inkubationszeit in MEM und RPMI wurde zwischen 24 Stunden und 4 Tagen variiert, so dass sowohl proliferierende Zellen (Inkubation: 24 Stunden bzw. 2 Tage) als auch ruhende, d. h. konfluente Zellen (Inkubation: 3 bzw. 4 Tage) geerntet werden konnten. Es wurde kein Mediumwechsel vorgenommen.

Proliferierende Zellen haben die erste Phase nach Aussaat, die Anpassungsphase (lag-Phase), in der die Zellen sich am Substrat anheften, sich ausbreiten und zu metabolisieren beginnen, durchlaufen und befinden sich in der Phase des exponentiellen Wachstums. Konfluente Zellen halten das verfügbare Substrat besetzt und stehen in engem Kontakt miteinander. Nach wenigen weiteren Populationsverdopplungen erreichen sie die stationäre (Plateau-)Phase, in der sich Zellteilung und Zellverlust im Gleichgewicht befinden, d. h. die Netto-Wachstumsrate unverändert ist aufgrund der Kontaktinhibierung des Wachstums.

Bei den nach 24 Stunden geernteten A-498-Zellen war FCS in unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 0 % und 10 % (0 - 1 - 2,5 - 5 - 10 %) zugesetzt worden. Die jeweiligen Kulturmedien aller länger inkubierten Zellen waren mit 10 % FCS supplementiert gewesen.

## 2.6 Zytotoxizitätstests

Die Zytotoxizität von Na-MCA wurde anhand der Zell-Vitalität an konfluenten und proliferierenden A-498-Zellen untersucht: an konfluenten A-498 fünfmal als Doppelbestimmung in 6-Loch-Platten und einmal als Einfachbestimmung in 225 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen, an proliferierenden A-498 zweimal als Doppelbestimmung in 6-Loch-Platten.

### 2.6.1 Konfluente A-498-Zellen

Zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung von Na-MCA auf optisch konfluente A-498-Zellen wurden 50 000 Zellen/cm<sup>2</sup> (250 000 Zellen/ml) ausgesät in 6-Loch-Platten (Kulturfläche pro Vertiefung 9,6 cm<sup>2</sup>) bzw. in 225 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen.

Die ausgesäten A-498-Zellen waren nach dreitägiger Inkubation im Kulturmedium optisch konfluent, d. h. unter dem Phasenkontrastmikroskop war ein dichter Zellrasen erkennbar. Nun erfolgte ein Mediumwechsel und die Inkubation mit Na-MCA in Konzentrationen von 0 bis 400 µg/ml für 24 Stunden. Na-MCA lag als in PBS pH 7,5 gelöste und sterilfiltrierte Stammlösung von 5 mg/ml vor. Als Kontrolle dienten A-498-Proben ohne Na-MCA-Zusatz. Von Mediumwechsel und Na-MCA-Exposition ausgenommen waren sog. t<sub>0</sub>-Proben, die sofort ausgezählt und wie in 2.7 beschrieben für die Cathepsinbestimmung aufgearbeitet wurden.

Der zytotoxische Effekt von Na-MCA sollte anhand der Zell-Vitalität, d. h. der Anzahl überlebender Zellen beurteilt werden. Hierfür wurden zunächst die bereits abgelösten toten Zellen entfernt durch Absaugen des Überstands und Waschen mit PBS, dann wurden die adhärenen Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung pH 7,2 abgelöst und in PBS suspendiert (vgl. 2.5.3). Mit einem kleinen Teil der Suspensionen wurden Zählkammern nach Neubauer beschickt, der Rest wurde für die Bestimmung der Cathepsin-Aktivitäten aufgearbeitet (s. 2.7).

Unter dem Phasenkontrast-Mikroskop wurden dann die vitalen Zellen ausgezählt, die von den etwas dunkler erscheinenden abgestorbenen Zellen gut zu unterscheiden waren. Außerdem wurden die Wachstumsraten unter Exposition

mit Na-MCA verschiedener Konzentrationen berechnet gemäß unten aufgeführter Formeln (1) und (2).

$$\text{Populationsverdopplungen [PD]} = \frac{\log Z1 - \log Z0}{\log 2} \quad (1)$$

$$\text{Wachstumsrate [PD/Tag]} = \frac{\text{Populationsverdopplungen}}{\text{Tage der Inkubation mit Na - MCA}} \quad (2)$$

Hierbei steht Z1 für die Anzahl überlebender Zellen nach Inkubation mit Na-MCA, Z0 für die Anzahl vitaler Zellen in den t0-Proben, d. h. vor Na-MCA-Zugabe.

## 2.6.2 Proliferierende A-498-Zellen

Die Zytotoxizitätstests an proliferierenden A-498-Zellen wurden wie für konfluente A-498-Zellen beschrieben durchgeführt mit den folgenden Abweichungen: Es wurden lediglich 15 000 Zellen/cm<sup>2</sup> (75 000 Zellen/ml) in 6-Loch-Platten ausgesät und nur 24 Stunden lang im Brutschrank inkubiert, bevor nach Mediumwechsel mit Na-MCA-Konzentrationen von 0 bis lediglich 200 µg/ml 24 Stunden lang inkubiert wurde.

## 2.7 Aufarbeitung der Proben für die Bestimmung der Cathepsinaktivitäten

Die durch Trypsin abgelösten und als homogene Zellsuspension in PBS vorliegenden Proben der Zytotoxizitätstests mußten für die Aktivitätsbestimmungen der Cathepsine aufgeschlossen werden, da das Substrat Z-Phe-Arg-AMC nicht membrangängig ist.

### 2.7.1 Herstellung von Gesamtzell-Lysaten durch Zellaufschluss

Die durch Trypsin abgelösten, in PBS suspendierten Zellen (ca. 1–2,5 × 10<sup>6</sup> konfluente bzw. ca. 0,02–0,8 × 10<sup>6</sup> proliferierende Zellen pro Ansatz) wurden mit 170 × g 12 min lang bei 4 °C in einer CR 422 Zentrifuge zentrifugiert, in PBS re-

suspendiert und nochmals wie zuvor zentrifugiert zur Entfernung von Trypsin- und Mediumresten aus dem Zellsediment. Dieses wurde dann in 1 ml eiskaltem zweifach destilliertem Wasser resuspendiert, welches als hypotones Agens eine Osmolyse der Zellen bewirkte. Durch 15-minütiges Schockgefrieren in Flüssigstickstoff bei  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  und anschließendes Wiederauftauen der Proben im Kühlschrank wurde der Aufschlussgrad noch verbessert. Bis zur Bestimmung der Cathepsin-Aktivitäten wurden die Proben dann bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## **2.7.2 Subzelluläre Fraktionierung**

Da für die subzelluläre Fraktionierung eine größere Zellmenge nötig ist (ca.  $30\text{--}60 \times 10^6$  konfluente Zellen pro Ansatz), wurden die Zytotoxizitätstests an konfluenten A-498-Zellen in  $225\text{ cm}^2$ -Kulturflaschen durchgeführt.

Wie die Ansätze zur Herstellung der Gesamtzell-Lysate in 2.7.1 wurden auch die Ansätze der  $225\text{ cm}^2$ -Kulturflaschen zweimal mit PBS gewaschen, so dass nach der zweiten Zentrifugation ein weitgehend von Trypsin- und Mediumresten gereinigtes Zellpellet zur Verfügung stand. Dieses Zellpellet wurde dann mit Fraktionierungspuffer gewaschen, der aus 10 mM Tris/Essigsäure pH 7,0 und 250 mM Saccharose zur osmotischen Stabilisierung bestand. Das durch 7-minütige Zentrifugation bei 1 200 rpm ( $200 \times g$ ) und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in der Heraeus-Christ Minifuge T gewonnene Zellsediment wurde in Fraktionierungspuffer aufgenommen und dann im Potter-Elvehjem-Homogenisator unter Eiskühlung durch 10 Hübe bei 1000 rpm äußerst schonend homogenisiert, so daß nur die Plasmamembran zerstört wurde, die Organellen aber erhalten blieben.

Der größere Teil des auf diese Weise erhaltenen Gesamtzell-Homogenats wurde einer differentiellen Zentrifugation modifiziert nach Schröter et al. (1999) unterzogen. Unter Eiskühlung wurden die homogenisierten Zellen in einer Beckman TL 100 Ultrazentrifuge mit  $4\ 000 \times g$  2 min lang bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgezogen und das Pellet noch einmal in Fraktionierungspuffer aufgenommen, im Elvehjem-Potter homogenisiert und 2 min lang mit  $4\ 000 \times g$  zentrifugiert, um die Organellenausbeute des Überstands zu erhöhen. Das Pellet K, welches ganze Zellen, Zelltrümmer und Zellkerne enthält, wurde in  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und mit der Pipette suspendiert. Die

Überstände der ersten und zweiten Zentrifugation wurden in ein gemeinsames Zentrifugenröhrchen gegeben und 12 min lang bei  $400\,000 \times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das hierbei gewonnene Pellet entspricht der Organellen-Fraktion mit Mitochondrien, Endosomen, Lysosomen und Mikrosomen. Der Überstand entspricht der Cytosol-Fraktion. Das Organellen-Pellet wurde in  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und suspendiert.

## 2.8 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung mit Roti<sup>®</sup>-Nanoquant der Firma Roth beruht auf einer Modifikation der Proteinbestimmung nach Bradford (1976) und erlaubt den photometrischen Nachweis von Proteinmengen ab 200 ng. Als Farbreagenz dient hierbei 1 + 4 mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnte Roti<sup>®</sup>-Nanoquant-Lösung, die nach Bindung an Proteine einen Farbumschlag von braun nach blau zeigt.

Von diesem Farbreagenz wurden in jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte 200  $\mu\text{l}$  vorgelegt. Eichstandards bzw. bei Bedarf mit  $\text{H}_2\text{O}$  vorverdünnte Proben (gemeint sind Gesamtzell-Lysate sowie Gesamtzell-Homogenate und ihre subzellulären Fraktionen) wurden hinzupipettiert. Dann wurde jede Vertiefung mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 250  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und gemischt. Als Eichprotein fand BSA Verwendung, mit dem im Bereich von 0,5–10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  mittels Doppelbestimmungen eine Eichgerade aufgenommen wurde. Die Proteinbestimmungen in den Proben wurden als Vierfachbestimmungen durchgeführt.

Die gemischten Eichstandards samt Nullwert und die Proben wurden nach  $\geq 5$ -minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Spektralphotometer bei 450 nm und 620 nm gemessen. Die 620 nm-Extinktionswerte wurden durch die 450 nm-Werte geteilt und dieser Quotient in die nach der Proteinkonzentration aufgelöste Geradengleichung der Eichkurve eingesetzt. Das Gleichungsergebnis wurde durch das eingesetzte Probenvolumen in  $\mu\text{l}$  dividiert bzw. mit dem Verdünnungsfaktor der Probe multipliziert. Aus den so errechneten Endergebnissen der je vier Bestimmungen pro Probe wurde ein Mittelwert der Proteinkonzentration in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  gebildet.

## 2.9 Bestimmung der Aktivitäten der Cathepsine B, L und S

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methode erlaubt den direkten Vergleich der Aktivitäten der Cathepsine B, L und S bei Verwendung eines gemeinsamen, im Überschuß vorliegenden Substrats (Schmid et al., 1997). Aus dem fluorogenen Peptidsubstrat, Z-Phe-Arg-AMC (0,5 mM), entsteht durch Cathepsinkatalyse das stark fluoreszierende AMC, welches im Spektralfluorometer quantitativ erfasst wird. Nicht enzymatisch bedingte Fluoreszenz wurde in Form von Probenleerwerten und Reagenzienleerwerten von der gemessenen Fluoreszenz subtrahiert. Die dann verbleibende Fluoreszenz wurde unter Berücksichtigung verschiedener Parameter in Enzymaktivität umgerechnet, wie in 2.9.3 erläutert wird.

Da in Nierenzellen auch mit proteolytischer Aktivität von Metallo- und Serinproteasen zu rechnen ist, wobei letztere ebenfalls Z-Phe-Arg-AMC spalten (Morita et al., 1977), enthielt der Reaktionspuffer EDTA (4 mM) zur Hemmung der Metalloproteasen und Aprotinin (6  $\mu$ M) als Serinproteasen-Inhibitor. Außerdem waren dem Reaktionspuffer DTT (4 mM) als Stabilisator der SH-Gruppen im aktiven Zentrum der Cathepsine und BSA (0,02 % für Gesamtzell-Lysate bzw. 0,1 % für Gesamtzell-Homogenate und ihre subzellulären Fraktionen) als Detergenz zugesetzt, welches das Aufbrechen von Zellen und Organellen unterstützt. Die 5fache BSA-Konzentration für Gesamtzell-Homogenate und ihre Fraktionen war angezeigt aufgrund ihres unvollständigeren Aufschlusses. Da die Cathepsine B, L und S Cysteinproteasen sind, konnte durch die annähernd komplette Hemmung der proteolytischen Aktivität mit E-64 (10  $\mu$ M), welches ausschließlich Cysteinproteasen hemmt (Inubushi et al., 1994), bestätigt werden, dass das freigesetzte AMC ausschließlich auf Cathepsin-Aktivitäten zurückzuführen war.

Eine Differenzierung der Gesamtcathepsin-Aktivität gelang über Inhibitoren sowie unterschiedliche Stabilität im neutralen pH-Bereich. Ein spezifischer und bei Konzentrationen  $> 10^{-7}$  M kompletter Inhibitor für Cathepsin B ist CA-074 (Inubushi et al., 1994), welches dem Reaktionspuffer mit pH 5,0 zugesetzt



wurde. Die gehemmte Aktivität, errechnet aus Gesamtcathepsin-Aktivität minus Restaktivität, entspricht also der Cathepsin B-Aktivität. Da die Cathepsin S-Aktivität vernachlässigbar gering war, sollte die Restaktivität der Cathepsin L-Aktivität entsprechen. Dies wurde durch den Inhibitor Z-Phe-Phe-CHN<sub>2</sub> stichprobenartig bestätigt, welcher in einer Konzentration von 0,5 µM Cathepsin L vollständig, Cathepsin S zu ca. 50 % und Cathepsin B (fast) nicht hemmt (Kirschke et al., 1986). Deshalb konnte in den folgenden Versuchen die nach Inhibition mit CA-074 verbleibende Restaktivität der Cathepsin L(+S)-Aktivität gleichgesetzt und daher auf den Inhibitor Z-Phe-Phe-CHN<sub>2</sub> verzichtet werden. Die Cathepsin S-Aktivität wurde bei pH 7,5 bestimmt nach 60-minütiger Vorinkubation bei pH 7,5 im 37 °C-Wasserbad, da Cathepsin S im Unterschied zu den Cathepsinen B und L bei neutralen pH-Werten weitgehend aktiv bleibt (Kirschke und Wiederanders, 1994).

### **2.9.1 Versuchsprotokoll zur Bestimmung der Cathepsinaktivitäten B+L+S, B und L**

Jede Probe (und jeder AMC-Standard) wurde doppelt angesetzt und jeder der beiden Ansätze am Fluorimeter doppelt bestimmt, so dass also aus je zwei Fluoreszenz-Mittelwerten ein Mittelwert gebildet werden konnte.

Der für jeden Versuch frisch angesetzte Reaktionspuffer bestand aus dem Messpuffer 0,1 M Citratpuffer pH 5,0, dem DTT (4 mM), BSA (0,02 % bzw. 0,1 %), EDTA (4 mM) und Aprotinin (6 µM) zugesetzt waren. Dieser Cat B+L+S-Reaktionspuffer wurde für die Bestimmung der Cathepsin B- und damit „indirekt“ auch der Cathepsin L-Aktivität mit CA-074 (10 µM) versetzt (Cat B-Reaktionspuffer) bzw. stichprobenartig mit Z-Phe-Phe-CHN<sub>2</sub> (0,5 µM) (Cat L-Reaktionspuffer) zur „direkten“ Bestimmung der Cathepsin L(+S)-Aktivitäten. Die zur Kalibrierung notwendigen AMC-Standardlösungen A, B, C und D wurden folgendermaßen angesetzt:

A (20 µM)	2 µl 10 mM AMC + 1000 µl Cat B+L+S-Reaktionspuffer
B (8 µM)	100 µl A + 150 µl Cat B+L+S-Reaktionspuffer
C (4 µM)	50 µl A + 200 µl Cat B+L+S-Reaktionspuffer
D (2 µM)	50 µl A + 450 µl Cat B+L+S-Reaktionspuffer

100 µl Cat B+L+S-Puffer bzw. Cat B-Puffer bzw. in Vorversuchen Cat L-Puffer wurden je zweimal als Reagenzienleerwert und je zweimal für jede Probe als Messwert im Eisbad vorgelegt. Auch von jedem AMC-Standard wurden je zweimal 100 µl im Eisbad vorpipettiert. Alle Ansätze wurden dann mit 10 µl des Substrats Z-Phe-Arg-AMC (0,5 mM) versetzt. Darauf wurde zu den Proben-Ansätzen 5–10 µl Probe hinzupipettiert, zu den Reagenzienleerwert- und AMC-Standard-Ansätzen die gleiche Menge H<sub>2</sub>O. Dabei wurden die Proben bei Bedarf so mit H<sub>2</sub>O vorverdünnt, dass ihre Fluoreszenzsignale möglichst im Bereich jener der AMC-Standards lagen.

Von allen Ansätzen wurden nach Durchmischen 5 µl-Aliquots entnommen und jeweils zu (bereits vor Beginn des Versuchs vorgelegten) 1 000 µl 0,1 M Citratpuffer pH 5,0 als Stoppuffer pipettiert und eisgekühlt. Durch die 200fache Verdünnung im Citratpuffer und die Kühlung dieser sog. t=0-Werte sollte jede weitere AMC-Freisetzung verhindert werden.

Anschließend wurden alle Ansätze aus dem Eisbad genommen und 10 min im 37 °C-Wasserbad inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden sie sofort zurück ins Eisbad gestellt, um die Enzymreaktion zu stoppen. Von diesen Ansätzen wurden nach Durchmischen Aliquots von 5 µl in jeweils 1 000 µl 0,1 M Citratpuffer pH 5,0 als Stopppuffer pipettiert.

Die so erhaltenen t=10-Werte und AMC-Standards wurden in Quarzküvetten umgefüllt, ebenso die t=0-Werte, und am Spektralfluorimeter gemessen bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissions(Absorptions)wellenlänge von 445 nm. Am Beginn und Ende jeder Messreihe wurde die Intensität und Stabilität der Fluorometerlampe durch Messung einer Chinin-Hydrobromid-Lösung überprüft. Die gemessenen Fluoreszenzsignale wurden von einem Schreiber aufgezeichnet und konnten dann in Skalenteilen abgelesen werden.

Zur Ergänzung soll kurz auf die Herstellung der Reaktionspuffer eingegangen werden: Für 1 ml Cat B+L+S-Reaktionspuffer wurden 0,618 mg DTT eingewogen und mit 2 bzw. 10 µl 10% igem BSA, 16 µl 0,25 M EDTA, 40 µl 0,154 mM Aprotinin und 942 bzw. 934 µl 0,1 M Citratpuffer pH 5,0 versetzt. 1 ml Cat B-Reaktionspuffer bestand aus 1 ml Cat B+L+S-Reaktionspuffer versetzt mit 1 µl 10 mM CA-074.

1 ml Cat L-Reaktionspuffer bestand aus 1 ml Cat B+L+S-Reaktionspuffer versetzt mit 1  $\mu$ l 0,5 mM Z-Phe-Phe-CHN<sub>2</sub>.

### **2.9.2 Versuchsprotokoll zur Bestimmung der Cathepsin S-Aktivität**

Zur Bestimmung der Aktivitäten der Cathepsine B+L+S und B bestehen folgende Unterschiede:

Der Reaktionspuffer für die Bestimmung der Cathepsin S-Aktivität (Cat S-Reaktionspuffer) enthielt anstelle von Citratpuffer 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,5 als Messpuffer (0,1 M) und wurde im gleichen Volumen eingesetzt wie die Proben (50  $\mu$ l + 50  $\mu$ l). Der Grund dafür liegt in der sehr geringen Aktivität von Cathepsin S in den Nierenkarzinomzellen.

Diese Ansätze wurden 60 min lang bei pH 7,5 im 37 °C-Wasserbad vorinkubiert, um Cathepsin L, vor allem aber Cathepsin B zu inaktivieren. Anschließend erfolgte unter Eiskühlung die Zugabe von 10  $\mu$ l Z-Phe-Arg-AMC (0,5 mM), wie in 2.9.1 beschrieben, und die Entnahme von 5  $\mu$ l-Aliquots für die t=0-Werte. Aufgrund der geringen Cathepsin S-Aktivität wurden 60 min als Inkubationszeit gewählt und nach deren Ablauf 5  $\mu$ l-Aliquots für die t=60-Werte entnommen.

Zur Ergänzung: 1 ml des Cat S-Reaktionspuffers, der im gleichen Volumen wie die Proben eingesetzt wurde, bestand aus 1,236 mg eingewogenem DTT versetzt mit 4 bzw. 20  $\mu$ l 10%igem BSA, 32  $\mu$ l 0,25 M EDTA, 80  $\mu$ l 0,154 mM Aprotinin und 884 bzw. 868  $\mu$ l 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,5.

### **2.9.3 Berechnung der Cathepsinaktivitäten**

Aus den um die Reagenzien- und Probenleerwerte (t=0-Werte) korrigierten Fluoreszenzsignalen der AMC-Standards und Proben (t=10- bzw. t=60-Werte) wurden unter Berücksichtigung der jeweiligen Inkubationszeit sowie der eingesetzten Zellzahl bzw. Proteinmenge die spezifischen Enzymaktivitäten errechnet. Diese wurden angegeben in  $\mu\text{mol}/(\text{min} \times \text{Zellzahl}) = \text{Units}/\text{Zelle} = \text{U}/\text{Zelle}$  oder  $\mu\text{mol}/(\text{min} \times \text{g Protein}) = \text{Units}/\text{g Protein} = \text{U}/\text{g (Protein)}$ .

## 2.10 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten umfasste die Angabe von arithmetischen Mittelwerten (MV) und ihrer Streuung mit Hilfe der Standardabweichung (SD) bzw. des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM) sowie Signifikanzprüfungen mit dem Student's t-Test bei einem Signifikanzniveau von 0,05.

## 3 ERGEBNISSE

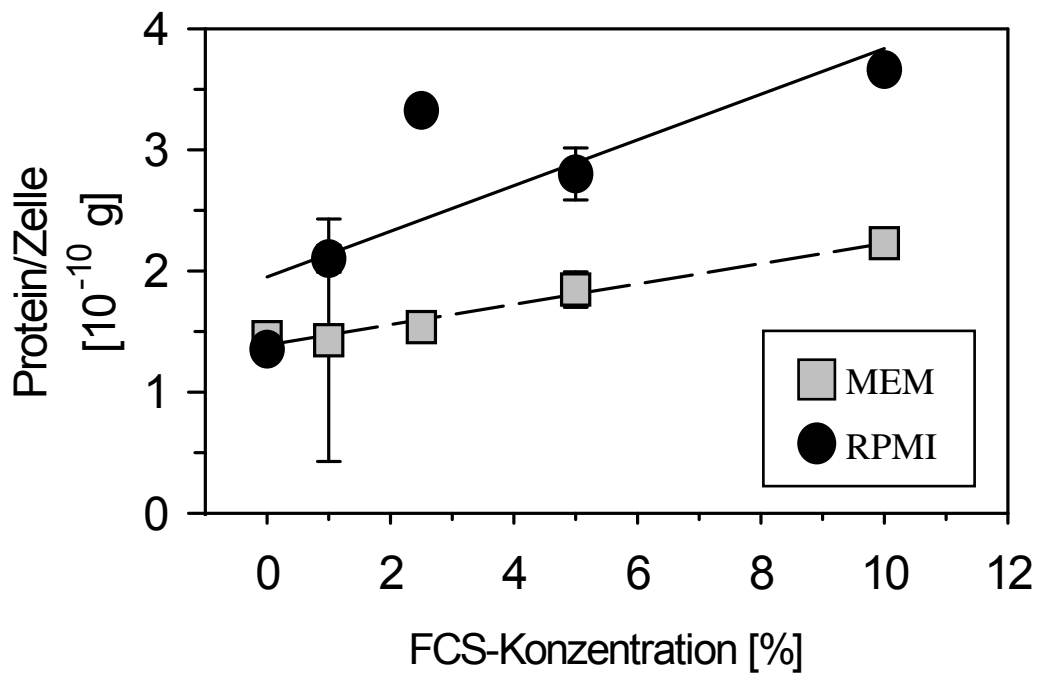
### 3.1 Vorversuche zu den Zellkulturbedingungen

Untersucht wurde der Einfluss der Kulturmedien Eagle's MEM respektive RPMI 1640 sowie unterschiedlicher Konzentrationen von hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS) (zwischen 0 % und 10 %) auf Proteingehalt und Cathepsinaktivitäten (Cat-Aktivitäten) von 24 Stunden lang inkubierten, d. h. proliferierenden A-498-Zellen.

Der Anteil von Cathepsin B an der Gesamtaktivität der Cathepsine B, L und S (Cat B+L+S- oder Gesamt-Aktivität) belief sich auf durchschnittlich 94 % unabhängig von Kulturmedium und FCS-Konzentration, so dass, was hier für die Cat B+L+S-Aktivität dargestellt wird, mit rund 6 % Abzug auch für Cathepsin B gilt.

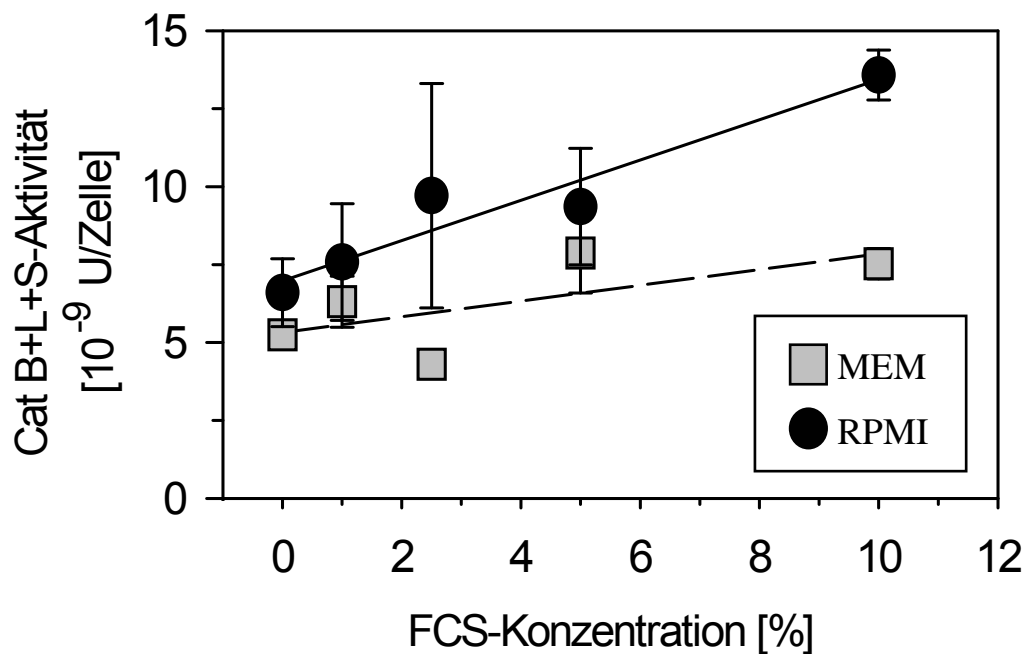
Für alle FCS-Konzentrationen lagen Proteinmenge und spezifische Cat B+L+S- bzw. Cat B-Aktivität pro Zelle (Units/Zelle) bei Kultivierung in RPMI 1640 um durchschnittlich 50 % höher als bei Kultivierung in Eagle's MEM. Bei von 0 % auf 10 % zunehmenden FCS-Konzentrationen fand sich für das jeweilige Kulturmedium ein nahezu paralleler Anstieg von Proteinmenge und Cat B+L+S- bzw. Cat B-Aktivität pro Zelle mit mehr als Verdopplung in RPMI 1640 und Zunahme um etwa die Hälfte in Eagle's MEM (Abb. 1 und 2).

Proteinmenge und Cat B+L+S- bzw. Cat B-Aktivität pro Zelle zeigen also für das jeweilige Kulturmedium gleiche Kurvensteigungen. Daraus folgt, dass die spezifischen Cat B+L+S- bzw. Cat B-Aktivitäten pro g Protein (Units/g Protein) sich für die beiden Kulturmedien fast nicht unterscheiden und über alle FCS-Konzentrationen hinweg konstant bleiben (geringfügige Abnahme ohne biologische Relevanz). Mit anderen Worten, die Cat B+L+S- bzw. Cat B-Aktivität pro g Protein ist unabhängig vom gewählten Kulturmedium Eagle's MEM bzw. RPMI 1640 und unabhängig von der Konzentration des supplementierten FCS (Abb. 3).



**Abb. 1: Proteingehalt proliferierender A-498-Zellen bei Kultivierung in Eagle's MEM resp. RPMI 1640 unter ansteigender FCS-Konzentration**

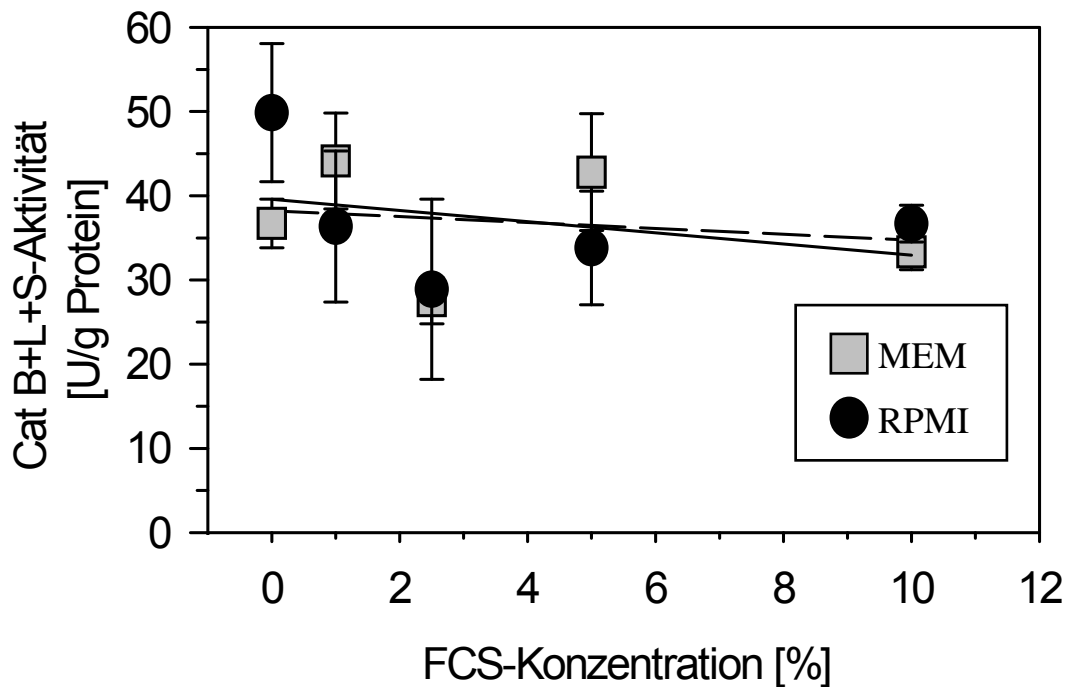
Lineare Regression;  $MV \pm SD$ ; ein Kulturexperiment mit zwei unabhängigen Proteinbestimmungen pro FCS-Konzentration, jeweils als Doppelbestimmungen ausgeführt



**Abb. 2: Cat B+L+S-Aktivität pro Zelle in proliferierenden A-498-Zellen bei Kultivierung in Eagle's MEM resp. RPMI 1640 unter ansteigender FCS-Konzentration**

Lineare Regression;  $MV \pm SD$ ; bezüglich Stichprobenumfang s. Abb. 3

Beachte: Cat B-Aktivität ganz entsprechend nach Abzug von 6 %



**Abb. 3: Cat B+L+S-Aktivität pro g Protein in proliferierenden A-498-Zellen bei Kultivierung in Eagle's MEM resp. RPMI 1640 unter ansteigender FCS-Konzentration**

Lineare Regression;  $MV \pm SD$ ; ein Kulturexperiment mit zwei unabhängigen Aktivitätsbestimmungen pro FCS-Konzentration, jeweils als Doppelbestimmungen ausgeführt  
 Fazit: In proliferierenden A-498-Zellen erwiesen sich die in Units/g Protein bestimmten Cat B+L+S- sowie Cat B-Aktivitäten als unabhängig von Kulturmedium und FCS-Konzentration.

## 3.2 Konfluente A-498-Zellen

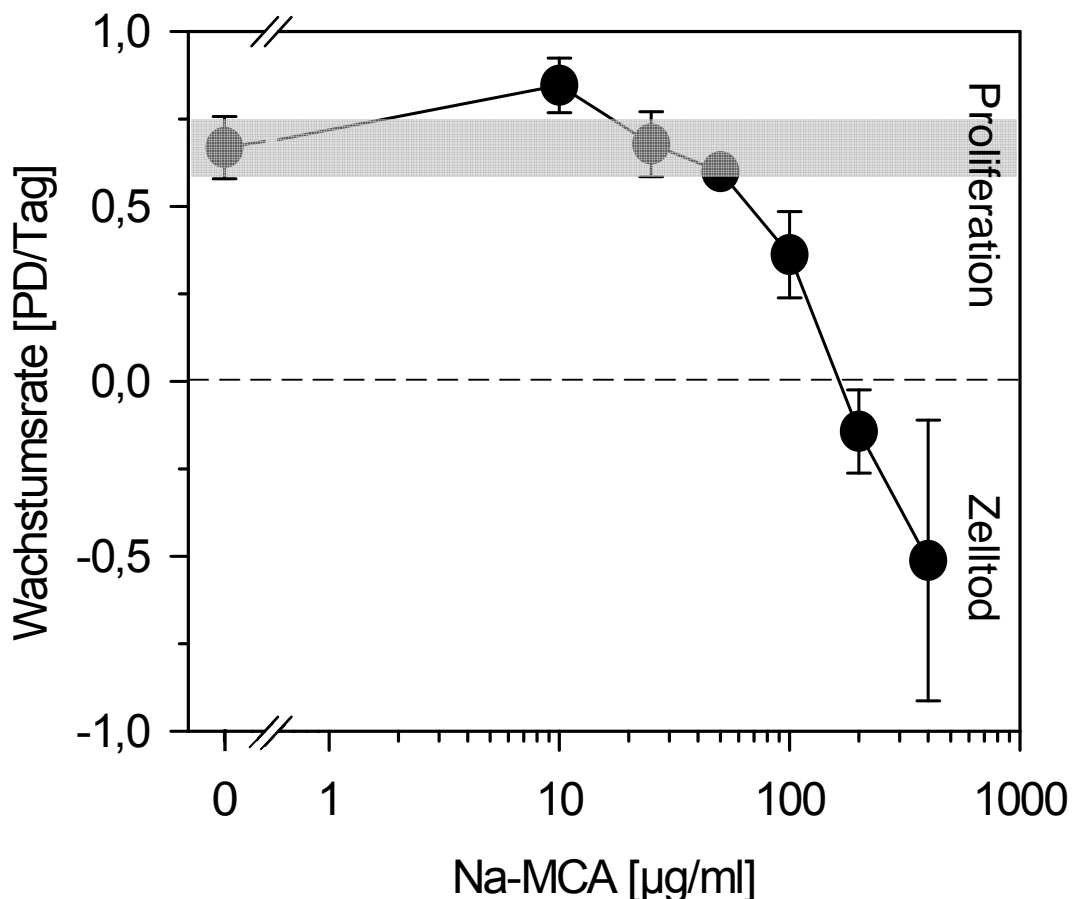
### 3.2.1 Untersuchungen an Gesamtzell-Lysaten

Den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bilden die im folgenden dargestellten optisch konfluenten A-498-Zellen, die nach dreitägiger Inkubation in Eagle's MEM (10 % FCS, 6 % CO<sub>2</sub>) einer 24-stündigen Exposition mit Na-MCA verschiedener Konzentrationen unterzogen und zu Gesamtzell-Lysaten aufgearbeitet wurden.

Die Zytotoxizitätsprüfungen wurden an fünf Passagen mit je zwei Kulturen pro Na-MCA-Konzentration durchgeführt, die Zellprotein- und Cathepsinaktivitäts-Bestimmungen an vier der fünf Passagen jeweils zweimal als Doppelbestimmung, so dass also für jede Passage pro Na-MCA-Konzentration ein Mittelwert aus 32 Einzelwerten gebildet werden konnte.

### 3.2.1.1 Zytotoxizitätstests

Gegenstand des Interesses waren die zytotoxischen Effekte verschiedener Na-MCA-Konzentrationen (von 0  $\mu\text{g/ml}$  bis 400  $\mu\text{g/ml}$ ) bei 24-stündiger Exposition. Hierzu wurde für jede Na-MCA-Konzentration die Zahl der vitalen Zellen pro  $\text{cm}^2$  Kulturfläche sowie die entsprechende Wachstumsrate (s. 2.6.1) ermittelt. Wie aus Abb. 4 ersichtlich liegt die Na-MCA-Konzentration, bei der es zu einem überwiegenden Absterben der Zellen einer Population kommt, zwischen 100 und 200  $\mu\text{g/ml}$ . Die  $\text{ED}_{50}$ , d. h. die Dosis Na-MCA, die nach 24-stündiger Exposition zu einem Vitalitätsverlust von 50 % der Zellen führt, liegt für optisch konfluente A-498-Zellen bei ca. 105  $\mu\text{g/ml}$  Na-MCA.



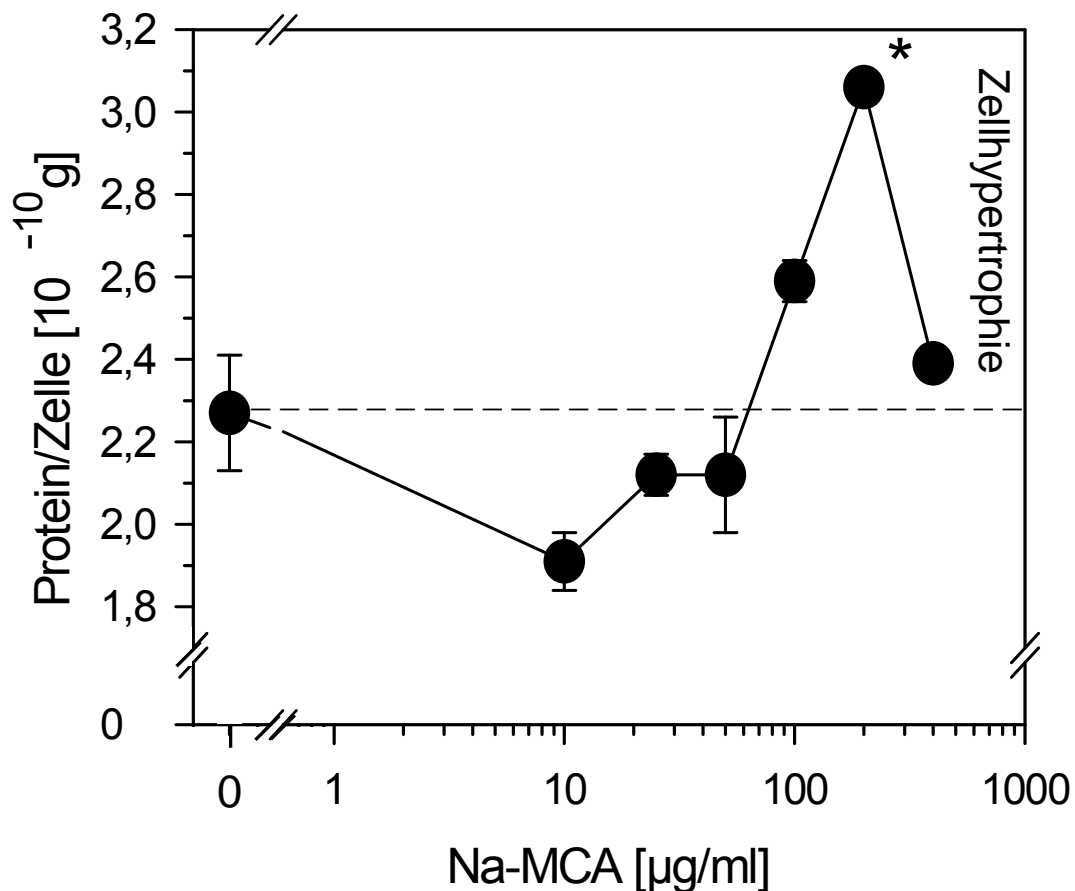
**Abb. 4: Wachstumsraten konfluenter A-498-Populationen nach 24-stündiger Inkubation mit steigenden Na-MCA-Konzentrationen**

MV  $\pm$  SEM mit  $n = 5$ ; fünf Passagen mit je zwei Kulturen pro Na-MCA-Konzentration



### 3.2.1.2 Zellprotein

Normalerweise korrelieren Zellprotein und Zellzahl sehr gut miteinander. Dies trifft auch zu für Expositionsdosen bis etwa 50 µg/ml Na-MCA mit relativ konstantem Proteingehalt bei relativ konstanter Zellzahl. Oberhalb ca. 50 µg/ml Na-MCA allerdings nimmt die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle (= unbehandelte Zellen, d. h. 0 µg/ml Na-MCA) kontinuierlich ab, gleichzeitig nimmt die Proteinmenge bis 200 µg/ml Na-MCA kontinuierlich zu, d. h. die Zellen hypertrophieren. Jenseits 200 µg/ml nimmt jedoch auch der Proteingehalt wieder ab und erreicht bei der höchsten Na-MCA-Dosis von 400 µg/ml fast schon wieder den Wert der Kontrolle (Abb. 5).

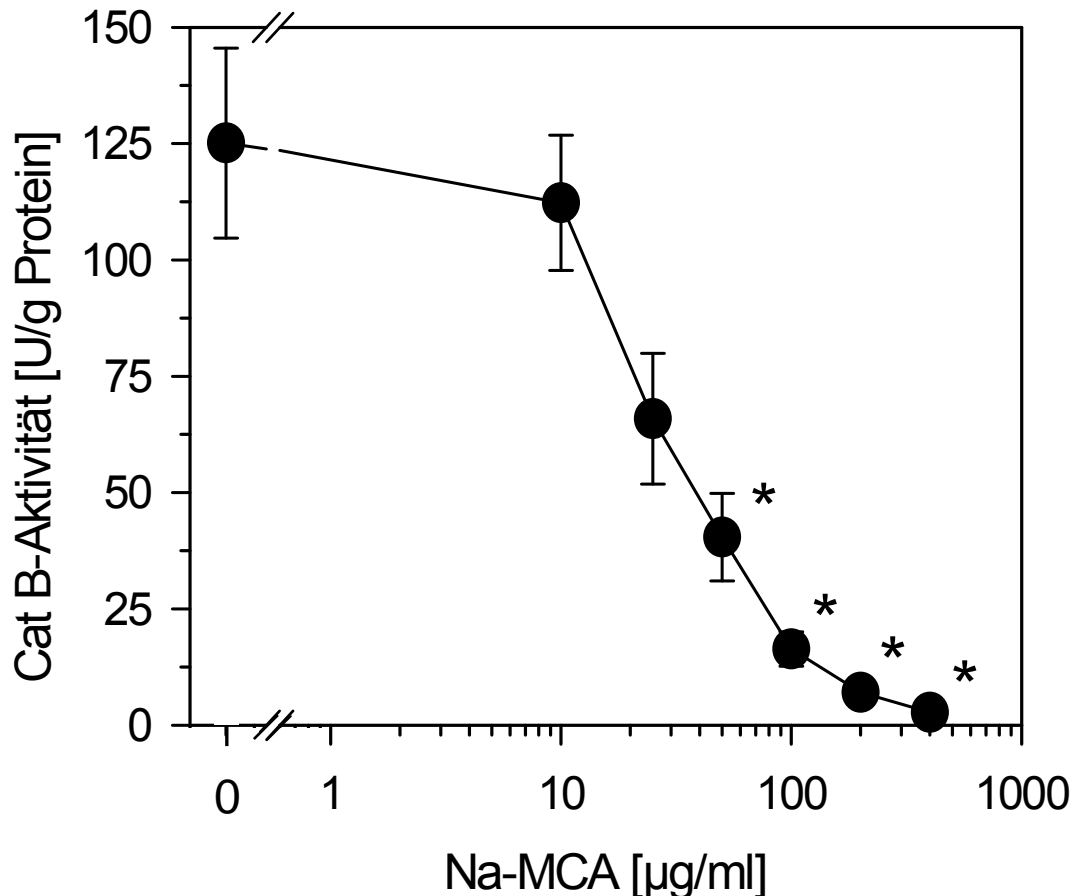


**Abb. 5: Proteingehalt konfluenter A-498-Zellen in Abhängigkeit von der Na-MCA-Konzentration nach 24-stündiger Exposition**

MV ± SEM mit n = 4; im Student's t-Test mit n = 4 \* = p < 0,05; vier Passagen mit jeweils zwei Zellkulturen pro Na-MCA-Konzentration, deren Proteingehalt in mindestens zwei Doppelbestimmungen pro Na-MCA-Dosis ermittelt wurden – also mindestens 16 Doppelbestimmungen pro Na-MCA-Dosis

### 3.2.1.3 Cathepsinaktivitäten

Empfindlicher als Zellzahl und Zellprotein reagieren die Cathepsinaktivitäten, v. a. Cathepsin B, auf Na-MCA-Exposition. Schon bei der niedrigsten eingesetzten Na-MCA-Dosis von 10 µg/ml ist eine Abnahme der Cathepsin B-Aktivität um mehr als 10 % gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen (Abb. 6).

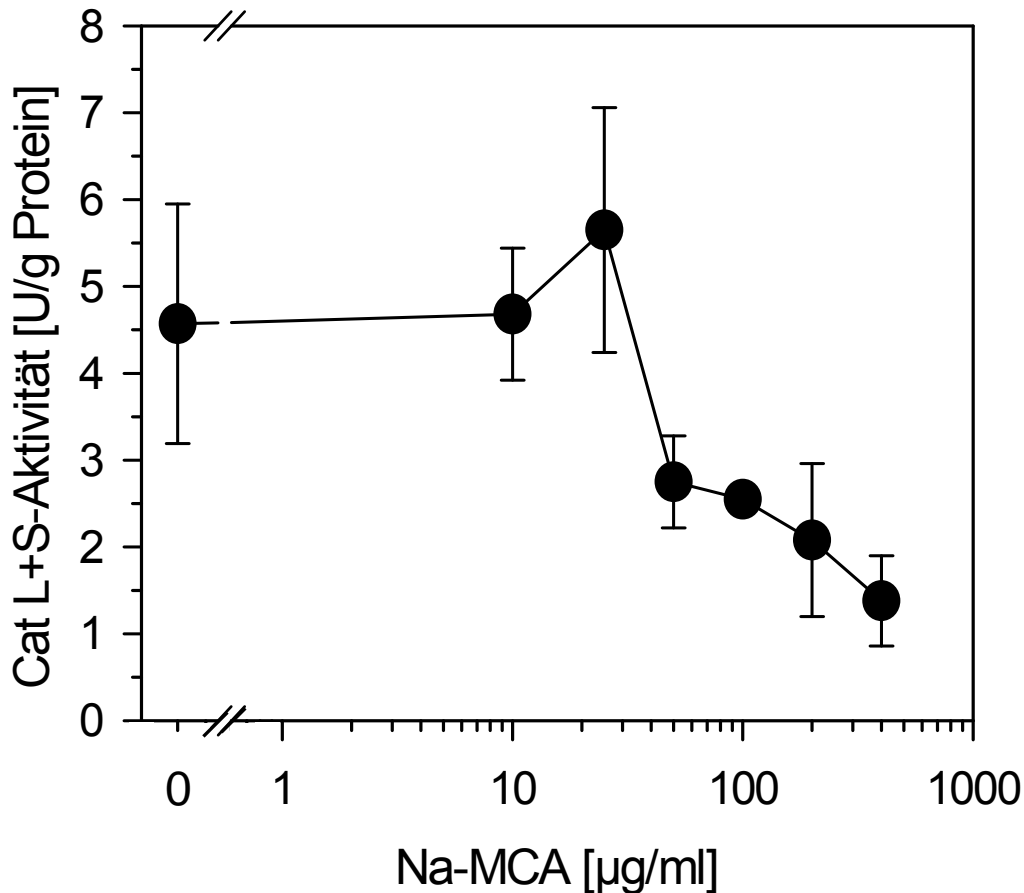


**Abb. 6: Cat B-Aktivitäten in konfluenten A-498-Zellen (Messung in Gesamtzell-Lysaten) nach 24-stündiger Inkubation mit Na-MCA**

MV ± SEM mit n = 4; im Student's t-Test mit n = 4 \* = p < 0,05; vier Passagen mit je zwei Zellkulturen pro Na-MCA-Konzentration, deren Cat-Aktivitäten in zwei unabhängigen Versuchen jeweils mittels Doppelproben bestimmt wurden – also MV aus jeweils 32 Einzelwerten pro Na-MCA-Dosis

In den Kontrollzellen betrug die Cat B+L+S-Aktivität 130 Units/g Protein; davon entfielen 125 Units/g Protein auf Cathepsin B und die restlichen 5 Units/g Protein auf die Cathepsine L und S (Cathepsine L+S). Die Cat L+S-Aktivität nahm erst bei Na-MCA-Konzentrationen größer als 25 µg/ml ab, geringere Do-

sen scheinen im Gegenteil mit einem gewissen Aktivitätszuwachs einherzugehen (Abb. 7).



**Abb. 7: Cat L+S-Aktivitäten in konfluenten A-498-Zellen (Messung in Gesamtzell-Lysaten) nach 24-stündiger Inkubation mit Na-MCA**

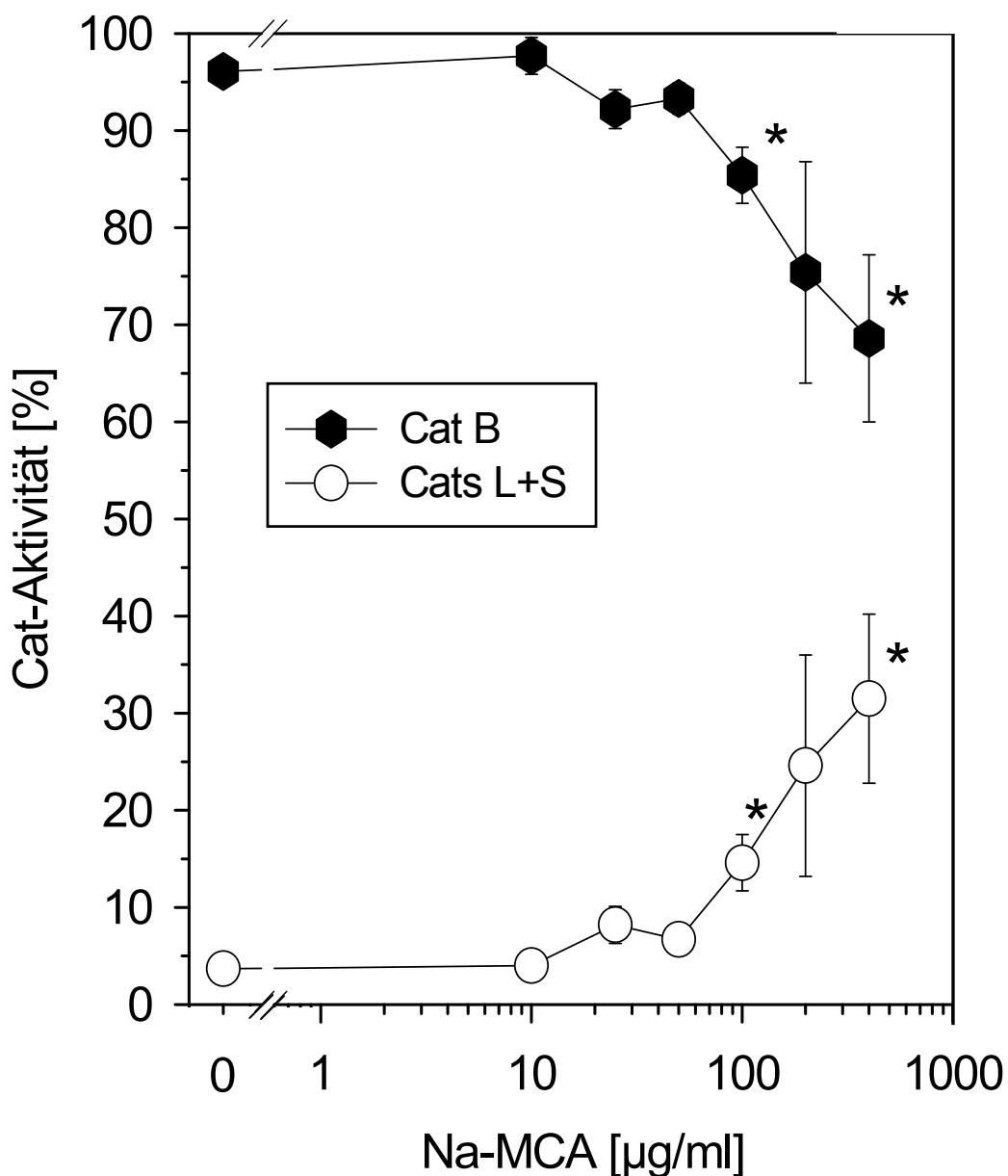
MV ± SEM mit n = 4; bezüglich Stichprobenumfang s. Abb. 6

Beachte: Die Cat S-Aktivität lag in den Gesamtzell-Lysaten an der Nachweisgrenze, so dass es sich bei den sog. Cat L+S-Aktivitäten praktisch um Cat L-Aktivitäten handelt.

Setzt man die Aktivität in den Kontrollzellen gleich 100 %, so ist für Cathepsin B eine kontinuierliche Abnahme von 89,7 % bei 10 µg/ml auf 2,2 % bei 400 µg/ml Na-MCA konstatierbar, wogegen die Aktivität der Cathepsine L+S weniger steil abfällt auf immerhin noch 30,2 % der Kontrolle bei 400 µg/ml Na-MCA, eine im Vergleich zu Cathepsin B noch 14fach höhere relative Aktivität.

Bis zu einer Na-MCA-Konzentration von 50 µg/ml stellt die Cat B-Aktivität mit mehr als 90 % den größten Anteil an der Cat B+L+S-Aktivität.

Oberhalb 50  $\mu\text{g/ml}$  Na-MCA aber driften Gesamt- und Cat B-Aktivitäten immer weiter auseinander – bei 400  $\mu\text{g/ml}$  Na-MCA beträgt der Anteil von Cathepsin B an der Gesamtaktivität nur noch 68,6 % (Abb. 8).



**Abb. 8: Prozentualer Anteil der Cathepsine B und L+S an der in U/g Protein bestimmten, hier 100 % gesetzten Cat B+L+S-Aktivität in konfluenten A-498-Zellen unter steigender Na-MCA-Dosis**

MV  $\pm$  SEM mit n = 4; im Student's t-Test mit n = 4 \* = p < 0,05; bezüglich Stichprobenumfang s. Abb. 6

Die Cat S-Aktivität lag in den Gesamtzell-Lysaten (konfluenter A-498-Zellen) an der Nachweisgrenze, was die sehr hohen Standardabweichungen zeigten. Darum wird diesbezüglich auf die Ergebnisse der subzellulären Fraktionierung (3.2.2.3) verwiesen.

#### **3.2.1.4 Einfluss des in vitro-Alters**

Wie in 3.2.1 angeführt wurden Zellvitalität bzw. Zellprotein und Cathepsinaktivitäten von mit Na-MCA versetzten konfluenten A-498-Zellen anhand von fünf bzw. vier verschiedenen Passagen (zwischen den Passagenummern 75 und 90) untersucht.

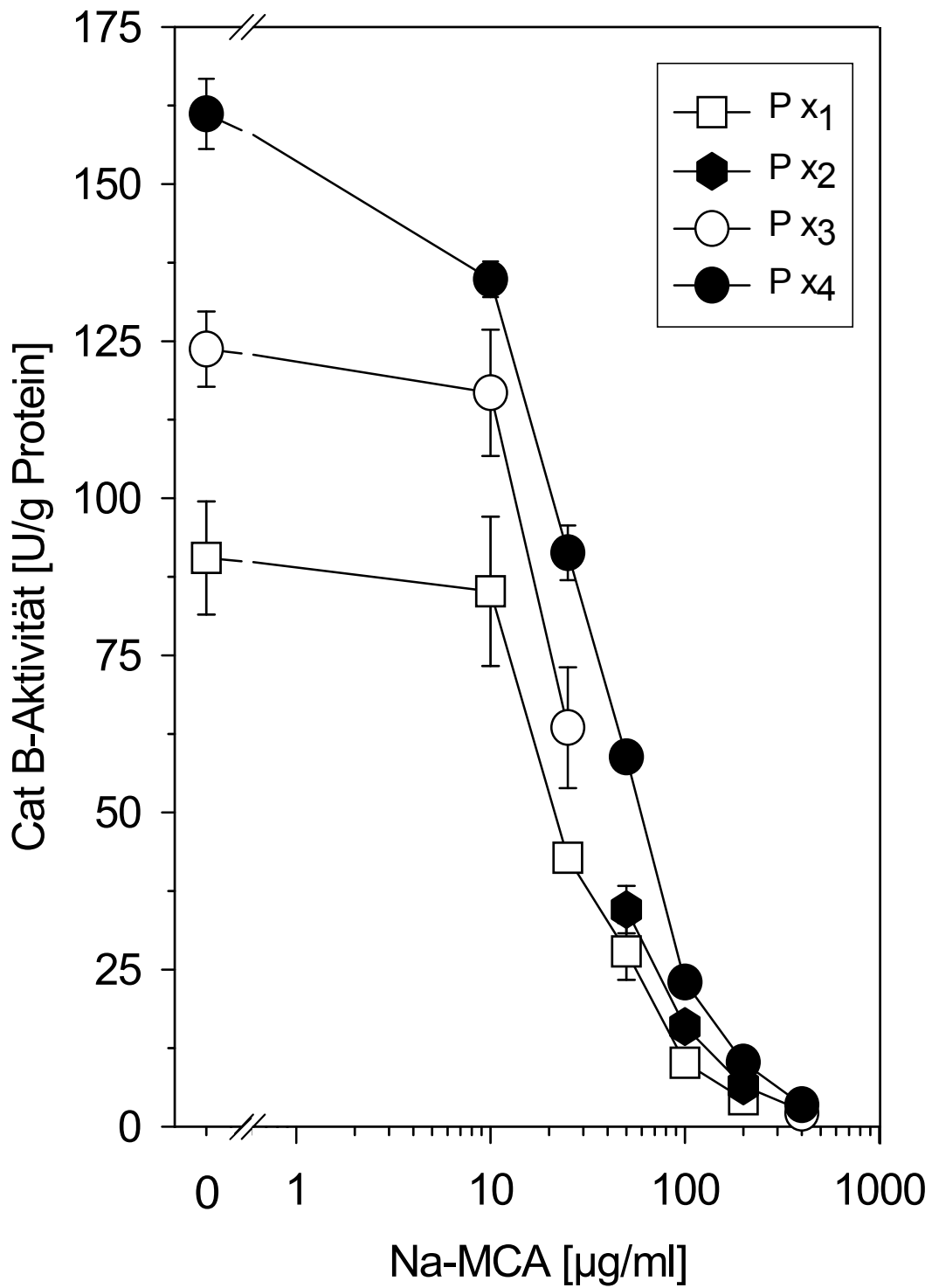
Der Vergleich der Passagen erbrachte eine stete Zunahme der Cathepsinaktivitäten (Cat B+L+S- sowie Cat B-, und damit auch Cat L+S-Aktivitäten) mit zunehmendem in vitro-Alter der A-498-Zellen, und zwar für alle Na-MCA-Konzentrationen von 0 bis 400 µg/ml (Abb. 9).

Auf Zellvitalität und Proteingehalt hingegen scheint das in vitro-Alter weniger Einfluß zu haben; hier ließ sich von der 75. hin zur 90. Passage keine Tendenz erkennen.

### **3.2.2 Untersuchungen an subzellulären Fraktionen**

In Abschnitt 3.2.1.3 wurden die spezifischen Aktivitäten der Cathepsine B und L+S in Gesamtzell-Lysaten (vergleichend) dargestellt. Diese Aktivitätswerte sind jedoch durch cytosolische Cysteinprotease-Inhibitoren wie die Cystatine A und B verfälscht, deren hemmender Einfluss auf die verschiedenen Cathepsine überdies bekanntlich stark differiert.

Die Isolierung Cytosol-freier Organellen-Fraktionen gibt Aufschluss über die „wahren“, nicht durch Inhibitoren veränderten Cathepsinaktivitäten und über das Ausmaß der cytosolischen Inhibition und ihre eventuelle Beeinflussung durch Na-MCA.



**Abb. 9: Cat B-Aktivitäten in vier Passagen konfluenter A-498-Zellen im Vergleich (Messung in Gesamtzell-Lysaten)**

MV ± SD mit n = 4 Doppelbestimmungen pro Na-MCA-Konzentration einer Passage;

P x sei Passage zwischen Nummer 75 und 90 mit  $x_1 < x_2 < x_3 < x_4$

Für die subzelluläre Fraktionierung der konfluenten A-498-Zellen in eine Organellenfraktion mit Lysosomen, Endosomen, Mitochondrien und Mikrosomen wurde eine über 20 mal größere Kulturfläche bei allerdings gleicher Einsaatdichte verwendet. Die Unterschiede zwischen den Lysaten dieser Gesamtzell-Homogenate (kurz „Gesamtzell-Homogenate“ genannt) und den bisher beschriebenen Gesamtzell-Lysaten bezüglich Zytotoxizität, Zellprotein und Cathepsinaktivitäten erwiesen sich dann auch als geringfügig und durch die normale biologische Variationsbreite hinreichend erklärbar.

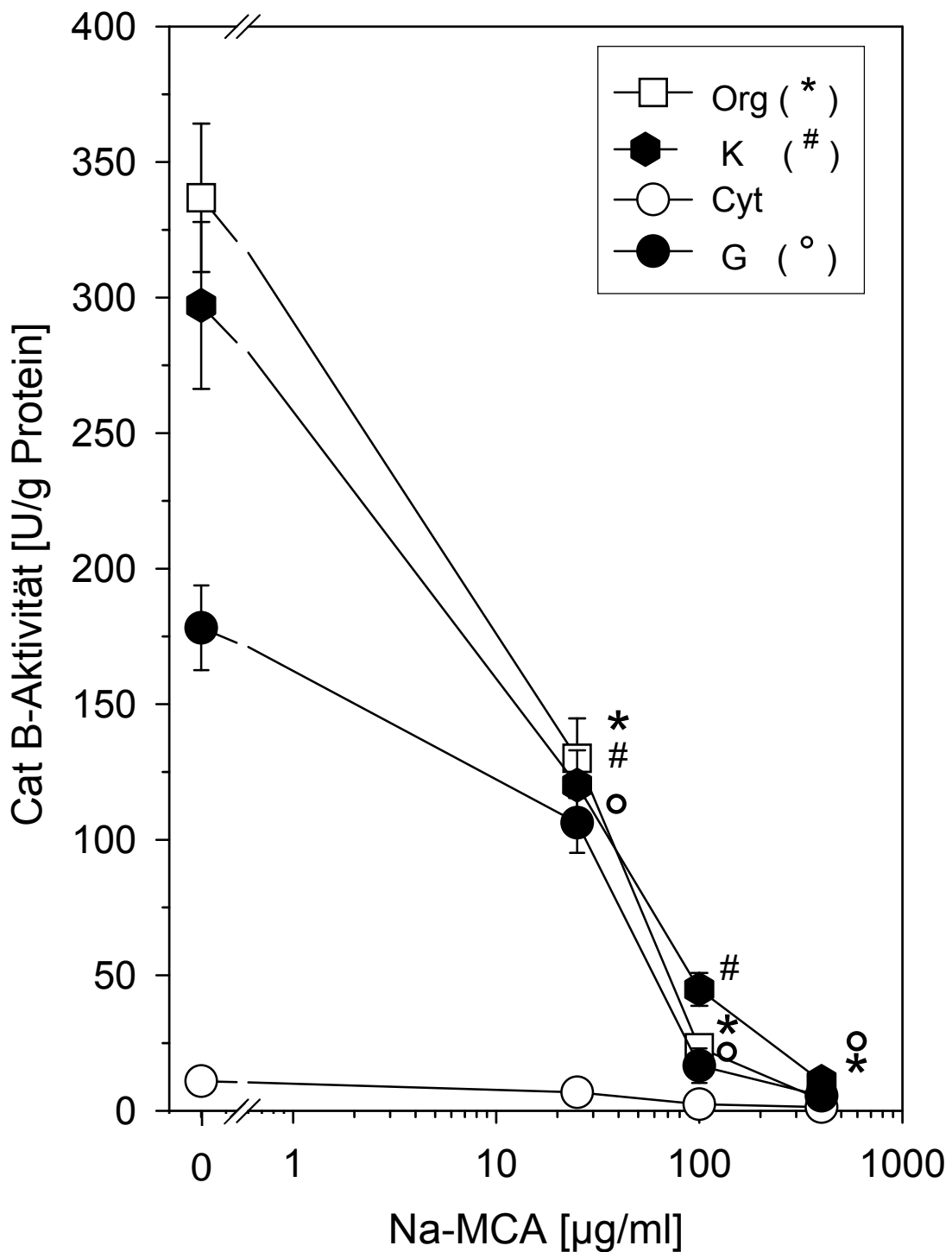
### **3.2.2.1 Subzelluläre Fraktionen im Vergleich**

Im Folgenden werden die bei der differentiellen Zentrifugation anfallenden Fraktionen bezüglich ihrer spezifischen Cathepsinaktivitäten pro g Protein (Units/g Protein) miteinander verglichen.

Wie zu erwarten finden sich die höchsten Cathepsinaktivitäten in der Cytosolfreien Organellenfraktion (Org) aus Lysosomen, Endosomen, Mitochondrien und Mikrosomen, die niedrigsten im Cytosol (Cyt); dazwischen liegen jene in der K-Fraktion (K), die Zellkerne und -trümmer enthält, und im Gesamtzell-Homogenat (G-Homogenat) (Abb. 10 und 11).

Es fällt auf, dass mit zunehmender Na-MCA-Konzentration die Unterschiede zwischen den Cathepsinaktivitäten der einzelnen Fraktionen abnehmen. So ist die Cat B-Aktivität bei 0 µg/ml Na-MCA (= Kontrolle) in der Organellen-Fraktion um den Faktor 31 größer als in der Cytosol-Fraktion, bei 400 µg/ml Na-MCA dagegen nur noch um den Faktor 3 (Abb. 10). Eine noch ausgeprägtere Angleichung der Aktivitäten mit ansteigender Na-MCA-Dosis beobachtet man für die Cathepsine L+S: Bei 0 µg/ml Na-MCA beträgt die Aktivität in den Organellen das 40fache von derjenigen im Cytosol, bei 400 µg/ml Na-MCA dagegen nur noch das 3fache (Abb. 11).

Mit ansteigender Na-MCA-Dosis nehmen die Cathepsinaktivitäten in allen Fraktionen kontinuierlich ab mit einer Ausnahme: Die Aktivität der Cathepsine L+S im Cytosol nimmt zwischen 100 und 400 µg/ml Na-MCA um den Faktor 4,6 zu (Abb. 11).



**Abb. 10: Cat B-Aktivitäten in subzellulären Fraktionen und Gesamtzell-Homogenat konfluenter A-498-Zellen nach 24-stündiger Na-MCA-Exposition**

MV ± SD; im Student's t-Test mit n = 4 bzw. n = 2 \* , # , ° = p < 0,05; pro Na-MCA-Konzentration in Org (= Organellen-Fraktion) vier, in K (= K-Fraktion), G (= Gesamtzell-Homogenat) und Cyt (= Cytosol-Fraktion) jeweils zwei unabhängige Aktivitätsbestimmungen, die als Doppelbestimmungen ausgeführt wurden



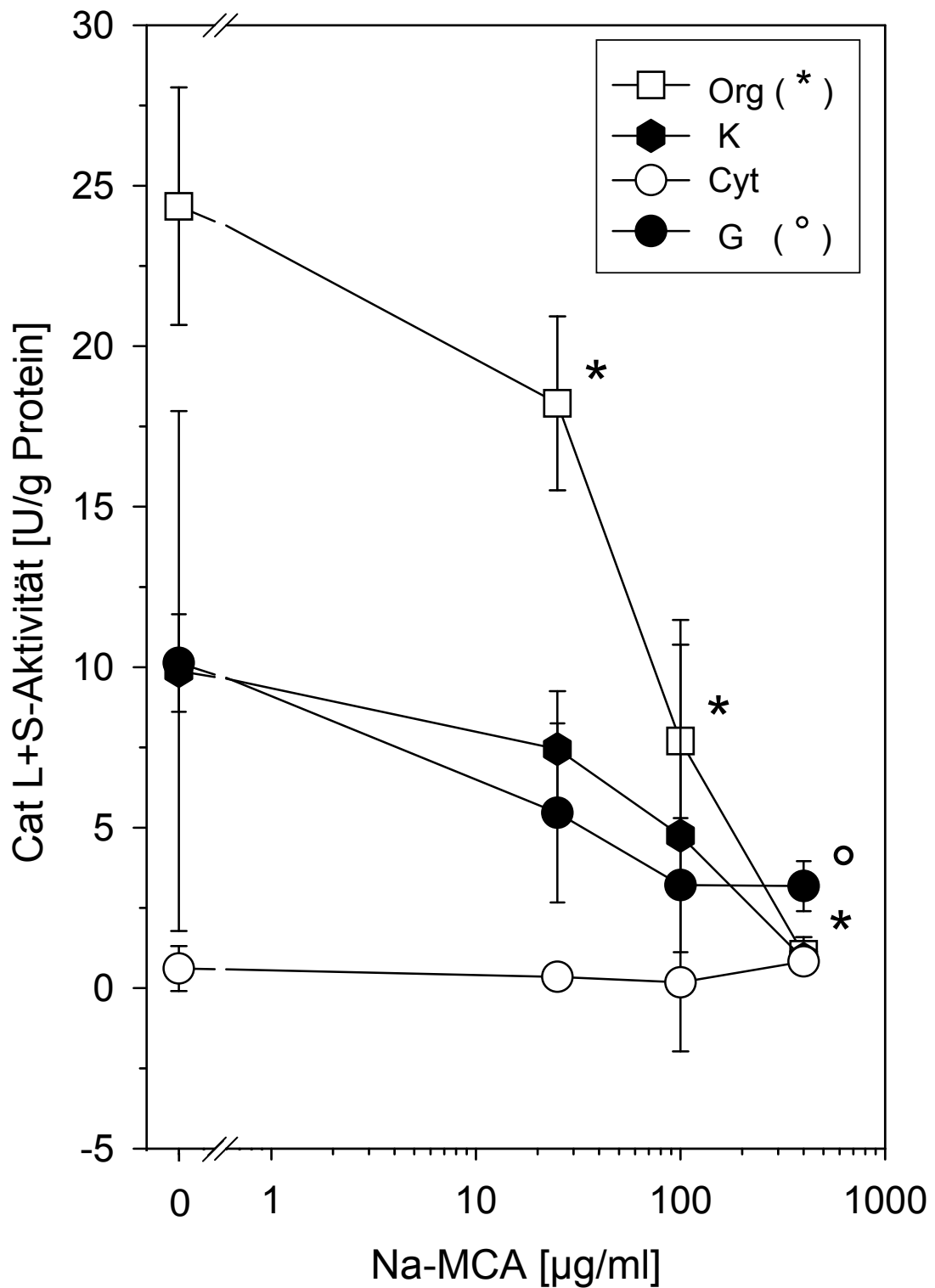


Abb. 11: Cat L+S-Aktivitäten in subzellulären Fraktionen und Gesamtzell-Homogenat konfluenter A-498-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Na-MCA

MV  $\pm$  SD; im Student's t-Test mit n = 4 bzw. n = 2 \* , # = p < 0,05; bezüglich Stichprobenumfang s. Abb. 10

Betrachtet man den Proteingehalt des Cytosols ( $\mu\text{g Protein}/\mu\text{l Cytosol}$ ) unter zunehmender Na-MCA-Konzentration, so fällt auf, dass dieser bis 100  $\mu\text{g/ml}$  Na-MCA kontinuierlich anwächst, um dann zwischen 100 und 400  $\mu\text{g/ml}$  Na-MCA um mehr als die Hälfte abzufallen (Tab. 3).

**Tab. 3: Proteingehalt der Cytosol-Fractionen (Cyt)**

MV  $\pm$  SD aus n = 4 Bestimmungen

Na-MCA [ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	25	100	400
Cyt [ $\mu\text{g Protein}/\mu\text{l}$ ]	1,27 $\pm$ 0,08	1,55 $\pm$ 0,03	1,73 $\pm$ 0,14	0,75 $\pm$ 0,01

### 3.2.2.2 Angereicherte Cathepsinaktivitäten

Der Anreicherungsfaktor F beschreibt die spezifische Aktivität in einer Fraktion bezogen auf die spezifische Aktivität in Gesamtzell-Lysaten (= G-Lysat), beide in Units/g Protein, und wird für die jeweilige Fraktion mit einem entsprechenden Zusatz versehen, also z. B.  $F_{\text{Org}}$  für Anreicherung in der Organellen-Fraktion.

#### • Anreicherungsfaktor $F_{\text{Org}}$

In der Kontrolle beträgt  $F_{\text{Org}}$  für Cathepsin B 2,7, für die Cathepsine L+S dagegen 5,3, d. h. fast das Doppelte. Bis zur Na-MCA-Konzentration von 400  $\mu\text{g/ml}$  fällt  $F_{\text{Org}}$  für die Cathepsine L+S ab auf 14,6 % der Kontrolle, für Cathepsin B auf 54,3 % der Kontrolle, d. h. mit zunehmender Na-MCA-Dosis nimmt der Anreicherungsfaktor  $F_{\text{Org}}$  für die Cathepsine L+S stärker ab als für Cathepsin B (Tab. 4).

#### • Anreicherungsfaktor $F_{\text{Cyt}}$

Der Einheitlichkeit wegen wird auch für den Quotienten aus cytosolischer Cathepsinaktivität und Aktivität im Gesamtzell-Lysat der Begriff der „Anreicherung“ verwendet, obwohl es sich hier durchweg um Werte kleiner als eins handelt.

Wie in 3.2.1.1 beschrieben lässt sich für konfluente A-498-Zellen ein überwiegendes „Populationssterben“ bei Na-MCA-Konzentrationen über 100  $\mu\text{g/ml}$  beobachten. Lyse der Organellen mit „Auslaufen“ der Enzyme ins Zytosol gilt als einer der Prozesse des nekrotischen Zelluntergangs. Dieses „Auslaufen“ der Cathepsine aus den Lysosomen könnte Abfall (Cats L+S) bzw. Konstanz (Cat B)

von  $F_{Org}$  bei gleichzeitigem Anstieg von  $F_{Cyt}$  bei Na-MCA-Dosen zwischen 100 und 400  $\mu\text{g/ml}$  erklären (Tab. 4).

**Tab. 4: Anreicherung der Aktivitäten der Cathepsine B bzw. L+S in Organellen- und Cytosol-Fractionen**

Errechnet aus Cat-Aktivitäten-MV aus  $n = 4$  (Org und G-Lysat) bzw.  $n = 2$  (Cyt) unabhängigen Bestimmungen

F = Anreicherungsfaktor

Na-MCA [ $\mu\text{g/ml}$ ]	F Org		F Cyt	
	B	L+S	B	L+S
0 (Kontr.)	2,69	5,33	0,09	0,13
25	1,97	3,22	0,10	0,06
100	1,42	3,02	0,15	0,07
400	1,46	0,78	0,50	0,60

**3.2.2.3 Cathepsinaktivitäten in der Organellen-Fraktion**

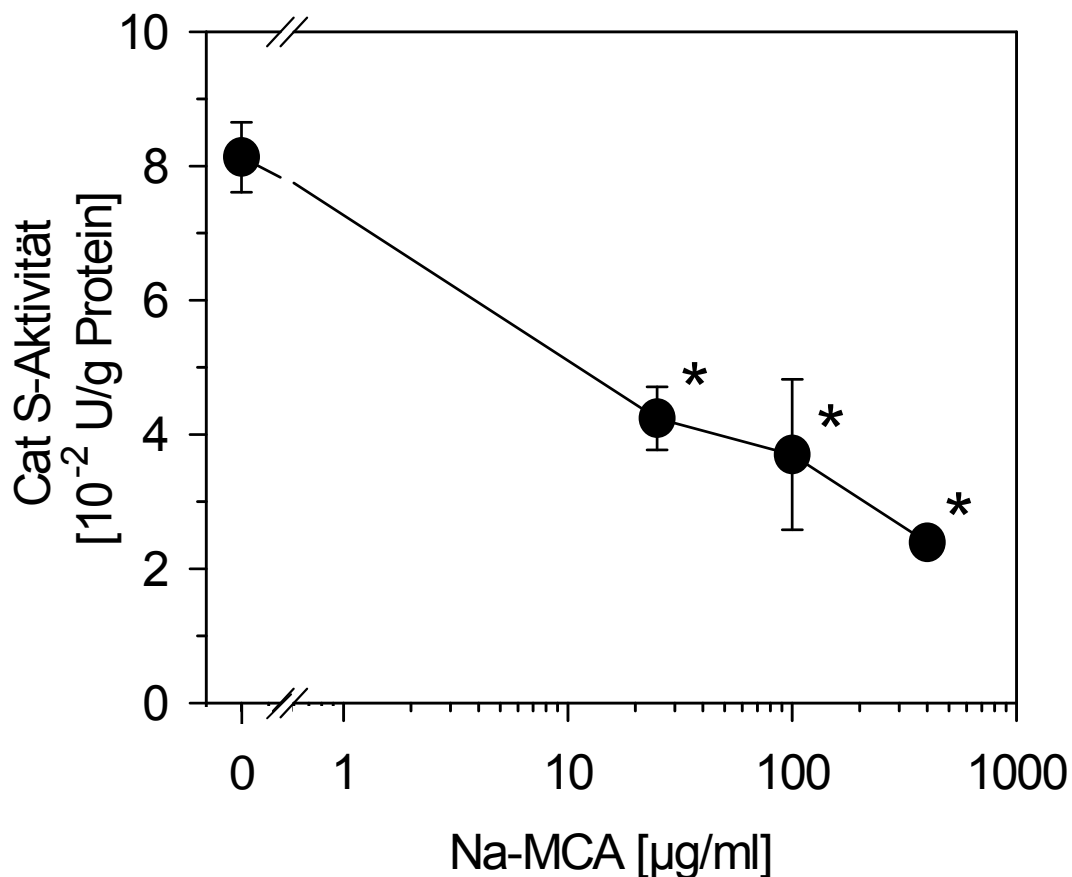
Beschrieben werden die spezifischen Aktivitäten in  $\mu\text{mol}/(\text{min} \times \text{g Protein}) = \text{Units/g Protein}$ .

Die Anreicherung der Cathepsine in der Organellenfraktion bei gleichzeitigem Fehlen cytosolischer Inhibitoren ermöglicht die Bestimmung der Cat S-Aktivität mit tolerablen Standardabweichungen. In den Kontrollzellen lag die absolute Cat S-Aktivität bei 0,08 Units/g Protein. Setzt man diesen Wert gleich 100 %, so misst man bis zur Na-MCA-Dosis von 400  $\mu\text{g/ml}$  eine kontinuierliche Aktivitätsabnahme auf aber immerhin noch 29,4 % der Kontrolle (Abb. 12).

Im Unterschied dazu beobachtet man für die Cathepsine L+S eine Aktivitätsabnahme auf 4,4 % und für Cathepsin B sogar auf nur noch 1,2 % der Kontrolle bei 400  $\mu\text{g/ml}$  Na-MCA (s. Abb. 11 und 10).

In den Organellen bestimmbare Cat S-Aktivität reagiert also auf zunehmende Na-MCA-Konzentrationen mit einem im Vergleich zu den Cathepsinen B und L+S stark abgeschwächten bzw. verzögerten Aktivitätsrückgang. Bis zur Na-MCA-Konzentration von 400  $\mu\text{g/ml}$  nimmt die Cat B-Aktivität fast 4 mal stärker ab als die Aktivität der Cathepsine L+S, und letztere wiederum fast 7 mal stärker als die Cat S-Aktivität.

Vergleicht man die Aktivitätsabnahme unter Na-MCA in den Organellen mit jener in Gesamtzell-Homogenat bzw. -Lysat, dann fällt auf, dass bei 400 µg/ml Na-MCA die Aktivitätswerte in % der Kontrolle für Cathepsin B durchweg um 2 % liegen. Anders stellt sich dies für die Cathepsine L+S dar: Während die spezifische Aktivität bei 400 µg/ml Na-MCA in den Organellen wie beschrieben 4,4 % der Kontrolle beträgt, macht sie im Gesamtzell-Homogenat bzw. -Lysat ca. 30 % der Kontrolle aus.

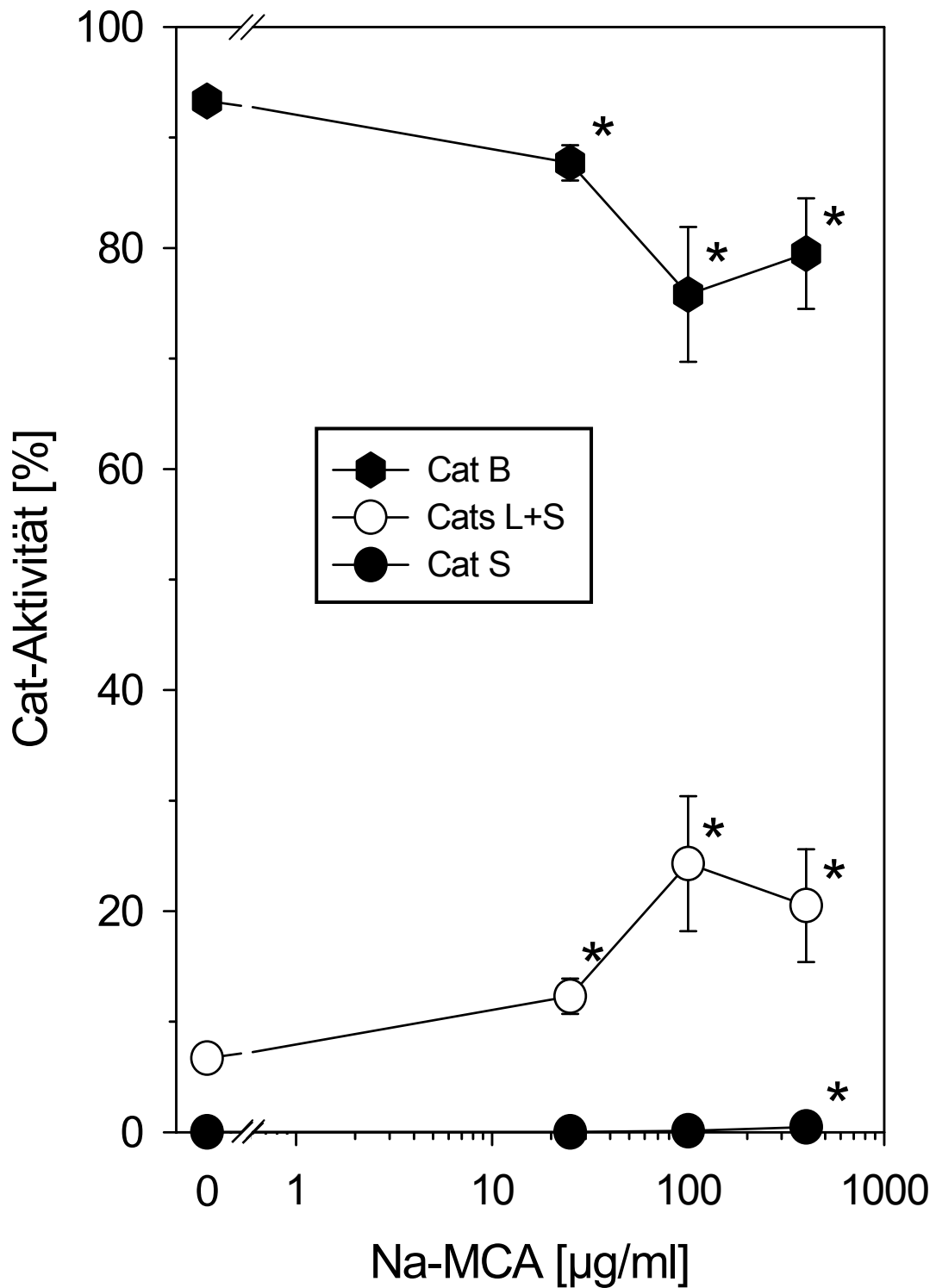


**Abb. 12: Cat S-Aktivitäten in Organellen-Fractionen konfluenter A-498-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Na-MCA**

MV ± SD; im Student's t-Test mit n = 2 \* = p < 0,05; pro Na-MCA-Konzentration zwei unabhängige Aktivitätsbestimmungen, die als Doppelbestimmungen ausgeführt wurden

### 3.2.2.4 Cat-Aktivitäten in % der Cat B+L+S-Gesamtaktivität

Eine gute Möglichkeit, die Aktivitäten der Cathepsine B, L und S miteinander zu vergleichen, ist ihre Darstellung in % der Cat B+L+S-Aktivität (Abb. 13).



**Abb. 13: Prozentualer Anteil der einzelnen Cathepsine an der 100 % gesetzten Cat B+L+S-Aktivität [U/g Protein] in Organellen-Fractionen konfluenter A-498-Zellen unter ansteigender Na-MCA-Dosis**

MV ± SD; im Student's t-Test mit n = 4 bzw. n = 2 \* = p < 0,05; vier (Cat B sowie Cats L+S) bzw. zwei (Cat S) unabhängige Aktivitätsbestimmungen, die jeweils als Doppelbestimmungen ausgeführt wurden

In den Kontroll-Organellen (= Organellen-Fraktion unbehandelter Zellen) beträgt der Anteil an der Gesamtaktivität für Cathepsin S 0,02 %, für die Cathepsine L+S 6,7 % und für Cathepsin B 93,3 %.

Wie in 3.2.1.3 für Gesamtzell-Lysate beschrieben, so ist auch in den Organellen mit zunehmender Na-MCA-Dosis für Cathepsin B eine anteilige Aktivitätsabnahme auf 79,5 % der Cat B+L+S-Aktivität bei 400 µg/ml Na-MCA und für die Cathepsine L+S eine anteilige Zunahme auf 20,5 % der Gesamtaktivität, also das Dreifache des Anteils in der Kontrolle, zu verzeichnen. Der Anteil der Cat S-Aktivität nimmt unter Na-MCA-Anstieg noch stärker zu als der L+S-Anteil und zwar auf 0,49 % der Gesamtaktivität bei 400 µg/ml Na-MCA, das ist das 21fache des Anteils in Kontroll-Organellen.

### **3.3 Untersuchungen an proliferierenden A-498-Zellen**

Die 24 Stunden in Eagle's MEM inkubierten, also proliferierenden A-498-Zellen wurden wie die (der in vivo-Situation näheren) konfluenten Zellen 24 Stunden lang steigenden Na-MCA-Konzentrationen ausgesetzt und zu Gesamtzell-Lysaten aufgearbeitet.

Da bereits bei Na-MCA-Konzentrationen größer 100 µg/ml mit der Roti<sup>®</sup>-Nanoquant-Methode kein Zellprotein mehr nachweisbar war, wurden Zytotoxizitätsprüfungen bzw. Zellprotein- und Cathepsinaktivitäten-Bestimmungen lediglich an zwei bzw. einer Passage(n) vorgenommen (mit je zwei Zellkulturen pro Na-MCA-Konzentration, jeweils als Doppelbestimmung pro Zellkultur). Aus diesem Grund soll das Augenmerk vorzugsweise auf tendenzielle Unterschiede zu den konfluenten A-498-Zellen und weniger auf absolute Zahlenwerte gerichtet werden.

#### **3.3.1 Zytotoxizitätstests**

Die Wachstumsrate proliferierender A-498-Zellpopulationen ohne Na-MCA-Zusatz beträgt 1,16 PD/Tag. Das bedeutet, dass sich proliferierende Populationen in knapp einem Tag verdoppeln.

Nur bis 25 µg/ml Na-MCA weisen proliferierende Populationen höhere Wachstumsraten auf als konfluente, bei darüber hinausgehenden Konzentrationen verhält es sich umgekehrt (Tab. 5).

Proliferierende Zellverbände zeigen beginnendes „Populationssterben“ schon jenseits 50 µg/ml Na-MCA mit einer ED<sub>50</sub> bei ca. 46 µg/ml, während in konfluenten Populationen der Zelltod erst oberhalb 100 µg/ml Na-MCA dominiert (Tab. 5).

**Tab. 5: Wachstumsraten, Zellzahl und Proteingehalt proliferierender und konfluenter A-498-Zellen im Vergleich (Messungen in Gesamtzell-Lysaten)**

MV ± SD; prolif. A-498: n = 4 (Wachstumsrate bzw. Zellzahl), n = 2 (Zellprotein) und konfl. A-498: n = 10 (Wachstumsrate bzw. Zellzahl), n = 8 (Zellprotein) unabhängige Bestimmungen

■ = Zelltod übersteigt Zellproliferation; \* = Zellhypertrophie; n. n. = nicht nachweisbar

Na-MCA [µg/ml]	Prolif. A-498		Konfl. A-498	
	Wachstums- rate [PD/Tag] <i>Zellzahl [<math>\times 10^4</math>]</i>	Zellprotein [ $10^{-10}$ g /Zelle]	Wachstums- rate [PD/Tag] <i>Zellzahl [<math>\times 10^4</math>]</i>	Zellprotein [ $10^{-10}$ g /Zelle]
0	1,16 ± 0,26 54,63 ± 13,41	0,93 ± 0,22	0,67 ± 0,18 232,03 ± 21,60	2,27 ± 0,28
10	1,41 ± 0,26 64,88 ± 15,93	1,17 ± 0,12	0,85 ± 0,18 268,75 ± 11,83	1,91 ± 0,15
25	1,15 ± 0,14 55,75 ± 20,55	0,96* ± 0,32	0,68 ± 0,21 239,50 ± 37,22	2,12 ± 0,10
50	0,46 ± 0,23 35,00 ± 13,71	1,13* ± 0,11	0,60 ± 0,08 227,38 ± 26,99	2,12 ± 0,28
100	-1,27 ± 1,47 2,88 ± 3,33	0,83	0,36 ± 0,28 192,63 ± 19,00	2,59* ± 0,09
200	-2,14 ± 2,47 0,88 ± 1,03	n. n.	-0,14 ± 0,27 135,88 ± 15,67	3,06* ± 0,09
400			-0,51 ± 0,80 113,13 ± 39,88	2,39* ± 0,06

Genauer beziffern lässt sich die größere Na-MCA-Empfindlichkeit proliferierender A-498-Zellen durch die vergleichende Überlebensrate Q1; diese ist folgendermaßen definiert:

$$Q1 = \frac{\text{Prozentsatz an konfluenten Zellen}}{\text{Prozentsatz an proliferierenden Zellen}}$$
, wobei die 100 % gesetzte Kontrolle als Bezugsgröße fungiert.

Folglich hat Q1 in der Kontrolle den Wert 1 und nimmt mit steigender Na-MCA-Expositionsdosis kontinuierlich zu auf über 36 bei 200 µg/ml. Das heißt, dass proliferierende A-498-Zellen durch Na-MCA der Konzentration 200 µg/ml über 36-mal stärker geschädigt werden als konfluente A-498-Zellen (Tab. 6).

**Tab. 6: Vergleichende Überlebensrate Q1**

Q1 beschreibt, um welchen Faktor proliferierende A-498-Zellen mehr durch Na-MCA geschädigt werden als konfluente A-498-Zellen; als Bezugsgröße dienen die unbehandelten Kontrollzellen.

Errechnet aus Zellzahl-MV aus n = 10 (konfl. A-498) bzw. n = 4 (prolif. A-498) unabhängigen Bestimmungen

Na-MCA [µg/ml]	0	10	25	50	100	200
Q1	1	0,98	1,01	1,53	15,81	36,6

**3.3.2 Zellprotein**

Proliferierende A-498-Zellen wiesen einen im Schnitt nur etwa halb so großen Proteingehalt auf wie konfluente Zellen, und zeigten bereits bei Na-MCA-Konzentrationen über 50 µg/ml ein Absinken ihres Eiweißgehalts unter den Kontrollwert; bei 200 µg/ml Na-MCA war dann mit der Roti<sup>®</sup>-Nanoquant-Methode kein Zellprotein mehr nachweisbar.

In konfluenten A-498-Zellen dagegen lag der Proteingehalt sogar bei 400 µg/ml Na-MCA noch über der Kontrolle (s. Tab. 5).



### 3.3.3 Cathepsinaktivitäten

Während proliferierende A-498-Zellen in Vitalität (Zellzahl bzw. Wachstumsrate) und Proteingehalt durch steigende Na-MCA-Konzentrationen stärker beeinträchtigt werden als konfluente Zellen, verhält es sich bezüglich der Cathepsinaktivitäten genau umgekehrt: Der kontinuierlichen Abnahme der Cat B+L+S-Aktivität pro Zelle (Units/Zelle) in konfluenten Populationen steht eine kontinuierliche Aktivitätszunahme in proliferierenden Populationen gegenüber (Abb. 14). Gibt man außerdem die Cathepsinaktivitäten proliferierender A-498-Zellen in Prozent der entsprechenden Aktivitäten konfluenter Zellen an, dann ist sowohl für Cathepsin B als auch für die Cathepsine L+S unter Na-MCA-Anstieg eine stetige Zunahme zu verzeichnen, und zwar sowohl der aus Units/Zelle als auch der aus Units/g Protein ermittelten Prozentwerte (Tab. 7).

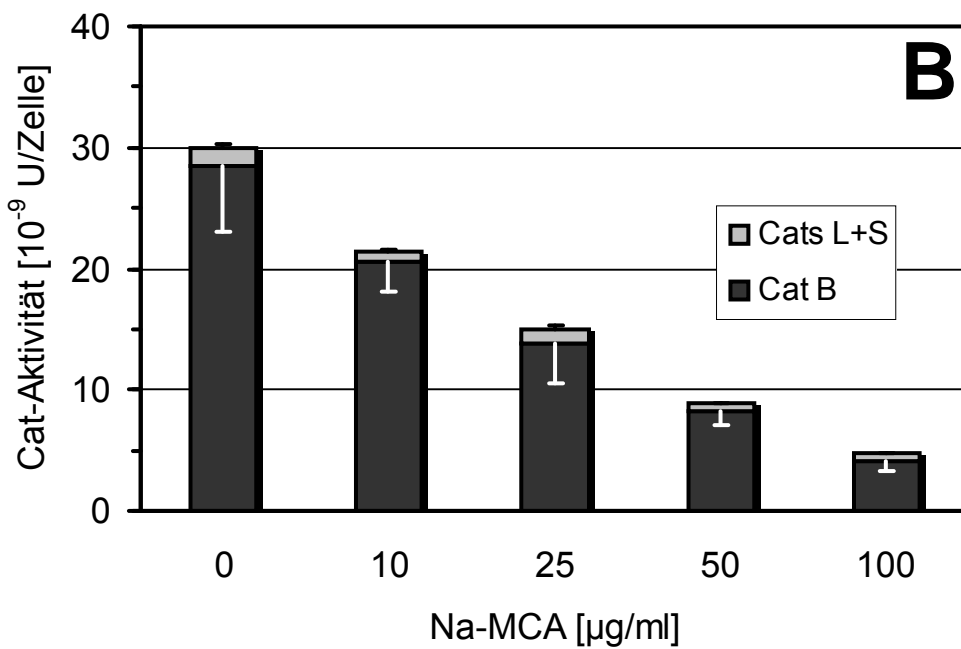
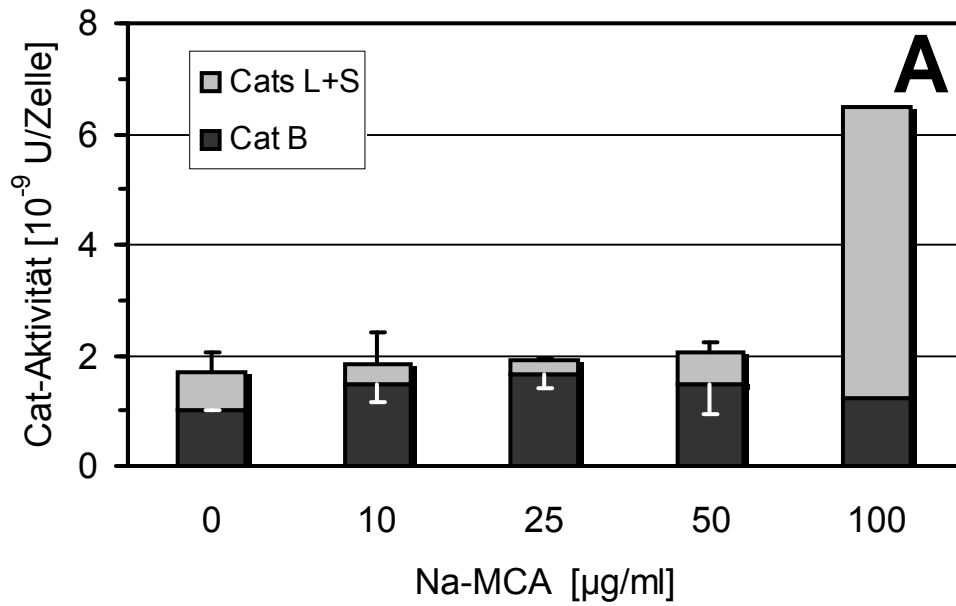
**Tab. 7: Aktivitäten der Cathepsine B und L+S in proliferierenden A-498-Zellen in % der Aktivitäten in konfluenten A-498-Zellen**

Prozentwert errechnet aus Cat-Aktivitäten-MV in U/Zelle (U/g Protein)

Cat-Aktivitäten-MV aus n = 4 (prolif. A-498) bzw. n = 16 (konfl. A-498) unabhängigen Doppelbestimmungen

Na-MCA [µg/ml]	0	10	25	50	100
B [%]	3,52 (8,87)	7,24 (11,09)	11,99 (27,11)	17,70 (32,76)	29,85 (90,23)
L+S [%]	44,83 (115,54)	91,76 (114,53)	56,30 (130,09)	179,66 (344,36)	1426,56? (4299,61?)

Vergleicht man die prozentualen Anteile der Cathepsine B sowie L+S an der Gesamtaktivität in proliferierenden und konfluenten A-498-Zellen, so fällt auf, dass in proliferierenden Zellen über alle Na-MCA-Konzentrationen hinweg der Anteil von Cathepsin B an der Gesamtaktivität geringer, der Anteil der Cathepsine L+S aber höher ausfällt als in konfluenten A-498-Zellen. Dagegen findet man in proliferierenden wie in konfluenten Zellen mit steigender Na-MCA-Dosis für die Cathepsine L+S eine anteilige Aktivitätszunahme bei anteiliger Abnahme der Cat B-Aktivitäten (Abb. 14).



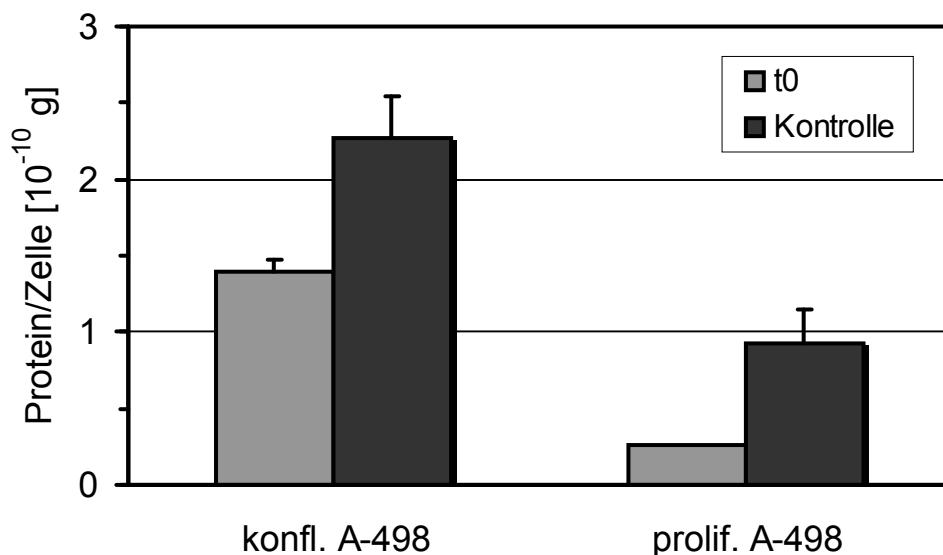
**Abb. 14: Cathepsinaktivitäten in proliferierenden (A) und konfluenten A-498-Zellen (B) (Messung in Gesamtzell-Lysaten) unter 24-stündiger Na-MCA-Exposition im Vergleich**

MV  $\pm$  SD (prolif. A-498-Zellen) bzw. MV  $\pm$  SEM mit n = 4 (konfl. A-498-Zellen); eine (prolif. A-498) bzw. vier Passagen (konfl. A-498) mit je zwei Zellkulturen pro Na-MCA-Dosis und zwei unabhängigen Aktivitätsbestimmungen mittels Doppelproben pro Zellkultur – also MV aus acht (prolif. A-498) bzw. 32 (konfl. A-498) Cathepsinaktivitäten

### 3.4 Vergleich der Kontrollzellen mit den Zellen vor Beginn der Behandlung mit Na-MCA (sog. t<sub>0</sub>-Zellen)

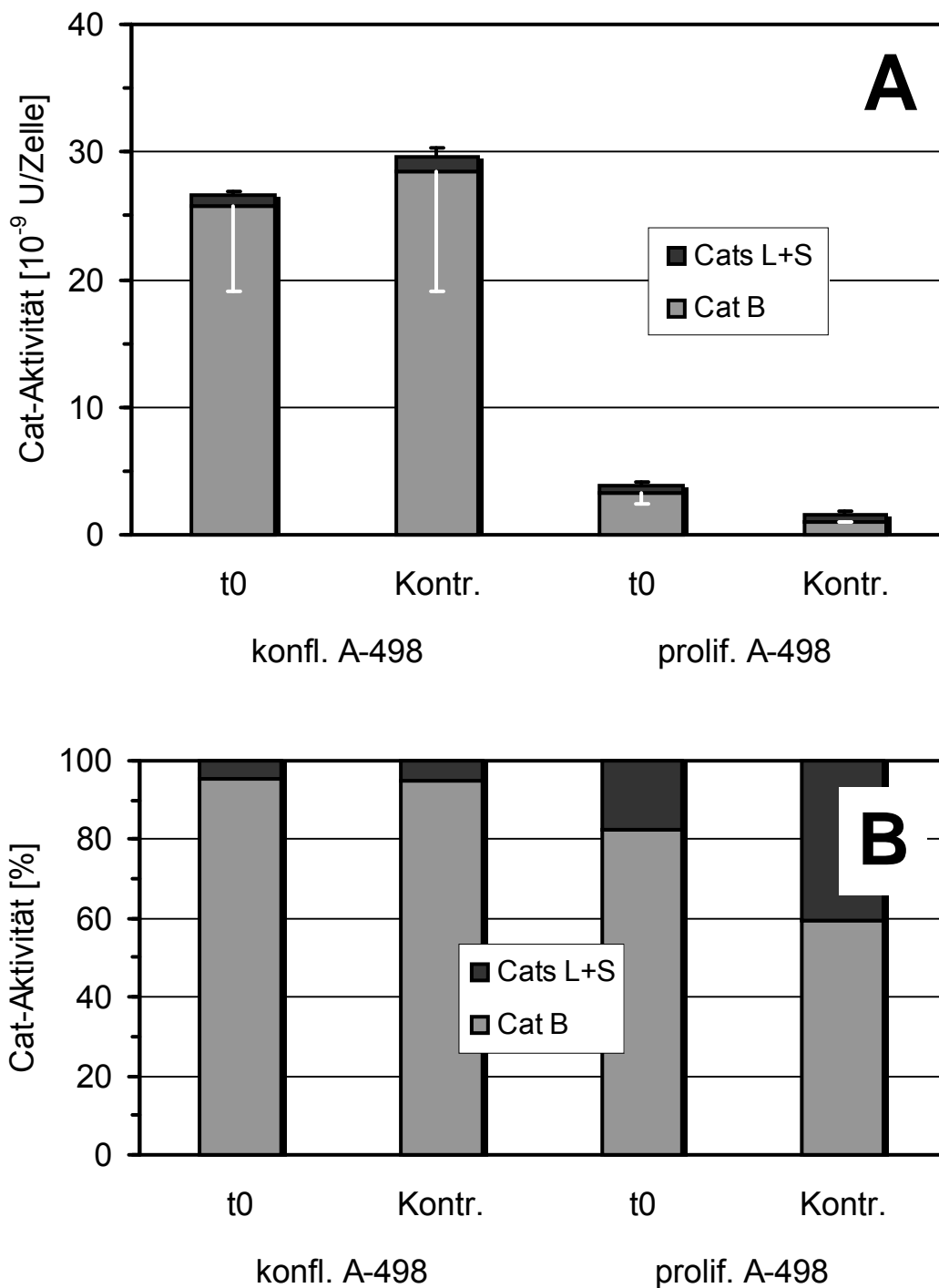
Bisher wurden die Auswirkungen 24-stündiger Inkubation mit Na-MCA dargestellt. Im Folgenden soll untersucht werden, wie sich Wachstum, Proteingehalt und Cathepsinaktivitäten unbehandelter, d. h. ohne Na-MCA-Zusatz inkubierter A-498-Zellen innerhalb von 24 Stunden (nach Mediumwechsel) verändern. Es werden also verglichen sog. t<sub>0</sub>-Zellen (vgl. Material und Methoden 2.6.1) mit 24 Stunden länger inkubierten Kontrollzellen. Bei den t<sub>0</sub>-Zellen handelt es sich um einen Tag kultivierte, d. h. proliferierende bzw. drei Tage inkubierte, d. h. optisch konfluente A-498-Zellen.

Wie zu erwarten führt die 24-stündige Weiterinkubation dazu, dass die Zellen sich vermehren und vergrößern, d. h. ihren Proteingehalt erhöhen. Dabei teilen sich die proliferierenden Zellen fast doppelt so oft wie die optisch konfluenten und nehmen mehr als doppelt so rasch an Protein und damit Volumen zu (Abb. 15).



**Abb. 15: Proteingehalt optisch konfluenter und proliferierender A-498-Zellen (Messung in Gesamtzell-Lysaten) vor (t<sub>0</sub>) und nach (Kontrolle) 24-stündiger (Weiter)Inkubation ohne Na-MCA**

MV ± SD; n = 8 (konfl. A-498) bzw. n = 2 (prolif. A-498) unabhängige Bestimmungen



**Abb. 16: Cathepsinaktivitäten pro Zelle (A) bzw. prozentualer Anteil an der 100 % gesetzten Cat B+L+S-Aktivität (B) in optisch konfluenten und proliferierenden A-498-Zellen (Messungen in Gesamtzell-Lysaten) vor (t0) und nach (Kontrolle) 24-stündiger (Weiter)Inkubation ohne Na-MCA**

MV ± SD (prolif. A-498-Zellen) bzw. MV ± SEM mit n = 4 (konfl. A-498-Zellen); eine (prolif. A-498) bzw. vier Passagen (konfl. A-498) mit je zwei Zellkulturen pro Na-MCA-Dosis und zwei unabhängigen Doppelbestimmungen pro Zellkultur – also MV aus acht (prolif. A-498) bzw. 32 (konfl. A-498) Cathepsinaktivitäten

Die Cat B+L+S-Gesamtaktivität pro Zelle (Units/Zelle) beträgt in proliferierenden t0-Zellen nur 15 % der in konfluenten t0-Zellen bestimmten Gesamtaktivität. Während weiterer 24 Stunden in Kultur nimmt die Gesamtaktivität in optisch konfluenten Zellen um 10 % zu, in proliferierenden dagegen um mehr als die Hälfte ab (Abb. 16 A).

Der prozentuale Anteil der Cat B-Aktivität an der Cat B+L+S-Aktivität liegt in optisch konfluenten Zellen auch nach 24 Stunden unverändert bei 95 %, in proliferierenden Zellen dagegen nimmt dieser Anteil von 82 % auf 60 % ab (Abb. 16 B).

Der Aktivitätsanteil der Cathepsine L+S an der Gesamtaktivität beläuft sich in proliferierenden t0-Zellen auf knapp das Vierfache gegenüber optisch konfluenten t0-Zellen. Innerhalb 24-stündiger Weiterkultivierung lässt sich in proliferierenden Zellen eine Anteilszunahme auf das 2,7fache ausmachen, während der prozentuale Anteil in optisch konfluenten Zellen gleichbleibend um 3–4 % misst (Abb. 16 B).

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Vorversuche zu den Zellkulturbedingungen

#### 4.1.1 Serum-Konzentration und lysosomale Proteolyse

Das dem Zellkulturmedium zugesetzte Serum, hier fetales Kälberserum (FCS), ist eine chargenabhängige Mischung verschiedener wachstumsfördernder Substanzen. An Cysteinproteasen-Inhibitoren enthält es v. a. Kininogene (= Familie 3-Cystatine) und Cystatine (= Familie 2-Cystatine). Das Serum ist erhältlich in hitzeinaktivierter wie auch in nicht-hitzeinaktivierter Form. Die 30-minütige Hitzeinaktivierung bei 56 °C, die der Zerstörung von Komplementfaktoren dient, führt auch zur Inaktivierung zumindest eines Teils der Kininogene (Friedrich, 1999). Als FCS-Gesamtwirkung wird eine Hemmung des Proteinabbaus in Lysosomen beobachtet (Wharton und Riley, 1986; Polet und Swager, 1987), wobei laut Polet und Swager (1987) sowohl im Serum enthaltene als auch auf Serumstimulation hin in den Zellen gebildete Wachstumsfaktoren diese Hemmung vermitteln. Im umgekehrten Fall einer Serum-Reduktion ist demzufolge mit einem Anstieg der lysosomalen Proteolyse und damit der Aktivitäten der Cathepsine (Cat-Aktivitäten) als der wichtigsten lysosomalen Proteasen zu rechnen (Bradley, 1977; Fuertes et al., 2003; Hendil et al., 1990; Schröter, 1999; Warburton und Poole, 1977; Wharton und Riley, 1986). Dieser durch Serum-Entzug ausgelöste Anstieg der proteolytischen Kapazität ist aber nur vorübergehend und wird (in IMR90 menschlichen Fibroblasten nach etwa 24 Stunden) von einem Rückgang abgelöst (Berger und Dice, 1986; Slot et al., 1986). Der Zeitpunkt des „Umkippen“ von Steigerung in Senkung der Proteolyse-Kapazität ist vermutlich sowohl von der Zellart als auch dem Wachstumszustand (proliferierend oder konfluent, d. h. ruhend) der Zellen abhängig.

In der vorliegenden Arbeit wurden *proliferierende* A-498-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an hitzeinaktiviertem FCS (zwischen 0 % und 10 %) 24 Stunden lang inkubiert. Anschließend wurden der Proteingehalt sowie die

spezifischen Cat B+L+S- sowie Cat B-Aktivitäten (im jeweiligen Gesamtzell-Lysat) bestimmt. Je geringer die FCS-Konzentration gewählt wurde, desto niedriger maß das Zellprotein. Die Cat-Aktivitäten (in Units) pro g Protein hingegen zeigten für alle FCS-Konzentrationen den gleichen Wert. Zu einem entsprechenden Ergebnis kommen Ronning et al. (1981) für NHIK 3025-Zellen. Sie untersuchten die Auswirkungen einer Serumreduktion von 30 % auf 3 % auf proliferierende NHIK 3025-Zellen des Menschen und stellten eine unveränderte Proteolyserate fest. Darüber hinaus maßen Ronning et al. (1981) eine unter Serumreduktion verminderte Proteinsyntheserate. Letztere würde die Zellprotein-Abnahme in den proliferierenden A-498-Zellen der vorliegenden Arbeit erklären.

Den Einfluss einer Serumreduktion (von 10 % auf 1 % FCS) auf *konfluente* Zellen beschreiben Schmid et al. (2004 a): Sie fanden für N11-Zellen (Mikrogliazelllinie der Maus) praktisch unveränderte, für RAW 264.7-Zellen (Makrophagenzelllinie der Maus) hingegen beinahe halbierte Cat B-Aktivitäten (U/g Protein), wobei (im Unterschied zu vorliegender Arbeit) nicht-hitzeinaktiviertes FCS zum Einsatz kam.

Wie oben ausgeführt erwiesen sich die in Units pro g Protein bestimmten Cat-Aktivitäten der hier untersuchten proliferierenden A-498-Zellen als unabhängig von der FCS-Konzentration. Ganz anders die (in Units) pro Zelle gemessenen Cat-Aktivitäten: sie fielen umso niedriger aus, je geringer die eingesetzte FCS-Konzentration war. In proliferierenden A-498-Zellen scheint also nach 24-stündiger Serum-Reduktion der anfängliche Proteolyse-Anstieg bereits dem Proteolyse-Rückgang (unter den Ausgangswert) gewichen zu sein. Die trotz abnehmender FCS-Konzentration gleichbleibenden Cat-Aktivitäten (in Units) pro g Protein sind dann plausibel, wenn der Rückgang der Proteinsynthese pro Zelle genauso stark ausfällt wie der Rückgang des lysosomalen Proteinabbaus. Möglicherweise hängen Ausmaß und im Extremfall Art der Serumwirkung auf Cat-Aktivitäten auch ab von der jeweiligen FCS-Charge mit wechselndem Verhältnis von Proteolyse-hemmenden (z. B. die oben genannten Kininogene und Cystatine) zu -steigernden Serumfaktoren (z. B. LPS, welches die Cat B-Aktivität stimuliert (Li et al., 1997)).

### **4.1.2 Kulturmedium und Cathepsin-Aktivitäten**

Proteinmenge pro Zelle sowie Cat B+L+S- und Cat B-Aktivitäten pro Zelle lagen bei Kultivierung in RPMI 1640 über alle FCS-Konzentrationen hinweg um durchschnittlich 50 % höher als in MEM.

In RPMI 1640 als nährstoffreicherem Medium für anspruchsvollere Zellen scheinen alle Zellstoffwechselfvorgänge, anabolische (wie cytosolische Proteinsynthese) wie katabolische (wie durch Cats vor allem bewerkstelligte lysosomale Proteolyse), um etwa die Hälfte schneller abzulaufen als in MEM mit seiner einfacheren Formulierung (Morgan und Darling, 1994). Da Proteingehalt und Cat-Aktivitäten pro Zelle in RPMI 1640 um den gleichen prozentualen Anteil höher liegen als in MEM, zeigen die pro g Protein bestimmten Aktivitäten für RPMI 1640 und MEM logischerweise übereinstimmende Werte. Für die folgenden Untersuchungen wurde (deshalb) das auch von Vertreibern der A-498-Zellen (DSMZ, Invitrogen) empfohlene „einfachere“ Kulturmedium MEM, supplementiert mit 10 % FCS verwendet.

## **4.2 Zytotoxizität**

Untersucht wurde die 24-Stunden-Toxizität von Na-MCA auf A-498-Zellen, das sind aus einem menschlichen Nierenkarzinom etablierte epithelähnliche Zellen, bei denen es sich aufgrund ihrer Cathepsinaktivitäten um proximale Tubuluszellen handeln soll (Schmid et al., 2004 b). A-498-Zellen reagieren unabhängig von ihrem Wachstumszustand (proliferierend oder optisch konfluent) auf zunehmende Dosen Na-MCA – nach nicht-signifikantem Anstieg der Zellzahl bzw. Wachstumsrate bis 25 µg/ml Na-MCA – mit stetiger Abnahme der Zellvitalität. Entsprechendes dosisabhängiges Vitalitäts-Verhalten zeigen auch OK-Zellen (Opossum kidney-Zellen), das sind permanente epithelähnliche Nierenzellen aus dem proximalen Tubulus vom Opossum (Dartsch et al., 2000; Koyama et al., 1978; Schiek, 2001). OK-Zellen eignen sich aus mehreren Gründen besonders gut zum Vergleich mit A-498-Zellen, denn beide sind etablierte proximale Tubuluszellen und zeigen ein vergleichbares Proliferationsverhalten: Beide Zelllinien



wachsen mit 1,2 PD/Tag und erreichen nach etwa drei Tagen optische Konfluenz (Dartsch et al., 2000; Schiek, 2001). Auch der Speziesunterschied mindert nicht die Vergleichbarkeit der beiden Zelllinien, da für letale MCA-Effekte eine geringe Interspeziesvariabilität kennzeichnend ist (AEGs, 2001). Der Zelltod proximaler Tubuluszellen durch Na-MCA lässt sich erklären sowohl durch pH-Abfall des Kulturmediums im Rahmen der metabolischen Azidose (gesteigerte Sekretion des intrazellulär kumulierten Lactat und Pyruvat (Dartsch et al., 2000)) als auch durch hochgradigen ATP-Verlust: Man hat beobachtet, dass viele Zelltypen in Kulturmedien mit pH unter 6,8 innerhalb 24 Stunden absterben (Paul, 1980); dies könnte auch für permanente proximale Tubuluszellen gelten. Ferner hat man herausgefunden, dass ausgeprägte ATP-Verluste durch nephrotoxische Substanzen zum nekrotischen Zelluntergang in proximalen Tubuli führen (Leist und Nicotera, 1997; Lieberthal und Levine, 1996). Die Na-MCA-Empfindlichkeit von Zellen lässt sich beschreiben durch die  $ED_{50}$ , also die Dosis Na-MCA, welche zu einem Vitalitätsverlust von 50 % der Zellen führt. Sie beträgt für optisch konfluente A-498-Zellen 105  $\mu\text{g/ml}$  und entspricht somit fast genau der  $ED_{50}$  von optisch konfluenten OK-Zellen mit 110  $\mu\text{g/ml}$ . Auch in beiden Zelllinien messbar ist eine geringere Na-MCA-Empfindlichkeit konfluenter Zellen (erkennbar an höherer  $ED_{50}$ ) im Vergleich mit proliferierenden. Dies entspricht der von Dartsch et al. (2000) geäußerten Vermutung, dass eine höhere Wachstumsrate von Nierenepithelzellen auch eine höhere Na-MCA-Empfindlichkeit bedingt. Allerdings ist der Empfindlichkeits-Unterschied zwischen proliferierenden und konfluenten Zellen für OK-Zellen größer als für A-498-Zellen; dies zeigen die unterschiedlichen vergleichenden Überlebensraten Q1: Proliferierende OK-Zellen werden durch 200  $\mu\text{g/ml}$  Na-MCA über 50 mal stärker geschädigt als konfluente, während Q1 für A-498-Zellen nur etwas über 36 beträgt. Diesem zugrunde liegt die fast doppelt so große Na-MCA-Empfindlichkeit proliferierender OK-Zellen ( $ED_{50} = 25 \mu\text{g/ml}$  Na-MCA) gegenüber proliferierenden A-498-Zellen ( $ED_{50} = 46 \mu\text{g/ml}$  Na-MCA). Wieso aber sind in der log-Phase A-498-Zellen weniger Na-MCA-empfindlich als OK-Zellen – trotz bekanntlich geringer Interspeziesvariabilität und gleicher basaler Wachstumsrate (PD/Tag)? Eine mögliche Erklärung liegt in der kanzerösen Natur der

A-498-Zellen. So haben Williamson et al. (1970) beschrieben, dass in Nierentumoren die anaerobe Glykolyse ausgeprägter und stärker steigerbar ist als in gesunden Nieren, so dass folglich erst höhere Na-MCA-Konzentrationen zu bedeutsamen ATP-Verlusten führen sollten. Dies könnte auch für A-498-Zellen gelten im Unterschied zu den nicht-tumorösen OK-Zellen. Möglich ist aber auch, dass proliferierende A-498-Zellen Na-MCA in größerem Umfang mit reduziertem Glutathion konjugieren – und damit entgiften – können als proliferierende OK-Zellen. Denn reduziertes Glutathion lässt seine SH-Gruppe von MCA alkylieren und verhindert dadurch eine Alkylierung anderer Thiolgruppen wie jener in den aktiven Zentren der Cathepsine (Bruschi und Bull, 1993).

## 4.3 Zellprotein

### 4.3.1 Konfluente A-498-Zellen

*Bis ca. 50 µg/ml* Na-MCA misst man in konfluenten A-498-Zellen eine gegenüber der Kontrolle nicht signifikante Zellprotein-Verminderung. Parallel dazu beschreibt Schiek (2001) für entsprechend behandelte ruhende OK-Zellen eine Zellvolumen-Abnahme bei Konzentrationen unter 200 µg/ml. Zellprotein-Abnahme mit Zellschrumpfung unter geringen Dosen einer (nephro)toxischen Substanz bzw. unter geringer Absenkung des zellulären ATP-Spiegels sind Kennzeichen der Apoptose als Energie(ATP)-verbrauchender, genetisch gesteuerter Form des Zelltods (Darzynkiewicz et al., 1992; Lieberthal und Levine, 1996). Da Zellzahl bzw. Wachstumsrate konfluenter A-498-Zellen aber erst oberhalb 50 µg/ml unter den Kontrollwert sinken, findet Apoptose – wenn überhaupt – allenfalls in unbedeutendem Umfang statt.

*Jenseits* einer Na-MCA-Konzentration von *50 µg/ml bis mindestens 200 µg/ml* findet man eine signifikante Zellprotein-Zunahme einhergehend mit immer stärkerem Absinken von Zellzahl bzw. Wachstumsrate unter den Kontrollwert. Die Zellen reagieren auf Na-MCA dieses Konzentrationsbereichs also mit Hypertrophie, d. h. mit Zellprotein-Zunahme bei gleichzeitiger Zellvolumen-Zunahme. Eine Zellvolumen-Zunahme wird auch von Schiek (2001) für OK-Zellen bei Na-

MCA-Konzentrationen um 200 µg/ml beschrieben, und im BUA-Stoffbericht 127 (1994) ist die Rede von einer signifikanten Zunahme der Leber- und Nierengewichte bei Na-MCA-exponierten Ratten. Plausibel erklären lassen sich Zellprotein-Anstieg und Hypertrophie als Auswirkungen einer durch MCA induzierten metabolischen Azidose. Diese bewirkt einen Anstieg der Proteinsynthese bei gleichzeitig reduzierter renaler Proteolyseaktivität (infolge reduzierter Cats B- und L-Genexpression) sowie Nieren-Hypertrophie, wahrscheinlich aufgrund einer vorübergehenden Zunahme des renalen IGF-I Spiegels (Fawcett et al., 2000; Rabkin et al., 1996). Renale Hypertrophie kommt je nach Ursache vor als Zellzyklus-abhängige und -unabhängige Hypertrophie (Preisig und Franch, 1995). Metabolische Azidose führt zur Zellzyklus-unabhängigen Hypertrophie, für die eine Hemmung lysosomaler Enzyme charakteristisch ist (Preisig und Franch, 1995).

*Oberhalb 200 µg/ml Na-MCA* erfolgt eine Wiederabnahme des Zellproteins, welches bei der höchsten Expositionsdosis von 400 µg/ml Na-MCA fast wieder den Kontrollwert erreicht hat. „Populationssterben“ setzt bereits bei Konzentrationen über 100 µg/ml Na-MCA ein. Man hat herausgefunden, dass höhergradige Zellschädigungen (z. B. proximaler Tubuluszellen) durch hohe Dosen zytotoxischer Substanzen (z. B. Nephrotoxine wie Cisplatin) und/oder ATP-Verluste zur Zell-Nekrose führen (Leist und Nicotera, 1997; Lieberthal und Levine, 1996). Dabei soll die Dauer zwischen letaler Schädigung und Nekrose (ante- und postmortem Veränderungen) sowohl von der Zellart als auch vom schädigenden Agens abhängen (Kanduc et al., 2002). Die Nekrose ist morphologisch gegen die andere Form des Zelltods, die Apoptose, abzugrenzen, welche man eher bei niederen Schädigungsgraden findet (Leist und Nicotera, 1997; Lieberthal und Levine, 1996). Aus diesen Ausführungen kann man folgern, dass auch Na-MCA in höheren Dosen, die mit bedeutsamen ATP-Verlusten einhergehen, Zell-Nekrosen bewirkt. Nekrotische Prozesse liefern dann auch eine gute Erklärung für Zellprotein-Rückgang bei massenhaftem Zellsterben. Dabei setzen Nekrose-Vorgänge wohl schon ein bei Na-MCA-Konzentrationen über 50 µg/ml (Zellzahl sinkt unter Kontrollwert) und definieren somit auch das „Populationssterben“ oberhalb 100 µg/ml Na-MCA als ein nekrotisches durch totale Zell-Lyse. In

Reinform findet man die Nekrose aber erst jenseits 200 µg/ml Na-MCA, wenn ihre Wirkungen (z. B. Zellprotein-Abnahme) endgültig über diejenigen der metabolischen Azidose dominieren. Zu den nekrotischen Wirkungen zählt der Verlust der Plasmamembran-Integrität mit Wasserinflux und resultierender Zellschwellung sowie Auslaufen von Zellproteinen. Also könnte es sich bei dem von Schiek (2001) bei 200 µg/ml Na-MCA beobachteten Zellvolumen-Anstieg (s. o.) auch um nekrotische Zellschwellung handeln. Neben besagten Proteinen gelangen aber auch andere Zytosolbestandteile durch die undichten Membranen in den Extrazellulärraum (Lieberthal und Levine, 1996; Roche Molecular Biochemicals, 2003). Auch andere Autoren beschreiben den durch höhere Dosen Na-MCA bewirkten Untergang von Nierenzellen als nekrotisches Geschehen. Schiek (2001) beschreibt das Absterben von mit Na-MCA behandelten OK-Zellen als nekrotischen Zelltod aufgrund des morphologischen Bildes sowie elektronenmikroskopischer Untersuchungen, deren Resultate in Dartsch et al. (2000) näher ausgeführt werden: Die Ultrastruktur Na-MCA-exponierter Nierenzellen zeigt u. a. Membranzerreißung und speziell Veränderungen der Mitochondrien, die man bei Nekrose, nicht aber Apoptose findet (Lieberthal und Levine, 1996). Kulling et al. (1992) erwähnt Segmentnekrosen der Nierentubuli bei einem 38-jährigen Mann nach großflächiger dermaler MCA-Exposition (Exposition von 25 % der Körperoberfläche mit 80% iger MCA).

Mehrere Autoren haben vorgeschlagen, den Terminus „Nekrose“ auf postmortem Veränderungen zu beschränken, und Veränderungen geschädigter Zellen vom Verlust der Plasmamembranintegrität über reversible und irreversible Zellschwellung (Roche Molecular Biochemicals, 2003) bis hin zur ultimativen Zell-Lyse – in Abgrenzung zur Apoptose – „Onkose“ (von griechisch „onkos“ = „Schwellung“) zu nennen (Kanduc et al., 2002; Majno und Joris, 1995; Van Cruchten und Van Den Broeck, 2002).

### **4.3.2 Proliferierende A-498-Zellen**

Bei durchschnittlich nur halb so großem Proteingehalt reagieren proliferierende A-498-Zellen auf Na-MCA-Exposition weit früher mit Zellhypertrophie und nekrotischen bzw. onkotischen Mechanismen als konfluente A-498-Zellen.

So misst man *bis über 50 µg/ml* Na-MCA einen gegenüber der Kontrolle erhöhten Zellprotein-Gehalt, der *oberhalb 25 µg/ml* mit verminderter Zellzahl einhergeht. Hypertrophe Reaktion findet sich also bereits oberhalb 25 µg/ml Na-MCA. *Jenseits 50 µg/ml* Na-MCA zeigt sich dann schon ein Absinken des Zellproteins unter den Kontrollwert bei gleichzeitig einsetzendem Populationssterben. Dies sind die Zeichen der Nekrose bzw. Onkose mit Auslaufen des Zellproteins und ultimativer Zell-Lyse.

## 4.4 Cathepsinaktivitäten

### 4.4.1 Cathepsinaktivitäten in Gesamtzell-Lysaten

In den (optisch) konfluenten und also den *in vivo*-Verhältnissen näheren A-498-Zellen beobachtet man unter zunehmenden Na-MCA-Konzentrationen eine kontinuierliche Abnahme der Cat B- wie der Cat L(+S)-Aktivitäten, wobei Cat B einen stärkeren bzw. rascheren Aktivitäts-Rückgang aufweist, der umso stärker ausfällt, je höher die Na-MCA-Dosis gewählt wird. Zu beachten ist, dass in den hier untersuchten Gesamtzell-Lysaten die Cat L(+S)-Aktivität praktisch der Cat L-Aktivität gleichkommt, da die katalytische Aktivität von Cat S an der Nachweisgrenze liegt. Dies entspricht den Ergebnissen von Kirschke et al. (1997) für das Nierenkarzinom, die in den meisten Tumorproben keine Cat S-Aktivität messen konnten und einen Grund dafür in der engen Cystatinbindung des Cat S vermuteten (Brömme et al., 1991).

Die Reduktion der Cat-Aktivitäten durch Na-MCA geschieht wohl auf mehreren Wegen: Na-MCA bewirkt eine direkte Inhibierung der Cats durch Alkylierung ihrer SH-Gruppen im aktiven Zentrum, was allerdings *in vitro* in geringerem Umfang stattfinden soll als *in vivo*. Möglicherweise verhält sich Na-MCA dabei wie Iodacetamid, welches die Aktivität von Cat L nur schwach senkt, Cat B1 hingegen stark inhibiert (Barrett, 1973). Dies würde die oben beschriebene stärkere Abnahme der Cat B-Aktivität erklären. Die Cats-Alkylierung verhindern kann reduziertes Glutathion, indem es seine Thiolgruppe durch MCA alkylieren lässt; allerdings wird es mit ansteigender Na-MCA-Konzentration zunehmend verbraucht (Bruschi und Bull, 1993; Davis und Berndt, 1989). Neben dieser

direkten Cats-Inhibierung durch Sulfhydryl-Gruppen-Alkylierung entfaltet Na-MCA auch indirekt hemmende Wirkungen auf Cat-Aktivitäten, etwa über die Induktion einer metabolischen Azidose. Diese führt in der Niere zur Reduktion der Genexpression und damit der katalytischen Aktivität der Cats B und L (Fawcett et al., 2000; Rabkin et al., 1996), und bei starker Ausprägung mit einem  $\text{pH} \leq 3,8$  zur Denaturierung der Cats B, L und S (Lenarcic und Stoka: unveröffentlichte Befunde nach Turk et al., 2000; Turk et al., 1999).

Anders als in den konfluenten A-498-Zellen werden die Cat-Aktivitäten in den proliferierenden Zellen durch Na-MCA kaum beeinträchtigt. Für die Cats L(+S) lässt sich sogar eine kontinuierliche Aktivitäts-Zunahme (auf 180 % der Kontrolle bei 50  $\mu\text{g/ml}$  Na-MCA) beobachten. Bezüglich des Wachstumszustands der A-498-Zellen gilt also für Cat-Aktivitäten genau das Gegenteil wie für Zellvitalität und Zellprotein, für die ja in der log-Phase eine größere Na-MCA-Empfindlichkeit festgestellt wurde (s. 4.2 und 4.3). Die unterschiedlichen Wirkungen von Na-MCA auf die Cat-Aktivitäten konfluenter und proliferierender A-498-Zellen beschreibt auch der Quotient aus den Cat-Aktivitäten proliferierender Zellen durch die entsprechenden Cat-Aktivitäten konfluenter Zellen. Dieser Aktivitäten-Quotient zeigt mit zunehmender Na-MCA-Dosis einen kontinuierlichen Anstieg sowohl für Cat B als auch für die Cats L(+S).

Beim Vergleich von konfluenten und proliferierenden A-498-Zellen fällt ferner auf, dass in proliferierenden Zellen der Anteil der Cats L(+S) an der Cat B+L+S-Gesamtaktivität höher ausfällt (bei entsprechend geringerem Cat B-Anteil) als in konfluenten – und dies über alle eingesetzten Na-MCA-Konzentrationen hinweg. Eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit geht also einher mit einer relativ zur Cat B-Aktivität höheren Cat L(+S)-Aktivität.

In den Gesamtzell-Lysaten der Kontrolle betragen die Aktivitäten pro Zelle für die Cats L(+S) bzw. B  $1,2 \times 10^{-9}$  U/Zelle bzw.  $28,4 \times 10^{-9}$  U/Zelle bei Konfluenz und  $0,5 \times 10^{-9}$  U/Zelle bzw.  $1,0 \times 10^{-9}$  U/Zelle bei Proliferation. Im Zustand der Konfluenz fallen also die Cat-Aktivitäten pro Zelle höher aus. Hierfür könnte wie von Colella et al. (2002) für Prostatakarzinom-Zelllinien beschrieben eine infolge erhöhter Zelldichte verminderte CPIs-Aktivität (mit)verantwortlich sein. Dagegen verneint Bradley (1977) eine solche Abhängigkeit der Proteolyse-

rate vom Wachstumszustand kultivierter Humanzellen. Für Bradleys Ergebnisse sprechen die in U/g Protein berechneten Cat-Aktivitäten in Kontrollzellen (siehe unten), die bei Konfluenz nur für Cat B höher liegen, nicht aber für die Cats L(+S), für welche sie doch bei einer Inaktivierung der CPIs primär ansteigen müssten.

Die gerade angesprochenen Cat-Aktivitäten (U/g Protein) der A-498-Kontrollzellen betragen für die Cats L(+S) bzw. B bei Konfluenz 4,6 U/g (4 % der Cat B+L+S-Gesamtaktivität) bzw. 125,1 U/g (96 % der Gesamtaktivität) und in der log-Phase (proliferierende Zellen) 5,3 U/g (29 % der Gesamtaktivität) bzw. 11,1 U/g (61 % der Gesamtaktivität). Eine vergleichbare Aktivitätsmessung in unbehandelten A-498-Zellen findet man bei Englert (Englert, 2000; Schmid et al., 2004 b), der in Gesamtzell-Homogenaten die Cat B- und L(+S)-Aktivitäten mit der auch in vorliegender Arbeit verwendeten Methode nach Schmid et al. (1997) bestimmt hat. Allerdings stammen Englerts A-498-Zellen aus einer anderen Bezugsquelle (ATCC, Manassas VA, USA) als die der vorliegenden Arbeit (DSMZ, Braunschweig). Englert misst in A-498-Zellen (eigene Anzucht) für Cat B 19,6 U/g (63 % der Cat B+L+S-Gesamtaktivität) und für die Cats L(+S) 11,5 U/g (37 % der Gesamtaktivität). Diese Werte entsprechen in vorliegender Arbeit eher den Aktivitäten der proliferierenden als der konfluenten Zellen, insbesondere was Cat B angeht (Tab. 8). Die Cat L-Aktivität hingegen ist in den A-498-Zellen der vorliegenden Arbeit nur etwa halb so groß und dies unabhängig vom Wachstumszustand der Zellen. Eine mögliche Erklärung dafür könnten stärkere degenerative Veränderungen der A-498-Zellen vorliegender Arbeit sein. „Stärkere“ deshalb, weil bereits karzinomatöse Umwandlung von Nierenzellen, die erwiesenermaßen mit einer Absenkung der Cat-Aktivitäten einhergeht (Jung et al., 1998; Kirschke et al., 1997; Werle et al., 1994), eine degenerative Veränderung darstellt ([www.biocab.org/Apoptosis.html](http://www.biocab.org/Apoptosis.html)). In proximalen Tubuluszellen nun scheint der karzinomatös-degenerative Aktivitätsschwund vor allem Cat L zu betreffen, wie der Vergleich mit gesunden proximalen Tubuli zeigt, für die ja bekanntlich hohe Cat L-Aktivitäten charakteristisch sind (Baricos et al., 1987; Brando et al., 1986; Kirschke et al., 1997; Qian et al., 1991). So messen Schmid et al. (1997) und Englert (2000) in gesunden (proximalen) Tubuli von Ratten für

Cat B einen Aktivitätswert, der jenem in den konfluenten, also den in vivo-Bedingungen näheren A-498-Kontrollzellen der vorliegenden Arbeit nahe kommt, für Cat L hingegen einen Wert, der rund zehnmal so hoch ausfällt wie in den degenerierten humanen A-498-Karzinomzellen der vorliegenden Arbeit (Tab. 8). Der Vergleich mit Aktivitäten in Ratten-Tubuli bei Schmid et al. (1997) und Englert (2000) ist legitim, da Cat B- und Cat L-Aktivitäten (z. B. gegenüber dem hier verwendeten Substrat Z-Phe-Arg-AMC) kaum Spezies-abhängig sind (Kirschke et al., 1986; Kirschke et al., 1995; Mason, 1986; Otto und Schirmeister, 1997) und da die Methoden der Aktivitätsbestimmung übereinstimmen (Schmid et al., 1997).

**Tab. 8: Vergleich von Cathepsin-Aktivitäten in A-498-Zellen und proximalen Tubuli ohne Na-MCA-Exposition**

% = % der Cat B+L+S-Gesamtaktivität

G = Gesamtzell-Lysat; unbeh. = unbehandelt, d. h. ohne Na-MCA-Exposition; vorl. Arb. = vorliegende Arbeit; prox. = proximal

Cat-Aktivitäten unbeh. Probe		<b>B+L+S</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>L(+S)</b>	<b>L(+S)</b>
		[U/g] <i>[U/Zelle]</i>	[U/g] <i>[U/Zelle]</i>	[%] <i>[%]</i>	[U/g] <i>[U/Zelle]</i>	[%] <i>[%]</i>
G aus unbeh. A-498 (vorl. Arb.)	kon- fluent	130,3 $29,9 \times 10^{-9}$	125,1 $28,4 \times 10^{-9}$	96 95	4,6 $1,2 \times 10^{-9}$	3,5 3,9
	prolife- rierend	18,2 $1,7 \times 10^{-9}$	11,1 $1,0 \times 10^{-9}$	61 60	5,3 $0,5 \times 10^{-9}$	29 31
G aus unbeh. A-498 (Englert, 2000)		31,1	19,6	63	11,5	37
Prox. Ratten-Tubuli (Schmid et al., 1997)		211,7	156,1	74	52,4	25
Ratten-Tubuli (Eng- lert, 2000)		220,2	159,7	72	60,4	28



#### **4.4.1.1 Einfluss des in vitro-Alters**

Bei den hier untersuchten konfluenten A-498-Zellen handelt es sich – wie bereits mehrfach erwähnt – um immortale Zellen, da sie von Nierenkarzinomzellen abstammen, aber als Tumorzelllinie den mortalen Zellen näher stehen dürften als Zelllinien, welche von normalem Gewebe stammen (Paul, 1980).

Diese konfluenten A-498-Zellen zeigten mit steigendem in vitro-Alter zunehmende Cat B, L und S-Aktivitäten. Darin gleichen sie alternder Rattenleber (Keppler et al., 2000) genauso wie alternden menschlichen Fibroblasten, mortalen Zellen, die im konfluenten Zustand ebenfalls einen Anstieg der lysosomalen Cathepsin-Aktivitäten zeigen (Sitte et al., 2000 c).

Wie verträgt sich nun aber die Zunahme der lysosomalen Cathepsin-Aktivitäten mit der für alternde Zellen charakteristischen Akkumulation von oxidierten Proteinen (Merker et al., 2003)? Die Lösung dieses scheinbaren Widerspruchs liefert das andere neben den Lysosomen wichtige zelluläre Proteolyse-System, welches speziell für den Abbau geschädigter Proteine zuständig ist, das Proteasom (Fuentes et al., 2003; Merker et al., 2001). Dessen proteolytische Aktivität nimmt mit zunehmendem (in vitro-)Alter ab (Petropoulos et al., 2000; Sitte et al., 2000 c). Denn mit dem Alter steigt die Produktion von Oxidantien (in den Mitochondrien) an (Grune et al., 2001), welche bevorzugt Proteine oxidieren. Die dadurch ständig wachsende Zahl oxidierte Proteine hemmt schließlich durch Bindung das Proteasom (Shringarpure und Davies, 2002; Sitte et al., 2000 a).

#### **4.4.1.2 Vergleich der Kontrollzellen mit den Zellen vor Beginn der Behandlung mit Na-MCA (sog. t0-Zellen)**

Wie verändern sich die Cathepsin-Aktivitäten in proliferierenden Zellen zunehmender Wachstumsrate, d. h. während des sogenannten "proliferierenden Alters", und wie in optisch konfluenten Zellen abnehmender Wachstumsrate auf dem Weg zum irreversiblen Wachstumsstillstand? Diese Fragen zum in vitro-Alter wurden bisher vor allem an mortalen Fibroblasten untersucht. Deshalb stellt sich hier erneut die Frage nach der Vergleichbarkeit gesunder mortaler Zellen mit den in vorliegender Arbeit untersuchten immortalen A-498-

Karzinomzellen. Für die Übertragbarkeit der Resultate zur Zellalterung auf Krebszellen spricht – außer der von Paul (1980) herausgestellten Ähnlichkeit von Tumorzelllinien und Primärzellen bezüglich spezieller Zellfunktionen (vgl. 4.4.1.1) – auch die Beobachtung, dass Krebszellen ähnlich normalen somatischen Zellen einen Alterungsprozess mit Telomerkürzung sowie Aktivierung Zell-Zyklus inhibierender Vorgänge durchlaufen (Hwang, 2002).

In der Phase *exponentieller Proliferation* (log-Phase) wurde für Fibroblasten (Sitte et al., 2000 b; Sitte et al., 2000 d) und proximale Tubuluszellen (Evans, 1994) ein Rückgang der proteolytischen Aktivität in Lysosomen (Evans, 1994) wie auch in cytosolischen Proteasomen (Meker et al., 2003; Sitte et al., 2000 b) beschrieben mit Aktivitätsabnahme der Cathepsine als der wichtigsten lysosomalen Proteasen (Sitte et al., 2000 b). In den hier untersuchten A-498-Zellen betrug der Aktivitätsrückgang für die Cats B+L+S nach 24-stündigem exponentiellem Wachstum mehr als 50 %.

Anders verhält es sich mit dem lysosomalen Proteinabbau in (*optisch*) *konfluenten* Fibroblasten. Sie zeigten bei Weiterkultivierung einen Anstieg ihrer lysosomalen Proteolyserate (Cockle und Dean, 1982; Fuertes et al., 2003 b) und also ihrer Cat-Aktivitäten (Sitte et al., 2000 c). Der Proteinabbau durch das cytosolische Proteasom hingegen nahm wie schon während des oben besprochenen "proliferierenden Alterns" so auch in alternden konfluenten Fibroblasten weiter ab (Fuertes et al., 2003 a) (s. 4.4.1.1). In optisch konfluenten A-498-Zellen wurde bei weiter zunehmender Zelldichte bzw. weiter abnehmender Wachstumsrate nach 24 Stunden ein 10%iger Anstieg der Cat B+L+S-Aktivitäten gemessen. Dieser Aktivitätsanstieg kann durch abnehmende CPI-Aktivitäten unter zunehmender Zelldichte mitbedingt sein, wie von Colella et al. (2002) in Tumorzelllinien der Prostata beobachtet (vgl. 4.4.1). Afonso et al. (2002) dagegen beschreiben in Deziduakulturen von Mäusen für Cystatin C eine Expressionszunahme unter ansteigender Zelldichte. Hieraus kann freilich noch nicht auf eine Expressionszunahme anderer CPIs geschlossen werden, zumal Cystatin C, zumindest was die Hemmung der Cats L und S angeht, unter den Cystatinen eine gewisse Sonderstellung einnimmt.

Die für (normale) Fibroblasten und A-498-Carcinomzellen im Zustand optischer Konfluenz gemachte Beobachtung, dass größere Kulturdichte bzw. niedrigere Zellteilungsrate mit höherer Proteolyserate in Lysosomen einhergeht, scheint nicht für alle Zellen zu gelten. So fehlt in transformierten 3T3-Zellen (unter Serum-Suffizienz) die Abhängigkeit der Proteinhydrolyse von der Kulturdichte (Cockle and Dean, 1984).

Für den Proteinabbau während des *in vitro*-Alterns von (nicht-transformierten) Zellen ist also festzuhalten, dass zwar die Proteasom-Aktivität im Cytosol unabhängig vom Wachstumszustand (Proliferation oder Konfluenz) der Zellen mit zunehmendem Alter abnimmt (vgl. 4.4.1.1), die lysosomale Proteolysekapazität aber nach Rückgang in der log-Phase mit Erreichen der (optischen) Konfluenz wieder zunimmt. Dies bedeutet, dass in (optisch) konfluenten als den *in vivo*-näheren Zellen der Proteinabbau hauptsächlich in Lysosomen stattfindet, und also insbesondere den Cathepsinen als den wichtigsten lysosomalen Proteasen obliegt (Cockle und Dean, 1982; Fuertes et al., 2003 b).

#### **4.4.2 Cathepsinaktivitäten in subzellulären Fraktionen**

Aus optisch konfluenten A-498-Zellen wurden durch differentielle Zentrifugation drei subzelluläre Fraktionen gewonnen: die K-Fraktion (K) aus Zellkernen, Zelltrümmern und übriggebliebenen ganzen Zellen, die Cytosol-freie Organellen-Fraktion (Org), sowie die Cytosol-Fraktion (Cyt) mit den cytosolischen CPIs, insbesondere den Stefinen A und B. Die Organellen-Fraktion umfasst Lysosomen und Endosomen als Orte des natürlichen Vorkommens der Cats B, L und S sowie Mitochondrien und Mikrosomen, deren Beitrag zu den Cat-Aktivitäten in Org vernachlässigbar gering ist.

##### **4.4.2.1 Unbehandelte Kontrolle**

Schaut man sich zunächst die unbehandelte Kontrolle an, so findet man in der Organellen-Fraktion höhere Cat-Aktivitäten als im (zuvor besprochenen) Gesamtzell-Lysat (G) (Tab. 9). Dies war zu erwarten, da in Org die Cats konzentriert sind und cytosolische CPIs fehlen.

Die Stefine als bedeutendste cytosolische CPIs üben auf die Cats B, L und S unterschiedlich starke Inhibitorwirkungen aus, wobei Cat S stärker als Cat L und Cat L wiederum mehr als Cat B gehemmt wird (Abrahamson, 1994). Diese Reihenfolge spiegelt der Anreicherungsfaktor  $F_{Org}$  wieder, wenn er für die Cats L+S fast doppelt so hoch ausfällt ( $F_{Org} = 5,3$ ) wie für Cat B ( $F_{Org} = 2,7$ ).  $F_{Org}$  als Aktivitäten-Quotient aus Organellen-Fraktion durch Gesamtzell-Lysat gibt an, um wievielfach höher die Cat-Aktivitäten ohne Inhibierung durch cytosolische CPIs sind. Die fast doppelt so hohe cytosolische Inhibierung der Cats L+S gegenüber Cat B lässt sich auch an ihrem Anteil an der Cat B+L+S-Gesamtaktivität ablesen. Dieser Anteil liegt für die Cats L+S in Org (mit 6,7 %) beinahe doppelt so hoch wie in G (mit 3,7 %), während der Cat B-Anteil zwischen Org und G kaum differiert (in Org nur um rund 3 % niedriger als in G und Cyt) (Tab. 9).

Zum Vergleich der Cat-Aktivitäten bietet sich wieder die Arbeit von Englert (2000) an, dessen unbehandelte A-498-Zellen nach derselben Methode zu subzellulären Fraktionen aufgearbeitet wurden. Englert misst für Cat B in Gesamtzell-Homogenat (G) und Cytosol-Fraktion (Cyt) einen verglichen mit den Ergebnissen vorliegender Arbeit vielfach niedrigeren Aktivitätswert, in der Organellen-Fraktion (Org) hingegen einen vorliegender Arbeit vergleichbaren (um ein Weniges höheren) Wert (Tab. 9). Das heißt, die Gründe für die weit niedrigeren Cat B-Aktivitäten in G und Cyt bei Englert liegen nicht etwa in geringeren (endosomal-lysosomal) Cats-Aktivitäten an sich, sondern in ausgeprägteren cytosolischen Aktivitätsminderungen. Für die Cats L+S kommt Englert in Org auf einen fast 20fachen Aktivitätswert, in G und Cyt nur auf einen gut doppelt so hohen Wert (Tab. 9). Das bedeutet wohl, dass in Englerts A-498-Zellen verglichen mit jenen der vorliegenden Arbeit nicht nur die ungehemmte Cat L+S-Aktivität fast 20 mal höher ist (möglicherweise infolge höherer Cats L+S-Konzentration), sondern auch die cytosolische Hemmung der Cats L+S wie schon des Cat B höher ausfällt, z. B. infolge eines höheren Gehalts an cytosolischen CPIs. Degenerativ veränderte, konfluente A-498-Zellen – wofür die A-498-Zellen vorliegender Arbeit wohl zu gelten haben – scheinen sich also außer durch geringere Cat L-Aktivität (s. 4.4.1) auch durch verminderte Wirksamkeit

und/oder Konzentration ihrer cytosolischen CPIs von den weniger degenerierten, eher proliferierenden A-498-Zellen bei Englert zu unterscheiden.

**Tab. 9: Cathepsin-Aktivitäten in subzellulären Fraktionen aus A-498-Zellen ohne Na-MCA-Exposition**

fett: konfluente A-498-Kontrollzellen der vorliegenden Arbeit; *kursiv*: unbehandelte A-498-Zellen bei Englert (2000)

G = Gesamtzell-Lysat, K = Zellkerne, Zelltrümmer und ganze Zellen, Org = Lysosomen, Endosomen, Mitochondrien und Mikrosomen, Cyt = Cytosol

% = % der Cat B+L+S-Gesamtaktivität

(...) = Faktor, um den sich die Cat-Aktivitäten der vorliegenden Arbeit und der Arbeit von Englert (2000) unterscheiden

Fraktion	B+L+S [U/g]	B [U/g]	B [%]	L(+S) [U/g]	L(+S) [%]	S [U/g]	S [%]
G	<b>130,3</b>	<b>125,1</b> (6,4)	<b>96</b>	<b>4,6</b> (2,5)	<b>3,7</b>	<b>0,04</b> (2)	<b>0,03</b>
	<i>31,1</i>	<i>19,6</i>	<i>63</i>	<i>11,5</i>	<i>37</i>	<i>0,08</i>	<i>0,26</i>
K	<b>307,0</b>	<b>297,1</b>	<b>97</b>	<b>9,9</b>	<b>3,2</b>		
	<i>202,7</i>	<i>105,7</i>	<i>62</i>	<i>97,0</i>	<i>39</i>	<i>0,26</i>	<i>0,13</i>
Org	<b>361,2</b>	<b>336,8</b> (1,1)	<b>93</b>	<b>24,4</b> (19,3)	<b>6,7</b>	<b>0,08</b> (15)	<b>0,02</b>
	<i>855,0</i>	<i>383,9</i>	<i>43</i>	<i>471,1</i>	<i>57</i>	<i>1,20</i>	<i>0,14</i>
Cyt	<b>11,5</b>	<b>10,9</b> (27,3)	<b>96</b>	<b>0,6</b> (2,3)	<b>5,3</b>		
	<i>1,8</i>	<i>0,4</i>	<i>22</i>	<i>1,4</i>	<i>78</i>	<i>0,08</i>	<i>4,44</i>

#### 4.4.2.2 Na-MCA Exposition

Vergleicht man unter Na-MCA-Anstieg die Cat-Aktivitäten der subzellulären Fraktionen, so zeigt sich eine Annäherung der Cat (B und L+S)-Aktivitäten zwischen Org und Cyt bzw. ein Abfall von  $F_{Org}$  (außer  $F_{Org}$  für Cat B bei 400  $\mu\text{g/ml}$  Na-MCA) bei gleichzeitigem Anstieg von  $F_{Cyt}$ . Wie ist dies zu erklären? Wie bereits ausgeführt, induziert Na-MCA in A-498-Zellen eine metabolische Azidose sowie nekrotische Prozesse. Azidose bewirkt laut Ahlberg et al. (1985) eine erhöhte Fragilität von Lysosomen mit Auslaufen lysosomaler Hydrolasen wie der Cats ins Cytosol. Zellnekrose beinhaltet einen Verlust der Plasmamembran-Integrität mit Auslaufen cytosolischer Bestandteile wie der Stefine in den Extrazellulärraum. Beide Vorgänge, Azidose wie Nekrose, intensivieren sich unter ansteigender Na-MCA-Dosis und führen so zu einer Annäherung der in Lyso-

somen (also hier Organellen) und im Cytosol messbaren Cat-Aktivitäten. Diese Annäherung war für die Cats L+S in noch ausgeprägterem Maß zu beobachten als für Cat B. In Analogie dazu ist bekanntlich die Hemmung der Cats L+S durch Cystatine weit stärker als die des Cat B. Was liegt näher als die Vermutung, dass Na-MCA die Wirkung der cytosolischen Cystatine (Stefine) abschwächt, und zwar umso stärker je höher die Na-MCA-Dosis gewählt wurde.

Ebenfalls durch metabolische Azidose und Nekrose erklären lässt sich folgendes Phänomen. Alle Fraktionen zeigen unter Na-MCA-Anstieg eine stetige Abnahme ihrer Cat-Aktivitäten bis auf eine Ausnahme: Im Cytosol ist zwischen 100 und 400 µg/ml Na-MCA eine Zunahme der Cat L+S-Aktivität zu verzeichnen. Gleichzeitig geht in diesem Konzentrationsbereich auch der Proteingehalt des Cytosols zurück nach kontinuierlichem Anstieg bis dahin (bis 100 µg/ml Na-MCA). Der anfängliche Anstieg der cytosolischen Proteinmenge ist wohl durch die metabolische Azidose bedingt, welche zu einer Zunahme der ja im Cytosol ablaufenden Proteinsynthese führt (Fawcett et al., 2000). Wie in 4.3.1 dargelegt überwiegen bei höheren Na-MCA-Konzentrationen die Wirkungen der Nekrose jene der metabolischen Azidose, wodurch sich Proteinrückgang und Anstieg der Cat-Aktivitäten erklären lassen. Denn im Rahmen der Nekrose wird die Plasmamembran durchlässig für cytosolische Inhalte wie Stefine und andere Proteine (Darzynkiewicz et al., 1992: Nekrotische Zellen mit durchlässigen Membranen hatten einen minimalen Proteingehalt.). Infolge bevorzugter Wirkung der Stefine auf die Cats S und L führt der Stefin-Verlust primär zum Anstieg der Cat L+S-Aktivität.

Einen weiteren Beleg für eine Wirkungsabschwächung cytosolischer CPIs (Stefine) durch Na-MCA liefert folgende Beobachtung: Beim Vergleich der Cats L+S mit Cat B unter ansteigender Na-MCA-Konzentration fällt auf, dass die Aktivität in Org für die Cats L+S schwächer abnimmt, während  $F_{Org}$  für die Cats L+S stärker abnimmt als für Cat B. Eine Ursache für die mit zunehmender Na-MCA-Konzentration abnehmende Wirksamkeit cytosolischer CPIs ist sicherlich ihr Auslaufen in den EZR im Rahmen der Nekrose. Die ebenfalls Na-MCA-induzierte metabolische Azidose hingegen dürfte den außerordentlich pH-stabilen Stefinen (Barrett, 1986) nichts anhaben. Ob Na-MCA an Stefinen im

Cytosol direkte chemische Veränderungen induziert – vergleichbar etwa der SH-Gruppen-Alkylierung und damit Inhibierung der Cats – ist nicht bekannt. Wie bereits ausgeführt ergab sich im Gesamtzell-Lysat konfluenten A-498-Zellen unter ansteigender Na-MCA-Konzentration für Cat B ein weit stärkerer Aktivitätsrückgang (auf 2,2 % der Kontrolle bei 400 µg/ml Na-MCA) als für die Cats L+S (auf 30,2 % der Kontrolle). Diese Cat-Aktivitäten sind aber durch cytosolische CPIs unterschiedlich stark vermindert, deren Wirksamkeit zudem durch Na-MCA in unklarem Ausmaß beeinträchtigt wird. Bessere Aussagen über die durch Na-MCA-Einwirkung auf die Cats selbst veränderten Cat-Aktivitäten liefert die Organellen-Fraktion, da sie keine cytosolischen CPIs enthält. In dieser ebenfalls aus konfluenten A-498-Zellen gewonnenen Organellen-Fraktion (Org) ermittelt man für Cat B einen Aktivitätsabfall auf 1,2 % der Kontrolle bei 400 µg/ml Na-MCA und für die Cats L+S auf 4,4 % der Kontrolle. Infolge der Cats-Anreicherung und des Fehlens cytosolischer CPIs in Org lässt sich nun auch die Cat S-Aktivität bestimmen, für die man unter Na-MCA-Anstieg einen weit verhalteneren Aktivitätsrückgang beobachtet (auf 29,4 % der Kontrolle bei 400 µg/ml Na-MCA) als für die Cats L und B. Beim Vergleich von Gesamtzell-Lysat und Organellen-Fraktion fällt auf, die in % der Kontrolle angegebene Aktivität beträgt in Org bei 400 µg/ml Na-MCA für Cat B nur die Hälfte (1,2 % : 2,2 % (s. o.)) und für die Cats L+S sogar nur etwa ein Siebtel des Prozentwertes im Gesamtzell-Lysat (4,4 % : 30,2 % (s. o.)). Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass Na-MCA tatsächlich die Wirksamkeit cytosolischer CPIs (v. a. Stefine) abmindert, was sich aufgrund stärkster Stefinwirkungen auf Cat S in dessen geringstem Aktivitätsrückgang niederschlägt. Der im Rahmen der metabolischen Azidose stattfindende Cats-Verlust (aus den Lysosomen) ins Cytosol sollte für alle drei Cats in etwa den gleichen Anteil am lysosomalen Gesamtbestand ausmachen. Deshalb kann aus dem unterschiedlich starken bzw. raschen Aktivitätsrückgang in Org auf unterschiedliche Empfindlichkeiten der einzelnen Cats gegenüber Na-MCA bzw. seinen Effekten geschlossen werden. Dabei erweist sich Cat S als bei weitem am unempfindlichsten, erst mit Abstand gefolgt von Cat L und dem am empfindlichsten reagierenden Cat B. Was den Effekt auf Cat B im Vergleich mit Cat L angeht, verhält sich MCA hier entsprechend einigen

anderen SH-Reagenzien wie Iodacetamid und N-Ethylmaleimid, welche die Cat L-Aktivität nur schwach senken, Cat B1 hingegen stark inhibieren (Barrett, 1973) vermutlich über ausgeprägtere SH-Gruppen-Alkylierungen. Da Cat S sehr große Sequenz- und Strukturähnlichkeit mit Cat L aufweist (McGrath et al., 1998), war zu erwarten, dass die Na-MCA-Wirkungen auf Cat S eher denen auf Cat L als auf Cat B ähneln würden. Von der ebenfalls SH-Gruppen-alkylierenden (d. h. inhibierenden) Halogenessigsäure Monoiodacetat weiß man, dass sie die Cat S-Aktivität stärker senkt als die Cat L-Aktivität (Kirschke et al., 1977; Petanceska und Devi, 1992); dies steht im Gegensatz zu den hier für (Na-)MCA gewonnenen Ergebnissen. Vielleicht sind die Effekte der durch (Na-)MCA hervorgerufenen metabolischen Azidose für diesen Unterschied verantwortlich. So gilt Cat L als instabilste lysosomale Cysteinproteinase neutralen und alkalischen pH-Werten gegenüber. Möglicherweise reagiert Cat L aber auch auf stark saure pH-Werte (Zunahme der metabolischen Azidose) empfindlicher als das für seine breite pH-Stabilität bekannte Cat S. Einen anderen ebenfalls auf metabolischer Azidose fußenden Erklärungsansatz liefern Fawcett et al. (2000). Sie berichten von abnehmenden Cat B- und L-Aktivitäten in der Rattenniere infolge einer durch metabolische Azidose verminderten Genexpression. Möglicherweise ist Cat S (nicht thematisiert bei Fawcett et al., 2000) davon weniger stark betroffen als Cat L.

Welche eventuellen weiteren Mechanismen in welchem Umfang für die Empfindlichkeits-Unterschiede der drei Cats gegenüber Na-MCA bzw. für die oben postulierte Wirkungsabschwächung cytosolischer CPIs durch Na-MCA verantwortlich sind, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Untersucht wurden die Wirkungen akut toxischer Dosen (bis 400 µg/ml) des Gefahrstoffs Natriummonochloracetat (Na-MCA) auf die lysosomalen Cysteinproteasen Cathepsine B, L und S in permanenten Nierenkarzinom-Zellen des Menschen (Zelllinie A-498).

*Konfluente* A-498-Zellen (Schwerpunkt dieser Arbeit) zeigten in weitgehend Cysteinproteasen-Inhibitor-freien Organellen-Fraktionen (aus Lysosomen und Endosomen mit angereicherten Cathepsinen sowie Mitochondrien und Mikrosomen) eine dosisabhängige Abnahme ihrer Cathepsin-Aktivitäten durch Na-MCA, wobei die Cathepsin B-Aktivität am stärksten und die Cathepsin S-Aktivität am wenigsten abfiel. Dies deutet hin auf unterschiedliche Na-MCA-Sensitivität der drei Cathepsine mit höchster Empfindlichkeit des Cathepsin B und geringster des Cathepsin S. Auch in den Cysteinproteasen-Inhibitorreichen Gesamtzell-Lysaten ließ sich dieser dosisabhängige Aktivitätsrückgang durch Na-MCA beobachten, der aber insbesondere für die Cathepsine L+S sehr viel schwächer ausfiel als in den Organellen-Fraktionen. Dies weist hin auf eine Na-MCA-induzierte Wirkungsabschwächung cytosolischer Cysteinproteasen-Inhibitoren, deren Effekte auf die Cathepsine L und S bekanntlich stärker sind als auf Cathepsin B – wie auch in vorliegender Arbeit gezeigt werden konnte.

*Proliferierende* A-498-Zellen – welche unabhängig von der Na-MCA-Dosis in Relation zur Cathepsin B-Aktivität höhere Cathepsin L+S-Aktivitäten aufwiesen als konfluente A-498-Zellen – wurden hingegen durch Na-MCA (zumindest bis 200 µg/ml) kaum in ihren Cathepsin-Aktivitäten beeinträchtigt; in Vitalität und Proteingehalt dagegen weit stärker als konfluente A-498-Zellen. So reagierten proliferierende A-498-Zellen schon auf geringere Na-MCA-Konzentrationen hypertrophisch (deutbar als Folge einer Na-MCA-induzierten metabolischen Azidose) und zunehmend nekrotisch (Wiederabnahme des Zellproteins bei höheren Na-MCA-Konzentrationen) und wurden durch 200 µg/ml Na-MCA nahezu 40 mal stärker geschädigt als konfluente A-498-Zellen.

## 6 ANHANG

**Tab. 1–3: Aktivitäten der Cathepsine B+L+S, B und L(+S) in Gesamtzell-Lysaten (optisch) konfluenter und proliferierender A-498-Zellen vor (t0-Zellen) und nach 24-stündiger Inkubation mit Na-MCA in Konzentrationen von 0 (Kontrolle) bis 400 µg/ml**

MV ± SEM (n = 4) mit n = 4 Passagen und insgesamt n = 16 unabhängigen Doppelbestimmungen (konfluente A-498-Zellen) bzw. MV ± SD mit n = 1 Passage und insgesamt n = 4 unabhängigen Doppelbestimmungen (proliferierende A-498-Zellen)

<b>Cats B+L+S</b>	<b>konfl. A-498</b>		<b>prolif. A-498</b>		
	Na-MCA [µg/ml]	[10 <sup>-9</sup> U/Zelle]	[U/g Protein]	[10 <sup>-9</sup> U/Zelle]	[U/g Protein]
0 (t0)		27,09 ± 3,75	198,95 ± 30,66	4,06 ± 1,74	209,43 ± 43,24
0 (Kontr.)		29,88 ± 5,71	130,34 ± 21,31	1,68 ± 0,31	18,17 ± 2,37
10		21,36 ± 2,68	115,47 ± 16,63	1,84 ± 0,6	15,82 ± 5,26
25		15,04 ± 3,39	71,31 ± 14,57	1,92 ± 0,49	20,85 ± 6,53
50		8,84 ± 1,09	43,17 ± 9,69	2,05 ± 0,78	18,52 ± 8,08
100		4,76 ± 0,83	18,92 ± 3,71	6,47 ± 5,51	124,41
200		2,78 ± 0,37	9,11 ± 1,02	6,66 ± 1,88	
400		0,61 ± 0,11	2,56 ± 0,42		

<b>Cat B</b>	<b>konfl. A-498</b>		<b>prolif. A-498</b>		
	Na-MCA [µg/ml]	[10 <sup>-9</sup> U/Zelle]	[U/g Protein]	[10 <sup>-9</sup> U/Zelle]	[U/g Protein]
0 (t0)		25,78 ± 3,37	189,88 ± 28,34	3,34 ± 0,88	152,31
0 (Kontr.)		28,42 ± 5,39	125,13 ± 20,41	1,00 ± 0,01	11,10 ± 2,67
10		20,59 ± 2,46	112,28 ± 14,51	1,49 ± 0,35	12,45 ± 2,18
25		13,84 ± 3,34	65,87 ± 14,06	1,66 ± 0,24	17,86 ± 3,50
50		8,25 ± 1,10	40,42 ± 9,41	1,46 ± 0,52	13,24 ± 5,93
100		4,12 ± 0,85	16,37 ± 3,71	1,23	14,77
200		2,16 ± 0,57	7,04 ± 1,71		
400		0,66 ± 0,12	2,74 ± 0,40		

<b>Cat L(+S)</b> Na-MCA [ $\mu\text{g/ml}$ ]	<b>konfl. A-498</b>		<b>prolif. A-498</b>	
	[ $10^{-9}$ U/Zelle]	[U/g Protein]	[ $10^{-9}$ U/Zelle]	[U/g Protein]
0 (t0)	0,78 $\pm$ 0,15	5,66 $\pm$ 1,12	0,46 $\pm$ 0,33	26,54
0 (Kontr.)	1,16 $\pm$ 0,40	4,57 $\pm$ 1,38	0,52 $\pm$ 0,38	5,28 $\pm$ 2,88
10	0,85 $\pm$ 0,16	4,68 $\pm$ 0,76	0,78 $\pm$ 0,57	5,36 $\pm$ 4,82
25	1,19 $\pm$ 0,27	5,65 $\pm$ 1,41	0,67 $\pm$ 0,02	7,35 $\pm$ 2,67
50	0,59 $\pm$ 0,11	2,75 $\pm$ 0,53	1,06 $\pm$ 0,19	9,47 $\pm$ 2,64
100	0,64 $\pm$ 0,03	2,55 $\pm$ 0,06	9,13	109,64
200	0,62 $\pm$ 0,25	2,08 $\pm$ 0,88		
400	0,32 $\pm$ 0,13	1,38 $\pm$ 0,52		

**Tab. 4–7: Aktivitäten der Cathepsine B+L+S, B und L(+S) (S nur in Org) [U/g Protein] in Gesamtzell-Homogenaten und zugehörigen subzellulären Fraktionen Org, K und Cyt (optisch) konfluenter A-498-Zellen vor (t0-Zellen) und nach 24-stündiger Inkubation mit Na-MCA in Konzentrationen von 0 (Kontrolle) bis 400  $\mu\text{g/ml}$  MV  $\pm$  SD mit n = 4 (Org) bzw. n = 2 (G, K, Cyt) unabhängigen Doppelbestimmungen; Org = Organellen-Fraktion aus Lysosomen, Endosomen, Mitochondrien und Mikrosomen, K = K-Fraktion aus Zellkernen und Zelltrümmern, Cyt = Cytosol-Fraktion**

### Gesamtzell-Homogenat

Na-MCA [ $\mu\text{g/ml}$ ]	<b>Cats B+L+S</b> [U/g Protein]	<b>Cat B</b> [U/g Protein]	<b>Cats L(+S)</b> [U/g Protein]
0 (t0)	152,01 $\pm$ 5,58	149,24 $\pm$ 2,82	2,77 $\pm$ 2,76
0 (Kontr.)	188,31 $\pm$ 14,09	178,19 $\pm$ 15,61	10,13 $\pm$ 1,52
25	111,77 $\pm$ 8,37	106,31 $\pm$ 11,15	5,46 $\pm$ 2,79
100	19,85 $\pm$ 4,27	16,65 $\pm$ 6,36	3,21 $\pm$ 2,09
400	8,70 $\pm$ 2,32	5,51 $\pm$ 2,22	3,18 $\pm$ 0,78

## Organellen-Fraktion

Na-MCA [µg/ml]	Cats B+L+S [U/g Protein]	Cat B [U/g Protein]	Cats L+S [U/g Protein]	Cat S [10 <sup>-2</sup> U/g Protein]
0 (t0)	413,54 ± 38,55	389,69 ± 33,64	23,85 ± 6,12	9,73 ± 3,39
0 (Kontr.)	361,17 ± 30,10	336,81 ± 27,35	24,36 ± 3,70	8,13 ± 0,52
25	148,31 ± 15,93	130,09 ± 14,69	18,22 ± 2,71	4,24 ± 0,47
100	30,97 ± 5,91	23,27 ± 3,42	7,70 ± 3,00	3,70 ± 1,12
400	5,08 ± 1,81	4,00 ± 1,76	1,06 ± 0,53	2,39 ± 0,04

## K-Fraktion

Na-MCA [µg/ml]	Cats B+L+S [U/g Protein]	Cat B [U/g Protein]	Cats L(+S) [U/g Protein]
0 (t0)	215,53 ± 31,25	207,98 ± 32,58	7,55 ± 1,33
0 (Kontr.)	306,98 ± 22,69	297,10 ± 30,79	9,88 ± 8,10
25	127,62 ± 11,00	120,18 ± 12,81	7,45 ± 1,80
100	49,58 ± 0,66	44,83 ± 6,05	4,75 ± 6,72
400	11,69	10,78	0,91

## Cytosol-Fraktion

Na-MCA [µg/ml]	Cats B+L+S [U/g Protein]	Cat B [U/g Protein]	Cats L(+S) [U/g Protein]
0 (t0)	19,08 ± 7,85	18,25 ± 7,23	0,83 ± 0,62
0 (Kontr.)	11,51 ± 3,76	10,90 ± 3,06	0,61 ± 0,70
25	7,18 ± 2,88	6,83 ± 2,62	0,35 ± 0,25
100	2,61 ± 0,83	2,43 ± 0,60	0,18 ± 0,23
400	1,40 ± 1,13	1,37	0,83

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abrahamson, M. (1994): Cystatins. *Methods Enzymol.* **244**: 685-700.
- Abudula, A., Rommerskirch, W., Weber, E., Günther, D., Wiederanders, B. (2001): Splice variants of human cathepsin L mRNA show different expression rates. *Biol. Chem.* **382**: 1583-1591.
- AEGLs (2001): Proposed Acute Exposure Guideline Levels (AEGLs) "Public Draft": Monochloroacetic Acid (CAS Reg. No. 79-11-8). United States Environmental Protection Agency, Office of Pollution Prevention and Toxics
- Afonso, S., Romagnano, L., Babiarz, B. (1997): The expression and function of cystatin C and cathepsin B and cathepsin L during mouse embryo implantation and placentation. *Development* **124**: 3415-3425.
- Afonso, S., Tovar, C., Romagnano, L., Babiarz, B. (2002): Control and expression of cystatin C by mouse decidual cultures. *Mol. Reprod. Dev.* **61**: 155-163.
- Agarwal, S. K. (1990): Proteases cathepsins – a view. *Biochemical Education* **18**: 67-72.
- Ahlberg, J., Berkenstam, A., Henell, F., Glaumann, H. (1985): Degradation of short and long lived proteins in isolated rat liver lysosomes. Effects of pH, temperature, and proteolytic inhibitors. *J. Biol. Chem.* **260**: 5847-5854.
- Andreu, A. L., Schwartz, S. (1995): Nutrition, lysosomal proteases, and protein breakdown. *Nutrition* **11**: 382-387.
- Ansorge, S., Kirschke, H., Friedrich, K. (1977): Conversion of proinsulin into insulin by cathepsins B and L from rat liver lysosomes. *Acta Biol. Med. Ger.* **36**: 1723-1727.
- Arora, S., Chauhan, S. S. (2002): Identification and characterization of a novel human cathepsin L splice variant. *Gene* **293**: 123-131.
- Assfalg-Machleidt, I., Jochum, M., Klaubert, W., Inthorn, D., Machleidt, W. (1988): Enzymatically active cathepsin B dissociating from its inhibitor complexes is elevated in blood plasma of patients with septic shock and some malignant tumors. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **369** Suppl.: 263-269.
- Bakhshi, R., Goel, A., Seth, P., Chhikara, P., Chauhan, S. S. (2001): Cloning and characterization of human cathepsin L promoter. *Gene* **275**: 93-101.

- Bania, J., Gatti, E., Lelouard, H., David, A., Cappello, F., Weber, E., Camosseto, V., Pierre, P. (2003): Human cathepsin S, but not cathepsin L, degrades efficiently MHC class II-associated invariant chain in nonprofessional APCs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**: 6664-6669.
- Baricos, W. H., Zhou, Y. W., Fuerst, R. S., Barrett, A. J., Shah, S. V. (1987): The role of aspartic and cysteine proteinases in albumin degradation by rat kidney cortical lysosomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **256**: 687-691.
- Barrett, A. J. (1973): Human cathepsin B1. Purification and some properties of the enzyme. *Biochem. J.* **131**: 809-822.
- Barrett, A. J. (1986): The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. *Biomed. Biochim. Acta* **45**: 1363-1374.
- Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Davies, M. E., Machleidt, W., Salvesen, G., Turk, V. (1986): Cysteine proteinase inhibitors of the cystatin superfamily, 515-569. In: Dingle, J. T., Gordon, J. L.: Research monographs in cell and tissue physiology, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, New York, Oxford.
- Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Woessner, J. F. (1998): Handbook of proteolytic enzymes. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Berger, J. J., Dice, J. F. (1986): Proteolysis in cultured cells during prolonged serum deprivation and replacement. *Am. J. Physiol.* **251**: C748-C753.
- Bernstein, H. G., Kirschke, H., Wiederanders, B., Pollak, K. H., Zipress, A., Rinne, A. (1996): The possible place of cathepsins and cystatins in the puzzle of Alzheimer disease: a review. *Mol. Chem. Neuropathol.* **27**: 225-247.
- Bevec, T., Stoka, V., Pungercic, G., Dolenc, I., Turk, V. (1996): Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L. *J. Exp. Med.* **183**: 1331-1338.
- Bever, C. T. Jr., Garver, D. W. (1995): Increased cathepsin B activity in multiple sclerosis brain. *J. Neurol. Sci.* **131**: 71-73.
- Bhat, H. K., Ahmed, A. E., Ansari, G. A. (1990): Toxicokinetics of monochloroacetic acid: a whole-body autoradiography study. *Toxicology* **63**: 35-43.
- Blume, H. P. (1990): Handbuch des Bodenschutzes: Bodenökologie und –belastung, vorbeugende und abwehrende Schutzmaßnahmen. Ecomed Verlag, Landsberg.
- Bohley, P., Seglen, P. O. (1992): Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia* **48**: 151-157.
- Bohley, P. (1995): The fates of proteins in cells. *Naturwissenschaften* **82**: 544-550.

- Bond, J. S., Barrett, A. J. (1980): Degradation of fructose-1,6-bisphosphate aldolase by cathepsin B. *Biochem. J.* **189**: 17-25.
- Bond, J. S., Butler, P. E. (1987): Intracellular proteases. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 333-364
- Bradley, M. O. (1977): Regulation of protein degradation in normal and transformed human cells. Effects of growth state, medium composition, and viral transformation. *J. Biol. Chem.* **252**: 5310-5315.
- Brando, B., Civati, G., Busnach, G., Broggi, M. L., Seveso, M., Belli, L. S., Brunati, C., Minetti, L. (1986): Ciclosporin does not inhibit the early steps of lymphocyte Activation. *Contrib. Nephrol.* **51**: 19-22.
- Brix, K., Lemansky, P., Herzog, V. (1996): Evidence for extracellularly acting cathepsins mediating thyroid hormone liberation in thyroid epithelial cells. *Endocrinology* **137**: 1963-1974.
- Brömme, D., Rinne, R., Kirschke, H. (1991): Tight-binding inhibition of cathepsin S by cystatins. *Biomed. Biochim. Acta* **50**: 631-635.
- Brömme, D., Bonneau, P. R., Lachance, P., Wiederanders, B., Kirschke, H., Peters, C., Thomas, D. Y., Storer, A. C., Vernet, T. (1993): Functional expression of human cathepsin S in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of the recombinant enzyme. *J. Biol. Chem.* **268**: 4832-4838.
- Bruschi, S. A., Bull, R. J. (1993): In vitro cytotoxicity of mono-, di-, and trichloroacetate and its modulation by hepatic peroxisome proliferation. *Fundam. Appl. Toxicol.* **21**: 366-375.
- BUA-Stoffbericht 127 (1994): Monochloressigsäure.Natriummonochloracetat. Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) der Gesellschaft Deutscher Chemiker, S. Hirzel Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Buck, M. R., Karustis, D. G., Day, N. A., Honn, K. V., Sloane, B. F. (1992): Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem. J.* **282**: 273-278.
- Bukur, J., Malenica, B., Huber, C., Seliger, B. (2003): Altered expression of nonclassical HLA class Ib antigens in human renal cell carcinoma and its association with impaired immune response. *Hum. Immunol.* **64**: 1081-1092.
- Calkins, C. C., Sloane, B. F. (1995): Mammalian cysteine protease inhibitors: biochemical properties and possible roles in tumor progression. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **376**: 71-80.
- Chaiken, I. M., Smith, E. L. (1969): Reaction of the sulfhydryl group of papain with chloroacetic acid. *J. Biol. Chem.* **244**: 5095-5099.

- Chapman, H. A., Riese, R. J., Shi, G. P. (1997): Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* **59**: 63-88.
- Chauhan, S. S., Goldstein, L. J., Gottesman, M. M. (1991): Expression of cathepsin L in human tumors. *Cancer Res.* **51**: 1478-1481.
- Chauhan, S. S., Popescu, N. C., Ray, D., Fleischmann, R., Gottesman, M. M., Troen, B. R. (1993): Cloning, genomic organization, and chromosomal localization of human cathepsin L. *J. Biol. Chem.* **268**: 1039-1045.
- Christensen, E. I., Birn, H., Verroust, P., Moestrup, S. K. (1998): Membrane receptors for endocytosis in the renal proximal tubule. *Int. Rev. Cytol.* **180**: 237-284.
- Cimerman, N., Brguljan, P. M., Krasovec, M., Suskovic, S., Kos, J. (2001): Circadian and concentration profile of cathepsin S in sera from healthy subjects and asthmatic patients. *Pflugers Arch.* **442**: R204-R206.
- Claus, V., Jahraus, A., Tjelle, T., Berg, T., Kirschke, H., Faulstich, H., Griffiths, G. (1998): Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes. *J. Biol. Chem.* **273**: 9842-9851.
- Cockle, S. M., Dean, R. T. (1982): The regulation of proteolysis in normal fibroblasts as they approach confluence. Evidence for the participation of the lysosomal system. *Biochem. J.* **208**: 795-800.
- Cockle, S. M., Dean, R. T. (1984): Distinct proteolytic mechanisms in serum-sufficient and serum-restricted fibroblasts. Transformed 3T3 cells fail to regulate proteolysis in relation to culture density only during serum-sufficiency. *Biochem. J.* **221**: 53-60.
- Colella, R., Goodwyn, E., Gopal, P. (2002): Increased cell density decreases cysteine proteinase inhibitor activity and increases invasive ability of two prostate tumor cell lines. *Cancer Lett.* **185**: 163-172.
- Daniel, F. B., Robinson, M., Stober, J. A., Page, N. P., Olson, G. R. (1991): Ninety-day toxicity study of sodium monochloroacetate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology* **67**: 171-185.
- Dartsch, P. C., Wolburg, H., Al Makdessi, S., Schiek, D., Sweidan, H., Kimmel, R., Schmahl, F. W. (2000): Sodium monochloroacetate causes cytotoxic effects, an increased lactate and pyruvate level and induces ultra structural and cytoskeletal alterations in cultured kidney and liver epithelial cells. *Hum. Exp. Toxicol.* **19**: 138-148.
- Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. (1992): Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* **13**: 795-808.



- Debigare, R., Price, S. R. (2003): Proteolysis, the ubiquitin-proteasome system, and renal diseases. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **285**: F1-F8.
- Desmazes, C., Gauthier, F., Lalmanach, G. (2001): Cathepsin L, but not cathepsin B, is a potential kininogenase. *Biol. Chem.* **382**: 811-815.
- Dilakian, E. A., Gureeva, T. A., Zhurbitskaia, V. A., Suletskaia, Iu. A., Solov'eva, N. I. (2002): Characterization of cysteine proteinase endogenous inhibitors obtained from transformed fibroblasts. *Vopr. Med. Khim.* **48**: 611-617.
- Dunn, A. D., Crutchfield, H. E., Dunn, J. T. (1991): Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsins B, D, and L. *J. Biol. Chem.* **266**: 20198-20204.
- Dunn, A. D., Myers, H. E., Dunn, J. T. (1996): The combined action of two thyroidal proteases releases T4 from the dominant hormone-forming site of thyroglobulin. *Endocrinology* **137**: 3279-3285.
- ECETOC (1999): Monochloroacetic acid and its sodium salt. JACC Report No. 38, Brussels.
- ECETOC (2001): Human acute intoxication from monochloroacetic acid: Proposals for therapy. Technical Report No. 81, Brussels.
- Ebert, D. H., Kopecky-Bromberg, S. A., Dermody, T. S. (2004): Cathepsin B is inhibited in mutant cells selected during persistent reovirus infection. *J. Biol. Chem.* **279**: 3837-3851.
- Eisenberger, U., Fels, L. M., Olbricht, C. J., Stolte, H. (1995): Cathepsin B and L in isolated proximal tubular segments during acute and chronic proteinuria. *Ren. Physiol. Biochem.* **18**: 89-96.
- Englert, J. (2000): Aktivität und Funktion der Cathepsine B, L und S in diabetischen und teilnephrektomierten Rattennieren sowie in einer MHC Klasse II-induzierbaren Nierenkarzinomzelllinie. Med. Dissertation, Universität Tübingen.
- Evans, P. J. (1994): Protein degradation in kidney proximal tubule cell monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1221**: 243-249.
- Fahimi, I. J., Keppler, F., Scholer, H. F. (2003): Formation of chloroacetic acids from soil, humic acid and phenolic moieties. *Chemosphere* **52**: 513-520.
- Fawcett, J., Hsu, F. W., Tsao, T., Rabkin, R. (2000): Effect of metabolic acidosis on the insulin-like growth factor-I system and cathepsins B and L gene expression in the kidney. *J. Lab. Clin. Med.* **136**: 468-475.

- Felbor, U., Kessler, B., Mothes, W., Goebel, H. H., Ploegh, H. L., Bronson, R. T., Olsen, B. R. (2002): Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**: 7883-7888.
- Feldhaus, K., Hudson, D., Rogers, D., Horowitz, R. S., Brent, J., Dart, R. C., Gomez, H. (1993): Pediatric fatality associated with accidental oral administration of monochloroacetic acid (MCA). *Vet. Hum. Toxicol.* **35**: 344.
- Fiebiger, E., Maehr, R., Villadangos, J., Weber, E., Erickson, A., Bikoff, E., Ploegh, H. L., Lennon-Duménil, A.-M. (2002): Invariant chain controls the activity of extracellular cathepsin L. *J. Exp. Med.* **196**: 1263-1269.
- Fineschi, B., Miller, J. (1997): Endosomal proteases and antigen processing. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 377-382.
- Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D., Lademann, U., Bastholm, L., Boes, M., Elling, F., Leist, M., Jaattela, M. (2001): Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J. Cell Biol.* **153**: 999-1010.
- Friedrich, B. (1999): Cathepsine B, H, L und ihre Inhibitoren im Gewebe und in Zellkulturen der Prostata. Med. Dissertation, Humboldt-Universität Berlin.
- Friedrichs, B., Tepel, C., Reinheckel, T., Deussing, J., von Figura, K., Herzog, V., Peters, C., Saftig, P., Brix, K. (2003): Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L. *J. Clin. Invest.* **111**: 1733-1745.
- Frosch, B. A., Berquin, I., Emmert-Buck, M. R., Moin, K., Sloane, B. F. (1999): Molecular regulation, membrane association and secretion of tumor cathepsin B. *APMIS* **107**: 28-37.
- Fuertes, G., Martin De Llano, J. J., Villarroja, A., Rivett, A. J., Knecht, E. (2003 a): Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions. *Biochem. J.* **375**: 75-86.
- Fuertes, G., Villarroja, A., Knecht, E. (2003 b): Role of proteasomes in the degradation of short-lived proteins in human fibroblasts under various growth conditions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**: 651-664.
- Giller, S., Le Curieux, F., Erb, F., Marzin, D. (1997): Comparative genotoxicity of halogenated acetic acids found in drinking water. *Mutagen.* **12**: 321-328.
- Gosselin, R. E., Hodge, H. C., Smith, R. P., Gleason, M. N. (1976): Clinical toxicology of commercial products, acute poisoning, 133, 4. Aufl., The Williams and Wilkins Co., Baltimore

- Grune, T., Shringarpure, R., Sitte, N., Davies, K. (2001): Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **56**: B459-467.
- Halangk, W., Lerch, M. M., Brandt-Nedelev, B., Roth, W., Ruthenbueger, M., Reinheckel, T., Domschke, W., Lippert, H., Peters, C., Deussing, J. (2000): Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J. Clin. Invest.* **106**: 773-781.
- Haas, C., Ryffel, B., Aguet, M., Le Hir, M. (1995): MHC antigens in interferon gamma (IFN gamma) receptor deficient mice: IFN gamma-dependent up-regulation of MHC class II in renal tubules. *Kidney Int.* **48**: 1721-1727.
- Haga, H. J. (1989): Kidney lysosomes. *Int. J. Biochem.* **21**: 343-345.
- Hagerty, D. T., Allen, P. M. (1992): Processing and presentation of self and foreign antigens by the renal proximal tubule. *J. Immunol.* **148**: 2324-2330.
- Hashimoto, Y., Kakegawa, H., Narita, Y., Hachiya, Y., Hayakawa, T., Kos, J., Turk, V., Katunuma, N. (2001): Significance of cathepsin B accumulation in synovial fluid of rheumatoid arthritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**: 334-339.
- Hayes, F. D., Short, R. D., Gibson, J. E. (1973): Differential toxicity of monochloroacetate, monofluoroacetate and monoiodoacetate in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **26**: 93-102.
- Heidtmann, H. H., Salge, U., Havemann, K., Kirschke, H., Wiederanders, B. (1993): Secretion of a latent, acid activatable cathepsin L precursor by human non-small cell lung cancer cell lines. *Oncol. Res.* **5**: 441-451.
- Hendil, K. B., Lauridsen, A. M., Seglen, P. O. (1990): Both endocytic and endogenous protein degradation in fibroblasts is stimulated by serum/amino acid deprivation and inhibited by 3-methyladenine. *Biochem. J.* **272**: 577-581.
- Hwang, E. S. (2002): Replicative senescence and senescence-like state induced in cancer-derived cells. *Mech. Ageing Dev.* **123**: 1681-1694.
- Inubushi, T., Kakegawa, H., Kishino, Y., Katunuma, N. (1994): Specific assay method for the activities of cathepsin L-type cysteine proteinases. *J. Biochem.* **116**: 282-284.
- Illy, C., Quraishi, O., Wang, J., Purisima, E., Vernet, T., Mort, J. S. (1997): Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *J. Biol. Chem.* **272**: 1197-1202.
- Jokimaa, V., Oksjoki, S., Kujari, H., Vuorio, E., Anttila, L. (2001): Expression patterns of cathepsins B, H, K, L and S in the human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* **7**: 73-78.

- Jung, K., Friedrich, B., Turk, I., Roigas, J., Lein, M., Schnorr, D., Loening, S. A. (1998): Cathepsins B, H, L and cysteine proteinase inhibitors in renal cell carcinoma: no evidence for dysregulated proteolytic balance. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **124**: 60-61.
- Kadowaki, M., Kanazawa, T. (2003): Amino acids as regulators of proteolysis. *J. Nutr.* **133** (6 Suppl. 1): 2052S-2056S.
- Kanduc, D., Mittelman, A., Serpico, R., Sinigaglia, E., Sinha, A. A., Natale, C., Santacroce, R., Di Corcia, M. G., Lucchese, A., Dini, L., Pani, P., Santacroce, S., Simone, S., Bucci, R., Farber, E. (2002): Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int. J. Oncol.* **21**: 165-170.
- Katunuma, N., Murata, E., Kakegawa, H., Matsui, A., Tsuzuki, H., Tsuge, H., Turk, D., Turk, V., Fukushima, M., Tada, Y., Asao, T. (1999): Structure based development of novel specific inhibitors for cathepsin L and cathepsin S in vitro and in vivo. *FEBS Lett.* **458**: 6-10.
- Kempson, S. A., Kunkler, K. J., Murer, H. (1991): Iodoacetate action on endocytic uptake of different fluid-phase markers by OK renal epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1091**: 324-328.
- Keppler, D., Abrahamson, M., Sordat, B. (1994): Secretion of cathepsin B and tumour invasion. *Biochem. Soc. Trans.* **22**: 43-49.
- Keppler, D., Walter, R., Perez, C., Sierra, F. (2000): Increased expression of mature cathepsin B in aging rat liver. *Cell Tissue Res.* **302**: 181-188.
- Kirk-Othmer (1982): Encyclopedia of Chemical Technology, Vol. 10,16 und 24, 3. Aufl., John Wiley and Sons, New York
- Kirschke, H., Langner, J., Wiederanders, B., Ansorge, S., Bohley, P. (1977): Cathepsin L. A new proteinase from rat-liver lysosomes. *Eur. J. Biochem.* **74**: 293-301.
- Kirschke, H., Pepperle, M., Schmidt, I., Wiederanders, B. (1986): Are there species differences amongst the lysosomal cysteine proteinases? *Biomed. Biochim. Acta* **45**: 1441-1446.
- Kirschke, H., Wiederanders, B., Brömme, D., Rinne, A. (1989): Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochem. J.* **264**: 467-473.
- Kirschke H, Wiederanders B. (1994): Cathepsin S and related lysosomal endopeptidases. *Methods Enzymol.* **244**: 500-511.

- Kirschke, H., Barrett, A. J., Rawlings, N. D. (1995): Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile* **2**: 1581-1643.
- Kirschke, H., Clausen, T., Göhring, B., Günther, D., Heucke, E., Laube, F., Lowe, E., Neef, H., Papesch, H., Peinze, S., Plehn, G., Rebmann, U., Rinne, A., Rüdlich, R., Weber, E. (1997): Concentrations of lysosomal cysteine proteases are decreased in renal cell carcinoma compared with normal kidney. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **123**: 402-406.
- Knop, M., Schiffer, H. H., Rupp, S., Wolf, D. H. (1993): Vacuolar/lysosomal proteolysis: proteases, substrates, mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**: 990-996.
- Koblinski, J. E., Ahram, M., Sloane, B. F. (2000): Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin. Chim. Acta* **291**: 113-135.
- Koenig, G. (1975): Chloressigsäuren, 393-403. In: Bartholomé, E., Biekert, E., Hellmann, H., Ley, H., Weigert, M.: Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, 4. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim.
- Kos, J., Šmid, A., Krašovec, M., Svetic, B., Lenarčič, B., Vrhovec, I., Škrk, J., Turk, V. (1995): Lysosomal proteases cathepsins D, B, H, L and their inhibitors stefins A and B in head and neck cancer. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **376**: 401-405.
- Kos, J., Lah, T. T. (1998): Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review). *Oncol. Rep.* **5**: 1349-1361.
- Kos, J., Sekirnik, A., Kopitar, G., Cimerman, N., Kayser, K., Stremmer, A., Fiehn, W., Werle, B. (2001): Cathepsin S in tumours, regional lymph nodes and sera of patients with lung cancer: relation to prognosis. *Br. J. Cancer* **85**: 1193-1200.
- Koyama, H., Goodpasture, C., Miller, M. M., Teplitz, R. L., Riggs, A. D. (1978): Establishment and characterization of a cell line from the American opossum (*Didelphys virginiana*). *In Vitro* **14**: 239-246.
- Kulling, P., Andersson, H., Bostrom, K., Johansson, L. A., Lindstrom, B., Nystrom, B. (1992): Fatal systemic poisoning after skin exposure to monochloroacetic acid. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **30**: 643-652.
- Kumamoto, T., Ueyama, H., Sugihara, R., Kominami, E., Goll, D. E., Tsuda, T. (1997): Calpain and cathepsins in the skeletal muscle of inflammatory myopathies. *Eur. Neurol.* **37**: 176-181.
- Kusch, G. D., McCarty, L. P., Lanham, J. M. (1990): Monochloroacetic acid exposure: a case report. *Pol. J. Occup. Med.* **3**: 409-414.
- Lah, T. T., Kos, J. (1998): Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis. *Biol. Chem.* **379**: 125-130.

- Lang, A., Horler, D., Baici, A. (2000): The relative importance of cysteine peptidases in osteoarthritis. *J. Rheumatol.* **27**: 1970-1979.
- Lash, L. H. (1998): In vitro methods of assessing renal damage. *Toxicol. Pathol.* **26**: 33-42.
- Leist, M., Nicotera, P. (1997): The shape of cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**: 1-9.
- Lemere, C. A., Munger, J. S., Shi, G. P., Natkin, L., Haass, C., Chapman, H. A., Selkoe, D. J. (1995): The lysosomal cysteine protease, cathepsin S, is increased in Alzheimer's disease and Down syndrome brain. An immunocytochemical study. *Am. J. Pathol.* **146**: 848-860.
- Lenarcic, B., Bevec, T. (1998): Thyropins – new structurally related proteinase inhibitors. *Biol. Chem.* **379**: 105-111.
- Lennon-Duménil, A.-M., Roberts, R. A., Valentijn, K., Driessen, C., Overkleeft, H. S., Erickson, A., Peters, P. J., Bikoff, E., Ploegh, H. L., Wolf Bryant, P. (2001): The p41 isoform of invariant chain is a chaperone for cathepsin L. *EMBO J.* **20**: 4055-4064.
- Li, Q., Falkler, W. A. Jr., Bever, C. T. Jr. (1997): Endotoxin induces increased intracellular cathepsin B activity in THP-1 cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **19**: 215-237.
- Lieberthal, W., Levine, J. S. (1996): Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am. J. Physiol.* **271**: F477-F488.
- Lindström, K., Österberg, F. (1986): Chlorinated carboxylic acids in softwood kraft pulp spent bleach liquors. *Environ. Sci. Technol.* **20**: 133-136.
- Linebaugh, B. E., Sameni, M., Day, N. A., Sloane, B. F., Keppler, D. (1999): Exocytosis of active cathepsin B enzyme activity at pH 7.0, inhibition and molecular mass. *Eur. J. Biochem.* **264**: 100-109.
- Liuzzo, J. P., Petanceska, S. S., Moscatelli, D., Devi, L. A. (1999): Inflammatory mediators regulate cathepsin S in macrophages and microglia: A role in attenuating heparan sulfate interactions. *Mol. Med.* **5**: 320-333.
- Maciewicz, R. A., Etherington, D. J. (1988): A comparison of four cathepsins (B, L, N and S) with collagenolytic activity from rabbit spleen. *Biochem. J.* **256**: 433-440
- Majno, G., Joris, I. (1995): Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* **146**: 3-15.

- Maksimov, G. G., Dubinina, O. N. (1974): Data on the experimental establishment of maximum permissible concentration of monochloroacetic acid in the air of a work zone. *Gig. Tr. Prof. Zabol.* **9**: 32-35.
- Mason, R. W. (1986): Species variants of cathepsin L and their immunological identification. *Biochem. J.* **240**: 285-288.
- McGrath, M. E., Palmer, J. T., Bromme, D., Somoza, J. R. (1998): Crystal structure of human cathepsin S. *Protein Sci.* **7**: 1294-1302.
- Merker, K., Stolzing, A., Grune, T. (2001): Proteolysis, caloric restriction and aging. *Mech. Ageing Dev.* **122**: 595-615.
- Merker, K., Ullrich, O., Schmidt, H., Sitte, N., Grune, T. (2003): Stability of the nuclear protein turnover during cellular senescence of human fibroblasts. *FASEB J.* **17**: 1963-1965.
- Mitroka, J. G. (1989): Monochloroacetic acid lethality in the rat in relation to lactic acid accumulation in the cerebrospinal fluid. Dissertation, Rutgers State University of New Jersey, No. 9008948.
- Millischer, R. J. et al. (1987): Monochloroacetic acid: seven worldwide cases of systemic poisoning resulting from accidental skin contact. Occupational Health in Chemical Industry. 22th ICOH-Congress, Sydney: 138-144.
- Morgan, S. J., Darling, D. C. (1994): Kultur tierischer Zellen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Morita, T., Kato, H., Iwanaga, S., Takada, K., Kimura, T. (1977): New fluorogenic substrates for alpha-thrombin, factor Xa, kallikreins, and urokinase. *J. Biochem.* **82**: 1495-1498.
- Musil, D., Zucic, D., Turk, D., Engh, R. A., Mayr, I., Huber, R., Popovic, T., Turk, V., Towatari, T., Katunuma, N., Bode, W. (1991): The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J.* **10**: 2321-2330.
- Nakagawa, T., Roth, W., Wong, P., Nelson, A., Farr, A., Deussing, J., Villadangos, J. A., Ploegh, H., Peters, C., Rudensky, A. Y. (1998): Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* **280**: 450-453.
- Nakagawa, T. Y., Rudensky, A. Y. (1999): The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol. Rev.* **172**: 121-129.
- Nicklin, M. J., Barrett, A. J. (1984): Inhibition of cysteine proteinases and dipeptidyl peptidase I by egg-white cystatin. *Biochem. J.* **223**: 245-253.

- Olbricht, C. J., Steinker, M., Auch-Schwelk, W., Bossaller, C., Haas, J., Koch, K. M. (1994): Effect of cyclosporin on kidney proteolytic enzymes in men and rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* **9**: 22-26.
- Otto, H. H., Schirmeister, T. (1997): Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chem. Rev.* **97**: 133-172.
- Paul, J. (1980): Zell- und Gewebekulturen. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Petanceska, S., Devi, L. (1992): Sequence analysis, tissue distribution, and expression of rat cathepsin S. *J. Biol. Chem.* **267**: 26038-26043.
- Petropoulos, I., Conconi, M., Wang, X., Hoemel, B., Bregegere, F., Milner, Y., Friguert, B. (2000): Increase of oxidatively modified protein is associated with a decrease of proteasome activity and content in aging epidermal cells. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **55**: B220-B227.
- Plewa, M. J., Kargalioglu, Y., Vankerk, D., Minear, R. A., Wagner, E. D. (2002): Mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity analysis of drinking water disinfection by-products. *Environ. Mol. Mutagen.* **40**: 134-142.
- Podgorski, I., Sloane, B. F. (2003): Cathepsin B and its role(s) in cancer progression. *Biochem. Soc. Symp.* **70**: 263-276.
- Polet, H., Swager, J. S. (1987): Effects of serum and conditioned medium on protein degradation, migration of nonhistone proteins to the nucleus, and DNA synthesis in transformed cells. *J. Cell Physiol.* **130**: 436-443.
- Preisig, P. A., Franch, H. A. (1995): Renal epithelial cell hyperplasia and hypertrophy. *Semin. Nephrol.* **15**: 327-340.
- Qian, F., Chan, S. J., Gong, Q. M., Bajkowski, A. S., Steiner, D. F., Frankfater, A. (1991): The expression of cathepsin B and other lysosomal proteinases in normal tissues and in tumors. *Biomed. Biochim. Acta* **50**: 531-540.
- Quinn, P. S., Judah, J. D. (1978): Calcium-dependent Golgi-vesicle fusion and cathepsin B in the conversion of proalbumin into albumin in rat liver. *Biochem. J.* **172**: 301-309.
- Rabkin, R., Shechter, P., Shi, J. D., Boner, G. (1996): Protein turnover in the hypertrophying kidney. *Miner Electrolyte Metab.* **22**: 153-156.
- Reddy, V. Y., Zhang, Q. Y., Weiss, S. J. (1995): Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**: 3849-3853.
- Reimann, S., Grob, K., Frank, H. (1996): Chloroacetic acids in rainwater. *Environ. Sci. Technol.* **30**: 2340-2344.



- Reinheckel, T., Deussing, J., Roth, W., Peters, C. (2001): Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: phenotypes of mice deficient for cathepsin B or cathepsin L. *Biol. Chem.* **382**: 735-741.
- Riese, R. J., Wolf, P. R., Brömme, D., Natkin, L. R., Villadangos, J. A., Ploegh, H. L., Chapman, H. A. (1996): Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* **4**: 357-366.
- Risk Assessment (2003): Risk Assessment Monochloroacetic Acid (MCAA), CAS-No.: 79-11-8, EINECS-No.: 201-178-4. The Netherlands Ministry of Housing, Spatial Planning and the Environment.
- Rivett, A. J. (1998): Intracellular distribution of proteasomes. *Curr. Opin. Immunol.* **10**: 110-114.
- Roche Molecular Biochemicals (2003): Apoptosis and cell proliferation. 2<sup>nd</sup> revised Edition.
- Rogers, D. R. (1995): Accidental fatal monochloroacetic acid poisoning. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* **16**: 115-116.
- Ronning O. W., Lindmo T., Pettersen E. O., Seglen P. O. (1981): Effect of serum step-down on protein metabolism and proliferation kinetics of NHIK 3025 cells. *J. Cell Physiol.* **107**: 47-57.
- Rosa, F. M., Cochet, M. M., Fellous, M. (1986): Interferon and major histocompatibility complex genes: a model to analyse eukaryotic gene regulation? *Interferon* **7**: 47-87.
- Roshy, S., Sloane, B. F., Moin, K. (2003): Pericellular cathepsin B and malignant progression. *Cancer Metastasis Rev.* **22**: 271-286.
- Roth, W., Deussing, J., Botchkarev, V. A., Pauly-Evers, M., Saftig, P., Hafner, A., Schmidt, P., Schmahl, W., Scherer, J., Anton-Lamprecht, I., Von Figura, K., Paus, R., Peters, C. (2000): Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J.* **14**: 2075-2086.
- Rubin-Kelley, V. E., Jevnikar, A. M. (1991): Antigen presentation by renal tubular epithelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2**: 13-26.
- Saegusa, K., Ishimaru, N., Yanagi, K., Arakaki, R., Ogawa, K., Saito, I., Katunuma, N., Hayashi, Y. (2002): Cathepsin S inhibitor prevents autoantigen presentation and autoimmunity. *J. Clin. Invest.* **110**: 361-369.

- Schaefer, L., Schaefer, R. M., Ling, H., Teschner, M., Heidland, A. (1994): Renal proteinases and kidney hypertrophy in experimental diabetes. *Diabetologia* **37**: 567-571.
- Schaub, A. C. (2001): Analyse von Interferon-gamma induzierten Genen in Makrophagen: Klonierung und Charakterisierung von PUMA-G und Inaktivierung des Gens in der Maus. Naturwissenschaftliche Dissertation, Technische Universität München.
- Schiek, D. (2001): Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von Natriummonochloracetat auf kultivierte Nieren- und Leberepithelzellen. Med. Dissertation, Universität Tübingen.
- Schmid, H., Koop, M., Utermann, S., Lambacher, L., Mayer, P., Schaefer, L. (1997): Specific catalytic activity of cathepsin S in comparison to cathepsins B and L along the rat nephron. *Biol. Chem.* **378**: 61-69.
- Schmid, H., Nguyen-Xuan, T., Tran, M., Schwarz, G., Brandenburg, J., Weber, E., Reich, M., Kalbacher, H., Wiesinger, H. (2004 a, zur Publikation eingereicht): Differences in modulation of the endosomal and the lysosomal distribution of active cathepsins B, L and S in cell lines derived from murine microglia cells and macrophages.
- Schmid, H., Englert, J., Schwarz, G., Brandenburg, J., Schröter, C., Flad, T., Reich, M., Kalbacher, H., Weber, E. (2004 b, zur Publikation eingereicht): Activity Levels and Endosomal/Lysosomal Distribution of Cathepsins B, L and S Reflect the Different Functions of Various Types of Antigen-Presenting Cells.
- Schröter, C. J. (1999): Die Rolle endosomal-lysosomaler Proteasen bei der Prozessierung MHC Klasse II-präsentierter Antigene. Naturwissenschaftliche Dissertation, Universität Tübingen.
- Schwarz, G., Boehncke, W. H., Braun, M., Schröter, C. J., Burster, T., Flad, T., Dressel, D., Weber, E., Schmid, H., Kalbacher, H. (2002): Cathepsin S activity is detectable in human keratinocytes and is selectively upregulated upon stimulation with interferon-gamma. *J. Invest. Dermatol.* **119**: 44-49.
- Seglen, P. O., Bohley, P. (1992): Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia* **48**: 158-172.
- Shi, G. P., Webb, A. C., Foster, K. E., Knoll, J. H., Lemere, C. A., Munger, J. S., Chapman, H. A. (1994): Human cathepsin S: chromosomal localization, gene structure, and tissue distribution. *J. Biol. Chem.* **269**: 11530-11536.
- Shringarpure, R., Davies, K. J. (2002): Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Radic. Biol. Med.* **32**: 1084-1089.

- SIDS, 1994: SIDS initial assessment report on the OECD HPV chemical Monochloro-acid (MCAA) & Sodium monochloroacetate (SMCA). KEMI, 30<sup>th</sup> September.
- Simonnet, H., Gauthier, C., Pellet, M. (1980): Effect of acidosis, alkalosis and mono-fluoroacetate administration on citrate and ATP content of rat renal medulla and papilla. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **88**: 69-74.
- Sitte, N., Huber, M., Grune, T., Ladhoff, A., Doecke, W. D., von Zglinicki, T., Davies, K. J. (2000 a): Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts. *FASEB J.* **14**: 1490-1498.
- Sitte, N., Merker, K., von Zglinicki, T., Grune, T., Davies, K. J. (2000 b): Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I--effects of proliferative senescence. *FASEB J.* **14**: 2495-2502.
- Sitte, N., Merker, K., von Zglinicki, T., Davies, K. J., Grune, T. (2000 c): Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II--aging of nondividing cells. *FASEB J.* **14**: 2503-2510.
- Sitte, N., Merker, K., von Zglinicki, T., Grune, T. (2000 d): Protein oxidation and degradation during proliferative senescence of human MRC-5 fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* **28**: 701-708.
- Slot, L. A., Lauridsen, A. M., Hendil, K. B. (1986): Intracellular protein degradation in serum-deprived human fibroblasts. *Biochem. J.* **237**: 491-498.
- Sluyterman, L. A. (1968): The rate-limiting reaction in papain action as derived from the reaction of the enzyme with chloroacetic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **151**: 178-187.
- Solovyeva, N. I., Balayevskaya, T. O., Dilakyan, E. A., Zakamaldina-Zama, T. A., Pozdnev, V. F., Topol, L. Z., Kissel'jov, F. L. (1995): Proteolytic enzymes at various stages of oncogenic transformation of rat fibroblasts. I. Aspartyl and cysteine proteinases. *Int. J. Cancer* **60**: 495-500.
- Steer, M. L. (1992): How and where does acute pancreatitis begin? *Arch. Surg.* **127**: 1350-1353.
- Storm van's Gravesande, K., Layne, M. D., Ye, Q., Le, L., Baron, R. M., Perrella, M. A., Santambrogio, L., Silverman, E. S., Riese, R. J. (2002): IFN regulatory factor-1 regulates IFN-gamma-dependent cathepsin S expression. *J. Immunol.* **168**: 4488-4494.
- Strojnik, T., Kos, J., Zidanik, B., Golouh, R., Lah, T. (1999): Cathepsin B immunohistochemical staining in tumor and endothelial cells is a new prognostic factor for survival in patients with brain tumors. *Clin. Cancer Res.* **5**: 559-567.

- Sukhova, G. K., Zhang, Y., Pan, J. H., Wada, Y., Yamamoto, T., Naito, M., Kodama, T., Tsimikas, S., Witztum, J. L., Lu, M. L., Sakara, Y., Chin, M. T., Libby, P., Shi, G. P. (2003): Deficiency of cathepsin S reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **111**: 897-906.
- Takahashi, H., Ishidoh, K., Muno, D., Ohwada, A., Nukiwa, T., Kominami, E., Kira, S. (1993): Cathepsin L activity is increased in alveolar macrophages and bronchoalveolar lavage fluid of smokers. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**: 1562-1568.
- Takahashi, S., Murakami, K., Miyake, Y. (1982): Activation of kidney prorenin by kidney cathepsin B isozymes. *J. Biochem.* **91**: 419-422.
- Thomssen, C., Schmitt, M., Goretzki, L., Oppelt, P., Pache, L., Dettmar, P., Janicke, F., Graeff, H. (1995): Prognostic value of the cysteine proteases cathepsins B and cathepsin L in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **1**: 741-746.
- Trabandt, A., Muller-Ladner, U., Kriegsmann, J., Gay, R. E., Gay, S. (1995): Expression of proteolytic cathepsins B, D, and L in periodontal gingival fibroblasts and tissues. *Lab. Invest.* **73**: 205-212.
- Turk, B., Dolenc, I., Turk, V., Bieth, J. G. (1993): Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry* **32**: 375-380.
- Turk, B., Turk, V., Turk, D. (1997): Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol. Chem.* **378**: 141-150.
- Turk, B., Dolenc, I., Lenarcic, B., Krizaj, I., Turk, V., Bieth, J. G., Bjork, I. (1999): Acidic pH as a physiological regulator of human cathepsin L activity. *Eur. J. Biochem.* **259**: 926-932.
- Turk, B., Turk, D., Turk, V. (2000): Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**: 98-111.
- Turk, V., Turk, B., Guncar, G., Turk, D., Kos, J. (2002): Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. *Adv. Enzyme Regul.* **42**: 285-303.
- Van Cruchten, S., Van Den Broeck, W. (2002): Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat. Histol. Embryol.* **31**: 214-223.
- Villadangos, J. A., Bryant, R. A., Deussing, J., Driessen, C., Lennon-Dumenil, A. M., Riese, R. J., Roth, W., Saftig, P., Shi, G. P., Chapman, H. A., Peters, C., Ploegh, H. L. (1999): Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol. Rev.* **172**: 109-120.
- Villadangos, J. A., Ploegh, H. L. (2000): Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? *Immunity* **12**: 233-239.

- Vray, B., Hartmann, S., Hoebeke, J. (2002): Immunomodulatory properties of cystatins. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 1503-1512.
- Wang, P. H., Do, Y. S., Macaulay, L., Shinagawa, T., Anderson, P. W., Baxter, J. D., Hsueh, W. A. (1991): Identification of renal cathepsin B as a human prorenin-processing enzyme. *J. Biol. Chem.* **266**: 12633-12638.
- Warburton, M. J., Poole, B. (1977): Effect of medium composition on protein degradation and DNA synthesis in rat embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 2427-2431.
- Werle, B., Ebert, W., Klein, W., Spiess, E. (1994): Cathepsin B in tumors, normal tissue and isolated cells from the human lung. *Anticancer Res.* **14**: 1169-1176.
- Wharton S. A., Riley, P. A. (1986): The suppression of endogenous protein degradation by fractions of foetal calf serum: dialysed serum is less able to suppress degradation in aged cells. *Cell Biochem. Funct.* **4**: 189-195 .
- Wiederanders, B., Brömme, D., Kirschke, H., Kalkkinen, N., Rinne, A., Paquette, T., Toothman, P. (1991): Primary structure of bovine cathepsin S. Comparison to cathepsins L, H, B and papain. *FEBS Lett.* **286**: 189-192.
- Wiederanders, B. (2003): Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. *Acta Biochim. Pol.* **50**: 691-713.
- Williamson, D. H., Krebs, H. A., Stubbs, M., Ann Page, M., Morris, H. P., Weber, G. (1970): Metabolism of renal tumors in situ and during ischemia. *Cancer Res.* **30**: 2049-2054.
- Willstätter, R., Bamann, E. (1929): Über die Proteasen der Magenschleimhaut. Erste Abhandlung über die Enzyme der Leukozyten. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **180**: 127-143:
- Wolters, P. J., Chapman, H. A. (2000): Importance of lysosomal cysteine proteases in lung disease. *Respir. Res.* **1**: 170-177.
- Würl, P., Taubert, H., Meye, A., Dansranjav, T., Weber, E., Günther, D., Berger, D., Schmidt, H., Dralle, H., Rath, F. W. (1997): Immunohistochemical and clinical evaluation of cathepsin expression in soft tissue sarcomas. *Virchows Arch.* **430**: 221-225.
- Wuthrich, R. P., Glimcher, L. H., Yui, M. A., Jevnikar, A. M., Dumas, S. E., Kelley, V. E. (1990): MHC class II, antigen presentation and tumor necrosis factor in renal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* **37**: 783-792.
- Yamaguchi, N., Chung, S. M., Shiroeda, O., Koyama, K., Imanishi, J. (1990): Characterization of a cathepsin L-like enzyme secreted from human pancreatic cancer cell line HPC-YP. *Cancer Res.* **50**: 658-663.

Yllner, S. (1971): Metabolism of chloroacetate-1- <sup>14</sup>C in the mouse. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **30**: 69-80.

Zwicky, R., Muntener, K., Goldring, M. B., Baici, A. (2002): Cathepsin B expression and down-regulation by gene silencing and antisense DNA in human chondrocytes. *Biochem. J.* **367**: 209-217.

# DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. P. C. Dartsch danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die wohlwollende Betreuung insbesondere des zellbiologischen Teils dieser Arbeit, alle Hilfestellung in computertechnischen Fragen, besonders in der Erstellung der Grafiken, sowie seine unverbrüchliche Loyalität.

Frau Dr. H. Schmid danke ich für die engagierte Betreuung insbesondere des Cathepsin-Teils der vorliegenden Arbeit, alle lehrreichen und aufmunternden Gespräche und die sorgfältige und konstruktive Durchsicht des Manuskripts.

Außerdem gilt mein Dank Frau M. Heilig für die Einweisung in Zellkultur-Techniken sowie Herrn G. Schwarz für die Anleitung bei Proteinbestimmung und differentieller Zentrifugation.

# LEBENS LAUF

## Angaben zur Person

Name: Cordula Christine Günter  
Geburtsdatum und -ort: 18.08.1971, Singen  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Schulbildung

09.1982 – 06.1991 Hegau-Gymnasium Singen, Abschluss: Abitur

## Berufsausbildung

10.1991 – 09.1993 Studium für das Lehramt an Gymnasien in den Fächern Deutsch, Katholische Theologie und Philosophie (Universität Freiburg)

04.1994 – 09.2001 Vorklinisches und Klinisches Studium der Medizin (Universität Tübingen)

10.2001 – 09.2002 Praktisches Jahr (Dundee (UK), Böblingen)

15.05.2003 Ärztliche Prüfung

08.1999 – 08.2004 Anfertigung der Dissertation im Institut für Arbeits- und Sozialmedizin sowie im Institut für Pathologie der Universität Tübingen gefördert durch das fortüne-Programm Nr. 367 und 497 des Universitätsklinikums Tübingen

### Abstract/Poster:

Heide Schmid, Cordula Günter, Gerold Schwarz, Peter C. Dartsch (1999): Sodium monochloroacetate (SMCA) causes cytotoxic effects and a preferential decrease of cathepsin B activity in human kidney cells. International Proteolysis Society, First General Meeting (25.–30. September, 1999), Mackinac Island, Michigan, USA.